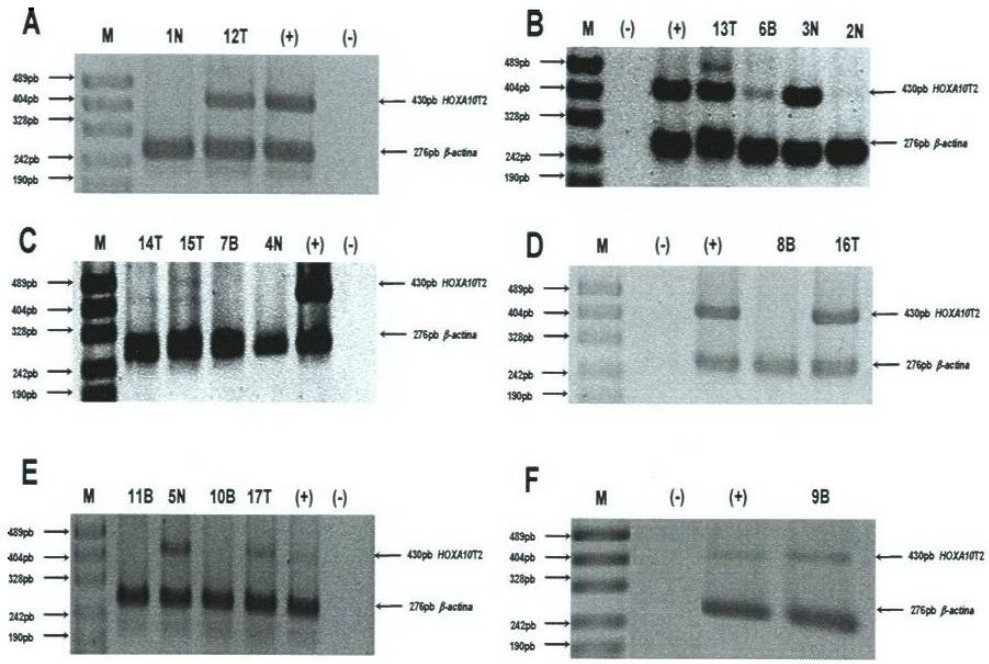

Figura 32. Amplificación de *HOXA10* transcrito 2 en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestran la amplificación de *HOXA10* transcrito 2 en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones de estandarización. La expresión de *HOXA10* transcrito 2 con la banda de amplificación de 430pb se observa en las muestras de tejido ovárico normales 2N, 3N y 5N, con patología benigna 6B y 9B y con patología maligna del 12T al 17T. Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen *β-actina*. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

7.2.2.5. Expresión de *HOXA11* en tejidos ováricos

La amplificación de *HOXA11* en tejido ovárico realizada de acuerdo a las condiciones estandarizadas se observa en la Figura 33, la cual muestra la expresión de *HOXA11* con la banda de amplificación de 179pb en tres muestras normales, en dos tejidos con patología benigna y en todas las muestras de tejido ovárico con patología maligna. Es decir que la diferencia de expresión entre los tejidos ováricos es estadísticamente significativa (p=0.0427), presentando una tendencia en la expresión de este gen en los tejidos ováricos con patología maligna.

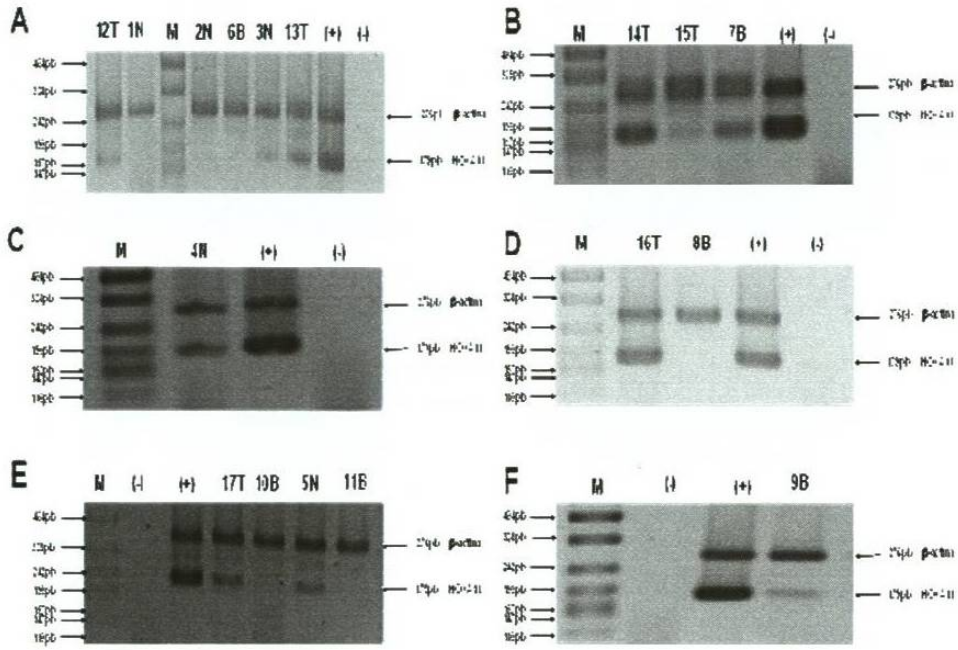

Figura 33. Amplificación de *HOXA11* en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestran la amplificación de *HOXA11* en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones de estandarización. La expresión de *HOXA11* con la banda de amplificación de 179pb se observa en las muestras de tejido ovárico normales 3N, 4N y 5N, con patología benigna 7B y 9B y en todas las muestras con patología maligna (12T al 17T). Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen *β-actina*. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

7.2.2.6. Detección de transcritos de *HOXB7* en ovario

La Figura 34 muestra la expresión de *HOXB7* con la banda de amplificación de 190pb en todas las muestras normales (1N al 5N), en cinco muestras de tejido con patología benigna y en todas las muestras de tejido ovárico con patología maligna. No se observa una diferencia en la expresión de este gen en los tejidos ováricos normales y patológicos.

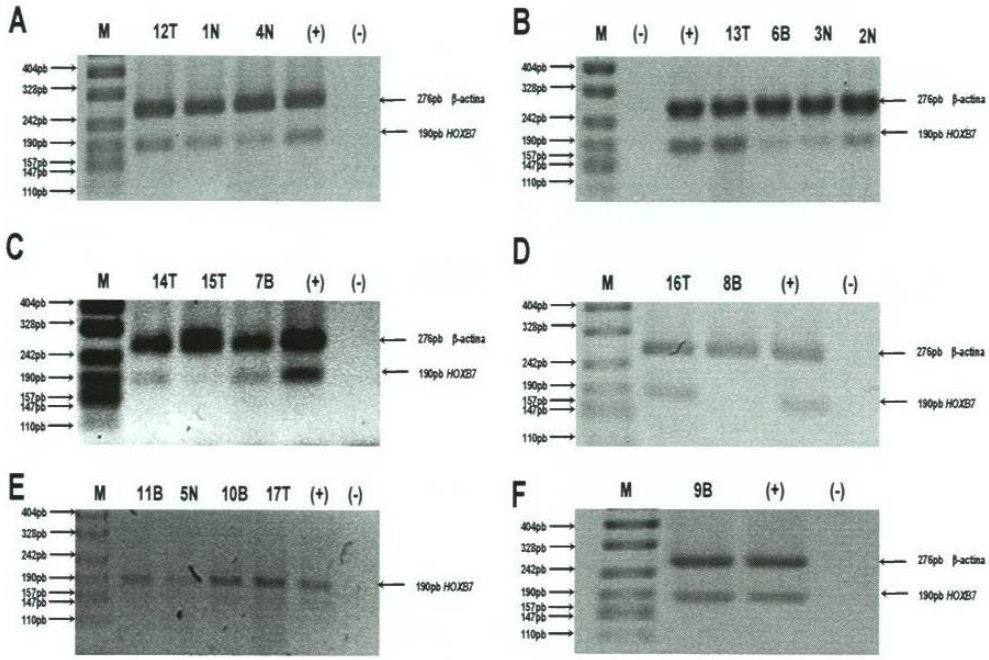

Figura 34. Amplificación de *HOXB7* en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestran la amplificación de *HOXB7* en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones de estandarización. La expresión de *HOXB7* con la banda de amplificación de 190pb se observa en todas las muestras de tejido ovárico normales (1N al 5N), con patología benigna 6B, 7B, 9B, 10B y 11B y en todas las muestras con patología maligna (12T al 17T). Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen *β-actina*. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

7.2.2.7. Amplificación de *HOXB13* en tejidos ováricos con patología maligna

Los geles de agarosa al 2.0% en la Figura 35 muestran la amplificación de *HOXB13* en tejido ovárico y en la línea celular SiHa utilizada como control positivo. La expresión de *HOXB13* con la banda de amplificación de 300pb no se detectó en ninguna de las muestras normales (1N al 5N), pero se expresa en una muestra de tejido con patología benigna y en todas las muestras de tejido ovárico con patología maligna (12T al 17T). Estos resultados muestran una clara tendencia de la expresión del gen *HOXB13* en los tejidos con patología maligna (p=0.0006).

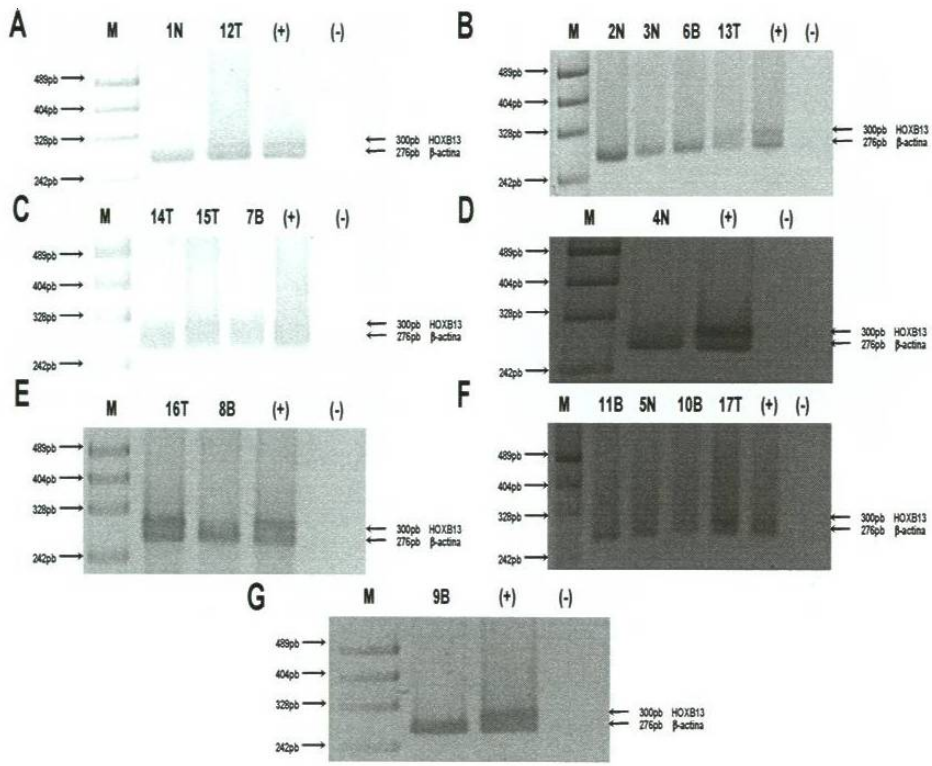

Figura 35. Amplificación de *HOXB13* en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 2.0% muestran la amplificación de *HOXB13* en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones de estandarización. La expresión de *HOXB13* con la banda de amplificación de 300pb no se observa en ninguna de las muestras de tejido ovárico normales (1N al 5N). pero se observa en la muestra de tejido con patología benigna 7B y en todas las muestras con patología maligna (12T al 17T). Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen *β-actina.* El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

En resumen la expresión de los genes *HOXA7, 9, 10, 11, B7* y *B13* en los tejidos ováricos normales, con y sin patología maligna analizados en esta tesis (Figura 36) muestra que los genes *HOXA10* transcrito 2, *A11* y *B13* presentan una diferencia significativa en la expresión de los tejidos no malignos en comparación con los malignos. La expresión preferencial de los genes *HOXA10* transcrito 2 y *HOXA11* en los tejidos ováricos malignos fue estadísticamente significativa (p=0.0427). De estos tres genes, la diferencia significativa más evidente la podemos observar en el gen *HOXB13* (p=0.0006), por lo que se decidió realizar la cuantificación relativa de *HOXB13* mediante PCR tiempo real para determinar de una forma más precisa los resultados obtenidos.

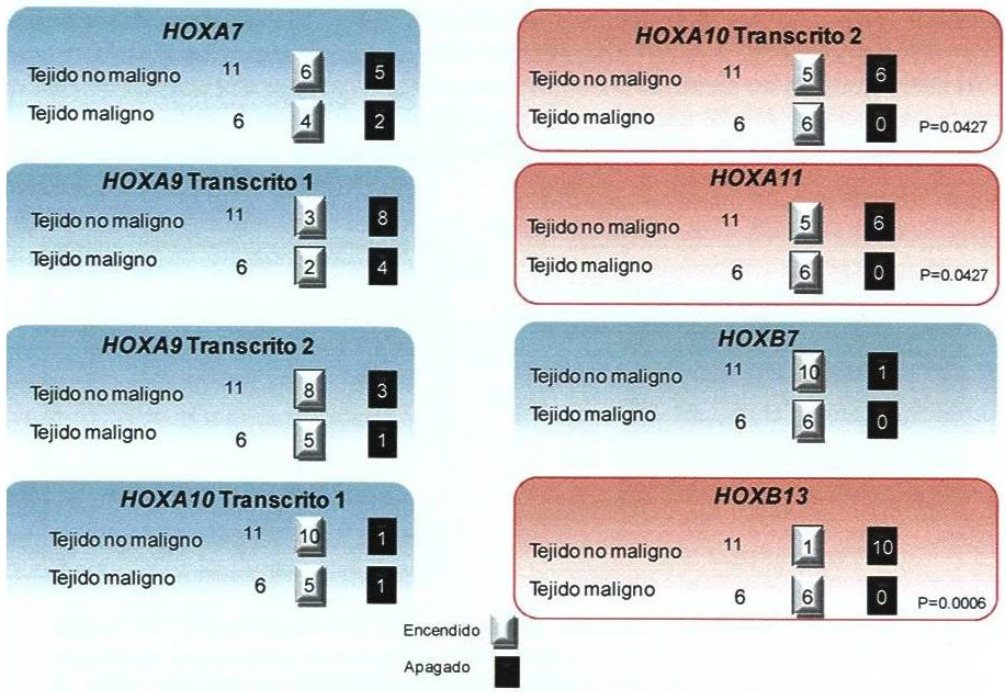

Figura 36. Expresión diferencial de los genes *HOXA7, 9, 10, 11, B7 y B13* en tejidos ováricos. En la tabla se muestra un resumen de la expresión de los genes *HOX* analizados en el tejido ovárico no maligno (muestras normales y con patología benigna) y maligno (muestras con patología maligna). Se encontró una expresión diferencial significativa en la expresión de *HOXA10* transcrito 2, *A11* y *B13* entre los tejidos ováricos no malignos y malignos analizados (cuadro rojo).

7.3. Cuantificación de la expresión de *HOXB13* mediante PCR tiempo real

Para cuantificar la expresión de *HOXB13* en las muestras de tejido ovárico, se realizó la estandarización de la reacción de PCR tiempo real del gen *HOXB13* y de *β-actina* con los DNAc's previamente obtenidos de la línea celular SiHa.

7.3.1. Estandarización de la expresión del gen *β-actina* en células SiHa

Para la estandarización de la cuantificación de la expresión de *β-actina* mediante PCR tiempo real se realizó una curva estándar que permite determinar la eficiencia de la reacción de amplificación con los oligonucleótidos limitados de *β-actina* marcados con sondas Taqman® y con el fluoróforo VIC (Applied Biosystems). La Figura 37A muestra la amplificación de *β-actina* en los DNAc's de las células SiHa mediante la acumulación de fluorescencia por los productos amplificados de una región del transcrito de *β-actina*. En la Figura 37B se muestra la eficiencia de la reacción de PCR con las condiciones usadas en la pendiente de una regresión lineal de los C_T obtenidos y del logaritmo en base 10 de las concentraciones de RNA's totales a partir de los cuales se sintetizaron los

DNAc´s contenidos en la reacción de PCR. La pendiente obtenida es de -3,488 y mediante la fórmula $E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$ se obtuvo la eficiencia (E)=1.935. Esta eficiencia fue considerada adecuada ya que la recomendada para llevar a cabo adecuadamente el análisis de los datos de expresión génica relativa puede variar en un rango del 90-110% (Nolan *et al.*, 2006). Debido a que la eficiencia obtenida del 93.5% con los iniciadores para *β-actina* usados en la reacción de PCR, no fue necesario la optimización de la reacción.

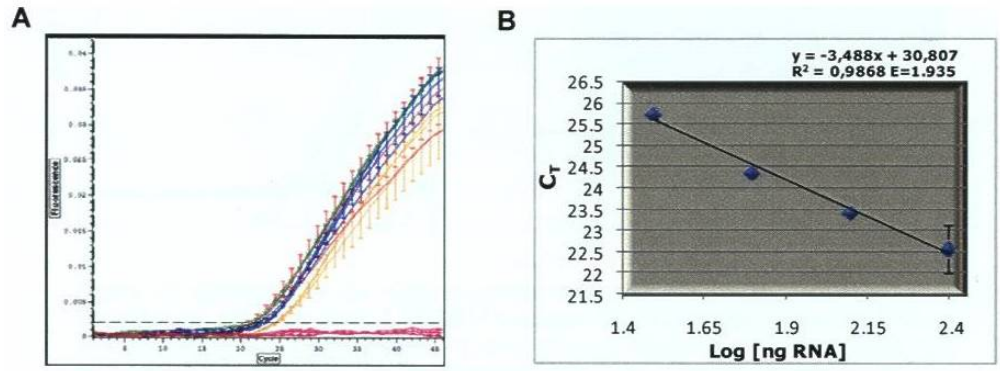

Figura 37. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan® para cuantificar la expresión para el gen constitutivo *β-actina* en los DNAc's de las células SiHa. Se realizó una curva de calibración utilizando diluciones seriadas por duplicado de los DNAc's de la línea celular SiHa con los oligonucleótidos para el gen β-actina usando en el termociclador Chromo 4™. A) Curvas de amplificación del gen *β-actina* obtenidas en el programa Opticon MonitorTM a partir de las concentraciones de 250, 125, 75, 37.5 y 0 ng (control negativo) de los RNA´s totales obtenidos de la línea celular SiHa. B) Curva estándar donde se grafica el C_T contra el logaritmo de la concentración de RNA's en cada dilución (se muestra el promedio y la desviación estándar de cada duplicado). La ecuación de la línea de regresión, el valor de R^2 y la eficiencia (E) se indican en la parte superior de la gráfica. La eficiencia (E=1.935) fue calculada a partir de la fórmula $E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$ y la eficiencia en por ciento 1-Ex100 es igual a 93.5%.

7.3.2. Amplificación del gen *HOXB13* en células SiHa

La estandarización de *HOXB13* se llevo a cabo con una curva estándar para determinar la eficiencia de la reacción de PCR con los oligonucleótidos de *HOXB13* marcados con sondas Taqman® y con el fluoróforo FAM. La Figura 38A muestra las curvas de amplificación del gen *HOXB13* en los DNAc's de las células SiHa obtenidas en el termociclador Cromo 4™ y graficadas por el programa Opticon Monitor™. La curva estándar se realizó con diluciones seriadas de 1/2 de los DNAc's y para evaluar la eficiencia de la reacción de PCR en éstas condiciones se obtuvo la pendiente en la línea de tendencia de una regresión lineal de los C_T obtenidos en cada reacción de PCR y del logaritmo en base 10 de las concentraciones de RNA total a partir de las cuales fue sintetizado el DNAc contenido en la reacción como se observa en la Figura 38B. La pendiente obtenida mostró una eficiencia del 92%, que se encuentra dentro del rango especificado para realizar la cuantificación de la expresión génica sin la necesidad de optimizar ninguno de los componentes de la reacción de PCR.

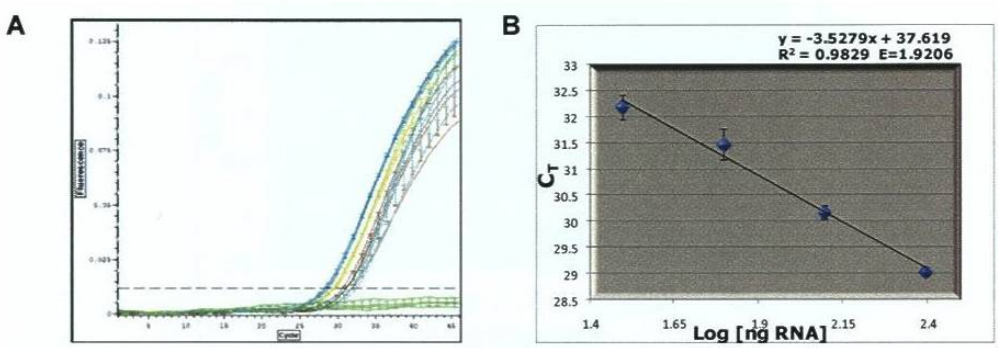

Figura 38. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan® para cuantificar la expresión para el *HOXB13* mediante RT-PCR tiempo real en los DNAc's de las células SiHa. La curva estándar se llevó acabo con diluciones seriadas de los DNAc's de la línea celular SiHa con los oligonucleótidos para la amplificación del gen *HOXB13* en el termociclador Chromo 4™. A) Las curvas de amplificación del gen *HOXB13* se obtuvieron usando el programa Opticon Monitor™ a partir de las concentraciones de 250, 125, 75, 37.5 y 0 ng (control negativo) de los RNA's totales de la línea celular SiHa a partir del cual se sintetizaron los el DNAc's. B) La gráfica muestra el C_T contra el logaritmo de la concentración de los RNA's en cada dilución (promedio y desviación estándar de cada duplicado). La ecuación de la línea de regresión, el valor de R^2 y la eficiencia (E) se muestran en la parte superior de la gráfica. La eficiencia (E=1.9206) fue calculada a partir de la fórmula $E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$ y la eficiencia en por ciento 1-Ex100 es igual a 92%.

7.3.3. Cuantificación relativa de *HOXB13* en SiHa

Los valores de los C_T obtenidos en cada una de las curvas estándar fueron corregidos de acuerdo a la fórmula 4 (ver Materiales y Métodos), para realizar la normalización de acuerdo a la eficiencia de amplificación para cada gen. Posteriormente, se obtuvo el $\Delta\Delta C_T$, restando los C_T's de la amplificación del gen *β-actina* a los valores de C_T obtenidos de la amplificación del gen *HOXB13*. La Figura 39 muestra los resultados de los $\Delta\Delta C_T$ con la concentración de los RNA's totales en ng a partir de los cuales se sintetizaron los DNAc's utilizados en la reacción de PCR. La pendiente obtenida ($6E^{-05}$) corresponde al valor de la sugerida para la validación de éste método (menor o igual a 0.1), que indica que la diferencia en la expresión entre el gen de referencia (*β-actina*) y el gen problema (*HOXB13*) no presenta variaciones significativas en diferentes concentraciones de los DNAc's.

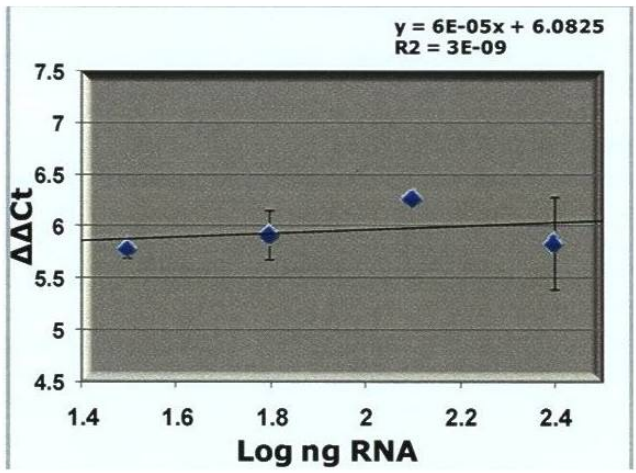

Figura 39. Validación del método $\Delta\Delta C_T$ para la cuantificación relativa de expresión génica de *HOXB13* mediante PCR tiempo real. A los C_T obtenidos para la curvas estándar del gen *HOXB13* se les restaron los C_T obtenidos para el gen *β-actina* (previamente normalizados por la eficiencia de la reacción de PCR para cada gen) obteniendo así el ΔC_T para cada una de las concentraciones de los RNA's totales a partir de la cual se realizó la RT-PCR. La grafica muestra el $\Delta\Delta C_T$ contra el logaritmo de la concentración de RNA en cada dilución (promedio y desviación estándar de cada duplicado) y se indica en la parte superior de la gráfica la ecuación de la línea de regresión y el valor de R^2.

7.4. Cuantificación relativa de la expresión de *HOXB13* en los tejidos ováricos

La cuantificación de la expresión de PCR tiempo real del gen *HOXB13* y el gen *β-actina* se realizó mediante los DNAc's de los tejidos ováricos previamente obtenidos para la amplificación de los genes *HOX* mediante PCR punto final.

La cuantificación relativa del gen *HOXB13* se realizó mediante la amplificación de PCR tiempo real de los genes *HOXB13* y *β-actina* en los tejidos ováricos normales (n=5), con patología benigna (n=6), y con patología maligna (n=6). Una vez obtenidos los valores de C_T para cada reacción se llevó a cabo la normalización de éstos valores y se aplicó la fórmula del método $\Delta\Delta C_T$ previamente validado para estas condiciones utilizando como valor calibrador el $\Delta\Delta C_T$ de la muestra de tejido ovárico normal 5N que se comprobó mediante examen microscópico como ovario normal (comunicación personal del Dr. Raúl Garza Garza). Lo anterior permitió obtener la cuantificación relativa de expresión de *HOXB13* que representa el número de veces más que se encuentra aumentada la expresión con respecto al calibrador. La Tabla IX muestra la cuantificación de los resultados obtenidos de la expresión de *HOXB13* en escala normal y logarítmica. Debido a la diferencia en la magnitud de los resultados en la expresión de *HOXB13* relativa a la muestra normal de ovario se decidió utilizar los datos en escala logarítmica base 10 para una mejor cuantificación y análisis de los datos.

El análisis de la cuantificación de la expresión de *HOXB13* en los tejidos ováricos normales en la Figura 40A en escala logarítmica muestra una diferencia clara

en los valores obtenidos en los tejidos ováricos y benignos con la excepción de la muestra de tejido ovárico benigno 7B que muestra valores definitivamente en el rango de los obtenidos en las muestras de tejido ovárico con patología maligna.

Interesantemente, estos valores de cuantificación de los transcritos de *HOXB13* mediante tiempo real corresponden predominantemente con los resultados obtenidos mediante PCR tiempo final. Inclusive muestran la expresión positiva de *HOXB13* en una sola muestra de tejido benigno (Figura 40B) que corresponde efectivamente a la misma muestra 7B. Por otro lado, la comparación de los niveles de expresión de *HOXB13* en las muestras de tejido maligno (12T, 16T y 17T) presentan valores en los límites de las muestras con patología no maligna. No obstante, la Figura 24C muestra que cuando se realiza la prueba estadística de t-student en los resultados de la cuantificación relativa de *HOXB13* y los obtenidos mediante PCR punto final de *HOXB13*, fue negativa y positiva con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0001$). Esto indica objetivamente la relación que mantienen los resultados obtenidos en la expresión diferencial de *HOXB13* mediante PCR punto final y la cuantificación del transcrito de *HOXB13* mediante PCR tiempo real.

Por otro lado, en la Figura 41A se muestran los promedios y las desviaciones estándar de los valores en escala logarítmica de la cuantificación relativa de *HOXB13* para cada tipo de tejido ovárico analizado (normal, patología benigna y maligna). El análisis estadístico en la Figura 41B muestra claramente que existe un aumento en la expresión relativa de *HOXB13* en muestras de tejido ovárico con cáncer en comparación con tejidos ováricos normales y con patología benigna ($p<0.05$).

Tabla IX. Cuantificación Relativa del gen *HOXB13* en muestras de tejido ovárico

Muestra de tejido ovarico	Expresión de *HOXB13* relativa a muestra normal de ovario (Escala normal)	Escala logarítmica Expresión de *HOXB13* relativa a una muestra normal de ovario (Escala logarítmica)
1N	84 7795±0 7483	1 9283±0.0038
2N	24 6791±1 4792	1.3919±0.0260
3N	49 9961±1 8348	1 6988±0 0159
4N	11 4141±0 9320	1 0567±0 0355
5N	1 0191±0.2779	0 0000±0 0000
6B	0.6282±0 1988	0 2130±0 1397
7B	2314 6704±515 2552	3 3590±0 0975
8B	86 1265±48 9172	1 8969±0.2614
9B	0 3290±0.0377	0 4842±0 0499
10B	19 3095±4 4366	1 2799±0 1007
11B	10 5681±2 0183	1 0200±0.0835
12T	102 2466±3 0811	2 0096±0 0131
13T	1015 5514±78 7351	3 0060±0 0337
14T	712 7877±453 9923	2 8037±0 2979
15T	4985 6145±228 1554	3 6975±0 0199
16T	76 3892±1 73423	1 8829±0 0098
17T	122 54618±17.1107	2 0862±0 0608

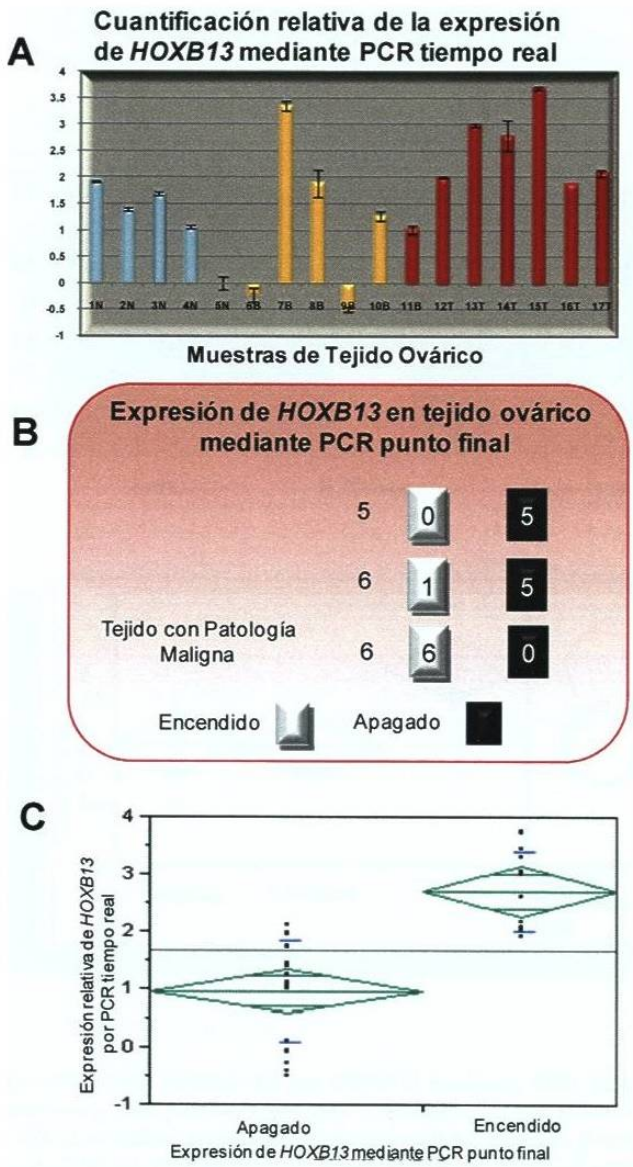

Figura 40. Cuantificación relativa del gen *HOXB13* mediante PCR tiempo real en tejidos ováricos normales, y con patología benigna y maligna. la cuantificación de la expresión génica de *HOXB13* se realizó mediante PCR tiempo real de los genes *β-actina* y *HOXB13* por duplicado en los DNAc's obtenidos de los tejidos de ovario, usando el método $\Delta\Delta C_T$. A) Las barras muestran la cuantificación de la expresión génica de *HOXB13* (media y desviación estándar) en escala logarítmica en las muestras de tejidos ováricos normales (azul), con patología benigna (naranja) y maligna (rojo). B) Resumen de la expresión de *HOXB13* en muestras de tejido ovárico utilizando PCR punto final. C) La grafica muestra que los valores de la cuantificación relativa (escala logarítmica) de *HOXB13* en el apagado y encendido de *HOXB13* por PCR punto final. Las muestras apagadas de *HOXB13* son menores significativamente ($p<0.0001$) que las muestras con este gen encendido.

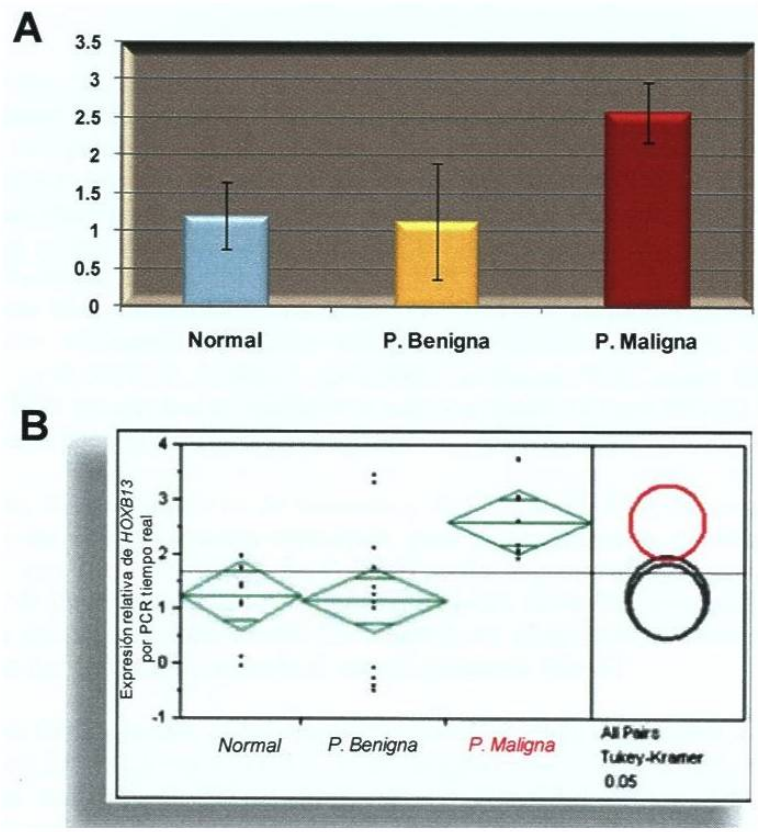

Figura 41. Cuantificación relativa del gen *HOXB13* mediante PCR tiempo real en tejidos ováricos normales, y con patología benigna y maligna. La cuantificación de la expresión génica de *HOXB13* se realizó mediante PCR tiempo real de los genes *β-actina* y *HOXB13* por duplicado en los DNAc's obtenidos de los tejidos de ovario usando el método $\Delta\Delta C_T$. A) Las barras muestran la cuantificación de la expresión génica de *HOXB13* (media y límites de confianza) en escala logarítmica en los tejidos ováricos normales, y con patología benigna y maligna. B) La prueba de contrastes de HSD (diferencia honesta significativa) de Tukey mostró diferencia significativa en la cuantificación relativa de *HOXB13* entre el tejido maligno y los tejidos normales y con patología benigna ($p<0.05$).