

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estandarización de la amplificación de los genes HOX

6.1.1. Obtención de líneas celulares y tejido de placenta

Las líneas celulares empleadas para la estandarización fueron la línea celular de adenocarcinoma ductal infiltrante con receptor de estrógeno positivo (MCF-7) y la línea celular de carcinoma de cérvix de células escamosas infectadas con el virus de papiloma humano tipo 16 (SiHa). La línea celular MCF-7 fue amplificada amablemente por la Q.B.P. Ana Dulce Hernández Herrera y el Q.B.P. Santiago Saavedra Alonso, de la Unidad de Biología Molecular del Cáncer y Unidad de Virología y cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas a cargo del Dr. Pablo Zapata Benavides y de la Dra. Laura Trejo Ávila respectivamente. La línea celular SiHa fue donada por el Dr. Augusto Rojas, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL. Ésta línea fue propagada, en la Unidad de Virología y Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología, por la Q.B.P. Fernanda Thompson.

Para la colecta de la pastilla celular, las células se colocaron en tubos para centrífuga de 50 mL, se centrifugaron a 2,000 rpm por un tiempo de 5 min, se vertió el medio de cultivo y se colocó 10 mL de Buffer PBS 1X, se agitó suavemente, y se centrifugó a 2,000 rpm por 5 min. Se repitió este paso de lavado con buffer PBS, se retiró el sobrenadante, y la pastilla celular se congeló a -70°C (modificado de Sambrook & Russell, 2001).

El tejido de placenta utilizado para la estandarización de las condiciones de amplificación de los genes *HOX* fue colectado y almacenado en RNA*later*® (Ambion, Austin, Texas, E.E.U.U.) por el Dr. José Isaías Badillo Almaráz del Hospital General de Zacatecas. El tejido preservado en RNA*later*® (Ambion, Austin, Texas, E.E.U.U.) se congeló a -20°C hasta su uso.

6.1.2. Aislamiento de los RNA's totales a partir de líneas celulares y tejido de placenta

La extracción de los RNA's totales se realizó con material libre de RNAasas, como tubos para microcentrífuga certificados, agua DEPC, soluciones disueltas en agua DEPC, recipientes de vidrio, morteros y material quirúrgico horneados a 300°C por 3h, micropipetas reservadas para ese uso y cámaras de electroforesis tratadas con RNAasa Zap (Invitrogen, Carlsbald California, E.E.U.U.). Se usaron guantes para evitar la contaminación con las RNAasas y se trató el área de trabajo con agua DEPC y RNAasa Zap. El agua DEPC se preparó añadiendo 1mL de DEPC 6.9M (dietilpirocarbonato,



Sigma, St. Louis Missouri, E.E.U.U.) en 1 L de agua procesada en filtros MilliQ, se homogenizó por agitación, se incubó a 37°C por un mínimo de 12 h, y se esterilizó por autoclave durante 15 min para hidrolizar el DEPC.

La extracción de los RNA's totales se realizó utilizando el método de "Aislamiento de ARN con Trizol" descrito por Simms y cols. (1993), en donde mediante pipeteo se homogeneizaron los cultivos celulares con Trizol (1 mL trizol/5 a 10 x 10⁶ células; Invitrogen) en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Por el contrario, en el caso del tejido de placenta se obtuvo 50 mg, mediante la disección de éste con tijera quirúrgica o bisturí, y se homogenizó con el uso de un mortero. Posteriormente, se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL donde se continuó homogenizando mediante pipeteo. Y posteriormente se incubó la solución homogenizada durante cinco min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se añadió a la solución 0.2 mL de cloroformo a cada tubo por mililitro de Trizol utilizado para la homogenización, se mezcló en vortex vigorosamente durante 15 seg la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente 6 min y se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 15 min. Una vez terminada la centrifugación se retiró el tubo gentilmente observando 2 fases, la fase orgánica de color rojo (inferior) es fenol:cloroformo, una interfase y la fase acuosa incolora (superior) donde se encuentran los RNA's totales.

Para la precipitación de los RNA's, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 0.5 mL de isopropanol por cada mililitro de Trizol utilizado en la homogenización inicial. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugaron a 13 200 rpm por 8 min a 4°C y se procedió al lavado de la pastilla de los RNAs, donde se removió el sobrenandante y se mezcló en vortex con 1 mL de etanol 75% por cada mililitro de Trizol empleado en la homogenización inicial. Se centrifugó a 13 200 rpm. Una vez obtenida la pastilla de RNA's, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de los RNA's a temperatura ambiente de 20 a 25 min, sin permitir que se secara totalmente. Por último, se resuspendió la pastilla en 20 μL de agua DEPC.

La visualización de los RNA's se realizó en geles de agarosa al 0.8% colocados en una cámara de electroforesis horizontal sumergidos en buffer SB 1X. Las muestras de los RNA's fueron mezcladas con 2 μL de jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y fueron depositadas en los carriles del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V por 40 min, posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a concentración de 5μg/mL durante 10 min. La fotodocumentación de los geles con los RNA's se realizó utilizando un transiluminador de luz UV. Se determinó la calidad de los RNA's, así como su integridad con la presencia de las dos bandas prominentes de los RNA's ribosomales de aproximadamente 5 y 2 kb (28S y 18S, respectivamente).



6.1.3. Cuantificación del RNA obtenido

Para cuantificar la concentración y evaluar la pureza del RNA extraído, se diluyeron los RNA's totales 1:200 en agua libre de RNAasas, en 600 μL de volumen final, Posteriormente se realizó la lectura de las absorbancias a las longitudes de onda 260 y 280nm en el espectrofotómetro SmartSpecTM plus de Biorad, para calcular la concentración de RNA total se aplicó la fórmula 1:

[RNA mg/ml]=(A260 x 0.040 mg/ml x B)

Fórmula 1

Donde:

A260 = El valor de la absorbancia a la longitud de onda de 260 nm.

B = Factor de dilución.

La pureza de los RNA's en relación a la presencia de proteínas se obtuvo con el cociente de las absorbancias a las longitudes de 260 y 280nm (A260/A280).

6.1.4. Síntesis de los DNAc's a partir de los RNA's totales

Posterior a la extracción de los RNA's, se llevó a acabo la síntesis de los DNAc's mediante la técnica de "transcripción reversa" (RT) descrita por Gerard *et al.* en 1986. Se realizaron la mismas condiciones utilizadas en la extracción de RNA's para evitar la contaminación por RNAasas, se tomaron hasta 10 μL del RNA (5μg totales), 1 μL de dNTPs 20 mM, 0.5 μL de Oligo (dT)₂₃ anclado (0.5 μg/μL; Sigma) y se llevó a un volumen final de 12 μL con agua libre de nucleasas. Se incubó a 65°C por 5 min y se colocó en hielo. A continuación, se agregaron 4 μL de buffer de reacción 5X para la enzima transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina (M-MLV, Invitrogen), 2 μL de DTT 0.1 M, 1 μL de agua libre de nucleasas, se mezcló suavemente y se incubó 2 min a 37°C, finalmente se añadió 1 μL de la enzima M-MLV (200 U/μL; Invitrogen) y se homogenizó por pipeteo. Posteriormente, se incubó a 37°C por 50 min y para finalizar se inactivó la reacción calentando a 70°C por 15 min.

6.1.5. Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación mediante PCR

Para diseñar los oligonucleótidos específicos que amplifican regiones de los genes β -actina (producto de 276pb), HOXA7, A9, A10, A11 y B7 se utilizaron las



secuencias nucleotídicas del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y programa primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000), disponible (http://frodo.wi.mit.edu/). El diseño de los iniciadores se realizó de tal forma que incluyera por lo menos un intrón, para poder identificar las amplificaciones debidas a la presencia de DNA genómico. Posteriormente, se realizaron las amplificaciones virtuales con el programa "AmplifX 1.37", para corroborar el peso molecular de los productos amplificados y la presencia de interacciones entre los oligonucleótidos (primers dimers), finalmente se realizó una búsqueda en el programa (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para descartar aquellos oligonucleótidos que amplificaran DNAc's no deseados. Por el contrario, para la amplificación de HOXB13 y β-actina (producto de 414pb) se utilizaron los oligonucleótidos previamente descritos por Cantile et al. en el 2003.

A cada oligonucleótido se le determinó la temperatura de fusión (Tm), y la temperatura de alineamiento (TA) usando las fórmulas descritas por Sambrook & Russell (2001) y Rychlik & Rhoads (1989) respectivamente. En la Tabla III se resumen las características de los oligonucléotidos utilizados para la amplificación de los genes empleados en esta tesis.

6.1.6. Amplificación de los Genes HOX y β-actina mediante RT-PCR

La amplificación de los genes *HOX* en los ADNc's obtenidos de las líneas celulares y el tejido de placenta se llevó a cabo mediante la metodología modificada de Sambrook & Russell (2001). Todas las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes finales de 25 μL, con 1 μL de una dilución 1 a 10 de ADNc, 0.2 mM de dNTPs, buffer (a una concentración de 20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), diferentes concentraciones de MgCl₂ (de 1.0 a 2.5 mM) y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), en tubos de microcentrífuga de 0.6 mL. La reacción de PCR se llevó acabo en el termociclador Mastercycler gradient, de Eppendorf.

Para estandarizar la reacción de amplificación, se utilizaron gradientes de temperatura a partir de las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos empleados buscando la banda de amplificación más intensa. En el caso donde no se obtuvo una amplificación adecuada, se realizó un gradiente de cloruro de magnesio.

Una vez amplificado el gen HOX deseado, se continuó con la estandarización de la reacción de PCR dúplex con los oligonucleótidos para β -actina en la misma reacción, usando las condiciones normalizadas para el gen HOX empleado. En los casos en los que no se obtuvo amplificación, se llevó a cabo un gradiente de cloruro de magnesio o de temperatura. En la Tabla IV se señalan las condiciones estandarizadas para la amplificación de los genes HOX y β -actina mediante PCR dúplex, cabe destacar que la amplificación de todos los PCR dúplex se obtuvieron a la temperatura de alineamiento de 62° C, por lo que la única variable fue la concentración de cloruro de magnesio usada. Así mismo, en la Tabla V se especifican los pasos de la reacción de PCR llevados a cabo en el termociclador así como la temperatura, el tiempo y los ciclos en cada uno de ellos.



	Oligonucleótad	os para <i>B-actina</i> 276	GeneBank	
Nombre	βас ина 2765	βасила2763		
Secuencia	5° COT GAT GOT GGG CAT GGG 3	5' ACG TAC ATG GCT GGG GTG TT 3'	NEM_001101.2	
Ta (*C)	71 33	70 30		
TA (*C)	62	61 7		
	Oligonneleót	idos para HOXA7		
Nombre	HOXA75'1x	HOXA73°ıx		
Sесиенска	5' TGC GCC TCC TAC GAC CAA A 3'	5' TCT TCT TCA TCA TCG TCC TCC T 3'	NM_0068963	
Tm (°C)	69 71	69 45		
TA (*C)	62 1	62		
	Oligonucleótados par	a HOXA9 transcrito 1 y 2		
Nombre	HOXA95'	HOXA93		
Secuencia	5' CGT GCA GCT TCC AGT CCA A 3'	5" GTC GAG CCA CCT CGT ACC T 3"	_	
Tm (°C)	69 7]	71 87	AF010258 1	
TA (*C)	62.4 y 62	63 ly 62 7	<u> </u>	
	Oligonneleótidos pa	ara HOXA10 transcrito 1		
Nombre	HOXA10Tlax5	HOXA10Tlax3'	AF040714 1	
Secuencia	5' GCA AAG CCT CGC CGG AGA A 3'	5' GGA CGC TGC GGC TAA TCT CTA 3'		
Tw (*C)	71 87	72 79		
TA (°C)	61 4	61 7		
	Oligonucleótidos pa	ara HOXA10 transcrito 2		
Nombre	HOXA10T25'New	HOXA103'New		
Sec вевсы	5' GCA TGA TTC TTG GCC TTT GTT C 3'	5' CAG TIT CAT CCT GCG GTT CT 3'	AF040714.1	
Tm (°C)	66 93	66.93		
TA (°C)	61.2	61.2		
	Oligonucleón	tidos para HOX11		
Nombre	HOXAllıx5'	HOXA11x3'		
Secuencia	5' GTC TTC CGG CCA CAC TGA G 3'	5' GAC GAT CAG TGA GGT TGA GCA T 3'	NR/ 005522 5	
Tm (°C)	71 87	71 32	NM_005523 5	
TA (°C)	61 2	61		
	Oligonacleói	tidos para HOXB7		
Nombre	HOXB751	HOXB73°	NM_004502 3	
Secuencia	5' TAT GGG CTC GAG CCG AGT T 3'	5' GGC CTC GTT TGC GGT CAG T 3'		
Tm (°C)	69 71	6971		
TA (°C)	60 7	60 7		
	Oligonucleót	idos para HOXB13		
Nombre	HOXB135'	HOXB133		
Secuencia	5' CTG GAA CAG CCA GAT GTG TT 3'	5' TTG GCG AGA ACC TTC TTC TC 3	NM_006361.5	
Tm (*C)	68 25	68 25	NWT0000013	
TA (°C)	61 2	61 2		
	Oligonueleótid	los para β-actina433		
Nombre	B-act 433 5'	B-act 433 3'	_	
Secuencia	5'CGT GAT GGT GGG CAT GGG 3'	5'ACG TAC ATG GCT GGG GTG TT 3'	NM_001101.2	



Gen	Concentración de MgCl ₂ (mM	
HOXA7	1.5	
HOXA9 transcrito 1 y 2	1.5	
HOXA10 transcrito 1	1.5	
HOXA10 transcrito 2	2.0	
HOXA11	2.0	
HOXB7	1.5	
HOXB13	2.5	

6.1.7. Visualización de los Productos Amplificados en Geles de Agarosa

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1.2 y 2.0% situados en una cámara horizontal sumergidos en buffer SB 1X (0.01M de NaOH, 0.04M $\rm H_3BO_4$). Se mezclaron 10 $\rm \mu L$ de los productos amplificados con 2 $\rm \mu l$ de jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y se colocaron en los carriles del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 150V por 35min, posteriormente los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a una concentración de $\rm 5\mu g/mL$ durante 10min. La fotodocumentación de los geles con los productos amplificados se realizó utilizando un transiluminador de luz UV. En los casos en que la banda de amplificación fue muy tenue, se confirmó su presencia mediante el ajuste de los niveles de color en la fotografía del gel, utilizando el programa Adobe Photoshop 7.0.1.

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94	5 min
Desnaturalización		94	1 min
Alineamiento	35	Gradiente o TA	45 seg
Extensión	Ī	72	1 min
Extensión final	1	72	10 min



6.2. Amplificación de los Genes HOX en Tejidos Ováricos

6.2.1. Colecta de Muestras de Tejido Ovárico

Las muestras de tejido ovárico se obtuvieron del Departamento de Anatomía Patológica y en el Laboratorio Forense del Hospital General de Zacatecas por el Dr. José Isaías Badillo. Así como en el Depto. de Patología del Hospital Christus Muguerza por la Dra. Lucía Jara y la Dra. Gabriela Quiroga bajo la dirección del Dr. Raúl Garza. Las muestras se colectaron en la solución RNA*later*® almacenadas a 4°C por un tiempo variable (2 días a 2 semanas) y posteriormente se almacenaron a -20°C. Cuatro de las muestras se preservaron en trizol y el resto se conservó en RNA*later*®.

6.2.2. Extracción de los RNA's Totales a partir de Tejido Ovárico y Síntesis de los DNAc's

La metodología utilizada para la extracción de los RNA's totales de los tejidos ováricos fue similar a la realizada para la obtención de los RNA's totales de tejido de placenta. Las muestras almacenadas a -20°C se descongelaron, y se tomaron del tubo contenedor con pinzas (previamente horneadas por 3 h a 300°C), se cortó una cantidad variable de tejido (20-70 mg), se pesó, y se procedió a homogeneizar en mortero con la solución de trizol. A continuación, se continuó con la metodología descrita en los puntos 6.1.2 y 6.1.3. La reacción de transcripción reversa se realizó mediante el mismo método que se expuso en la sección 6.1.4.

6.2.3. Amplificación de los Genes HOX en Tejido Ovárico

La amplificación de los genes *HOX* los DNAc's del tejido ovárico se llevó a cabo como se describe en el punto 6.1.6. En cada reacción se incluyó un ensayo sin DNAc como testigo negativo y otro ensayo con el DNAc de las líneas celulares o el tejido de placenta, como control positivo de la reacción de PCR.

6.3. Cuantificación relativa mediante PCR tiempo real de la expresión de *HOXB13* en Tejidos Ováricos

En la Figura 14 se muestra que los sistemas de cuantificación por PCR tiempo real se caracterizan por detectar la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de una reacción y no por medir la cantidad de un producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos, como ocurre en el PCR punto final. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de copias inicial del producto amplificado se detectará un incremento en la fluorescencia, como consecuencia del acumulo de productos de PCR. De esta forma es posible realizar la cuantificación del DNA o RNA de una forma más exacta y reproducible (Heid *et al.*, 1996).



Los ensayos que se realizan mediante PCR tiempo real se dividen en dos grandes grupos: sistemas no específicos y sistemas específicos, los primeros detectan la presencia o ausencia de productos amplificados, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados (por ejemplo: SYBR® Green), es decir, que se pueden producir falsos positivos en el caso de la amplificación de productos de PCR inespecíficos o dímeros de oligonucleótidos (Wittwer et al., 1997).

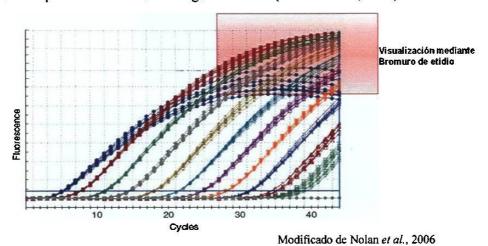
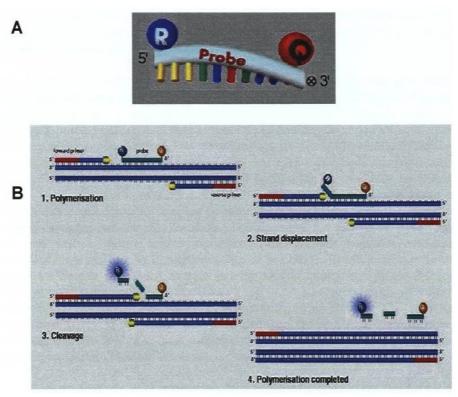


Figura 14. Cuantificación de la expresión génica mediante las técnicas de PCR tiempo real. Se cuantificó la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de la reacción en contraste con la reacción de PCR punto final que sólo podemos estimar la cantidad de un producto de PCR generado después de un número determinado de ciclos (recuadro rojo).

Por otro lado, los sistemas específicos emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (Tagman®, "molecular beacons" y "scorpions") que hibridan específicamente en la secuencia blanco (Livak et al., 1995). La Figura 15 muestra que la sonda Tagman® es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR (Lee et al., 1993). El fluorocromo situado en el extremo 5' se denomina reportero y el del extremo 3' recibe el nombre de inhibidor. Cuando la sonda, que se incluye en la reacción de PCR conjuntamente con los cebadores está integra, la proximidad del reportero y del inhibidor provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente) que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda (Cardillo et al., 1988). En el curso de la PCR, la sonda se une a su secuencia blanco cuando esta se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq DNA polimerasa, permite eliminar nucleótidos específicamente desde el extremo 5' de una cadena de ácido nucleico (Holland et al., 1991), provocando la liberación del reportero del extremo 5' de la sonda, que al separarse del inhibidor comienza a emitir fluorescencia. La acumulación de los productos de PCR se cuantifica monitorizando el aumento de fluorescencia por la liberación del fluorocromo reportero. El proceso de hibridación y corte no interfiere con la acumulación exponencial del producto amplificado. A medida que aumenta el número de copias del producto,



aumenta el número de moléculas de sonda que hibridan en su secuencia blanco y cada reportero se separa de su respectiva sonda, por lo que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad del amplicón generado. Como la sonda sólo se corta si hibrida en la secuencia blanco, la fluorescencia generada procede exclusivamente de la amplificación específica de los productos de PCR.



Modificado de http://cgr.otago.ac.nz/slides/TAQMAN.

Figura 15. Características de las Sondas Taqman®. A) La sonda Taqman® es un oligonucleótido que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR. Esta sonda contiene dos fluorocromos, uno situado en el extremo 5′ que se llama reportero (R) y el del extremo 3′ recibe el nombre de inhibidor (Q). B) Durante el curso de la PCR, la sonda se une a su secuencia blanco, y cuando se lleva a cabo la extensión de la cadena, la actividad 5′ exonucleasa de la enzima Taq DNA polimerasa, provoca la liberación del reportero del extremo 5′ de la sonda, que al separarse del inhibidor comienza a emitir fluorescencia.

Los fluorocromos comúnmente utilizados para PCR tiempo real son: 6-FAMTM (6-carboxy-fluorescein), VICTM (2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein), TETTM (6-carboxi-tetrachloro-fluoresceina), JOETM (2,7-dimethoxi-4,5-dicloro,6-carboxi-fluoresceina) y HEXTM (hexacloro-6-carboxi-fluoresceina). En el extremo 3', se utiliza TAMRATM (6-carboxi-tetrametil-rhodamina) como inhibidor. Como referencia interna de las reacciones se emplea ROXTM (6-carboxy-X-rhodamine) que sirvió para



normalizar las reacciones, evitando fluctuaciones en la fluorescencia de las reacciones réplicas por errores en el pipeteo o evaporación de las muestras. La señal generada por la referencia interna no depende de la cantidad de producto de PCR generado.

Además las sondas Taqman® MGB presentan dos características innovadoras: 1) incorporan una molécula llamada MGB (del acrónimo en inglés, minor groove binder) que se une al surco menor del DNA, lo cual incrementa la estabilidad y especificidad de la hibridación de la sonda (Afonina *et al.*, 1997; Kutyavin *et al.*, 1997), y 2) emplean un inhibidor no fluorescente.

El MGB es una molécula pequeña, con forma de media luna, que encaja en el surco menor del DNA de doble cadena. En las sondas Tagman®-MGB, el grupo MGB va unido al extremo 3', junto al inhibidor. Cuando la sonda hibrida, la molécula MGB estabiliza la unión pegándose al surco menor de la doble cadena de DNA generada entre la sonda y la secuencia blanco. Esta característica ha permitido el diseño de sondas de menor tamaño, con una longitud comprendida entre 13 y 20 pb, la mitad que una sonda estándar. Por otra parte, las sondas Tagman® MGB usan un inhibidor no fluorescente, también conocido como inhibidor oscuro. Este inhibidor no fluorescente es una molécula que actúa como un aceptor de transferencia energética de un inhibidor, pero que no emite señal fluorescente detectable por sí misma. La ventaja es que se emite una señal con menor fondo fluorescente procedente de la reacción, mejorando la discriminación y facilitando la interpretación de los datos. El inhibidor no fluorescente proporciona buenos resultados cuando se emplea con cualquiera de los fluorocromos reporteros más comunes (FAMTM, VICTM, TETTM). Las principales ventajas de las sondas MGB cuando se emplean en PCR cuantitativo en tiempo real, se deben a su mayor especificidad de hibridación y a su pequeño tamaño. Esto permite una mayor discriminación, que facilita el diseño de ensayos y la reducción del tamaño del amplicón, lo que mejora la fiabilidad del ensayo.

Cada reacción de PCR tiempo real se preparó adicionando los DNAc's a partir de 250 ng de RNA total de las muestras llevándolo a un volumen total de 10 μL, el cual contiene 5 μL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems California, E.E.U.U.), 0.5 μL de la mezcla de oligonucleótidos y sonda Taqman 200nM (Applied Biosystems, Foster city, California, E.E.U.U.) y 4.5 μL de H₂0 libre de RNAasas. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de microcentrífuga de 200 μL, los cuales fueron colocados en el termociclador DNA Engine cycler con la unidad de detección de fluorescencia para tiempo real Chromo4 (Biorad, Hercules, California, E.E.U.U.), bajo las condiciones especificadas en la tabla VI. El calentamiento inicial durante 10 minutos a 95°C se debe a la utilización del sistema de inicio en caliente (hot start) con el fin de reducir la formación de productos no específicos. La enzima AmpliTaq Gold® DNA polimerasa es una de las más empleadas en los ensayos de PCR tiempo real y está diseñada para permanecer inactiva hasta que se calienta a 95°C durante 10 minutos, por lo que no es necesario conservarla en hielo.

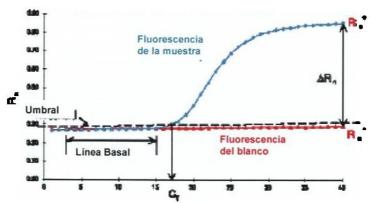


Tabla VI. Pasos de la reacción de PCR tiempo real realizados en el termociclador			
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	
1 ciclo	95	10 main	
40 -:	95	15 seg	
40 ciclos	60	1 min	

La reacción de PCR consta habitualmente de 3 etapas: desnaturalización de la doble cadena de DNA, unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas de DNA y extensión del producto amplificado mediante la incorporación de los nucleótidos presentes en la solución, en contraste con la técnica de PCR cuantitativo que emplea dos etapas, debido al pequeño tamaño de los fragmentos generados, no es necesario añadir una tercera etapa a 72°C para extender la cadena de amplificación de DNA, ya que el tiempo invertido en pasar entre las fases de unión de los cebadores a 60°C y de desnaturalización a 95°C es suficiente para copiar la secuencia blanco.

La Figura 16 muestra los datos obtenidos en el detector de fluorescencia Cromo4 y que fueron graficados usando el programa Opticon MonitorTM 3.1 (Biorad, Hercules, California, E.E.U.U.), En los ciclos iniciales de la PCR, donde existen muy pocos cambios en la señal de fluorescencia y esta zona define la línea basal del gráfico de amplificación. El umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar producto de PCR acumulado. Esta línea debe situarse por encima de la línea basal y dentro de la zona en la que se produce la fase exponencial de la reacción. El parámetro C_T (ciclo umbral o threshold cycle) se define como la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral. El valor del C_T se obtiene cuando la reacción está en la fase exponencial y ningún componente de la reacción está limitado, por lo que los valores de C_T obtenidos son muy reproducibles en reacciones con el mismo número de copias iniciales. Por el contrario, la cantidad de producto de PCR acumulado al final de la reacción es muy sensible a pequeñas variaciones en los componentes de la reacción. El programa Opticon MonitorTM analiza los datos calculando la contribución de cada componente fluorescente al experimento. En los ciclos iniciales de la PCR, apenas hay cambios en la señal de fluorescencia (ΔRn). Esta zona define la línea basal del gráfico de amplificación. La línea umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar producto de PCR acumulado. Esta línea debe situarse por encima de la línea basal y dentro de la zona en la que se produce la fase exponencial de la reacción (que es lineal en la transformación logarítmica del gráfico), y en donde la eficiencia de la reacción de PCR debe ser de 90 a 110%.





Modificado de http://dna-9.int-med.uiowa.edu/realtime.htm

Figura 16. Representación de los datos que se obtienen en el programa Opticon Monitor® en PCR tiempo real. La línea basal del gráfico de amplificación se refiere a los ciclos iniciales de la PCR en los que hay muy pocos cambios en la señal de fluorescencia. El umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar el producto de PCR acumulado. El parámetro C_T (ciclo umbral o *threshold cycle*) es definido como la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral. El R_n es el nivel de fluorescencia, las abreviaturas Rn+ y Rn- se refieren al nivel de fluorescencia de la muestra y del blanco respectivamente.

6.3.1. Estandarización de la expresión del gen β -actina y HOXB13 en la línea celular SiHa.

Se realizó una curva estándar para determinar la concentración de los DNAc's óptima en la reacción de amplificación. Los DNAc's extraidos de la línea celular SiHa (sección 6.1.4), fueron obtenidos por duplicado a partir de: 250, 125, 75 y 37.5ng/μL de RNA's totales. Las condiciones de amplificación son las mismas que las indicadas en la sección anterior, los oligonucleótidos y la sonda Taqman® utilizados fueron diseñados y sintetizados por Applied Biosystems, la sonda Taqman® tiene MGB y está marcada con los fluoróforos reporteros VICTM y FAMTM (β-actina y HOXB13 respectivamente) y el inhibidor sin fluorescencia. La línea de tendencia de la gráfica muestra la escala logarítmica de las concentraciones de RNA y de los valores de C_T en el umbral 0.03, cuya pendiente refleja la eficiencia de la reacción de PCR. La eficiencia de la reacción de amplificación se obtiene usando las siguientes fórmulas:



La eficiencia obtenida debe de encontrarse en un rango de 90-110% para poder realizar una cuantificación relativa.



6.3.2. Validación del método comparativo para cuantificación relativa (ΔΔCT)

El método comparativo ΔΔC_T descrito por Applied Biosystems asume que la eficiencia de amplificación es igual y optima, es decir del 100%, para los genes de referencia (β-actina) y blanco (HOXB13), en muchos casos no se puede obtener, además de que se requiere la optimización de la reacción, el uso de reactivos y tiempo. Por lo que Pfaffl en el año 2001 propone una fórmula alterna en donde incluye las eficiencias de amplificación para los genes de referencia y blanco, posteriormente MultiD Analyses AB ® en su programa Genes Light Ver 4.3.2 sugiere normalizar los valores de C_T obtenidos con la eficiencia de las reacciones de PCR de los genes blanco y de referencia, mediante la formula 4:

$$C_{TE} = 100\% = C_{TE} \frac{\log(1+E)}{\log(2)}$$

Fórmula 4

Posteriormente se obtiene el ΔC_T para cada uno de las concentraciones de RNA obtenidas en las secciones 6.3.1 y 6.3.2 con la fórmula 5:

$$\Delta C_T = C_T referencia - C_T blanco$$

Fórmula 5

La pendiente de la línea de tendencia que se obtiene graficando el ΔC_T contra la concentración de RNA, debe de ser menor a 0.1 para validar que el ΔC_T no varía con respecto a la concentración de DNAc.

6.3.4 Cuantificación relativa de la expresión del gen *HOXB13* en tejidos ováricos normales, con patología benigna y maligna

Se realizó la amplificación mediante PCR tiempo real de los DNAc's (obtenidos de 250 ng/mL de RNA totales) obtenidos de las muestras de tejidos ováricos, con la metodología ya mencionada en la sección 6.2.2, tanto de β -actina (gen referencia) como de HOXB13 (gen blanco). Los C_T 's obtenidos fueron normalizados por la eficiencia de la reacción de PCR tanto en el gen referencia como en el blanco (Fórmulas 4 y 5). y se obtuvieron los ΔC_T para cada muestra. Posteriormente, se realizaron los cálculos matemáticos para la obtención de la cuantificación relativa de HOXB13 (Fórmulas 6 y 7).





6.4. Tipo de Estudio y Análisis Estadístico

El tipo de estudio que fue llevado acabo es transversal, descriptivo y observacional. La expresión mediante PCR punto final de los genes HOX A7, A9, A10, A11, B7 y B13, el tipo de tejido analizado (normal, patología benigna y maligna), y la expresión relativa del gen HOXB13 mediante PCR tiempo real fueron las variables analizadas (Tabla VII).

Los datos se sometieron a pruebas de estadística descriptiva y exploratoria, y los datos cuantitativos se presentan en el texto como las medias \pm desviación estándar y en las Figuras como las medias \pm desviación estándar ó límites de confianza. Se comprobaron los requisitos de normalidad mediante el estadístico D con la prueba de Kolmogorov-Smirnov tanto para distribución normal y normal logarítmica. Para probar la igualdad de las medias se utilizó un análisis de varianza, y en aquellos casos en donde la hipótesis nula fue rechazada se aplicó la prueba de contrastes HSD (diferencia honesta significativa) de Tukey para probar cuáles medias fueron diferentes. En los casos en los que solamente se compararon dos medias se realizó la prueba de t-student. Para la comparación de las variables ordinales dicotómicas se realizó la prueba exacta de Fisher. Se mantuvo el nivel global de α de todas las comparaciones en 0.05. El análisis estadístico se llevó a cabo en el paquete JMP® (SAS Institute Inc., Cary, Calorina del Norte, E.E.U.U.).

Vanable	Tipo	Medicion	Escala	Operacionalización
Expresión por punto final de los genes				
HOXA7				
HOXA9 transcrato 1	Cualitativo	La presencia o ausencia de una banda correspondiente a la expresion del gen	Ordinal dicotomica	1)Encendido 2)Apagado
HOXA9 transcrito 2				
HOXA10 transcrito 1				
HOXA10 transcrito 2				
HOXAII				
НОХВ7				
НОХВ13				
Cuantificacion de la expresson relativa de HOXB13	Cuantitativo	Expresson de HOXB13 relativa a una muestra normal de ovario	Discreta	Valores en escala normal y en escala logaritmica
Tipo de tejido para estudios con PCR tiempo real	Cualitativo	Evaluación microscópica del tejido ovarico	Ordinal	1)Tepdo normal 2)Tepdo con patologia benigna 3)Tepdo con patologii maligna
Tipo de tejido para estudios con PCR punto final	Cualitativo	Evaluación microscopica del tendo ovarico	Ordinal decotomica	1)Tepdo con histopatologia maligna 2)Tejido sm histopatologia maligna