

2-HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

2-HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN:

El pronóstico adverso del carcinoma de ovario se debe a que su localización anatómica no permite establecer un diagnóstico precoz. Del mismo modo que la investigación básica nos ha permitido utilizar los hallazgos morfológicos para evaluar la agresividad en el comportamiento de estos tumores, el avance de la biología molecular ha dado algunos frutos para el entendimiento de los acontecimientos que dirigen la génesis y la biología del cáncer de ovario, y para encontrar algunos marcadores que nos aproximen al diagnóstico precoz, así como objetivos para nuevas estrategias terapéuticas.

Al igual que el índice de proliferación celular, la apoptosis es un proceso de vital importancia en la homeostasis tisular que está involucrada en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, entre los que destaca el cáncer.

En las neoplasias la muerte celular programada se caracteriza por:

1- jugar un probable papel en la destrucción de células preneoplásicas.

Actúa como un mecanismo de supresión de células con daño genético, por lo que su inhibición permitiría la permanencia de las células mutadas en el tejido siendo determinante para el crecimiento del tumor. Los tumores de ovario tienen un espectro de grados, benignos, “borderline” y francamente malignos que nos indican la agresividad biológica, y nos permite estudiar el papel de la apoptosis en la evolución de los mismos.

2- estar presente en los tumores ya establecidos, como resultado de procesos intrínsecos de las células tumorales, o por factores externos que tienen lugar en el tejido tumoral.

Se ha visto que los diferentes tipos histológicos de carcinoma de ovario se caracterizan por poseer diferentes alteraciones moleculares. La apoptosis es un evento genéticamente programado, por lo que pensamos que muy probablemente la expresión de genes pro y antiapoptóticos y de genes de vigilancia (“checkpoint”) puede ser diferente en los distintos tipos histológicos.

3- ser necesaria para la respuesta terapéutica de las diferentes armas antitumorales. De igual modo, la expresión génica de ciertas proteínas proapoptóticas y, por tanto, la mayor predisposición a la apoptosis puede estar en relación a una mejor respuesta terapéutica y a un mejor pronóstico.

Recientemente, también se han identificado genes implicados en el control de progresión de la mitosis y en el control del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA denominados genes de vigilancia o de “checkpoint”. Fallos en el proceso de parada del ciclo celular en respuesta a daño en el genoma, conllevan a una inestabilidad genómica.

Pensamos que alguno de los genes humanos recientemente descritos implicados en checkpoint, podría estar implicado directamente en tumorigénesis y pretendemos investigar esta posibilidad en los carcinomas de ovario. Además, es sabido que la sobreexpresión en células humanas de algunos de estos genes, como el hRad9, induce apoptosis y ésta puede ser rescatada por la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2.

Por todo ello, consideramos que las neoplasias epiteliales de ovario son un grupo heterogéneo de cáncer en el que sería interesante estudiar el estado de los mecanismos de apoptosis y de vigilancia (“checkpoint”) , analizando la presencia y expresión de todos los genes descritos, pues existe la posibilidad de que una deficiencia en ellos intervenga no sólo en el proceso de carcinogénesis, sino también como factores pronósticos, probablemente en relación a la quimioresistencia.

3- OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

Los objetivos concretos del presente trabajo son:

1. Estudiar el índice de apoptosis (HE y TUNNEL), la expresión de genes reguladores de apoptosis (p53, bcl-2 y bax) y de vigilancia o de “checkpoint” (hHus 1 y hRad 9) en tumores epiteliales ováricos (benignos, borderline y malignos) de nuestro medio.

2. Comparar el índice mitótico y apoptótico (HE y TUNNEL), y la expresión génica de proteínas pro- ó antiapoptóticas y de proteínas de checkpoint, entre tumores de diferente tipo histológico.

3. Analizar si existe relación entre el índice apoptótico (HE y TUNNEL) y la expresión de genes reguladores del proceso (p53, bax, bcl-2), con otros factores pronósticos ya establecidos.

4. Determinar si el índice apoptótico (HE y TUNNEL), así como la expresión de los genes involucrados en su control (p53, bcl-2 y bax) y en los mecanismos de vigilancia o de “checkpoint” (hHus 1 y hRad 9) pueden considerarse factores pronósticos, estudiando la asociación con el tiempo de supervivencia y el periodo libre de enfermedad.

5. Valorar la relación existente entre la expresión de los diferentes factores involucrados en la apoptosis, y la probable relación entre la expresión de genes de vigilancia o de checkpoint (hHus1 y hRad 9), y la apoptosis y los genes implicados en su control (p53, bcl-2 y bax), en los carcinomas de ovario.

4- MATERIAL Y MÉTODOS

4- MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio fue llevado a cabo en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron, conjuntamente con los servicios de Ginecología Oncológica, Unitat de Recerca Biomedica del Hospital Vall d'Hebron y la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias .

4.1 SUJETOS DE ESTUDIO

Se seleccionaron todas las pacientes diagnosticadas de tumores de bajo potencial de malignidad y de cáncer epitelial de ovario primario en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón en el periodo comprendido entre 1994-1998 ,ambos inclusive, siendo el número total de pacientes con este tipo de neoplasias de 109. Se estudiaron, igualmente 21 casos de cistoadenomas benignos (11 serosos y 10 mucinosos) diagnosticados entre el mismo periodo (1994-1998).

4.2 DATOS CLÍNICOS:

Los datos se recogieron de las historias clínicas de las pacientes, en los archivos de los Hospital General y Materno-Infantil del Vall d'Hebron. Los datos de la evolución se obtuvieron en las sucesivas consultas de control , realizándose la última revisión de historias el 31 de diciembre de 2000. Para evitar la pérdida de casos se contactó vía telefónica con las pacientes o familiares de las mismas, completando el seguimiento adecuado, estableciendo las supervivencias, recidivas ó metástasis en todos los casos^{433, 434}. Se puso especial énfasis la

recogida de las siguientes variables, que fueron especificadas en una hoja de recogida de datos individualizada para cada paciente:

1. Datos personales donde se incluyeron filiación, edad, nº de historia y nº de biopsia.
2. Antecedentes familiares de algún tipo de cáncer, haciendo mención especial al cáncer de mama, colon, ovario ó endometrio.
3. Antecedentes personales: paridad, tratamientos hormonales previos y antecedentes de algún tipo de neoplasia.
4. La presencia de sintomatología antes del diagnóstico, tipo y duración.
5. Estadio clínico según la FIGO.
6. Fecha del último control, el estado de la paciente y de la enfermedad, y si ha presentado alguna recurrencia o metástasis con su localización, intentando detallar los tratamientos recibidos al respecto.

Se consideró el periodo libre de enfermedad como los meses transcurridos desde el tratamiento hasta el diagnóstico de recurrencias ó metástasis y Tiempo de supervivencia como los meses transcurridos desde el diagnóstico hasta el fallecimiento ó último control.

4.3 DATOS PATOLÓGICOS

Se revisaron todas las preparaciones histológicas de las pacientes diagnosticadas de cáncer epitelial de ovario a partir de 1994 almacenadas en el archivo de Anatomía Patológica.

En cada uno de los casos, se valoraron los siguientes datos morfológicos:

4.3.a-Tipo histológico: Se consideraron los cinco tipos histológicos principales (seroso, mucinoso, endometriode, de células claras y transicionales) y sus diferentes grados de agresividad biológica: benignos, de bajo potencial de malignidad (borderline) y malignos.

4.3.b-Grado histológico: Utilizamos como referencia el patrón arquitectural del tumor, dependiendo del porcentaje de áreas sólidas en los tumores de tipo endometriode:

Grado 1: Menos del 10 % de componente sólido;

Grado 2: hasta el 50 % de áreas sólidas.

Grado 3 : más del 50 % de áreas sólidas.

En el resto de los tipos histológicos se utilizó el grado nuclear.

4.3.c- Grado nuclear. Consideramos:

Grado 1: Núcleos pequeños (diámetro de 1-1'5 del tamaño de un hematíe), homogeneidad de tamaño y forma, con contornos regulares, cromatina nuclear uniforme y nucleolo inaparente.

Grado 2: Núcleos mayores de lo normal (diámetro de 2 del tamaño de un hematíe), con cromatina gruesa y nucleolo visible, y moderada variación en forma y tamaño.

Grado 3 : Núcleos mayores (diámetro de más de 2 del tamaño de los hematíes) cromatina vesicular y presencia de uno o más nucleolo prominente, y con marcada variación en forma y tamaño.

4.3.d-Grado de necrosis. Valoramos la presencia de restos nucleares necróticos con material proteináceo en los siguientes grados:

Grado 1: Necrosis focal en sólo 1- 3 CGA (campo de gran aumento).

Grado 2: Necrosis focal en más de 3 CGA.

Grado 3 : Necrosis intensa en casi toda el área en uno o más campos ,o necrosis leve-moderada en amplias zonas.

4.3.e- Índice mitótico: El recuento mitótico tuvo en cuenta solamente las figuras claramente en mitosis y se hizo con objetivo de gran aumento (x40) en 10 campos consecutivos. Se identificaron áreas representativas del tumor, sin focos de necrosis ni de infiltrado inflamatorio. Se cuantificó en un campo de gran aumento el número de células tumorales y se multiplico x 10. Seguidamente se realizó un contaje de figuras de mitosis en 10 CGA similares al inicial, para así poder contabilizar un índice mitótico en 10 CGA= N° de mitosis/ N° de células tumorales en 10CGA.

4.3.f- Índice apoptótico (Hematoxilina-Eosína) ^{435, 436}: Se realizó el contaje de células en apoptosis. Considerando células en apoptosis en H/E no sólo aquellas células con rasgos morfológicos típicos, sino también la presencia de cuerpos apoptóticos en el tejido. Histológicamente, la célula apoptótica aparece como una masa redondeada u oval de citoplasma fuertemente eosinófilo con fragmentos de cromatina nuclear densa . La constricción celular y la formación de cuerpos apoptóticos tienen un comienzo abrupto y una duración de pocos minutos , sin embargo los cuerpos de apoptosis permanecen en el tejido aproximadamente 2 horas hasta que son fagocitados y degradados . Por otro lado, la apoptosis, al contrario que la necrosis, no produce respuesta inflamatoria, lo que la hace más difícil de detectar desde el punto de vista histológico . Debido a estas dificultades, el método más adecuado para identificar células en

apoptosis es el marcaje *in situ* del DNA fragmentado ó técnica de T.U.N.E.L. (TdT- mediated dUTP nick end labelling).

4.4 MARCAJE *IN SITU* DEL DNA FRAGMENTADO Ó TÉCNICA DE T.U.N.E.L. (TdT- mediated dUTP nick end labelling) ^{437, 438, 439, 440}

Para la realización de las diferentes determinaciones se utilizaron los bloques de parafina de las piezas quirúrgicas, obtenidos de los archivos de histología del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron.

Se revisaron los casos diagnosticados, con el fin de distinguir el corte más adecuado para poder estudiar los detalles y seleccionar el bloque de parafina para la realización de esta técnica y de las técnicas de inmunohistoquímica de las proteínas involucradas en la apoptosis y en los mecanismos de vigilancia (“checkpoint”).

La valoración de la apoptosis por el método de marcaje *in situ* del DNA fragmentado ó técnica de T.U.N.E.L. (TdT- mediated dUTP nick end labelling) tiene su fundamento en la detección de la rotura del DNA internucleosomal, típica de la apoptosis, en secciones de tejido fijadas en parafina. Presenta como ventaja la detección de las células de apoptosis en estadios más precoces que la hematoxilina–eosina.

Se pone de manifiesto los extremos 3'-OH libres que se generan en la fragmentación de DNA, incorporando nucleótidos marcados a dichos extremos mediante la acción del enzima transferasa terminal (TdT).

Para llevarlo a cabo, se utilizaron secciones parafinadas de 5 µm de los tumores de ovario, montadas sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Inicialmente, se desparafinaron las secciones en xileno y se hidrataron mediante concentraciones decrecientes de alcohol etílico

(100%, 96 %, 70 %) y agua destilada. A continuación, se desproteinizaron durante 10 minutos, mediante incubación con proteinasa K (SIGMA) (20µg/ml) en agua destilada. El bloqueo de la actividad de las peroxidases endógenas se realizó con H₂O₂ al 2 % en agua destilada durante 5 minutos.

A continuación, las secciones fueron incubadas con el tampón de la TdT (200 mM ácido cacodílico (ICN Biomedicals), 200 mM KCl (Merck), 25mM Trizma base (Merck), pH=6,6), al que se añadió 1,25 mg/ml albúmina bovina y cloruro de cobalto para la concentración final 1mM, antes de realizar la incorporación del nucleótido marcado. El dUTP biotinilado (Boehringer Mannheim) diluido en el mismo tampón (10nmol/ml) fue incorporado a los extremos 3' libres en presencia de la TdT (Boehringer Mannheim) (50 unidades/ml) mediante incubación en cámara húmeda durante 90 minutos a 37 ° C. Estas concentraciones de terminal transferasa y dUTP fueron utilizadas en todas las secciones, después de haberlas optimizado en ensayos sucesivos para obtener un buen marcaje específico y mínimo o nulo fondo en nuestros tejidos.

La reacción se detuvo introduciendo las secciones en tampón TB (300mM NaCl (Merck) , 30 mM citrato sódico (SIGMA)). Para bloquear las uniones inespecíficas del complejo avidina-biotina que se utilizaría después, se incubaron las secciones con albúmina bovina al 2 % en agua destilada. Para amplificar la señal de la biotina incorporada al nucleótido y disponer de un sistema de revelado, se aplicó el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC kit de Vector Laboratories) a 37 °C en cámara húmeda. La peroxidasa permitió realizar el revelado con diaminobenzidina (DAKO) 0,05 % y H₂O₂ 0,05 % en PBS. Las secciones fueron contrateñidas con eosina, deshidratadas en alcohol etílico a concentraciones crecientes y xileno, antes de ser montadas con medio de montaje DPX.

Los controles positivos se realizaron con muestras de testículo de ratones transgénicos de ABP (androgen-binding protein)⁴⁴¹ y los controles negativos resultaron de practicar el ensayo en ausencia de la enzima terminal transferasa.

Se calculó, igualmente, un índice apoptótico (T.U.N.E.L.) calculando el número de nucleos positivos (células en preapoptosis y en apoptosis) / n° de células tumorales en 10 CGA. Para evitar el conteo de células falso positivas^{442, 443, 444}, no se valoraron las zonas próximas a áreas de necrosis o de autólisis.

4.5 INMUNOHISTOQUÍMICA DE FACTORES BIOLÓGICOS

INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS

Para la identificación inmunohistoquímica de las proteínas involucradas en el control de la apoptosis utilizamos:

1- Anticuerpo monoclonal de ratón anti- proteína p53 humana, clona DO-7 en una dilución 1:10(DAKO). Este anticuerpo reconoce un epítipo en el extremo N-terminal de la proteína p53 humana salvaje “wild type” y mutada.

Se utilizaron como controles positivos cortes histológicos de carcinoma basocelular cutáneo y como controles negativos tumores, sustituyendo la incubación del anticuerpo primario por PBS. La expresión nuclear de p53 se valoró mediante una graduación de porcentaje de células positivas; así: 1 (nula-baja): 0-25 % de nucleos positivos; 2 (moderada-baja): 26-50 % de nucleos positivos; 3 (moderada-alta): 51- 75 % de nucleos positivos; 4 (alta): > de 75 % de nucleos positivos.

2- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína bcl-2 humana, clona 100, en una dilución 1:100 (BioGenex). Este anticuerpo reconoce la oncoproteína bcl-2 alpha localizada en la membrana interna mitocondrial.

Como controles positivos para bcl-2 evaluamos los linfocitos de las áreas T y las zonas del manto en tejido de amígdalas palatinas y como controles negativos muestras del tumor sustituyendo la incubación del anticuerpo primario por PBS. La valoración de la expresión de bcl-2 se realizó, igualmente, mediante el porcentaje de células que mostraban una positividad citoplasmática: 1 (nula-baja): 0-25 % de núcleos positivos; 2 (moderada-baja): 26-50 % de núcleos positivos; 3 (moderada-alta): 51- 75 % de núcleos positivos; 4 (alta): > de 75 % de núcleos positivos.

3- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína bax humana, clona 2D2, en una dilución 1:100 (Zymed Laboratories, Inc). Este anticuerpo reacciona con el extremo N-terminal de la proteína bax localizada en la mitocondria.

Cuando se puso a punto la técnica de inmunohistoquímica para bax, se realizó en varios tumores ováricos, de diferente estadio, con el fin de seleccionar un caso con expresión de bax > 75 %, el cual se utilizó como control positivo en todas las determinaciones posteriores; como control negativo se utilizaron muestras de tumores sustituyendo el anticuerpo primario por PBS. La expresión de bax, al igual que en el bcl-2, se valoró mediante una graduación de porcentaje de células con citoplasma positivos; así: 1 (nula-baja): 0-25 % de núcleos positivos; 2 (moderada-baja): 26-50 % de núcleos positivos; 3 (moderada-alta): 51- 75 % de núcleos positivos; 4 (alta): > de 75 % de núcleos positivos.

Para llevarlo a cabo, se utilizaron secciones parafinadas de 4 μm de los tumores de ovario, montadas sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Se desparafinaron las secciones en xileno y se hidrataron mediante concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100%, 96 %, 70 %) y agua destilada. A continuación, se realizó el desenmascaramiento antigénico de los cortes, en un tampon citrato pH 6 en olla a presión, durante tres minutos, dejando enfriar a temperatura ambiente 20 minutos . Posteriormente se lavaron con PBS y agua destilada. A continuación, y con el fin de bloquear la peroxidasa endógena se empleó peróxido de hidrógeno al 0,03 % durante 10 minutos, volviéndose a lavar con agua destilada (2 veces) y baño en PBS (2 veces de 5 minutos cada uno). Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario (anti p53, anti bcl-2 y anti bax) durante 60 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Se repitió el lavado con agua destilada y los dos baños de cinco minutos en PBS. Seguidamente se incubaron los portaobjetos con anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente con polímero de dextrano marcado con biotina antimouse (Envision +). La unión antígeno-anticuerpo se reveló con el uso de diaminobenzidina con cromógeno durante 5 minutos (DAKO) Las secciones fueron contrateñidas levemente con hematoxilina acuosa de Meyer, deshidratadas en alcohol etílico a concentraciones crecientes y xilol, antes de ser montadas con medio de montaje permanente.

4.6 ESTUDIO DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOCIDAD DE TP53

Se seleccionaron 12 casos de tumores de ovario que expresaran alto porcentaje e intensidad de p53 para estudiar la pérdida de heterocigocidad y la inestabilidad de microsatélites del gen Tp53.

Se procedió a la extracción DNA mediante el siguiente protocolo ⁴⁴⁵:

Se realizaron 2 cortes de 20 μm de los bloques parafinados seleccionados como tumor y sano, y se depositaron en tubos eppendorf. Se añadió 200 μm de Tween-20 (Sigma) al 0,5 %, vortex y se dejó en termobloque a 90 °C durante 10 minutos. Seguidamente se bajó la temperatura a 55 °C, y al alcanzarse se añadió 4 μm de 10 mg/ml de Proteínasa K (Serva) con una concentración final de 200 $\mu\text{m}/\text{ml}$, dejándolos a 55 °C durante 3 horas, agitando las muestras cada hora. Posteriormente se añadió 200 μm de Chelex-100 (Bio-Rad) al 5 % en TE (0,5 x). Tras realizar vortex se subió el termobloque a 99 °C durante 10 minutos para inactivar la proteínasa K. Volvimos a descender la temperatura a 45 °C, y al alcanzar la temperatura se centrifugaron las muestras durante 15 minutos. Acto seguido se pusieron las muestras en hielo, para que se endureciera la parafina facilitando su extracción con una aguja. El resto de la muestra se volvió a poner en un termobloque a 45 °C añadiendo 200 μm de cloroformo y centrifugando nuevamente durante 15 minutos. La fase acuosa (superior) del tubo de eppendorf, aproximadamente un volumen de 180-200 μm , se paso a un tubo nuevo, teniendo así el DNA purificado de las muestras para proceder a la amplificación génica mediante técnica de PCR (polymerase chain reaction).

Análisis de microsatélites por PCR:

El marcador de DNA polimórfico usado fue el TP-53, localizado en el cromosoma 17p13.1 (primers: 5' - ACTGCCATCCCTTGCCCAATTC - 3' and 5' -AGGGATACTATTCA GCCCGAGGTG - 3'). La amplificación de los microsatélites fue realizada mediante PCR en un volumen final de 25 μl bajo las siguientes condiciones: TrisHCl 5mM pH=8,0, NaCl 50mM, EDTA 0,01mM, DTT 0,1mM, MgCl₂ 1,5mM, Glicerol 25%, Tritón X100 0,1%, 200uM de cada

dNTP, 1uM de cada primer, 2ul de DNA genómico y 0,5U de Taq DNA polimerasa (Promega,USA). Amplification conditions were

Tras un primer ciclo de 4°C durante 3 minutos, el perfil térmico consistió en 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto con un periodo final de elongación de 72°C durante 10 minutos en un termociclador (Techne, Progene). Una alícuota de 2ul de cada producto de PCR fue mezclada con un volumen de 4ul de Buffer de carga (95% formamida, 10mM EDTA, 0,05% bromofenol y 0,05 % xilencianol, 0,1 % SDS), desnaturalizadas a 90°C durante 5 minutos y cargadas en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante (6%, 29:1). Después de la electroforesis en buffer TBE, 5X (Acido Bórico 44,5mM, EDTA 0,9mM, Trizma 44,5mM), las bandas alélicas fueron visualizadas mediante tinción de plata.

La pérdida de heterocigocidad se consideró por la pérdida total, o una reducción de más del 50 %, de uno de los alelos. Por otro lado, la inestabilidad de microsatélites se valoró por la presencia de bandas extras en la muestra tumoral que no haya sido observada en la muestra de DNA normal correspondiente al mismo paciente.

4.7 INMUNOHISTOQUÍMICA DE EXPRESIÓN DE GENES DE CHECKPOINT

Para la identificación inmunohistoquímica de las proteínas involucradas en la vigilancia genómica utilizamos anticuerpos policlonales de conejo anti-proteína Rad 9 y Hus 1 humana en dilución 1:1500 y 1: 1000 respectivamente.

Como controles positivos utilizamos muestras de carcinoma de colon que mostraron una positividad nuclear intensa y como controles negativos muestras del tumor sin la incubación del

anticuerpo primario sustituyéndolo por PBS. La valoración de la expresión de ambas proteínas se realizó mediante el porcentaje de células que mostraban positividad, considerando asimismo si la positividad era nuclear, citoplasmática o de ambas: 1 (nula-baja): 0-25 % de núcleos positivos; 2 (moderada-baja): 26-50 % de núcleos positivos; 3 (moderada-alta): 51- 75 % de núcleos positivos; 4 (alta): > de 75 % de núcleos positivos.

4.7 a) Clonación de Rad9 y Hus1 en vectores de expresión en Bacterias:

El cDNA de los genes hRad9 y hHus1 fue obtenido por PCR usando una librería de cDNA humana como molde, y dos oligonucleótidos específicos que contienen la secuencia de 5' y el 3' del cDNA previamente descrito en las bases de datos. Una vez obtenidos los fragmentos del tamaño esperado, estos fueron subclonados en un vector diseñado para fragmentos de PCR, pGEMT (Farmacia Biothec). Una vez obtenidos los clones, estos fueron secuenciados y se comprobó que la secuencia era la misma que la descrita en las bases de datos.

A continuación se diseñaron oligonucleótidos para utilizarlos en una reacción de PCR y así proceder a su clonación en vectores de expresión en E. Coli. En el caso de hRad9 se clonó el gen entero como una fusión 5' con la secuencia de la Glutathion-S- transferasa en los sitios Bam HI y Not I del vector pGEX-4T-3 (Farmacia Biothec). El 5' del gen hHus1 correspondiente a los aminoácidos 1-121 fue clonado como una fusión con una cola de 6 histidinas en su extremo 5' utilizando los sitios BamHI y Sac I del vector pQE 30 (Quiagen).

Los clones positivos fueron caracterizados por análisis de restricción antes de secuenciar el inserto y comprobar que la secuencia del cDNA de ambos genes no había sufrido ninguna modificación por el proceso de clonación y/o PCR. A continuación los vectores con el inserto correcto fueron transformados en la estirpe de E. Coli BL-21 con el fin de sobreexpresar la

proteína recombinante. En ambos casos se obtuvieron niveles altos de sobreexpresión . Extractos de bacterias fueron obtenidos resuspendiendo el precipitado de bacterias correspondientes en PBS (tampon fosfato salino) y tratamiento de sonicación posterior. Se comprobó que ambas proteínas recombinantes se encontraban en una forma insoluble, por lo que la parte insoluble de los extractos se sometió a electroforesis preparativa utilizando un gel al 10% de poliacrilamida-SDS para separación de proteínas por tamaño molecular. Después de teñir el gel brevemente con Coomassie blue-R se recortó la banda correspondiente a la proteína sobreexpresada, y se homogeneizó para su posterior inmunización.

La inmunización se realizó en conejos de laboratorio inyectando de 50 a 70 microgramos de proteína en cada inmunización. En cada caso se procedió a 7 inyecciones antes de desangrar al animal. Los sueros obtenidos fueron probados mediante la técnica de Western blot, utilizando tanto proteína recombinante como extractos de líneas celulares. En ambos casos se observó que reconocían la proteína adecuada de manera específica.

4.7 b) Técnica de inmunohistoquímica

Se realizó el mismo protocolo de inmunohistoquímica que con las proteínas involucradas en la apoptosis, con algunas diferencias:

-Los anticuerpos secundarios biotinilados utilizados en la inmunohistoquímica se adquirieron de Jackson ImmunoResearch Laboratories y fueron usados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

-No se practicó la contratinción con hematoxilina de Mayer.

4.8 ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 10.0. Las pruebas de comparación de proporciones para el estudio de asociación entre factores se realizaron con la prueba de χ^2 ⁴⁴⁶. Para medir la correlación entre dos variables se utilizó los coeficientes de correlación de Pearson ó la correlación por rangos de Spearman⁴⁴⁷. Para estimar la asociación entre los factores pronósticos y la supervivencia (o intervalo libre de enfermedad) se calculó la media de tiempo libre de enfermedad y la media de tiempo de supervivencia utilizando el método de Kaplan-Meier⁴⁴⁷. Para las comparaciones de supervivencia entre grupos se utilizó la prueba de log-rank⁴⁴⁸. Para controlar que la asociación entre un factor pronóstico y la supervivencia no sea debida a otros factores dependientes se utilizó la prueba del modelo de regresión de Cox⁴⁴⁹. Los valores de p obtenidos que fueron inferiores a 0,05 se consideraron significativos^{450, 451}.

Los resultados de las variables cuantitativas se expresan con la media y la desviación estándar. Los resultados de variables cualitativas se expresan en porcentajes.