



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE TRANSCRITOS EN LESIONES MALIGNAS DE**  
**OVARIO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ**

**TUTOR: DR. JOSÉ MORENO RODRÍGUEZ**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**MÉXICO, D.F. MAYO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 17 de febrero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **JUÁREZ MÉNDEZ SERGIO** con número de cuenta **505013657**, con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE TRANSCRITOS EN LESIONES MALIGNAS DE OVARIO"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ MORENO RODRÍGUEZ**:

Presidente: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES  
Vocal: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA  
Secretario: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Suplente: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA  
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de marzo de 2014

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi profundo agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Donde se me dio la oportunidad de realizar los estudios de posgrado y por el apoyo dado durante el transcurso de los estudio de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me fue otorgada para realizar los estudios de Doctorado.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por la beca que se me otorgo en el Doctorado.

Mi profundo agradecimiento a los miembros del comité tutor: Dr. José Moreno Rodríguez, Dr. Alejandro Zentella Dehesa y Dra. Marcela Lizano Soberón, quienes me dirigieron orientaron y apoyaron para realizar el proyecto. Sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

A mi jurado por los comentarios realizados al trabajo, Dr. Marco A. Cerbón, Dr. Diego J. Arenas y Dr. Carlos Pérez

A CONACyT por los fondos (61742) para el presente trabajo, a cargo de la Dra. Guelaguetza Vázquez Ortiz y el Dr. Ricardo López Romero.

Al Dr. Mauricio Salcedo Vargas y al laboratorio de Oncología Genómica IMSS por el apoyo brindado.

A la Dra. Patricia Piña Sánchez por todo su apoyo brindado.

Dr. Fabian Arecavaleta Velazco, Dra Laura Díaz Cueto por su apoyo, comentario y orientación, para la realización del presente trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Oncología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, por brindarme su apoyo incondicional.



## **Agradecimientos**

A toda mi familia, a mi mamá Josefa Méndez por todo su apoyo y estar siempre conmigo.

A mi esposa Vanessa Villegas Ruíz, por toda la paciencia, apoyo y por esta conmigo incondicionalmente.

A mis amigos del Laboratorio de Oncología Genómica, Hugo Arreola, Raúl Peralta.

A mis amigos de la Unidad de Bioquímica INCMNSZ, especialmente a Eden V. Montes de Oca por su valiosa ayuda.

A mis compañeros de Laboratorio, Ariel Flores, Víctor Dávila, Oscar A. Pérez, Israel Pérez.

A mis amigos Héctor P. Salazar, Guillermo Romero, Andrés Jara, Berenice Hernández, Carlos Hagnahuer.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>5</b>
<b>Cáncer de ovario</b> .....	<b>5</b>
<b>Factores de Riesgo</b> .....	<b>5</b>
Factores genéticos familiares .....	6
Factores reproductivos.....	6
Factores farmacológicos .....	6
<b>Teorías del desarrollo de Cáncer de Ovario</b> .....	<b>7</b>
<b>Clasificación de los tumores de ovario</b> .....	<b>7</b>
Tumores de origen epitelial.....	7
Tumores de estroma gonadal.....	8
Tumores de células germinales.....	8
<b>Aspectos clínicos de los tumores de ovario</b> .....	<b>9</b>
<b>Estadificación de los tumores de ovario</b> .....	<b>10</b>
<b>Tratamiento de los tumores de ovario</b> .....	<b>11</b>
<b>Biología molecular del cáncer de ovario</b> .....	<b>12</b>
Alteraciones genéticas .....	13
<b>Splicing alternativo</b> .....	<b>14</b>
Splicing Alternativo y en patologías .....	17
<i>Splicing</i> en cáncer .....	18
<b>Justificación</b> .....	<b>20</b>
<b>Pregunta de investigación</b> .....	<b>21</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>21</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>21</b>
Objetivos Particulares .....	21
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>22</b>
Tejidos de Estudio.....	22
Purificación del RNA .....	22
Microarreglos .....	23
Análisis de expresión y splicing alternativo .....	23
Amplificación de RT-PCR y clonación.....	23
<b>Resultados</b> .....	<b>25</b>
Muestras de estudio .....	25
Purificación del RNA .....	25
Microarreglos de expresión.....	25
Controles de calidad.....	25
Análisis de expresión diferencial .....	28
Expresión diferencial de exones .....	32
<i>Splicing</i> alternativo del mRNA de la proteína ZNF695 .....	33
Caracterización de los amplicones de ZNF695.....	35
<b>Discusión</b> .....	<b>40</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>43</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>44</b>



<b>Anexo 1 Protocolo para el GENE CHIP 1.0</b> .....	<b>44</b>
<b>Anexo 2 Genes expresados diferencialmente</b> .....	<b>55</b>
<b>Anexo 3. Expresión de variantes de mensajeros</b> .....	<b>57</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>58</b>
<b>Apéndice</b> .....	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer en México..	5
Figura 2. Alteraciones presentes en 528 casos de cáncer de ovario.....	14
Figura 3. Electroforesis capilar. ....	26
Figura 4. Controles de calidad de los microarreglos.....	27
Figura 5. Correlación de Pearson de los controles de calidad.....	27
Figura 6. Normalización de los controles de calidad.....	28
Figura 7. Análisis de componente principal (PCA).....	29
Figura 8. <i>Cluster</i> Jerárquico..	31
Figura 9. Dedo de Zinc 695 (ZNF695).....	34
Figura 10. Gen ZNF695.....	35
Figura 11. Electroforesis de los productos de PCR del gen constitutivo RPL4 y ZNF695. ....	36
Figura 12. Variantes de RNA mensajero de ZNF695 expresados en tumores de ovario.....	37
Figura 13. Alineamiento de las secuencias expresadas de ZNF695.....	38
Figura 14. Alineamiento de los péptidos generados <i>in silico</i> de los amplicones del gen ZNF695 expresados en tumores y líneas celulares de CaO..	39
Figura 15. <i>Splicing</i> alternativo del gen ZNF695.....	39

## Resumen

El cáncer de ovario (CaO) es la sexta neoplasia con mayor frecuencia en el mundo, ésta enfermedad tiene una alta mortalidad debido a que más del 70% de las pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas, permitiendo una supervivencia a 5 años en menos del 30%. Se han identificado diferentes factores de riesgos, sin embargo, la etiología aún no es clara.

En CaO se han identificado diferentes alteraciones moleculares incluidas: pérdidas de DNA, cambios en los perfiles de expresión y *splicing* alternativo (SA). El SA provee un importante mecanismo de regulación involucrado en diversos procesos biológicos. El SA tiene un impacto importante en el fenotipo celular, esto se debe a que puede generar diferentes RNA mensajeros maduros que pueden traducirse a proteínas con funciones distintas. En este trabajo nosotros evaluamos los perfiles de expresión y *splicing* alternativo en tejidos de ovario sin lesión, tumores benignos, tumores malignos de ovario y líneas celulares derivadas de cáncer de ovario. Entre los transcritos más significativos con SA, sobre expresados en cáncer de ovario y líneas celulares fue el dedo de zinc 695 (ZNF695), con dos variantes de RNA mensajero no caracterizadas hasta el momento. La identidad de las variantes del ZNF696, fue confirmado por clonación y secuenciación de los amplicones obtenidos de los pacientes con CaO y líneas celulares. Los tejidos sanos de ovario no expresaron ninguna variante del gen ZNF695, mientras que las células de CaO expresaron las variantes del gen. Nosotros consideramos a las variantes del ZNF695 como potenciales oncogenes que juegan un papel importante en la patogenia del CaO.



## **Abstract**

Ovarian Cancer (OC) is the sixth most prevalent form of cancer worldwide, which has a high mortality rate because at the time of diagnosis nearly 70% of cases are at an advanced stage, leading to a 5 years survival below ~30%. There are several risk factors OC-associated, however, the etiological is not clear.

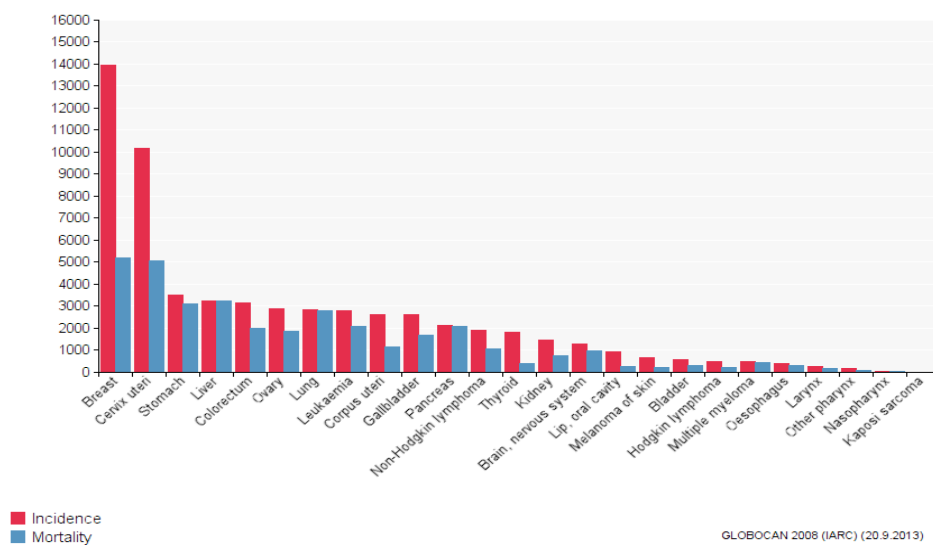
Several alterations in OC have been identified including: loss DNA, gene expression deregulated and alternative splicing (AS). The AS provides a critical and flexible layer of regulation, intervening in many biological processes. AS has major impact on the cell phenotype as a single pre-mRNA spliced in different ways can give rise to different mature mRNA transcripts that are translated onto distinct proteins varying in functions.

In this work we evaluated gene expression profiles and alternative splicing in ovarian tissues, benign ovarian tumors, ovarian cancer and ovarian cell lines. Among several significantly overexpressed AS genes in malignant ovarian tumors and ovarian cancer cell lines, the most significant one was that of the zinc finger protein ZNF695, with two previously unknown mRNA splice variants identified in ovarian tumors and cell lines. The identity of ZNF695 AS variants was confirmed by cloning and sequencing of the amplicons obtained from ovarian cancer tissue and cell lines. Moreover, normal ovarian tissue does not express ZNF695 in any of its isoforms and OC cells express only the alternative splice variants. We consider ZNF695 splice variants as potential oncogenes playing a role in the pathogenesis of OC

## Introducción

### Cáncer de ovario

El cáncer de ovario (CaO) es un problema importante de salud, ya que es la sexta neoplasia más común a nivel mundial y la tercera de tipo ginecológico (**Figura 1**). Estudios epidemiológicos sitúan al CaO con un mayor índice de mortalidad que otras neoplasias ginecológicas, lo cual puede deberse a que las pacientes generalmente son diagnosticadas en etapas avanzadas. El CaO tiene una incidencia  $<6.1/100,000$  mujeres (Globocan 2008) y, en décadas recientes (1975-2007) el número de pacientes con CaO se ha elevado en un 25% y su supervivencia sigue siendo baja (<http://www.cancerresearchuk.org>). De acuerdo a su origen, el CaO se clasifica en: epitelial, de estroma y de células germinales; de los cuales, el 85% de los casos son del tipo epitelial [1], que es más frecuente en mujeres pre-menopáusicas y menopáusicas, mientras que los tumores germinales ocurren generalmente en menores de 20 años. Otro dato interesante del CaO es la supervivencia, es mayor en mujeres jóvenes que en aquellas que inician con la enfermedad en edades avanzadas.



**Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer en México.** Principales neoplasias en mujeres mexicanas de todas las edades.

### Factores de Riesgo

Aunque a la fecha se desconocen los factores que promueven el desarrollo del CaO, algunos factores pudieren estar relacionados a la enfermedad, como:



## **Factores genéticos familiares**

Para esto, que ocurre en menos del 10% de los tumores de ovario, se han identificado tres patrones generales de relación familiar:

1. Síndrome de cáncer ovárico, con alto riesgo para el desarrollo de CaO (50%).
2. Síndrome de cáncer mama-ovario, con riesgo para desarrollar carcinomas de mama y/o de ovario (solos o combinados), asociado principalmente a polimorfismos puntuales de los genes BRCA1 y BRCA2 [2].
3. El tercero también se considera de tipo familiar, no muy claro hasta ahora, pero aparentemente asociado con riesgo a desarrollar cáncer de colon y, en menor proporción, gástrico, sarcomas, tiroideos, Lynch II y de endometrio.

Los tres síndromes tienen una forma de transmisión vertical, con herencia autosómica dominante. Las hijas de madres con estos carcinomas tienen un 50% de riesgo a desarrollar la enfermedad [3].

## **Factores reproductivos**

Estudios epidemiológicos han revelado que las mujeres nulíparas tienen un riesgo 2.45 mayor de desarrollar carcinomas de tipo epitelial con respecto a las multíparas. El riesgo se reduce a 1.27 en aquellas que tuvieron al menos una gestación, sugiriendo que el estado endocrinológico del embarazo podría ser un factor protector para el desarrollo de CaO [4].

## **Factores farmacológicos**

La utilización de fármacos para aumentar la fertilidad, aparentemente aumenta el riesgo para desarrollar CaO [5]. Por otro lado, la utilización de anticonceptivos orales podría tener un papel protector, ya que el riesgo relativo en mujeres que los han utilizado es de 0.6 y persiste hasta 10 años después de la suspensión de la terapia hormonal [6]. Lo mismo se observó en mujeres nulíparas que utilizaron anticonceptivos durante 5 años.

**Factores ambientales:** Datos epidemiológicos sugieren que algunos factores ambientales podrían ser determinantes en el desarrollo de CaO, principalmente la exposición a asbesto. Otro factor posiblemente relacionado

con el CaO, podría ser la dieta, ya que se ha sugerido una posible asociación con el consumo de grasa animal, carne o proteína total y con niveles elevados de colesterol sérico.

### **Teorías del desarrollo de Cáncer de Ovario**

Como se ha mencionado, existe poca evidencia confiable para correlacionar posibles factores de desarrollo y/o progresión del CaO. Sin embargo, existen algunas teorías al respecto:

- 1. Teoría de la "ovulación incesante":** esta teoría propone que en cada ovulación, el epitelio ovárico sufre lesiones que activan mecanismos diversos de reparación tisular. El daño constante en el epitelio ovárico, podría eventualmente llevar a errores en la reparación del DNA, causando mutaciones o microdeleciones, entre otros, con cambios en la expresión génica y finalmente, transformación celular.
- 2. Teoría del "exceso de gonadotropina":** esta teoría propone que un exceso de gonadotropina promueve proliferación constante del epitelio ovárico, que lleva eventualmente a la transformación celular.
- 3. Teoría de "migración de carcinógenos exógenos":** esta teoría, que no es clara y con poca evidencia, sugiere la llegada de carcinógenos a las áreas genitales y la cavidad peritoneal como promotores de la transformación celular.

### **Clasificación de los tumores de ovario**

Actualmente se conoce una amplia variedad de tumores de ovario, lo que ha permitido clasificarlos en tres grandes grupos, dependiendo del tejido que origina el tumor.

#### **Tumores de origen epitelial**

Los más frecuentes (aproximadamente 90% de todos los tumores malignos de ovario) que se originan en la superficie del epitelio del ovario, se sub-clasifican en 6 categorías de acuerdo a sus características histopatológicas:

1. Serosos
2. Mucinosos
3. Endometrioides



4. Mesonefroides (de células claras)
5. Tumores de Brenner
6. Mesodérmico mixto.

La mayoría de los tumores puede agruparse en benignos o malignos, sin embargo, los tumores de ovario se agrupan además, en un grado intermedio de malignidad, tumores de bajo potencial oncogénico o limítrofes, de acuerdo con sus características proliferativas celulares. Esto también influye en el pronóstico, ya que la supervivencia en tumores *limítrofes* es mayor que en los tumores malignos de la misma estirpe [7].

### **Tumores de estroma gonadal**

Representan el 6% de los tumores de ovario y tienen una gran cantidad de variantes histológicas y de grado de diferenciación celular, dificultando su categorización como benignos o malignos [7]. Estos se originan a partir de diversos componentes del ovario, incluyendo: células de la teca, granulosa y/o fibrocitos, se pueden sub-clasificar como:

1. Tumores de células de la granulosa
2. Tumores de células de Sertoli
3. Tumores de la teca
4. Tumores Sertoli-Leydig

### **Tumores de células germinales**

Representan menos del 2% de los tumores malignos de ovario, es interesante mencionar que algunos de estos tumores recapitulan estadios del desarrollo embrionario, los más frecuentes son:

1. Disgerminoma
2. Tumor endodérmico
3. Carcinoma embrionario
4. Coriocarcinoma
5. Teratoma
6. Tumor carcinoide
7. Gonadoblastoma

Los teratomas se subclasifican en inmaduros, maduros, monodérmicos y altamente especializados, mientras que los carcinoide puede ser insulares,

trabeculares o mucinosos [7].

### **Aspectos clínicos de los tumores de ovario**

El diagnóstico del CaO es muy difícil debido a que los síntomas casi nunca son claros, entre los más frecuentes están: dolor y distensión abdominal, flatulencias, dispepsias, presión en la pelvis, lo que hace casi imposible hacer el diagnóstico precoz. Conforme el tumor crece, las pacientes pueden notar aumento del volumen abdominal, seguida de anorexia, dolor intenso, pérdida de peso y náuseas. En las etapas iniciales, el dolor se debe a distensión de la capa ovárica, mientras que en etapas tardías puede deberse a hemorragia y necrosis. De estos, el signo más frecuente es la distensión abdominal. Un porcentaje elevado de las pacientes (50%) presentan ascitis al momento del diagnóstico, lo que generalmente es un indicio de malignidad, aunque, se han observado quistes de ovario que pueden ocupar gran parte del área abdominal (con ascitis), sin rasgos contundentes de malignidad. Otros signos asociados son: aumento de la frecuencia urinaria, pérdida de peso, trastornos menstruales (amenorrea, menorragia, polimenorrea, metrorragia), masa pélvica uni o bilateral.

Otro factor importante de riesgo son los tumores de origen familiar, es el tipo de tumor son cerca del 10% de todos los tumores de ovario, se caracterizan por presentar una amplia variedad de mutaciones, principalmente en los genes BRCA1 y BRCA2 [2]. Otros datos importantes a ser considerados en la evaluación del paciente, son los sitios potencialmente comprometidos por el crecimiento de la masa tumoral, para lo cual se realizan diversos estudios de laboratorio, que en conjunto con las características clínicas, permiten dar un diagnóstico más certero. Dentro de los estudios de rutina más comunes tenemos:

1. Rx. estándar de tórax.
2. Ecografía de abdomen-pélvica
3. TAC Abdomen y pelvis
4. Pielograma intravenoso
5. Proctosigmoideoscopia y Enema de Bario
6. Citología cérvico vaginal
7. Citología de la ascitis

## 8. Marcador tumoral CA-125

La diseminación del CaO es principalmente por implantación peritoneal, pero también puede ser por vías linfática o hemática. En un inicio, las células tumorales invaden y se implantan en las superficies de la cavidad peritoneal, siendo el epiplón un área frecuente para el desarrollo de metástasis. Inicialmente se forman micrometástasis, que con la proliferación continua, y la diseminación peritoneal, promueven la producción de ascitis que se debe a un bloqueo de la absorción linfática, además de ser mediada por factores como prostaglandinas y péptidos derivados del tumor.

### **Estadificación de los tumores de ovario**

La estadificación del cáncer de ovario se hace en forma quirúrgica, y está basada en los hallazgos transoperatorios. El objetivo fundamental de la laparotomía es el diagnóstico, el estadio y la citoreducción máxima del tumor. Se procede posteriormente a examinar las características de la masa, tamaño, adherencia e invasión a otras estructuras. Basados en estas características, la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) clasifica los tumores de ovario en:

**Estadio I:** Crecimiento limitado a los ovarios.

- **Ia:** El crecimiento es limitado a un ovario, no hay ascitis con células malignas, no hay tumor en las superficies externas y se encuentra encapsulado e intacto.
- **Ib:** El crecimiento es limitado en ambos ovarios, no hay ascitis con células malignas, no hay tumor en la superficie externas y el tumor se encuentra encapsulado e intacto.
- **Ic:** Hay presencia de masa tumoral en la superficie en uno o ambos ovarios, con capsula rota, con ascitis y células malignas.

**Estadio II:** El crecimiento del tumor puede ser uni o bilateral y con extensión

- **Ila:** Con extensión y/o metástasis a trompas de Falopio.
- **Ilb:** Con extensión a otros tejidos pélvicos.
- **Ilc:** Tumor en la superficie de uno o ambos ovarios, capsula rota o intacta, con ascitis que contenga células malignas.

**Estadio III:** El tumor puede afectar ambos ovarios con implantes en el

peritoneo fuera de la pelvis y/o ganglios, con metástasis y extensión maligna al intestino delgado o epiplón, comprobada por histología.

- **IIIa:** El tumor por revisión macroscópica esta limitado a la pelvis, invasión a ganglios negativos, con micrometástasis en la superficie peritoneal abdominal confirmado por histopatología.
- **IIIb:** El tumor puede ser uni o bilateral, con implantes en la superficie peritoneal abdominal, menores a 2 cm de diámetro y ganglios negativos.
- **IIIc:** Hay implantes abdominales de  $\geq 2$  cm de diámetro.

**Estadio IV:** El tumor puede ser uni o bilateral, con metástasis a distancia, derrame pleural.

### Tratamiento asignado a las pacientes con CaO.

Estadio	Tratamiento
I	Histerectomía abdominal con salpingooforectomía bilateal, se recomienda quimioterapia para Ib y posteriores
II	Tumores residual menor a 2 cm se les administra quimioterapia sistémica, entre los fármacos utilizados están: paclitaxel (taxol)-platino, carboplatino, ciclofosfamida-cisplatino o ciclofosfamida-caboplatino, en combinación radioterapia abdominal. En tumores residuales mayores a 2 cm se recomienda la administración de paclitaxel con cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida más cisplatino, o bien ciclofosfamida+carboplatino. Se ha demostrado mayor supervivencia en pacientes con lesiones residuales mejores a 2 cm, versus aquellos que tienen residuos mayores a 2 cm [8-10]
III	Es recomendable aplicar al paciente con tumores menores a 2 cm radioterapia, más el tratamiento de quimioterapia. Es importante mencionar que, en pacientes en estadios III, es necesario realizar nuevamente una laparotomía, con la finalidad de evaluar la respuesta al tratamiento por la existencia de masa tumoral, así como la persistencia de la enfermedad.
IV	La enfermedad se encuentra diseminada, se realiza la extirpación de la mayor cantidad de tumor posible, posteriormente a ello se considera la administración de quimioterapia.

### Tratamiento de los tumores de ovario

El tratamiento de los tumores de ovario es variable y se basa en las



características y estadio del tumor. Es importante recalcar que la exploración quirúrgica es indispensable para el diagnóstico, estadificación y para la decidir la aplicación de quimioterapia y/o radioterapia.

Evidentemente, en CaO la cirugía es la primera intervención para eliminar la mayor cantidad de células tumorales, se reporta que la supervivencia a 5 años es del 28% en los pacientes que se someten a tratamientos quirúrgicos radicales; en cirugías parciales es del 9% y solo el 3% cuando son sometidas únicamente a biopsia [11].

El papel de la radioterapia para el tratamiento del CaO continúa siendo controversial, a pesar de múltiples ensayos realizados, el uso de alquilantes como la ciclofosfamida, clorambucilo y nitrosureas, han mostrado alta efectividad en el tratamiento de esta neoplasia [12], sin embargo, a pesar de que se ha mostrado evidencia de la efectividad de fármacos alquilantes, los fármacos no alquilantes (hexametilmelamina, doxorubicina, methotrexate, cisplatino y 5-fluoracilo) son los más utilizados para el tratamiento del CaO.

En el pronóstico del CaO influye fundamentalmente la etapa del diagnóstico, debido a que representa la extensión del tumor. De acuerdo a la FIGO, la supervivencia a 5 años para los tumores epiteliales de ovario son: Estadio Ia: 84%, Ib: 79%, Ic: 73%, IIa: 65%, IIb: 61%, IIc: 54%, IIIa: 52%, IIIb 29%, IIIc: 18%, IV: menos del 14%.

### **Biología molecular del cáncer de ovario**

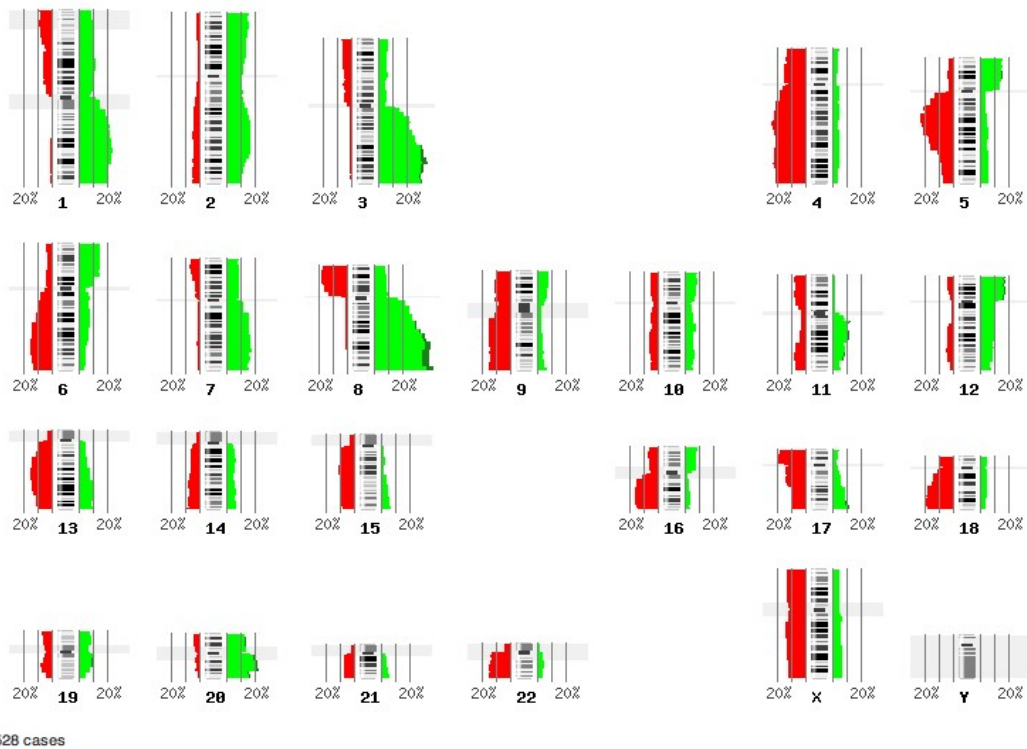
Lo que se conoce como cáncer, comprende un grupo de enfermedades caracterizadas por proliferación anormal e incontrolada de células transformadas (mailgnas) que invaden el tejido sano y se diseminan, ya sea por contigüidad o por vías linfática o hematológica. Se han podido elucidar características inherentes del cáncer como: autosuficiencia en señales de crecimiento, evasión de la apoptosis, insensibilidad a señales para inhibir el crecimiento, angiogénesis sostenida, ilimitado potencial de replicación, capacidad de migrar y producir metástasis, inflamación, evasión del sistema inmune, desregulación energética celular y la inestabilidad genómica [13, 14]. Las distintas formas de cáncer son heterogéneas y se asocian a una gran

diversidad de cambios moleculares, difíciles de identificar con los métodos tradicionales.

### **Alteraciones genéticas**

Las primeras evidencias relacionadas con el número de copias, se les denominó desordenes genómicos causados por cambios estructurales de *novo* [15]. Actualmente, se sabe que la amplificación del DNA en el número de copias, es un mecanismo importante por el cual, las células cancerosas incrementan la expresión de genes como: oncogenes y genes de resistencia a fármacos, entre otros [16]. Se sabe que la expresión de proteínas oncogénicas, se encuentran íntimamente relacionados con procesos celulares asociados al crecimiento celular, migración, metástasis, inhibición de la apoptosis, entre otros. Por otro lado, también se han evidenciado regiones del DNA que se pierden, por ejemplo: microdeleciones, deleciones parciales o total de diversos genes, con ello la supresión de múltiples genes; principalmente supresores de tumores [17]. Diversos reportes sugieren que el desarrollo y progresión del cáncer requiere de alteraciones génicas, promoviendo la formación de nuevos arreglos cromosómicos y con ello la transformación celular [18] .

En CaO se han evidenciado cambios estructurales en el DNA, incluyendo deleciones y amplificaciones en diversas regiones del genoma. Entre las alteraciones más representativas en ganancia tenemos: 1q21~q31, 2p, 3q, 5p, 7, 8q, 10p, 12p, 16p, 17, 19, 20, y 22q; las pérdidas más frecuentes: X, 2q22~q34, 3p, 4, 5q11~q31, 6q, 8p, 9, 11p, 13, 14 y 18 [19]. Además, se han definido genes alterados con papeles celulares importantes entre los que destacan: FGF3/4, FGFR, CCNE1, PAK1, JUNB y MDM2 [16]. Es importante destacar que, las alteraciones génicas pueden agrupar estirpes tumorales de ovario [19, 20]. No obstante, existen muchas discrepancias sobre las alteraciones génicas asociadas al CaO, por ejemplo, se reporta que las amplificación más frecuentes son en las regiones citogenéticas 8q, 1q, 20q y 3q en más del 50% de los casos, y las deleciones más comunes se presentan en las regiones 13q, 4q y 18q [21]. Por otro lado, otros grupos reportan la amplificación citogenética 9q en 32% de los casos [22], y deletadas (4q, 5q, 13q y 18q) se presentan en el 41% de los casos [23].



**Figura 2. Alteraciones presentes en 528 casos de cáncer de ovario:** En esta figura están representadas las alteraciones presentes en los 24 cromosomas humanos, en el lado izquierdo, en rojo, se muestran las regiones que se pierden o eliminan, en color verde se muestran las regiones que se ganan o amplifican en los 24 cromosomas humanos.

Debido a que no existe una definición clara en el desarrollo y progresión de los tumores de ovario, hay dos hipótesis; por una parte, que los tumores malignos surgen de la progresión de tumores de bajo potencial oncogénico (límitrofe) [24]; por otro lado, los tumores malignos de ovario se originan *de novo* [25, 26], es decir, que no hay estadios en etapas precursoras como los *límitrofes*. En estudios moleculares se ha observado que los estadios de bajo potencial oncogénico, no presentan las mismas alteraciones de los tumores malignos [21]. Estos resultados pudieran estar relacionados con la teoría sugerida, donde los tumores malignos de ovario son *de novo*.

### Splicing alternativo

El genoma humano tiene aproximadamente 30 mil genes reportados en el *International Human Genome Sequencing Consortium* (IHGSC) [27]. No

obstante, se estiman más de 300 mil transcritos distintos. La diferencia entre el número de genes y transcritos, se debe en la mayoría de los casos a variantes de mensajero o isoformas, generadas a partir de un único transcrito por mecanismos de corte y empalme alternativo (*splicing* alternativo, SA).

Históricamente, por el descubrimiento del adenovirus hexon en 1977 por Walter Gilbert, se observó la presencia de diferentes transcritos generados por un único mensajero. A partir de entonces, se propuso la idea que en el transcriptoma humano, también podrían existir esas formas de mensajeros; sin embargo, fue en inicios de 1980 cuando se evidencian genes con éstas características [28-31]. De manera general el SA ocurre cuando: el ensamble del *spliceosoma* inicia con el reconocimiento del sitio de *splicing* 5' por snRNA U1, y la unión del factor de *splicing* (SF1) a el punto de ramificación, la unión de estas dos ribonucleoproteínas conforman el complejo E', el cual, es dependiente ATP. Posteriormente, el complejo E' se convierte en complejo E, por el reclutamiento y unión al tracto de polipirimidina en la región 3' terminal del factor auxiliar U2 (U2AF), y el heterodímero U2AF65/U2AF35. A continuación, se reemplaza SF1 por U2 mediante una reacción dependiente de ATP. Como consecuencia, se genera el complejo del pre-*spliceosoma*. Cuando se recluta el tri-snRNP (U4/U6-U5) ocurren nuevos cambios conformacionales, promoviendo la formación del complejo B. Finalmente, la forma catalítica del *spliceosoma* resulta de la formación del complejo C por la pérdida de snRNP (U1 y U4) [32]. Es importante destacar que el proceso es corregulado por más de 150 proteínas accesorias [33-35]. Además, muchas proteínas con función reguladora del *splicing* tienen la capacidad de promover la escisión alternativa de regiones codificantes, promoviendo la formación de variantes de mensajero a partir de un transcrito único pero con secuencias distintas. Muchos de los transcritos generados por *splicing* alternativo pueden traducirse a proteína (isoformas). Esto nos habla de la complejidad del transcriptoma y de la diversidad de proteínas que pueden generarse por *splicing* alternativo [36, 37].

El *splicing* alternativo puede ocurrir en diversas regiones del pre-RNA mensajero, generando distintos sitios alternativos de corte y empalme, en los que podemos encontrar: sitios alternativos de 5', 3', escisión exones, escisión de múltiples exones, y retención de intrones [38]. Cabe mencionar que en



mamíferos el evento más común es la escisión de exones [39].

Las regiones que serán escindidas alternativamente están delimitadas por secuencias específicas conocidas como: definición de intrones (ID) y definición de exones (ED) de sus siglas en inglés [40], y un sistema regulador principalmente proteínas ricas en serina y arginina (SR) [40], asimismo, estas proteínas pueden tener una función dual en el SA, debido a que pueden reprimir o promover la escisión alternativa de las regiones codificantes.

La región estructural del RNA mensajero juega también un papel primordial en la regulación del SA debido a que existen secuencias específicas que promueven la activación o represión del *splicing*. Se sabe que estas secuencias se pueden localizar en regiones exónicas e intrónicas, de tal manera que se pueden clasificar en: sitios reguladores localizados en regiones exónicas que potencian el *splicing* (ESE), regiones exónicas silenciadoras de *splicing* (ESS), regiones intrónicas potenciadoras de *splicing* (ISE) y regiones intrónicas silenciadoras de *splicing* (ISS) de sus siglas en inglés [41].

En esencia, el SA es controlado por dos niveles de regulación: la primera por la RNA polimerasa II (maquinaria basal de la transcripción), y la segunda por factores transcripcionales (sistema regulador). Éste último, controla espacial y temporalmente la activación o supresión génica. Por ejemplo, mutaciones en los ID y ED alteran los sitios de reconocimiento del *spliceosoma*, generando la escisión o retención de intrones y exones [40, 42-46]. Al igual que, la presencia de mutaciones en sitios importantes del *spliceosoma* (ESE, ESS, ISE, ISS) promueven la escisión o retención de regiones codificantes/no codificantes, a las que se les ha denominado como *splicing* aberrantes [43].

Se han observado que estos nuevos sitios de *splicing*, no necesariamente promoverán la eliminación de exones completos, de tal manera, que los mensajeros podrían ser constituidos por regiones parciales de exones, pero eventualmente el mensajero tendría características estructurales distintas.

Se ha evidenciado por medio de análisis de genomas, que hay menos eventos de SA en organismos inferiores. Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* el 95% de su genoma no es codificante [47, 48], en *Arabidopsis thaliana* se

observan pocos eventos de SA. Estos datos sugieren que el SA está relacionado con la complejidad del organismo [49]. En eucariontes, se observan diferencias significativas de SA respecto a otros organismos, lo cual pudiera sugerir que existe una regulación más fina del *splicing* [36, 50]. Se ha estimado que, más del 90% de los genes humanos tienen variantes de mensajero, lo que muestra la alta complejidad del transcriptoma y la diversidad de proteínas que pudieran ser resultantes de este mecanismo de regulación [51, 52]. De esta manera, se ha estimado que el transcriptoma humano está conformado por ~300 mil de transcritos [53]. Cabe mencionar que el SA en humanos es más frecuente en la región 5' [54], y se ha reportado que un porcentaje elevado (70 a 80%) de estas modificaciones postraduccionales, tienen un impacto directo con la función de la proteína [54-56].

Aunque se sabe poco sobre los mecanismos involucrados en la regulación del SA, se han identificado diferentes elementos reguladores que promueven el SA positiva y negativamente. Estos mecanismos de regulación del SA pueden tener un efecto directo en diversos procesos celulares, incluyendo: ciclo celular, desarrollo, determinación del sexo, respuesta a estímulos, entre otros [42, 57]. Hallazgos recientes han mostrado la presencia de variantes de mensajero (*splicing* aberrante) en distintas enfermedades humanas, incluyendo distintos tipos de cáncer [50, 58-60], sin embargo, aun se desconoce el alcance de la diversidad de variantes de mensajero expresados en salud y enfermedad.

### **Splicing Alternativo y en patologías**

Evidencias recientes han permitido identificar mutaciones asociadas a diferentes enfermedades humanas, esto han permitido conformar una base de las mutaciones identificadas hasta el momento (<http://www.hgmd.org>). Se han observado la asociación directa entre diversas mutaciones y alteraciones del SA, debido a que promueve la generación de nuevos sitios de *splicing*, o bien la pérdida de sitios de *splicing* existentes; en ambas situaciones estos eventos promueven la formación de *splicing* aberrantes, con ellos potencialmente la expresión de proteínas con funciones diferentes. Más de 3,000 mutaciones han sido identificadas en sitios que promueven el *splicing* [61].

Por otra parte, los cambios de nucleótidos simples (SNP) también pueden afectar la formación de variantes de mensajero. Aunque no se conocen del todo los mecanismos reguladores del SA, se han identificado dos tipos de mecanismo: *cis* y *trans*. El mecanismo en *cis* comprende todos los cambios estructurales en la secuencia del mRNA que promueven la formación de variantes del mismo mensajero. Por ejemplo, mutaciones en sitios *enhancer* de *splicing* (ISE, ESE) impiden la formación del *spliceosoma*. En contraparte, cambios en sitios de silenciamiento (ESS, ISS), promueven el ensamblaje del *spliceosoma*. Por otro lado, la regulación en *trans* depende de las proteínas involucradas en el ensamblaje del *spliceosoma* o en la regulación del *splicing* (SR). En este contexto, estudios moleculares han permitido evidenciar cambios en la expresión de proteínas reguladoras del *splicing*; por ejemplo, la expresión de la familia de proteínas Fox se han asociado fuertemente con mecanismos reguladores del *splicing* [62] y se ha evidenciado incremento de su expresión en algunos tipos de cáncer [63].

Diversos estudios han mostrado asociación entre la expresión de variantes de mensajero con enfermedad. Por ejemplo, en el síndrome de Peutz-Jeghers se expresa una variante del gen *LBK1*, generada como consecuencia de un cambio en *IVS2 +1A>G* [64] y la expresión de este mensajero es asociada con la susceptibilidad para desarrollar algún tipo de cáncer.

### ***Splicing en cáncer***

Se han identificado perfiles de expresión asociados a cáncer [65], pero han sido pocos los hallazgos de variantes de mensajero, esto se debe principalmente a la existencia de una diversidad de estirpes tumorales. Se sabe que los eventos de la célula neoplásica son regulados por la interacción de múltiples moléculas aunque, se desconoce la mayoría de ellas. El SA aberrante juega un papel muy importante en cáncer, esto se debe principalmente a que promueve la expresión de distintas proteínas, y algunas de ellas tienen un impacto importante para el desarrollo y progresión del cáncer [60, 66]. Por ejemplo, el gen *CD44* puede generar 7 isoformas, de las cuales, la variante 5 y la 7 se expresan en algunas patologías, la variante 6 se expresa en tumores metastásicos y en diversas líneas celulares tumorales [67, 68]. En CaO se ha

evidenciado expresión de isoformas de citocromo P450 [69], diferentes a las expresadas en tejido sano [70].

En contraparte, la expresión de elementos reguladores del *spliceosoma* han sido identificados en cáncer, por ejemplo la expresión de FOX1 y FOX2 [71], principalmente mediando la regulación del *splicing* en elementos ESE. Otro hallazgo interesante es sobre el papel del factor de transcripción hnRNP A2, se sabe que éste tiene la función de regular el *splicing* alternativo de TP53INP2 [72], y a su vez este gen participa en migración celular. En éste contexto, la expresión de factores transcripcionales (*trans-splicing*) promueve la represión o favorece la transcripción de isoformas de mensajero de diversos genes.

La asociación de la expresión génica en cáncer, ha tomado un rumbo importante sobre la investigación básica, es imprescindible conocer los elementos de regulación que promueven la formación de variantes de RNA mensajero, y su papel en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Por ejemplo, un gen importante asociado al desarrollo de cáncer familiar de mama y ovario es el gen BRCA1, se ha identificado en BRCA1 la presencia de una mutación (c.591C>T), la cual, promueve la formación de un sitio de *splicing*, involucrando la escisión del exon 18, esto es interesante [73]. BCL es otro ejemplo interesante, se sabe que presenta dos variantes con función antagónica, BCL-xL (forma larga) tiene función anti-apoptótica evidenciada en cáncer colorrectal, y la forma corta BCL-xS tiene actividad proapoptótica [74]. En cáncer gástrico se ha observado una delección de 30 a 40 en el gen KIT, promoviendo un *splicing* aberrante. La isoforma generada por este evento promueven la pérdida en la función de la proteína resultante, es importante destacar que este gen se autoregula, de tal manera se promueve expresión constitutiva [75].

## **Justificación**

El *splicing* alternativo es un mecanismo de regulación postranscripcional que juega un papel fundamental en la generación de diversidad de proteínas. Se sabe poco acerca de los mecanismos que regulan este proceso y, sobre todo, se desconoce la mayoría las variantes de RNA mensajero generadas por *splicing* alternativo. El estudio del *splicing* alternativo es importante para generar información de las variantes de transcritos y posibles proteínas resultantes expresadas por células malignas, consecuentemente, mayor conocimiento del proceso neoplásico. En CaO se ha identificado una gran variedad de genes desregulados, recientemente variantes de RNA mensajero asociadas con el pronóstico de la neoplasia. Esto es importante, ya que ésta neoplasia representa un problema de salud, debido que más del 80% de las pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas, lo que resulta en una pobre supervivencia. Por tal motivo, es de suma importancia conocer más sobre la diversidad de alteraciones moleculares presentes en esta neoplasia, lo que favorecería el entendimiento del desarrollo y progresión del cáncer de ovario.



### **Pregunta de investigación**

¿Será diferente el perfil de uso alternativo de exones en tumores invasores de ovario y tejido de ovario sanos?

### **Hipótesis**

En CaO se expresan isoformas de RNA mensajero diferentes a las expresadas en tejidos de ovario sano.

### **Objetivo General**

Identificar las isoformas de RNA mensajero expresados en tumores malignos de ovario.

### **Objetivos Particulares**

- Caracterizar el perfil de expresión asociado a tejido de ovario sano.
- Caracterizar el perfil de expresión asociado a tumores malignos de ovario y líneas celulares.
- Identificar y validar la expresión de las isoformas de RNA mensajero expresados en los tumores los tumores malignos de ovario.

## **Materiales y Métodos**

### **Tejidos de Estudio**

Las muestras biológicas que utilizamos fueron obtenidas del Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital de Oncología CMN-SXXI y del Hospital General de México. Se colectaron tumores de tipo epitelial seroso de pacientes que eran vírgenes a tratamiento de quimioterapia y/o radio terapia, y sin estar bajo tratamiento hormonal. Los tejidos sanos de ovario se obtuvieron de hysterectomías de pacientes con diagnóstico de miomatosis uterina del Hospital General de México. De los tejidos utilizados en este estudio, una fracción se incluyó en bloques de parafina para corroborar el tipo tumoral para el caso de los tumores, y para los tejidos sanos que estuvieran libres de enfermedad. Cabe mencionar, todas las muestras tumorales utilizadas se manejaron bajo la selección de la estirpe tumoral del tipo epitelial seroso, tumores de benignos de ovario y tejido de ovario sin lesión. Las muestras biológicas se manejaron bajo los principios científicos y éticos para la investigación en seres humanos de acuerdo a la Declaración de Helsinki (64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013), y con consentimiento informado. Finalmente, las muestras incluidas en parafina se les hicieron cortes histológicos de 5 micras, se tiñeron con Hematoxilina & Eosina (H&E), para ser examinados por los patólogos.

### **Purificación del RNA**

Las muestras utilizadas en este estudio se almacenaron en RNAlater™ (Qiagen Valencia, CA, USA) a -70° C hasta la purificación de los ácidos nucleicos. Las líneas utilizadas en este estudio fueron NIH:OVECAR-3 [76], SK-OV-3 [77], TOV-112D, TOV-21G [78], fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% de suero fetal bovino, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los tejidos y las líneas celulares se disgregaron con el TissueLiser™ (Qiagen Valencia, CA, USA) por 60 seg a 30Hz, posteriormente se purificaron con el kit RNeasy mini Kit™ (Qiagen Valencia, CA, USA) bajo el protocolo de la casa comerciar. La concentración y calidad del RNA purificado, se analizó con el NanoDrop ND-1000 espectrofotómetro y con el Bioanlizador 2100 de Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

## **Microarreglos**

Los tumores, líneas celulares y tejidos de ovarios sanos, se hibridaron en el GeneChip 1.0 de Affymetrix bajo el protocolo que establece la casa comercial (Anexo 1). De manera general se utilizó 100 ng de RNA total, se sintetizó cDNA, se marco y se hibridó en el chip por 17 horas a 37°C y 60 RPM, posteriormente se lavan en la estación de fluidos con el protocolo establecido (formato del chip) y finalmente se escanean los microarreglos.

## **Análisis de expresión y splicing alternativo**

Este análisis se realizó con el programa Partek Genomics suite v 6.5 (Partek Incorporated, saint Luis, MO), se utilizó *Robust Multichip Average* (RMA) para la corrección del ruido de fondo, la normalización se realizó por cuantiles, la sumarización se realizó con Median Polish, y los datos resultantes se transformaron en  $\text{Log}_2$ . Los datos fueron categorizados basados en las características de los tejidos (sano, tumor benigno, tumor maligno y líneas celulares) y se visualizó su distribución por el Análisis de Componente Principal (PCA) [79]. Las diferencias de expresión se detectaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) para expresión, y para la detección de las isoformas de RNA mensajero se realizó una ANOVA para *splicing* alternativo (ASANOVA), la comparación se basó tomando encuentra como expresión basal a los tejidos de referencia (sanos), respecto a estos valores se compararon los tumores benignos, malignos y líneas celulares (modelo geométrico de mínimos cuadrados). Los genes estadísticamente significativos fueron seleccionados mediante dos puntos de corte: *fold change* (>3 y <-3) y *False Discovery Ratio* (FDR) > 0.005. Finalmente, la relación de los genes que cambian la expresión y que son estadísticamente significativos fueron visualizados mediante el *cluster* jerárquicos.

## **Amplificación de RT-PCR y clonación**

Se partió de 1 µg RNA total, se sometió a la digestión de DNasa con 1U de enzima, en buffer DNasa 1x, se incubó la reacción a 37°C por 30 min, posteriormente se agregó 5mM de EDTA y se incubó 65°C por 10 min. Posteriormente, a las muestras se les agregó el mix que contenía: 40U de Ribolock (inhibidor de RNasa), 0.2 µg de *random hexamer primers*, 20 mM de

la mezcla de dNTP's, 40U M-Mulv de enzima transcriptasa reversa (RT), la reacción en 1x de buffer para la enzima M-Mulv RT (Thermo Scientific).

Las condiciones de amplificación de PCR se realizó con los iniciadores: sentido 5' CGAATGAGAGCTGGCAAAGGCAAA 3', y antisentido 5' ACGCCAAGTGCCGTACAATTCATC 3' para el gen constitutivo RPL4 a 7.5mM de concentración, con las siguientes condiciones de amplificación: 1x de buffer para Taq, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de dNTP's, 1.25U de *Taq Pol*, 2ul cDNA; para la amplificación del gen ZNF695 se utilizaron los iniciadores: sentido 5' GCCTTTGTCTCCTTGCGGC 3', antisentido 5' GGCTGTCTTCTCTGTGTTACGTT 3' a una concentración de 12.5mM. Con los siguientes condiciones de amplificación: 1x buffer para Taq pol, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM de dNTP's, 1.25U de Taq Pol, 2ul cDNA. En ambos casos las mezclas de reacción fueron incubadas en el termociclador con las siguientes condiciones de amplificación: Inicialmente la mezcla de reacción se incubo a 95°C por 5 min, y se corrió a 40 ciclos con las siguientes temperaturas: 94°C 45 s, 59°C 45 s, 72°C 60 s, para finalizar se incubo a 72°C for 5 min.

Clonación de los productos de PCR. Para clonar los productos de interés se separaron en geles de agarosa al 2.5% y se purificaron por medio de *Gel extraction kit*<sup>TM</sup> (Qiagen, Valencia, CA, USA). Posteriormente los productos fueron ligados en el vector pGem-T Easy Vector<sup>TM</sup> (Promega, Madison, WI), se incubaron toda la noche a 4°C, en tubos de 1.5 ml con buffer de ligación 2x *Rapid Ligation Buffer* (T4 ligase), el Vector pGEM-T Easy (50ng), los productos de PCR (100ng) y la enzima T4 DNA ligase 3U.

El plásmido ligado con el producto de DNA de interés, fue purificado con el Wizard Plus Miniprep DNA Purification System<sup>TM</sup> (Promega) bajo el protocolo establecido de la casa comercial, se seleccionaron las clonas para secuencias con los iniciadores M13, y se marcaron con el *BigDye Terminator 3.1* bajo las condiciones de la casa comercial (Applied Biosystems), posteriormente se secuenciaron los vectores en el secuenciador de Applied Biosystems Abi Prism 3130. Subsecuentemente, los productos de PCR fueron analizados con respecto a las secuencias anotadas en el NCBI.

## **Resultados**

### **Muestras de estudio**

Se colectaron cinco tejidos sanos, 10 tumores malignos de ovario y cuatro líneas celulares derivadas de cáncer de ovario. Los tejidos sanos se obtuvieron en transoperatorio de pacientes con miomatosis uterina. El tratamiento para estas pacientes en México es la histerectomía, que en mujeres mayores de 45 años es radical, y en menores de 45 años se mantiene un ovario. Los tejidos se cortaron en dos fragmentos, uno se preservó en RNAlater y el otro se embebió en bloques de parafina para el estudio histopatológico. Todos los tumores de ovario utilizados en este estudio fueron del tipo epitelial seroso, debido a su mayor incidencia (80% aproximadamente). Al igual que los tejidos sanos, se obtuvieron de transoperatorio, donde un fragmento se incluyó en parafina y el otro se preservó en RNAlater hasta la purificación de los ácidos nucleicos.

### **Purificación del RNA**

Todas las muestras se disgregaron con el TissueLyser de Qiagen™ y se purificaron con el RNaeasy Mini Kit de Qiagen™ bajo el protocolo establecido por la casa comercial. La integridad de las muestras se evaluó en el Bioanalizador de Agilent (**Figura 3**), y la concentración se midió en el NanoDrop ND-1000. Todas las muestras purificadas tuvieron cantidades variables de RNA (500-2000 ng/ul).

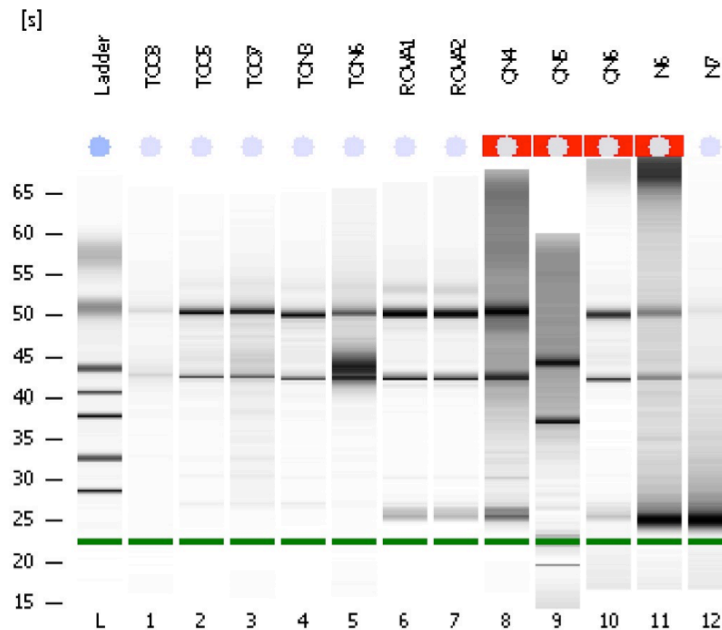
### **Microarreglos de expresión**

Un total de 14 muestras fueron hibridadas en el GeneChip 1.0 de Affymetrix, de acuerdo al protocolo establecido **Anexo 1**. Cabe mencionar que todos los experimentos de microarreglos, se realizaron de acuerdo a la guía de *Minimum information about a microarray experiment* (MIAME) [80, 81]. Las muestras hibridadas fueron: cuatro tejidos de ovario sano, dos tumores benignos de ovario, cuatro tumores epiteliales serosos invasores y cuatro líneas celulares de CaO (NIH:OVECAR-3, SK-OV-3, TOV-21G, TOV-112D).

### **Controles de calidad**

La evaluación de los controles de calidad (CC) se realizó con el programa de Affymetrix expression console software v 1.3.1, disponible en la página web:

[http://www.affymetrix.com/estore/browse/level\\_seven\\_software\\_products\\_only.jsp?productId=131414&categoryId=35623&productName=Affymetrix%26%23174%3B-Expression-Console%26%23153%3B-Software#1\\_1](http://www.affymetrix.com/estore/browse/level_seven_software_products_only.jsp?productId=131414&categoryId=35623&productName=Affymetrix%26%23174%3B-Expression-Console%26%23153%3B-Software#1_1). El análisis se realizó utilizando el algoritmo *Robust Multichip Analysis* (RMA) para expresión (considerando exclusivamente marcadores para la región 3 del mensajero) y para exones (considerando todos los marcadores incluidos en el arreglo).



**Figura 3. Electroforesis capilar.** Evaluación de la integridad del RNA total.

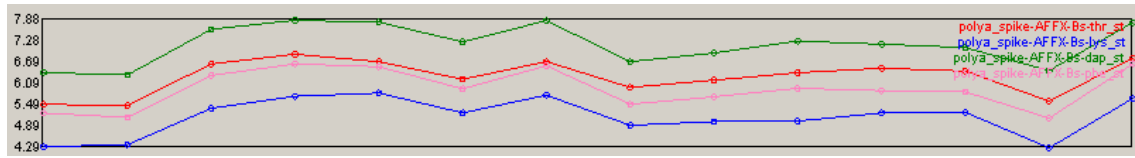
**Controles de calidad para expresión.** Inicialmente se evaluaron los controles internos (hibridación y procesamiento) para determinar valores extremos en los experimentos (**Figura 4**).

Los controles de calidad en los microarreglos presentaron un gradiente de fluorescencia, indicando que las hibridaciones y el procesamiento experimental fue adecuado.

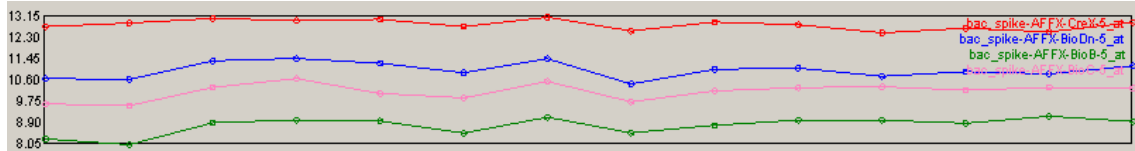
Debido a que se observaron variaciones en los controles de calidad, se compararon todos los microarreglos con la finalidad de identificar variaciones importantes en los experimentos (**Figura 5**). Se realizó una correlación de Pearson, mostrando variaciones poco significativa experimentales en los controles de los 14 microarreglos (correlación mínima 0.889).



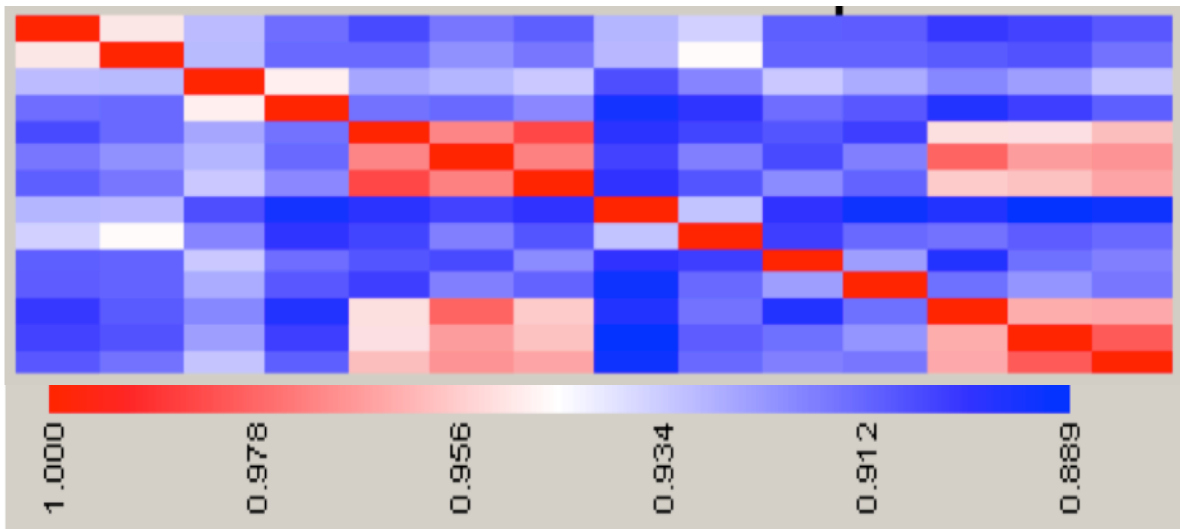
A)



B)



**Figura 4. Controles de calidad de los microarreglos.** Expresión diferencial de 4 controles de procesamiento e hibridación, en el eje Y; se representa la fluorescencia relativa de expresión, en el eje X; están representados los 14 experimentos realizados. A) Controles internos de procesamiento (Poly A); cada punto en la imagen representa un control, la línea representa la variación en la intensidad de fluorescencia generada por cada experimento, así se pueden distinguir los controles: verde (dap), rojo (thr), rosa (phe) y azul (lys). B) Controles de hibridación (spike), al igual que los controles del procesamiento, estos controles se representan por distintos colores; rojo (CreX), azul (Bio D), rosa (Bio C), verde (Bio B), mostrando un diferencial de expresión.

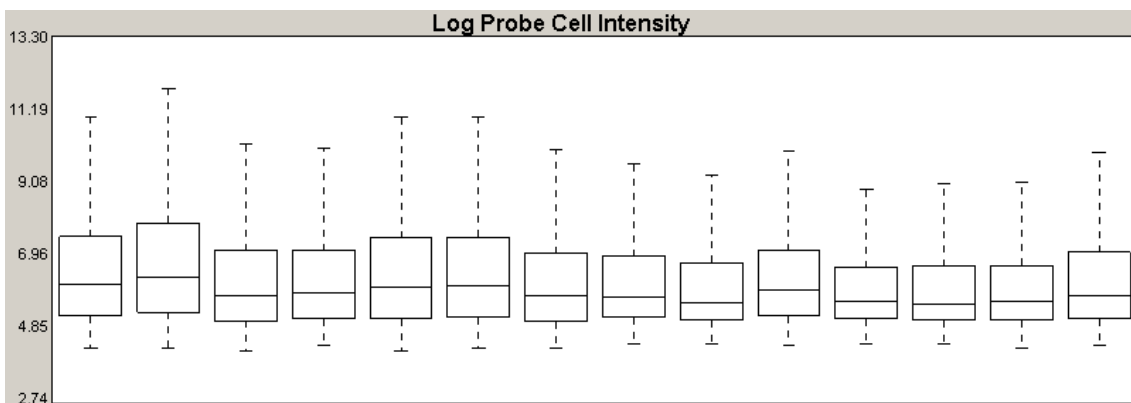


**Figura 5. Correlación de Pearson de los controles de calidad.** Correlación de 14 microarreglos de expresión GeneChip 1.0. Las correlaciones observadas en los experimentos van de 1 a 0.889 (barra inferior). Los ejes X y Y representan los 14 microarreglos hibridados, al comparar la misma muestra la correlación siempre es de 1. La correlación mínima observada en arreglos fue de 0.889, mostrando pocas diferencias experimentales.

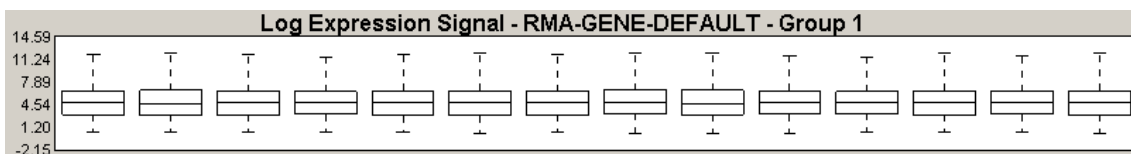
A continuación, se examinó la distribución de los controles de calidad en cada uno de los experimentos, como se esperaba, se observaron variaciones en la distribución aparentemente causadas por diferencias experimentales (**Figura**

**6A).** Posteriormente, los datos se normalizaron para eliminar las variaciones experimentales, permitiendo hacer un ajuste de todos los experimentos (**Figura 6B**). Finalmente, se realizó la normalización de los marcadores a nivel de exones (**Figura 6C**). Al igual que para la normalización previa, se ajustaron todos los datos. Con estos resultados podemos concluir que no existieron diferencias experimentales, que pudieran afectar los resultados de la expresión.

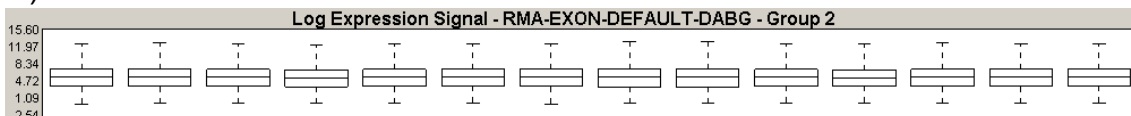
A)



B)



C)

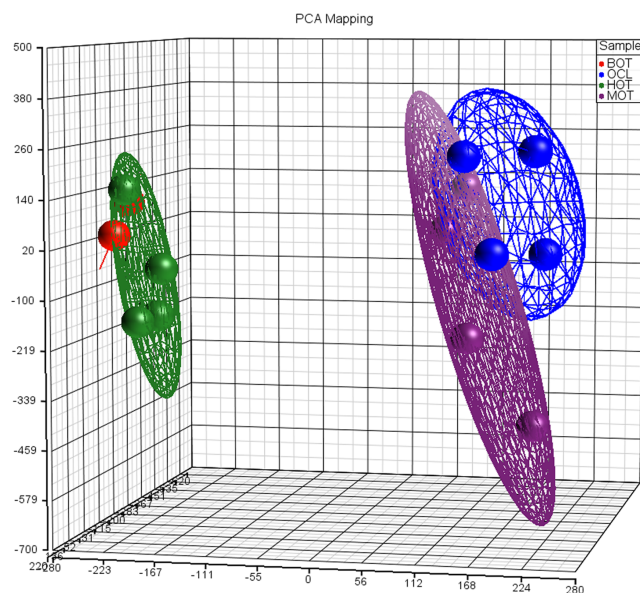


**Figura 6. Normalización de los controles de calidad.** Distribución de los controles de calidad en 14 microarreglos GeneChip 1.0. en el eje X se representan 14 microarreglos y en el eje Y la distribución de los marcadores para los controles de calidad. A) Distribución de los datos crudos de los 14 microarreglos hibridados. Se observan variaciones en la distribución de las intensidades de fluorescencia en los distintos microarreglos hibridados. B) Normalización de 14 microarreglos GeneChip 1.0 para expresión, expresados en Log2, se observa que todos los arreglos se ajustan. C) Normalización de los controles de calidad de 14 microarreglos de expresión, basados en todo los marcadores incluidos en el microarreglo (a nivel de exones) expresados en Log2.

### **Análisis de expresión diferencial**

Una vez que se corroboró la ausencia de errores importantes en los controles de calidad, para reducir el ruido de fondo intraarreglo e interarreglos, y para hacerlos comparables, los datos se normalizaron mediante el algoritmo RMA. El siguiente análisis se realizó utilizando los archivos \*.CEL de los datos

generados por el microarreglo, con el software Partek Genomics Suite v.6.5. Así, se examinó la distribución de la expresión global mediante análisis de componente principal (PCA, **Figura 7**), el cual mostró diferencias claras entre los distintos grupos (tejido sano, tumor benigno, tumores malignos y líneas celulares) y sugirió diferencias de expresión entre los distintos grupos de estudio. De esta manera, se pueden observar, a la izquierda, los grupos de muestras sanas y de tumores benignos, y a la derecha, los tumores malignos y líneas celulares de ovario. Como sería de esperar, se observó mayor dispersión en los tumores (círculos morados), lo que aparentemente refleja su heterogeneidad.



**Figura 7. Análisis de componente principal (PCA).** Distribución de los tejidos de estudio, basados en las características de expresión. Se pueden observar claramente la agrupación de las muestras en distintas áreas (tridimensional) de la gráfica. Se ubican en la parte negativa del eje X, los tejidos sanos (esferas verdes) y los tumores benignos (esferas rojas), mientras que en la parte positiva se ubican los tumores malignos (esferas moradas) y las líneas celulares derivadas de cáncer de ovario (esferas azules).

Después de determinar las diferencias de expresión entre los grupos analizados, se procedió a identificar cuales eran los transcritos responsables de ello, con los siguientes parámetros.

- a) Definir una línea basal de expresión de todos los transcritos presentes, con los tejidos sanos como expresión basal.

b) Descartar transcritos con intervalo de expresión entre 3 y -3 en *fold change*.

c) Identificar los transcritos con cambios más significativos (b).

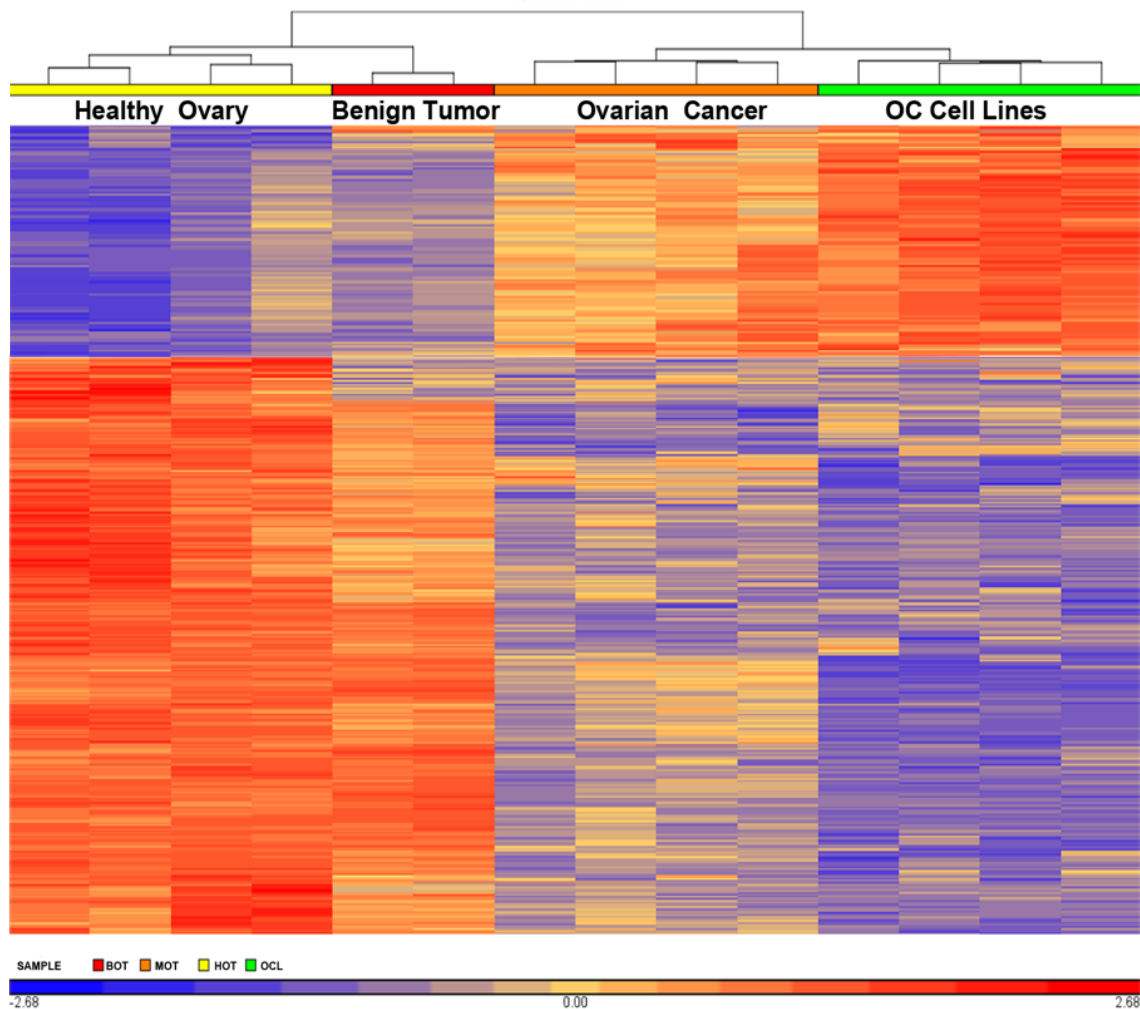
Ya que se habían observado características de expresión asociadas al tipo de tejido, se realizaron diversas comparaciones entre los distintos grupos (**Tabla 1**). Las diferencias de expresión entre tumores benignos y tejidos sanos fueron mínimas (sólo 28 genes), mientras que la mayor diferencia de genes expresados, fue entre las líneas celulares y tejidos sanos (1664 genes). Al comparar (como grupos) tumores malignos/líneas celulares contra tejidos sanos/tumores benignos, las diferencias fueron aún mayores (1799 genes). Es interesante, que la mayoría de las diferencias correspondieron a genes suprimidos en cáncer, que es indicativo de la complejidad de la transformación maligna.

**Tabla 1. Expresión diferencial entre grupos.**

Comparación	Genes diferenciales	Sobre-expresados	Suprimidos
BOT vs. HOT	28	24	4
MOT vs. HOT	1329	476	853
OCL vs. HOT	1664	669	995
MOT vs. BOT	625	135	490
OCL vs. BOT	1369	488	881
OCL vs. MOT	666	385	281
BOT+MOT+OCL vs. HOT	545	146	399
MOT+OCL vs. HOT	1498	508	990
MOT+OCL vs. BOT	1030	262	768
HOT+MOT+OCL vs. BOT	368	28	340
MOT+OCL vs. BOT+HOT	1799	595	1205

A continuación, se realizó un “*cluster jerárquico*” (**Figura 8**) basado en genes expresados diferencialmente. Se puede observar claramente distintos grupos (tumores benignos, malignos, líneas celulares de ovario y tejidos sanos), el

cuál los divide en dos grupos principales: tejidos sanos y tumores benignos (izquierda), tumores malignos y líneas celulares (derecha). Estos resultados fueron semejantes a los observados en el PCA (**Tabla 1**). Es interesante mencionar que, se observan más genes suprimidos (70% aproximadamente, **anexo 2**).



**Figura 8. Cluster Jerárquico.** Agrupación de 545 genes expresados diferenciales en tumores malignos de ovario, líneas celulares derivadas de cáncer de ovario y tejidos sanos de ovario. La línea inferior representa la escala de expresión; rojo (incremento de la expresión) y azul (supresión). En el *cluster* se observan dos grupos iniciales, a la izquierda los tejidos sanos y tumores benignos y a la derecha los tumores malignos y líneas celulares. Cada grupo se subdivide; izquierda los tejidos sanos y a la derecha los tumores benignos. Por el otro lado, a la izquierda los tumores y las líneas a la derecha. En cada grupos, se observan genes suprimidos (azul) y expresados (rojo).

Ya que habíamos observado cambios en los perfiles de expresión entre grupos, el siguiente objetivo fue evidenciar posibles cambios en los perfiles de expresión a nivel de exones.

### Expresión diferencial de exones

Ya que habíamos observado perfiles de expresión asociados a los distintos tipos de tejidos utilizados, se realizó el análisis para identificar cambios de expresión a nivel de exones, de esta forma determinar potenciales variantes de mensajero. Para este análisis se utilizó la paquetería del programa de Partek *Genomics Suite* v.6.5, utilizando el ANOVA modificada para *splicing* alternativo (ASANOVA). Los genes que presentaron cambios en la expresión de exones fueron seleccionados con puntos de corte en *False discovery ratio* (FDR) < 0.05 y *fold change* >3, al igual que en el análisis previo, se agruparon las muestras de acuerdo al tipo histológico, usando los tejidos sanos como expresión basal (expresión referencia). El resultado de este análisis evidenció 207 genes con posibles diferencias en al menos un exón respecto a la expresión en tejido de ovario sano (**Anexo 3**). Posteriormente, se realizó un tamiz, seleccionando aquellos que presentaran cambios de la expresión en un exón del grupo problema (tumores benignos, malignos y líneas celulares) y que tuvieran significado estadístico (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Genes con expresión diferencial de exones**

No de marcadores	Símbolo del gen	p-value	p-Splicing alternativo	Fold Change
9	ZNF695	1.28E-05	8.16E-05	4.5411
13	CCNB1	3.11E-06	2.26E-10	4.98751
36	FANCD2	4.87E-05	8.33E-10	6.58464
12	CDKN3	2.51E-04	7.59E-10	5.42259
25	TPX2	1.05E-04	2.04E-16	11.0438
14	E2F8	1.27E-03	1.92E-07	3.20517
14	FOXMI	1.09E-04	2.98E-08	5.86201
18	HMMR	1.71E-03	3.87E-02	6.55569
50	CENPE	1.87E-03	5.00E-05	4.35735

## **Splicing alternativo del mRNA de la proteína ZNF695**

Entre los genes mas significativos identificados está el gen ZNF695. Este gen se encuentra en el cromosoma 1q44 y es codificado en la cadena antisentido del DNA (**Figura 9A**). Hasta el momento se conocen tres transcritos generados por *splicing* alternativo, de los cuales, la variante 1 (NM\_020394.4) y la 2 (NM\_001204221.1) codifican proteínas de 515 y 172 a.a. respectivamente, y la variante 3 (NR\_037892.1) se ha descrito como un RNA no codificante. El gen ZNF695 esta constituido por 6 exones, con un sitio alternativo de poliA en el exón 4 para la variante 1, y un sitio de corte alternativo en el exón 4; para las variantes 2 y 3. Por otra parte, se sabe que este gen genera un RNA no codificante, resultado de la fusión de los genes ZNF670-ZNF695 (Figura 9A).

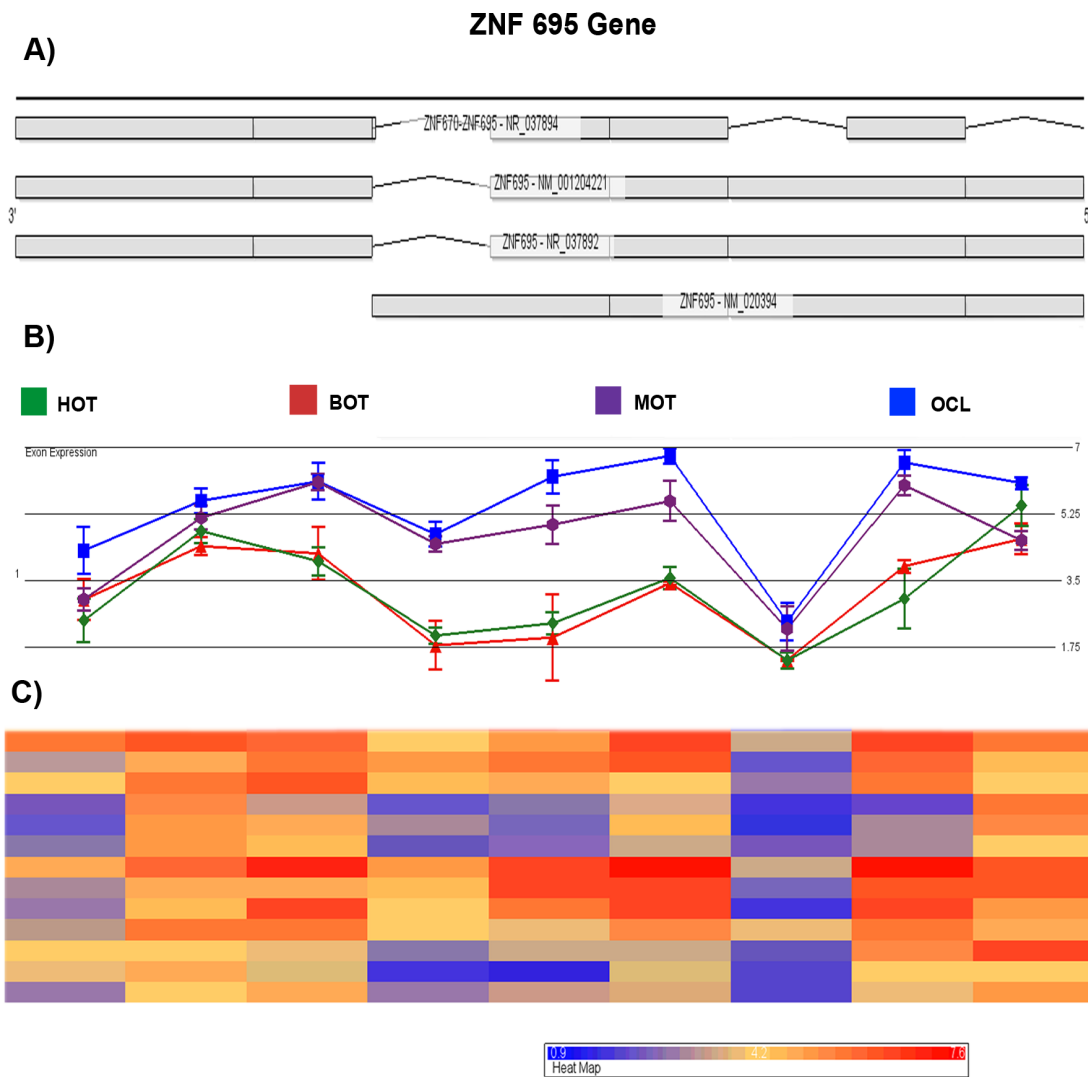
Para la cobertura de los 6 exones del gen ZNF695, el microarreglo contiene 9 marcadores, de los cuales, los exones 2, 4 y 6 contenían dos marcadores cada uno (**Figura 9A-B**). Se evidenció un cambio importante en el marcador de la región 3' del exón 2, mostrando una supresión de aproximadamente 5 veces respecto a los marcadores aledaños (**Figura 9B-C**), estos resultados sugerían la presencia de un corte alternativo en esa región.

Para corroborar los resultados obtenidos, se diseñaron iniciadores flanqueando la región de interés. Para ello se identifico la secuencia que aparentemente se encontraba suprimida del gen ZNF695, en la pagina NetAffx de Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/estore/analysis/index.affx;jsessionid=9DA78DAB52DF09972E06196EE6A41B62?category=34005&categoryIdClicked=34005&rootCategoryId=34005&navMode=34005&ald=netAffxNav>), y con el programa de *GenomeBrowser* (IBG 6.6.3). Con estas herramientas pudimos identificar la sonda 792566 y su localización 1:247,163,216 - 247,163,241 (**Figura 10**).

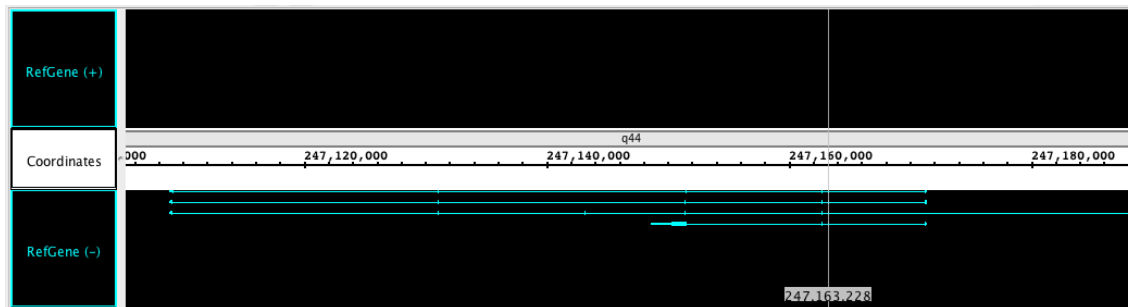
Ya que se había identificado la región de interés, se diseñaron los iniciadores posicionando al sentido en el exon 1 y al antisentido en el exon 3 del gen ZNF695, esto se realizó con el programa IDT Tools (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Posteriormente, se realizó un *blast* en el NCBI a las secuencias de los iniciadores, se observó la



especificidad del 100% con el gen ZNF695. Paralelamente, se diseñaron iniciadores para amplificar un gene de referencia (constitutivo, RPL4). Inicialmente, se realizó la amplificación del gen constitutivo, ya corroborado las muestras amplificaban al gen constitutivo se sometieron a la amplificación para el gen ZNF695.



**Figura 9 Dedo de Zinc 695 (ZNF695).** A) Estructura del gen ZNF695 (genomebrowser), el gen es codificado en la cadena negativa, se han descrito tres variantes de mensajero y la fusión de los genes ZNF70 y 695, generan un RNA no codificante (ZNF670-ZNF695). B) Expresión de los exones (6) del gen ZNF695, representados por 9 marcadores en el microarreglo. Cada línea representa el promedio de la expresión por grupo; Azul (líneas celulares), morado (tumores malignos de ovario), Rojo (tumores benignos de ovario) y verde (tejidos sanos de ovario). C) Cluster de la expresión de los marcadores para el gen ZNF695 en los 14 muestras analizadas.



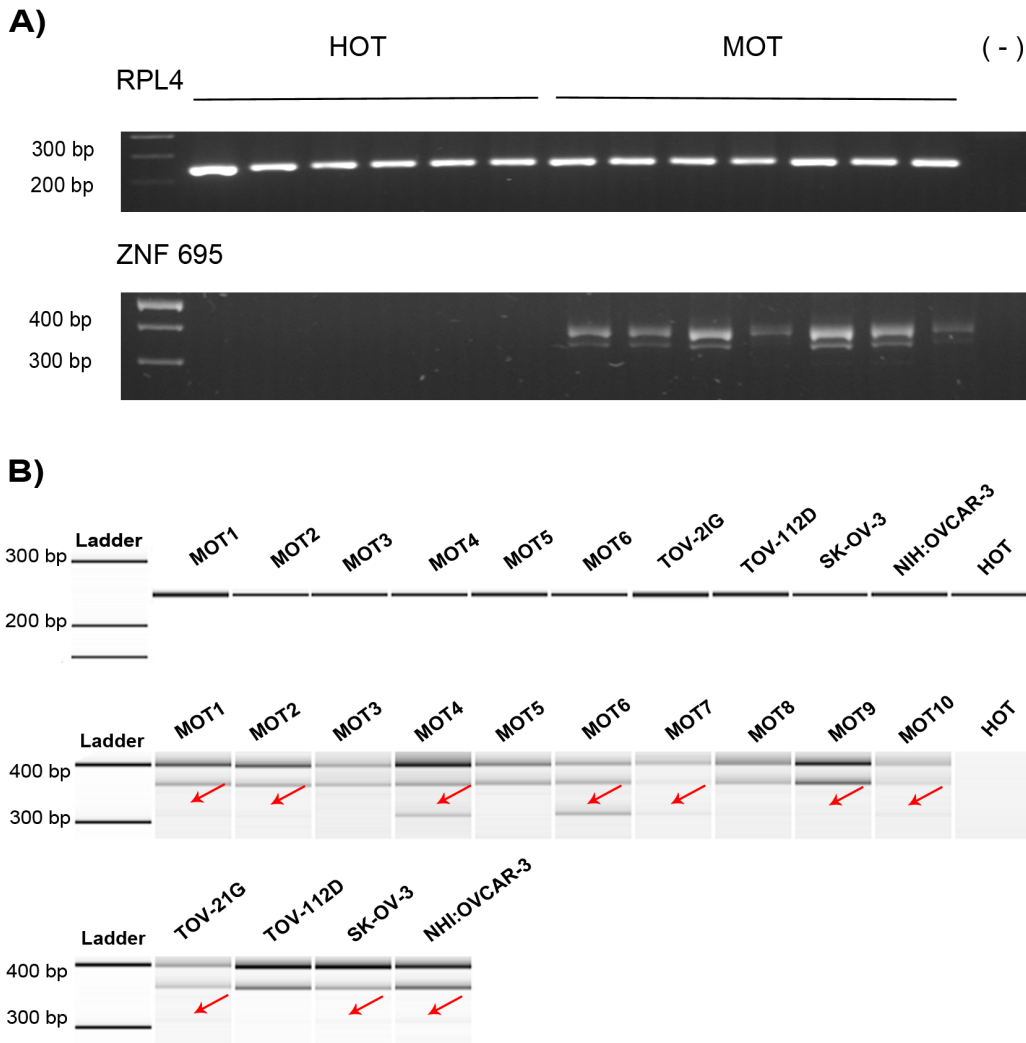
**Figura 10. Gen ZNF695.** EL gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 1, región citogenética 247,170,000-247,130,000 y la transcripción es en la cadena negativa.

La amplificación se realizó utilizando seis tejidos de ovario sano, dos tumores benignos, 10 malignos de ovario y cuatro líneas celulares de CaO. La amplificación del gen RPL4; no mostró diferencias de expresión entre las distintas muestras amplificadas, y se confirmó el amplicón esperado de 250 pb aproximadamente. La amplificación del gen ZNF695 evidenció la presencia de tres amplicones. Es importante destacar que solo se observaron en los tumores malignos y líneas celulares de CaO. Los tamaños de los amplicones fueron: 400, 360 y 300 nucleótidos, aproximadamente (**Figura 11A**). Debido a que la amplificación del amplicón más pequeño era poco visible, se realizó una electroforesis capilar para aumentar la resolución (**Figura 11B**).

Con estos resultados, pudimos definir que no hay expresión del gen ZNF695 en los tejidos sanos y tumores benignos, mientras que el 70% los tumores malignos y líneas celulares presentaban la amplificación de los tres amplicones y el 30% restante solo dos (mayor peso y el intermedio) (**Figura 11B**).

### **Caracterización de los amplicones de ZNF695**

De acuerdo al diseño de los iniciadores, se espera la amplificación de un producto de PCR en 400 pb. Sin embargo, la amplificación del gen ZNF695 en tumores y líneas celulares reveló la presencia de otros transcritos en 360 y 300 nt aproximadamente. Todos los tumores malignos de ovario y líneas celulares presentaron la amplificación de dos transcritos (400 y 360 nt), y el 70% de las muestras presentaron la expresión de los 3 amplicones.

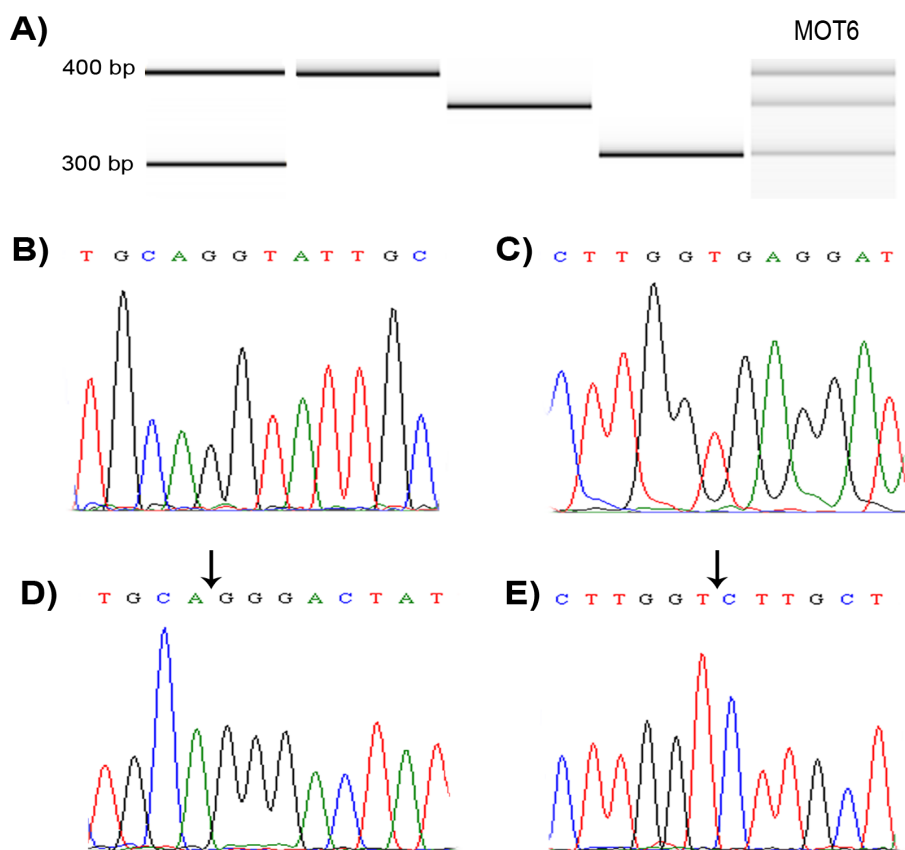


**Figura 11. Electroforesis de los productos de PCR del gen constitutivo RPL4 y ZNF695.** A) Gel de agarosa al 2%. En la parte superior se observa la expresión del gen RPL4, en el primer carril se encuentra el marcador de peso, seguido de 6 tejidos sanos de ovario (HOT) y 7 tumores malignos de ovario (MOT). En la parte inferior, los productos del gen ZNF695, el primer carril se observa el marcador de peso molecular, seguido de los 6 tejidos de ovario sanos; donde no se observa la expresión del gen ZNF695. Los tumores malignos de ovario; presentaron expresión variable del gen. B) Electroforesis capilar. En la parte superior se observa la expresión del gen RPL4. En la imagen intermedia se observa la expresión de 10 tumores de ovario (MOT) y un tejido sano (HOT), en la parte inferior la expresión del gen ZNF694 en 4 líneas celulares de ovario (TOV-21G, TOV-112D, SK-OV-3 y NIH:OVCAR-3).

Ya que habíamos identificado la expresión de tres amplicones, se procedió a su caracterización. Para ello, se corrieron los productos de PCR en geles de agarosa al 3% a 70 volts por 3 hrs. Posteriormente, se cortaron las bandas y se purificaron con el gel *extraction* kit de Qiagen<sup>TM</sup>, bajo el protocolo establecido. A continuación, los productos de PCR se ligaron en el vector pGEM-T Easy Vector, y se sometieron a la secuenciación con los iniciadores M13 (**Figura 12**).

Nosotros pudimos corroborar la separación de los productos mediante la amplificación por PCR de los amplicones de interés, observándose un solo amplicon, además corroboramos el peso esperado comparando con un tumor (MOT6) (**Figura 12A**).

A continuación se secuenciaron los productos de PCR (**Figura 12B-E**), lo que definió la expresión de tres transcritos del gen ZNF695: la banda superior corresponde a la secuencia de la variante 1 y/o 2 (**Figura 12B-C**), la banda intermedia; tiene una escisión de 36 nucleótidos en el extremo 3' del exon 2 (**Figura 12C**), la banda inferior, la misma escisión que la intermedia y una escisión adicional de 51 nt en el extremo 3' del exón 1 (**Figura 12D**).



**Figura 12. Variantes de RNA mensajero de ZNF695 expresados en tumores de ovario.** A) Electroforesis capilar de los tres amplicones del gen ZNF695. B-C) Secuencia del producto de mayor peso. D) Corte alternativo en la región 3' del exon 1. E) Corte alternativo en la región 3' del exon 2.

Después de identificar tres transcritos diferentes, se realizó el alineamiento de las secuencias con respecto a la secuencia completa del gen ZNF695 obtenida del NCBI (**Figura 13**). El alineamiento de las secuencias encontradas en los tumores malignos de ovario y líneas celulares mostró identidad de 100% del amplicón de mayor tamaño (400 nt). Sin embargo, para la secuencia intermedia y la de menor peso no se encontró identidad alguna, lo que sugiere que son variantes no reportadas de mensajero del gen ZNF695. Para determinar si estas nuevas variantes (denominadas 4 y 5) codifican alguna proteína, se hizo traducción *in silico* en el sitio web <http://insilico.ehu.es>. La variante 4 (blast) fue idéntica al péptido BAG54313.1 (Isogai, Helix Research Institute, Genomics Laboratory [fij-cdna@nifty.com](mailto:fij-cdna@nifty.com), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/193785160?from=1&to=118>) (**Figura 14**).

```

ZNF695_Full_Length      AGAGAGGAAGGGCGGCCTTGGGATCTGCGGGGCCTTTGTCTCCTTGC GGCGCGCGGG
ZNF695_Transcript_variant_1/2 -----TTGTCTCCTTGC GGCGCGCGGG
ZNF695_Transcript_variant_4 -----TTGTCTCCTTGC GGCGCGCGGG
ZNF695_Transcript_variant_5 -----TTGTCTCCTTGC GGCGCGCGGG
*****

ZNF695_Full_Length      GTGCTGGGTTCCCGTCTGCTGCCTCTCGGAGAGTCCCGGTGACTGCCG CAGGCTCCATC
ZNF695_Transcript_variant_1/2 GTGCTGGGTTCCCGTCTGCTGCCTCTCGGAGAGTCCCGGTGACTGCCG CAGGCTCCATC
ZNF695_Transcript_variant_4 GTGCTGGGTTCCCGTCTGCTGCCTCTCGGAGAGTCCCGGTGACTGCCG CAGGCTCCATC
ZNF695_Transcript_variant_5 GTGCTGGGTTCCCGTCTGCTGCCTCTCGGAGAGTCCCGGTGACTGCCG CAGGCTCCATC
*****

ZNF695_Full_Length      GCCCTGTGGCCTGCAGGTATTGCGAGATTTATAGGGAGGACGCTGGGAC CCCCAAAAGCT
ZNF695_Transcript_variant_1/2 GCCCTGTGGCCTGCAGGTATTGCGAGATTTATAGGGAGGACGCTGGGAC CCCCAAAAGCT
ZNF695_Transcript_variant_4 GCCCTGTGGCCTGCAGGTATTGCGAGATTTATAGGGAGGACGCTGGGAC CCCCAAAAGCT
ZNF695_Transcript_variant_5 GCCCTGTGGCCTGCA-----
*****

ZNF695_Full_Length      GGGAAATGGGACTATTGGCATTTCAGGGATGTGGCTCTAGAATTCTCT CCAGAGGAGTGGG
ZNF695_Transcript_variant_1/2 GGGAAATGGGACTATTGGCATTTCAGGGATGTGGCTCTAGAATTCTCT CCAGAGGAGTGGG
ZNF695_Transcript_variant_4 GGGAAATGGGACTATTGGCATTTCAGGGATGTGGCTCTAGAATTCTCT CCAGAGGAGTGGG
ZNF695_Transcript_variant_5 -----GGGACTATTGGCATTTCAGGGATGTGGCTCTAGAATTCTCT CCAGAGGAGTGGG
*****

ZNF695_Full_Length      AATGCCTGGACCCAGCTCAGCGGAGTTTGTATAGGGATGTGATGTTAG AGAACTACAGAA
ZNF695_Transcript_variant_1/2 AATGCCTGGACCCAGCTCAGCGGAGTTTGTATAGGGATGTGATGTTAG AGAACTACAGAA
ZNF695_Transcript_variant_4 AATGCCTGGACCCAGCTCAGCGGAGTTTGTATAGGGATGTGATGTTAG AGAACTACAGAA
ZNF695_Transcript_variant_5 AATGCCTGGACCCAGCTCAGCGGAGTTTGTATAGGGATGTGATGTTAG AGAACTACAGAA
*****

ZNF695_Full_Length      ACCTGATCTCCCTTGGTGAGGATAGCTTCAATATGCAATTCCTATTTC ACAGTCTTGCTA
ZNF695_Transcript_variant_1/2 ACCTGATCTCCCTTGGTGAGGATAGCTTCAATATGCAATTCCTATTTC ACAGTCTTGCTA
ZNF695_Transcript_variant_4 ACCTGATCTCCCTTGGT-----CTTGCTA
ZNF695_Transcript_variant_5 ACCTGATCTCCCTTGGT-----CTTGCTA
*****

ZNF695_Full_Length      TGTCTAAGCCAGAACTGATCATCTGTCTGGAGGCAAGGAAAGAGCCCT GGAACGTGAACA
ZNF695_Transcript_variant_1/2 TGTCTAAGCCAGAACTGATCATCTGTCTGGAGGCAAGGAAAGAGCCCT GGAACGTGAACA
ZNF695_Transcript_variant_4 TGTCTAAGCCAGAACTGATCATCTGTCTGGAGGCAAGGAAAGAGCCCT GGAACGTGAACA
ZNF695_Transcript_variant_5 TGTCTAAGCCAGAACTGATCATCTGTCTGGAGGCAAGGAAAGAGCCCT GGAACGTGAACA
*****

ZNF695_Full_Length      CAGAGAAGACAGCCAAACACTCAGTTTTGTCTTCTTATCTTACTGAAG ACATTTTGCCAG
ZNF695_Transcript_variant_1/2 CAGAGAAGACAGC-----
ZNF695_Transcript_variant_4 CAGAGAAGACAGC-----
ZNF695_Transcript_variant_5 CAGAGAAGACAGC-----
*****

```

**Figura 13. Alineamiento de las secuencias expresadas de ZNF695.** Se comparan los tres amplicones expresados del gen ZNF695 en los tumores malignos y líneas celulares de ovario, respecto a la secuencia reportada en el NCBI (ZNF695\_Full\_Length).

Por otra parte, la variante 5 no genero ningún péptido debido a que no se encontró el codón de inicio, sugiriendo que este transcrito no se traduce a proteína, potencialmente es un RNA largo no codificante.

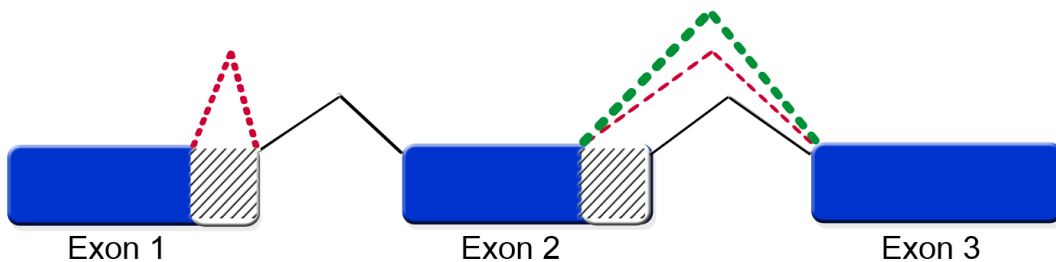
```

NP_065127.4      MGLLAFRDVALEFSPEEWECLDPAQRSLYRDVMLENYRNLIISLGEDSFNMQFLFHSLAMS
BAG54313.1      MGLLAFRDVALEFSPEEWECLDPAQRSLYRDVMLENYRNLIISLG-----LAMS
ZNF695_Transcript_variant_1/2  MGLLAFRDVALEFSPEEWECLDPAQRSLYRDVMLENYRNLIISLGEDSFNMQFLFHSLAMS
ZNF695_Transcript_variant_4    MGLLAFRDVALEFSPEEWECLDPAQRSLYRDVMLENYRNLIISLG-----LAMS
ZNF695_Transcript_variant_5    -GLLAFRDVALEFSPEEWECLDPAQRSLYRDVMLENYRNLIISLG-----LAMS
                                *****
NP_065127.4      KPELIICLEARKEPWNVNTTEKTAKH
BAG54313.1      KPELIICLEARKEPWNVNTTEKTAKH
ZNF695_Transcript_variant_1/2  KPELIICLEARKEPWNVNTTEKT---
ZNF695_Transcript_variant_4    KPELIICLEARKEPWNVNTTEKT---
ZNF695_Transcript_variant_5    KPELIICLEARKEPWNVNTTEKT---
                                *****

```

**Figura 14. Alineamiento de los péptidos generados in silico de los amplicones del gen ZNF695 expresados en tumores y líneas celulares de CaO.** Se compararon las secuencias de: 1) La proteína de referencia del gen ZNF695 variantes 1 y/o 2 (NP\_065127.4, NP\_001191150.1), 2) Secuencia BAG54313.1 3) Péptidos generados in silico de los amplicones expresados en tumores malignos y líneas celulares de CaO. El amplicón (variante 1 y/o 2) fue igual a la de referencia, y los amplicones (variantes 4 y 5) a BAG54313.1, aunque para la variante 5 no se observó la metionina 1.

Finalmente, de los resultados obtenidos, proponemos que el mRNA del ZNF695 puede generar variantes de mensajero (**Figura 15**). Se observan dos sitios de corte y empalme alternativo no descritos hasta el momento, con lo que le permite generar tres transcritos del gen ZNF695, aparentemente asociados a los procesos de malignidad.



**Figura 15. Splicing alternativo del gen ZNF695.** Los cuadros azules representan 3 exones del gen ZNF695, las líneas negras representan el splicing de los 3 exones, que corresponde a la variante 1 y/o 2 del gen. Línea Verde, representa el splicing alternativo del exon 2 permitiendo escindir una secuencia de 36 nt, y corresponde a la variante 4. Línea roja, representa a los dos sitios de splicing en el exon 1 y 2, que corresponde a la variante 5.

## Discusión

El cáncer de ovario representa un problema prioritario de salud, esto se debe a que más del 80% de las pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas de la enfermedad, lo que lleva a un pronóstico desfavorable. La supervivencia a cinco años y la remisión es menor del 20%, esto se debe a que es una enfermedad asintomática y se sabe poco sobre su patogénesis, aunado a que los métodos de diagnóstico temprano carecen de especificidad y sensibilidad, dificultando su detección temprana [82, 83].

La biología molecular es una herramienta muy importante para el entendimiento de la enfermedad, esto también ha permitido la búsqueda de marcadores moleculares que provean mejores herramientas para la detección temprana, pronóstico y diagnóstico en diferentes enfermedades humanas. El cáncer es un conjunto enfermedad donde se han observado una variedad de eventos, entre ellos: Inhibición de la apoptosis, proliferación descontrolada, autosuficiencia en la proliferación, migración e invasión, angiogénesis, inestabilidad cromosómica, entre otros [13, 14].

Un evento que puede afectar la función de células y tejidos sanos, incluso promover la transformación celular [87], es el *splicing* alternativo (SA) [71, 84-86]. El SA juega un papel importante en diversos procesos celulares y regulatorios de la célula, el corte y empalme alternativo de los transcritos promueve la expresión de diversos transcritos generados a partir de un único mensajero. En consecuencia promueve la generación de la diversidad de proteínas.

En el presente estudio se examinó mediante microarreglos de expresión de alta densidad, la expresión diferencial de exones en: tejidos sanos, tumores benignos, tumores malignos y líneas celulares. De esta manera se identificaron perfiles de expresión asociados a cada estirpe de tejido analizado. Por otra parte, se identificó la expresión diferencial de exones, lo que nos sugiere la presencia de variantes de mensajero expresadas y su potencial asociación al proceso de malignidad, debido al incremento de la expresión respecto a los tejidos de referencia (tejido de ovario sano) entre los genes más significativos se encontró al gen dedos de zinc 695 (ZNF695).

La proteína del gen ZNF695, aún no se encuentra caracterizada, por lo que su función es desconocida. Se ha descrito que este gen se transcribe y promueve

la expresión de tres variantes de mensajero, de las cuales, las variantes 1 y 2 codifican proteínas y la variante 3 un RNA no codificante. La amplificación del mensajero ZNF695, permitió identificar la expresión de tres variantes del gen. Los amplicones expresados del gen ZNF695 fue igual al reportado en la literatura y los dos restantes no se habían reportado, de ellos el de menor peso aparentemente corresponde a un RNA no codificante, esto se debe a que no se identificó la Metionina 1 del inicio de traducción. Cabe mencionar que, probablemente estos resultados puedan ser utilizados como un marcador de malignidad en cáncer de ovario, debido a la expresión exclusiva en los tumores y líneas celulares de ovario. Además, abre la oportunidad de conocer la función de los transcritos identificados en el proceso de malignidad y transformación celular.

El *splicing* alternativo es la mayor fuente para generar diversidad de proteínas. Basados en métodos bioinformáticos, se ha mostrado que más del 90% de los genes humanos pueden generar al menos dos variantes por SA [53, 55, 88]. De esta manera, se estima que en el humano pueden expresarse >100,000 transcritos diferentes [89].

La expresión de variantes de mensajero en el humano no se ha elucidado completamente. Se ha identificado la expresión de variantes de mensajero específicas en órganos y tejidos, además, la expresión es variable y puede cambiar en el tiempo [90, 91], sugiriendo la presencia de mecanismos regulatorios complejos. En cáncer se han evidenciado diversos mecanismos celulares involucrados, entre ellos, el SA [71]. La expresión diferencial de variantes de mensajero en cáncer, abre la oportunidad de identificar mensajeros asociados a estirpes tumorales específicas. Desarrollo de marcadores moleculares que permitan diagnosticar y/o predecir la enfermedad tempranamente [72].

Por otra parte, los eventos de SA en cáncer pueden servir para el entendimiento de los procesos moleculares involucrados en la transformación celular y desarrollo tumoral [92, 93], eventualmente para la identificación de potenciales blancos terapéuticos [94]. Nuestros resultados mostraron perfiles de expresión asociados a líneas celulares, tumores malignos, tumores benignos y tejidos sanos de ovario. Identificamos ~200 genes que pueden



generar variantes de mensajero, entre los más significativos se encontró el dedos de zinc 695.

La familia de proteínas dedos de zinc (ZNF) esta constituida por más de 700 diferentes miembros. Los genes ZNF tienen múltiples papeles en la célula, incluyendo; supresión, activación de la expresión, promoción del *splicing*, entre otros [95]. Dentro de los factores transcripcionales ZNF, la subfamilia C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> tiene la capacidad de unirse al DNA mediante los dominios de zinc (dedos) [96]. Además, los ZNF pueden tener dominios adicionales que les permite tener la función de represores, activadores o bien la función dual (activador-represor). Nosotros evidenciamos el incremento de la expresión del gen ZNF695 en tumores malignos y líneas celulares de ovario, éste gen pertenece a la subfamilia C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, esta constituido por 9 dedos de zinc y por el dominio Krüppel-associated box (KRAB); actúa como un represor de la expresión génica, basado en la homología con otras proteínas que contiene el mismo dominio [97-99]. La proteína ZNF695 contienen dos o más dominios funcionales. Diversos reportes han revelado que cambios en la estructura peptídica puede afectar y tener consecuencias dramáticas en su función proteica [98, 100], incluso promover función antagonistas (activador de la expresión) [100]. El dominio KRAB en las proteínas ZNF participa como un factor de unión a diversas proteínas (co-represores), y en conjunto promueven la represión transcripcional [97], el ZNF695 tiene el dominio KRAB sugiriendo que esta proteína participa en la represión.

Otros datos importantes que evidenciamos, es sobre la expresión de un transcrito con un sitio alternativo en el dominio KRAB (variante 4, amplicon intermedio). Posiblemente la proteína resultante pudiera tener una función alterna a las variantes 1/2, debido a cambios en la estructura del dominio represor KRAB. Posiblemente, el corte alternativo en esta secuencia promueve la alteración en la represión de genes, debido a que éste dominio es esencial para la interacción con los cofactores represivos. Adicionalmente, también evidencian la expresión variante 5, amplicon inferior; este transcrito aparentemente es un RNA no codificante, debido que no generó péptido al realizar la traducción *in silico*. En este exón 1 se encuentra el 5' UTR del gen ZNF695, probablemente el corte alternativo en esta región impida la traducción del transcrito.

Existe poca información sobre el papel del gen ZNF695 en humanos y otras especies. Los homólogos más cercanos al gen ZNF695 tiene el 64% de identidad, lo que dificulta predecir su función. Aunado a esto, observamos tres variantes de mensajero expresadas del gen ZNF695 en CaO. Esto nos hace pensar que cada variante pudiera tener papeles distintos en la patología.

### **Conclusión**

Se identificaron los perfiles de expresión y *splicing* alternativo en tumores benignos, tumores malinos, líneas celulares y tejido de ovario sin lesión, el ZNF695 fue uno de los genes expresados diferencialmente con mayor significado estadístico. Se determino la expresión de tres transcritos del gen ZNF695, de las cuales dos no habían sido reportadas. La expresión del gen se encontró en tumores malignos y líneas celulares de ovario, y la ausencia de la expresión en tejidos sanos y benignos, lo que nos hace pensar su asociación con el proceso de malignidad. Por lo tanto, consideramos que la expresión de las variantes identificadas del gen ZNF695, pudieran ser un oncogén, con un papel importante en la patogénesis del cáncer de ovario.

### **Perspectivas**

- Elucidar el papel que tienen las variantes expresadas del Gen ZNF695.
- Conocer los genes que son regulados por ZNF695.
- Conocer los mecanismos por los cuales ZNF695 genera variantes de RNA mensajero.
- Evaluar otros blancos de *splicing* alternativo en tumores de ovario.

## Anexos

### Anexo 1 Protocolo para el GENE CHIP 1.0

Fecha: \_\_\_\_\_

Proyecto: \_\_\_\_\_

Experimento: \_\_\_\_\_

Número	Muestra	(ng/ul):	260/280	RIN	RNA y H <sub>2</sub> O (100 ng final)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					

Dil. Muestra	Cuantificación 1		Cuantificación 2	
	ng / ul	260/280	ng / ul	260/280
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

#### *Primer día.*

#### Limites de RNA recomendado

Recomendaciones	Cantidad	RIN	260/280
Recomendado	100ng	≥ 8	1.8-2.0

#### Recomendaciones iniciales:

- Descongelar los reactivos a temperatura ambiente, agitar en vortex y pasar a hielo inmediatamente.
- Mezclar suavemente las enzimas mix antes de adicionar al master mix.
- Todos los tubos a usar deberan estar libres de RNasa
- Evitar pipetear <2µl
- Mantener en hielo los controles todo el tiempo.

**I.-Preparación de diluciones de Control poly-A para 100ng de RNA total (NOTA: si la cantidad de RNA es mayor o menor ver manual).**

1. Agregar 2µl de poly-A control stock a 38µl del poly-A control Dil Buffer, primera dilución 1:20, mezclar vigorosamente y centrifugar brevemente.
2. Agregar 2µl de la primera dilución a 98µl del poly-A control Dil Buffer, segunda dilución 1:50, mezclar y centrifugar.
3. Agregar 2µl de la segunda dilución a 98µl del poly-A control Dil Buffer, tercera dilución 1:50, mezclar y centrifugar.

**La primera dilución de poly-A se podrá guardar hasta 6 semanas a -20°C**

**NOTA: BAJAR LOS TUBOS DESPUES DE CADA INCUBACIÓN**

**II.- Preparación de T7-(N)6 Primers/Poly-A RNA controls.**

1. Prepare en fresco 250 ng/µl **T7-(N)6 Primers** partiendo de una concentración de 2.5µg/µl. Usar agua libre de RNasas.

Componentes

Reactivo	Volumen 100 ng	Marcar
<b>T7-(N)6 Primers</b>	2µl	
Control poly A dil 3	2µl	
Agua libre de nucleasa	16µl	
Volumen total	20µl	

2. Mezclar, centrifugar y poner en hielo.

**III.- Preparación del RNA total / T7-(N)6 Primers/Poly-A RNA controls.**

- 1.- Mezclar el RNA total y la solución del T7-(N)6 Primers/Poly-A RNA controls ver la siguiente tabla.

Reactivo	Volumen µl por 1 Rxn	Vol. µl por x Rxn	Marcar
RNA total 100 ng	Variable (100 ng en – 3 µl)		
Solución T7-(N)6	2µl		

Primers/Poly-A RNA controls	
Agua libre de RNasas	llevar a 5 $\mu$
Volumen total	5 $\mu$

Muestra	uL de RNA para 100 ng		Solución T7-(N)6 Primers
	uL RNA	uL H 2O	
1			2 $\mu$ l
2			2 $\mu$ l
3			2 $\mu$ l
4			2 $\mu$ l
5			2 $\mu$ l
6			2 $\mu$ l
7			2 $\mu$ l
8			2 $\mu$ l

2.- Mezclar y centrifugar e incubar por 5 min a 70 °C. Después, enfriar por 2 min a 4 °C y espinear para bajar la muestra.

Mezclar por vortex suavemente (2 cuadros) y centrifugar brevemente (5seg)

3.- Mantener en hielo hasta usar.

#### IV.- Síntesis de la primera cadena de cDNA

1.- Preparar la primera cadena como se muestra en la siguiente tabla.  
(**NOTA: trabajar en hielo**)

Componentes

Reactivo	Volumen $\mu$ l por 1 Rxn	Vol. $\mu$ l por x Rxn	Marcar
5x 1 <sup>st</sup> Estándar buffer	2 $\mu$ l x		
DTT, 0.1 M	1 $\mu$ l x		
dNTPs Mix, 10 mM	0.5 $\mu$ l x		
Rnase Inhibidor	0.5 $\mu$ l x		
SuperScrip II	1 $\mu$ l x		
Volumen total	5 $\mu$ l		

2.- Agregar los **5 $\mu$ L** (sln de la síntesis de la primera cadena) al RNA total / T7-(N)6 Primers/Poly-A RNA controls volumen final de 10  $\mu$ l vortex y spin.

3.- Incubar a

- 25 °C por 10 min
- 42 °C por 60 min
- 70 °C por 10 min

4.- Poner la reacción a **4 °C, 2 minutos antes de continuar** con la síntesis de la segunda cadena.

**Nota: Más de 10 min a 4 °C reduce la eficiencia para el cRNA.**

#### **V.- Síntesis de la segunda cadena de cDNA**

Usar el kit de GeneChip WT cDNA syntesis kit.

- i. Hacer la dilución a 17.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
Mezclar 2 µl de 1 M MgCl<sub>2</sub> con 112 µl de agua libre de Rnasas
- ii. Preparar la segunda cadena como se muestra en la siguiente tabla.

Reactivo	Volumen µl por 1 Rxn	Vol. µl por x Rxn	Marcar
Agua libre de Rnasas	4.8 µl x		
MgCl <sub>2</sub> , 17.5 mM	4µl x		
dNTPs Mix, 10 mM	0.4µl x		
DNA Pol I	0.6µl x		
RNasa H	0.2µl x		
Volumen total	10µl		

- iii. Agregar 10 µl de esta reacción a la mezcla de síntesis de la primera cadena de cDNA. Volumen final de 20 µl, mezclar gentilmente con el vortex y spinear.
- iv. Incubar la reacción.
  - a. 16 °C por 120 min sin la tapa.
  - b. 75 °C por 10 min con la tapa.

**NOTA: Mantener la reacción máximo por 10 min en hielo, ya que limita la eficiencia de la síntesis del cRNA.**

#### **VI.- Síntesis del cRNA y cleanup.**

Este protocolo requiere del kit de GeneChip WT cDNA amplification kit y del GeneChip sample cleanup module.

Preparar ET-OH al 80 %

- a) En un tubo, preparar el master mix IVT a temperatura ambiente como se muestra en la siguiente tabla.

**NOTA: si se presenta un precipitado después de descongelar el IVT 10x, poner a incubar a 37 °C hasta que el precipitado se elimine. NO hacer la reacción en hielo.**

Reactivos IVT mix	Volumen (µl) por Rxn	Volumen (µl) x Rxns
IVT Buffer Mix	24 µl	
IVT Enzyme Mix	6 µl	
Volumen Total	30 µl	

Vortex suave y Spin.

- b) Transferir 30 µl del IVT Mix a la reacción de síntesis del cDNA. Volumen final de 50 µl, mezclar y centrifugar (**rápido**).
- c) **Incubar la reacción por 16 horas a 40 °C** en el termociclador.

### Segundo Día

- d) Proceder a preparar el cleanup para le cRNA, usar cRNA Cleanup Spin Columns

**NOTA: Guardar a – 80 °C si no se procede a la purificación del cRNA inmediatamente.**

- e) Si no se ha hecho, agregar 20 ml de ET-OH (100%) a el cRNA Wash buffer.
- f) Agregar 50 µl de agua libre de RNasas a la reacción IVT. Volumen final de 100µl.
- g) Agregar 350 µl de cRNA Binding Buffer a cada una de las muestras y vortex por 3 seg.
- h) Agregar 250 µl de ET-OH al 100% a cada una de las reacciones y mezclar rápido.
- i) Poner la mezcla anterior al IVT cRNA cleanup spin column, en tubos colectores de 2 ml.
- j) Centrifugar por 15 seg. a 10,000 rpm. Descartar
- k) Transferir la columna a un tubo colector nuevo de 2 ml y agregar 500 µl de cRNA wash buffer a columna y centrifugar por 15 seg a 10,000 rpm y descartar.
- l) Lavar nuevamente con 500 µl de 80 % (v/v) ET-OH. Centrifugar por 15 seg, a 10,000 rpm y descartar.
- m) Abrir la tapa de la columna y centrifugar al máximo por 5 min.
- n) Transferir la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml y agregar 15 µl de agua libre de RNasas directamente sobre la membrana. Incubar a temperatura ambiente por 5 min. Centrifugar al **máximo por 1 min.**
- o) Tomar el eluido y ponerlo en la columna nuevamente, incubar por 5 min y centrifugar nuevamente al **máximo 1 min.**
- p) El cRNA eluido es aproximadamente 13.5 µl (cuantificar ).

**NOTA: Guardar a -80 si no se utiliza inmediatamente, si se obtienen concentraciones menor de 8 a 10 µg en 6.5 µl se puede utilizar el speedvac.**

**10 ug de cRNA para síntesis de primera cadena de cDNA.**

Muestra cRNA	ng/µl	260/280	260/230	µl de cRNA	H <sub>2</sub> O ul
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					

### VII.- Segundo ciclo, primera cadena de cDNA.

Se requiere el uso de GeneChip WT cDNA síntesis.

- Mezclar el cRNA como se muestra en la siguiente tabla.

Reactivo	Volumen µl por 1 Rxn	Vol. µl por x Rxn	Marcar
cRNA, 10 µg	variable		
Rando Primers (3µg/ul)	1.5 µl		
Agua libre de RNasas	Lleva a 8 µl		
Volumen total	8µl		

- Mezclar y spinear
- Incubar:
  - 70 °C por 5 min
  - 25 °C por 5 min
- Enfriar por lo menos 2 min a 4 °C.
- En un tubo nuevo preparar el mix para la reversa transcriptasa.

Reactivo	Volumen µl por 1 Rxn	Vol. µl por x Rxn	Marcar
5x 1 <sup>st</sup> strand Buffer	4 µl	x	
DTT, 0.1 M	2 µl	x	
dNTP +dUTP, 10 mM	1.25 µl	x	
SuperScrip II	4.75 µl	x	
Volumen total	12µl		

- Transferir los 12 µl de la reacción previa (random) volumen 20 µl.



- Mezclar y centrifugar.
- Incubar la reacción
  - 25 °C por 10 min
  - 42 °C por 90 min
  - 70 °C por 10 min
  - 4 °C

### VIII.- Hidrólisis del cRNA y cleanup de cadena sencilla de DNA.

- Agregar 1 µl de RNasa H, incubar a:
  - 37 °C por 45 min.
  - 95 °C por 5 min
  - 4 °C por 2 min
- Utilizar las columnas del cleanup de cDNA, si no se purifican guardar a -20 °C.
- Si no se ha hecho, agregar 24 ml de ET-OH (100%) al cDNA wash buffer.**
- Agregar 80 µl agua libre de RNasas a cada muestra, seguido de 370 µl de cDNA binding buffer, y vortex por 3 seg.
- Aplicar a la columna cleanup la muestra ( total de 471 µl).
- Centrifugar a 10,000 rpm por 1 min y descartar.
- Transferir la columna a un tubo colector nuevo de 2 ml y agregar 750 µl de cDNA Wash buffer. Centrifugar a 10,000 rpm por 1 min y descartar.
- Abrir la tapa de la columna y centrifugar al **máximo** por 5 min, descartar y poner la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml.
- Pipetear 15 µl del buffer de elución del cDNA, directamente sobre la membrana e incubar por 1 min a temperatura ambiente. Después centrifugar al **máximo** por 1 min.
- Repetir el paso de la elución agregar otros 15 µl del buffer de elución del cDNA, directamente sobre la membrana e incubar por 1 min a temperatura ambiente. Después centrifugar al **máximo** por 1 min.
- Total del volumen aprox 28 µl, tomar 2 µl y checar con el espectrofotómetro.

#### **5.5 ug de cDNA para fragmentar.**

Muestra	ng/µl	260/280	230/280	µl de cDNA fragmentación	H <sub>2</sub> O ul
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					

**NOTA:** la elución del cDNA puede ser guardada a -20 °C, si no se procede inmediatamente a la fragmentación.

### IX.- FRAGMENTACIÓN (caja 1).

Se requiere GeneChip WT Terminal labeling kit.

1.-Mezcla de Fragmentación microarreglo **GeneChip 1.0**

Reactivos	Formato 1 rxn	Muestra	Marque
Single-strand DNA	5.5 (variable)	µg	
Agua libre de RNasas	Llevar a 31.2 µl		
Volumen total	31.2 µl		

2.-Preparar master Mix para la fragmentación.

Reactivos	Formato 1 rxn	Vol. µl por x Rxn	Marque
Agua libre de RNasas	10 µl	x	
10 x cDNA fragmentation buffer	4.8 µl	x	
UDG, 10 u/ µl	1 µl	x	
APE1, 1000 U/ µl	1 µl	x	
Volumen total	16.8 µl		

3.- Agregar los 16.8 µl a la mezcla preparada previamente. Volumen final de 48 µl.

4.- Incubar la reacción :

37 °C por 60 min

93 °C por 2 min

4 °C

5.- Mezclar, spinear, y transferir 45 µl de la muestra a un tubo nuevo de 0.2 ml, el resto de la muestra se utilizara para ver el fragmentado que va desde 40 a 70 nt, se puede utilizar el bionalizador.

6.- Si la muestra no se macra inmediatamente guardar a -20°C, **NOTA:** Se deja a -20 para analizar nuevamente con el bionalizador para ver el fragmentado.

### X.- Marcaje del fragmentado de ssDNA

Se requiere GeneChip WT Terminal labeling kit.

1) Preparar el Mix de Marcaje como se muestra en la siguiente tabla.

Reactivos	Formato 1 rxn	Vol. µl por x Rxn	Marque
-----------	---------------	-------------------	--------

5x TdT Buffer	12 µl	x
TdT	2 µl	x
DNA labeling reagent, 5 mM	1 µl	x
Volumen total	15 µl	

Fragmento ssDNA	45 µl
-----------------	-------

Volumen final de la reacción 60 µl

- 2) Después de agregar los reactivos al fragmento del DNA, mezclar, spin e incubar:

37 °C por 60 min

70 °C por 10 min

4 °C, al menos 2 min.

- 3) Tomar 2 µl y hacer un gel shift para analizar

#### XI.- HIBRIDACION microarreglo GeneChip 1.0.

Se requieren 3 termoblocks a 65 °C, 99 °C y 45 °C

1.- Preparar el cocktail de hibridación en un tubo de 1.5 ml como se muestra en la tabla siguiente.

Calentar a 65°C por 5 min <b>antes de alicuotar</b> los controles de hibridación 20x
--

1. Tener los chips microarreglos a temperatura ambiente 30 minutos antes de usarlos.
2. Calentar los controles de hibridación 20x a 65°C por 5 minutos.
3. Preparación del coctel de hibridación por cada chip, según la siguiente tabla:

#### Cocktail de hibridación

Reactivo	Formato 169 (GeneChip 1.0)	Marque
Agua libre de nucleasas	9.3 µl	x
Control oligonucleotido (3nM)	B2 1.7 µl (50 pM)	x
Control de hibridación (bioB, bioC, bioD, cre)	20x 5 µl (1.5, 5, 25, 100 pM respectivamente)	x
Mix de hibridación 2x	50 µl	x
DMSO	7 µl	x
Volumen total	73µl	

Agregar a cada reacción

DNA fragmentado y marcado

27  $\mu$ l (25 ng/ $\mu$ l)

Volumen final 100  $\mu$ l

4.-Vortex y spinear rápido.

5.-Calentar el cóctel de hibridación a 99°C por 5 min en thermo block.

5.-Pasar el cóctel de hibridación a 45°C por 5 minutos en termo block

6.-Centrifugar el cóctel de hibridación 1 minutos a velocidad máxima.

7.- Poner los chips a temperatura ambiente.

8.- Inyectar a los chips 80  $\mu$ l del cocktail de hibridación.

9.- Hibridar los chips de microarreglos a 45°C y 60 rpm durante 17 horas, mas menos 1.

Microarreglos/muestra	Hora de entrada	Hora de salida
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

ID Gen Chip \_\_\_\_\_  
Lote \_\_\_\_\_ Exp \_\_\_\_\_ Muestra \_\_\_\_\_  
Parte \_\_\_\_\_

ID Gen Chip \_\_\_\_\_  
Lote \_\_\_\_\_ Exp \_\_\_\_\_ Muestra \_\_\_\_\_  
Parte \_\_\_\_\_

ID Gen Chip \_\_\_\_\_  
Lote \_\_\_\_\_ Exp \_\_\_\_\_ Muestra \_\_\_\_\_  
Parte \_\_\_\_\_

ID Gen Chip \_\_\_\_\_  
Lote \_\_\_\_\_ Exp \_\_\_\_\_ Muestra \_\_\_\_\_  
Parte \_\_\_\_\_

ID Gen Chip \_\_\_\_\_  
Lote \_\_\_\_\_ Exp \_\_\_\_\_ Muestra \_\_\_\_\_  
Parte \_\_\_\_\_

ID Gen Chip _____		
Lote _____	Exp _____	Muestra _____
Parte _____		

ID Gen Chip _____		
Lote _____	Exp _____	Muestra _____
Parte _____		

ID Gen Chip _____		
Lote _____	Exp _____	Muestra _____
Parte _____		

## **XII.- LAVADO Y TINCION DE MICROARREGLOS.**

- 1.- Registro de la muestra.
- 2.- Preparación de la estación de fluidos
  - a) Encender la estación de fluidos
  - b) En el Selector de AGCC, haga clic en el icono de Control de AGCC Fluidics o haga clic en el botón Inicio de Microsoft Windows y seleccione Programas → Affymetrix → Command Console → AGCC Fluidics de control
  - c) Abrir la ventana de AGCC.
- 3.- Hacer el priming con el Buffer A o con H<sub>2</sub>O.
- 4.- Programar con el formato del chip.
- 5.- Colocar los buffers :
  - En A 600 µL of Stain Cocktail en un tubo de 1.5 uL ambar
  - En B. 600 µL of Stain Cocktail 2 en un tubo de 1.5 uL.
  - En C. 800 µL of Array Holding Buffer en un tubo de 1.5 mL.
- 6.- Escanerar

## Anexo 2 Genes expresados diferencialmente.

Los genes más significativos en expresión diferencialmente, Rojo; mensajeros con incremento en la expresión. Azul; mensajeros que se suprimen.

Gene Symbol	RefSeq	p-value(BT and EOT and OCL vs. HT)	Fold-Change(BT and EOT and OCL vs. HT)	F(Sample)	F(Error)
TPX2	NM_012112	0.000154404	8.80566	22.7476	1
PBK	NM_018492	0.000777589	8.02879	16.0308	1
ASPM	NM_018136	0.0010057	6.62781	16.0076	1
CENPF	NM_016343	4.71E-05	7.76012	29.8423	1
DLGAP5	NM_014750	0.000149382	8.94812	22.0858	1
NUF2	NM_145697	0.00199553	5.84276	13.4793	1
FAM72D	AB096683	0.00176273	5.71322	15.1136	1
MKI67	NM_002417	7.07E-05	7.93594	25.4169	1
TTK	NM_003318	0.000430585	5.69559	21.1956	1
KIAA0101	NM_014736	0.000731436	8.28481	14.2421	1
CDK1	NM_001786	0.00106218	6.80948	13.8392	1
TOP2A	NM_001067	0.000829099	8.94981	12.8911	1
DEPDC1	NM_001114120	0.00177403	6.50243	13.2477	1
RAD51AP1	NM_001130862	0.000620543	5.23151	18.8754	1
CCNB2	NM_004701	0.000139169	7.05656	23.3378	1
OCLN	NM_002538	1.12E-05	8.16218	36.1394	1
CKMT1A	NM_001015001	0.00802147	4.68691	12.318	1
CKMT1A	NM_001015001	0.00802147	4.68691	12.318	1
KIF4A	NM_012310	0.000233905	7.28844	20.7285	1
CASC5	NM_170589	0.000490189	5.36201	19.9417	1
DLEU2	NR_002612	0.00108397	2.7685	35.1747	1
NCAPG	NM_022346	0.000714939	6.24529	17.139	1
MELK	NM_014791	0.00186246	7.40505	11.6829	1
PTTG1	NM_004219	5.19E-05	6.33443	29.596	1
IGF2BP3	NM_006547	0.0503751	3.08025	10.5331	1
BUB1B	NM_001211	0.000353	6.09797	20.0288	1
ECT2	NM_018098	0.000777821	6.26774	14.1976	1
KIF14	NM_014875	0.000730535	4.6239	20.7678	1
NDC80	NM_006101	0.00245349	3.77721	17.2579	1
ARHGAP11A	NM_014783	0.000372821	4.99102	23.3682	1
FAM72D	AB096683	0.000583452	4.53246	21.0417	1
KIF2C	NM_006845	0.00020277	4.75694	28.2571	1
BUB1	NM_004336	0.00033726	5.72694	18.6003	1
NEK2	NM_002497	1.76E-05	5.23344	39.4811	1
FAM72D	AB096683	0.000431398	4.66733	21.9811	1
FAM72D	AB096683	0.000385631	4.65182	22.5635	1
ESCO2	NM_001017420	0.000704985	4.30436	22.1215	1
DEPDC1B	NM_018369	0.000568265	4.92412	18.6703	1
CDKN3	NM_005192	0.000279223	5.58834	20.0882	1
PLK1	NM_005030	0.000165747	5.74012	23.5083	1
KIF23	NM_138555	0.000899856	6.32716	13.2187	1
HMMR	NM_001142556	0.00297561	4.67718	11.2922	1
ANLN	NM_018685	0.00109226	6.17843	13.705	1
UBE2T	NM_014176	0.00176011	4.4568	14.5153	1
ELOVL7	NM_024930	0.00944618	5.64565	6.19374	1
KIF11	NM_004523	0.000446304	4.55694	23.0658	1

KIF18A	NM_031217	0.000414327	4.67193	20.0155	1
SPC25	NM_020675	0.00095341	4.41456	16.5385	1
EXO1	NM_130398	0.000306829	4.23999	24.6241	1
CDCA2	NM_152562	0.000657568	4.22455	20.8262	1
SYNPO2	NM_133477	8.32E-05	-5.98779	48.5176	1
ACTA2	NM_001141945	0.0107198	-4.23269	20.4641	1
AOX1	NM_001159	2.54E-05	-5.71204	56.3707	1
NR4A2	NM_006186	0.00336042	-10.6176	9.52609	1
LYVE1	NM_006691	0.000399318	-4.09924	46.3334	1
MT1M	NM_176870	0.345298	-1.47739	21.253	1
GREB1	NM_014668	7.32E-06	-10.7907	57.29	1
ISLR	NM_005545	7.75E-06	-3.9458	122.14	1
SMOC2	NM_022138	0.000333696	-3.87138	57.777	1
C4A	NM_007293	7.80E-05	-6.76087	39.7822	1
C4A	NM_007293	7.80E-05	-6.76087	39.7822	1
C4A	NM_007293	7.80E-05	-6.76087	39.7822	1
LUM	NM_002345	0.0795253	-5.05243	5.50126	1
COL14A1	NM_021110	0.00109473	-3.83663	39.7611	1
MAOB	NM_000898	2.24E-08	-8.57468	260.703	1
MAMDC2	NM_153267	9.98E-05	-7.59467	33.1747	1
ABCA8	NM_007168	1.04E-06	-12.5793	76.4061	1
CFH	NM_000186	0.000626813	-7.47239	28.3824	1
PTGIS	NM_000961	0.0358362	-5.04162	7.80764	1
SERPING1	NM_000062	0.000117338	-7.84531	36.4894	1
MFAP4	NM_002404	4.27E-06	-6.85434	79.7504	1
FOS	NM_005252	7.58E-05	-8.26068	36.4582	1
NR4A1	NM_002135	2.36E-08	-12.8366	158.471	1
TAGLN	NM_001001522	7.15E-05	-5.57473	57.6696	1
C1R	NM_001733	1.17E-05	-5.8145	83.5927	1
COL1A2	NM_000089	0.0154743	-4.31277	25.1573	1
SPARC	NM_003118	0.00153793	-4.41626	52.8581	1
THBS2	NM_003247	1.14E-05	-4.25647	124.91	1
MUM1L1	NM_152423	7.69E-09	-24.9596	162.537	1
C1S	NM_201442	0.000120947	-7.62167	38.4922	1
MGP	NM_000900	1.57E-05	-5.35479	108.644	1
STAR	NM_000349	3.94E-07	-34.9361	65.0655	1
ACTG2	NM_001615	0.00641375	-3.6165	35.3861	1
COL6A3	NM_004369	7.25E-05	-5.45244	97.1785	1
CDH11	NM_001797	6.54E-06	-8.52423	99.7437	1
IGFBP5	NM_000599	0.00455233	-9.60083	12.569	1
MYH11	NM_022844	2.38E-07	-5.96226	215.688	1
SERPINE1	NM_000602	1.50E-05	-8.26279	61.3428	1
OLFML1	NM_198474	3.66E-06	-6.51918	107.763	1
FOSB	NM_006732	1.82E-07	-16.5704	101.01	1
SCN7A	NM_002976	7.05E-07	-21.0868	73.7422	1
EFEMP1	NM_004105	0.00040567	-9.97734	24.2543	1
SERPINF1	NM_002615	5.64E-05	-9.04011	45.1603	1
PDGFRA	NM_006206	7.77E-08	-11.076	192.872	1
OGN	NM_033014	0.000508642	-7.52981	40.5965	1
SPARCL1	NM_001128310	3.55E-06	-9.85209	131.475	1
DCN	NM_001920	0.00278917	-12.2463	17.7594	1
SFRP4	NM_003014	0.00139391	-5.93525	39.6746	1
C7	NM_000587	3.53E-09	-15.915	466.33	1

### Anexo 3. Expresión de variantes de mensajeros

Lista de genes representativos que tienen potenciales variantes de mensajero.

Gene Symbol	p-value(Sample)	alt-splicing(Sample)	Fold-Change(OCL and MOT vs. BOT and HOT)	F(Sample)	F(Error)
FEN1	9.14E-05	2.48E-05	2.51803	22.5062	1
HIST1H4C	0.0126118	9.46E-06	2.28247	6.08543	1
TUBA1C	0.000801759	3.57E-06	2.4004	13.286	1
OIP5	4.02E-06	8.12E-06	3.38581	45.2028	1
DLEU2	1.89E-05	1.55E-05	6.97934	32.1929	1
COX5A	0.000101577	1.56E-10	2.16992	21.9574	1
ERCC6L	1.21E-05	2.50E-05	2.67807	35.5668	1
CDCA3	9.02E-05	1.92E-07	2.94069	22.5728	1
ZDHHC23	0.000369608	4.68E-09	2.66144	16.1262	1
CDCA5	0.000375609	8.94E-09	2.98813	16.0625	1
ALYREF	0.000465658	8.97E-06	2.21737	15.2326	1
MAL2	0.00438762	5.38E-08	8.56509	8.39298	1
PARD6B	0.0203488	2.87E-07	2.78765	5.18717	1
C17orf104	2.40E-05	2.29E-08	2.69008	30.5203	1
RRM2	4.71E-05	9.82E-06	3.28285	26.2058	1
SPC24	0.000102045	3.25E-07	2.36429	21.9338	1
KIF18B	0.000115732	4.82E-05	2.99028	21.2978	1
CHRNA5	0.000451896	5.83E-06	2.71642	15.3463	1
HMGB3	0.000681796	4.07E-08	2.73671	13.8448	1
ORC6	0.00241712	1.12E-06	3.67003	9.92491	1
HMGA2	7.55E-06	6.27E-06	2.51728	39.4143	1
FAM72D	2.74E-05	6.21E-10	6.55051	29.6284	1
TYMS	0.000380976	3.98E-05	4.88177	16.0066	1
FBXO5	0.00153158	9.95E-09	2.21228	11.2259	1
GLDC	0.0269123	1.70E-05	5.61893	4.69963	1
YEATS4	0.0309089	6.48E-05	2.48924	4.46772	1
OCLN	4.11E-06	4.49E-11	8.02422	44.9786	1
ZNF695	1.28E-05	8.16E-05	4.5411	35.097	1
FAM54A	2.24E-05	2.89E-13	3.95164	30.9816	1
CCNB2	4.54E-05	4.35E-12	7.88777	26.432	1
SPC25	7.06E-05	7.02E-07	4.74645	23.8929	1
CEP55	0.000146763	2.64E-14	5.51172	20.1402	1
NIPA1	0.000367218	1.53E-05	2.62022	16.1519	1
UBE2T	0.000387489	5.25E-07	4.46297	15.9401	1
KIAA0101	0.000465302	1.02E-06	8.65772	15.2355	1
CKAP2L	0.000568405	9.42E-10	5.09256	14.4937	1
SEMA4D	0.000748092	9.90E-05	2.12394	13.5226	1
HN1	0.000931111	2.22E-05	2.50341	12.7861	1
RCAN3	0.000965539	2.58E-05	2.12593	12.667	1
C20orf24	0.00656259	1.14E-05	2.25296	7.4561	1
CDKN3	0.000250637	7.59E-10	5.42259	17.7247	1
C1orf106	0.0147522	4.39E-05	3.20522	5.7818	1
TNNC1	0.0178817	7.42E-08	3.22658	5.42165	1
NEK2	9.25E-06	1.37E-11	8.18157	37.697	1
FAM72D	3.48E-05	1.65E-10	5.74446	28.0709	1
CDC20	5.84E-05	2.59E-15	3.61476	24.9532	1
AP1S3	7.19E-05	4.52E-08	2.46944	23.7911	1



## Referencias

1. Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG: **Ovarian carcinogenesis and the biology of ovarian surface epithelium.** *Journal of cellular physiology* 1997, **173**(2):261-265.
2. Sowter HM, Ashworth A: **BRCA1 and BRCA2 as ovarian cancer susceptibility genes.** *Carcinogenesis* 2005, **26**(10):1651-1656.
3. Kote-Jarai Z, Eeles RA: **BRCA1, BRCA2 and their possible function in DNA damage response.** *British journal of cancer* 1999, **81**(7):1099-1102.
4. Hartge P, Schiffman MH, Hoover R, McGowan L, Leshner L, Norris HJ: **A case-control study of epithelial ovarian cancer.** *American journal of obstetrics and gynecology* 1989, **161**(1):10-16.
5. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE, Self SG: **Risk of breast cancer in a cohort of infertile women.** *Gynecologic oncology* 1996, **60**(1):3-7.
6. Rosenberg L, Shapiro S, Slone D, Kaufman DW, Helmrich SP, Miettinen OS, Stolley PD, Rosenshein NB, Schottenfeld D, Engle RL, Jr.: **Epithelial ovarian cancer and combination oral contraceptives.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1982, **247**(23):3210-3212.
7. Scully RE: **Classification of human ovarian tumors.** *Environmental health perspectives* 1987, **73**:15-25.
8. Krag KJ, Canellos GP, Griffiths CT, Knapp RC, Parker LM, Welch WR, Klatt M, Andersen J: **Predictive factors for long-term survival in patients with advanced ovarian cancer.** *Gynecologic oncology* 1989, **34**(1):88-93.
9. Gershenson DM, Mitchell MF, Atkinson N, Silva EG, Kavanagh JJ, Morris M, Burke TW, Warner D, Wharton JT: **The effect of prolonged cisplatin-based chemotherapy on progression-free survival in patients with optimal epithelial ovarian cancer: "maintenance" therapy reconsidered.** *Gynecologic oncology* 1992, **47**(1):7-13.
10. Wharton JT, Edwards CL, Rutledge FN: **Long-term survival after chemotherapy for advanced epithelial ovarian carcinoma.** *American journal of obstetrics and gynecology* 1984, **148**(7):997-1005.
11. Munnell EW: **Surgical treatment of ovarian carcinoma.** *Clinical obstetrics and gynecology* 1969, **12**(4):980-992.

12. Griffiths CT, Grogan RH, Hall TC: **Advanced ovarian cancer: primary treatment with surgery, radiotherapy, and chemotherapy.** *Cancer* 1972, **29**(1):1-7.
13. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
14. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
15. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR: **Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders.** *Nature genetics* 2007, **39**(7 Suppl):S48-54.
16. Mayer D: **A new approach to drug development.** *The New England journal of medicine* 2006, **355**(19):2045; author reply 2046.
17. Bayani J, Brenton JD, Macgregor PF, Beheshti B, Albert M, Nallainathan D, Karaskova J, Rosen B, Murphy J, Laframboise S *et al*: **Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and expression microarrays.** *Cancer research* 2002, **62**(12):3466-3476.
18. Vogelstein B, Kinzler KW: **The multistep nature of cancer.** *Trends in genetics : TIG* 1993, **9**(4):138-141.
19. Helou K, Padilla-Nash H, Wangsa D, Karlsson E, Osterberg L, Karlsson P, Ried T, Knutsen T: **Comparative genome hybridization reveals specific genomic imbalances during the genesis from benign through borderline to malignant ovarian tumors.** *Cancer genetics and cytogenetics* 2006, **170**(1):1-8.
20. Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, Yang-Feng TL, Gray JW: **Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors.** *Cancer research* 1995, **55**(24):6172-6180.
21. Kiechle M, Hinrichs M, Jacobsen A, Luttges J, Pfisterer J, Kommos F, Arnold N: **Genetic imbalances in precursor lesions of endometrial cancer detected by comparative genomic hybridization.** *The American journal of pathology* 2000, **156**(6):1827-1833.
22. Sonoda G, Palazzo J, du Manoir S, Godwin AK, Feder M, Yakushiji M, Testa JR: **Comparative genomic hybridization detects frequent**

- overrepresentation of chromosomal material from 3q26, 8q24, and 20q13 in human ovarian carcinomas.** *Genes, chromosomes & cancer* 1997, **20**(4):320-328.
23. Tapper J, Butzow R, Wahlstrom T, Seppala M, Knuutila S: **Evidence for divergence of DNA copy number changes in serous, mucinous and endometrioid ovarian carcinomas.** *British journal of cancer* 1997, **75**(12):1782-1787.
24. Link CJ, Jr., Reed E, Sarosy G, Kohn EC: **Borderline ovarian tumors.** *The American journal of medicine* 1996, **101**(2):217-225.
25. Wolf NG, Abdul-Karim FW, Farver C, Schrock E, du Manoir S, Schwartz S: **Analysis of ovarian borderline tumors using comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization.** *Genes, chromosomes & cancer* 1999, **25**(4):307-315.
26. Hauptmann S, Denkert C, Koch I, Petersen S, Schluns K, Reles A, Dietel M, Petersen I: **Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization.** *Human pathology* 2002, **33**(6):632-641.
27. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al*: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, **291**(5507):1304-1351.
28. Early P, Rogers J, Davis M, Calame K, Bond M, Wall R, Hood L: **Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways.** *Cell* 1980, **20**(2):313-319.
29. Rogers J, Early P, Carter C, Calame K, Bond M, Hood L, Wall R: **Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain.** *Cell* 1980, **20**(2):303-312.
30. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM: **Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products.** *Nature* 1982, **298**(5871):240-244.
31. Rosenfeld MG, Lin CR, Amara SG, Stolarsky L, Roos BA, Ong ES, Evans RM: **Calcitonin mRNA polymorphism: peptide switching associated with alternative RNA splicing events.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982, **79**(6):1717-1721.

32. Zamore PD, Green MR: **Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, **86**(23):9243-9247.
33. Hartmuth K, Urlaub H, Vornlocher HP, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Luhrmann R: **Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(26):16719-16724.
34. Jurica MS, Moore MJ: **Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins.** *Molecular cell* 2003, **12**(1):5-14.
35. Brow DA: **Allosteric cascade of spliceosome activation.** *Annual review of genetics* 2002, **36**:333-360.
36. Graveley BR: **Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world.** *Trends in genetics : TIG* 2001, **17**(2):100-107.
37. Zhao W, Manley JL: **Complex alternative RNA processing generates an unexpected diversity of poly(A) polymerase isoforms.** *Molecular and cellular biology* 1996, **16**(5):2378-2386.
38. Smith CW, Valcarcel J: **Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control.** *Trends in biochemical sciences* 2000, **25**(8):381-388.
39. Sugnet CW, Kent WJ, Ares M, Jr., Haussler D: **Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice.** *Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing* 2004:66-77.
40. Manley JL, Tacke R: **SR proteins and splicing control.** *Genes & development* 1996, **10**(13):1569-1579.
41. Maniatis T, Tasic B: **Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans.** *Nature* 2002, **418**(6894):236-243.
42. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR: **Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.** *Nature reviews Genetics* 2002, **3**(4):285-298.

43. Cartegni L, Krainer AR: **Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1.** *Nature genetics* 2002, **30**(4):377-384.
44. Wagner EJ, Garcia-Blanco MA: **Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition.** *Molecular and cellular biology* 2001, **21**(10):3281-3288.
45. Faustino NA, Cooper TA: **Pre-mRNA splicing and human disease.** *Genes & development* 2003, **17**(4):419-437.
46. Lareau LF, Green RE, Bhatnagar RS, Brenner SE: **The evolving roles of alternative splicing.** *Current opinion in structural biology* 2004, **14**(3):273-282.
47. Lopez PJ, Seraphin B: **Uncoupling yeast intron recognition from transcription with recursive splicing.** *EMBO reports* 2000, **1**(4):334-339.
48. Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ: **Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature biotechnology* 1997, **15**(13):1359-1367.
49. Xing Y, Lee C: **Alternative splicing and RNA selection pressure--evolutionary consequences for eukaryotic genomes.** *Nature reviews Genetics* 2006, **7**(7):499-509.
50. Modrek B, Lee C: **A genomic view of alternative splicing.** *Nature genetics* 2002, **30**(1):13-19.
51. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD: **Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays.** *Science* 2003, **302**(5653):2141-2144.
52. Blencowe BJ, Ahmad S, Lee LJ: **Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes.** *Genes & development* 2009, **23**(12):1379-1386.
53. Carninci P: **Constructing the landscape of the mammalian transcriptome.** *The Journal of experimental biology* 2007, **210**(Pt 9):1497-1506.
54. Mironov AA, Fickett JW, Gelfand MS: **Frequent alternative splicing of human genes.** *Genome research* 1999, **9**(12):1288-1293.

55. Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C: **Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes.** *Nucleic acids research* 2001, **29**(13):2850-2859.
56. Kan Z, Rouchka EC, Gish WR, States DJ: **Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs.** *Genome research* 2001, **11**(5):889-900.
57. Pick M, Flores-Flores C, Soreq H: **From brain to blood: alternative splicing evidence for the cholinergic basis of Mammalian stress responses.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004, **1018**:85-98.
58. Stoilov P, Meshorer E, Gencheva M, Glick D, Soreq H, Stamm S: **Defects in pre-mRNA processing as causes of and predisposition to diseases.** *DNA and cell biology* 2002, **21**(11):803-818.
59. Hastings ML, Krainer AR: **Pre-mRNA splicing in the new millennium.** *Current opinion in cell biology* 2001, **13**(3):302-309.
60. Nissim-Rafinia M, Kerem B: **Splicing regulation as a potential genetic modifier.** *Trends in genetics : TIG* 2002, **18**(3):123-127.
61. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN: **Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update.** *Human mutation* 2003, **21**(6):577-581.
62. Tang ZZ, Zheng S, Nikolic J, Black DL: **Developmental control of CaV1.2 L-type calcium channel splicing by Fox proteins.** *Molecular and cellular biology* 2009, **29**(17):4757-4765.
63. Gatesman Ammer A, Hayes KE, Martin KH, Zhang L, Spirou GA, Weed SA: **Multi-photon imaging of tumor cell invasion in an orthotopic mouse model of oral squamous cell carcinoma.** *Journal of visualized experiments : JoVE* 2011(53).
64. Hastings ML, Resta N, Traum D, Stella A, Guanti G, Krainer AR: **An LKB1 AT-AC intron mutation causes Peutz-Jeghers syndrome via splicing at noncanonical cryptic splice sites.** *Nature structural & molecular biology* 2005, **12**(1):54-59.
65. Berchuck A: **Microarray analysis of gene expression in gynecologic cancers--still only the beginning.** *Gynecologic oncology* 2009, **114**(1):1-2.

66. Philips AV, Cooper TA: **RNA processing and human disease.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2000, **57**(2):235-249.
67. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Hausmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P: **A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells.** *Cell* 1991, **65**(1):13-24.
68. Sneath RJ, Mangham DC: **The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia.** *Molecular pathology : MP* 1998, **51**(4):191-200.
69. Burrows JF, Chanduloy S, McIlhatton MA, Nagar H, Yeates K, Donaghy P, Price J, Godwin AK, Johnston PG, Russell SE: **Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia.** *The Journal of pathology* 2003, **201**(4):581-588.
70. Leung YK, Lau KM, Mobley J, Jiang Z, Ho SM: **Overexpression of cytochrome P450 1A1 and its novel spliced variant in ovarian cancer cells: alternative subcellular enzyme compartmentation may contribute to carcinogenesis.** *Cancer research* 2005, **65**(9):3726-3734.
71. Venables JP, Klinck R, Koh C, Gervais-Bird J, Bramard A, Inkel L, Durand M, Couture S, Froehlich U, Lapointe E *et al*: **Cancer-associated regulation of alternative splicing.** *Nature structural & molecular biology* 2009, **16**(6):670-676.
72. Moran-Jones K, Grindlay J, Jones M, Smith R, Norman JC: **hnRNP A2 regulates alternative mRNA splicing of TP53INP2 to control invasive cell migration.** *Cancer research* 2009, **69**(24):9219-9227.
73. Dosil V, Tosar A, Canadas C, Perez-Segura P, Diaz-Rubio E, Caldes T, de la Hoya M: **Alternative splicing and molecular characterization of splice site variants: BRCA1 c.591C>T as a case study.** *Clinical chemistry* 2010, **56**(1):53-61.
74. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB: **bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.** *Cell* 1993, **74**(4):597-608.
75. Chen LL, Sabripour M, Wu EF, Prieto VG, Fuller GN, Frazier ML: **A mutation-created novel intra-exonic pre-mRNA splice site causes constitutive**

- activation of KIT in human gastrointestinal stromal tumors.** *Oncogene* 2005, **24**(26):4271-4280.
76. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF: **Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCA-3) with androgen and estrogen receptors.** *Cancer research* 1983, **43**(11):5379-5389.
77. Fogh J, Wright WC, Loveless JD: **Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.** *Journal of the National Cancer Institute* 1977, **58**(2):209-214.
78. Provencher DM, Lounis H, Champoux L, Tetrault M, Manderson EN, Wang JC, Eydoux P, Savoie R, Tonin PN, Mes-Masson AM: **Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines.** *In vitro cellular & developmental biology Animal* 2000, **36**(6):357-361.
79. Quackenbush J: **Computational analysis of microarray data.** *Nature reviews Genetics* 2001, **2**(6):418-427.
80. Brazma A: **Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)--successes, failures, challenges.** *TheScientificWorldJournal* 2009, **9**:420-423.
81. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC *et al*: **Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data.** *Nature genetics* 2001, **29**(4):365-371.
82. Hoskins WJ: **Prospective on ovarian cancer: why prevent?** *Journal of cellular biochemistry Supplement* 1995, **23**:189-199.
83. Nguyen HN, Averette HE, Hoskins W, Sevin BU, Penalver M, Steren A: **National survey of ovarian carcinoma. VI. Critical assessment of current International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system.** *Cancer* 1993, **72**(10):3007-3011.
84. Thorsen K, Sorensen KD, Brems-Eskildsen AS, Modin C, Gaustadnes M, Hein AM, Kruhoffer M, Laurberg S, Borre M, Wang K *et al*: **Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis.** *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2008, **7**(7):1214-1224.



85. Narla G, Difeo A, Reeves HL, Schaid DJ, Hirshfeld J, Hod E, Katz A, Isaacs WB, Hebbing S, Komiya A *et al*: **A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk.** *Cancer research* 2005, **65**(4):1213-1222.
86. Cheng C, Sharp PA: **Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion.** *Molecular and cellular biology* 2006, **26**(1):362-370.
87. Zardi L, Carnemolla B, Siri A, Petersen TE, Paoletta G, Sebastio G, Baralle FE: **Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon.** *The EMBO journal* 1987, **6**(8):2337-2342.
88. Schmucker D, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, Dixon JE, Zipursky SL: **Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity.** *Cell* 2000, **101**(6):671-684.
89. Missler M, Sudhof TC: **Neurexins: three genes and 1001 products.** *Trends in genetics : TIG* 1998, **14**(1):20-26.
90. Joseph R, Dou D, Tsang W: **Neuronatin mRNA: alternatively spliced forms of a novel brain-specific mammalian developmental gene.** *Brain research* 1995, **690**(1):92-98.
91. Chen CD, Kobayashi R, Helfman DM: **Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene.** *Genes & development* 1999, **13**(5):593-606.
92. Guo M, Liu W, Serra S, Asa SL, Ezzat S: **FGFR2 isoforms support epithelial-stromal interactions in thyroid cancer progression.** *Cancer research* 2012, **72**(8):2017-2027.
93. Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, Sondek J, Der CJ: **Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation.** *Oncogene* 2004, **23**(58):9369-9380.
94. Dery KJ, Gusti V, Gaur S, Shively JE, Yen Y, Gaur RK: **Alternative splicing as a therapeutic target for human diseases.** *Methods in molecular biology* 2009, **555**:127-144.

95. Phillips JE, Corces VG: **CTCF: master weaver of the genome.** *Cell* 2009, **137**(7):1194-1211.
96. Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV: **Structural classification of zinc fingers: survey and summary.** *Nucleic acids research* 2003, **31**(2):532-550.
97. Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, Rauscher FJ, 3rd: **KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain.** *Genes & development* 1996, **10**(16):2067-2078.
98. Vissing H, Meyer WK, Aagaard L, Tommerup N, Thiesen HJ: **Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins.** *FEBS letters* 1995, **369**(2-3):153-157.
99. Pengue G, Calabro V, Bartoli PC, Pagliuca A, Lania L: **Repression of transcriptional activity at a distance by the evolutionarily conserved KRAB domain present in a subfamily of zinc finger proteins.** *Nucleic acids research* 1994, **22**(15):2908-2914.
100. Agata Y, Matsuda E, Shimizu A: **Two novel Kruppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through functional interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1beta/KRIP-1).** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(23):16412-16422.

## **Apéndice**

Artículo publicado con los resultados de esta tesis



RESEARCH

Open Access

# Splice variants of zinc finger protein 695 mRNA associated to ovarian cancer

Sergio Juárez-Méndez<sup>1</sup>, Alejandro Zentella-Dehesa<sup>3,4</sup>, Vanessa Villegas-Ruiz<sup>5</sup>, Oscar Alberto Pérez-González<sup>1</sup>, Mauricio Salcedo<sup>5</sup>, Ricardo López-Romero<sup>5</sup>, Edgar Román-Basaure<sup>7</sup>, Minerva Lazos-Ochoa<sup>6</sup>, Víctor Edén Montes de Oca-Fuentes<sup>4</sup>, Guelaguetza Vázquez-Ortiz<sup>5,8\*†</sup> and José Moreno<sup>2\*†</sup>

## Abstract

**Background:** Studies of alternative mRNA splicing (AS) in health and disease have yet to yield the complete picture of protein diversity and its role in physiology and pathology. Some forms of cancer appear to be associated to certain alternative mRNA splice variants, but their role in the cancer development and outcome is unclear.

**Methods:** We examined AS profiles by means of whole genome exon expression microarrays (Affymetrix GeneChip 1.0) in ovarian tumors and ovarian cancer-derived cell lines, compared to healthy ovarian tissue. Alternatively spliced genes expressed predominantly in ovarian tumors and cell lines were confirmed by RT-PCR.

**Results:** Among several significantly overexpressed AS genes in malignant ovarian tumors and ovarian cancer cell lines, the most significant one was that of the zinc finger protein ZNF695, with two previously unknown mRNA splice variants identified in ovarian tumors and cell lines. The identity of ZNF695 AS variants was confirmed by cloning and sequencing of the amplicons obtained from ovarian cancer tissue and cell lines.

**Conclusions:** Alternative ZNF695 mRNA splicing could be a marker of ovarian cancer with possible implications on its pathogenesis.

**Keywords:** Ovarian cancer, Alternative mRNA splicing, ZNF695

## Background

Ovarian Cancer (OC) is the sixth most prevalent form of cancer worldwide, which has a high mortality rate because at the time of diagnosis nearly 70% of cases are at an advanced stage, leading to a 5 year survival below 30% [1]. The classification of OC depends on its cellular origin, with approximately two-thirds belonging to the epithelial serous type [2]. Similar to other types of cancer, OC is characterized by changes in gene expression profiles [3-6], including under and overexpression, or even *de novo* gene expression [7,8].

Alternative splicing (AS) provides a critical and flexible layer of regulation, intervening in many biological processes, such as the diversity of proteins.

AS has major impact on the cell phenotype as a single pre-mRNA spliced in different ways can give rise to different mature mRNA transcripts (variants) that are translated onto distinct proteins varying in functions [9-11]. Apparently, over 90% of human genes have two or more splice variants [9,10], greatly increasing the complexity of both the transcriptome and the proteome [12,13]. Therefore, AS could play an important role in gene regulation both in health and disease. In cancer, AS could affect the cellular processes related to tumor progression, including inhibition of apoptosis, tumor invasiveness, metastasis and angiogenesis [14].

Among the genes with well established AS patterns whose derived alternative proteins affect tumor cell behavior is the SRPK1 kinase that in breast, colonic and pancreatic carcinomas phosphorylates the splicing factor SF2/ASE, allowing import to the nucleus, where it modulates AS of multiple target mRNAs, such as BIN1, S6K1, MNK2, contributing to tumor progression [15,16]. Additional cancer types with apparent alterations of alternative

\* Correspondence: vazquezortizg@niiddk.nih.gov; jmoreno49@gmail.com

†Equal contributors

<sup>5</sup>Genomic Oncology Laboratory, Medical Research Unit in Oncologic Diseases, Oncology Hospital, National Medical Center Siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Mexican Faculty of Medicine, Universidad La Salle, Mexico City, Mexico  
Full list of author information is available at the end of the article

splicing, include: gastric, colon and bladder carcinomas [17], hepatocarcinoma [18], prostatic cancer [19,20], multiple myeloma [21], breast cancer, and OC [22], where most cancer-associated transcript variants belong to genes related to processes such as cellular transformation [23,24], adhesion, proliferation, migration and invasion [25-28]. In OC, a new, previously unknown, variant of p53 mRNA transcript variant (p53 $\delta$ ) was identified [29] whereas variants of the NR4A1, a nuclear receptor involved in steroidogenesis, and MRRE, a mitochondrial protein, were identified in prostatic cancer [20]. Although the extent and pathophysiological meaning of this has yet to be established, there is little doubt that the study of alternative splicing can lead to a better understanding of the mechanisms of cancer development, and to the identification of new biomarkers for the diagnosis, epidemiological studies of prevalence, prognosis, and therapeutic responses.

The aim of the present study was to identify the whole genome profile of alternatively spliced mRNA in ovarian cancer and cell lines by high-density microarrays. Among the spectrum of several ovarian cancer-associated alternatively spliced genes, one mRNA, coding for ZNF695, a zinc finger protein, had the most significantly overexpression in OC with two prominent splice variants that were not present in normal ovarian tissue. These variants were cloned and sequenced. Here we describe some of the characteristics of ZNF695 mRNA splicing variants associated to ovarian cancer.

## Methods

### Data set and specimens

All investigations were performed in accordance with the Declaration of Helsinki with approval by the Central Research Committee of the Mexican Institute of Social Security and The Ethics Committee of Centro Médico Siglo XXI, Mexican Institute of Social Security. After informed consent was obtained, normal ovarian tissue (HOT), borderline ovarian tumor (BOT), malignant epithelial ovarian tumors stages III and IV (MOT) tissues were collected by the clinical partners at the Oncology Hospital, National Medical Center Siglo XXI, IMSS, and at the General Hospital of Mexico SSA (Secretaría de Salud) from patients with diagnosed ovarian cancer, or healthy ovarian tissue from patients who underwent abdominal surgery for hysterectomy due to uterine myomatosis with no evidence of ovarian pathology. Routinely, during this type of procedure, in patients over 45 years old both ovaries are removed, and only one in patients under 45.

Cancer and corresponding normal tissue specimens were cut into three fragments and snapped frozen in liquid nitrogen, one of which was stored in RNA Lateral<sup>R</sup> (Qiagen, Valencia, CA, USA) at -70°C for a maximum of two months until RNA was purified, and the other two remaining fragments were formalin-fixed, paraffin-embedded, sliced,

mounted on slides, and stained with HE. Only tissue samples with >80% tumor cells or normal epithelial cells (MOT or HOT, respectively), according to the histopathological examination were included for analysis.

Moreover, we also included for study ovarian cancer cell lines (OCL) NIH: OVCAR-3 [30], SK-OV-3 [31], TOV-112D [32] and TOV-21G [32], kindly provided by Dr. Laura Díaz-Cueto, Research Unit on Reproductive Medicine, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Samples were disrupted using a TissueLyser<sup>™</sup> system (Qiagen, Valencia, CA, USA) for 60s at 30 Hz. Total RNA was obtained with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and total RNA concentration was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer and RNA quality was visualized and measured on an Agilent RNA 6000 Nano Assays in an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

### Microarray GeneChip 1.0 assay

The microarray used for these studies was Affymetrix GeneChip 1.0, which contains over 750,000 probe sets representing all exons of ~28,800 annotated genes. Sample amplification and preparation for microarray hybridization was performed according to Affymetrix specifications ([http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/wt\\_expressionkit\\_manual.pdf](http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/wt_expressionkit_manual.pdf)). In brief, 100 ng total RNA was reverse transcribed to cDNA, amplified by *in vitro* transcription and reverse transcribed to cDNA again. Fragments between 40 and 70 bp were generated enzymatically, labelled and hybridized onto the microarray chips in an Affymetrix hybridization oven at 60 rpm, 45°C for 17 hours. Chips were washed according to the established protocols (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) with GeneChip fluidics station 450, and finally they were scanned with an Affymetrix 7G GeneChip scanner. The raw data (CEL files) will be deposited in Gene Expression Omnibus (GEO).

### Data analysis

Microarray analysis was achieved by means of CEL files of the Partek Genomics Suite 6.5 v software (Partek Incorporated, Saint Louis, MO). Probe sets were summarized by means of Median Polish and normalized by quantiles with no probe sets excluded from analysis. Background noise correction was achieved by means Robust Multi-chip Average (RMA) and data were log<sub>2</sub> transformed. Data grouping and categorization was achieved by principal component analysis (PCA). Differentially expressed exons were detected by means of Alternative Splicing ANOVA with the healthy control samples as the baseline. Moreover, BOT, MOT and OCL were also examined against HOT by the Geometric least squares means model. Hierarchical clustering was based on the

dissimilarity of samples (Euclidian method) by means of average linkage.

#### Reverse transcription PCR

For linear cDNA synthesis, 1 µg total RNA was predigested with 1 U DNase, 1 × DNase buffer, 5 mM EDTA, after which it was incubated at 37°C for 30 min and at 65°C for an additional 10 min. Thereafter, samples were placed in master mix containing: 40 U Ribolock RNase inhibitor, 0.2 µg random hexamer primers, 20 mM dNTP's mix, 40 U M-Mulv reverse transcriptase (RT), and 1 × M-Mulv RT Buffer (Thermo Scientific).

Conditions for endpoint PCR amplification were: 5' CGAATGAGAGCTGGCAAAGGCAAA 3' Fwd., 5' ACGCCAAGTGCCGTACAATTCATC 3' Rev. primers (housekeeping gene RPL4) 7.5 mM, 1 × Taq buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTP's, 1.25 U Taq Pol, 2 ul cDNA; whereas ZNF695 was amplified with primers: 5' GCCT TTGTCTCCTTGCGGC 3' Fwd. 5' GGCTGTCTTCTCT GTGTTACGTT 3' Rev. 12.5 mM, 1 × Taq buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTP's, 1.25 U Taq Pol, 2 ul cDNA. In both cases mix reactions were initially incubated at 95°C for 5 min, and then were run for 40 cycles at 94°C 45 s, 59°C 45 s, 72°C 60 s; and finally at 72°C for 5 min.

#### PCR product purification and cloning

PCR products were separated by electrophoresis (2.5% agarose gels) and extracted by means of Gel extraction kit<sup>TM</sup> (Qiagen, Valencia, CA, USA). The extracted products were ligated into pGem-T Easy Vector<sup>TM</sup> (Promega, Madison, WI) by incubating overnight in 1.5 mL Eppendorf tubes with 2 × Rapid Ligation Buffer (T4 ligase), pGEM-T Easy Vector, PCR product and T4 DNA ligase at 4°C.

Recombinant plasmid DNA was purified with Wizard Plus Miniprep DNA Purification System<sup>TM</sup> (Promega) and selected clones were sequenced with M13 oligonucleotide and BigDye Terminator 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems), and sequenced in an Applied Biosystems Abi Prism 3130 genetic analyzer automated sequencer. Subsequently, the PCR amplicon sequences were assembled and checked against the transcript sequences annotated in the NCBI nucleotide database.

## Results

#### Expression microarray assays

A total of 14 samples with an RNA integrity number (RIN) ≥ 8 were hybridized in GeneChip 1.0 microarrays according to the MIAME guidelines. Histopathological classification of tissues was as follows: healthy ovarian tissue (HOT) n = 4, benign ovarian tumors (BOT) n = 2, (malignant) serous epithelial ovarian tumors in stages III and IV (MOT) n = 4, and ovarian cell lines (OCL) n = 4. As a prerequisite, healthy tissue had to be free of any visible alteration, whereas all tumor tissues, benign or

malignant, selected for study contained at least 90% tumor cells.

Background correction and normalization of microarrays reported no quality control errors (QC) and, as expected, the QC intergroup proportions were variable (Additional file 1), whereas gene expression histograms were similar in all samples. General gene expression was examined and visualized according to the histological groups by means of PCA. As expected, except for HOT and BOT that essentially overlapped, MOT and OCL clustered in distinct regions of the PCA plot (Figure 1). Thus, HOT and BOT clustered together in the negative end, whereas MOT and OCL clustered separately in the positive area. This indicates that our data set has the power to discriminate OC (both MOT and OCL) from normal tissue or benign tumors. Moreover, as expected, OC gene expression profiles show a wide dispersion, reflecting tumor heterogeneity. In contrast, HOT and BOT plotted in relatively close proximity, even at the level of individual samples that for the two BOT samples practically overlapped. Finally, as expected, HOT also had some individual sample variability, probably reflecting proportional differences of tissue contents, individual variability or variations in the estrous stage, neither of which was addressed.

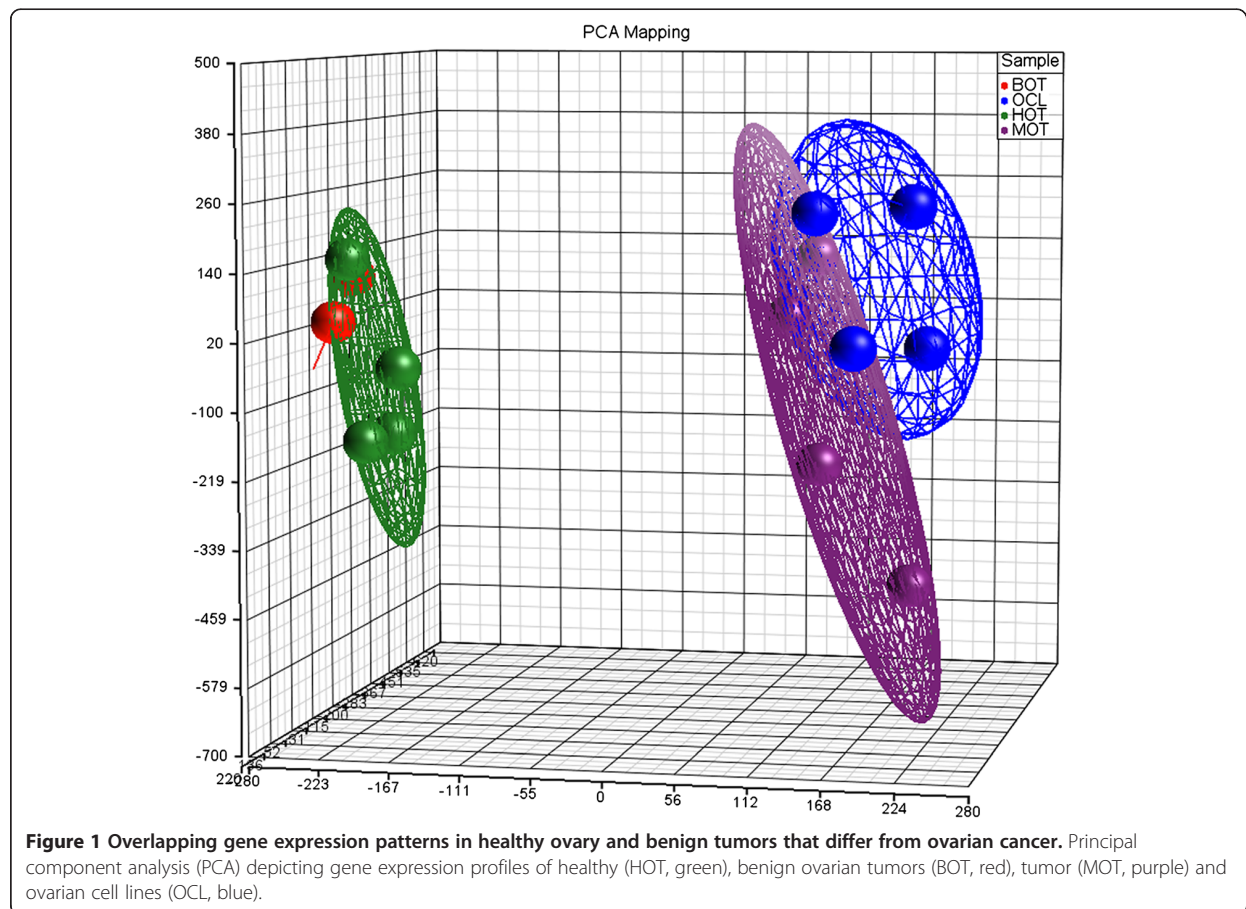
Moreover, hierarchical clustering on the basis of relative gene expression also grouped HOT and BOT together, whereas malignancies (both MOT and OCL) clustered together but distant of HOT and BOT (Figure 2). Nonetheless, careful analysis of individual genes revealed some small intragroup differences that could reflect tumor heterogeneity and that deserves further in depth analysis. Interestingly, predominant OC-associated changes in gene expression were suppression rather than overexpression (Additional file 2).

Up to here, the results show two major ovarian tissue gene expression patterns, one specific of OC (cell lines and tumors) and the other one characteristic of borderline tumors and healthy tissue. The gross differences seen probably reflect the relatedness among the different groups. To further explore this, we compared gene expression by grouping apparently related conditions together, against each of the individual or grouped opposites (Table 1). By these means, the highest differences were MOT + OCL vs. BOT + HOT (n = 1799), followed by MOT + OCL vs. HOT (1498 differences), MOT + OCL vs. BOT (1030 differences), BOT + MOT + OCL vs. HOT (545 differences). Finally, gene expression differences between BOT and HOT were minimal (~28). On the basis of these findings, we chose to further examine the most significant differentially expressed exons.

#### Exon analysis identifies two major ovarian cancer-associated, differentially spliced transcripts of gene ZNF695

Once we had examined the relative OC-associated gene expression profiles, it was important to examine whether





some of the overexpressed genes reflected only quantitative differences or if there were also qualitative differences among them. To achieve this, we performed exon analysis of genes overexpressed in both MOT and OCL. As differential exon usage cannot be easily examined in suppressed genes, we exclusively examined overexpressed genes.

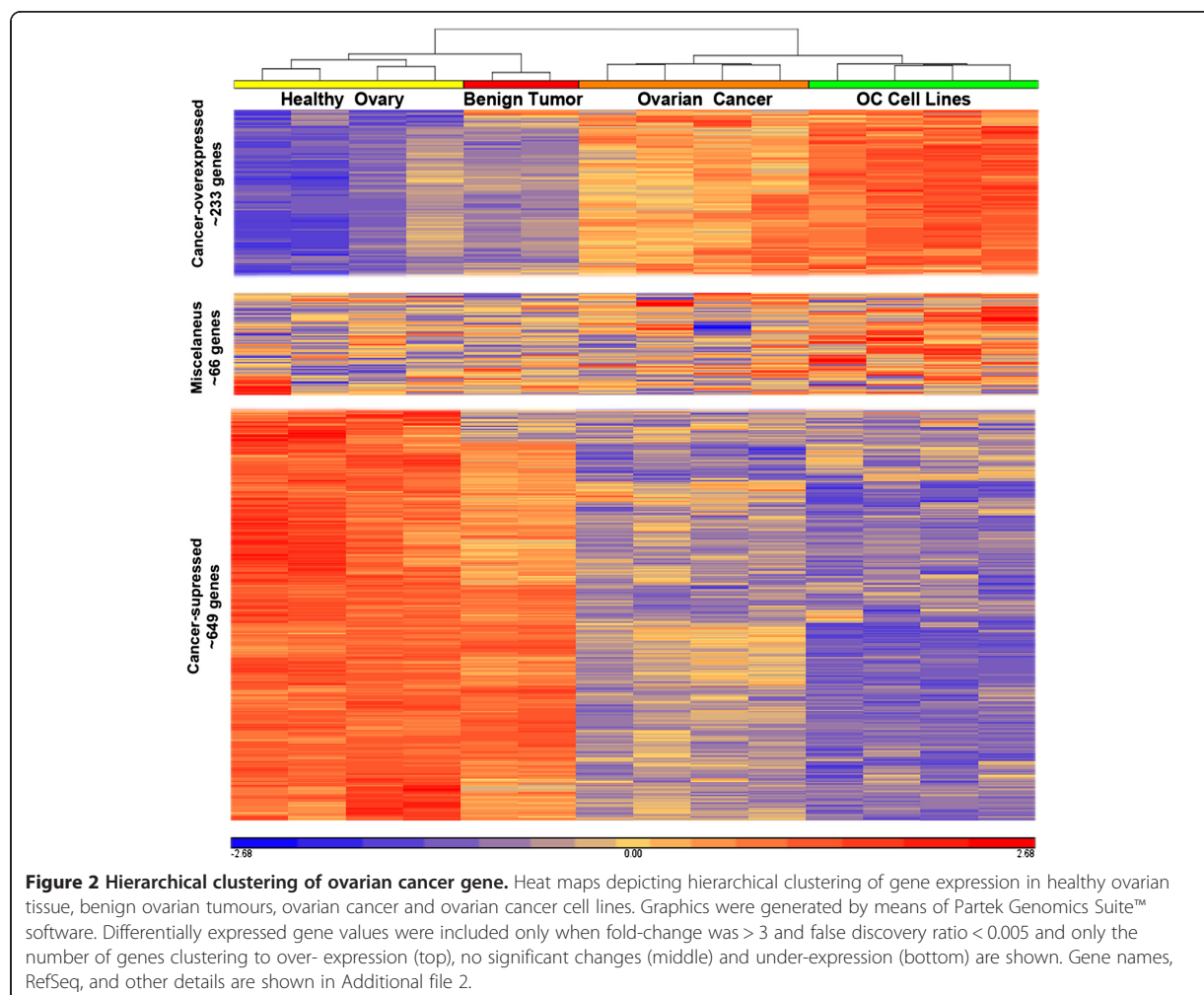
The analysis was performed by means of Alternative Splicing ANOVA and the criteria to select genes for exon analysis were: false discovery ratio (FDR) < 0.05 and fold change > 3, in at least one probe set. According to these criteria, the number of overexpressed alternatively spliced genes in OC was 207 (Additional file 3). To identify OC-predominant splice variants, these genes were subjected to internal analysis by comparing the expression of each individual exon for each study group against the mean total expression of the same gene in each of the groups, and were considered only when they yielded  $\geq 3$  fold change. Moreover, we performed visual inspection of each of the individual exon expression profile graphs (MOT + OCL vs. HOT + BOT or vs. HOT or vs. BOT, all of which yielded the same genes). This procedure identified at least nine genes of potential interest (Table 2), of which, ZNF695 (encoding a zinc-finger protein) had the highest

overexpression ( $\sim 7$  fold, FDR < 0.005) in MOT and OCL, and its mRNA had the highest significant changes in exon expression with significant suppression in one its exons when compared to HOT and BOT (Figure 3). The remaining of this study focuses on the characterization of ZNF695.

#### ZNF695 splice variants in OC

ZNF695 encode a zinc finger protein with as yet unknown functions and its gene contains six exons located in chromosome 1q cytogenetic positions 247,148,625-247,171,358. This gene has six possible transcripts of which two (ZNF695-003, and ZNF695-006) encode complete ORFs yielding a 515 and a 172 amino acid length proteins, respectively; whereas the other four transcripts encode products thought to undergo nonsense-mediated decay, a process that detects nonsense mutations and prevents the expression of truncated transcripts ([http://www.ensembl.org/Human/Search/Results?q=ZNF695;site=ensembl;facet\\_species=Human](http://www.ensembl.org/Human/Search/Results?q=ZNF695;site=ensembl;facet_species=Human)).

To characterize transcripts expressed predominantly in OC, we designed primers to identify and clone splice variants of ZNF695 most likely corresponding to the message lengths preferentially expressed in the four initial OC



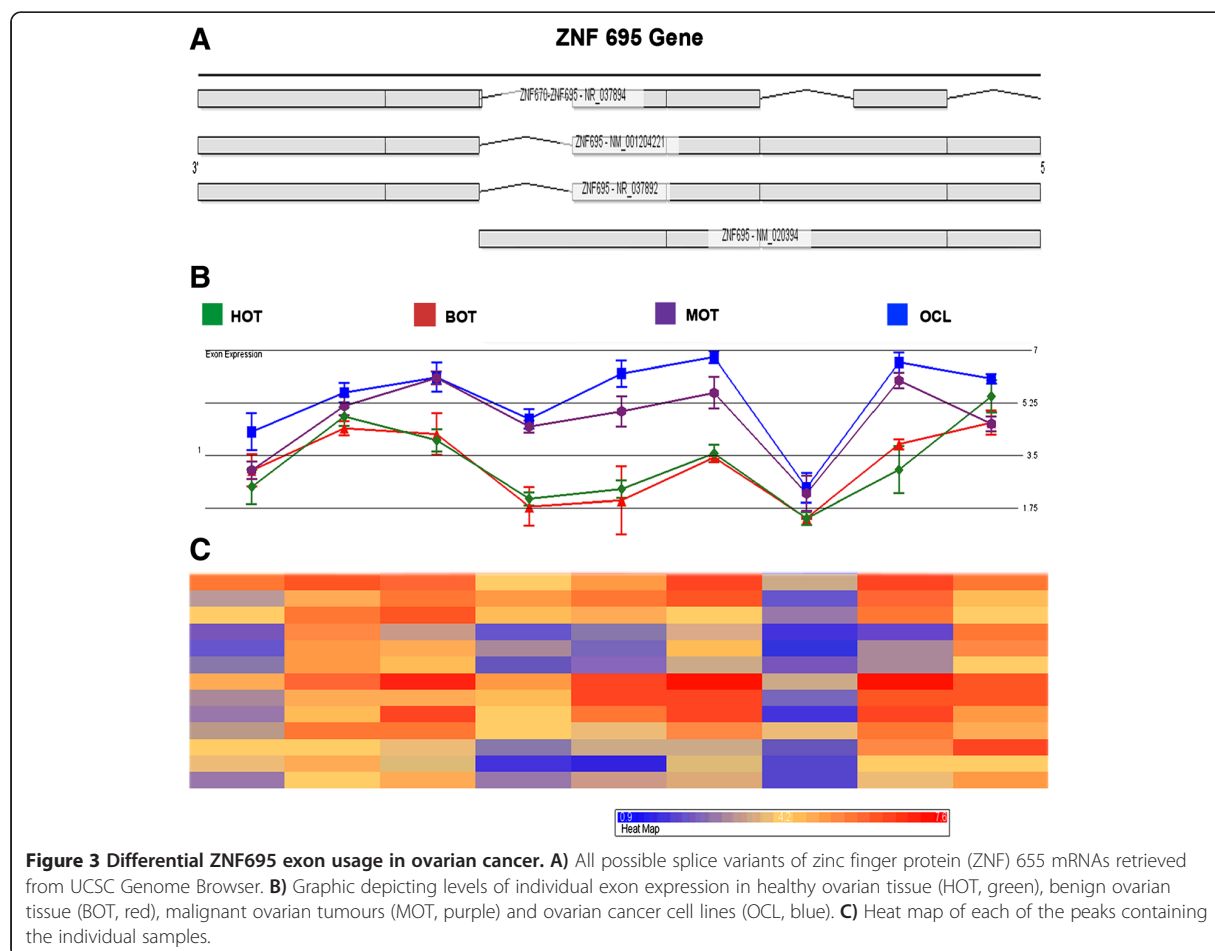
**Table 1 Gene expression differences among groups**

Comparisons	No. differences	Over-expressed	Suppressed
BOT vs. HOT	28	24	4
MOT vs. HOT	1329	476	853
OCL vs. HOT	1664	669	995
MOT vs. BOT	625	135	490
OCL vs. BOT	1369	488	881
OCL vs. MOT	666	385	281
BOT + MOT + OCL vs. HOT	545	146	399
MOT + OCL vs. HOT	1498	508	990
MOT + OCL vs. BOT	1030	262	768
HOT + MOT + OCL vs. BOT	368	28	340
MOT + OCL vs. BOT + HOT	1799	595	1205

**Table 2 Main genes whit potential alternative splicing**

# of markers	Gene symbol	p-value (sample)	Alt-splicing (sample)	Fold-Change(OCL and MOT vs. BOT and HOT)
9	ZNF695	1.28E-05	8.16E-05	4.5411
13	CCNB1	3.11E-06	2.26E-10	4.98751
36	FANCD2	4.87E-05	8.33E-10	6.58464
12	CDKN3	2.51E-04	7.59E-10	5.42259
25	TPX2	1.05E-04	2.04E-16	11.0438
14	E2F8	1.27E-03	1.92E-07	3.20517
14	FOXMI	1.09E-04	2.98E-08	5.86201
18	HMMR	1.71E-03	3.87E-02	6.55569
50	CENPE	1.87E-03	5.00E-05	4.35735



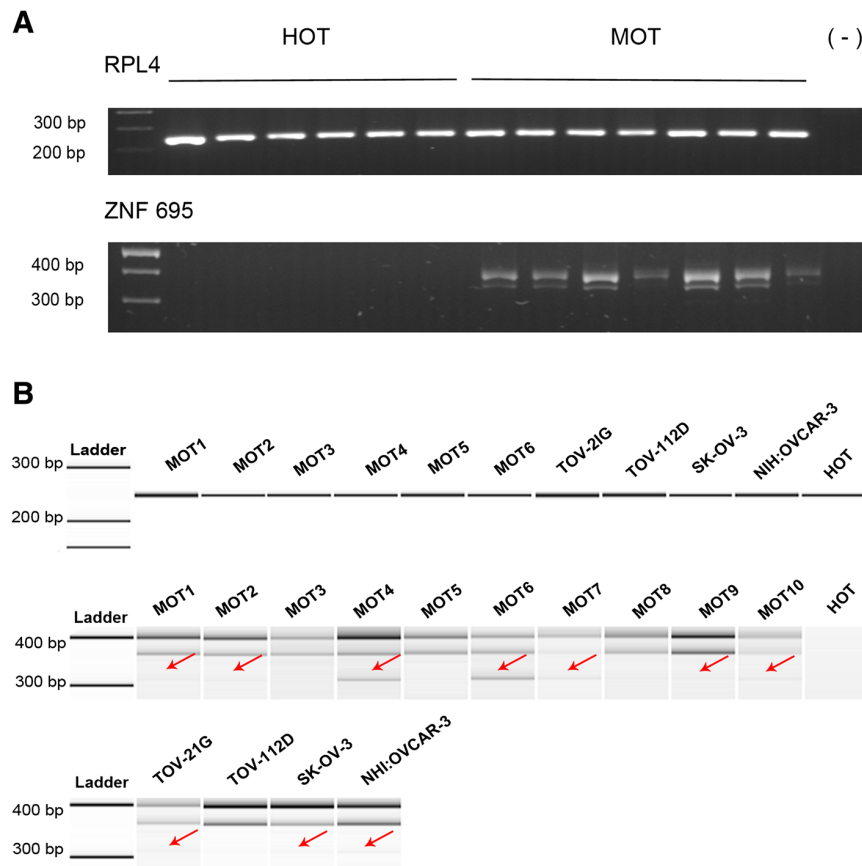


samples. By means of RT-PCR, in a total of 14 OC tissues (10 MOT and four OCL), expression of the three different transcripts was as follows: seven out of 10 tumor samples and three out of four cell lines expressed all three transcripts at variable degree, whereas the remaining samples (three tumors and one cell line) only expressed the two larger transcripts (Figure 4A and B). All three amplicons were gel purified, cloned into pGEM-T Easy Vector (Figure 5A) and confirmed to correspond to the aforementioned ZNF695 RNA transcripts by sequencing (Figure 5B-E). The first one appears to correspond to the full-length product (FLP), as it yields a 400 bp amplicon spanning FLP nucleotides 38 to 433 with full identity to ZNF695-003, ZNF695-006 and no other possible match (Figure 5B-C, Additional file 4). The second transcript spans 360 bp (that we name here ZNF695 transcript 4, see below) fully matching ENSEMBL nonsense-mediated decay transcript ZNF695-002, as well as NCBI peptide BAG54313.1 (Isogai, T. Helix Research Institute, Genomics Laboratory; e-mail: flj-cdna@nifty.com, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/193785160?from=1&to=118>) (Figure 5B, E,

Additional file 5). The third transcript (named here ZNF695 transcript 5) found here aligns with both those transcripts up to nucleotide 361, but our primers cannot identify further on the 5' direction. Although we cannot tell to which of ZNF695 splice variants it corresponds, this transcript contains a sequence partly identical to ZNF695-002 (ZNF695 transcript 4), except that it is missing a 52 bp fragment containing part of the 5' untranslated region and misses the translation initiation signal (Figure 5D, E, Additional file 4). Although there are additional AUG codons as potential alternative translation initiation signals 3' of the canonical AUG, these fail to yield useful ORFs. Therefore, most likely, this transcript represents a long non-coding mRNA. Finally, Figure 5F shows the ZNF695 AS model according to the transcripts found in MOT and OCL.

## Discussion

Understanding the origin of malignancy is one of the greater challenges of modern science. Among malignant tumors, OC represents a major problem because little is

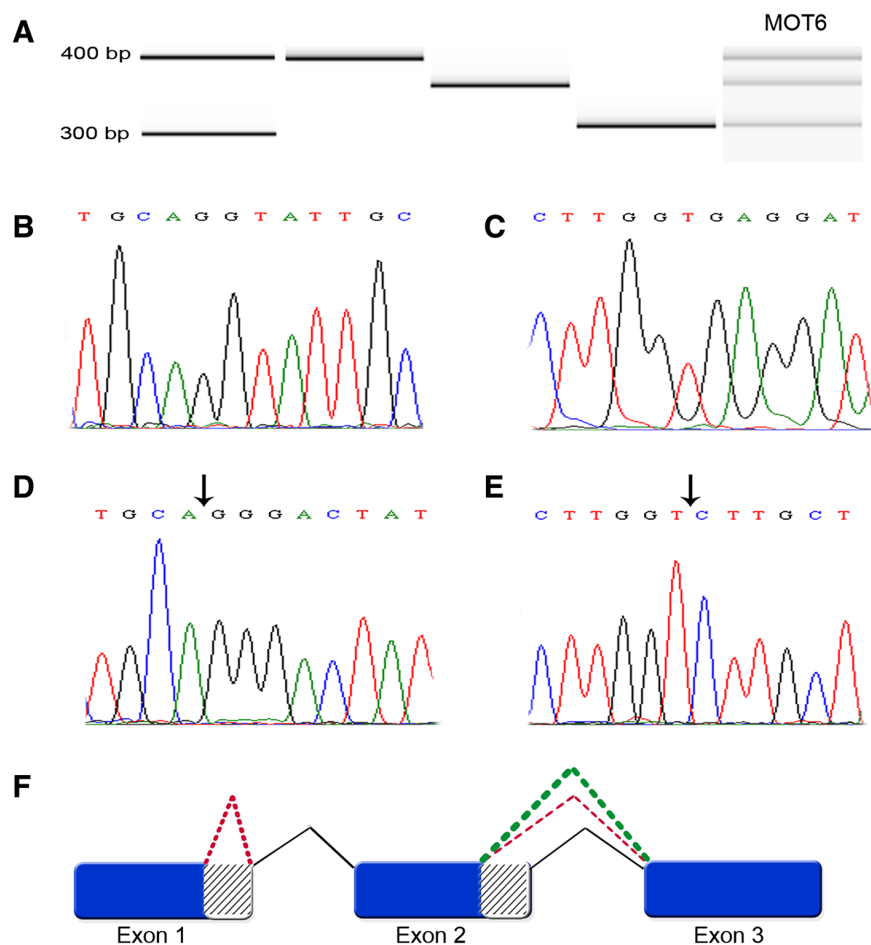


**Figure 4 ZNF695 transcripts of healthy ovarian tissue, individual ovarian cancer samples, and cell lines. A)** Agarose gel showing the raw RT-PCR products obtained from one HOTAIR (n = 6) sample and MOTAIR (n = 7) samples. Above, RPL4 protein (housekeeping), below, ZNF695. **B)** RT-PCR products run on a DNA Chip Agilent bioanalyzer. Top row: housekeeping gene RPL4. Middle and bottom rows: individual transcripts of each of the differentially spliced mRNAs in malignant ovarian cancer tissue (MOTAIR, n = 10) and individual ovarian cancer cell lines (n = 4, shown by their names).

known about its pathogenesis, which is also difficult to identify in early stages as it goes asymptomatic over long periods of time to be detectable only in late stages, almost always beyond any possibility of remission [33,34]. Alternative exon splicing is a biological process of major importance, because gene changes leading to altered splicing can affect normal cell and tissue function [19,20,27,35], including malignant transformation [36]. The current studies were carried out to examine whether OC could be associated to particular exon-splicing state and if so, to identify differentially spliced transcripts present in OC but absent in healthy ovarian tissue. With the exon array data set presented here, we identified nine overexpressed genes with differential exon profiles associated to OC, one such gene, ZNF695, coding for a largely uncharacterized zinc finger protein, is the most representative, with three transcripts differentially expressed by MOTAIR and OCL, one corresponding

to the whole protein, a second ORF corresponding to a shorter peptide and a third, with lower but significant expression that corresponds to a long non-coding mRNA. These results likely provide a useful biomarker of malignant transformation in women suspected to have OC and open the study of the role of these transcripts in cell proliferation and malignant transformation.

Alternative splicing is a major source of protein diversity, bioinformatics-based methods indicate that >90% human genes could be subject to AS [10,12,13] with an estimate of several million different proteins, and some individual proteins having over 1000 variants due only to AS [37]. This process can differ during distinct cellular functional or developmental stages [38,39]. It is, therefore, not surprising that AS has also been found altered during malignant transformation [40], which could be either a general marker of cancer or limited to certain cancer types. Moreover, cancer-associated AS could be the clue to understand the



**Figure 5 Cloning and sequencing of novel ZNF695 transcripts associated to ovarian cancer.** **A)** PCR product of ZNF695 showing the three different RNA transcript sizes of ZNF695 expressed in malignant ovary tissue sample 6 (MOT6, right) and the individual amplicons used for cloning, with the size (in base pairs) shown on the left. Ladder (line 1), ZNF695 splice variants 1 and/or 2 (lane 2, 400 bp), ZNF695 splice variant 4 (lane 3, 360 bp), ZNF695 splice variant 5 (lane 4, 310 bp), and ZNF695 amplicons in MOT6 (lane 5). **B)** Sanger sequence plot of ZNF695 splice variant 1 and 2 at the boundary of exons 1 and 2. **C)** Sanger sequence plot of ZNF695 splice variant 1 and 2 at the boundary of exons 2 and 3. **D)** Sanger sequence plot of ZNF695 splice 5. This transcript has alternative splicing in exon 1–2, with the arrow illustrating the alternative splicing site at the exon 1–2 boundary. **E)** Sanger sequence plot of ZNF695 splice variant 4. This sequence has alternative site splicing in exon 2–3 (arrows), this sequence are contain in ZNF695 variant 5 too. **F)** AS model of ZNF695 gene. Black lines represent primary splicing of exons 1-2-3 of ZNF695 gene containing the full coding sequence that corresponds to the largest amplicon. Green dotted line shows exons 2–3 AS, which corresponds to the intermediate amplicon. Red dotted line shows exon 1 AS together with exons 2–3 AS, which are contained in the smaller amplicon.

basis of malignant transformation, tumor behavior [23,41], and even for the identification of potential therapeutic targets [42].

We found that OC tissue has indeed a signature of alternatively spliced genes. Although we do not know yet whether these changes are indeed related only to OC or they are general markers of cancer. Of the >270 differentially spliced genes found in OC, nine were highly significant, but we decided to focus on the most significantly expressed gene with differential AS, the zinc finger protein ZNF695.

The zinc finger protein family (ZNF) spans over 700 members with many functional roles within the cell,

including regulation of gene expression, which is achieved by different means. For instance, ZNF transcription factors bind to DNA by means of  $C_2H_2$  zinc finger domains, constituting a subfamily of ZNF [43]. Although some ZNF members act only as repressors, others solely as act as activators, most of them can apparently be either repressors or activators depending on the particular status of the cell. Moreover, some ZNF play roles in signal transduction and many other cellular functions. ZNF695, which we found here to be differentially expressed and spliced in OC belongs to the  $C_2H_2$  subfamily of ZNF and also contains Krüppel-associated box (KRAB) domains, which characteristically identify gene repressors [44-46].

Because these genes, including ZNF695 contain two or more functional domains, changes affecting only one domain can have dramatic consequences [45,47]. On one hand, repressors could lose their regulatory function or even turn in the opposite direction and become activators [47]. KRAB domains in ZNF proteins serve to bind co-repressors, which in turn mediate transcription repression [44]. Of the ZNF695 splice variants we found here to be preferentially associated to OC, isoforms 2 and 3 have incomplete KRAB domains that are essential for interactions with co-repressors which suggests that such AS pattern could be related to carcinogenesis. The third variant lacked the initial translation codon; hence, it is unlikely to yield a translational product.

Unfortunately, as yet, almost nothing is known about ZNF695 in humans or in other species, with the closest homologues having up to 64% identity. Therefore, at present it is not possible to predict how ZNF695 could play a role in OC development, if at all. One could envision that because the alternative forms found in OC have incomplete KRAB domains, this potential repressor could function as an activator and turn on cell proliferation and, hence, malignant transformation. The other possibility would be to function as dominant negative variants, but this seems unlikely because normal ovarian tissue does not express ZNF695 in any of its isoforms and OC cells express only the alternative splice variants. Therefore, we consider ZNF695 splice variants 1/2, 4 and 5 as potential oncogenes playing a role in the pathogenesis of OC.

## Additional files

**Additional file 1: Graphic showing the proportions of four microarray quality controls.** The Y-axis depicts the expression level of controls (Log2) and the X-axis contains the 14 samples used for these studies. A) Microarray hybridization controls where the purple line corresponds to the control (CreX), green (BioDn), blue (BioC) red (BioB). B) Microarray labelling controls: pink line (dab), brown (thr), blue (phe), and orange controls (lys).

**Additional file 2: Table of genes expressed in ovarian samples.**

**Additional file 3: Table of significantly over-expressed genes with potential alternative splicing.**

**Additional file 4: Alignment of ZNF695 splice variants.** BLAST analysis of sequences obtained from the clones, alternatively spliced ZNF695 variants found predominantly in malignant ovarian tissue and cell lines. Transcript variant 1/2, the sequence corresponds to the heavier band. ZNF695 Transcript variant 4, the sequence corresponds to the medium sized band, and ZNF695 splice variant 5, this sequence corresponds to the lighter band.

**Additional file 5: Alignment of predicted ZNF695 peptides.** In silico translation of ZNF695 amplicons (ZNF695 transcript variant\_1/2, ZNF695 transcript variant 4, ZNF695 transcript variant 5) revealing sequence identity of unnamed protein product (BAG54313.1) with ZNF695 transcript variants 4 and 5. ZNF695 transcript variant 1/2 is identical to full length ZNF695 (transcript variant 1 or 2).

## Abbreviations

OC: Ovarian cancer; AS: Alternative splicing; HOT: Health ovarian tissue; BOT: Borderline ovarian tumor; MOT: Malignant ovarian tumor; OCL: Ovarian

cell lines; PCA: Principal component analysis; QC: Quality control; FDR: False discovery ratio; FLP: Full-length product; KRAB: Krüppel-associated box.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

SJ-M participated in the study design, carried out experiments, performed statistical analysis and helped to draft the manuscript, W-R and RL-R performed experimental procedures, OAP-G, and MS participated in microarray analysis, VEMO-F, AZ-D participated in sequencing and cloning experiments, ML-O, RB, provided clinical sample material, performed the pathological analysis and tumor classification. JM participated in the design of the study, coordination and helped to draft the manuscript, GV-O conceived the study and participated in its design and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This work was supported in part by a Basic Science grant 61742 from SEP-CONACyT México. Sergio Juárez-Méndez was financially supported by a scholarship provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and IMSS. This work constitutes a partial fulfillment of the graduate program in PhD Biological Science of National Autonomous University of México (UNAM) of Sergio Juárez-Méndez. We finally thank Dr. Carlos Pérez-Plasencia, Faculty of Superior Studies, Ixtacala, UNAM for critical review of the manuscript and Dr. Laura Díaz-Cueto, Research Unit on Reproductive Medicine, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) for kindly providing cell lines.

## Author details

<sup>1</sup>Experimental Oncology Laboratory, Research Department, National Institute of Pediatrics, Mexico, D. F., Mexico. <sup>2</sup>Mexican Faculty of Medicine, Universidad La Salle, Mexico City, Mexico. <sup>3</sup>Genomic Medicine and Environmental Toxicology Department, Biomedical Research Institute, UNAM, Mexico, D. F., Mexico. <sup>4</sup>Unit of Biochemistry, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico. <sup>5</sup>Genomic Oncology Laboratory, Medical Research Unit in Oncologic Diseases, Oncology Hospital, National Medical Center Siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico. <sup>6</sup>Faculty of Medicine, UNAM, General Hospital of México O. D., Mexico, D. F., Mexico. <sup>7</sup>Department of Oncology, General Hospital of México O. D., Mexico, D. F., Mexico. <sup>8</sup>Mammalian Genetics Section, NIDDK, National Institutes of Health, 10/9 N104, 10 Center Drive, Bethesda, MD 20892, USA.

Received: 28 May 2013 Accepted: 24 August 2013

Published: 5 September 2013

## References

1. Bast RC Jr, Hennessy B, Mills GB: **The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**:415–428.
2. Scully RE: **Classification of human ovarian tumors.** *Env Health Perspect* 1987, **73**:15–25.
3. Lancaster JM, Dressman HK, Clarke JP, Sayer RA, Martino MA, Cragun JM, Henriott AH, Gray J, Sutphen R, Elahi A, et al: **Identification of genes associated with ovarian cancer metastasis using microarray expression analysis.** *Int J Gynecol Cancer* 2006, **16**:1733–1745.
4. Maxwell GL, Chandramouli GV, Dainty L, Litzi TJ, Berchuck A, Barrett JC, Risinger JI: **Microarray analysis of endometrial carcinomas and mixed mullerian tumors reveals distinct gene expression profiles associated with different histologic types of uterine cancer.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:4056–4066.
5. Tinker AV, Boussioutas A, Bowtell DD: **The challenges of gene expression microarrays for the study of human cancer.** *Cancer Cell* 2006, **9**:333–339.
6. Zorn KK, Bonome T, Gangi L, Chandramouli GV, Awtrey CS, Gardner GJ, Barrett JC, Boyd J, Birrer MJ: **Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:6422–6430.
7. Keita M, Bachvarova M, Morin C, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, Sebastianelli A, Trinh XB, Bachvarov D: **The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion.** *Cell Cycle* 2013, **12**:972–986.

8. Treeck O, Schuler S, Haring J, Skrzypczak M, Lattrich C, Ortmann O: **icb-1 Gene counteracts growth of ovarian cancer cell lines.** *Cancer Lett* 2013, **335**:441–446.
9. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al: **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001, **409**:860–921.
10. Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C: **Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:2850–2859.
11. Graveley BR: **Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world.** *Trends Genet* 2001, **17**:100–107.
12. Carninci P: **Constructing the landscape of the mammalian transcriptome.** *J Exp Biol* 2007, **210**:1497–1506.
13. Schmucker D, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, Dixon JE, Zipursky SL: **Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity.** *Cell* 2000, **101**:671–684.
14. Venables JP: **Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer.** *Bioessays* 2006, **28**:378–386.
15. Hayes GM, Carrigan PE, Miller LJ: **Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas.** *Cancer Res* 2007, **67**:2072–2080.
16. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW: **Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications.** *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**:2189–2199.
17. Chen LL, Sabripour M, Wu EF, Prieto VG, Fuller GN, Frazier ML: **A mutation-created novel intra-exonic pre-mRNA splice site causes constitutive activation of KIT in human gastrointestinal stromal tumors.** *Oncogene* 2005, **24**:4271–4280.
18. Wang XQ, Luk JM, Leung PP, Wong BW, Stanbridge EJ, Fan ST: **Alternative mRNA splicing of liver intestine-cadherin in hepatocellular carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:483–489.
19. Narla G, Difeo A, Reeves HL, Schaid DJ, Hirshfeld J, Hod E, Katz A, Isaacs WB, Hebringer S, Komiya A, et al: **A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk.** *Cancer Res* 2005, **65**:1213–1222.
20. Thorsen K, Sorensen KD, Brems-Eskildsen AS, Modin C, Gaustadnes M, Hein AM, Kruoffer M, Laurberg S, Borre M, Wang K, et al: **Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis.** *Mol Cell Proteomics* 2008, **7**:1214–1224.
21. Adamia S, Reiman T, Crainin M, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM: **Intronic splicing of hyaluronan synthase 1 (HAS1): a biologically relevant indicator of poor outcome in multiple myeloma.** *Blood* 2005, **105**:4836–4844.
22. Mazoyer S, Puget N, Perrin-Vidoz L, Lynch HT, Serova-Sinilnikova OM, Lenoir GM: **A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping.** *Am J Hum Genet* 1998, **62**:713–715.
23. Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, Sondek J, Der CJ: **Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation.** *Oncogene* 2004, **23**:9369–9380.
24. Zhou YQ, He C, Chen YQ, Wang D, Wang MH: **Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas: generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential.** *Oncogene* 2003, **22**:186–197.
25. Bauer TW, Fan F, Liu W, Johnson M, Parikh NU, Parry GC, Callahan J, Mazar AP, Gallick GE, Ellis LM: **Insulinlike growth factor-I-mediated migration and invasion of human colon carcinoma cells requires activation of c-Met and urokinase plasminogen activator receptor.** *Ann Surg* 2005, **241**:748–756. discussion 756–748.
26. Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W: **Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin.** *Curr Opin Genet Dev* 2006, **16**:51–59.
27. Cheng C, Sharp PA: **Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:362–370.
28. Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP: **Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression.** *Int J Cancer* 1999, **81**:845–850.
29. Hofstetter G, Berger A, Fiegl H, Slade N, Zoric A, Holzer B, Schuster E, Mobus VJ, Reimer D, Daxenbichler G, et al: **Alternative splicing of p53 and p73: the novel p53 splice variant p53delta is an independent prognostic marker in ovarian cancer.** *Oncogene* 2010, **29**:1997–2004.
30. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF: **Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH: OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors.** *Cancer Res* 1983, **43**:5379–5389.
31. Fogh J, Wright WC, Loveless JD: **Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.** *J Natl Cancer Inst* 1977, **58**:209–214.
32. Provencher DM, Lounis H, Champoux L, Tetrault M, Manderson EN, Wang JC, Eydoux P, Savoie R, Tonin PN, Mes-Masson AM: **Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines.** *In vitro Cell Dev Biol Anim* 2000, **36**:357–361.
33. Hoskins WJ: **Prospective on ovarian cancer: why prevent?** *J Cell Biochem Suppl* 1995, **23**:189–199.
34. Nguyen HN, Averette HE, Hoskins W, Sevin BU, Penalver M, Steren A: **National survey of ovarian carcinoma. VI. Critical assessment of current International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system.** *Cancer* 1993, **72**:3007–3011.
35. Venables JP, Klinck R, Koh C, Gervais-Bird J, Bramard A, Inkel L, Durand M, Couture S, Froehlich U, Lapointe E, et al: **Cancer-associated regulation of alternative splicing.** *Nat Struct Mol Biol* 2009, **16**:670–676.
36. Zardi L, Carnemolla B, Siri A, Petersen TE, Paoletta G, Sebastio G, Baralle FE: **Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon.** *EMBO J* 1987, **6**:2337–2342.
37. Missler M, Sudhof TC: **Neurexins: three genes and 1001 products.** *Trends Genet* 1998, **14**:20–26.
38. Joseph R, Dou D, Tsang W: **Neuronatin mRNA: alternatively spliced forms of a novel brain-specific mammalian developmental gene.** *Brain Res* 1995, **690**:92–98.
39. Chen CD, Kobayashi R, Helfman DM: **Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene.** *Genes Dev* 1999, **13**:593–606.
40. Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M, Edmond V, Coll JL, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B: **The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo.** *Oncogene* 2010, **29**:5392–5403.
41. Guo M, Liu W, Serra S, Asa SL, Ezzat S: **FGFR2 isoforms support epithelial-stromal interactions in thyroid cancer progression.** *Cancer Res* 2012, **72**:2017–2027.
42. Dery KJ, Gusti V, Gaur S, Shively JE, Yen Y, Gaur RK: **Alternative splicing as a therapeutic target for human diseases.** *Methods Mol Biol* 2009, **555**:127–144.
43. Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV: **Structural classification of zinc fingers: survey and summary.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:532–550.
44. Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, Rauscher FJ 3rd: **KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain.** *Genes Dev* 1996, **10**:2067–2078.
45. Vissing H, Meyer WK, Aagaard L, Tommerup N, Thiesen HJ: **Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins.** *FEBS Lett* 1995, **369**:153–157.
46. Pengue G, Calabro V, Bartoli PC, Pagliuca A, Lania L: **Repression of transcriptional activity at a distance by the evolutionarily conserved KRAB domain present in a subfamily of zinc finger proteins.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:2908–2914.
47. Agata Y, Matsuda E, Shimizu A: **Two novel Kruppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through functional interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1 beta/KRIP-1).** *J Biol Chem* 1999, **274**:16412–16422.

doi:10.1186/1757-2215-6-61  
Cite this article as: Juárez-Méndez et al.: Splice variants of zinc finger protein 695 mRNA associated to ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research* 2013 **6**:61.