



RESULTATS

RESULTATS

15. Estudi de l'expressió diferencial en *microarrays* de cDNA

La hipòtesi inicial d'aquest treball es basa en el fet que els gens que potencialment participen en l'origen i/o desenvolupament del carcinoma endometrial es poden detectar mitjançant l'anàlisi de la seva expressió. Això és degut al fet que les alteracions gèniques inicials responsables de la transformació neoplàsica es tradueixen, en últim terme, en una variació dels nivells transcripcionals d'aquests gens. Aquest canvis poden ser detectats comparant els nivells d'expressió entre mostres de teixit normal (control) i mostres de teixit tumoral (problema). Nogensmenys, una vegada identificats els candidats gènics expressats diferencialment quedaria per posar de manifest llur participació i/o mecanisme d'acció en la transformació neoplàsica. Per portar a terme aquesta cerca es va decidir utilitzar la tecnologia dels *microarrays* de cDNA, una tecnologia molt innovadora en el moment de realitzar l'estudi que ha anat experimentant un gran auge a conseqüència de les seves prestacions. Els *microarrays* de cDNA ens van permetre trobar diferències d'expressió comparant mostres d'endometri normal amb mostres d'endometri tumoral.

15.1. Obtenció del panell de mostres

L'estudi es va dur a terme utilitzant tres tipus diferents de mostres: teixit de carcinoma endometrial de tipus endometriode, teixit d'endometri atròfic i teixit d'endometri normal proliferatiu. Es van introduir dos controls d'expressió, per una banda el teixit atròfic, que és el teixit natural en condicions postmenopàusiques, és a dir el teixit en què hom ha considerat els nivells d'expressió gènica basals, i per altra banda un segon control, teixit endometrial proliferatiu, que és el teixit natural en condicions premenopàusiques. Aquest teixit passa

regularment per un cicle continu de proliferació/regeneració en el qual s'expressen diversos gens involucrats en el procés de proliferació. Per tant, la introducció d'aquest control es féu per tal de descartar gens que s'expressen en condicions fisiològiques quan el teixit es troba en procés de proliferació. Les mostres es van anar recollint periòdicament a partir de les histerectomies realitzades al Servei de Ginecologia Oncològica de l'Hospital Vall d'Hebron i es van anar desant a -80°C .

15.1.1. Comprovació anatomopatològica de les mostres tumorals

La informació de les característiques patològiques, com el tipus histològic, l'estadi o el grau de les mostres tumorals es va obtenir a partir dels informes anatomopatològics de cadascuna de les histerectomies practicades (Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona) (Fig.37).

EEC

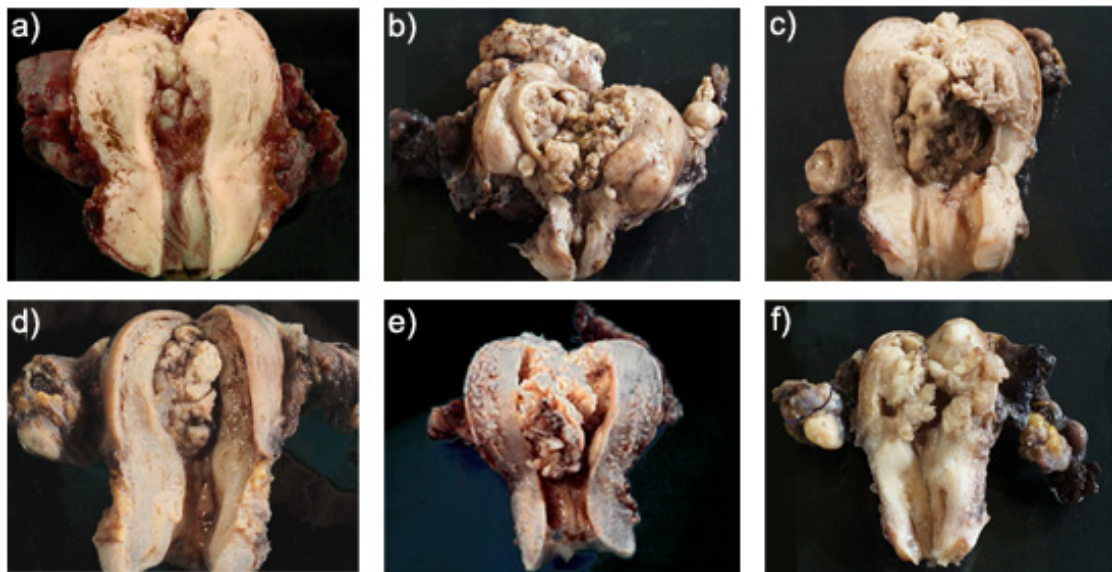


Figura 37, imatge de 6 histerectomies: la galeria d'imatges mostra 6 de les histerectomies realitzades en l'hospital Vall d'Hebron pel departament de ginecologia en el transcurs del projecte d'investigació. El tall sagital de la cara anterior de l'úter permet observar a l'interior el carcinoma endometrial. **a)** EEC inicial (només afectació del teixit endometrial); **b,c,f)** EEC avançat (el carcinoma col·lapsa la cavitat endometrial i hi ha afectació dels teixits contigus; i **d,e)** EEC mig avançat (el carcinoma no col·lapsa tota la cavitat endometrial i hi ha afectació de l'endometri i el miometri).

15.1.2. *Obtenció i verificació de les mostres control*

15.1.2.1. *Obtenció i verificació de les mostres d'endometri normal atròfic*

Amb la participació del cirurgià i en el mateix moment de la intervenció quirúrgica, es va portar a terme l'obtenció de la mostra normal atròfica. Aquesta mostra corresponia al teixit adjacent al tumor, que no presentava alteració. El patòleg va confirmar, en cada cas, que efectivament es tractava d'epiteli endometrial atròfic (Fig. 26).

15.1.2.2. *Verificació del cultiu primari d'endometri normal proliferatiu*

Els explants d'endometri proliferatiu sa, després d'haver estat sembrats en medi de cultiu, varen originar un cultiu primari de cèl·lules epitelials endometrials (Fig. 38a).

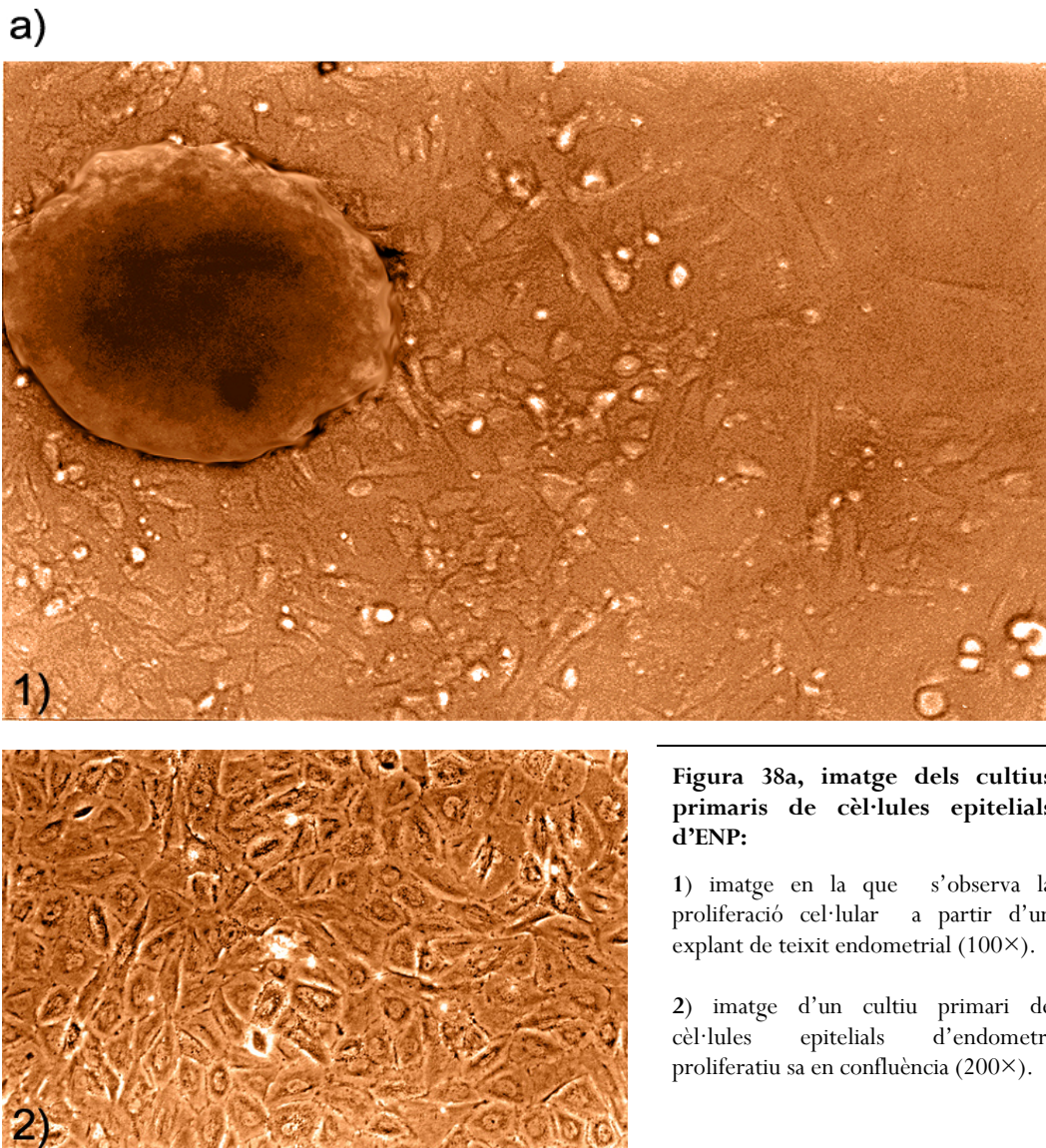


Figura 38a, imatge dels cultius primaris de cèl·lules epitelials d'ENP:

1) imatge en la que s'observa la proliferació cel·lular a partir d'un explant de teixit endometrial (100×).

2) imatge d'un cultiu primari de cèl·lules epitelials d'endometri proliferatiu sa en confluència (200×).

Es va realitzar un control per immunocitoquímica fluorescent, amb l'anticòs comercial anticitoqueratina 19 (CK19), sobre el cultiu primari procedent d'explants d'endometri proliferatiu sa per determinar que efectivament es tractava de cèl·lules epitelials de l'endometri. En la imatge obtinguda amb microscòpia confocal computeritzada *Leica TCS SP2*[®] s'observa el marcatge de la citoqueratina 19, proteïna característica de la glàndula d'epiteli endometrial que s'expressa en el citoesquelet de la cèl·lula.

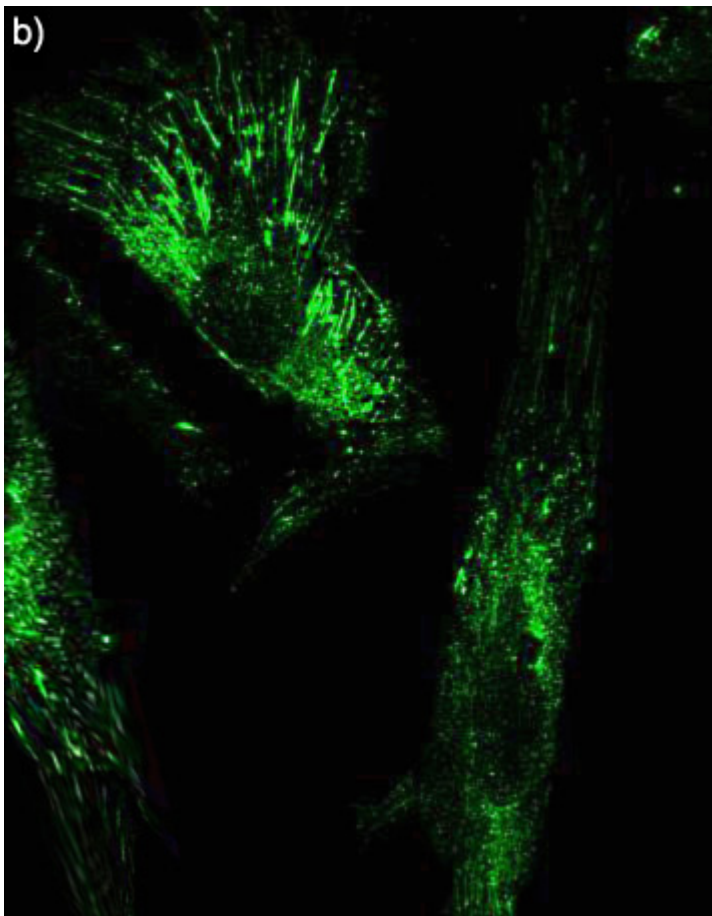


Figura 38b, processament de les mostres, ICQ de CK19 en el cultiu primari d'ENP: immunofluorescència realitzada sobre les cèl·lules dels explants d'endometri normal proliferatiu (ENP) cultivats. El marcatge verd fluorescent, amb el fluorocrom FITC sobre la citoqueratina 19 (CK19), específica de les glàndules endometrials, con-firma que es tractaven de cèl·lules epitelials d'endo-metri. Servei de microscòpia confocal, UCTS.

15.2. Resultat de les hibridacions dels microarrays de cDNA

Amb les possibilitats dels filtres *LifeGrid*TM en el moment en el qual es van realitzar els experiments d'hibridació, es van poder dur a terme sis experiments d'hibridació amb cDNA marcat amb P³³, que complien els criteris de qualitat i quantitat òptims tant a nivell d'RNA total com de l'mRNA (Fig. 39). Per tant els experiments d'hibridació van correspondre a

quatre mostres problema i dues control: Les mostres problema consistien en quatre mostres individuals de carcinoma endometriode, mentre que les mostres control es van generar a partir d'un conjunt de mostres per tal d'obtenir uns nivells d'expressió gènica promig en un context atròfic o en un context proliferatiu (vegeu Taula 9, *M i M*).

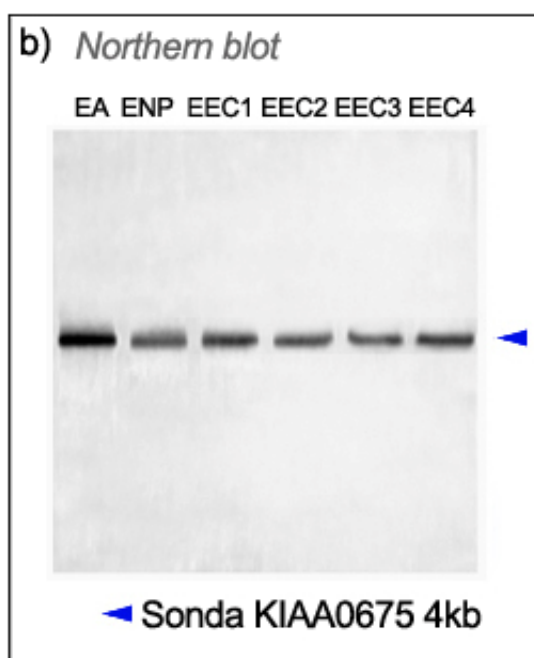


Figura 39, processament de les mostres, integritat de l'RNA hibridat: imatge del *northern blot* de les mostres control i tumorals. La banda correspon a la sonda KIAA0675 de 4 kb utilitzada per determinar la integritat de l'mRNA. La mida de la sonda indica que al obtenir banda en l'assaig de *northern blot* la integritat del RNA com a mínim és de 4 kb. Mida suficientment gran per determinar un RNA de qualitat.

15.2.1. Imatges dels filtres

Un cop realitzada l'exposició dels filtres hibridats a les pantalles de captació *Molecular Dynamics*TM es va visualitzar el resultat del senyal radioactiu amb l'aparell de captació *Personal Molecular Imager FX*TM. Aquest hardware va permetre obtenir imatges de totes les hibridacions. Es van obtenir un total de dotze imatges, dues imatges en format (.TIFF) per a cadascun dels filtres corresponents a alta resolució i baixa resolució. En les imatges obtingudes s'observen diferències d'intensitat dels diferents pous que corresponen al nivell d'expressió de cadascun dels gens del filtre que presenta la mostra hibridada. Per tant comparant la intensitat de marcatge del filtre control (mostra normal) amb la intensitat de marcatge del filtre problema (mostra tumoral) es poden determinar diferències d'expressió.

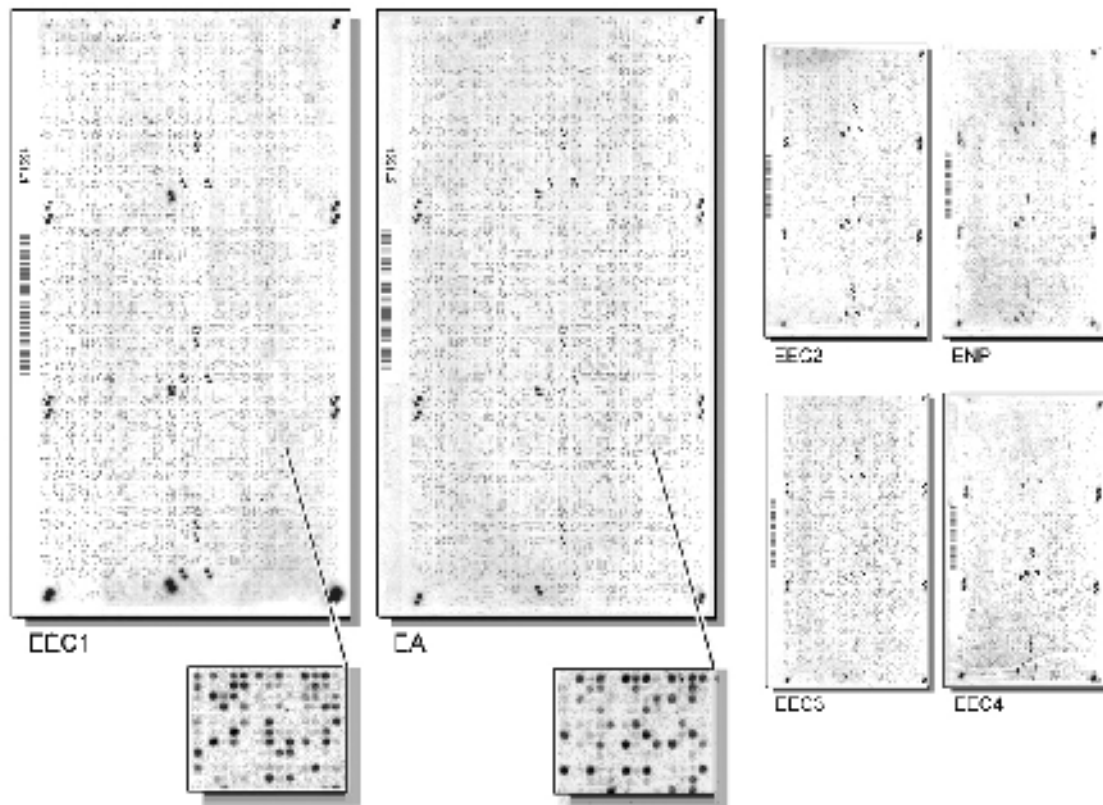


Figura 40, composició d'imatges dels filtres hibridats: galeria d'imatges de les diferents hibridacions obtingudes dels *microarrays* de cDNA. A l'esquerra de la fig. s'observa una ampliació de dos filtres hibridats. L'ampliació permet observar les diferències de marcatge entre una mostra tumoral EEC1 i una mostra control EA.

15.3. Tractament bioinformàtic

15.3.1. Anàlisi computacional dels filtres

Amb el software específic *Molecular Dynamics Storm & Array VisionTM* es va realitzar la conversió de la intensitat de marcatge radioactiu a un valor numèric. Es van normalitzar els marcadors intrínsecs permetent la comparació dels filtres no només en parelles sinó també entre ells. Els resultats de l'anàlisi presentada mostraven els següents paràmetres:

- 1) (*Spot labels*): coordenades de posició de cada gen en el *microarray* (permet la identificació de cada element en el filtre).
- 2) (*ARMDens*): valors d'intensitat del marcatge radioactiu (mitjana de les intensitats de tots els píxels de cada pou).
- 3) (*MAD*): valors de desviació respecte la mitjana de la intensitat radioactiva de cada pou.
- 4) (*Bkgd*): valors d'intensitat radioactiva corresponents al *background* (soroll de fons).
- 5) (*sARMDens*): valors d'intensitat radioactiva corregida pel *background* (elimina la intensitat inespecífica).
- 6) ($(a+b)/2$): valors promig d'intensitat radioactiva de les rèpliques (cada element del filtre es troba per duplicat).
- 7) (a/b): coeficient de correlació entre les rèpliques.

15.3.2. Anàlisi computacional de les dades

A partir de les aplicacions del full de càlcul *Excel*[®] es va portar a terme l'anàlisi d'identificació dels gens significativament alterats en condicions patològiques.

15.3.2.1. Premisses de l'anàlisi

Com a primera premissa es va assumir la mostra d'endometri normal atrofíic com a estat basal d'expressió gènica, atès que es tracta d'un epíteli en estat atrofíic, propi de la postmenopausa, i que per tant presenta cèl·lules en estat quiescent. Com a segona premissa es va introduir un segon control: la mostra d'endometri proliferatiu, per tal d'obtenir especificitat, pròpiament tumoral, del repertori diferencial. És a dir, que les diferències que es trobessin fossin diferències degudes, sobretot, a l'estat proliferatiu. Això es va corregir mitjançant la comparació realitzada entre la mostra procedent de teixit endometrial atrofíic i la mostra d'endometri proliferatiu. L'expressió gènica relacionada amb l'estat proliferatiu, però no necessàriament relacionada amb l'estat tumoral, ha d'estar representada en l'epíteli endometrial proliferatiu. A més, aquesta comparació també va permetre descartar gens l'expressió dels quals depèn de factors intrínsecs a l'hoste, sobretot factors hormonals.

| ANÀLISI DE COMPARACIÓ DELS FILTRES HIBRIDRATS | |
|---|---|
| ANÀLISIS | COMPARACIONS |
| 1 ^{er} | (Endometri normal atròfic) vs (Endometri tumoral 1) |
| 2 ^{on} | (Endometri normal atròfic) vs (Endometri tumoral 2) |
| 3 ^{er} | (Endometri normal atròfic) vs (Endometri tumoral 3) |
| 4 ^{art} | (Endometri normal atròfic) vs (Endometri tumoral 4) |
| 5 ^è | (Endometri normal atròfic) vs (Endometri normal proliferatiu) |

Taula 13. Relació de les comparacions entre els diferents filtres hibridats en l'anàlisi d'expressió gènica diferencial sobre *microarrays* de cDNA.

15.3.2.2. Criteris d'anàlisi

El primer criteri que es va aplicar per a l'obtenció de dades significatives va ser descartar tots aquells elements dels quals els seus valors d'intensitat no superessin en 2,5 vegades la intensitat del *background*. Això significa que només es van analitzar valors d'intensitat no deguts al soroll de fons del filtre. En segon lloc es van descartar els elements amb un valor de coeficient de correlació entre les rèpliques no comprès en l'interval (0,4-2,5). Els valors que no es troben compresos dins d'aquest interval disten massa respecte de la unitat i per tant les rèpliques no es poden considerar com a significatives. Aplicant aquests dos criteris en paral·lel a tots els elements dels sis experiments d'hibridació (és a dir que cadascun dels valors d'intensitat, per a poder ser considerat vàlid, havia de complir alhora aquests criteris en les sis taules de dades) hom va poder obtenir 4256 valors d'intensitats significatives corresponents a 1064 elements presents en els filtres, que corresponien a un 12% dels elements originals.

15.3.2.3. Taula d'anàlisi

Amb els 1064 elements es va construir un full de càlcul on es van representar els valors de les coordenades conjuntament amb els valors de les intensitat per cadascun dels element en cadascun dels filtres.

| TAULA D'ANÀLISI DEL CONJUNT DELS FILTRES | | |
|--|-------------------------------|----------------------------|
| CODI D'ANÀLISI | MOSTRA HIBRIDADA | CARACTERÍSTIQUES |
| A | Endometri normal atròfic | EA (control basal) |
| B | Endometri normal proliferatiu | ENP (control proliferatiu) |
| C | Endometri tumoral 1 | EEC; IA; G1 |
| D | Endometri tumoral 2 | EEC; IA; G2 |
| E | Endometri tumoral 3 | EEC; IA; G2 |
| F | Endometri tumoral 4 | EEC; IIB; G3 |

Taula 14. Codificació dels valors d'expressió obtinguts en l'assaig de *microarrays* de cDNA segons del tipus de mostra hibridada en cadascun dels filtres.

En la nova taula d'anàlisi es van normalitzar els valors de les intensitat de cadascun dels filtres respecte la intensitat del filtre (A) ja que aquest representa el filtre calibrador, és a dir on es troben els nivells basals d'expressió dels gens. Per tant, després de l'anàlisi (B/A), (C/A), (D/A), (E/A) i (F/A), finalment es va obtenir el nivell d'expressió de cadascun dels elements respecte del seu nivell basal d'expressió.

15.3.3. Anàlisi de distribució jeràrquica dels elements

L'anàlisi jeràrquica d'agrupació i d'organització dels diferents elements o anàlisi de *cluster* realitzat amb el programa d'anàlisi *Online Genecluster*TM (<http://research.nhgri.nih.gov/microarray/main.html>) va permetre agrupar els 1064 elements segons la seva semblança. Les dades de les intensitats es va transformar en un document de text delimitat per tabulacions, format que és reconegut pel programa *Genecluster*TM. Un cop enviades les dades a (<http://research.nhgri.nih.gov/microarray/main.html>) i realitzada l'anàlisi, el programa va retornar els següents paràmetres:

- 1) (**.data**): retorna la taula enviada per poder comprovar sobre quins valors s'ha realitzat l'anàlisi.
- 2) (**.out**): mostra els nous valors d'intensitat assignats després d'aplicar l'algoritme.
- 3) (**final_imatge.tiff**): imatge corresponent a l'arbre de distribució dels elements (gens i ESTs) i la relació entre mostres.

Aquest conjunt de paràmetres va permetre la construcció del diagrama jeràrquic, on s'hi troben representats tots els gens amb el seu estat d'expressió en cadascuna de les mostres i per tant una primera aproximació a l'obtenció de perfils d'expressió gènica de cadascuna de les mostres. Els primers resultats del *cluster* jeràrquic dels 1064 elements, utilitzant el coeficient de correlació de Pearson, van generar un diagrama de distribució amb una gran quantitat d'àrees sense diferències d'expressió significatives, és a dir àrees fosques sense intensitat colorimètrica. L'arbre mostra, també, la distribució dels gens en funció de la semblança del nivell d'expressió i a més els organitza ascendentment de menor a major expressió (Fig. 41).

15.3.4. Cerca de gens amb expressió diferencial

Per tal de trobar gens amb expressió diferencial entre les mostres tumorals i les mostres control es va establir un filtre per eliminar els valors propers a l'estat d'expressió control. És a dir, es van determinar uns intervals i es van eliminar tots els valors que es trobaven dins aquest interval (Taula 15).

| ESTABLIMENT D'INTERVALS D'EXCLUSIÓ EN L'ANÀLISI D'EXPRESSIÓ DIFERENCIAL | | |
|---|---------------------|--------------------|
| ANÀLISI | INTERVAL D'EXCLUSIÓ | ELEMENTS OBTINGUTS |
| 1 | (-) | 1064 |
| 2 | (0,9-1,1) | 297 |
| 3 | (0,85-1,15) | 134 |
| 4 | (0,8 -1,2) | 75 |
| 5 | (0,75-1,25) | 53 |

Taula 15. Nombre d'elements amb expressió gènica diferencial obtinguts en funció de d'interval d'exclusió aplicat. (-) sense interval d'exclusió, rang corresponent a tots els valors. En negreta es detalla d'interval d'exclusió escollit.

A mesura que s'anava incrementat l'interval anaven disminuït el nombre de gens amb expressió diferencial. Per tant hom es va quedar amb l'anàlisi (5) de l'interval de (0,75-1,25) amb una significació estadística, tot aplicant el test F de dues cues de ($p < 0,05$) i molt emprat en la literatura ⁽²⁵²⁻²⁵⁵⁾. Amb aquesta anàlisi es va obtenir un conjunt de 53 gens amb expressió diferencial significativa. Per tant es va poder fer una important selecció dels gens a estudiar i es va poder disminuir, així, la immensa quantitat d'informació que generen els *microarrays* de cDNA. Amb els 53 gens es va realitzar l'anàlisi de distribució jeràrquica amb què es va obtenir un nou diagrama jeràrquic (Fig. 41). A partir del diagrama de 53 elements s'ha realitzat una anàlisi posterior dels resultats obtinguts en la hibridació dels *microarrays* de cDNA.

15.4. Anàlisi dels resultats dels *microarrays* de cDNA

L'anàlisi de distribució jeràrquica dels elements realitza tres tipus d'agrupacions: el diagrama colorimètric (Fig.42a), l'arbre d'agrupació per mostres (Fig. 42b) i l'arbre d'agrupació per gens (Fig.42c). Els tres tipus de distribucions es relacionen entre elles a partir del nivell d'expressió de cada gen, obtenint el diagrama jeràrquic final que engloba les tres distribucions alhora. Per analitzar aquesta distribució jeràrquica cal estudiar el diagrama per parts, tenint en compte cadascuna de les tres agrupacions.

15.4.1. Diagrama colorimètric

Aquest tipus de diagrama realitza una conversió del valor numèric d'expressió a un color que pot ser verd, si es tracta d'infraexpressió, vermell si es tracta de sobreexpressió o negre si el valor d'expressió es proper al nivell basal. La diferent tonalitat cromàtica que adopta el diagrama està en funció del valor numèric, per tant, un vermell intens significarà una alta sobreexpressió o un color verd intens una gran infraexpressió. Així doncs en el diagrama es troben representades totes les games de colors des del negre al vermell o al verd depenent del valor numèric de la sobreexpressió o infraexpressió. El diagrama colorimètric que es va obtenir en l'anàlisi dels 53 gens (Fig. 42a) mostra en primer lloc 5 carrils verticals corresponents al conjunt de totes les mostres calibrades per la mostra (A) es a dir: (B/A), (C/A), (D/A), (E/A) i (F/A).

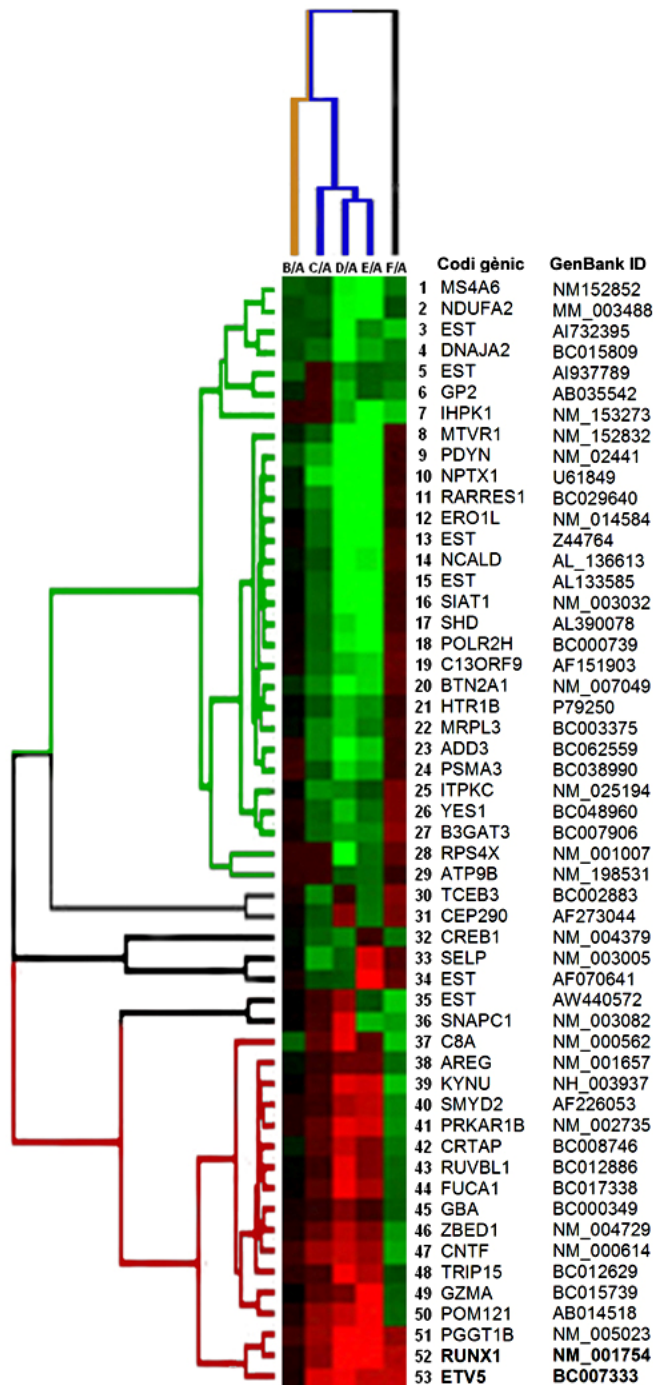


Figura 41, arbre jeràrquic de 53 elements: el diagrama jeràrquic mostra tres tipus de distribucions: el diagrama colorimètric (centre de la imatge), el diagrama de distribució per mostres (part superior de la imatge) i el diagrama de distribució per gens (part esquerra de la imatge). Acompanyant el diagrama jeràrquic, es mostra el codi genètic de cadascun dels 53 gens de l'anàlisi amb el seu codi d'identificació (ID) respecte de la base de dades genètica *GenBank*. El codi ID de la base de dades *GenBank* mostra la seqüència, així com, les principals característiques de cadascun dels elements. A partir del diagrama jeràrquic es van identificar els gens *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM*, com els dos gens amb major nivell de sobreexpressió en les mostres tumorals respecte a les mostres normals, és a dir que es sobreexpressaven altament en totes les mostres de carcinoma endometrial endometriode. En la imatge es destaquen, en negreta, els dos gens en les posicions 52 i 53 respectivament. Es pot observar, en el diagrama colorimètric, el color vermell intens de la sobreexpressió d'ambdós gens que presenten les mostres de carcinoma endometrial endometriode, i que contrasta amb el color negre (expressió basal) de la mostra control.

El primer carril correspon a la ràtio (B/A), és a dir la mostra normal proliferativa en front la mostra normal proliferativa. En aquest carril es pot veure que la coloració és pràcticament negra, cosa que significa que els valors d'expressió del control proliferatiu són semblants a

l'estat basal d'expressió del control atròfic. Això suggereix que els gens escollits no estan relacionats en el procés de proliferació fisiològic, sinó que pròpiament presenten una alteració deguda a l'estat tumoral. En els altres carrils s'observa el conjunt de mostres tumorals. Els tres carrils centrals, (C/A), (D/A) i (E/A), mostren un perfil d'expressió relativament semblant, la qual cosa concorda amb el fet que es tracta de mostres tumorals del mateix estadi IA. Aquesta dada proporciona validesa a l'anàlisi, perquè mostres semblants presenten perfils d'expressió semblants. Finalment en el carril (F/A) on hi ha la mostra d'estadi més alt IIB s'observa un perfil que dista del carril control però també té unes certes diferències amb les mostres tumorals d'estadi més baix.

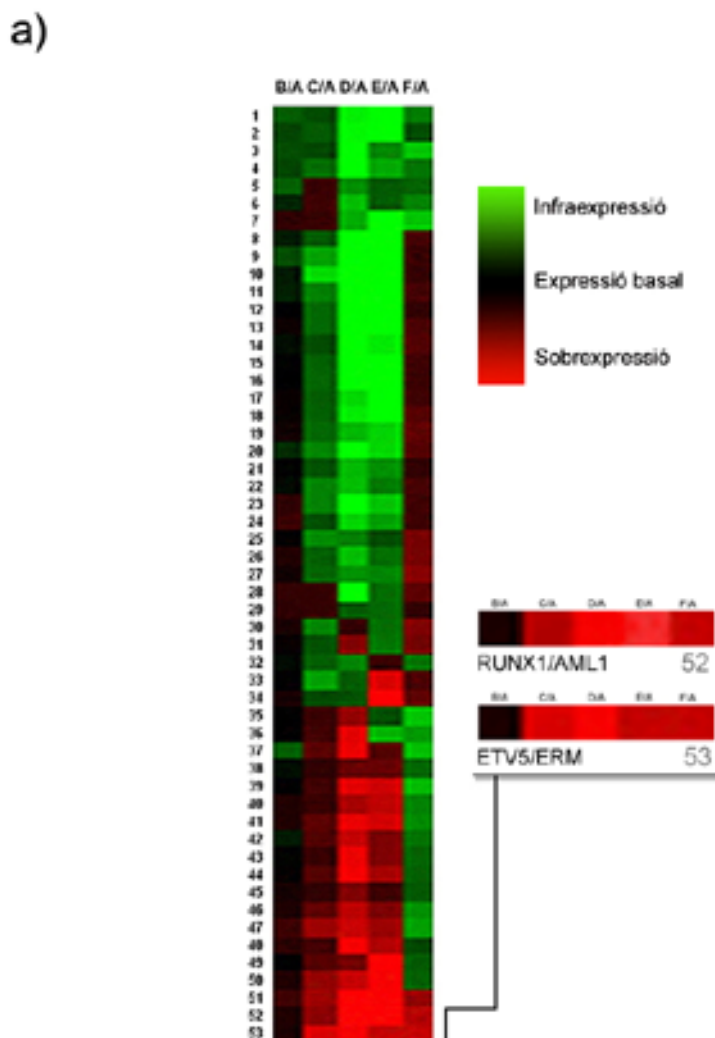


Figura 42a, diagrama colorimètric: el diagrama de distribució colorimètric atorga un color a cada gen en cada mostra segons el seu nivell d'expressió. Un color verd significa infraexpressió, un color negre significa nivell d'expressió proper a 1 (nivell basal), i un color vermell significa sobreexpressió. En la imatge es destaquen els gens *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM*. Es pot observar la sobreexpressió d'ambdós gens en totes les mostres tumorals i l'expressió basal en la mostra control de teixit atròfic. El diagrama colorimètric també permet distingir tres patrons d'expressió majoritaris: el carril B/A, corresponent a la ràtio de mostres control, els carrils C,D,E/A, corresponents a les mostres tumorals d'estadis inicials, i el carril F/A, corresponent a la mostra tumoral d'estadia alt.

15.4.2. Agrupació per mostres

Aquest sistema de distribució jeràrquica agrupa les mostres en funció de la semblança dels seus perfils d'expressió. El diagrama mostra d'una manera gràfica els grups de mostres,

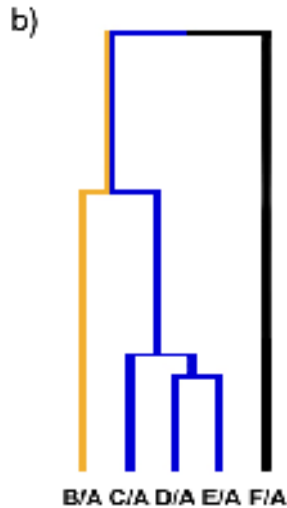


Figura 42b, diagrama d'agrupació per mostres: el diagrama mostra cadascuna de les branques generades per l'expressió dels 53 gens en les diferents mostres analitzades. El diagrama mostra tres grans grups: el control, els tumors d'estadi baix i els tumors d'estadi alt

anteriorment comentats en el diagrama colorimètric. La primera branca (color taronja) (*B/A*) representa la mostra d'endometri normal proliferatiu, la mostra utilitzada per calibrar els possibles falsos positius. La segona branca (color blau) (*C/A*), (*D/A*) i (*E/A*) correspon a les mostres de carcinoma endometrial d'estadi baix IA. Finalment la tercera branca (color negre) (*F/A*) comprèn la mostra d'estadi alt IIB. Cal destacar que en el diagrama d'arbre la llargada de les branques reflexa la semblança entre les mostres, a distàncies més curtes, major relació entre elles (Fig. 42b). Per tant, tot i fent servir perfils transcripcionals d'un nombre reduït de gens, aquests permeten la correcta agrupació de les mostres de forma no supervisada, segons les seves característiques biològiques com l'estadi.

15.4.3. Agrupació per gens

L'anàlisi jeràrquica també permet agrupar els gens per semblança de nivell d'expressió. Els resultats generals mostren dos grups clarament separats; per una banda, a la part superior, els gens infraexpressats en verd i per l'altra, a la part inferior els gens sobreexpressats en vermell. La zona de confluència, en negre, és on hi ha la major variabilitat de diferències d'expressió entre mostres i on les mostres presenten valors d'expressió més semblants a l'estat basal. També cal tenir en compte els extrems de l'arbre perquè és on hi ha els nivells més alts (part inferior) i més baixos (part superior) d'expressió respecte del nivell basal (Fig. 42c).

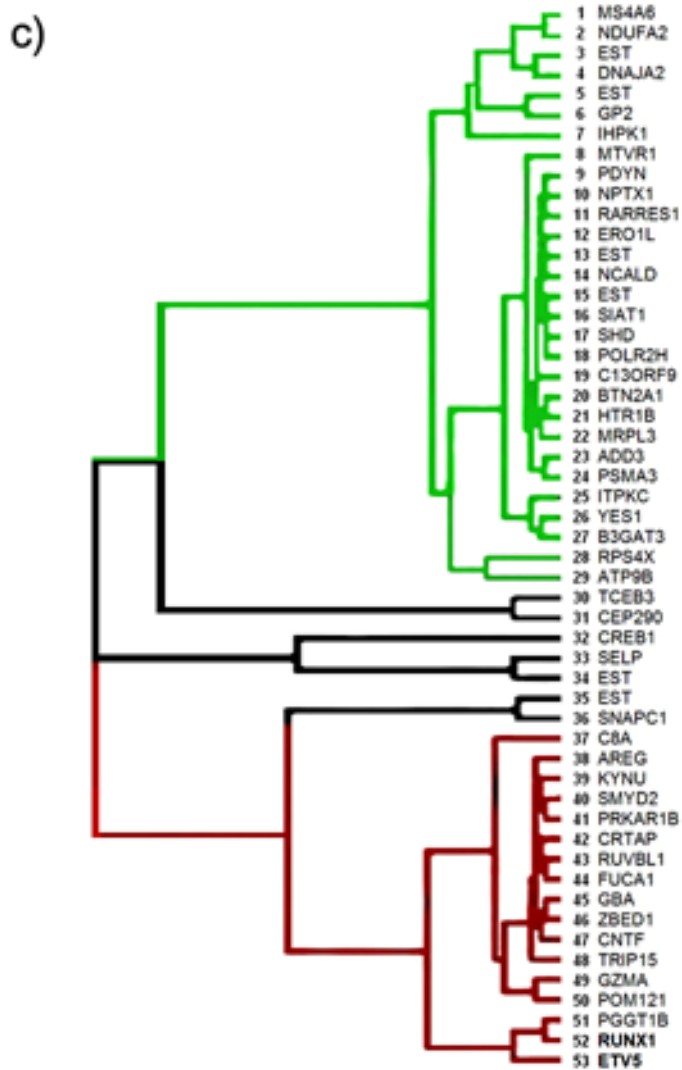


Figura 42c, diagrama d'agrupació per gens: el diagrama mostra el llistat dels 53 gens obtinguts de l'anàlisi d'expressió diferencial ordenats de menor a major expressió respecte de les mostres normals. A la esquerra de la fig. s'observen les branques d'agrupament dels gens en funció del seu nivell d'expressió. Les distàncies entre les diferents branques mostra la semblança en el nivell d'expressió de cadascun dels gens. En verd es destaquen les branques que relacionen aquell grup de gens que s'infraexpressen en les mostres tumorals. En negre s'indiquen les branques que relacionen aquells gens que tenen un nivell d'expressió semblant al nivell d'expressió dels controls. En vermell s'observen les branques que relacionen aquells gens que es sobreexpressen en les mostres tumorals. En l'últim grup es destaca, en negreta, els gens *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM* per representar els gens amb major sobreexpressió en les mostres tumorals.

15.4.4. Anàlisi dels elements amb expressió diferencial

Del conjunt de 53 seqüències amb expressió diferencial analitzades se'n van identificar la funció gènica corresponent, així com el seu símbol gènica. A continuació es mostra el conjunt dels 53 gens ordenats jeràrquicament en funció del nivell d'expressió (Taula 16):

53 SEQÜÈNCIES OBTINGUDES DE L'ESTUDI D'EXPRESSION GÈNICA DIFERENCIAL

| Nº | NOM DE LA SEQÜÈNCIA | SÍMBOL GÈNIC | GENBANK ID |
|----|--|--------------|------------------|
| 1 | Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6 | MS4A6 | NM_152852 |
| 2 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2 (8kD, B8) | NDUFA2 | NM_002488 |
| 3 | Hippocalcin-like 1 | HPCAL1 | A1732395 |
| 4 | DNAJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2 | DNAJA2 | BC015809 |
| 5 | CREB binding protein | CREBBP | A1937789 |
| 6 | Pancreatic zymogen granule membrane associated protein GP2 beta form | GP2 | AB035542 |
| 7 | Inositol hexaphosphate kinase 1 | IHPK1 | NM_153273 |
| 8 | Mouse Mammary Tumor Virus Receptor homolog 1 | MTVR1 | NM_152832 |
| 9 | Prodynorphin | PDYN | NM_024411 |
| 10 | Neuronal pentraxin 1 | NPTX1 | U61849 |
| 11 | Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 | RARRES1 | BC029640 |
| 12 | ERO1 (<i>S. cerevisiae</i>)-like | ERO1L | NM_014584 |
| 13 | protein tyrosine phosphatase domain containing 1 | PTPDC1 | Z44764 |
| 14 | Neurocalcin delta | NCALD | AL136612 |
| 15 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 | DDX5 | AL133585 |
| 16 | Sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase) | SIAT1 | NM_003032 |
| 17 | Src homology 2 domain containing transforming protein D | SHD | AL390078 |
| 18 | Polymerase (RNA) 2 (DNA directed) polypeptide H | POLR2H | BC000739 |
| 19 | vacuolar protein sorting 36 | VPS36 | AF151903 |
| 20 | Butyrophilin, subfamily 2, member A1 | BTN2A1 | NM_007049 |
| 21 | Incyte Genomics, Inc. EST | HTR1B | P79250 |
| 22 | Mitochondrial ribosomal protein L3 | MRPL3 | BC003375 |
| 23 | Adducin 3 (gamma) | ADD3 | BC062559 |
| 24 | Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3 | PSMA3 | BC038990 |
| 25 | Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C | ITPKC | NM_025194 |
| 26 | V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog 1 | YES1 | BC048960 |
| 27 | Beta-1,3-glucuronyltransferase 3 (glucuronosyltransferase P) | B3GAT3 | BC007906 |
| 28 | Ribosomal protein S4, X-linked | RPS4X | NM_001007 |
| 29 | ATPase, Class 2, type 9B | ATP9B | NM_198531 |
| 30 | Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kD, elongin A) | TCEB3 | BC002883 |
| 31 | Centrosomal protein Cep290 | CEP290 | AF273044 |
| 32 | cAMP responsive element binding protein 1 | CREB1 | NM_004379 |
| 33 | Selectin P (granule membrane protein 140kD, antigen CD62) | SELP | NM_003005 |
| 34 | Ets variant gene 1 | ETV1 | AF070641 |
| 35 | Ubiquitin specific peptidase 31 | UPS31 | AW440572 |
| 36 | Small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kD | SNAPC1 | NM_003082 |
| 37 | Complement component 8, alpha polypeptide | C8A | NM_000562 |
| 38 | Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) | AREG | NM_001657 |
| 39 | Kynureninase (L-kynurenine hydrolase) | KYNU | NM_003937 |
| 40 | SET and MYND domain containing 2 | SMYD2 | AF226053 |
| 41 | Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 1, beta | PRKAR1B | NM_002735 |
| 42 | Cartilage associated protein | CRTAP | NM_006371 |
| 43 | Homo sapiens, similar to RuvB (E coli homolog)-like 1, clone MGC:11137 | RUVBL1 | BC012886 |
| 44 | Fucosidase, alpha-L- 1, tissue | FUCA1 | BC017338 |
| 45 | Glucosidase, beta; acid (includes glucosylceramidase) | GBA | BC000349 |
| 46 | Zinc finger, BED-type containing 1 | ZBED1 | NM_004729 |
| 47 | Ciliary neurotrophic factor | CNTF | NM_000614 |
| 48 | Thyroid receptor interacting protein 15 | TRIP15 | BC012629 |
| 49 | Granzyme A | GZMA | BC015739 |
| 50 | Nuclear pore membrane protein 121 kDa | POM121 | AB014518 |
| 51 | Protein geranylgeranyltransferase type 1, beta subunit | PGGT1B | NM_005023 |
| 52 | Runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1) | RUNX1 | NM_001754 |
| 53 | Ets variant gene 5 (ets-related molecule) | ETV5 | BC007333 |

Taula 16. 53 seqüències, ordenades de menor a major expressió, obtingudes en l'anàlisi d'expressió gènica diferencial sobre *microarrays* de cDNA amb el seu símbol genètic i el seu n° d'accès a la base de dades GenBank. (En negreta es destaquen els dos gens amb els que s'ha dut a terme l'estudi, *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM*).

El conjunt de 53 gens coneguts es pot classificar en 7 categories funcionals diferents: 1) metabolisme cel·lular, 2) senyalització cel·lular, 3) regulació de la transcripció, 4) regulació del cicle cel·lular i proliferació, 5) receptors de membrana, 6) resposta immunològica i 7) trànsit cel·lular. Finalment, d'aquests gens amb expressió diferencial significativa entre la mostra normal i la tumoral, es van seleccionar els gens *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM*. El motiu pel qual es van seleccionar aquests dos gens fou perquè representaven la major sobreexpressió respecte la mostra calibradora de tot l'anàlisi, amb un nivell d'expressió mig de quatre vegades superior en les mostres tumorals respecte les mostres normals. Per tant van esdevenir uns candidats destacats per estudiar la seva implicació en la tumorigènesi endometrial. Tant per *RUNX1/AML1* com per *ETV5/ERM* es va dur a terme l'anàlisi de validació de l'expressió diferencial.

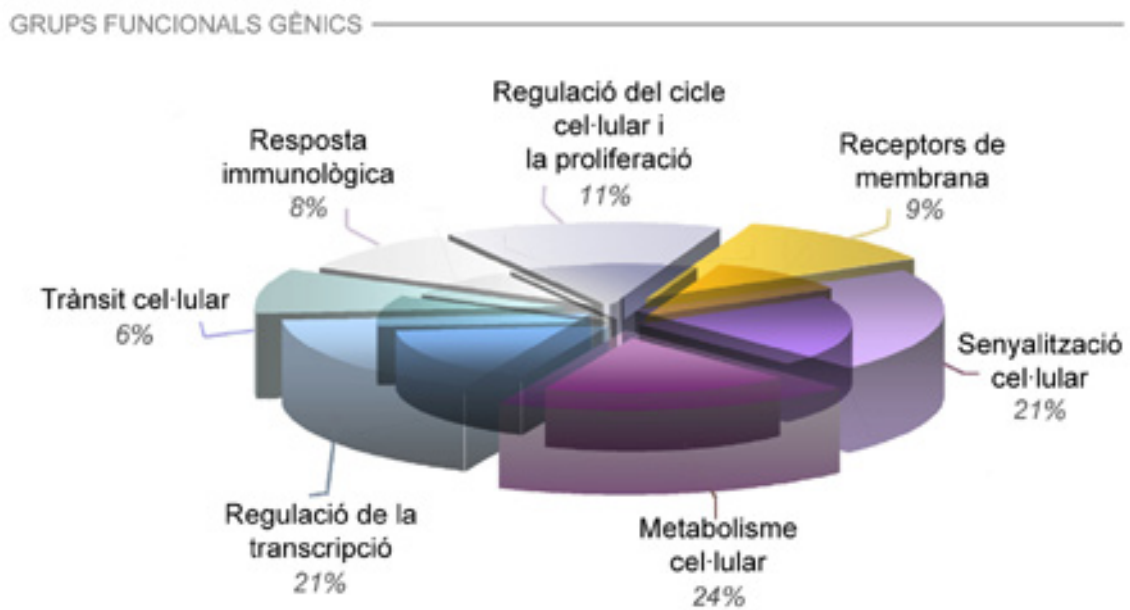


Figura 43, gràfic dels grups funcionals dels 53 gens alterats: el gràfic de sectors mostra l'agrupació dels 53 gens, identificats amb expressió diferencial entre l'EA i l'EEC, en els seus respectius grups funcionals. Els gens *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM* formen part del grup de regulació de la transcripció.

16. Validació de l'expressió diferencial per PCR a temps real

Una vegada obtinguts els resultats d'hibridació dels *microarrays* de cDNA i d'expressió diferencial es va verificar la suposada expressió diferencial obtinguda per la tècnica de la PCR a

temps real. Fins fa pocs anys la tècnica emprada solia ser el *Northern Blot* o la PCR convencional semiquantitativa. Durant els darrers anys, però, s'ha establert fermament la validesa de la tècnica de la PCR a temps real per quantificar amb precisió els nivells d'RNA o DNA de nombrosos casos partint d'una quantitat de mostra inicial baixa.

16.1. Obtenció del panell de mostres

La recollida, selecció i emmagatzemament de les mostres a estudi es va portar a terme sistemàticament fins a tenir un panell representatiu (*vegeu M i M*). Es van agrupar fins a 30 mostres de carcinoma endometrial del tipus histològic endometrioides d'estadis inicials IA fins a estadis molt avançats IIIA. Amb una (n=30), l'estudi a nivell estadístic es va considerar suficientment robust per poder obtenir resultats fiables.

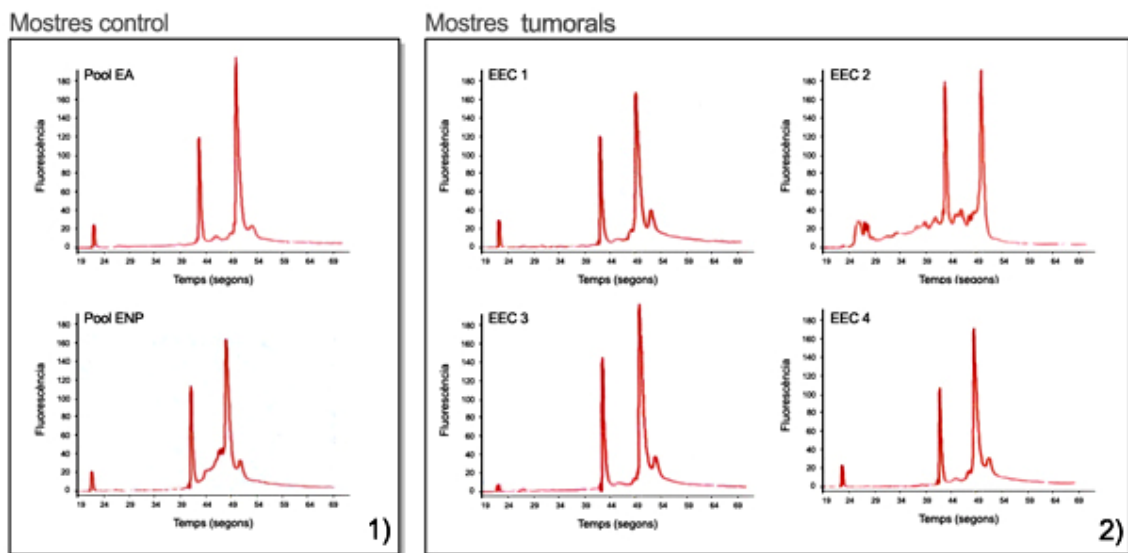


Figura 44, processament de les mostres utilitzades en la PCR a temps real: 1) imatge de l'electroferograma de l'RNA de les mostres control. Les gràfiques mostren un RNA d'alta qualitat. 2) imatge de l'electroferograma de l'RNA de 4 de les 30 mostres tumorals utilitzades en l'assaig. Es pot observar un RNA, provinent de mostres tumorals, d'alta qualitat.

Com a control es va utilitzar una mostra d'endometri normal atròfic (dilució de 16 mostres), com la mostra d'endometri normal proliferatiu (dilució de 4 mostres). Les mostres van ser processades i es va obtenir un cDNA de prou qualitat per poder portar a terme les anàlisis de PCR a temps real (Taula 10).

Com es pot observar en els perfils d'expressió de *RUNX1/AML1*, pràcticament tots els valors d'expressió del conjunt de mostres tumorals es trobaven per sobre d'1 (Fig. 45a i 45b). Aquest fet significa que existeix una sobreexpressió del gen *RUNX1/AML1* en les mostres tumorals respecte les mostres normals. Per donar significació estadística a aquest augment d'expressió es va aplicar el test estadístic *U* de Mann-Whitney. A més, assumint que el promig i la desviació estàndard obtinguda a partir de les dades calibrades definien bé la població, i que aquesta població s'associava a una distribució normal, es va poder calcular un llinar pel qual els valors de desviació estàndard distants de ($\pm 1,96$) es consideraven atípics (Fig. 46).

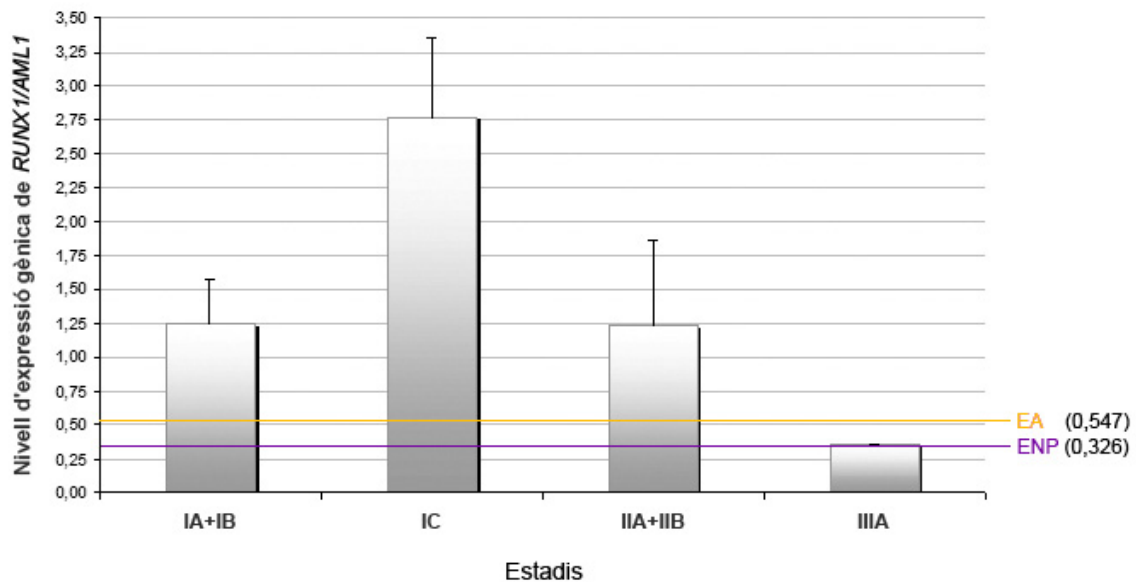


Figura 46, llinar de significació de l'expressió gènica de *RUNX1/AML1*: el gràfic mostra el nivell d'expressió del gen *RUNX1/AML1* agrupant les mostres pels estadis histològics: IA+IB, en què el tumor afecta principalment l'endometri; IC, en què hi ha una invasió tumoral de més del 50% del miometri; IIA+IIB, en què es dona afectació regional del tumor; i IIIA, en què es produeix una afectació del tumor a distància. El gràfic també mostra el llinar de significació de la sobreexpressió del gen respecte AE i ENP. Noti's l'alta sobreexpressió de *RUNX1/AML1* en l'estadi IC.

Els perfils d'expressió es van agrupar per conjunt d'estadis: 1) carcinoma confinant al cos uterí (IA+IB); 2) carcinoma amb una invasió miometrial de més del 50%, IC; 3) carcinoma amb afectació al cèrvix, (IIA+IIB); i 4) carcinoma amb afectació a la serosa uterina i els ganglis regionals, IIIA. El perfil d'expressió, com es pot observar (Fig. 46), augmenta i després decau i arriba a l'estadi IIIA, on es recuperen els nivells basals i hi ha una clara sobreexpressió de

RUNX1/AML1 des de l'estadi IA fins a l'estadi IIB i és en l'estadi IC on s'hi troba la màxima sobreexpressió. Els perfils d'expressió obtinguts per PCR a temps real suggereix una funció de *RUNX1/AML1* lligada als primers estadis de carcinogènesi, en concret amb l'estadi IC, estadi molt relacionat amb el procés d'infiltració tumoral. Aquests perfils d'expressió van permetre validar la sobreexpressió del gen *RUNX1/AML1* en el carcinoma endometrial respecte les mostres normals trobades en la hibridació dels *microarrays de cDNA* ($p=0,001$).

16.2.2. Anàlisi estadística dels perfils d'expressió de *RUNX1/AML1*

A partir dels resultats de sobreexpressió del gen *RUNX1/AML1* validats es va decidir realitzar un estudi estadístic amb el software estadístic *SPSS 12.0*[®] per tal d'analitzar la significació del conjunt de dades. Es van realitzar diferents comparacions estadístiques dels nivells d'expressió entre el conjunt d'estadis (IA+IB), IC, (IIA+IIB) i IIIA aplicant el test no paramètric *Rho* d'Spearman. Es va obtenir una alta significació estadística de la sobreexpressió del gen *RUNX1/AML1* en el estadi IC comparat amb (IA+IB) ($p=0.002$), amb (IIA+IIB) ($p=0.002$) i amb IIIA ($p=0,001$). Per tant no només es va observar una sobreexpressió del gen *RUNX1/AML1* en el carcinoma endometrial sinó que a més aquesta sobreexpressió esdevenia molt destacada en l'estadi IC, estadi molt relacionat amb la invasió miometrial de les cèl·lules tumorals.

16.3. Resultats d'expressió gènica d'*ETV5/ERM* per PCR a temps real

16.3.1. Anàlisi dels perfils d'expressió d'*ETV5/ERM*

A partir dels valors d'expressió relativa entre les mostres normals i tumorals de l'anàlisi computacional es van obtenir dos perfils d'expressió del gen *ETV5/ERM* en el carcinoma endometrial, com en el cas del gen en funció del teixit normal atròfic i un altre en funció del teixit normal proliferatiu, que es van representar gràficament (Fig. 47a i 47b).

Els resultats obtinguts en el perfil d'expressió d'*ETV5/ERM*, una vegada normalitzats vers el control atròfic i el control proliferatiu, mostraven que pràcticament tots els valors d'expressió del conjunt de mostres tumorals es trobaven per sobre 1 sobretot des de l'estadi IA fins a IC. Per tant pel cas d'*ETV5/ERM* també es va observar una sobreexpressió de les mostres tumorals respecte les mostres normals. Utilitzant el test estadístic *U* de Mann-Whitney i assumint que el promig i la desviació estàndard obtinguda a partir de les dades calibrades definien bé la població, i que aquesta població s'associava a una distribució normal, es va poder calcular un

llindar pel qual els valors de desviació estàndard distants de ($\pm 1,96$) es consideraven atípics (Fig. 48).

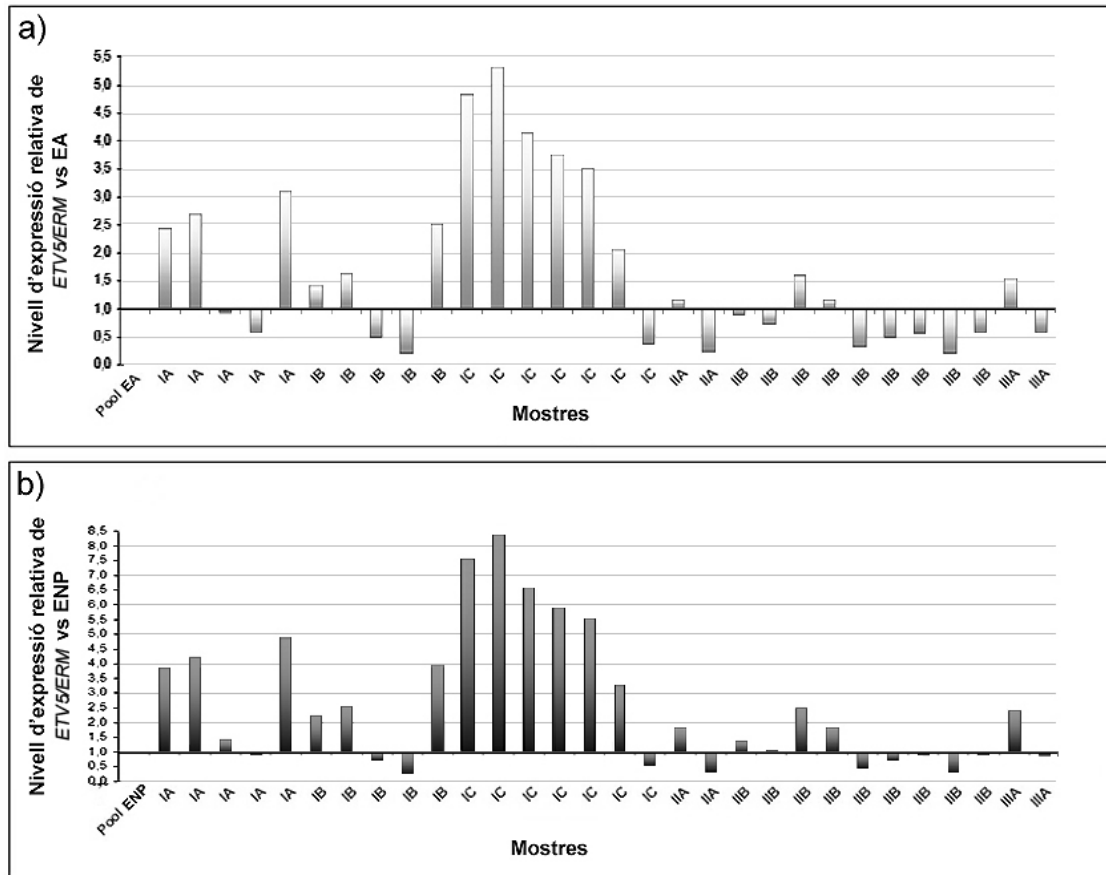


Figura 47a, perfil d'expressió d'ETV5/ERM per RT-Q-PCR calibrat per EA: el gràfic mostra l'expressió del gen *ETV5/ERM* respecte de la mostra control d'endometri atrofíic en el panell de 30 mostres de carcinoma endometrial endometrioiide. Noti's la sobreexpressió d'*ETV5/ERM* en les mostres d'estadi IC.

Figura 47b, perfil d'expressió d'ETV5/ERM per RT-Q-PCR calibrat per ENP: el gràfic mostra l'expressió del gen *ETV5/ERM* respecte de la mostra control d'endometri normal proliferatiu en el panell de 30 mostres de carcinoma endometrial endometrioiide. Noti's la sobreexpressió d'*ETV5/ERM* en les mostres d'estadi IC.

Pel cas d'*ETV5/ERM* els perfils d'expressió també es van agrupar per conjunt d'estadis: (IA+IB), IC, (IIA+IIB) i IIIA. Els nivells d'expressió d'*ETV5/ERM*, sorprenentment segueixen un perfil molt semblant al trobat per *RUNX1/AML1*. El perfil, com es pot observar (Fig. 48), augmenta i després decau arribant a l'estadi IIIA on es recuperen els nivells basals, tot mostrant

una clara sobreexpressió de *RUNX1/AML1* des de l'estadi IA fins a l'estadi IC on així com passava amb *RUNX1/AML1* s'hi troba la màxima sobreexpressió. Els perfils d'expressió obtinguts per PCR a temps real tant per *ETV5/ERM* com per *RUNX1/AML1* suggereixen una funció lligada als primers estadis de la carcinogènesi, en concret a l'estadi IC, relacionat amb el procés d'infiltració. Amb aquests resultats es van fer les anàlisis de correlació per trobar si presentaven significació estadística. Els perfils d'expressió, també van permetre validar la sobreexpressió del gen *ETV5/ERM* en el carcinoma endometrial respecte les mostres normals trobada en la hibridació dels *microarrays de cDNA* ($p=0,032$).

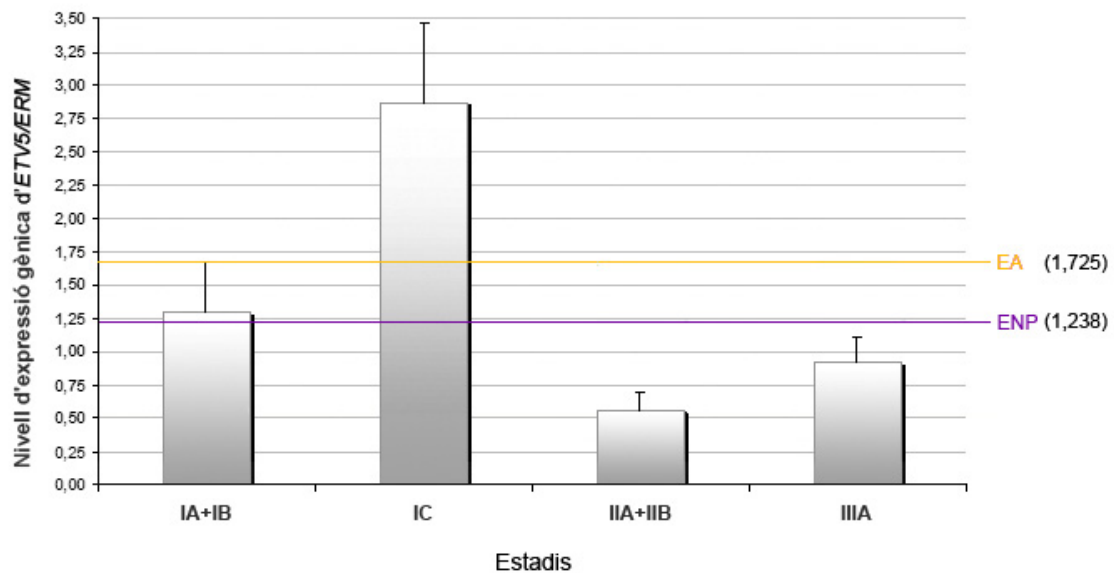


Figura 48, llindar de significació de l'expressió gènica d'ETV5/ERM: el gràfic mostra el nivell d'expressió del gen *ETV5/ERM* agrupant les mostres pels estadis histològics: IA+IB, el tumor afecta principalment l'endometri; IC, hi ha una invasió tumoral de més del 50% del miometri; IIA+IIB, afectació regional del tumor; i IIIA, afectació del tumor a distància. El gràfic, també, mostra el llindar de significació de la sobreexpressió del gen, respecte AE i ENP. És remarcable l'alta sobreexpressió d'*ETV5/ERM* en l'estadi IC.

16.3.2. Anàlisi estadística dels perfils d'expressió d'ETV5/ERM

Amb els resultats de la sobreexpressió del gen *ETV5/ERM* també es va realitzar una anàlisi de significació estadística del conjunt de dades obtingudes amb el software estadístic *SPSS 12.0*[®]. Es van analitzar les comparacions estadístiques dels nivells d'expressió entre el conjunt d'estadis (IA+IB), IC, (IIA+IIB) i IIIA aplicant, també, el test no paramètric *Rho* d'Spearman.

A partir de la qual es va obtenir una alta significació estadística de la sobreexpressió del gen *ETV5/ERM* a l'estadi IC comparat amb (IA+IB) ($p=0.0032$), amb (IIA+IIB) ($p=0.001$) i amb IIIA ($p=0,001$). Per tant, en aquest cas també es va observar que la sobreexpressió del gen *ETV5/ERM* en el carcinoma endometrial, no només es donava respecte les mostres normals, sinó que a més, esdevenia molt destacada en l'estadi IC. Aquests sorprenents resultats, en què es repeten els mateixos perfils d'expressió pels dos gens al llarg del procés tumorigènic, feien pensar en la possibilitat que *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM* es trobessin cooperant l'un amb l'altre. I altrament que aquesta cooperació es donés durant el fenomen d'invasió miometrial, moment en el qual s'ha trobat la màxima sobreexpressió d'ambdós gens. Per això es va decidir fer un estudi de correlació entre els perfils obtinguts per PCR a temps real.

17. Estudi de l'expressió diferencial proteica per *western blot*

Mitjançant la tècnica de la PCR a temps real es va validar la sobreexpressió tant de *RUNX1/AML1* com d'*ETV5/ERM* en el carcinoma endometrial a nivell d'RNA. Per tal d'analitzar la sobreexpressió d'ambdós gens a nivell proteic es van emprar dues tècniques que permeten la valoració de l'expressió de la proteïna, la tècnica del *western blot* i la de la immunohistoquímica, ja que és la macromolècula proteica la que en últim terme realitza la funció del gen.

17.1. Obtenció del panell de mostres

Per portar a terme l'anàlisi de validació de l'expressió diferencial a nivell proteic es van utilitzar mostres d'endometri tumoral de l'estadi IC, l'estadi invasiu amb la major expressió d'ambdós marcadors tant *RUNX1/AML1* com *ETV5/ERM*, així com mostres de l'estadi IIB per determinar l'evolució en l'expressió dels marcadors al llarg de la tumorigènesi. Les mostres de teixit utilitzades corresponien a mostres utilitzades també per l'assaig de PCR a temps real, per tal d'obtenir una correlació directa entre l'expressió d'RNA i l'expressió de la proteïna. Un cop extreta la proteïna total del conjunt de mostres, quantificada i desnaturalitzada es van dur a terme els experiment de *western blot* per les proteïnes *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM*.

17.2. Resultats de l'expressió proteica de RUNX1/AML1 per *western blot*

A partir de l'experiment de *western blot* es poden veure els nivells d'expressió de la proteïna RUNX1/AML1 en cadascuna de les mostres tumorals acompanyades de les seves respectives mostres control (endometri normal atrofíic). L'anàlisi d'expressió proteica mostra una banda d'uns 53 kDa, corresponent a RUNX1/AML1, la qual presenta una clara expressió diferencial entre les mostres normals i tumorals una vegada normalitzats els valors d'expressió respecte la β -actina. L'anàlisi de densitometria reforça els resultats observats dotant d'un valor numèric cadascuna de les intensitats de senyal de la banda. Per tant, la comparació dels resultats de densitometria va permetre validar la sobreexpressió del gen *RUNX1/AML1* a nivell proteic. Així doncs, en augmentar el nivell d'mRNA també augmenta el nivell de proteïna. Respecte les mostres d'estadi IC el nivell d'expressió de RUNX1/AML1 sembla ser més alt que en la mostra d'estadi IIB, però hi ha una certa variació entre mostres.

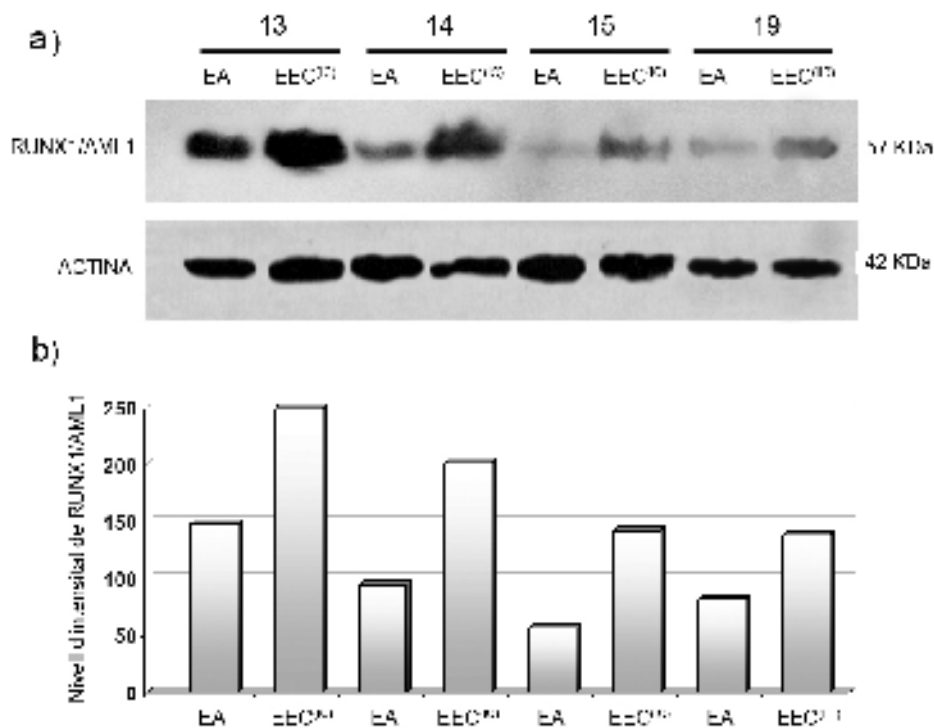


Figura 49a, WB de RUNX1/AML1: imatge del *western blot* realitzat amb 4 de les mostres tumorals emprades en l'RT-Q-PCR (3 d'estadi IC i 1 d'estadi IIB) amb les seves respectives parelles normals. Es pot observar la sobreexpressió proteica de RUNX1/AML1 en les mostres tumorals respecte de les normals. L'actina mostra la normalització de la càrrega proteica utilitzada.

Figura 49b, densitometria del WB de RUNX1/AML1: la densitometria de les bandes obtingudes en el *western blot* confirma la sobreexpressió proteica de RUNX1/AML1 en les mostres tumorals.

17.3. Resultats de l'expressió proteica d'ETV5/ERM per *western blot*

En l'experiment de *western blot* de la proteïna ETV5/ERM també s'observen els nivells d'expressió proteics en cadascuna de les mostres tumorals i en les seves respectives parelles control (endometri normal atròfic). El *western blot* mostra una banda d'uns 64 kDa, corresponent a ETV5/ERM, molt més intensa en les mostres tumorals que en les normals una vegada normalitzats els valors d'expressió respecte la β -actina. L'anàlisi de densitometria corrobora els resultats observats visualment. Així doncs, la comparació dels resultats de densitometria, també va permetre validar la sobreexpressió del gen *ETV5/ERM* a nivell proteic. En aquest cas les mostres d'estadi IC també presentaven un nivell d'expressió d'ETV5/ERM més alt que en la mostra IIB en el mateix sentit que els resultats trobats per RNA.

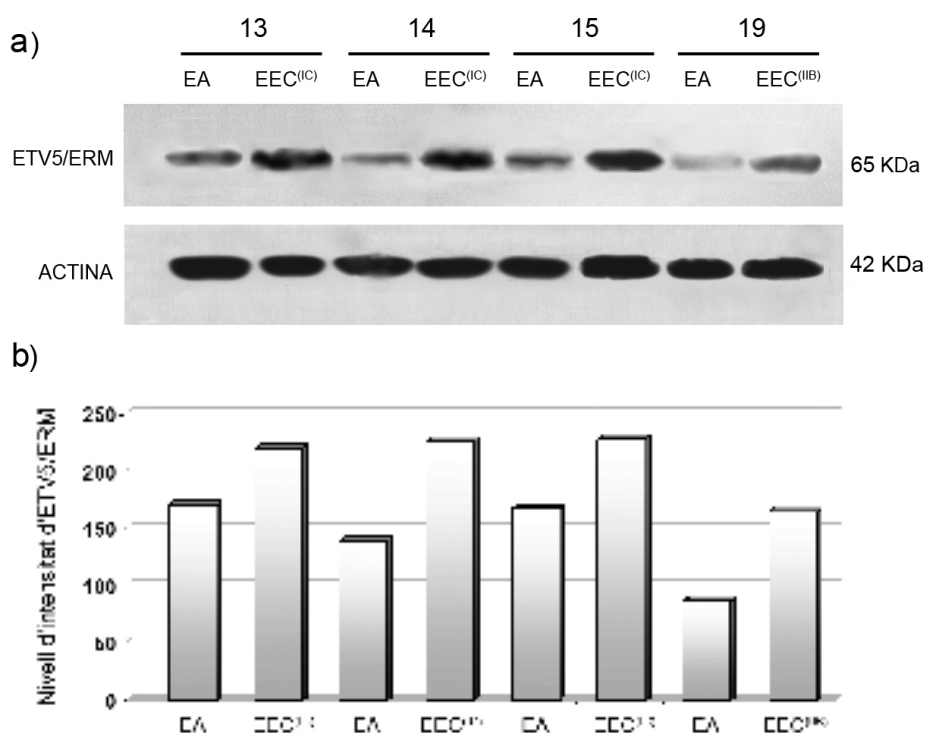


Figura 50a, WB d'ETV5/ERM: imatge del *western blot* realitzat amb 4 de les mostres tumorals emprades en l'RT-Q-PCR (3 d'estadi IC i 1d'estadi IIB) amb les seves respectives parelles normals. Es pot observar la sobreexpressió proteica d'ETV5/ERM en les mostres tumorals respecte de les normals. L'actina mostra la normalització de la càrrega proteica utilitzada.

Figura 50b, densitometria del WB d'ETV5/ERM: la densitometria de les bandes obtingudes en el *western blot* confirma la sobreexpressió proteica d'ETV5/ERM en les mostres tumorals.

18. Estudi de l'expressió diferencial proteica en *arrays* de teixit

La validació de l'expressió diferencial a nivell proteic no tan sols es va portar a terme amb la tècnica de *western blot* sinó que també es va emprar la immunohistoquímica, tècnica que no només va permetre l'anàlisi de l'expressió proteica sinó també l'anàlisi de la seva localització. Es va decidir realitzar un estudi de l'expressió proteica d'ambdós gens al llarg del procés tumorigènic, és a dir situant-nos en un context postmenopàusic es va estudiar l'expressió de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM, en tot el repertori tissular des del teixit normal atròfic fins al carcinoma endometrial endometriode, passant per les hiperplàsies simples i complexes.

18.1. Obtenció dels repertoris d'*arrays* de teixit

Seguint el protocol detallat de construcció es van obtenir tres *arrays* de teixit diferents, amb les mostres prèviament diagnosticades pels serveis de patologia de l'Hospital de la Vall d'Hebron i de l'Hospital del Mar de Barcelona.

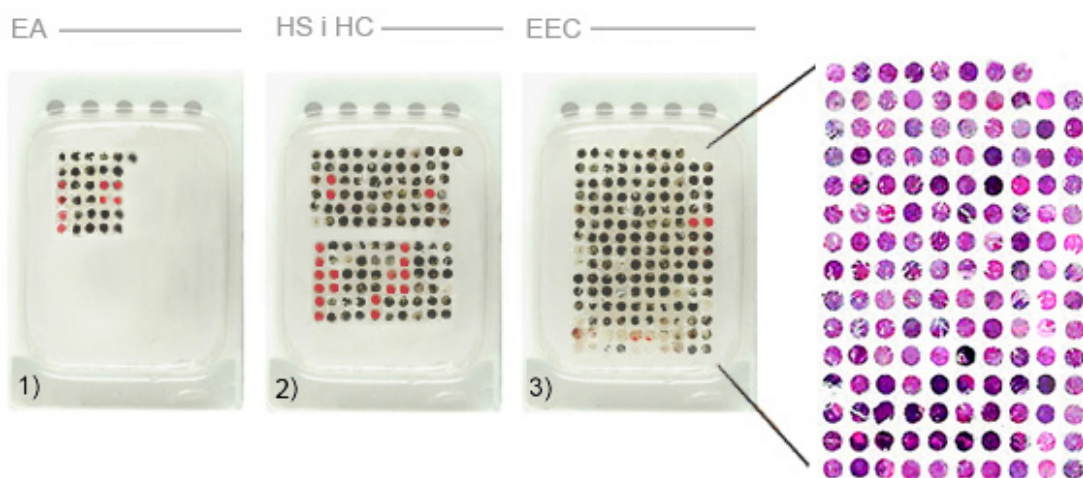


Figura 51, imatge dels TMA's d'EA, HS, HC i EEC: 1) imatge del bloc de parafina de l'*array* de teixit atròfic (15×2 + mostra de referència) . 2) imatge del bloc de parafina de l'*array* de teixit d'hiperplàsies simples (30×2) i hiperplàsies complexes (30×2 + mostra de referència). 3) imatge del bloc de parafina de l'*array* de teixit de carcinoma endometrial endometriode (74×2). A la dreta de la fig. es mostra una ampliació de la tinció d'hematoxilina/eosina realitzada en un tall de l'*array* tumoral.

Un primer *array* de teixit normal atròfic (15 mostres per duplicat), un segon *array* d'hiperplàsies (30 mostres per duplicat d'hiperplàsia simple i 30 mostres per duplicat d'hiperplàsia complexa amb atípia focal) i finalment un últim *array* de carcinoma endometrial

de tipus endometriode (74 mostres per duplicat d'un estadi comprès entre IA i IIIB). Amb aquest repertori d'*arrays* es van realitzar les immunohistoquímiques tant per RUNX1/AML1 com per ETV5/ERM.

18.2. Resultats de l'expressió proteica de RUNX1/AML1 en *arrays* de teixit

A partir de la immunohistoquímica sobre els *arrays* de teixit es van obtenir tres tipus de resultats: els qualitius, referents a la validesa de l'experiment d'immunohistoquímica, els descriptius, referents a la localització i distribució de la proteïna dins de la cèl·lula, i els quantitius referents al nivell d'expressió de la proteïna.

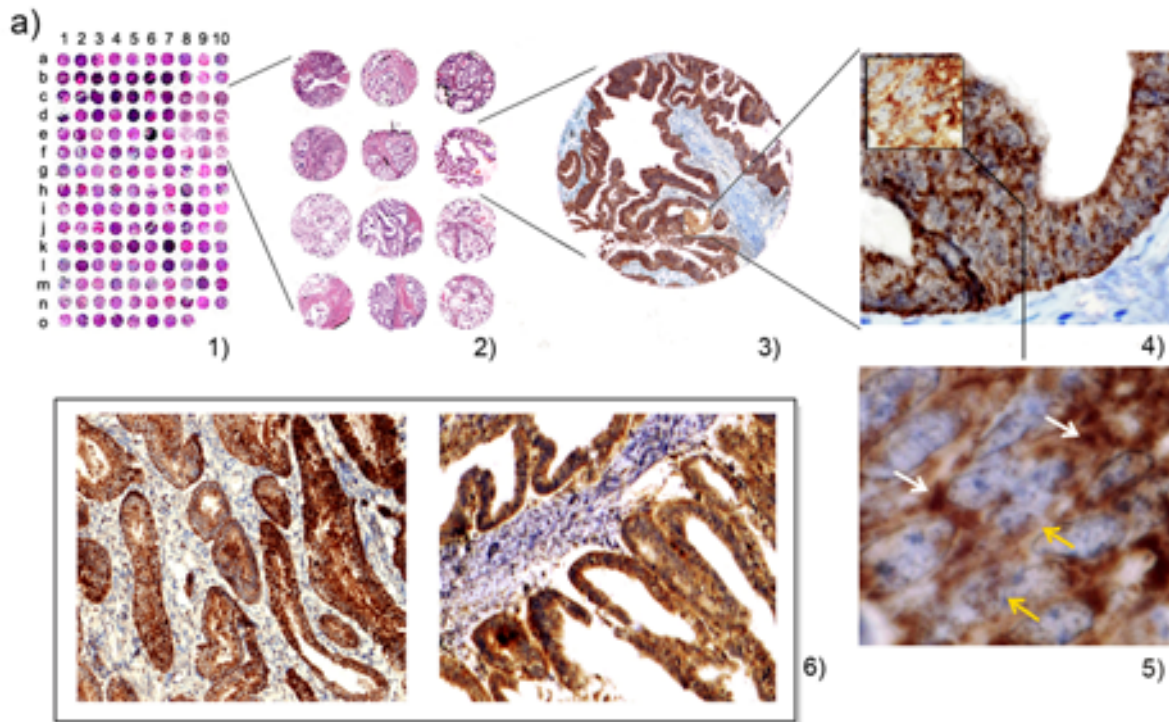


Figura 52a, localització cel·lular de RUNX1/AML1 en la IHQ dels TMAs: el recull d'imatges mostren les ampliacions des del tall sencer de l'*array* tumoral fins a l'observació del marcatge a nivell cel·lular. 1) hematoxilina/eosina de l'*array* tumoral amb les seves coordenades a 10x; 2) detall de l' hematoxilina/eosina de l'*array* tumoral a 20x; 3) imatge d'un punt de l'*array* tumoral a 40x, destaca el marcatge immunohistoquímic de RUNX1/AML1 en les glàndules epitelials, en contrast amb la negativitat de l'estroma; 4) detall del punt de l'*array* tumoral a 200x; 5) detall del punt de l'*array* tumoral a nivell cel·lular a 400x, es pot observar tant el marcatge citoplasmàtic de RUNX1/AML1 (fletxes blanques), com el marcatge nuclear puntejat (fletxes grogues); 6) detall de diferents punts de l'*array* tumoral amb un alt marcatge de RUNX1/AML1 en les glàndules epitelials a 100x.

Pel que fa als resultats qualitatius de l'anticòs antiRUNX1/AML1 (N-20), cal dir que es va posar a punt fins arribar a la concentració òptima d'1/50 amb un marcatge específic del teixit control (timus), que presenta una alta expressió de RUNX1/AML1. Els resultats descriptius mostraven, en primer lloc, un marcatge epitelial de RUNX1/AML1 ja que es mostrava molt positiu en l'epiteli endometrial, en concret en les glàndules, i completament negatiu en l'estroma.

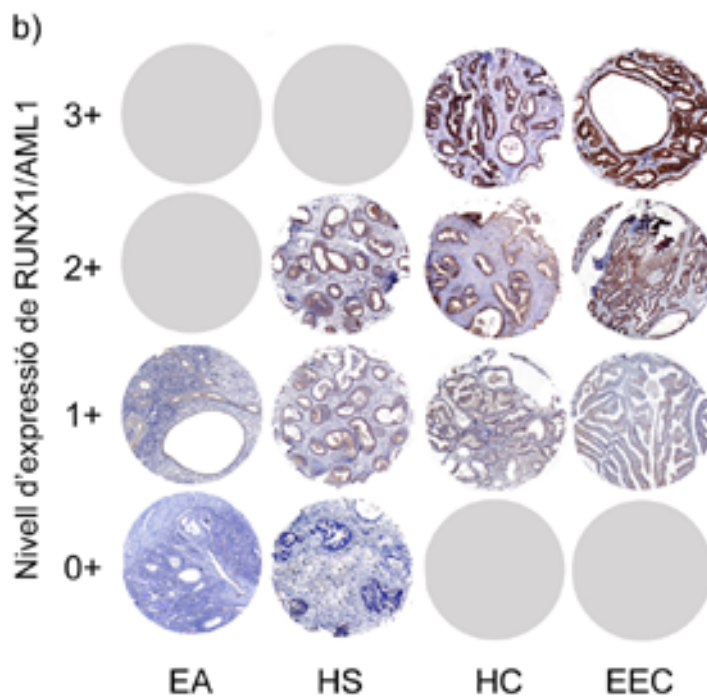


Figura 52b, imatge dels punts dels TMA's amb marcatge de RUNX1/AML1: composició d'imatges de punts dels diferents arrays de teixit. La imatge mostra el nivell d'expressió proteica de RUNX1/AML1 en cadascun dels teixits: endometri atròfic EA (0-1), hiperplàsia simple HS (0-2), hiperplàsia complexa HC (1-3) i carcinoma endometrial endometriode EEC (1-3). Observi's l'augment progressiu d'expressió de RUNX1/AML1 al llarg de la tumorigènesi endometrial. Els cercles grisos representen els nivells d'expressió no existents.

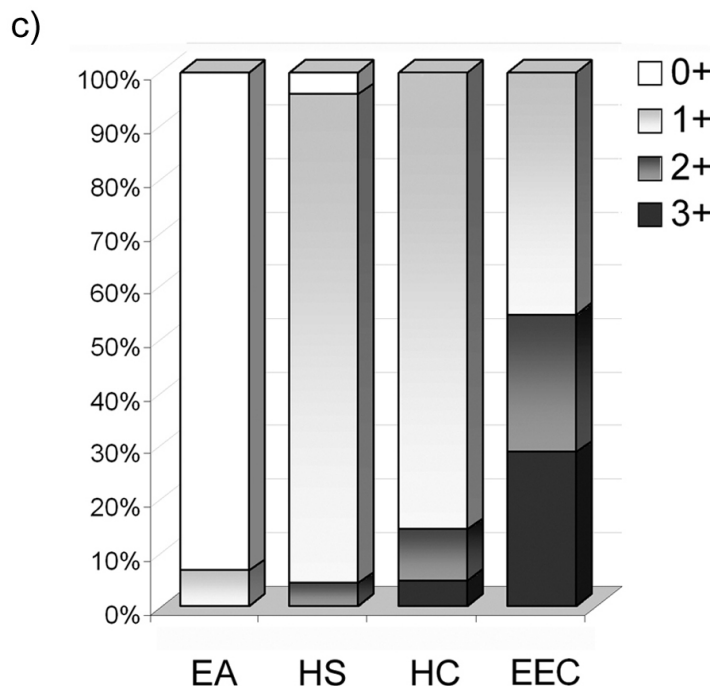


Figura 52c, quantificació del nivell d'expressió de RUNX1/AML1 en els TMA's: el gràfic mostra la quantificació dels nivells d'expressió proteica de RUNX1/AML1 en tots els arrays de teixit. El marcatge es va establir segons els criteris utilitzats en el camp de l'anatomia patològica com: 0 expressió negativa, 1 expressió baixa, 2 expressió mitja i 3 expressió alta. En el gràfic es fa més evident l'augment progressiu d'expressió de RUNX1/AML1 al llarg de la tumorigènesi endometrial. Destaca l'alta expressió en l'array tumoral, respecte dels altres teixits.

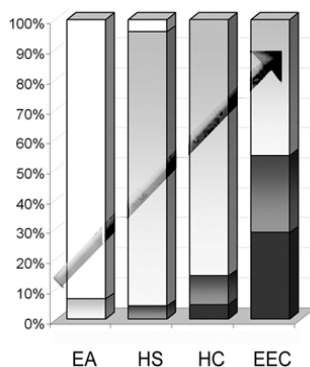
Quant a la localització cel·lular, el marcatge de RUNX1/AML1 es va observar principalment en el citoplasma, però també en el nucli on a més seguia un patró puntejat (Fig. 52a). Finalment els resultats quantitius mostraven una gradació del marcatge de RUNX1/AML1 al llarg del procés tumorigènic, amb uns valors pràcticament negatius en l'endometri atrofíic (0-1) uns resultats d'expressió intermitjos en la hiperplàsia simple (1-2), uns resultats d'expressió alts per a la hiperplàsia complexa (1-3) i uns resultats d'expressió molt alts per al carcinoma endometrial (2-3). Per tant dels resultats s'observa que l'augment d'expressió de RUNX1/AML1 està amb concordança amb l'evolució del procés tumoral (Fig. 52b i 52c).

Per dotar de significació estadística aquests resultats es va aplicar el test *Rho* d'Spearman. Es varen comparar les diferències d'expressió entre el conjunt d'*arrays* i es van obtenir diferències significatives en comparar l'expressió de RUNX1/AML1 en el teixit normal atrofíic vers les hiperplàsies i el carcinoma endometrial ($p=0,001$), així com en comparar les hiperplàsies amb el carcinoma ($p=0,001$) (Fig. 52d). Així doncs l'anàlisi d'expressió en *arrays* de teixit no només ha permès la validació de l'expressió diferencial a nivell de proteïna sinó que a més ha mostrat un altre nivell de regulació de RUNX1/AML1 al llarg del procés tumoral.

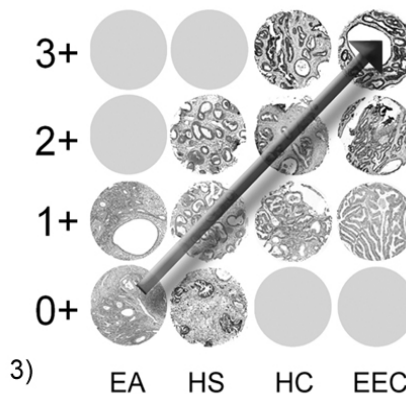
d)

| RUNX1 | AE | SH | CH | EEC | <i>Rho</i> d'Spearman |
|-------|------|------|----|------|-----------------------|
| □ 0+ | 93,3 | 4,2 | 0 | 0 | EEC vs EA $p=0,001$ |
| ▒ 1+ | 6,7 | 91,6 | 85 | 45,4 | EEC vs HC $p=0,001$ |
| ■ 2+ | 0 | 4,2 | 10 | 25,8 | EEC vs HS $p=0,001$ |
| ■ 3+ | 0 | 0 | 5 | 28,8 | HC vs EA $p=0,001$ |
| | | | | | HS vs EA $p=0,001$ |

1)



2)



3)

Figura 52d, diagrama dels resultats estadístics de RUNX1/AML1 en els TMA:

1) resultats numèrics del % de nivells d'expressió de RUNX1/AML1 en cadascun dels *arrays* de teixit, així com el valors de significació estadística del test *Rho* d'Spearman de les comparacions realitzades; 2) gràfic de quantificació en el que s'observa l'augment d'expressió de RUNX1/AML1 en el procés de tumorigènesi; 3) imatge dels punts dels *arrays* on es destaca l'augment d'expressió de RUNX1/AML1 en el procés tumorigènic.

18.3. Resultats de l'expressió proteica d'ETV5/ERM en *arrays* de teixit

Els resultats qualitius de la immunohistoquímica amb l'anticòs antiETV5/ERM (C-19) mostraven una concentració òptima de treball, també d'1/50 amb el teixit control específic (cervell), que presenta una alta expressió d'ETV5/ERM. Així com en el cas de RUNX1/AML1 els resultats descriptius mostraven una expressió epitelial d'ETV5/ERM a les glàndules i un marcatge negatiu a l'estroma endometrial. Quant a la localització cel·lular de l'expressió d'ETV5/ERM es va trobar marcatge tant a nucli com a citoplasma, amb una major expressió en aquest últim compartiment subcel·lular (Fig. 53a).

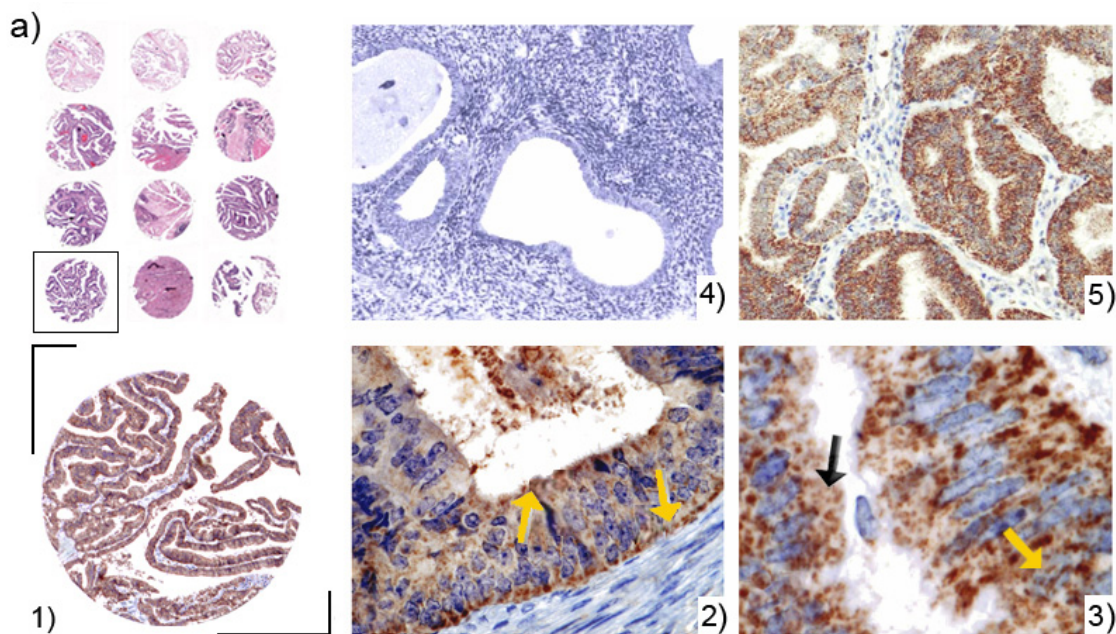


Figura 53a, localització cel·lular d'ETV5/ERM en la IHQ dels TMAs: el recull d'imatges mostren les ampliacions des del tall d'hematoxilina/eosina de l'*array* tumoral fins a l'observació del marcatge a nivell cel·lular. 1) imatge d'un punt de l'*array* tumoral a 40×, destaca el marcatge immunohistoquímic d'ETV5/ERM en les glàndules epitelials, en contrast amb la negativitat de l'estroma. A la part superior detall de l'hematoxilina/eosina de l'*array* tumoral a 20×; 2) detall del punt de l'*array* tumoral a 200×. Les fletxes grogues destaquen les regions amb més intensitat de marcatge; 3) detall del punt de l'*array* tumoral a nivell cel·lular a 400×, es pot observar tant el marcatge citoplasmàtic d'ETV5/ERM (fletxa negra), com el marcatge nuclear (fletxa groga); 4) detall de teixit endometrial atròfic a 100× on s'observa la negativitat d'expressió d'ETV5/ERM tant a les glàndules epitelials com en l'estroma; 5) el teixit tumoral contrasta amb el teixit atròfic per la positivitat d'expressió d'ETV5/ERM a les glàndules epitelials. Detall d'un punt de l'*array* tumoral a 100×.

Els resultats qualitius per a ETV5/ERM mostraven una gradació del marcatge al llarg de la tumorigènesi, amb valors d'expressió molt baixos a l'endometri atròfic (0-1) valors

d'expressió intermitjos a la hiperplàsia simple (0-2), valors d'expressió alts per a la hiperplàsia complexa (1-3) i finalment valors d'expressió alts per al carcinoma endometrial (2-3) (Fig. 53b i 53c).

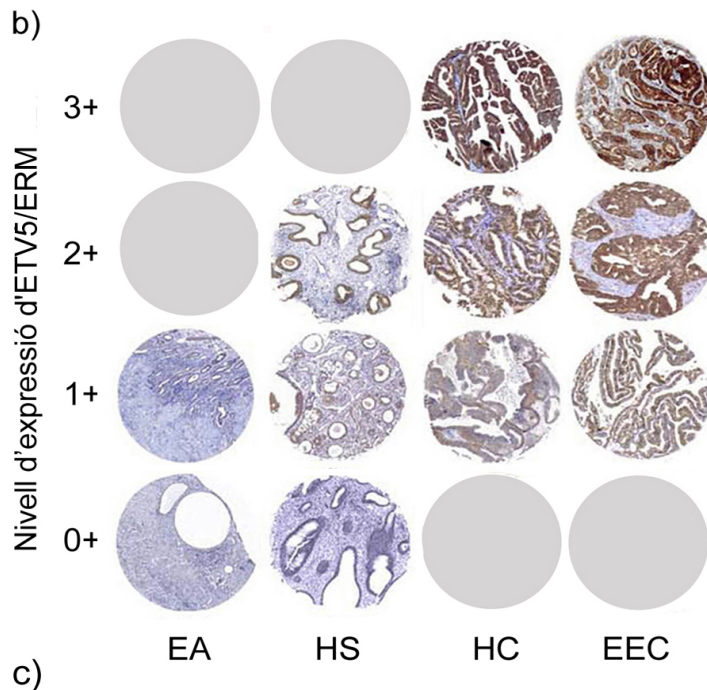


Figura 53b, imatge dels punts dels TMAs amb marcatge d'ETV5/ERM: composició d'imatges de punts dels diferents *arrays* de teixit. La imatge mostra el nivell d'expressió proteica d'ETV5/ERM en cadascun dels teixits: endometri atròfic EA (0-1), hiperplàsia simple HS (0-2), hiperplàsia complexa HC (1-3) i carcinoma endometrial endometriode EEC (1-3). Noti's l'augment progressiu d'expressió d'ETV5/ERM al llarg de la tumorigènesi endometrial. Els cercles grisos representen els nivells d'expressió no existents.

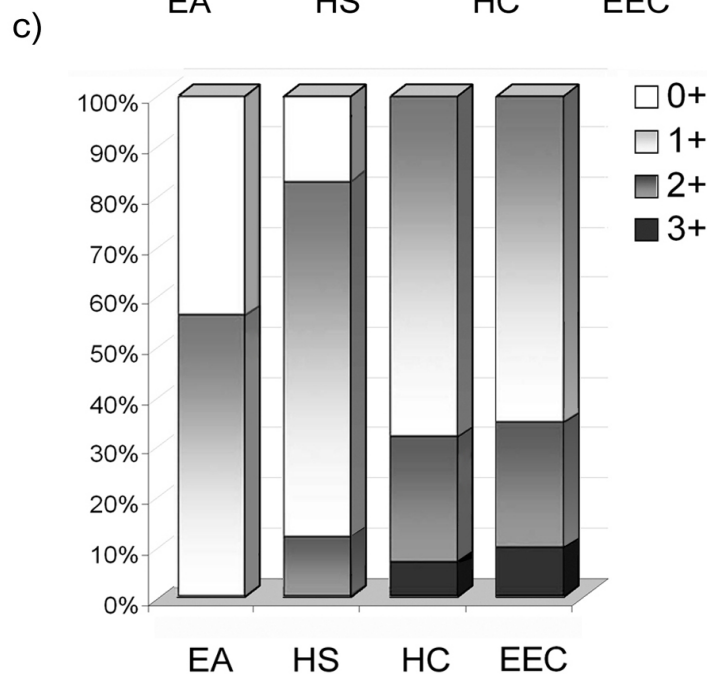


Figura 53c, quantificació del nivell d'expressió d'ETV5/ERM en els TMAs: el gràfic mostra la quantificació dels nivells d'expressió proteica d'ETV5/ERM en tots els *arrays* de teixit. El marcatge es va establir com: 0 expressió negativa, 1 expressió baixa, 2 expressió mitja i 3 expressió alta. En el gràfic es fa més evident l'augment progressiu d'expressió d'ETV5/ERM al llarg de la tumorigènesi endometrial. Destaca l'alta expressió en l'*array* tumoral, respecte dels altres teixits.

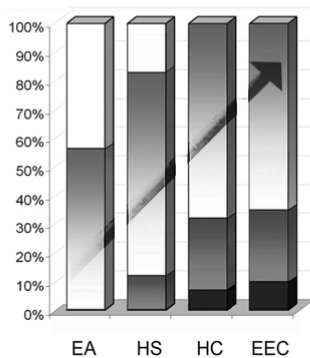
A més l'anàlisi estadística aplicant el test *Rho* d'Spearman va mostrar diferències significatives en comparar els nivells d'expressió entre el conjunt d'*arrays*. S'obtingueren resultats

significatius en comparar el teixit normal atròfic en front les hiperplàsies i el carcinoma endometrial ($p=0,001$), i en comparar les hiperplàsies amb el carcinoma ($p=0,001$) (Fig. 53d). Els resultats de l'expressió proteica d'ETV5/ERM també augmenten progressivament al llarg de l'evolució del procés tumoral. Per tant aquesta anàlisi ha permès la validació de l'expressió diferencial de la proteïna ETV5/ERM, tot mostrant, com en el cas de RUNX1/AML1, un altre nivell de regulació d'ETV5/ERM al llarg del procés tumoral.

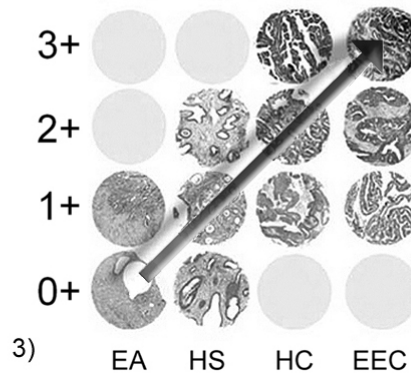
d)

| ETV5 | AE | SH | CH | EEC | <i>Rho</i> d'Spearman |
|------|------|------|------|------|-----------------------|
| □ 0+ | 43,8 | 16,9 | 0,0 | 0,0 | EEC vs EA $p=0,001$ |
| ▒ 1+ | 56,3 | 71,2 | 68,2 | 65,0 | EEC vs HC $p=0,001$ |
| ■ 2+ | 0,0 | 11,9 | 25,0 | 25,2 | EEC vs HS $p=0,001$ |
| ■ 3+ | 0,0 | 0,0 | 6,8 | 9,8 | |

1)



2)



3)

Figura 53d, diagrama dels resultats estadístics d'ETV5/ERM en els TMAs: 1) resultats numèrics del % dels nivells d'expressió d'ETV5/ERM en cadascun dels arrays de teixit així com el valor de significació estadística del test *Rho* d'Spearman de les comparacions realitzades; 2) gràfic de quantificació en el que s'observa l'augment d'expressió d'ETV5/ERM en el procés de tumorigènesi; 3) imatge dels punts dels arrays on es destaca l'augment d'expressió d'ETV5/ERM al llarg de la tumorigènesi endometrial.

19. Estudi d'expressió *in vitro* dels gens seleccionats

Per tal de demostrar l'especificitat dels anticossos utilitzats tant a l'assaig de *western blot* com al d'immunohistoquímica sobre els arrays de teixit es va optar per realitzar dues construccions gèniques per cadascun dels gens conjuntament amb la proteïna de fusió GFP (*green fluorescent protein*). Ambdues construccions van ser transfectades de manera transitòria a la línia cel·lular HEC-IA, i les cèl·lules van sobreexpressar el gen d'interès conjuntament amb la GFP. Aquest fet va permetre no només determinar l'especificitat dels anticossos contra RUNX1/AML1 i

contra ETV5/ERM sinó que a més va permetre determinar la localització subcel·lular d'ambdues proteïnes.

19.1. Resultats de les construccions de *RUNX1/AML1* i d'*ETV5/ERM* amb la GFP

La construcció per expressar la proteïna quimèrica GFP-RUNX1/AML1 es va realitzar en el vector *pEGFP-C1*, de la mateixa manera que la construcció d'*ETV5/ERM* es va realitzar en el vector *pEGFP-C2* (Fig. 54). Després d'analitzar el lloc d'inserció dels vectors es va determinar que *pEGFP-C1* era òptim per *RUNX1/AML1* mentre que *pEGFP-C2* ho era per *ETV5/ERM* ja que proporcionaven un inici de pauta de lectura correcte per ambdós casos. La seqüenciació d'ambdues construccions va permetre confirmar la presència de cadascun dels inserts corresponents, així com la correcta orientació i pauta de lectura.

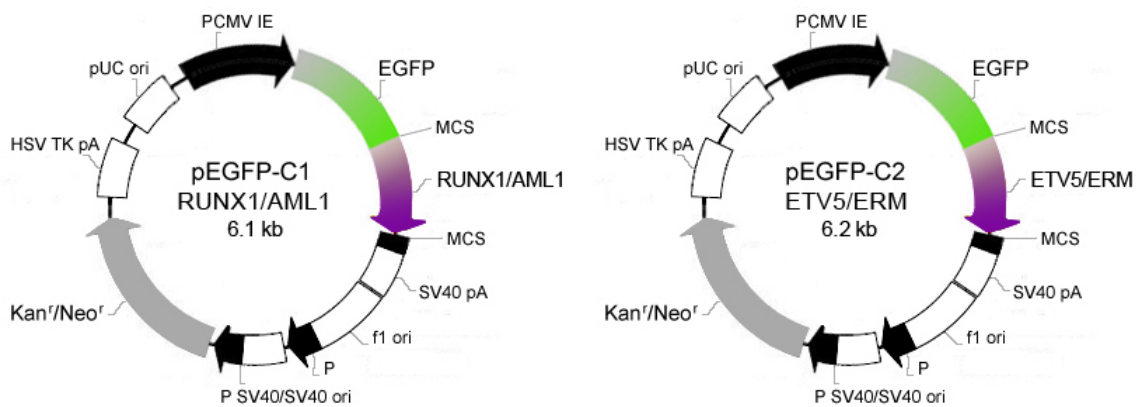


Figura 54, esquema de les construccions GFP-RUNX1/AML1 i GFP-ETV5/ERM: l'esquema mostra els mapes dels plasmidis *pEGFP-C1-RUNX1/AML1* i *pEGFP-C2-ETV5/ERM*. Ambdós gens es troben en pauta de lectura darrera la GFP permetent generar proteïnes de fusió amb aquesta proteïna. Ambdós plasmidis contenen Kan^r/Neo^r per poder ser transfectats en línies cel·lulars.

19.2. Resultats de les transfeccions en la línia HEC-IA

Per realitzar els assajos in vitro es va seleccionar la línia cel·lular HEC-IA, en primer lloc perquè originàriament provenia d'un carcinoma endometrial de tipus endometrioides i en segon lloc perquè el carcinoma d'origen era d'un estadi primerenc IA.

Les transfeccions transitòries dels plasmidis *pEGFP-C1-RUNX1/AML1* i *pEGFP-C2-ETV5/ERM* (vegeu *M i M*) van permetre determinar per una banda la localització subcel·lular tant de

RUNX1/AML com d' *ETV5/ERM* i per una altra demostrar la qualitat del marcatge obtingut en l'estudi d'expressió proteica.

19.2.1. Localització subcel·lular de les proteïnes de fusió transfectades

19.2.1.1. Localització subcel·lular de la GFP-*RUNX1/AML1*

La proteïna de fusió amb la GFP va permetre determinar per fluorescència la localització intracel·lular del factor de transcripció *RUNX1/AML1*. El patró de distribució mostrava un marcatge principalment nuclear amb un patró granular semblant al marcatge nuclear puntejat observat en la immunohistoquímica dels *arrays* de teixit (Fig. 52a). No obstant això, el marcatge també es trobava al llarg del citoplasma de la cèl·lula amb una distribució homogènia corroborant també l'observat per immunohistoquímica (Fig. 55a).

19.2.1.2. Localització subcel·lular de la GFP-*ETV5/ERM*

El patró de distribució fluorescent de la GFP mostrava una localització d'*ETV5/ERM* tant al compartiment nuclear, amb un marcatge intens, com al compartiment citoplasmàtic, amb una distribució homogènia (Fig. 55b). Pel cas d'*ETV5/ERM* els resultats també van resultar ser concordants amb la immunohistoquímica de l'*array* de teixit (Fig. 53a).

HEC-IA

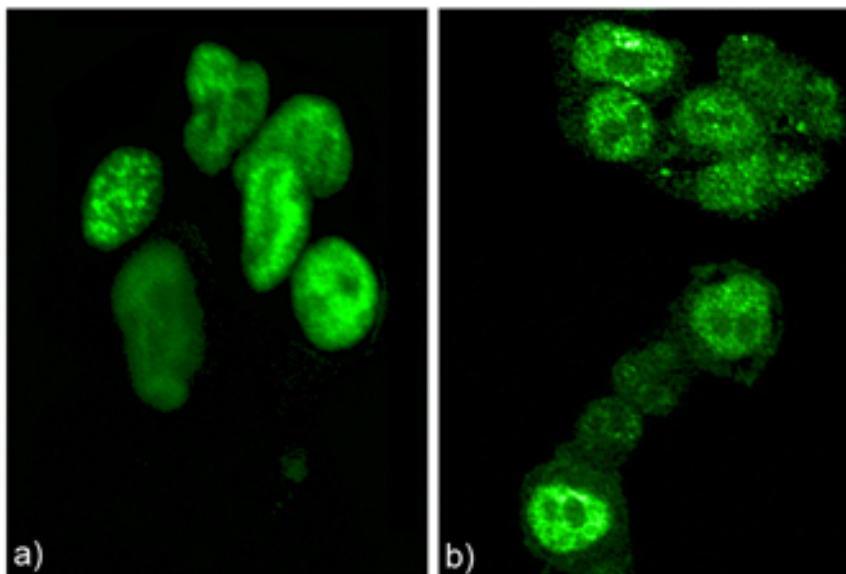


Figura 55a, imatge de la transfecció GFP-*RUNX1/AML1*: la imatge mostra el marcatge verd fluorescent de la proteïna de fusió GFP-*RUNX1/AML1* en la línia cel·lular transfecta HEC-IA. Servei de microscòpia confocal, UCTS.

Figura 55b, imatge de la transfecció GFP-*ETV5/ERM*: la imatge mostra el marcatge verd fluorescent de la proteïna de fusió GFP-*ETV5/ERM* en la línia cel·lular transfecta HEC-IA. Servei de microscòpia confocal, UCTS.

19.2.2. Resultats de col·localització de les línies HEC-IA transfectades

Per tal de validar l'especificitat dels anticossos contra RUNX1/AML1 i ETV5/ERM utilitzats en els assajos d'expressió proteica es va realitzar un assaig d'immunocitoquímica sobre les línies cel·lulars transfectades amb cadascuna de les proteïnes de fusió.

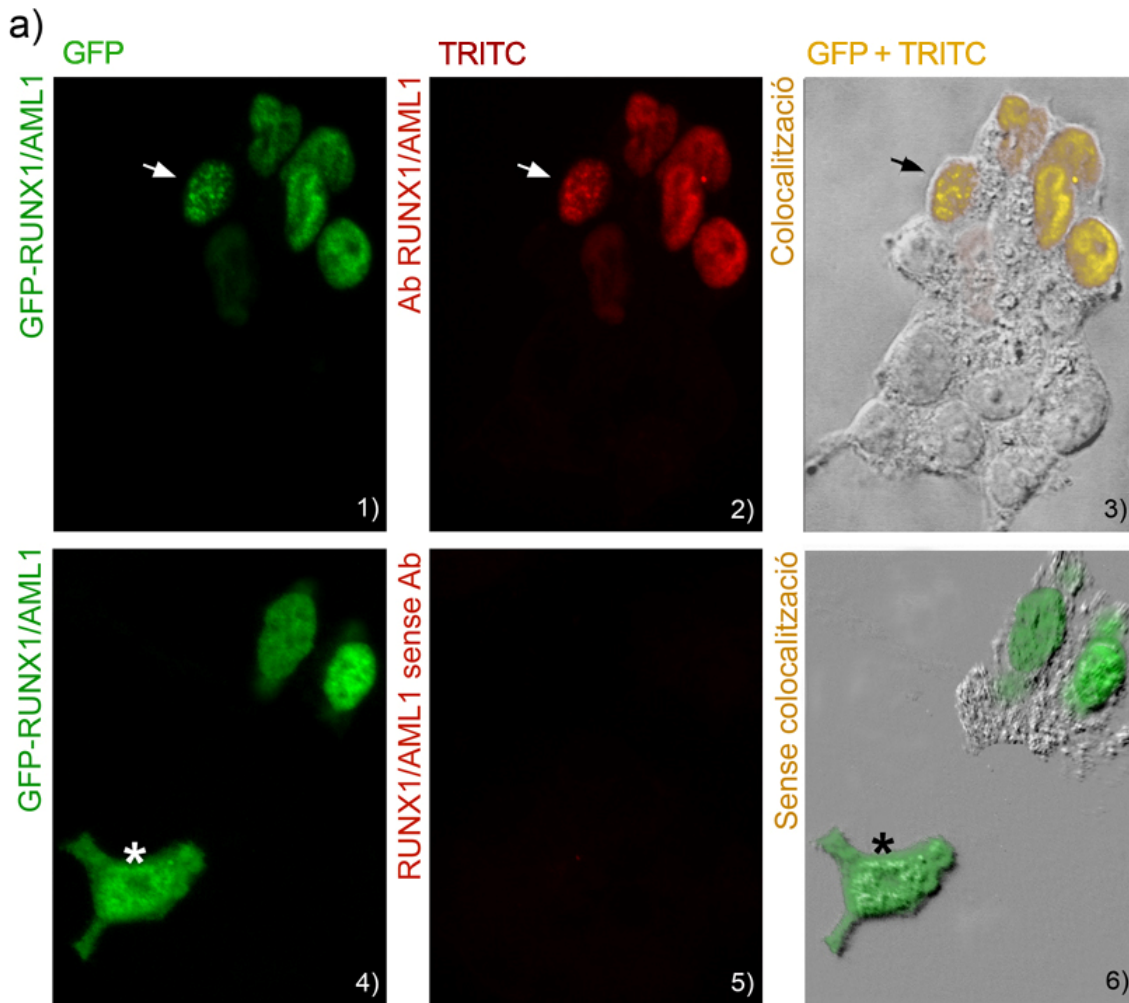


Figura 56a, imatge de la ICQ fluorescent, col·localització de RUNX1/AML1 i la GFP: la imatge mostra la col·localització de la GFP i RUNX1/AML1 en la línia cel·lular transfectada HEC-IA a 630 \times , demostrant l'especificitat de l'anticòs contra RUNX1/AML1 utilitzat en l'estudi de TMA's. 1) transfecció de la línia cel·lular HEC-IA; imatge de la fluorescència verda de la GFP; 2) ICQ contra RUNX1/AML1 en la línia cel·lular HEC-IA transfectada; imatge de la fluorescència vermella de l'anticòs secundari conjugat amb TRITC; 3) imatge de la col·localització del marcatge amb la GFP i amb TRITC. La col·localització (color groc) demostra l'especificitat del marcatge de l'anticòs contra RUNX1/AML1, perquè coincideix la localització de la GFP amb RUNX1/AML1; 4) transfecció de la línia cel·lular HEC-IA; imatge de la fluorescència verda de la GFP; (*) mostra, també, el marcatge citoplasmàtic de la GFP; 5) control sense incubació amb l'anticòs primari; 6) imatge de transmissió, només s'observa el marcatge de la GFP. Servei de microscòpia confocal, UCTS.

Els resultats de col·localització, obtinguts per microscopia confocal van confirmar que, efectivament, en la mateixa localització on hi havia marcatge de la proteïna de fusió GFP també hi havia el marcatge específic de cadascun dels anticossos (Fig. 56a,56b), tot demostrant que en tot moment el marcatge obtingut per ambdós anticossos era específic.

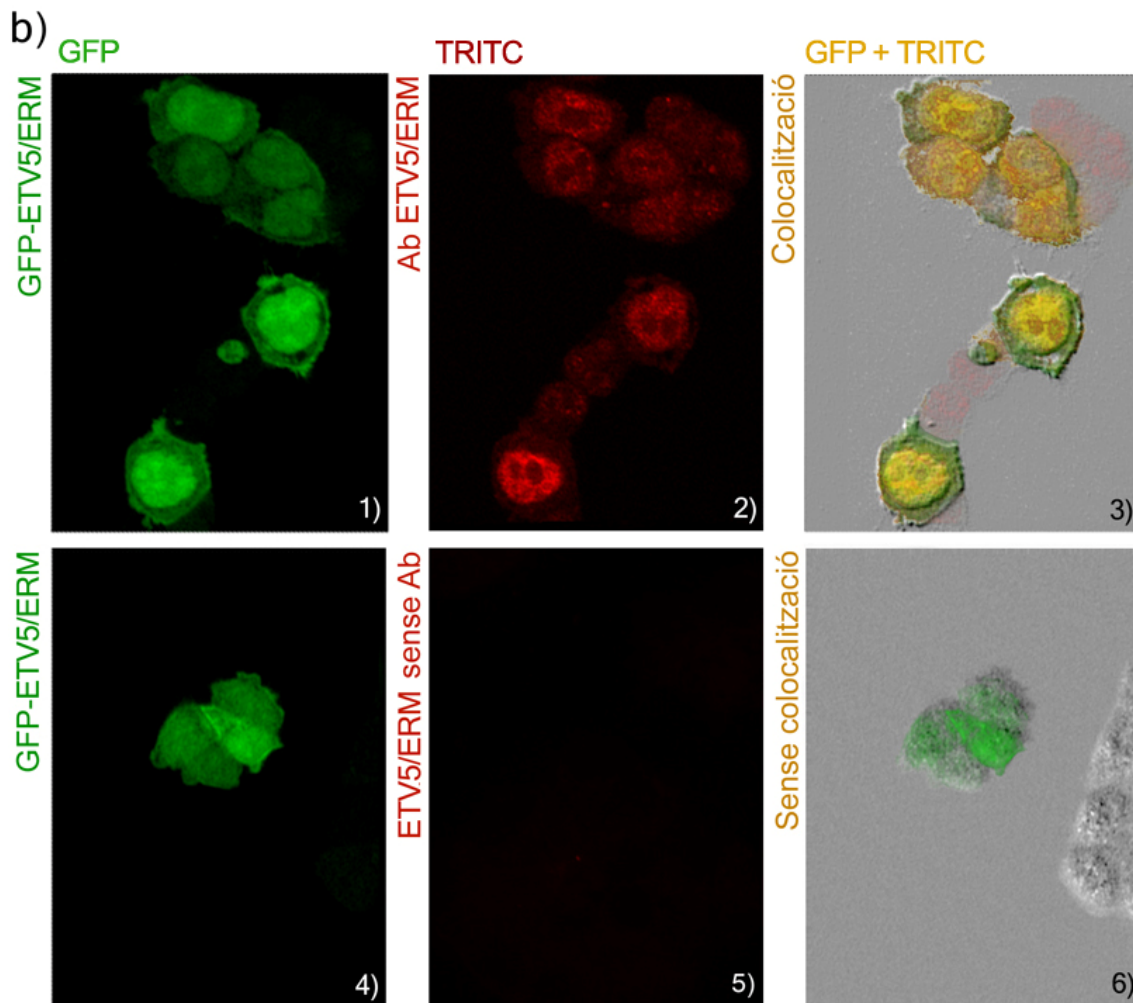


Figura 56b, imatge de la ICQ fluorescent, col·localització d'ETV5/ERM i la GFP: la imatge mostra la col·localització de la GFP i ETV5/ERM en la línia cel·lular transfectada HEC-1A a 630 \times , demostrant l'especificitat de l'anticòs contra ETV5/ERM utilitzat en l'estudi de TMAs. 1) transfecció de la línia cel·lular HEC-1A; imatge de la fluorescència verda de la GFP; 2) ICQ contra ETV5/ERM en la línia cel·lular HEC-1A transfectada; imatge de la fluorescència vermella de l'anticòs secundari conjugat amb TRITC; 3) imatge de la col·localització del marcatge amb la GFP i amb TRITC. La col·localització (color groc) demostra l'especificitat del marcatge de l'anticòs contra ETV5/ERM, perquè coincideix la localització de la GFP amb ETV5/ERM; 4) transfecció de la línia cel·lular HEC-1A; imatge de la fluorescència verda de la GFP; 5) control sense incubació amb l'anticòs primari; 6) imatge de transmissió, només s'observa el marcatge de la GFP. Servei de microscòpia confocal, UCTS.

20. Anàlisi de possibles mecanismes d'acció de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM en el carcinoma endometrial

La darrera part de l'estudi va consistir en intentar comprendre els mecanismes de regulació que condueixen a la sobreexpressió d'ambdós gens, les repercussions *downstream* de la sobreexpressió, així com, la seva implicació en el carcinoma endometrial endometriode. En primer lloc es van realitzar estudis de correlació entre els dos gens atesa la seva semblança pel que fa als perfils d'expressió, i seguidament es van començar a estudiar les dianes de regulació per a RUNX1/AML1 ja que, com que aquest gen està molt estudiat en la leucèmia mieloide aguda, es coneixen moltes de les seves dianes de regulació.

20.1. Resultats de l'estudi de correlació dels perfils d'expressió gènica i proteica de RUNX1/AML1 i d'ETV5/ERM

20.1.1. Resultats de l'estudi de correlació dels perfils d'expressió gènica

L'estudi de correlació es va dur a terme amb el software estadístic SPSS 12.0[®] aplicant el test de Wilcoxon per a dades aparellades.

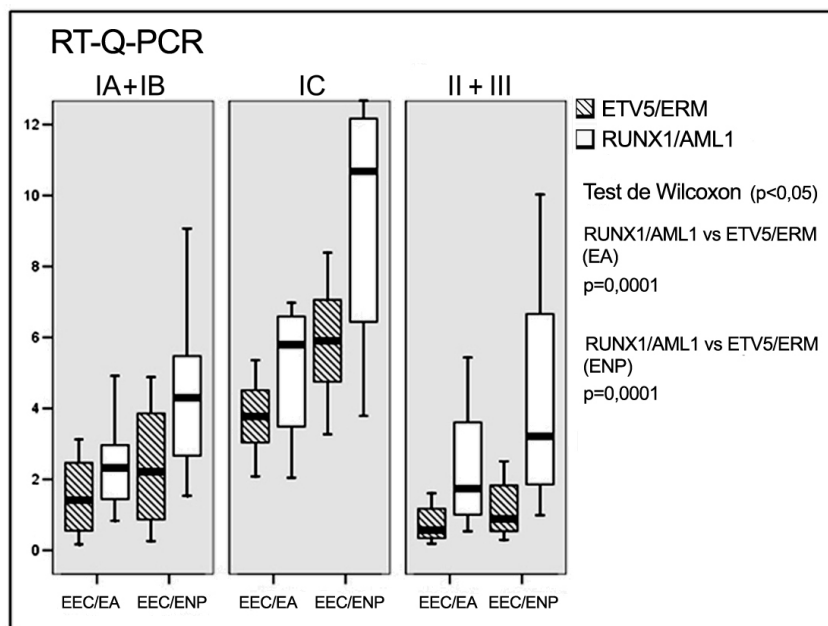


Figura 57, diagrama dels resultats estadístics de correlació de l'expressió gènica: el diagrama mostra la representació gràfica de la correlació de l'expressió gènica de RUNX1/AML1 i ETV5/ERM obtinguda amb el test de Wilcoxon. El gràfic, agrupat per estadis, permet observar que en augmentar ETV5/ERM també augmenta l'expressió de RUNX1/AML1. A la dreta de la fig. es representen els valors de significació del test estadístic.

Els resultats obtinguts van mostrar una correlació positiva entre els nivells d'expressió d'ambdós gens, en el sentit que quan augmentava *RUNX1/AML1* també augmentava *ETV5/ERM*. Els estudis de correlació es van analitzar tenint en compte els perfils de la mostra normal atròfica i de la mostra normal proliferativa. La significació obtinguda en l'estudi de correlació va ser ($p=0,0001$) per ambdós controls.

20.1.2. Resultats de l'estudi de correlació de l'expressió proteica

Atès el comportament tant semblant d'ambdós gens tant pel que fa als perfils d'expressió gènica com als perfils d'expressió proteica, es va decidir completar l'estudi analitzant la correlació de l'expressió proteica entre *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM*. Les dades es van analitzar estadísticament aplicant el test de Wilcoxon per a dades aparellades, tot obtenint una correlació positiva entre l'expressió proteica de *RUNX1/AML1* i l'expressió proteica d'*ETV5/ERM* ($p=0,001$). Els resultats per tant mostren que en augmentar l'expressió de *RUNX1/AML1* paral·lelament també augmenta l'expressió d'*ETV5/ERM*. L'estudi de correlació tant a nivell gènica com proteica suggereix la cooperació d'aquests dos factors de transcripció no només en fenòmens d'invasió sinó també en el procés de tumorigènesi endometrial.

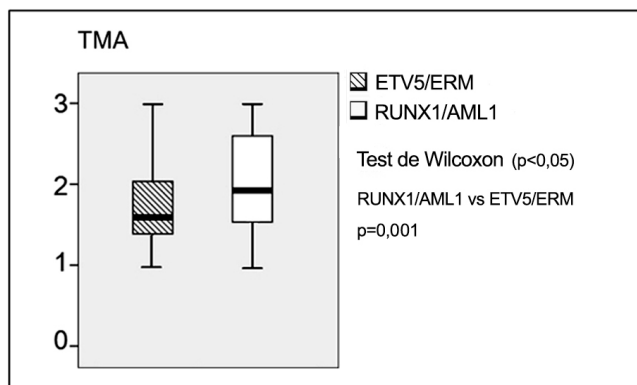


Figura 58, diagrama dels resultats estadístics de correlació de l'expressió proteica: imatge de la representació gràfica de la correlació de l'expressió proteica de *RUNX1/AML1* i *ETV5/ERM* obtinguda amb el test de Wilcoxon. A la dreta de la fig. es representa el valor de significació del test estadístic.

20.2. Estudi de la diana de regulació de *RUNX1/AML1*: *p21^{WAF1/CIP1}*

Les dianes de regulació de *RUNX1/AML1* que s'estudiaren en aquest treball es van seleccionar partint dels estudis ja realitzats sobre aquest gen en la leucèmia mieloide aguda. Amb l'ajuda dels treballs de Michaud i col·laboradors⁽²⁵⁶⁾ i dels estudis previs de Lutterbach i col·laboradors⁽²⁷²⁾ es van seleccionar les dianes seguint les següents premisses: en primer lloc

L'anàlisi per PCR a temps real del nivell d'expressió gènica de $p21^{WAF1/CIP1}$ en el panell de 30 mostres de carcinoma endometrial va mostrar un increment de l'expressió en les mostres tumorals quan els valors es normalitzaven respecte el control normal atròfic o el control normal proliferatiu. En analitzar l'expressió en funció dels estadis histològics des de l'estadi inicial IA fins a l'estadi metastàtic IIIA es va obtenir la sobreexpressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ en els estadis inicials quan el carcinoma es troba localitzat a la cavitat uterina (IA-IC) i en els estadis amb afectació fora de la cavitat uterina (IIA-IIB). Pel que fa a l'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ en els estadis metastàtics IIIA els valors presentaven el nivell de l'estat d'expressió basal (Fig 59a, 59b i 59c).

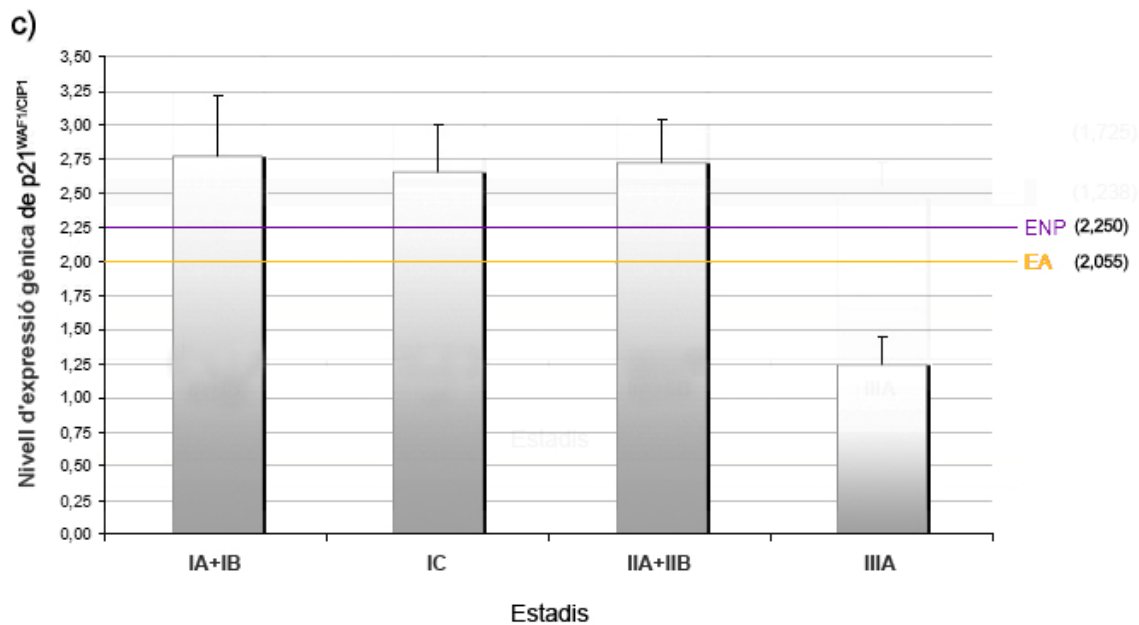


Figura 59c, perfil d'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ per estadis histològics: el gràfic mostra el nivell d'expressió del gen $p21^{WAF1/CIP1}$ agrupant les mostres pels estadis histològics: IA+IB, el tumor afecta principalment l'endometri; IC, hi ha una invasió tumoral de més del 50% del miometri; IIA+IIB, afectació regional del tumor; i IIIA, afectació del tumor a distància. El gràfic també mostra el llindar de significació de la sobreexpressió del gen respecte AE i ENP.

20.2.2. Resultats del perfil d'expressió proteica de $p21^{WAF1/CIP1}$ en l'EEC

Per tal d'estudiar el nivell d'expressió proteica de $p21^{WAF1/CIP1}$ en el procés de tumorigènesi endometrial es van realitzar els assajos de *western blot* i d'immunohistoquímica en els *arrays* de teixit construïts. Els resultats de *western blot* paral·lels als realitzats anteriorment mostraven una clara sobreexpressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ respecte la mostra normal atròfica amb una lleugera

disminució d'expressió en la mostra amb afectació fora de la cavitat uterina IIB; aquest perfil d'expressió proteica s'ajustava al perfil d'expressió gènica obtingut per PCR a temps real (Fig. 60a i 60b).

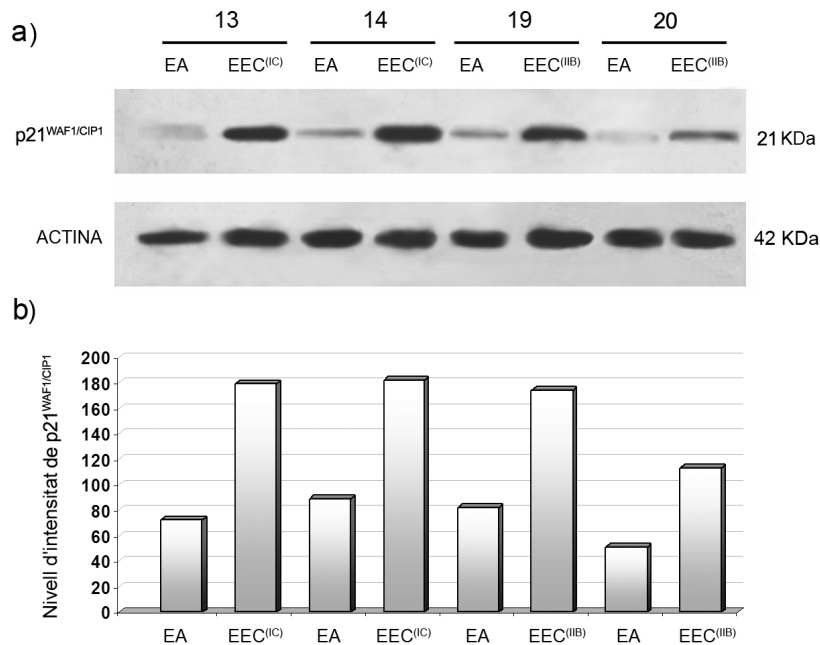


Figura 60a, WB de p21^{WAF1/CIP1}: imatge del *western blot* realitzat amb 4 de les mostres tumorals emprades en l'RT-Q-PCR (2 d'estadi IC i 2 d'estadi IIB) amb les seves respectives parelles normals. Es pot observar la sobreexpressió proteica de p21^{WAF1/CIP1} en les mostres tumorals respecte de les normals. L'actina mostra la normalització de la càrrega proteica utilitzada.

Figura 60b, densitometria del WB de p21^{WAF1/CIP1}: la densitometria de les bandes obtingudes en el *western blot* confirma la sobreexpressió proteica de p21^{WAF1/CIP1} en les mostres tumorals.

Finalment l'anàlisi d'expressió proteica de p21^{WAF1/CIP1} sobre el conjunt d'*arrays* de teixit mostraven un marcatge específic a les glàndules epitelials acompanyat d'un marcatge negatiu al component estromal. A major augment l'expressió de p21^{WAF1/CIP1} mostrava majoritàriament un marcatge en el compartiment nuclear, en certes ocasions acompanyat d'un marcatge suau en el citoplasma cel·lular (Fig. 61).

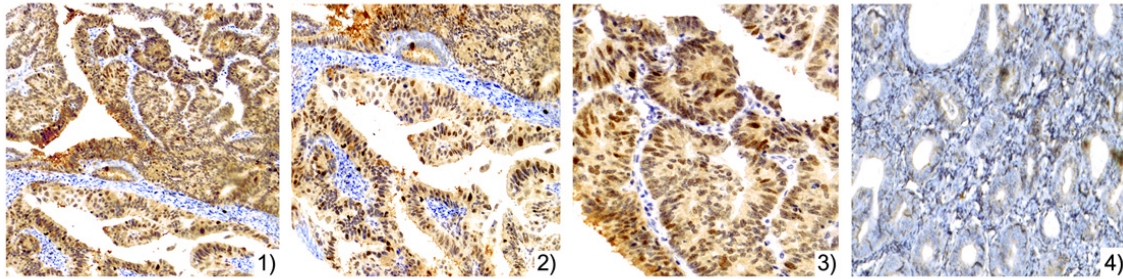


Figura 61, localització cel·lular de p21^{WAF1/CIP1} en la IHQ dels TMAs: recull d'imatges que mostren del marcatge immunohistoquímic de p21^{WAF1/CIP1}. 1) detall d'un punt de l'array tumoral a 100×; 2) detall del punt de l'array tumoral a 200×; 3) detall del punt de l'array tumoral a nivell cel·lular a 400×. Destaca el marcatge immunohistoquímic de p21^{WAF1/CIP1} en les glàndules epitelials, en contrast amb la negativitat de l'estroma. Es pot observar el marcatge principalment nuclear de p21^{WAF1/CIP1} però també citoplasmàtic; 4) detall d'un punt de l'array de teixit atrofic. Destaca la baixa expressió de p21^{WAF1/CIP1} en les glàndules endometrials.

20.2.3. Resultats de la correlació estadística de p21^{WAF1/CIP1}, RUNX1/AML1 i ETV5/ERM

L'anàlisi es va concloure estudiant la correlació estadística entre els resultats d'expressió gènica i proteica de p21^{WAF1/CIP1} en relació en primer lloc amb RUNX1/AML1, atès que presenta un domini d'unió directa a p21^{WAF1/CIP1}, i en segon lloc a ETV5/ERM, per tal com presenta un perfil d'expressió gènica i proteica tant semblant a RUNX1/AML1.

20.2.3.1. Resultats de correlació en els perfils d'expressió gènica

p21^{WAF1/CIP1} ha estat descrit com un regulador del cicle cel·lular que alhora es troba regulat, amb una certa complexitat, pel factor de transcripció RUNX1/AML1⁽²⁵⁶⁾. En l'estudi de correlació estadística es va voler determinar si els nivells d'expressió de p21^{WAF1/CIP1} determinats en el panell de mostres tumorals d'endometri correlacionava amb els nivells d'expressió de RUNX1/AML1 en el mateix panell de mostres. Aplicant el test de correlació *Rho* d'Spearman es va trobar una correlació positiva entre els nivells d'expressió de p21^{WAF1/CIP1} i els de RUNX1/AML1 ($p=0,04$); aplicant el test de Wilcoxon per a dades aparellades la correlació d'ambdós gens va pujar fins a ($p=0,021$). A més la comparació entre p21^{WAF1/CIP1} i RUNX1/AML1 en agrupar les dades en funció dels estadis mostrava que els màxims nivells de correlació es donaven a l'estadi IC ($p=0,018$). Aquests resultats no només mostren la sobreexpressió de p21^{WAF1/CIP1} en el carcinoma endometrial sinó que a més la sobreexpressió de

$p21^{WAF1/CIP1}$ correlaciona amb la sobreexpressió de $RUNX1/AML1$, especialment en els estadis IC en què $RUNX1/AML1$ podria jugar un rol durant el procés d'infiltració miometrial (Fig. 62a i 62b).

L'estudi de correlació dels perfils d'expressió gènica també es va estendre a l'anàlisi entre els gens $p21^{WAF1/CIP1}$ i $ETV5/ERM$ degut al comportament tant semblant entre $ETV5/ERM$ i $RUNX1/AML1$. Els resultats, a nivell global, no mostraven una correlació entre els perfils d'expressió gènica d'ambdós gens, però aplicant el test d'Spearman agrupant les dades per estadis es va obtenir una correlació significativa entre $p21^{WAF1/CIP1}$ i $ETV5/ERM$ en els estadis inicials (IA+IB) quan es comparava respecte el control atròfic ($p=0,014$) o respecte el control proliferatiu ($p=0,047$). Per tant, aquest resultats suggereixen que els tres gens $p21^{WAF1/CIP1}$, $RUNX1/AML1$ i $ETV5/ERM$, podrien estar relacionats en el procés de carcinogènesi i/o en la progressió tumoral endometrial en concret durant les etapes inicials que comprenen els estadis I.

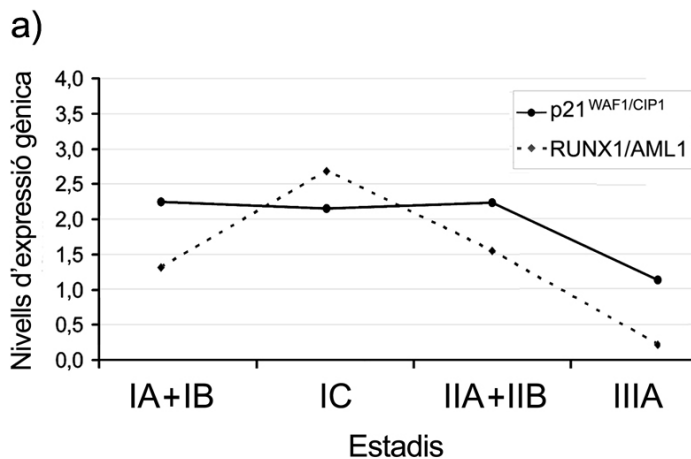


Figura 62a, imatge de correlació de l'expressió gènica de $p21^{WAF1/CIP1}$ i $RUNX1/AML1$: el gràfic mostra els nivells d'expressió de $p21^{WAF1/CIP1}$ i $RUNX1/AML1$, agrupats per estadis, respecte del teixit endometrial atròfic.

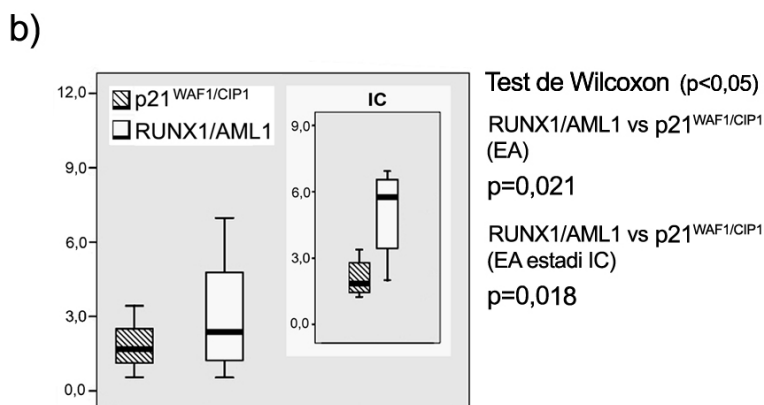


Figura 62b, diagrama dels resultats estadístics de correlació de l'expressió gènica: la representació gràfica del test de Wilcoxon mostra la correlació dels nivells d'expressió gènica de $p21^{WAF1/CIP1}$ i $RUNX1/AML1$ en especial en l'estadi IC, on hi ha la màxima correlació. A la dreta de la fig. es representa el valor de significació del test estadístic.

20.2.3.2. Resultats de correlació en els perfils d'expressió proteica

L'estudi estadístic es va completar analitzant la correlació entre $p21^{WAF1/CIP1}$ i RUNX1/AML1 a nivell proteic. L'estudi de correlació amb el test d'Spearman va mostrar una marcada correlació positiva entre el nivell d'expressió d'ambdues proteïnes ($p=0,001$) que es va confirmar amb el test de Friedman per a dades aparellades ($p=0,001$). Per tant, el resultat final de l'assaig mostrava una gran correspondència entre el marcatge proteic de $p21^{WAF1/CIP1}$ i el marcatge proteic de RUNX1/AML1 en els diferents punts de l'array de teixit (Fig. 63a).

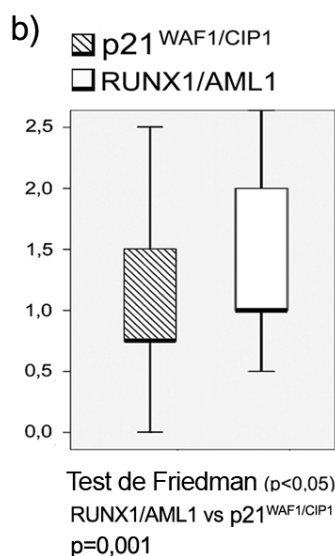
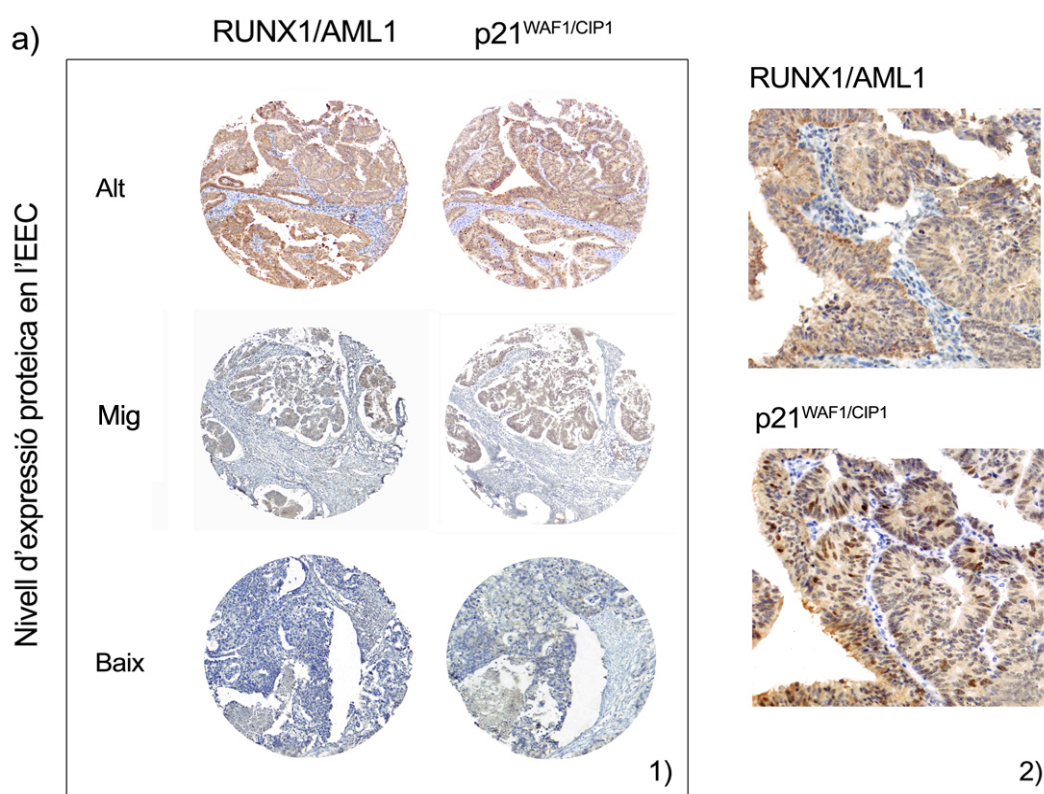


Figura 63a, imatge de correlació del marcatge de $p21^{WAF1/CIP1}$ i RUNX1/AML1: 1) la imatge mostra la comparació de tres punts provinents de dos talls seriatos de l'array tumoral d'EEC. Es pot observar la semblança en el nivell de marcatge de $p21^{WAF1/CIP1}$ i RUNX1/AML1; 2) detall d'un punt de l'array tumoral a $400\times$ amb marcatge de $p21^{WAF1/CIP1}$ i RUNX1/AML1.

Figura 63b, diagrama dels resultats estadístics de correlació de l'expressió proteica: la representació gràfica del test de Friedman mostra la correlació del nivells d'expressió proteica de $p21^{WAF1/CIP1}$ i RUNX1/AML1. A la part inferior de la fig. es representa el valor de significació del test estadístic.

Així mateix, l'estudi a nivell proteic també es va completar analitzant la correlació estadística dels nivells de p21^{WAF1/CIP1} amb els nivells d'ETV5/ERM. Els resultats a nivell global no van mostrar correlació entre les dues proteïnes. Curiosament, però, en agrupar els resultats per estadis es va obtenir una alta correlació d'ambdós marcadors, en concret en els estadis inicials (IA+IB) ($p=0.008$) (Fig. 63b). Aquests resultats es troben en concordança amb els resultats de correlació obtinguts en els perfils d'expressió genica, cosa que suggereix un paper cooperatiu de les tres proteïnes en les etapes inicials de carcinogènesi endometrial, en els estadis on el carcinoma esta confinat a l'endometri i en els estadis on s'inicia la invasió a l'espai miometrial.