



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE YIN
YANG EN EL CÁNCER DE OVARIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. ALEJANDRA BEATRIZ CERVANTES GARDUÑO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Gisela Ceballos Cancino

México, D.F.

JUNIO DE 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de febrero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **CERVANTES GARDUÑO ALEJANDRA BEATRIZ** con número de cuenta **98011636** con la tesis titulada: **“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE YIN YANG EN EL CÁNCER DE OVARIO”** realizada bajo la dirección de: **DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO**

| | | |
|-------------|------|--------------------------------|
| Presidente: | DRA. | SARA HUERTA YEPEZ |
| Vocal: | DR. | LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA |
| Secretario: | DR. | VÍCTOR MANUEL RUÍZ LÓPEZ |
| Suplente: | DR. | MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES |
| Suplente: | DRA. | MARÍA ISABEL SOTO CRUZ |

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de mayo de 2011

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas todo el apoyo brindado, las atenciones y sobre todo las herramientas para concluir exitosamente mi maestría en Ciencias Biológicas.

A CONACYT agradezco la beca otorgada durante mis estudios de posgrado, indispensable para cumplir con esta etapa académica.

A los miembros de mi Comité Tutor: a la Dra. Gisela Ceballos, la Dra. Isabel Soto y al Dr. Víctor Ruiz; gracias por las sugerencias, consejos y por el tiempo dedicado a mi proyecto de investigación, elementos indispensables para mi desarrollo académico.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| El cáncer de ovario | 5 |
| Clasificación histológica del cáncer de ovario | 6 |
| Etiología del cáncer de ovario epitelial | 7 |
| Marcadores tumorales en el cáncer de ovario | 9 |
| Tratamiento en el cáncer de ovario | 10 |
| Paclitaxel..... | 10 |
| Docetaxel..... | 10 |
| Cisplatino | 11 |
| Yin Yang 1 | 12 |
| Yin Yang 2 | 14 |
| Yin Yang 1 y el cáncer | 15 |
| RNAi | 18 |
| ANTECEDENTES DIRECTOS Y JUSTIFICACIÓN | 19 |
| HIPÓTESIS | 19 |
| OBJETIVOS | 20 |
| Objetivo general | 20 |
| Objetivos específicos | 20 |
| METODOLOGÍA | 21 |
| Líneas celulares..... | 21 |
| Cultivo celular | 21 |
| Criopreservación..... | 21 |
| Transfección..... | 21 |
| Viabilidad celular | 22 |
| Extracción de RNA total | 22 |
| RT-PCR | 22 |
| Bloques de parafina..... | 23 |
| Microarreglos de tejidos..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| Inmunohistoquímica | 24 |
| Revisión de laminillas | 25 |
| Análisis Bioestadístico | 25 |
| RESULTADOS | 26 |
| Características clínicas de las muestras de cáncer de ovario..... | 26 |
| Análisis de la expresión de YY1, YY2 Y P16 en muestras de cáncer de ovario | 32 |
| Correlación entra la expresión de YY1, YY2 Y P16 con las variables clínicas | 38 |
| Expresión de Yin Yang en células de cáncer de ovario | 42 |
| Efectos en la inhibición de los Yin Yang en la sensibilidad a antineoplásicos | 43 |
| Inhibición de YY1 y YY2 por RNA de interferencia..... | 43 |
| Sensibilidad al taxol y al cisplatino | 44 |
| DISCUSIÓN | 46 |
| CONCLUSIONES | 51 |
| ANEXOS..... | 52 |
| Anexo 1. Tabla 1 Estadios del cáncer de ovario | 52 |
| Anexo 2. Tabla 2. Tipos histológicos del cáncer de ovario | 54 |
| Anexo 3. Marcadores tumorales | 55 |
| Anexo 4. Abreviaturas | 56 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 58 |

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. . Fotografías de los cuatro subtipos histológicos del cáncer de ovario epitelial..... | 6 |
| Figura 2. Etiología del cáncer de ovario epitelial..... | 8 |
| Figura 3. Homología en las estructuras de las proteínas YY1 y YY2 | 14 |
| Tabla 1. Expresión de YY1 en cáncer | 17 |
| Gráfica 1. Histograma de las edades de las pacientes..... | 26 |
| Gráfica 2. Distribución de la edad de la menarca de las pacientes con cáncer de ovario..... | 27 |
| Gráfica 3. Porcentajes de pacientes que cursan menopausia | 28 |
| Gráfica 4. Distribución de los estadios clínicos | 29 |
| Gráfica 5. Porcentaje de los tipos histológicos | 30 |
| Gráfica 6. Porcentajes de los grados de diferenciación | 31 |
| Figura 4. Inmunocitoquímica de YY1 en células de cáncer | 32 |
| Figura 5. Inmunocitoquímica de YY2 en células de cáncer..... | 33 |
| Figura 6. Inmunocitoquímica de P16 en células de cáncer..... | 34 |
| Figura 7. Expresión de YY1 en cáncer de ovario | 35 |
| Figura 8. Expresión de YY2 en cáncer de ovario | 36 |
| Figura 9. Expresión de P16 en cáncer de ovario..... | 37 |
| Tabla 2. Correlación de la expresión de YY2 y las variables clínicas | 39 |
| Gráfica 7. Expresión de YY2 en los subtipos histológicos de cáncer de ovario | 40 |
| Tabla 3. Correlación de la expresión de p16 y las variables clínicas | 41 |
| Figura 10. Curvas de saturación de las proteínas Yin Yang en células de cáncer..... | 42 |
| Figura 11. Inhibición por RNAi de YY1 y de YY2..... | 43 |
| Gráfica 8. Sensibilidad en las células SKLuc, y SKRNAiYY1 | 44 |
| Gráfica 9. Sensibilidad en las células SKLuc, y SKRNAiYY2..... | 45 |
| ANEXOS | 52 |
| Tabla 1. Estadios del cáncer de ovario | 52 |
| Tabla 2. Tipos histológicos del cáncer de ovario | 54 |
| Tabla 3. Marcadores tumorales del cáncer de ovario..... | 55 |
| Tabla de abreviaturas..... | 56 |

RESUMEN

El cáncer de ovario es una de las principales causas de muerte dentro de los cánceres ginecológicos en el mundo, con tasa de mortalidad mayor al 60%.

En México, ocupa el segundo lugar en frecuencia dentro de las neoplasias ginecológicas.

El cáncer de ovario se diagnóstica en más del 75% de los casos en etapas avanzadas y con metástasis distales. El 25% de las pacientes que reciben tratamiento tienen una sobrevivida de 5 años aproximadamente.

Yin Yang 1 (YY1) y Yin Yang 2 (YY2) son proteínas que tienen la capacidad de regular distintos procesos celulares, mediante la activación o represión de genes involucrados en los procesos normales y tumorigénicos.

YY1 es un factor de transcripción que tiene un papel fundamental en procesos biológicos. Se ha propuesto que YY1, puede actuar como un iniciador de la tumorigénesis y además servir como un marcador pronóstico y/o diagnóstico. Se ha mostrado que la expresión de YY1 está asociada con algunos tipos de cáncer.

YY2 tiene homología estructural y funcional con YY1. Aunque no hay muchos estudios sobre esta proteína, se ha reportado que YY2 tiene la capacidad de interactuar con secuencias de DNA a las que se une YY1.

Debido a la carencia de marcadores pronóstico en el cáncer de ovario, así como la frecuencia, la mortalidad y la baja repuesta al tratamiento estándar, es necesario buscar nuevos marcadores para ésta enfermedad. El papel de las proteínas YY en la regulación de los procesos tumorales y sus posibles implicaciones en la respuesta a los antineoplásicos, sugieren que pueden tener un papel en el desarrollo del cáncer de ovario o como un marcador en esta enfermedad.

En este trabajo se analizó la expresión de YY1, YY2 y p16 en cáncer de ovario usando microarreglos de tejido. El análisis de la expresión se hizo con inmunohistoquímica y se evaluó el nivel de expresión de cada una de las proteínas para realizar una correlación con las variables clínicas. Para conocer más sobre el papel de YY1 y YY2 *in vitro* se midió el nivel de

expresión de las proteínas Yin Yang en células de cáncer de ovario, posteriormente se uso la técnica de RNA de interferencia para inhibir de forma específica la expresión de cada una de las proteínas Yin Yang. Se comprobó la eficiencia de la inhibición en las células transfectadas a nivel de mensajero y para conocer si hay cambios en la sensibilidad a los fármacos se realizaron pruebas de viabilidad con taxol y cisplatino.

Los resultados muestran que no hay una expresión significativa de YY1 en las muestras cáncer de ovario, la expresión de YY2 está asociada al subtipo histológico seroso en 80% de los casos. Este subtipo de cáncer es el de peor pronóstico y el más agresivo, por lo tanto la expresión de YY2 podría ayudar a diagnosticar este tipo de cáncer. Finalmente encontramos una alta expresión de p16 en la mayoría de las muestras, pero no hay correlación entre la expresión de esta proteína con las variables clínicas.

La inhibición de la expresión de los factores Yin Yang en las células SKOV3 se comprobó con los niveles de mensajero y no se encontró diferencia significativa en la sensibilidad a los fármacos en las células transfectadas, es probable que los niveles de expresión basal de YY1 y YY2 en esta línea celular sean tan bajos que al inhibir la expresión de estas proteínas no hay un efecto en la viabilidad celular y en la sensibilidad al taxol y al cisplatino.

Abstract

Ovarian cancer is one of the main causes of death in gynecological cancers worldwide, with a mortality rate above 60%. In Mexico, it has the 2nd place in frequency of all gynecological neoplasias.

Ovarian cancer is diagnosed in advanced stages in more than 75% of the cases and with distant metastasis 25% of the patients that receive treatment have a 5 year survival rate.

Ying Yang 1 (YY1) and Ying Yang 2 (YY2) are proteins that can regulate different cellular processes, by of genes activation or repressions that are involved in normal and tumorigenic processes.

YY1 is a transcription factor that has a fundamental role in biological processes like embryogenesis, cellular differentiation, replication and proliferation. It has been proposed that YY1 may act as a tumor initiator, and also can be useful as a prognostic and/or diagnostic marker. It has been showed that YY1 expression is associated with some cancer types.

As the role of YY1 in ovarian cancer, a previous study shows that this protein modulates the taxane response *in vitro*. Previous obtained data of microarrays show a correlation between YY1 expression and genes and regulate the survival rate in patients treated with taxol.

YY2 share a structural and functional homology with YY1. Even though there are few studies about this protein, it's been reported that this molecule can interact with the same DNA sequences that YY1 binds to.

The lack of prognosis and diagnostic markers in ovarian cancer, as well as the high mortality and the poor response to the standard treatment in this disease points to the necessity of new markers and therapeutical targets for the treatment of patients. The role of the ying yang proteins in the tumor process regulation and their possible implications in the neoplastic response, suggest that they may have an important roll in ovarian cancer development or as a marker for this type of cancer.

The results show that there is no significant expression of YY1 in the ovarian cancer, the expression of YY2 is associated with the serous subtype in 80% of

the cases. This cancer subtype has the worse prognosis and is the most aggressive cancer type, therefore the expression of YY2 may help in the diagnosis of this cancer type and to determine the treatment course. Finally, we found a high expression of p16 in many of the samples, but there is no correlation between the expression of this protein and the clinical features.

The inhibition of Ying Yang proteins expression in the cell line SKOV3 was analyzed at the level of the messenger of this protein, and no significant difference was observed related the drug sensibility in transfected cells. Therefore, it is likely that the constitutive expression of YY1 y YY2 in this cell line may be extremely low that when the expression of the protein is inhibited no effect in their functions, in this case, viability and sensibility to cisplatin and taxol were observed.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario

El cáncer de ovario ocupa el segundo lugar en frecuencia y es la segunda causa de muerte de los cánceres ginecológicos en el mundo, con una tasa de mortalidad mayor al 60% [1, 2]. En México, ocupa el segundo lugar en frecuencia y es causante de 340000 muertes por año dentro de las neoplasias ginecológicas y se presenta principalmente en mujeres menores a los 60 años [3]. (Rizo y col., 2007).

El cáncer de ovario es una enfermedad heterogénea con respecto a su histopatología, a su biología molecular y en los resultados clínicos [4]. En estadios tempranos la enfermedad es asintomática y más del 75% de los diagnósticos se hacen cuando la enfermedad ya está en etapas avanzadas y con metástasis distales [5]. En las pacientes con estadios avanzados aproximadamente el 25% tienen una sobrevida de 5 años después del tratamiento [4, 5].

Los factores clínicos como la edad, el estadio, las complicaciones posteriores a la primer laparotomía, el grado de diferenciación y la respuesta a la quimioterapia son empleados como marcadores pronósticos, sin tener los resultados óptimos en el tratamiento de esta enfermedad [6].

El cáncer de ovario es clasificado en diferentes estadios, el sistema más empleado es el de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia), (Ver anexo 1). Esta clasificación se basa en los hallazgos encontrados durante la exploración quirúrgica [6].

Clasificación histopatológica del cáncer de ovario

La determinación del tipo histológico en las muestras de las pacientes es importante, el tipo histológico determina la morfología del tumor, las manifestaciones clínicas, el tratamiento clínico y las alteraciones genéticas que presenten. El cáncer de ovario se divide en 3 tipos histológicos: cáncer de ovario de células germinales (oocitos), cáncer de ovario de células del estroma y *cáncer de ovario epitelial*. El más frecuente es el cáncer de ovario epitelial, este tipo de cáncer es heterogéneo y se clasifica en cuatro subtipos histológicos [7].

Los subtipos histológicos del cáncer de ovario epitelial son los siguientes: seroso, endometriode, mucinoso y de células claras, estos difieren en la morfología tisular como se puede observar en la figura 1 [8]. (Ver anexo 2).

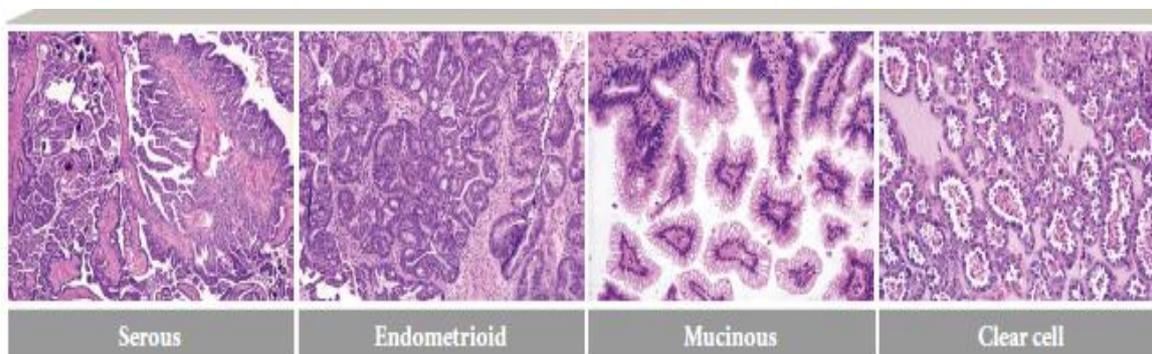


Figura 1. Fotos representativas de los cuatro subtipos histológicos del cáncer de ovario epitelial con tinción de hematoxilina y eosina [9]. El carcinoma *seroso* es de células de la salpíngex en las que se observa solo el núcleo; el carcinoma *endometriode* es parecido a las glándulas endometriales, las células se caracterizan por atipia nuclear; el carcinoma *mucinoso* se asemeja al epitelio endocervical, las células presentan moco en el citoplasma y el núcleo es chico, por último el carcinoma de células claras contiene células de alto grado de diferenciación y el citoplasma es claro.

Etiología del cáncer de ovario epitelial

El modelo tradicional que explica la etiología del cáncer de ovario epitelial propone que todos los subtipos de este cáncer tienen el mismo origen, que es la superficie del epitelio ovárico [10]. Durante la ovulación, la ruptura folicular y la liberación del oocito involucran un trauma físico en la superficie de los ovarios, generando una ruptura en el epitelio la cual tendría que ser reparada [11, 12]. Durante el ciclo reproductivo de la vida de las mujeres este proceso de daño y reparación se repite en múltiples ocasiones, pero este mecanismo genera la producción de citocinas inflamatorias y especies reactivas del oxígeno que son capaces de dañar el DNA. El daño generado al DNA puede favorecer la transformación así como la presencia de hormonas como la gonadotropina, estrógenos y andrógenos que favorecen la proliferación de las células epiteliales y dar como resultado que la transformación neoplásica se convierta en un carcinoma (Figura 2) [10-13].

En el 2004, Shih y Kurman propusieron un segundo modelo que explica el origen del cáncer de ovario epitelial. En este modelo se integran las variables clínicas e histopatológicas con marcadores genéticos como TP53 y KRAS, en base a estos marcadores genéticos se divide al cáncer de ovario epitelial en dos grupos, dependiendo de su origen genético. En el Tipo I se agrupan los tumores que presentan alteraciones en KRAS y en BRAF. Los subtipos histológicos que están en este grupo son: seroso, endometrioides, mucinoso y de las células claras. En el tipo II están agrupados aquellos tumores que presentan severas mutaciones de TP53 (50-80%) y que sobreexpresan Her2 y AKT2. En este grupo están los tumores benignos y los tumores del límite poco diferenciados; también los tumores muy diferenciados como los carcinomas mixtos y los indiferenciados [14].

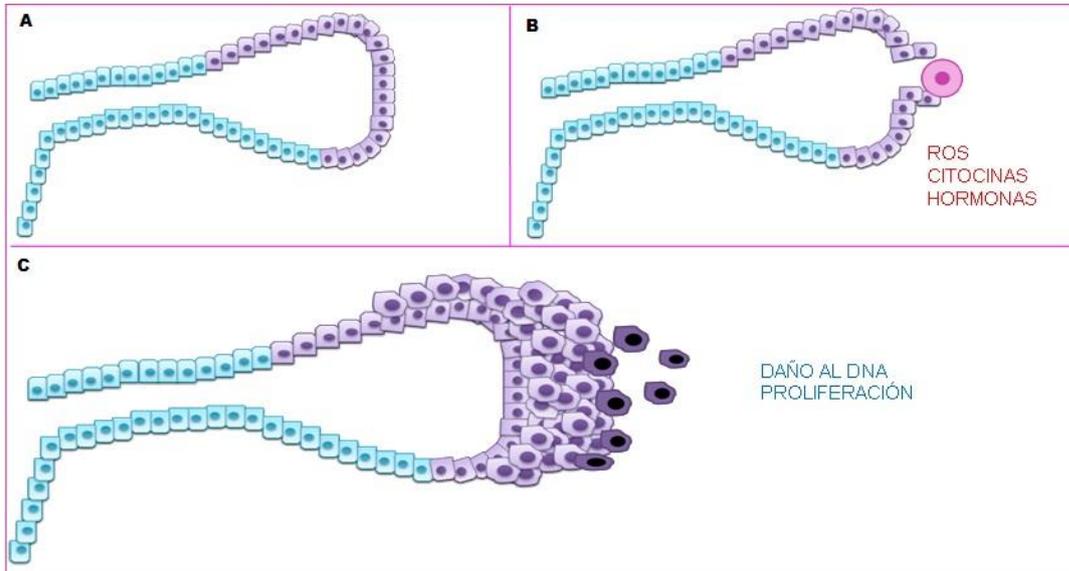


Figura 2. Modelo más aceptado de la etiología del cáncer de ovario epitelial. A) Ovario normal. Una capa de células epiteliales cubre los ovarios. B) La ovulación más factores inductores de transformación como las citocinas inflamatorias, las hormonas y los ROS (Especies Reactivas del oxígeno) inducen estrés en las células epiteliales. C) El estrés constante genera daño al DNA originando células de cáncer de ovario epitelial, las cuales proliferan y pueden generar metástasis locales.

Marcadores tumorales en el cáncer de ovario

El único marcador aprobado en la clínica para el diagnóstico del cáncer de ovario es CA125, aunque no tiene la sensibilidad ni la especificidad necesarias, actualmente se miden los niveles en suero de esta proteína [15, 16]. CA-125 es una glicoproteína transmembranal de alto peso molecular que es expresada por epitelio derivado de Müllerian y celómicos, incluyendo el tejido de las trompas de falopio, endometrio y endo-cérvix y no se expresa en epitelio de ovario normal [17]. CA-125 es expresada en bajos niveles, <35 U/mL en el suero de pacientes sanas, es elevada en aproximadamente el 50% de pacientes con cáncer de ovario en estadio I y aproximadamente el 90% de las pacientes en estadio avanzado expresan niveles altos [18]. Los niveles de CA-125 no tienen mucha sensibilidad en la detección de los estadios tempranos de la enfermedad y en los estadios avanzados se utiliza como marcador diagnóstico. Los valores de CA-125 permiten valorar la respuesta a quimioterapia y determinar el tiempo libre de la enfermedad después del tratamiento [19]. Lamentablemente, los niveles elevados de CA125 pueden ser falsos positivos en el cáncer de ovario debido a que pueden estar asociados a otra enfermedad como la endometriosis [20].

Se han propuesto diversos marcadores como método diagnóstico y pronóstico para el cáncer de ovario (Ver anexo 3), entre ellos se encuentra Her2, p53, BRCA1 y p16 [21, 22]. Dichos marcadores aún están siendo valorados para su aplicación clínica. La expresión de p16 esta asociada a los estadios avanzados del cáncer de ovario [21]. El gen de p16 se localiza en el cromosoma 9p21, codifica para un inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas. El p16 actúa como un regulador del ciclo celular. Ésta proteína está frecuentemente alterada en diferentes tipos de cáncer y es el gen más importante en la susceptibilidad en melanoma [21]. En el cáncer de ovario la expresión de p16 se asocia a la respuesta a la quimioterapia dependiendo de la localización celular de la proteína. Cuando p16 se localiza en el citoplasma

es resistente a los fármacos como el cisplatino y cuando se localiza en el núcleo es sensible al mismo fármaco.

Tratamiento en el cáncer de ovario

El tratamiento del cáncer de ovario depende del estado de la enfermedad, el tipo y grado histológico. El tratamiento estándar para esta enfermedad es la cirugía citoreductiva seguida de varios ciclos de quimioterapia sistémica. La quimioterapia de primera línea combina taxanos como el paclitaxel o el docetaxel con cisplatino [23].

Paclitaxel

El paclitaxel es un antineoplásico de origen natural de la familia de taxanos, aislado de árbol del Tejo Pacífico [24]. Es usado actualmente como tratamiento eficiente en cáncer de mama y cáncer de ovario [25]. El paclitaxel es un estabilizador de microtúbulos, promueve su unión, inhibiendo que se desacoplen y que se den los cambios dinámicos para que progrese la mitosis. Las células tratadas con paclitaxel se arrestan en G2/M [26]. Además de este mecanismo se han descrito sus efectos en la señalización celular y en la expresión de genes, en la activación de proteínas cinasas (MAPKS), Raf-1 y de proteínas tirosinas cinasas (PTK) [27, 28]. Se ha reportado que el tratamiento con paclitaxel en distintos tipos de tumores induce apoptosis [29].

Docetaxel

El docetaxel es un antineoplásico semisintético obtenido del *Taxus baccata*, Es usado en la clínica en quimioterapias combinadas como tratamiento en el cáncer de próstata, el cáncer de mama y el cáncer de ovario [30]. El docetaxel además de estabilizar los microtúbulos y evitar la progresión del ciclo celular, inhibe la fosforilación de Bcl2 induciendo muerte celular [31].

Cisplatino

El cisplatino es uno de los antineoplásicos más empleados en la clínica. Este compuesto fue descubierto en 1965 por Rosenberg y col., [32], es un potente electrófilo que reacciona con varios compuestos orgánicos como los grupos sulfhidrilo de las proteínas y partes nucleofílicas de los ácidos nucleicos. El cisplatino genera daño al DNA produciendo ductos en el DNA, que pueden ser intra e intercatenarios principalmente entre guaninas y adeninas-guaninas [33]. Entre los mecanismos de acción del cisplatino se encuentran: la inhibición de la síntesis de DNA, impidiendo el crecimiento celular; inhibición de la síntesis de RNA, impidiendo la formación de proteínas indispensables para las células y la inducción de la muerte celular por apoptosis [34].

El cisplatino tiene otros efectos como son la producción de radicales libres mediante la interacción con el DNA; y la participación de las proteínas del grupo de alta movilidad (HMG) así como los mecanismos de reparación del DNA [33].

Las proteínas Yin Yang

Yin Yang 1

Yin Yang 1 (YY1) es un factor de transcripción que tiene un papel fundamental en los procesos biológicos como la embriogénesis, la diferenciación, la replicación y la proliferación celular. YY1 regula genes involucrados en los procesos antes mencionados mediante su habilidad para iniciar, activar o reprimir la transcripción dependiendo del contexto en el que se den las interacciones [35]. Se ha propuesto que YY1, además de regular los procesos biológicos normales, puede actuar como un iniciador de la tumorigénesis y además servir como un marcador pronóstico y/o diagnóstico; así mismo puede ser un blanco efectivo para la quimioterapia y la inmunoterapia [35, 36].

YY1 es un miembro de la familia de proteínas *Polycomb*. Esta familia tiene un papel fundamental en la hematopoyesis y en el control del ciclo celular [37-39]. El YY1 fue descubierto y caracterizado por dos grupos independientes de forma simultánea. El grupo de Shi [38, 40] y el grupo de Park y Atchison [38, 40], investigaban la unión de una proteína que regulaba la activación y la represión transcripcional de la proteína AAV. Finalmente, cuando pudieron caracterizarla, la denominaron Yin Yang 1.

El gen de *yy1* se localiza en el cromosoma 14 en el segmento q32.2 [41], consta de cinco exones conservados que codifican para una proteína de 414 aminoácidos, con un peso molecular de 68 kDa [39]. Se han descrito ocho isoformas de YY1 en humanos, originadas por *Splicing* alternativo. Las isoformas de YY1 se han denominado de la siguiente manera: a, b, c, d, e, f, g y h, a la fecha no se ha descrito la función ni la relevancia biológica de estas isoformas [42].

Estructuralmente YY1 tiene cuatro motivos de dedos de zinc (C2 H2) con dos de estos motivos específicos caracteriza su función como activador o represor de la transcripción. Usando un sistema reportero con una proteína de fusión a

GAL4, se mostró que el dominio carboxilo terminal (298-397 aa) reprime la actividad transcripcional y que la región amino terminal (43-53 aa) actúa como un dominio de activación [39, 43]. La localización subcelular de YY1 es nuclear o citoplasmática dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentre. Durante la fase de síntesis (S) se localiza en el núcleo y en la fase G1 se localiza en el citoplasma [36].

La función de YY1 en la regulación de distintos procesos celulares se da por el reconocimiento y la unión a la secuencia consenso CGCCATNTT. La secuencia consenso se encuentra presente en 1664 sitios de unión al promotor de 2540 genes analizados en vertebrados y en 93 sitios de promotores virales [44]. YY1 puede activar o reprimir la expresión de muchos genes dependiendo del contexto específico y de las interacciones con diversos factores celulares [45]. El papel de YY1 en la regulación del ciclo celular está implicado en la tumorigénesis [46]. YY1 interactúa con efectores de la regulación del ciclo celular como Rb, cMyc y p53, entre otros [47], estas proteínas regulan la expresión de genes que participan en la respuesta celular a señales de estrés, como daño al DNA [48].

Yin Yang 2

La proteína YY2 fue caracterizada por Nguyen y col., en el 2004. En este estudio se utilizó una base de datos en la que se encontró una gran similitud en la secuencia de cDNA de yy2 con yy1. El análisis de la secuencia de esta proteína muestra que tiene una secuencia rica en serina y cuatro motivos de dedos de zinc (C2 H2), los cuales tienen un 86% de similitud con los de YY1 (Figura 3), [43].

El gen de yy2 es el resultado de la retroposición del gen de yy1 y solo está presente en los organismos placentarios [49]. El gen de yy2 se localiza en el cromosoma X, codifica una proteína de aproximadamente 58 KDa. La proteína YY2 estructuralmente tiene un dominio de activación y un dominio de represión [43]. Los patrones de expresión del gen de yy2 se están dilucidando a partir de los datos conocidos del gen de yy1 y se cree que el control de la transcripción es diferente del gen original debido a la inserción en otra secuencia [49]. La proteína YY2 puede unirse a la misma secuencia consenso de DNA a la que se une YY1, esta característica puede sugerir que las proteínas Yin Yang tienen una función sinérgica o de competencia si actúan en la misma célula [49-51].

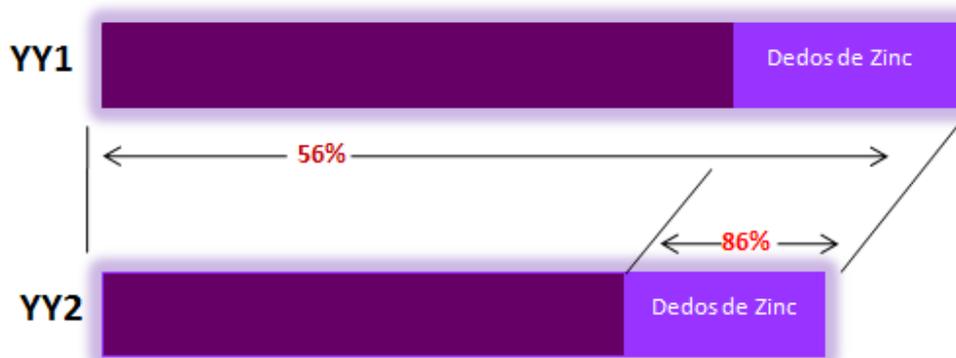


Figura 3. Homología en las estructuras de las proteínas YY1 y YY2 [43].

Yin Yang 1 y el cáncer

Se ha mostrado que la expresión de YY1 está correlacionada a la ocurrencia de diversos cánceres, tales como, el cáncer de mama, cervicouterino, osteosarcoma, el cáncer de la próstata, leucemia mieloide aguda (AML), entre otros [52-55].

Liebertahl y su grupo [56] con estudios *in vitro* demostraron que la sobreexpresión de YY1 en las células HS578T, con capacidad invasiva, suprimió la migración de éstas. Además, realizaron un *knock-out* de esta proteína y vieron que las células HS578T tuvieron un fenotipo aún más invasivo [56].

En estudios realizados en muestras de cáncer de mama se ha encontrado una asociación entre la sobreexpresión de YY1 y el mal pronóstico de las pacientes, además, esta sobreexpresión correlacionó con la expresión de HER2 [52].

Baritaki y col, realizaron un estudio en donde los tejidos con cáncer cervicouterino sobreexpresaron a YY1, mientras que los tejidos controles tenían niveles mínimos. Además, esta sobreexpresión la asociaron con la presencia del virus del papiloma humano (VPH), sugiriendo una posible participación de YY1 en la transformación neoplásica por infección de VPH [53].

En osteosarcoma se ha demostrado la sobreexpresión de YY1, tanto en líneas celulares como en tejido comparado con células de osteoblastos normales y esta sobreexpresión se encontró principalmente en el núcleo. Basándose en ésto, los autores sugieren que la activación YY1 se da en el inicio de la transformación maligna en el osteoblasto y por lo tanto, YY1 podría ser un marcador diagnóstico de esta enfermedad [54].

En cáncer de próstata, YY1 se ha propuesto como un biomarcador confiable.

Bonavida y col., observaron que la sobreexpresión de YY1 es detectable en las muestras de estadio tempranos. Y la baja expresión en el núcleo de esta asociada a la recurrencia a corto plazo en los pacientes. En este trabajo proponen a YY1 como un posible marcador pronóstico y diagnóstico del cáncer de próstata [55].

Finalmente, como un antecedente directo para nuestro estudio, Matsumura y col., reportaron que la inhibición de YY1 en líneas celulares de cáncer de ovario aumentaba la resistencia a los taxanos. Después, realizaron un microarreglo con muestras de pacientes de este mismo tipo de cáncer y que ya habían tenido tratamiento. Observaron que las pacientes que habían sido sensibles a los taxanos, tuvieron una sobreexpresión en el mensajero de YY1 [57].

En la tabla 1 se muestran los diversos tipos de cáncer en los que se ha analizado la sobreexpresión de YY1 y su relevancia para cada uno de ellos.

Tabla 1. Expresión de YY1 en cáncer

| Tipo de cáncer | Sobre expresión YY1 | Referencias |
|-----------------------|--|--|
| Cáncer de mama | Por inmunohistoquímica se encontró una correlación entre la sobreexpresión de YY1 con la sobreexpresión de HER2. | [52]. |
| Neoplasias cervicales | Usando RT-PCR se demostró la correlación de la sobreexpresión de YY1 con la progresión de la enfermedad. | [53]. |
| Osteosarcoma | Correlación de la sobreexpresión de YY1 y los tipos histológicos más agresivos, usaron RT-PCR, EW e inmunohistoquímica. | [54]. |
| Cáncer de próstata | La sobreexpresión de YY1 en las muestras de pacientes correlaciona con la metástasis y con el mal pronóstico. | [55]. |
| Cáncer de ovario | Mediante microarreglos mostraron la correlación entre la sobreexpresión de YY1 con una supervivencia más larga ^{1,2} y con la respuesta a taxanos ² . | ¹ [58]. ² [57]. |
| Leucemia mieloide | La sobreexpresión de YY1 correlaciona con t (8;21). | [59]. |
| Linfoma de Hodgkin | No se encontró ninguna correlación. | [60]. |
| Linfoma no Hodgkin | Análisis bioinformáticos, Western Blot e inmunohistoquímica muestran la correlación entre la sobreexpresión de YY1 con los fenotipos histológicos más agresivos y con el mal pronóstico. | [61]. |

RNA de interferencia

La década pasada surgió un mecanismo natural para silenciar genes denominado RNA de interferencia (RNAi). Este mecanismo se ha conservado durante la evolución, está presente en diversos organismos como: levaduras [62], hongos [63], plantas [64], insectos [65], nemátodos [66, 67] y mamíferos [62, 68]. El mecanismo por el cual actúa el RNAi es altamente específico y se basa en la degradación del RNA mensajero a partir de la instrucción de un RNA de doble cadena [62];[69, 70].

El mecanismo por el que se lleva a cabo el silenciamiento por RNAi puede ser dividido en dos pasos. Durante el primer paso se procesan los RNA de doble cadena (dsRNA), en la ribonucleasa de la familia tipo III llamada Dicer, que produce RNA interferentes pequeños (siRNA) formados de 21-25 nucleótidos, los cuales actúan como secuencias guía para la secuencia blanco del RNAm que se va a degradar. En el segundo paso los siRNA se unen a un complejo silenciador inducido por RNA (RISC), el cual tiene una helicasa que separa las dos cadenas del siRNA, posteriormente se libera una de las cadenas, mientras que la otra es degradada, finalmente una proteína con actividad de nucleasa se encarga de degradar el RNA blanco [65].

Se han usado diferentes estrategias para llevar el silenciamiento por RNAi a modelos *in vivo* (ratón [71, 72], puerco [72, 73] y primates [72, 74, 75]), entre las estrategias se encuentran: la conjugación directa de los siRNA con un ligando natural como el colesterol [76] inyección directa del siRNA desnudo en enfermedades del sistema nervioso central y del sistema respiratorio [71] y liposomas que encapsulan a el siRNA [77-79] y actualmente se ha visto que pueden ser usados como una poderosa herramienta terapéutica para el tratamiento de algunas enfermedades [69, 70]. La investigación biomédica ha aportado grandes avances usando RNAi en el tratamiento de enfermedades tales como el VIH (Virus de inmunodeficiencia adquirida) [62], hepatitis [80], enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares [81], enfermedades metabólicas, desórdenes neurodegenerativos y cáncer [82-84].

Antecedentes directos y Justificación

El cáncer de ovario es una enfermedad que se diagnostica en etapas avanzadas en la mayoría de los casos y la respuesta de las pacientes a los tratamientos no es buena. Los marcadores que se emplean en la actualidad para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de ovario son ineficientes y otros están en pruebas clínicas, por lo tanto es necesario encontrar nuevos marcadores moleculares que permitan una detección temprana y un manejo adecuado de esta enfermedad en base a las características clínicas de las pacientes.

Las proteínas Yin Yang intervienen en diferentes procesos normales y tumorigénicos de las células. Estos factores regulan diversos genes que participan en procesos como apoptosis, proliferación, metástasis, entre otros. Se ha visto que la sobreexpresión de YY1 se relaciona con el cáncer de próstata, el cáncer de mama, AML y las neoplasias cervicales. Creemos que las proteínas Yin Yang podrían servir como marcadores pronósticos en el cáncer de ovario, si su expresión correlaciona con las variables clínicas.

Hipótesis

La expresión de las proteínas Yin Yang pueden estar asociadas con los estadios y los subtipos histológicos del cáncer de ovario.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de YY1 y de YY2 en muestra de cáncer de ovario y analizar si esta expresión tiene alguna relación con las características clínicas de la enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la expresión de YY1 y YY2 en muestras de pacientes con cáncer de ovario por medio de Microarreglos de Tejidos.
2. Determinar si existe alguna relación entre la expresión de YY1, de YY2 y de p16, con las variables clínicas.
3. Analizar la expresión de YY1 y YY2 en una línea celular de cáncer de ovario por RT-PCR.
4. Determinar si la inhibición de los factores Yin Yang, mediante RNA de interferencia, modifica la sensibilidad a los antineoplásicos y a la viabilidad celular.

METODOLOGÍA

Líneas celulares

SKOV3. Línea celular derivada de ascitis de adenocarcinoma de ovario epitelial (Número ATCC HTB-77).

HeLa. Línea celular derivada de adenocarcinoma de cérvix (Número ATCC CCL-2). Se ha reportado que esta línea celular contiene el virus del papiloma humano tipo 16.

HEK-293. Línea celular derivada de riñón embrionario de humano (Número ATCC CLR-1573). Esta línea contiene el adenovirus tipo 5.

Cultivo celular

La línea celular SKOV3 se cultivó en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FSB) (PROMEGA), piruvato 0.11 % y antibiótico antimicótico Gibco (Gibco). Las líneas HeLa y HEK293 se cultivaron en medio DMEM (Gibco) suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (FSB) (PROMEGA) y antibiótico antimicótico Se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v).

Criopreservación.

Se preparó una suspensión de 2×10^6 células/ml/criovial en Suero Fetal Bovino (PROMEGA) con DMSO (10%), se congelaron gradualmente y se conservaron a -70°C.

Transfección

La transfección se realizó con liposomas ESCORT (Sigma). Un día antes de la transfección, las células se sembraron a una concentración de 2×10^5 por caja de 35 mm. Las células se transfectaron con el vector control (pSIREN /Luc) y con los RNA de interferencia dirigido contra el Yin Yang 1 (pSIREN /RNAi/YY1) y contra el Yin Yang 2 (pSIREN /RNAi/YY2), diseñados previamente en el laboratorio. Para las transfecciones se utilizaron 4µg de DNA. Finalmente las células fueron seleccionadas con 2 µg puomicina

(SIGMA) durante dos semanas.

Viabilidad celular

La viabilidad celular se realizó con cristal violeta en las células SKLuc, SKRNAiYY1 y SKRNAiYY2 tratadas con cisplatino y taxol. Se sembraron 3×10^3 células por pozo, en cajas de 96 pozos. Para el cisplatino (Sigma) se utilizaron las siguientes concentraciones: 10, 30, 50, 60 y 75 μM durante 24h. El taxol (Sigma) se usó con las concentraciones de: 2.5, 3.5, 5, y 7 μM por 48h. Posteriormente, las células se fijaron con etanol 70%, se tiñeron con cristal violeta y se leyó la absorbancia a 560 nm. El experimento se realizó por triplicado.

Extracción de RNA total

Se realizó la extracción de RNA total de la línea celular SKOV3 con la técnica de Trizol (Invitrogen). Las células se homogenizaron con Trizol, se agregó cloroformo, se centrifugaron y la fase acuosa se precipitó con isopropanol. Posteriormente se lavó con etanol 70%, se cuantificó y se verificó la pureza e integridad del RNA en el NanoDrop (absorbancia 260/280) y con electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

RT-PCR

La síntesis se hizo a partir de 2 μg de RNA total usando hexámeros al azar, y la enzima transcriptasa reversa de la siguiente manera: el RNA total se desnaturalizó a 65°C durante 5 minutos, se agregaron los hexámeros sintetizados al azar, desoxinucleótidos (dNTPs) (BIO-RAD) y la enzima transcriptasa reversa en el buffer adecuado. La reacción se incubó de la siguiente manera: 25°C 10 min, 50°C 50 min, 85°C 5 min y 37°C 20 min con RNAsa H.

El DNA complementario (DNAc) se amplificó con los dNTPs, el buffer, la enzima polimerasa DNA termoestable (Invitrogen) y los primers específicos para el gen de interés.

La expresión del RNA mensajero se normalizó con la expresión de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

GAPDH

Sentido 5' CCCCTTCATTGACCTCAACT 3',

Antisentido 5' TTGTCATGGATGACCTTGGC 3'

Condiciones: 94 °C 10 min. (1 ciclo); 94 °C 30 seg., 60 °C 30 seg., 72 °C 30 seg. (25 ciclos).

YY1

Sentido: 5' TGCACGAGATCGAGGTGGAGA 3'

Antisentido: 5' TCTGCACCAGGATCACCTCCT 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 95 °C 30 seg., 62 °C 30 seg., 72 °C 1 min. (40 ciclos).

YY2

Sentido: 5' AACTAGAATTCAGCCATGGCCTCCAACG 3'

Antisentido: 5' GAGGGGGTCCTCCTTTCACGGGTTGTTT 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 94 °C 30 seg., 68 °C 2 min. (3 ciclos); 94 °C 30 seg., 60 °C 2 min. (60 ciclos); 72 °C 5 min. (1 ciclo).

Bloques de Parafina

Se obtuvieron 132 muestras de pacientes con cáncer de ovario del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), en un periodo comprendido entre los años 2000 al 2002. Los criterios de inclusión de las pacientes fueron: pacientes sin tratamiento previo y el tipo histológico correspondiente a cáncer de ovario epitelial.

Microarreglos de tejidos

Se construyeron microarreglos de tejidos con muestras de cáncer de ovario (100), ovario normal (1) y como controles positivos las líneas celulares HeLa y

HEK-293. Para construir los microarreglos de tejidos se utilizó el equipo CHEMICON® Advanced Tissue Arrayer. Con este equipo se obtuvieron cilindros de 1 mm de diámetro de cada uno de los bloques de cáncer de ovario. Estos cilindros se colocaron en un bloque vacío de parafina para formar los microarreglos de tejidos. Las muestras se colocaron por triplicado y se ordenaron aleatoriamente. Finalmente, se utilizó el microtomo para obtener cortes de 5 micras de espesor.

Inmunohistoquímica.

Las inmunohistoquímicas para YY1, YY2 y p16, se estandarizaron en la línea celular SKOV3 y en los microarreglos de tejidos de cáncer de ovario y de ovario normal.

Los controles positivos que se establecieron para la inmunohistoquímica fueron: para YY1 y p16 las células HeLa y para YY2 las células HEK293. Brevemente, las líneas celulares se cultivaron y al 80% de confluencia se tripsinizaron, lavaron y contaron. El botón obtenido (4 millones de células) se fijó con formalina, se deshidrató con gradientes de etanol y se incluyó en parafina. Finalmente, se procesaron para inmunocitoquímica.

Las laminillas de los microarreglos se desparafinaron y se deshidrataron con xilol y con etanol. El antígeno se expuso con Buffer de citratos 10 mM pH 6 por 10 min a 94°C. Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido al 3% por 10 min a T.A. Las laminillas se permeabilizaron con Tritón 1X y se bloquearon con albúmina al 4% durante 1 h, posteriormente se incubaron con los anticuerpos específicos para YY1 (anti-YY1; Cell Signaling) y p16 (anti-p16; Santa Cruz Biotechnology). Las laminillas se incubaron con *Universal link* (BIOCARE MEDICAL) durante 30 min, se lavaron con PBS 1X. Se incubaron con la estreptavidina-biotina y se reveló con diamino-benzidina (DAB) (DAKO).

Para la inmunohistoquímica de YY2 (anti-YY2; Santa Cruz Biotechnology), se utilizó el Vectastain Elite Kit ABC-Peroxidasa Kit Goat IgG (Vector). Se incubó con el suero de bloqueo durante 30 min, posteriormente se incubaron con el

anticuerpo de YY2. Posteriormente se incubó por el anticuerpo secundario acoplado a biotina y finalmente se reveló.

Una vez concluida la inmunohistoquímica de los microarreglos se realizó la contratinción con hematoxilina de Mayer (Lillies Modification) y se montó con Permount (Fisher Scientific).

Revisión de laminillas

Las laminillas de los microarreglos de tejidos fueron revisadas en un microscopio Zeiss. La determinación de la expresión de YY1, del YY2 y de p16, se realizó ciego simple por tres personas de forma independiente. Los niveles de la expresión de las proteínas en las muestras se establecieron como: expresa y no expresa.

Análisis estadístico.

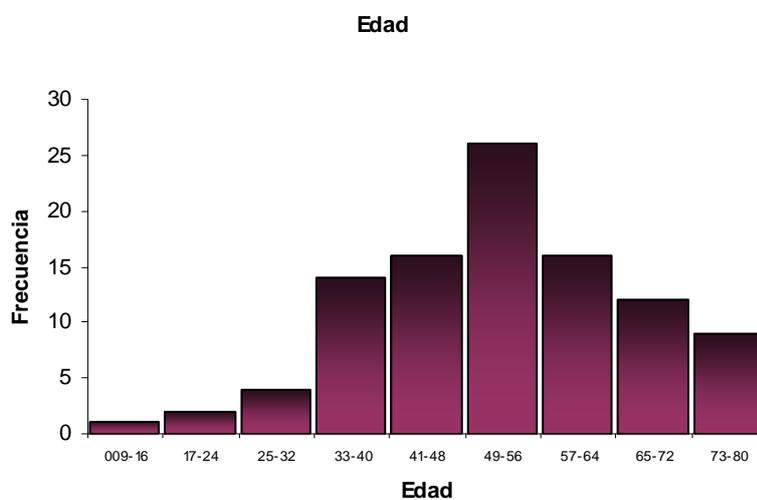
Se realizó un análisis de estadística descriptiva de las muestras de las pacientes. Se determinó la frecuencia de las variables clínicas para conocer las características de las muestras de las pacientes. Se determinó la correlación entre la expresión de YY1, de YY2 y de p16 con los diferentes estadios del cáncer de ovario, los subtipos histológicos, la edad y con las otras variables clínicas de las pacientes utilizando las pruebas de Pearson y Ji-cuadrada.

RESULTADOS

Características clínicas de las muestras de cáncer de ovario

Para conocer las características de las muestras de las pacientes se organizó la base de los datos clínicos y se realizó un análisis de estadística descriptiva. Los datos que incluimos en este análisis fueron: la edad de las pacientes, la edad de la menarca, el estatus de la menopausia, el estadio clínico, el tipo histológico y el grado de diferenciación.

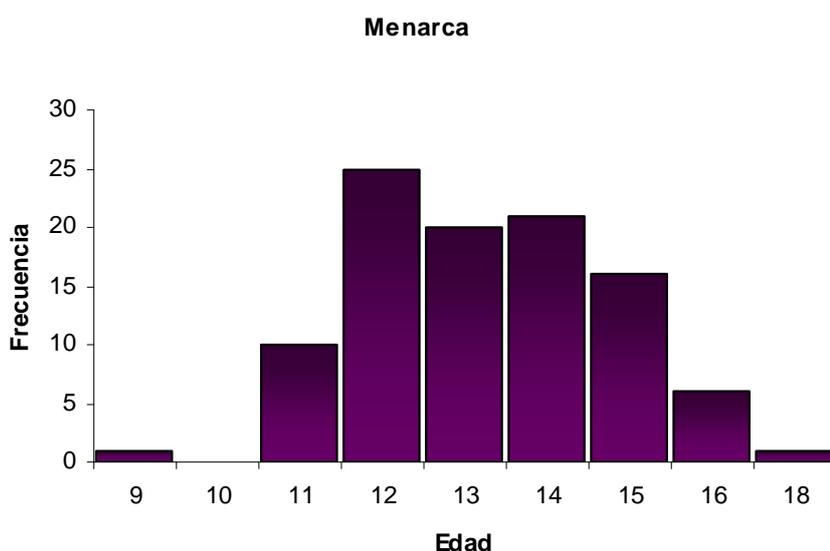
La edad de las pacientes con las que trabajamos tiene una distribución amplia que va desde los 13 años hasta los 80 años. Como se puede observar en la gráfica 1, el intervalo de edad que tiene mayor frecuencia es el de los 49 a los 56 años con 30 pacientes y la media fue 52.36 años.



Gráfica 1. Histograma de las edades de las pacientes.

En la menarca hay cambios hormonales en la mujer, se incrementan los niveles de estrógeno para iniciar esta etapa. Algunas hipótesis sustentan que los niveles elevados de los precursores de estrógenos y el estrógeno incrementan el riesgo de padecer cáncer de ovario debido a que estimulan la proliferación del epitelio del ovario y la posible transformación de éste a células de cáncer [85-87].

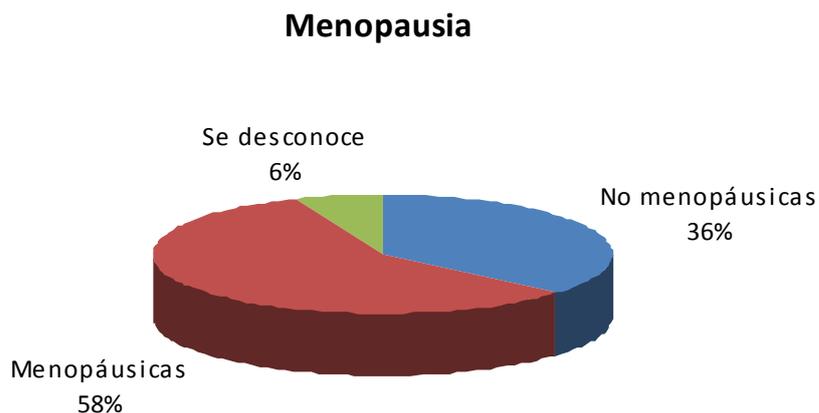
El rango de edad de la menarca de las pacientes es de los 9 hasta los 18 años, en la gráfica 2 se muestra que las edades que tienen una mayor frecuencia fueron los 12 y los 14 años de edad. La media que se obtuvo fue 13.27 años para esta variable.



Gráfica 2. Distribución de la edad de la menarca de las pacientes con cáncer de ovario

En la menopausia se dan cambios hormonales (modificaciones en los niveles de andrógeno/progesterona). Se ha reportado que el incremento en los niveles de progesterona y las alteraciones en el gen del receptor de esta hormona están asociados al cáncer de ovario y al mal pronóstico de esta enfermedad [87-90].

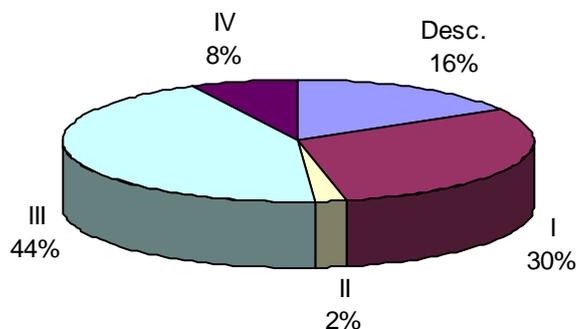
En la gráfica 3 se muestra que el 58% de las pacientes habían tenido o cursaban la menopausia y el 36% de las pacientes aún no la habían presentado.



Gráfica 3. Porcentajes de pacientes que presencia o ausencia de menopausia.

El estadio clínico de las pacientes es una variable importante para el tratamiento y para pronosticar la respuesta de las pacientes. Los porcentajes de los estadios clínicos se observa en la gráfica 4: estadio I, 30%; estadio II, 2%; estadio III, 44%; estadio IV, 8% y el 16% de las muestras no cuenta con la estadificación de la enfermedad.

Estadio clínico

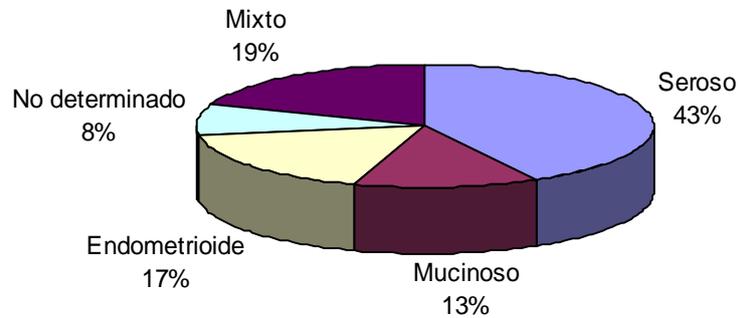


Gráfica 4. Distribución de los estadios clínicos de las muestras de las pacientes con cáncer de ovario.

El subtipo histológico de las pacientes permite determinar la respuesta, el pronóstico y tipo de tratamiento que se da a las pacientes y cada tipo histológico presenta diferentes modificaciones a nivel molecular.

En la gráfica 5 se observa que el subtipo histológico más frecuente es el seroso con 43% de los casos, en segundo lugar se encuentran los tumores mixtos con 19%, y el tipo endometriode con 17% de los casos. Finalmente, el subtipo histológico que presenta menor frecuencia es el mucinoso con el 13% de los casos.

Subtipos Histológicos

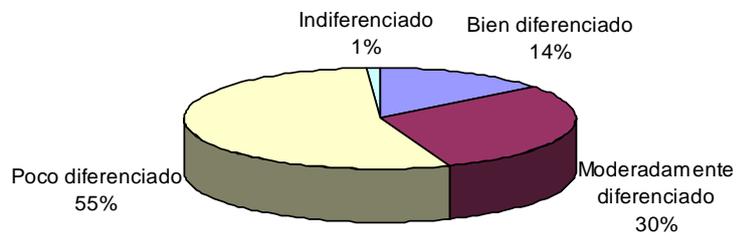


Gráfica 5. Porcentaje de los tipos subtipos histológicos de las muestras de las pacientes con cáncer de ovario.

El grado de diferenciación está asociado a la respuesta a la terapia y al pronóstico de las pacientes y hace referencia a qué tanto las células de cáncer se parecen a las células normales.

Las muestras de poco grado de diferenciación fueron el 55% y las indiferenciadas el 1% del total, estos datos clínicos nos indica que tienen un mal pronóstico debido a son los tumores más agresivos; el 30% de las muestras estaban moderadamente diferenciadas y el 14% esta bien diferenciada, ambos grados de diferenciación generalmente son poco agresivos y presentan una mejor respuesta a la terapia (ver gráfica 6).

Grado de diferenciación



Gráfica 6. Porcentajes de los grados de diferenciación de las muestras de las pacientes.

Análisis de la expresión de YY1, YY2 y p16 en muestras de cáncer de ovario.

Los microarreglos de tejidos es una técnica que nos permite analizar una gran cantidad de muestras de tejidos en una sola laminilla, evitando variaciones durante la inmunohistoquímica y permitiendo una adecuada comparación entre las muestras. Además reduce el tiempo para procesar las muestras y requiere poco tejido. En los microarreglos de cáncer de ovario analizamos los niveles de expresión de YY1, YY2 y p16, y la correlación con las variables clínicas.

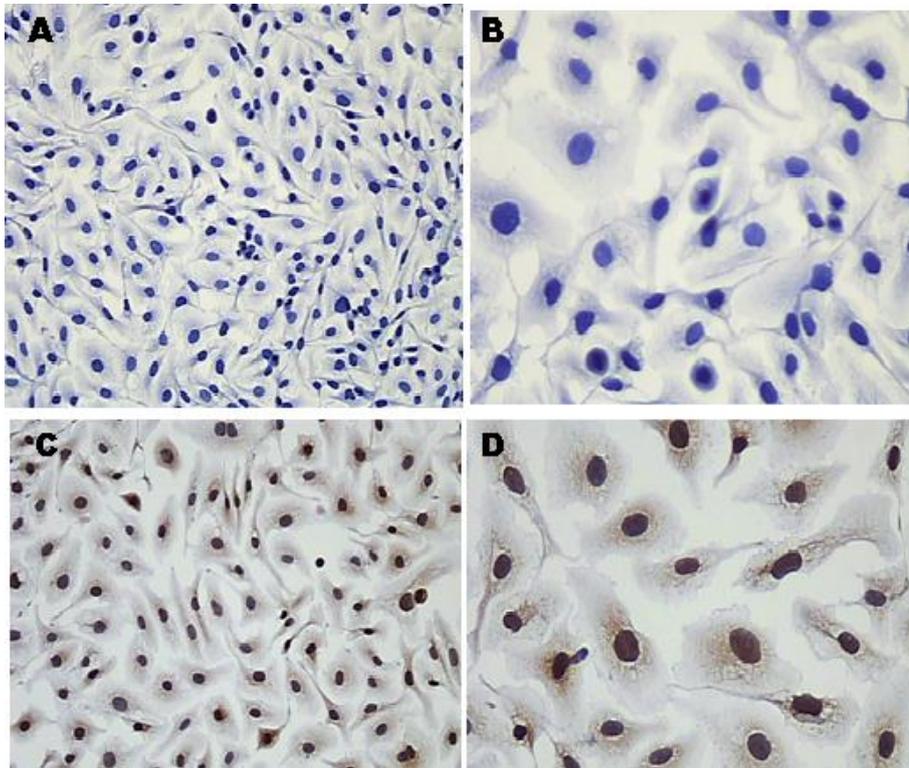


Figura 4. Inmunocitoquímica de YY1. (A-B) Control 20x y 40x. (C-D) Expresión de YY1 en células SKOV3 20x y 40x. YY1 se expresó tanto en núcleo como en citoplasma, la intensidad fue mayor en el núcleo.

Como primera parte estandarizamos en líneas de cáncer. Utilizamos a la línea HeLa como control positivo de la expresión de las proteínas YY1 (ver figura 4) y p16 (figura 6) y a la línea HEK293 para YY2. En este último caso, las células se desprendían, así que utilizamos una laminilla con cortes de esferoides de HEK293 (figura 5).

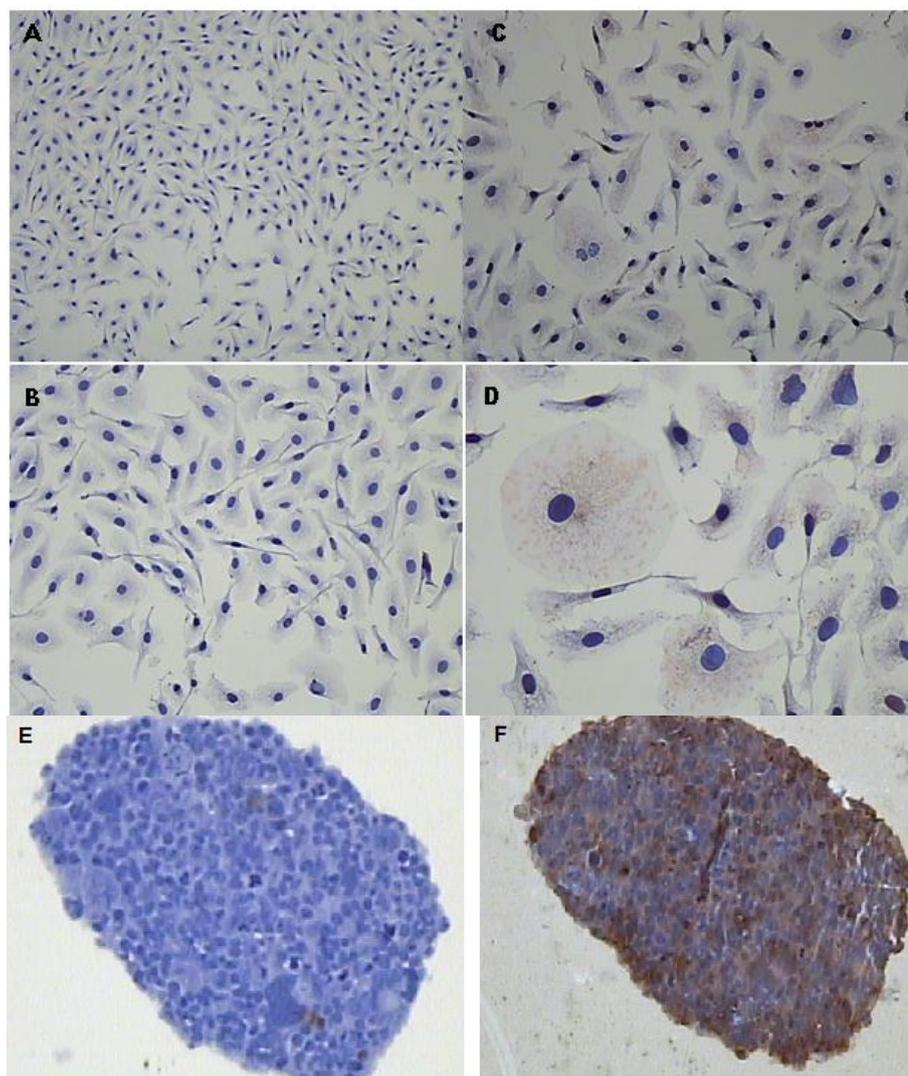


Figura 5. Inmunocitoquímica de YY2. (A-B) Control 20x y 40x. (C-D) Expresión de YY2 en células SKOV3 20x y 40x. (E) Control 20x (F) Expresión de YY2 en células HEK 293. En las células HEK-293 la expresión de YY2 fue intensa y en citoplasma. En el caso de las células SKOV3 tuvo un patrón difuso en el citoplasma y de baja intensidad.

Posteriormente, utilizamos a la línea SKOV3, de cáncer de ovario, como un primer acercamiento, y observamos que las tres proteínas se expresaron en esta línea. Finalmente, realizamos los microarreglos de tejidos.

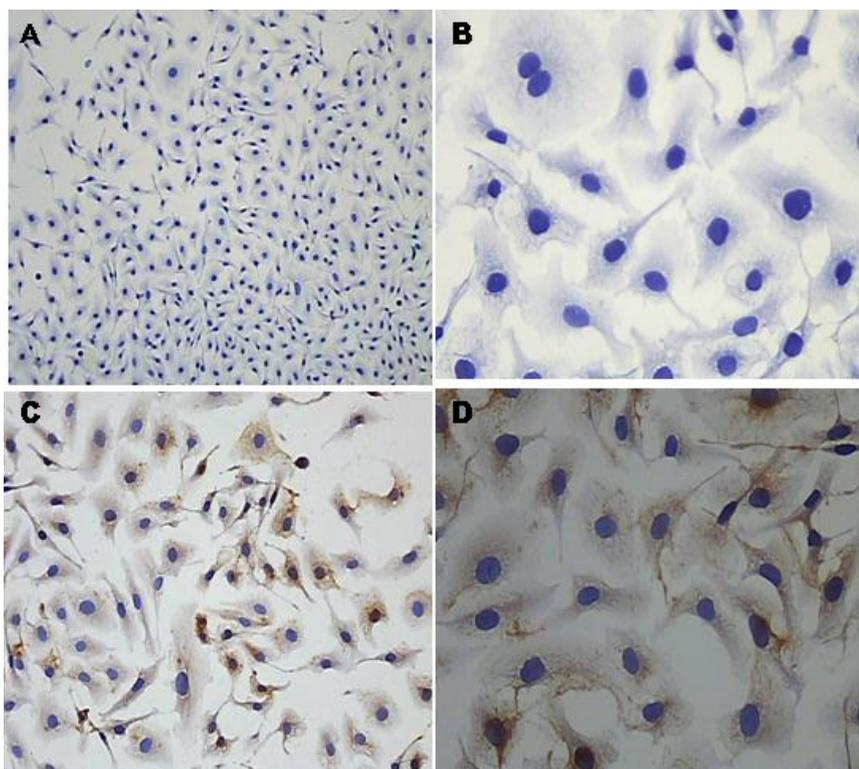


Figura 6. Inmunocitoquímica de p16. (A-B) Control 20x y 40x. (C-D) Expresión de p16 en células SKOV3 20x y 40x. La expresión de p16 fue de intensidad moderada y con una localización predominantemente en citoplasmática, y en algunas células en el núcleo.

En los microarreglos para YY1 encontramos que sólo 2/100 muestras expresaban a esta proteína. Como se observa en la figura 7 la expresión de YY1 es baja y se encuentra en una región localizada de las muestras. La expresión es predominantemente citoplasmática y algunas células la expresan también en núcleo.

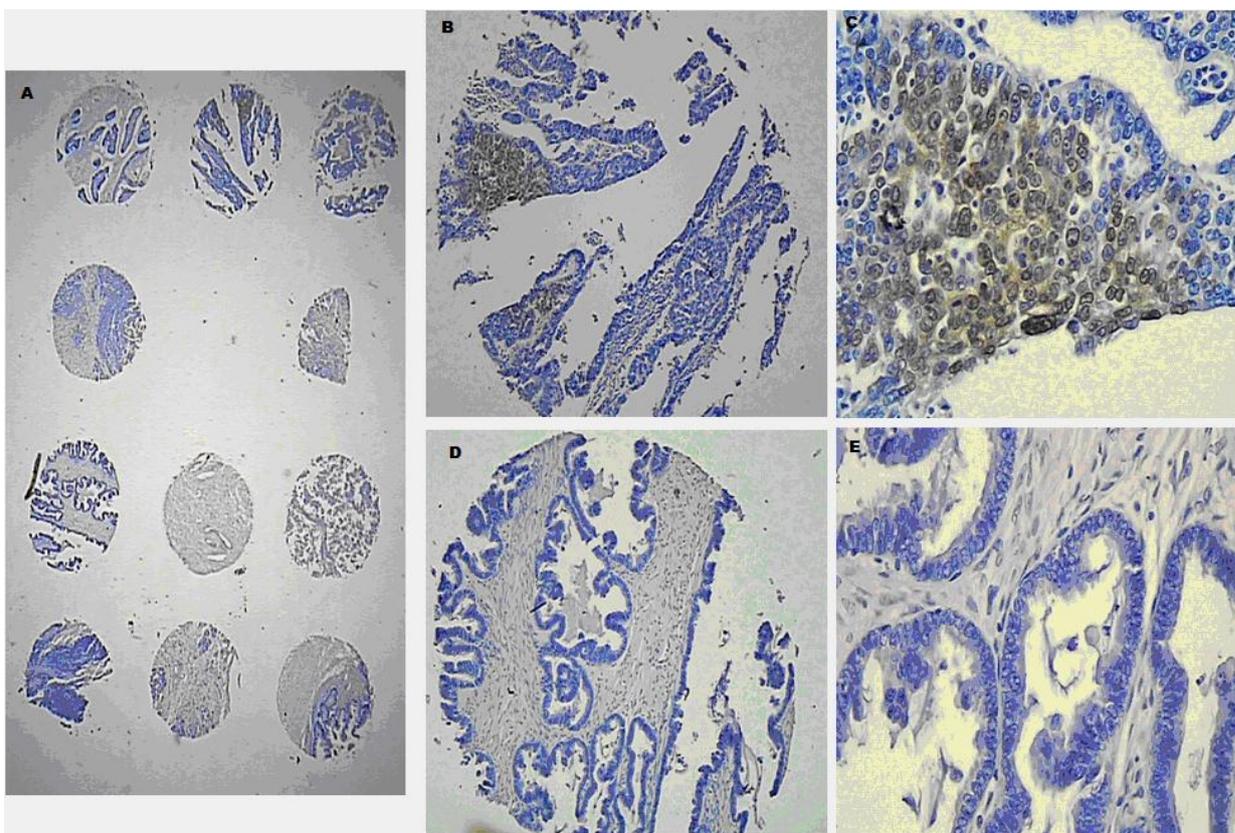


Figura 7. Expresión de YY1 en cáncer de ovario. A) Inmunohistoquímica de microarreglos de cáncer de ovario (2x). B-C) Muestra con expresión de YY1 en área sólida de adenocarcinoma (10x y 40x). D-E) Muestra con expresión negativa de YY1 en adenocarcinoma mucinoso área glandular (10x y 40x). La expresión fue baja, se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma.

En cuanto a la expresión de YY2, encontramos que la mayoría de las muestras (83/100) tienen una expresión moderada o alta. En la figura 8 se muestra que la expresión de YY2 es predominantemente citoplasmática 65/100 y que en algunas células se expresó tanto en núcleo como en citoplasma (25/100).

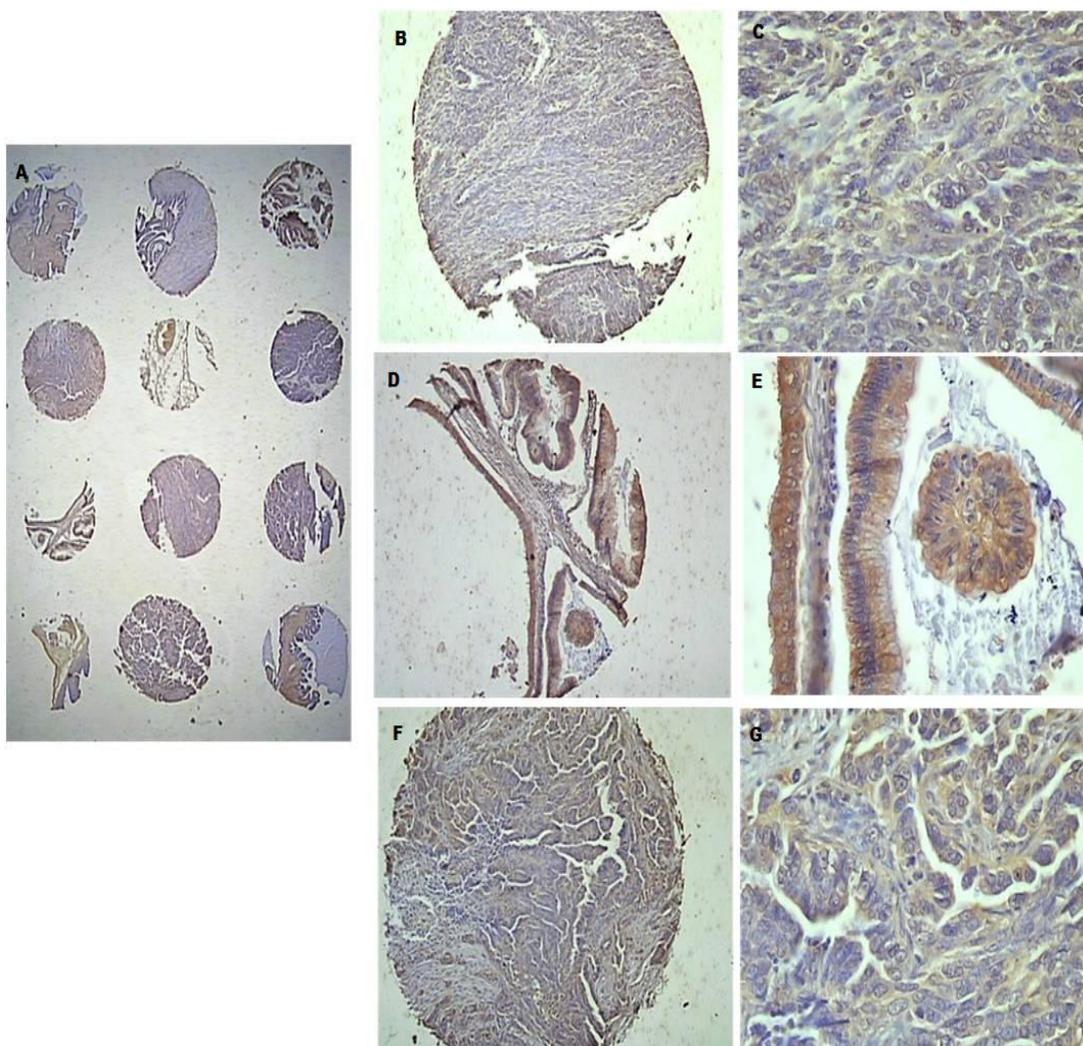


Figura 8. Expresión de YY2 en cáncer de ovario. A) Inmunohistoquímica de microarreglos de cáncer de ovario (2x) B-G) Muestras con expresión de YY2 (10x y 40x). Seroso papilar de alto grado (B,C, F y G) y adenocarcinoma mucinoso (Dy E) La expresión tuvo un patrón predominantemente citoplasmático solo algunas células presentaron la proteína en núcleo, la intensidad fue moderada a alta.

En el análisis de la expresión de p16 encontramos que 96/100 muestras expresaron a esta proteína y que se expresa de forma diferencial en las muestras. Se ha reportado que la localización subcelular de p16 es un marcador pronóstico en la sensibilidad a fármacos, cuando esta en el núcleo indica incremento en la resistencia y si se localiza en el citoplasma es sensibilidad a los fármacos. En la figura 9 se aprecia la localización de p16 preferentemente citoplasmática. En 60/100 muestras se presentó en citoplasma y el resto en núcleo.

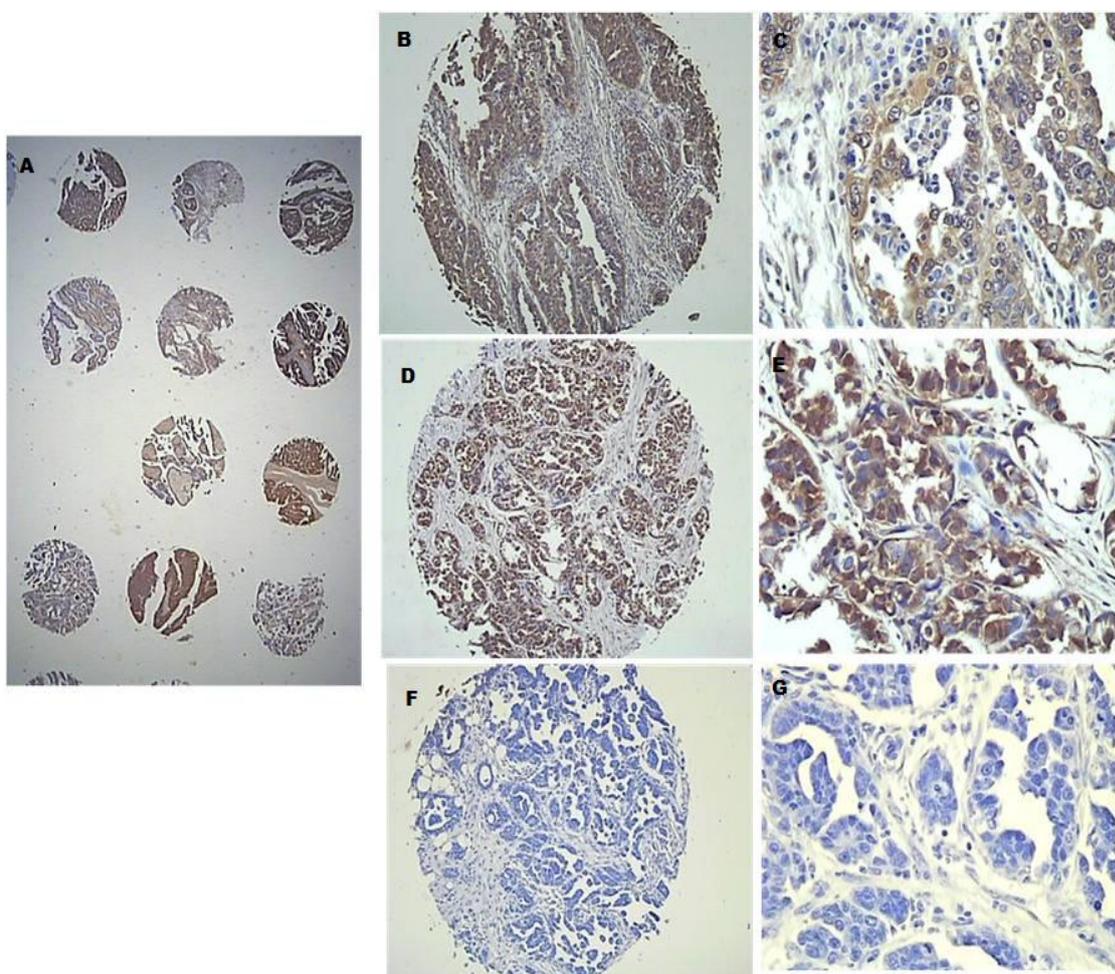


Figura 9. Expresión de P16 en cáncer de ovario. A) Inmunohistoquímica de microarreglos de cáncer de ovario (2x) B-E) Muestra con expresión de P16 carcinoma seroso papilar de alto grado (10x y 40x). F-G) Muestra con expresión negativa de P16 carcinoma seroso papilar de alto grado (10x y 40x). La expresión fue de una intensidad alta en la mayoría de las muestras, se localizó tanto en núcleo como en citoplasma, ésta última fue predominante.

Correlación entre la expresión de YY1, YY2, p16 con las variables clínicas.

Utilizamos la prueba de Pearson y la prueba Ji-cuadrada para saber si había alguna correlación entre la expresión de YY2 y p16 con las variables clínicas. La n inicial de nuestro proyecto fue de 132 muestras. En la revisión de los expedientes de las pacientes no se pudo obtener toda la información necesaria para el análisis estadístico. Por lo tanto, la n en algunas de las variables disminuyó más del 50%.

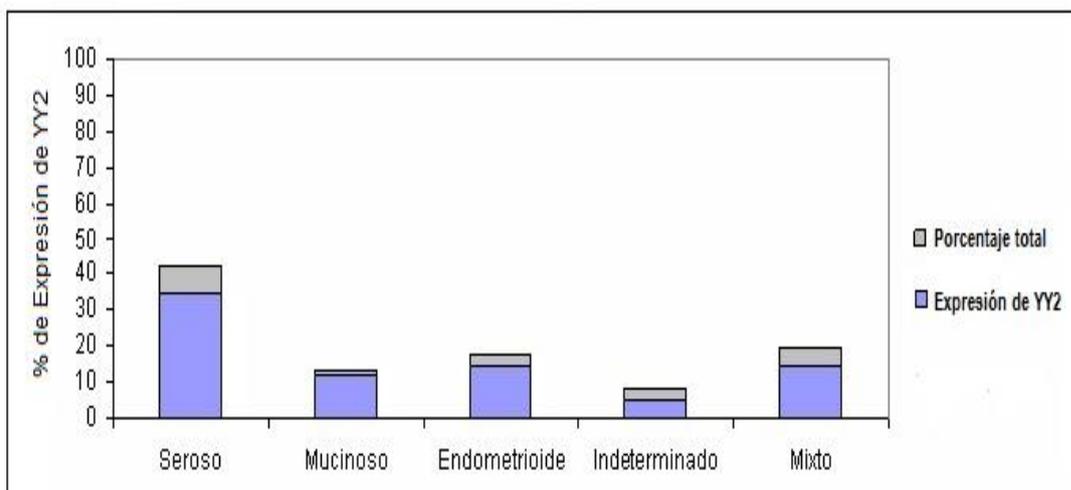
En el caso de YY1 no se realizaron pruebas estadísticas ya que el número de las muestras que expresaron esta proteína no era suficiente (2/100). La única característica en común de estas dos muestras fue que estaban poco diferenciadas, indicando que se trata de una enfermedad más agresiva.

Los resultados de las correlaciones de YY2 y de las variables se muestran en la tabla 2. Como se puede observar no hubo ninguna correlación significativa, sin embargo en el tipo histológico, observamos una tendencia entre la expresión de YY2 y el subtipo seroso (35/41).

Tabla2. Correlación de la expresión de YY2 y las variables clínicas

| Variable | No. Pacientes | Expresión YY2 (expresión positiva) | P |
|--------------------------------|----------------------|---|--------------|
| Estadios FIGO | (n= 92) | | |
| I (A, B, C) | 28 | 24 | |
| II (A, B, C) | 2 | 2 | |
| III (A, B, C) | 40 | 31 | 0.259 |
| IV | 7 | 5 | |
| No determinados | 15 | 15 | |
| Tipos Histológicos | (n= 98) | | |
| Seroso | 41 | 35 | |
| Mucinoso | 13 | 12 | |
| Endometriode | 17 | 15 | 0.313 |
| Mixtos | 19 | 14 | |
| No determinado | 8 | 5 | |
| Grado de diferenciación | (n= 84) | | |
| Bien diferenciado | 12 | 11 | |
| Moderadamente diferenciado | 25 | 22 | |
| Poco diferenciado | 46 | 37 | 0.099 |
| Indiferenciado | 1 | 0 | |
| Progresión | (n= 93) | | |
| No presentó | 62 | 49 | 0.343 |
| Presentó | 31 | 27 | |
| Recurrencia | (n= 100) | | |
| No presento | 77 | 65 | 0.490 |
| Presento | 23 | 18 | |

La expresión de YY2 en los subtipos histológicos, se muestra en la gráfica 7. El subtipo seroso 35/41 muestras expresaron YY2, fue el subtipo de mayor frecuencia, mientras que los subtipos con menor frecuencia tuvieron la siguiente expresión: mucinoso 12/13, endometriode 15/17 y mixto 14/19.



Gráfica 7. Expresión de YY2 en los subtipos histológicos de cáncer de ovario.

En el caso de p16 las muestras que expresaron esta proteína tampoco correlacionaron con las variables clínicas. En la tabla 3 se observan los datos de la expresión de p16 y las variables clínicas analizadas. Cabe mencionar que aunque no hubo correlación entre los estadios y la expresión de p16 ($p=0.878$), todas las muestras del estadio IV expresaron a p16. Así mismo todas las pacientes que presentaron recurrencia expresaron a la proteína. Finalmente se analizó si la expresión de YY2 correlacionaba con la expresión de p16 pero no fue así $p=0.45$.

Tabla 3. Correlación de la expresión de p16 y las variables clínicas

| Variable | No. Pacientes | Expresión p16 (expresión positiva) | P |
|--------------------------------|----------------------|---|--------------|
| Estadios FIGO | (n=92) | | |
| I (A, B, C) | 28 | 27 | 0.878 |
| II (A, B, C) | 2 | 2 | |
| III (A, B, C) | 40 | 38 | |
| IV | 7 | 7 | |
| No determinados | 15 | 15 | |
| Tipos Histológicos | (n= 98) | | |
| Seroso | 41 | 40 | 0.867 |
| Mucinoso | 13 | 12 | |
| Endometriode | 17 | 16 | |
| Mixtos | 19 | 18 | |
| No determinado | 8 | 8 | |
| Grado de diferenciación | (n= 100) | | |
| Bien diferenciado | 12 | 11 | 0.777 |
| Moderadamente diferenciado | 25 | 24 | |
| Poco diferenciado | 46 | 45 | |
| Indiferenciado | 1 | 1 | |
| Progresión | (n= 93) | | |
| No presentó | 62 | 60 | 0.470 |
| Presentó | 31 | 29 | |
| Recurrencia | (n= 100) | | |
| No presento | 77 | 73 | 0.265 |
| Presento | 23 | 23 | |

Expresión de Yin Yang en células de cáncer de ovario

Para analizar la expresión de los Yin Yang en las células SKOV3 y HeLa utilizamos RT-PCR para YY1 y YY2. Se realizaron las curvas de saturación para cada una de las líneas como se muestra en la figura 10 A y B.

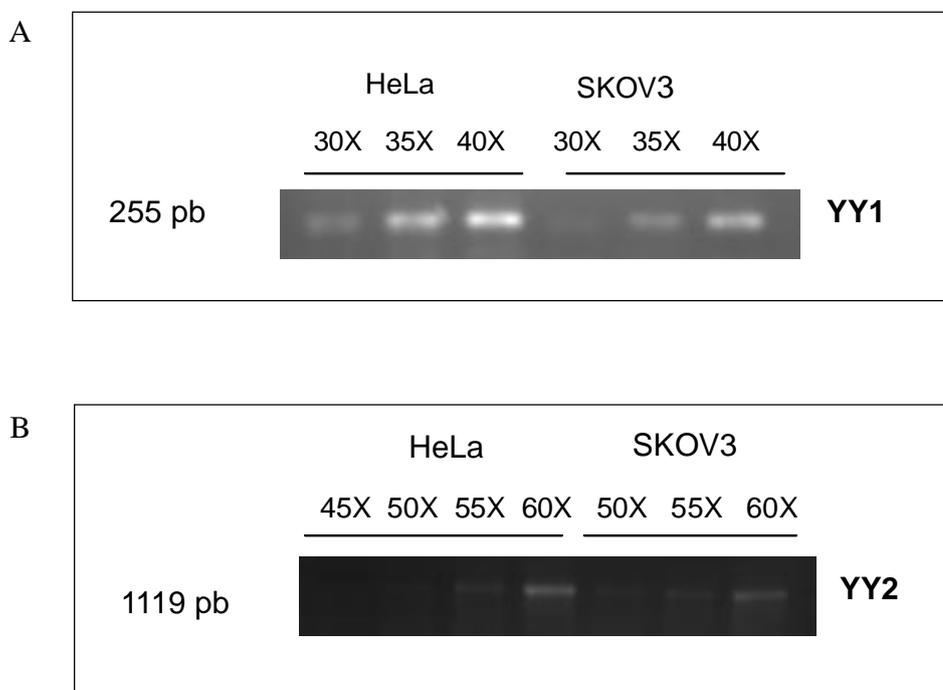


Figura 10. Curvas de saturación de las proteínas Yin Yang en células de cáncer. A) Expresión de YY1 en células HeLa y SKOV3 a 30,35 y 40 ciclos. B) Expresión de YY2 en células HeLa y SKOV3 a 45, 50, 55 y 60 ciclos.

Efecto de la inhibición de los Yin Yang en la sensibilidad a antineoplásicos.

Inhibición de YY1 y YY2 por RNA de interferencia.

El RNA de interferencia es un mecanismo altamente conservado en la evolución en diversos organismos. El mecanismo por el que actúa el RNAi es altamente específico y logra el silenciamiento a nivel del mensajero [62, 69]. Se utilizó este sistema para inhibir a los Yin Yang, y de esta manera poder determinar si su inhibición modificaba la sensibilidad a los antineoplásicos. Cada RNA de interferencia fue específico para cada una de las proteínas: pSIREN/RNAi/YY1 y pSIREN /RNAi/YY2.

Por medio de RT-PCR semicuantitativo se analizó la expresión de los YY1 y YY2. Como puede observarse los RNAis fueron efectivos, hay una disminución en la expresión del mensajero de YY1 y YY2, de aproximadamente el 50%. (Ver figura 11).

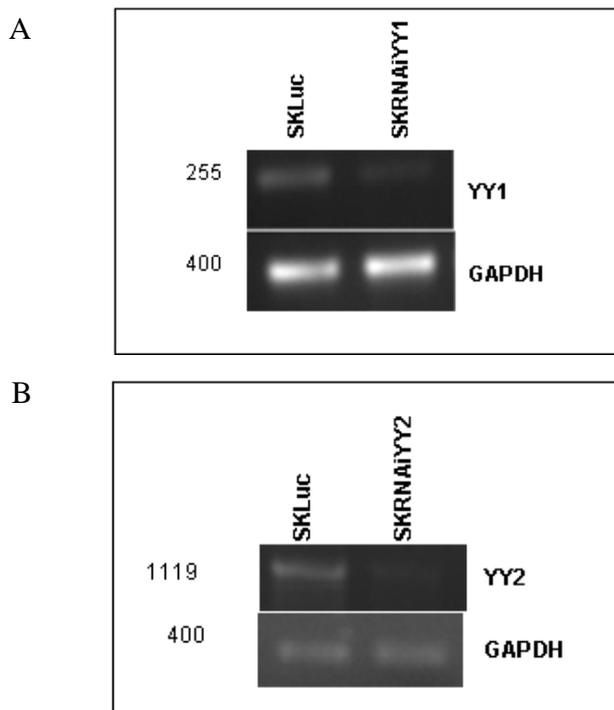
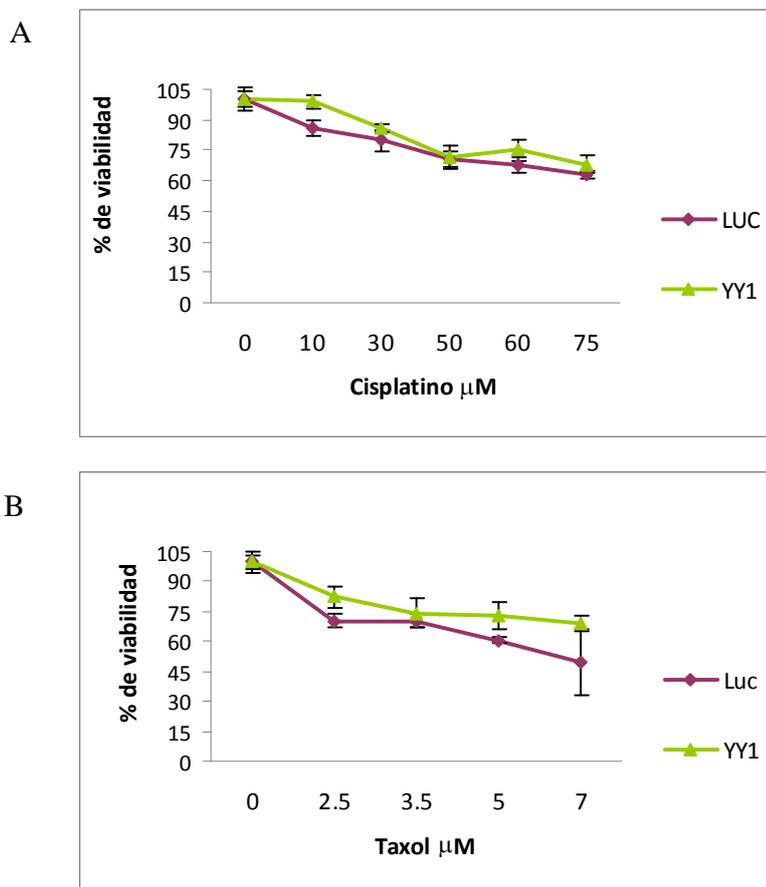


Figura 11. Inhibición por RNAi de YY1 y de YY2. A) Inhibición de YY1 en células SKRNAiYY1. B) Inhibición de YY2 en células SKRNAiYY2.

Sensibilidad al taxol y al cisplatino

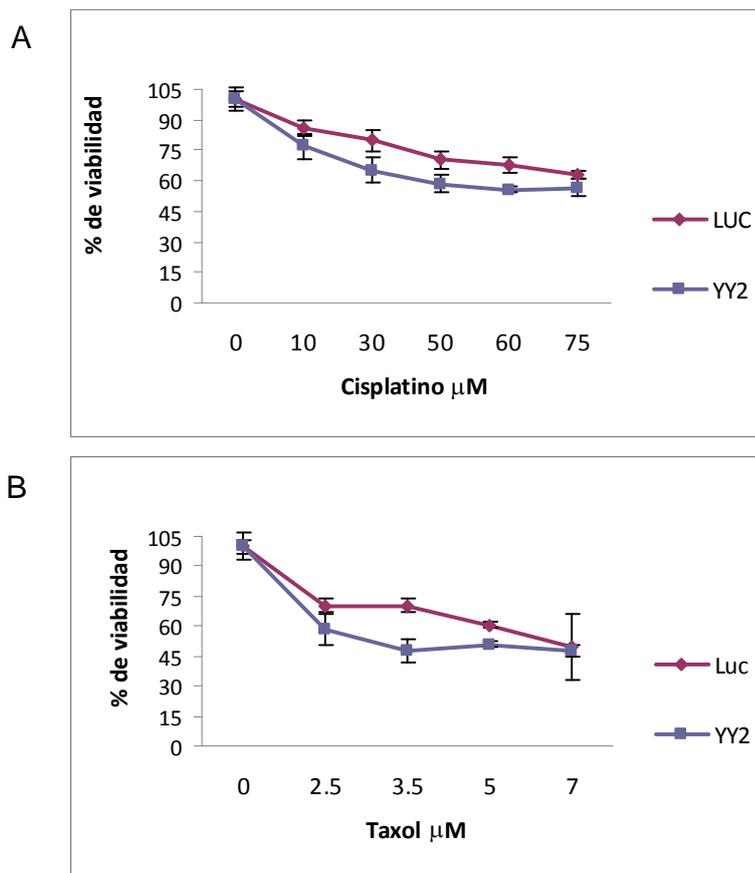
Una vez que se comprobó la eficiencia en la inhibición de los RNAs específicos para los mensajeros de los Yin Yang, las células SKLuc, y SKRNAiYY1 y SKRNAiYY2 fueron tratadas con cisplatino y taxol para determinar si había cambios en la sensibilidad a estos fármacos

Con respecto a la sensibilidad al cisplatino entre las células SKLuc, y SKRNAiYY1 no se observó cambio alguno ($p= 0.1$), mientras que con el taxol las células SKRNAiYY1 aunque mostraron más resistencia que las células SKLuc esta no fue significativa $p= 0.57$ (ver gráfica 8).



Gráfica 8. Sensibilidad en las células SKLuc, y SKRNAiYY1. A) Células tratadas con cisplatino por 24 h. B) Células tratadas con taxol por 48 h

En el caso del tratamiento con el cisplatino las células SKRNAiYY2 se comportan como las células SKLuc ($p= 0.1$), de la misma forma no hubo cambios en la sensibilidad al taxol entre las células SKLuc y SKRNAiYY2 ($p= 0.54$) como se muestra en la gráfica 9.



Gráfica 9. Sensibilidad en las células SKLuc, y SKRNAiYY2. A) Células tratadas con cisplatino por 24 h. B) Células tratadas con taxol por 48 h.

Discusión

El cáncer de ovario ocupa los primeros lugares en frecuencias y mortalidad de los cánceres ginecológicos a nivel mundial y en México, con 125 000 muertes por año [91, 92]. Este tipo de cáncer se presenta en mujeres menores a las 60 años [92].

El cáncer de ovario es una enfermedad asintomática en los estadios tempranos y se diagnóstica en los estadios avanzados (III y IV) en más del 75% de los casos [5]. En las pacientes con estadios avanzados aproximadamente el 25% tienen una sobrevida de 5 años posterior al tratamiento [4, 5].

Los factores clínicos como la edad, el estadio, el grado de diferenciación y la respuesta a la quimioterapia son empleados como marcadores pronósticos, sin tener resultados óptimos en el tratamiento de las pacientes [6]. El cáncer de ovario epitelial es el que se presenta en más del 90% de los casos, este tipo de cáncer es heterogéneo y se clasifica en cuatro subtipos histológicos: seroso, endometriode, mucinoso y de células claras. [32, 33].

El tratamiento estándar para esta enfermedad es la cirugía citoreductiva seguida de varios ciclos de quimioterapia sistémica. La quimioterapia de primera línea combina paclitaxel o docetaxel con carboplatino [23]

Actualmente en la clínica se miden en suero los valores de CA-125, ya que niveles elevados de esta proteína se han asociado a los estadios avanzados de ésta enfermedad. Lamentablemente su especificidad y confiabilidad no es muy buena [17].

Debido a la carencia de marcadores pronósticos para el cáncer de ovario y la participación de las proteínas Yin Yang en los procesos tumorales, decidimos analizar la expresión de estas proteínas en muestras de pacientes con este

tipo de cáncer.

Yin Yang 1 y Yin Yang 2 son factores de transcripción que tienen la capacidad de regular distintos procesos celulares, mediante la activación o la represión de genes involucrados en los procesos normales y tumorales [35]. YY1 es miembro de la familia *Polycomb* [38]. Estructuralmente YY1 tiene dedos de zinc con los que regula activando o reprimiendo la transcripción de genes de los distintos procesos celulares [39, 44]. YY2 es una proteína con homología estructural y funcional a YY1. YY2 tiene un dominio de activación y un dominio de represión [43]. El YY2 puede unirse a las mismas secuencias consenso de DNA a las que se une YY1, sugiriendo que puede tener una función sinérgica o de competencia si actúan en la misma célula [49-51].

Se ha mostrado que la expresión de YY1 correlaciona con la ocurrencia de diversos tipos de cáncer, tales como la AML, el cáncer de mama y el cáncer de próstata [5, 52, 55]. En este trabajo analizamos la expresión de YY1 y YY2 como posibles marcadores de cáncer de ovario epitelial de pacientes mexicanas, ya que no se cuenta con marcadores eficientes y confiables para el pronóstico de esta enfermedad.

El cáncer de ovario es una enfermedad heterogénea con respecto a su histopatología, a su biología molecular y a sus variables clínicas [4]. Las características clínicas de las pacientes que analizamos fueron heterogéneas y las resumimos a continuación; el rango de edad de las pacientes fue de los 9 hasta los 80 años; la edad de la menarca fue de los 9 a los 18 años y observamos que más del 50% de las pacientes ya cursaban la menopausia. En cuanto a la caracterización histopatológica, encontramos que el 43% de las muestras son del subtipo seroso y más del 50% de las muestras corresponden a un grado poco diferenciado y a los estadios avanzados de la enfermedad (III y IV).

En un reporte previo [57], en donde analizaron la expresión de YY1 en muestras de pacientes por medio de microarreglos, encontraron una correlación entre la expresión de YY1 y genes que regulan la respuesta a taxanos. En nuestro estudio utilizamos la técnica de microarreglos de tejidos, que nos permite colocar un gran número de muestras en un solo bloque y analizar con las mismas condiciones en la inmunohistoquímica.

Analizamos la expresión de YY1 en estas muestras, desafortunadamente la expresión de YY1 en los tejidos fue mínima (2/100), por lo que no pudimos realizar ninguna correlación con las variables clínicas. Hasta la fecha no se ha hecho algún estudio sobre la expresión de YY2 en cáncer. También analizamos la expresión de YY2 en los microarreglos de tejido y observamos que YY2 se expresó en 83% del total las muestras, el patrón de expresión fue diferencial y fue preferentemente citoplasmático (65/100). Aunque no encontramos correlaciones significativas, observamos que la expresión de YY2 está asociada al subtipo histológico seroso (45 %), este es el subtipo de mayor frecuencia, el más agresivo y de peor pronóstico en la clínica [9].

En este estudio incluimos al marcador p16 por estar relacionado con pronóstico de las pacientes y a la respuesta a los fármacos dependiendo de la localización celular de p16 [21]. Por lo que quisimos analizar la correlación entre la expresión de p16 y los Yin Yang. Encontramos que 96/100 de las muestras analizadas expresaron a p16. La expresión de esta proteína fue de moderada a alta y su localización fue preferentemente citoplasmática (75/100), lo cual nos sugiere que estas pacientes posiblemente eran resistentes a la quimioterapia. No encontramos una correlación entre las expresiones de las proteínas p16 y YY2. Se ha reportado la expresión de p16 en los estadios avanzados del cáncer de ovario [21], sin embargo no encontramos una correlación significativa entre las variables clínicas y la expresión de ésta proteínas.

Es posible que los resultados del análisis no hayan sido significativos por el tamaño de la muestras, que aunque nuestra n inicial era de 132, el número total de muestras para cada análisis, se redujo considerablemente. Esto se debió a que no pudimos contar con los datos clínicos suficientes de las muestras (reincidencia, metastasis, respuesta al tratamiento). Creemos que si se aumentara el tamaño de la muestra la diferencia entre la expresión de las proteínas Yin Yang y las características clínicas de las pacientes podría ser significativa en este tipo de cáncer.

El tratamiento de las pacientes con cáncer de ovario es la cirugía y quimioterapia que combina taxol y cisplatino. Debido a que los Yin Yang son factores de transcripción que regulan genes involucrados en el proceso tumoral y a la expresión que tuvo YY2 en la muestras de cáncer de ovario, decidimos realizar un experimento *in vitro*. Analizamos si la inhibición de los Yin Yang modificaba la sensibilidad a la apoptosis inducida por el taxol y el cisplatino.

Los resultados mostraron que en el caso del cisplatino no hubo diferencias significativas en la sensibilidad a este fármaco, inhibiendo a cada uno de los factores Yin Yang.

En cuanto al taxol, solamente las células con el YY1 inhibido, tuvieron un incremento ligero a su resistencia al taxol pero no fue significativo. Este aumento correlaciona con lo reportado en la literatura, donde demuestran que la inhibición de YY1 en las líneas celulares HEY y BG1 incrementa la resistencia a taxanos y que YY1 regula genes involucrados en la respuesta a taxol [57].

Con respecto a YY2, es probable que no participe en la regulación de los genes involucrados con los mecanismos de acción del taxol y por lo tanto no hay ningún efecto en la sensibilidad a este fármaco.

Lo cual nos sugiere que YY1 y YY2 tienen distintos papeles en la apoptosis inducida por el taxol y el cisplatino en las células SKOV3, y podrían no participar en los mecanismos de citotoxicidad en estas células.

Conclusiones

- La proteína YY1 no se expresó significativamente en las muestras de cáncer de ovario.
- La proteína YY2 se expresó en un 86% de las muestras y su patrón fue predominantemente citoplasmático.
- No se encontró correlación con la expresión de la proteína YY2 con la expresión de p16.
- La expresión de YY2 correlacionó con el subtipo seroso del cáncer de ovario epitelial, pero no fue significativo.
- Comprobamos la eficiencia de la inhibición de los RNA de interferencia de YY1 y YY2 a nivel de mensajero.
- No encontramos cambios en la sensibilidad al cisplatino entre las líneas SKLuc, SKRNAiYY1 y SKRNAiYY2.
- Las células SKLuc y SKRNAiYY2 tienen la misma sensibilidad al taxol, mientras que las células SKRNAiYY1 mostraron un ligero incremento en la resistencia sin haber sido significativo

ANEXO 1

Tabla 1. Estadios del cáncer de ovario (FIGO) [23].

| Estadio | Características |
|----------------|--|
| 0 | Sin evidencia del tumor primario. |
| I | Tumor confinado a ovarios |
| IA | Tumor limitado a un ovario, cápsula intacta. No hay tumor en la superficie del ovario No hay células de cáncer en el ascitis o en el lavado peritoneal. |
| IB | Tumor limitado a ambos ovarios, cápsula intacta. No hay tumor en la superficie de los ovarios. No hay células de cáncer en el ascitis o en el lavado peritoneal. |
| IC | Tumor limitado a uno o ambos ovarios, con alguna de las siguientes características: Ruptura de la cápsula, tumor en la superficie del ovario, presencia de células de cáncer en el ascitis o en el lavado peritoneal. |
| II | Tumor en uno o ambos ovarios con extensión pélvica. |
| IIA | Extensión y/o implantes en útero o en %tubos+ No hay células de cáncer en el ascitis o en el lavado peritoneal. |
| IIB | Extensión a otros órganos pélvicos No hay células de cáncer en el ascitis o en el lavado peritoneal. |
| IIC | IIA/B con presencia de células de cáncer en el ascitis o en el lavado peritoneal. |
| III | Tumor en uno o ambos ovarios con confirmación microscópica de metástasis peritoneal fuera de la pelvis y/o metástasis a los nódulos linfáticos regionales. |

| | |
|------|--|
| IIIA | Metástasis peritoneal microscópica más allá de la pelvis. |
| IIIB | Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis 2 cm o menos en su mayor dimensión. |
| IIIC | Metástasis peritoneal más allá de la pelvis más de 2 cm en su mayor dimensión y/o metástasis en los nódulos linfáticos regionales. |
| IV | Metástasis distales más allá de la cavidad peritoneal. |

ANEXO 2

Tabla 2. Tipos histológicos del cáncer de ovario (FIGO) [23].

| | | | |
|------------------|---------------------|---------------------------|--|
| | Células germinales | Disgerminosa | 5% de los casos de cáncer de ovario. Se presenta en mujeres menores de 20 años. |
| | | No-disgerminosa | |
| Cáncer de ovario | Células del estroma | Células de la granulosa | 5% de los casos de cáncer de ovario. El 70% de los casos se detecta en el estadio I. |
| | | Células de sertoli-leydig | |
| | Células epiteliales | Seroso | 50% de los casos Es el subtipo más agresivo, es una neoplasia de alto grado que disemina rápido en toda la pelvis |
| | | Endometriode | 25% de los casos Es de bajo grado y se confina a los ovario |
| | | Mucinoso | 10% de los casos Es de bajo grado y se confina a los ovarios |
| | | Células claras | 5% de los casos Es agresivo y altamente resistente a la quimioterapia. |

ANEXO 3

Tabla 2. Marcadores tumorales en el cáncer de ovario

| Marcador tumoral | Tipo de marcador | Referencias |
|---|----------------------------------|--------------------|
| Haptoglobina | Estadios tardío | [22] |
| Osteopontina | Estadios tempranos y avanzados | [16] |
| HE4 | Estadios tempranos y avanzados | [16] |
| Mesothelin (SMRP) | Estadios tempranos y avanzados | [22] |
| Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) | Estadios tempranos y avanzados | [19, 22] |
| Apolipoprotein A1 (APOA1) | Estadios tempranos | [22] |
| BRCA 1 | Estadios tempranos y tardíos | [22] |
| p53 | Usualmente en estadios avanzados | [19, 22] |
| ARH1 | Indefinido | [20, 22] |

ANEXO 4

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AML | Leucemia Mieloide Aguda |
| DAB | Diamino-benzidina |
| DMEM | Eagle's Basal Medium |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAc | DNA complementario |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos |
| FIGO | Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia |
| FSB | Suero Fetal Bovino |
| GAPDH | Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa |
| HMG | Grupo de alta movilidad |
| IVSA | Inicio de vida sexual activa |
| RISC | Complejo silenciador inducido por rna |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| RNA | Acido ribonucleico |
| RNAi | RNA de interferencia |
| RNAm | RNA mensajero |
| RT-PCR | Transcriptasa reversa- reacción en cadena de la polimerasa |
| T.A. | Temperatura ambiente |
| VPH | Virus del papiloma humano |
| WB | Western Blot |
| YY1 | Yin Yang 1 |
| YY2 | Yin Yang 2 |

Abreviaturas de medidas

| | |
|---------|----------------|
| μ l | Microlitro |
| ml | Mililitro |
| μ M | Micromole |
| mM | Milimol |
| seg | Segundo |
| min | Minuto |
| h | Hora |
| pb | Pares de bases |
| mm | Milímetro |

BIBLIOGRAFÍA

1. Rizo P, Sierra MI, Vázquez G et al. Compendio del Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología. *Cancerología* 2007; 203-287.
2. Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 2006; 20: 207-225.
3. Ochoa-Carrillo FJ, Millan SV. [Importance of genetic counseling and molecular diagnosis testing in families at high risk for cancer]. *Cirugia y cirujanos* 2006; 74: 137-142.
4. Fehrmann RS, Li XY, van der Zee AG et al. Profiling studies in ovarian cancer: a review. *The oncologist* 2007; 12: 960-966.
5. Erkeland SJ, Valkhof M, Heijmans-Antonissen C et al. The gene encoding the transcriptional regulator Yin Yang 1 (YY1) is a myeloid transforming gene interfering with neutrophilic differentiation. *Blood* 2003; 101: 1111-1117.
6. du Bois A, Quinn M, Thigpen T et al. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCCC 2004). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2005; 16 Suppl 8: viii7-viii12.
7. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL et al. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 2003; 97: 2631-2642.
8. Bocker W. [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 2002; 86: 116-119.
9. Karst AM, Drapkin R. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *Journal of oncology* 2010; 2010: 932371.
10. Kruk PA, Godwin AK, Hamilton TC, Auersperg N. Telomeric instability and reduced proliferative potential in ovarian surface epithelial cells from women with a family history of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 1999; 73: 229-236.
11. Drapkin R, Crum CP, Hecht JL. Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and benign ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia. *Human pathology* 2004; 35: 1014-1021.
12. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer research* 2005; 65: 2162-2169.
13. Murdoch WJ, Martinchick JF. Oxidative damage to DNA of ovarian surface epithelial cells affected by ovulation: carcinogenic implication and chemoprevention. *Experimental biology and medicine* 2004; 229: 546-552.
14. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American journal of pathology* 2004; 164: 1511-1518.
15. Poveda A. Ovarian cancer: is the news good enough? *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer*

Society 2005; 15 Suppl 3: 298-306.

16. Ahmad S. Advances in ovarian cancer screening: health and medicine for women: a multidisciplinary, evidence-based review of mid-life health concerns. *The Yale journal of biology and medicine* 2011; 84: 47-49.
17. Kabawat SE, Bast RC, Jr., Bhan AK et al. Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 1983; 2: 275-285.
18. Bast RC, Jr., Urban N, Shridhar V et al. Early detection of ovarian cancer: promise and reality. *Cancer treatment and research* 2002; 107: 61-97.
19. Gadducci A, Zola P, Landoni F et al. Serum half-life of CA 125 during early chemotherapy as an independent prognostic variable for patients with advanced epithelial ovarian cancer: results of a multicentric Italian study. *Gynecologic oncology* 1995; 58: 42-47.
20. Meden H, Fattahi-Meibodi A. CA 125 in benign gynecological conditions. *The International journal of biological markers* 1998; 13: 231-237.
21. Goto T, Takano M, Hirata J et al. p16INK4a expression in cytology of ascites and response to chemotherapy in advanced ovarian cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2009; 125: 339-344.
22. Zagouri F, Dimopoulos MA, Bournakis E, Papadimitriou CA. Molecular markers in epithelial ovarian cancer: their role in prognosis and therapy. *European journal of gynaecological oncology* 2010; 31: 268-277.
23. Benedet JL, Bender H, Jones H, 3rd et al. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2000; 70: 209-262.
24. Wani MC, Taylor HL, Wall ME et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 1971; 93: 2325-2327.
25. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *The New England journal of medicine* 1995; 332: 1004-1014.
26. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979; 277: 665-667.
27. Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P et al. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer research* 1996; 56: 1851-1854.
28. Ding A, Sanchez E, Nathan CF. Taxol shares the ability of bacterial lipopolysaccharide to induce tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein kinase. *Journal of immunology* 1993; 151: 5596-5602.
29. Fan W. Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis. *Biochemical pharmacology* 1999; 57: 1215-1221.
30. Tabaczar S, Koceva-Chyla A, Matczak K, Gwozdziński K. [Molecular mechanisms of antitumor activity of taxanes. I. Interaction of docetaxel with microtubules]. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* 2010; 64: 568-581.
31. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer.

The New England journal of medicine 2004; 351: 1513-1520.

32. Rosenberg JM, Sato PH. Cisplatin inhibits in vitro translation by preventing the formation of complete initiation complex. *Molecular pharmacology* 1993; 43: 491-497.
33. Velazquez M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Cisplatin-induced apoptosis of HeLa cells. Effect of RNA and protein synthesis inhibitors, Ca²⁺ chelators and zinc. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 1998; 17: 277-284.
34. Maldonado V, Melendez J, Gonzalez H, Ortega A. Internucleosomal DNA cleavage in HeLa cells exposed to cisplatin. *Biochemistry and molecular biology international* 1995; 37: 691-696.
35. Seto E, Lewis B, Shenk T. Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. *Nature* 1993; 365: 462-464.
36. Palko L, Bass HW, Beyrouthy MJ, Hurt MM. The Yin Yang-1 (YY1) protein undergoes a DNA-replication-associated switch in localization from the cytoplasm to the nucleus at the onset of S phase. *Journal of cell science* 2004; 117: 465-476.
37. Wieschaus E, Nusslein-Volhard C, Kluding H. Kruppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation. *Developmental biology* 1984; 104: 172-186.
38. Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 1991; 67: 377-388.
39. Shi Y, Lee JS, Galvin KM. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochimica et biophysica acta* 1997; 1332: F49-66.
40. Park K, Atchison ML. Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 9804-9808.
41. Yao YL, Dupont BR, Ghosh S et al. Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1. *Nucleic acids research* 1998; 26: 3776-3783.
42. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 2006; 25: 1125-1142.
43. Nguyen N, Zhang X, Olashaw N, Seto E. Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 25927-25934.
44. Hyde-DeRuyscher RP, Jennings E, Shenk T. DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1. *Nucleic acids research* 1995; 23: 4457-4465.
45. Castellano G, Torrisi E, Ligresti G et al. The involvement of the transcription factor Yin Yang 1 in cancer development and progression. *Cell cycle* 2009; 8: 1367-1372.
46. Sui G, Affar el B, Shi Y et al. Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* 2004; 117: 859-872.
47. Thomas MJ, Seto E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* 1999; 236: 197-208.
48. Blattner C. Regulation of p53: the next generation. *Cell cycle* 2008; 7: 3149-3153.

49. Kim JD, Faulk C, Kim J. Retroposition and evolution of the DNA-binding motifs of YY1, YY2 and REX1. *Nucleic acids research* 2007; 35: 3442-3452.
50. Yant SR, Zhu W, Millinoff D et al. High affinity YY1 binding motifs: identification of two core types (ACAT and CCAT) and distribution of potential binding sites within the human beta globin cluster. *Nucleic acids research* 1995; 23: 4353-4362.
51. Klar M, Bode J. Enhanceosome formation over the beta interferon promoter underlies a remote-control mechanism mediated by YY1 and YY2. *Molecular and cellular biology* 2005; 25: 10159-10170.
52. Allouche A, Nolens G, Tancredi A et al. The combined immunodetection of AP-2alpha and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors. *Breast cancer research : BCR* 2008; 10: R9.
53. Baritaki S, Sifakis S, Huerta-Yepez S et al. Overexpression of VEGF and TGF-beta1 mRNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection. *International journal of oncology* 2007; 31: 69-79.
54. de Nigris F, Botti C, de Chiara A et al. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in human osteosarcomas. *European journal of cancer* 2006; 42: 2420-2424.
55. Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S et al. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *International journal of oncology* 2005; 27: 131-141.
56. Lieberthal JG, Kaminsky M, Parkhurst CN, Tanese N. The role of YY1 in reduced HP1alpha gene expression in invasive human breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR* 2009; 11: R42.
57. Matsumura N, Huang Z, Baba T et al. Yin yang 1 modulates taxane response in epithelial ovarian cancer. *Molecular cancer research : MCR* 2009; 7: 210-220.
58. Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM et al. Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005; 11: 3686-3696.
59. Grubach L, Juhl-Christensen C, Rethmeier A et al. Gene expression profiling of Polycomb, Hox and Meis genes in patients with acute myeloid leukaemia. *European journal of haematology* 2008; 81: 112-122.
60. Dukers DF, van Galen JC, Giroth C et al. Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *The American journal of pathology* 2004; 164: 873-881.
61. Libra M, Castellano G, Baritaki S, et al. Expression, role in transformation and prognostic significance of the transcription factor Yin Yang 1 (YY1) in non-Hodgkin's lymphoma: analyses in NHL tissues by experimental and bioinformatic approaches. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2008; 112:2827.
62. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251.
63. Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology* 1992; 6: 3343-3353.
64. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* 1990; 2: 279-289.
65. Pham JW, Pellino JL, Lee YS et al. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves

- targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 2004; 117: 83-94.
66. Guo S, Kemphues KJ. Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Current opinion in genetics & development* 1996; 6: 408-415.
 67. Fire A, Xu S, Montgomery MK et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.
 68. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A et al. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2003; 67: 657-685.
 69. Downward J. RNA interference libraries prove their worth in hunt for tumor suppressor genes. *Cell* 2005; 121: 813-815.
 70. Swanton C, Nicke B, Marani M et al. Initiation of high frequency multi-drug resistance following kinase targeting by siRNAs. *Cell cycle* 2007; 6: 2001-2004.
 71. Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Molecular vision* 2003; 9: 210-216.
 72. Blagbrough IS, Zara C. Animal models for target diseases in gene therapy--using DNA and siRNA delivery strategies. *Pharmaceutical research* 2009; 26: 1-18.
 73. Pho M, Lee W, Watt DR et al. Cofilin is a marker of myofibroblast differentiation in cells from porcine aortic cardiac valves. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2008; 294: H1767-1778.
 74. Yokota T, Iijima S, Kubodera T et al. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and biophysical research communications* 2007; 361: 294-300.
 75. Tolentino MJ, Brucker AJ, Wan S et al. Re: Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 2004; 24: 661.
 76. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-178.
 77. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006; 441: 111-114.
 78. Hannenhalli S, Putt ME, Gilmore JM et al. Transcriptional genomics associates FOX transcription factors with human heart failure. *Circulation* 2006; 114: 1269-1276.
 79. Geisbert TW, Hensley LE, Kagan E et al. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. *The Journal of infectious diseases* 2006; 193: 1650-1657.
 80. Song E, Lee SK, Wang J et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature medicine* 2003; 9: 347-351.
 81. Reddy KS. India wakes up to the threat of cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 50: 1370-1372.
 82. Angaji SA, Hedayati SS, Poor RH et al. Application of RNA interference in treating human diseases. *Journal of genetics* 2010; 89: 527-537.
 83. Colussi PA, Quinn LM, Huang DC et al. Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. *The Journal of cell biology* 2000; 148: 703-714.

84. Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene therapy* 2006; 13: 496-502.
85. Godwin AK, Perez RP, Johnson SW et al. Growth regulation of ovarian cancer. *Hematology/oncology clinics of North America* 1992; 6: 829-841.
86. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 1983; 71: 717-721.
87. Chionh F, Baglietto L, Krishnan K et al. Physical activity, body size and composition, and risk of ovarian cancer. *Cancer causes & control : CCC* 2010; 21: 2183-2194.
88. Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Gordon GB et al. Serum gonadotropins and steroid hormones and the development of ovarian cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1995; 274: 1926-1930.
89. Gabra H, Taylor L, Cohen BB et al. Chromosome 11 allele imbalance and clinicopathological correlates in ovarian tumours. *British journal of cancer* 1995; 72: 367-375.
90. Davis M, Hitchcock A, Foulkes WD, Campbell IG. Refinement of two chromosome 11q regions of loss of heterozygosity in ovarian cancer. *Cancer research* 1996; 56: 741-744.
91. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2006. *CA: a cancer journal for clinicians* 2006; 56: 106-130.
92. Downie D, McFadyen MC, Rooney PH et al. Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005; 11: 7369-7375.