

CÀNCER COLORECTAL I GEN SUPRESSOR *TP53*:
ESTUDI COMPARATIU ENTRE METODOLOGIES

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MORFOLÒGIQUES

TESI DOCTORAL

CÀNCER COLORECTAL I GEN SUPRESSOR *TP53*:
ESTUDI COMPARATIU ENTRE METODOLOGIES

ANNA COLOMER VALERO

Barcelona, maig de 2002

FRANCESC GONZÀLEZ SASTRE, Doctor en Medicina i Catedràtic del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA: que la tesi titulada “Càncer colorectal i gen supressor *TP53*: estudi comparatiu entre metodologies”, que presenta la llicenciada Anna Colomer Valero per a optar al grau de Doctora en Biologia, ha estat realitzada sota la direcció d’en Manuel Guix Pericas, Doctor en Medicina i Professor Titular del Departament de Ciències Morfològiques de la mateixa Universitat, i es troba en condicions d’èsser defensada davant del tribunal corresponent.

Prof. Francesc González Sastre

Barcelona, 4 de març de 2002

TUTOR

Vull expressar el meu profund agraïment a totes les persones i institucions que d'alguna forma, activament o passiva, han fet possible la realització d'aquesta tesi doctoral:

Al Dr. Manuel Guix Pericas, per la seva idea, guió i direcció, però, per damunt de tot, per l'entusiasme posat en el projecte, fins al darrer moment.

Al Prof. Francesc González Sastre, Director del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la UAB, per la seva tutela i encertats consells.

Al Dr. August Moragas Redecilla, –i, per extensió, al Departament de Ciències Morfològiques de la UAB–, que em facilità l'accés al Departament.

Al Dr. Ignasi Orce Satrustegui, Conseller Delegat d'Assistència Sanitària Col·legial i President de BIOPAT. Biopatologia Molecular, SL, la institució a la qual pertanyo i on s'ha desenvolupat el projecte de tesi.

Al Dr. Carles Cordón-Cardó, Director de la Divisió de Patologia Molecular del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de NY i assessor científic de BIOPAT, per molts motius, però sobretot per destinar part del seu valuós temps a la meva formació.

A en Xavier Puig, responsable dels laboratoris HISTOPAT, SL que em subministraren les dades clinicopatològiques i els teixits necessaris per a l'execució del present treball. Li agraeixo sincerament tot l'ajut i el recolzament rebuts.

A la meva companya, la Nadina Erill, col·laboradora activa en totes les facetes del projecte. Pel rigor del seu treball i el valor de les seves aportacions.

A tots els professionals, companys i companyes de BIOPAT i HISTOPAT, que mai han deixat d'expressar-me el seu suport. En especial a la Ruth Roman, l'Eva Torija, la Montse Verdú i l'August Vidal, per la seva contribució al projecte.

A en Miquel Calvo, Professor Titular del Departament d'Estadística de la Facultat de Biologia de la UB, per l'assessorament estadístic.

A la meva família i amics, per la confiança i l'interès demostrats en tot moment.

Al Pau i a la Bet, per les hores robades que mai no m'han retret.

I a tú, Mateu, per tot i res ... una mica.

A tots, gràcies.

Als meus pares,
sens dubte

ABREVIATURES

aa: aminoàcid

AcK: acetat potàsic

BSA: albúmina sèrica bovina

CEA: antigen carcinoembriogènic

ddNTP: dideoxinucleòtid

dNTP: desoxiribonucleòtid

EtOH: etanol

FAP: poliposi adenomatosa familiar

5-FU: 5-fluorouracil (quimioteràpic)

HNPCC: carcinoma colorectal hereditari de tipus no polipòsic

H₂O_{dest}: aigua desionitzada estèril

HPV: papil·lomavirus humà

IHQ: immunohistoquímica

LOH: pèrdua d'heterozigositat

MSI: inestabilitat de microsatèl·lits

N: teixit normal

OMS: Organització Mundial de la Salut

ON: durant la nit (de l'anglosaxó *over night*)

PCNA: antigen nuclear de proliferació cel·lular

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PBS: tampó salí de fosfats

SDS: sulfat dodecil sòdic

SSCP: polimorfismes conformacionals de cadena senzilla

T: teixit tumoral

TA: temperatura ambient

TE: tampó Tris-EDTA (10:1)

TS: timidilat-sintasa

UV: ultraviolada (llum)

ÍNDEX

MATÈRIES

	pàgina
I. INTRODUCCIÓ	1
1. L'adenocarcinoma colorectal	3
1.1. Definició	3
1.2. Epidemiologia	3
1.2.1. Distribució geogràfica	3
1.2.2. Impacte en la població	5
1.2.3. Localització	7
1.2.4. Edat, sexe i raça	8
1.3. Etiologia	8
1.3.1. Hàbits alimentaris	9
1.3.2. Tabaquisme i consum de begudes alcoholiques	9
1.3.3. Carcinògens químics	10
1.3.4. Altres factors de risc	10
1.4. Patogènesi	11
1.4.1. Grau histològic	12
1.4.2. Nivell d'infiltració i estadiatge	14
1.5. Histopatologia	17
1.5.1. Variants	17
1.5.2. Lesions precursors	18
1.5.3. Síndromes associades	20
1.6. Manifestacions clíniques i diagnòstic	23
1.7. Tractament	24
1.7.1. Teràpia primària	24
1.7.2. Teràpia adjuvant	25
1.7.3. Teràpia gènica	26
1.8. Pronòstic	27
1.8.1. Factors clinicopatològics	27
1.8.2. Factors biològics	27

	pàgina
2. Caracterització molecular del carcinoma colorectal	31
2.1. Model de progressió de la síndrome hereditària de FAP	31
2.1.1. Oncogens	32
2.1.2. Gens supressors	33
2.2. Model de progressió de la síndrome HNPCC (síndrome de Lynch)	37
2.2.1. Inestabilitat genètica	37
2.2.2. Gens del fenotip mutador	41
3. El gen supressor <i>TP53</i> i la seva proteïna	43
3.1. Característiques estructurals	43
3.1.1. El gen <i>TP53</i>	43
3.1.2. La proteïna p53	44
3.2. Característiques funcionals	47
3.2.1. Activitat biològica en situació normal	48
3.2.2. Activitat biològica en resposta al dany cel·lular	50
3.3. Regulació	51
3.3.1. Model d'equilibri conformacional	51
3.3.2. Mecanismes d'activació "al·lostèrica"	52
3.3.3. Mecanismes d'inactivació durant el procés tumorigènic	53
3.4. La proteïna p53 mutant	56
3.4.1. Propietats oncogèniques: el model dominant negatiu	56
3.4.2. Activitat biològica de la p53 mutant	58
3.5. Aproximacions a l'estat de p53 en el càncer	58
3.5.1. Estudi de la proteïna p53	59
3.5.2. Estudi del gen <i>TP53</i>	61
 II. OBJECTIUS	 65
1. Objectiu general	67
2. Objectius específics	67

	pàgina
III. MATERIAL I MÈTODES	69
1. Material	71
1.1. Pacients	71
1.2. Peces quirúrgiques	71
1.3. Teixits	73
1.3.1. Teixit tumoral (T)	73
1.3.2. Teixit normal de control (N)	73
2. Mètodes	74
2.1. Estudi de la proteïna p53	74
2.1.1. Detecció immunohistoquímica	74
2.1.2. Control de qualitat de la immunohistoquímica	75
2.1.3. Criteris d'avaluació dels resultats de la immunohistoquímica	75
2.2. Estudi del gen <i>TP53</i>	76
2.2.1. Obtenció del DNA genòmic	76
2.2.2. Control de qualitat del DNA genòmic	78
2.2.3. Amplificació del gen <i>TP53</i> per PCR	80
2.2.4. Cribratge d'alteracions del gen <i>TP53</i> per SSCP	81
2.2.5. Identificació de les mutacions detectades per SSCP	83
2.2.6. Criteris d'avaluació dels resultats de PCR-SSCP/seqüenciació	85
2.3. Detecció de pèrdues al·lèliques al cromosoma 17p (locus <i>TP53</i>)	86
2.3.1. Amplificació del marcador p53CA per PCR	86
2.3.2. Anàlisi de polimorfismes per electroforesi en gel no-desnaturalitzant	86
2.3.3. Criteris d'avaluació dels resultats de l'anàlisi de polimorfismes	87
2.4. Anàlisi estadística	87
2.4.1. Descripció de les tècniques utilitzades	88
2.4.2. Relació de l'hardware i del software utilitzats	90

	pàgina
IV. RESULTATS	91
1. Descripció dels paràmetres anatomopatològics	93
1.1. Mida del tumor primari	93
1.2. Afectació ganglionar	94
1.3. Grau histològic	95
1.4. Nivell d'infiltració i estadiatge	95
2. Descripció de l'estat de p53	97
2.1. Resultats de l'assaig immunohistoquímic	97
2.1.1. Presència/absència de positivitat IHQ	97
2.1.2. Classificació per grups en base al grau de positivitat IHQ	98
2.2. Resultats de l'anàlisi mutacional del gen <i>TP53</i>	100
2.2.1. Obtenció de DNA genòmic i control de qualitat	100
2.2.2. Presència/absència de mutacions	101
2.2.3. Classificació per grups en base al tipus de mutació	101
2.3. Comparació entre els resultats d'IHQ i l'estat mutacional	107
2.4. Resultats de la detecció de LOH al locus TP53	109
2.5. Relació entre l'estat mutacional i la pèrdua al·lèlica a 17p	110
3. Anàlisi estadística	111
3.1. Relació entre els paràmetres anatomopatològics i l'estat de p53	111
3.2. Comparació entre els resultats de p53 amb diferents metodologies	112
V. DISCUSSIÓ	115
1. Anàlisi dels paràmetres anatomopatològics	117
1.1. Mida i grau histològic	117
1.2. Nivell d'infiltració, estadiatge i afectació ganglionar	118
2. Estudi de l'acumulació de la proteïna p53	119

2.1. Particularitats de l'assaig immunohistoquímic	119
2.2. Resultats de l'assaig immunohistoquímic	119
2.2.1. Consideracions sobre el patró d'acumulació de la proteïna p53	119
2.2.2. Definició del límit de sensibilitat de la IHQ de p53	121
2.2.3. Subclassificació dels tumors amb fenotip de p53 negatiu	122
3. Estudi de l'estat del gen <i>TP53</i> : anàlisi mutacional	122
3.1. Particularitats de l'anàlisi mutacional del gen <i>TP53</i>	122
3.1.1. Limitacions inherents al SSCP	123
3.1.2. Limitacions inherents a la seqüenciació directa	125
3.2. Resultats de l'anàlisi mutacional del gen <i>TP53</i>	126
3.2.1. Avaluació de la qualitat del DNA genòmic obtingut	126
3.2.2. Subclassificació dels tumors amb genotip de <i>TP53</i> positiu	127
4. Acumulació de la proteïna p53 vs. estat mutacional del gen	129
4.1. Comparació dels resultats d'IHQ amb els de SSCP/seqüenciació	129
4.2. Valoració de la IHQ com a mètode per a predir l'estat de p53	134
4.2.1. Anàlisi ROC i regressió logística	135
4.2.2. Discordances fenotip/genotip: implicació pronòstica	135
5. Estudi de l'estat del gen <i>TP53</i> : anàlisi de la pèrdua al·lèlica	136
5.1. Particularitats de la detecció de LOH al locus <i>TP53</i>	136
5.2. Resultats de l'anàlisi de la pèrdua al·lèlica al locus <i>TP53</i>	137
5.2.1. Grau d'informativitat.....	137
5.2.2. Pèrdua d'heterozigositat.....	138
5.3. Estadi tumoral i afectació ganglionar vs. pèrdua al·lèlica al locus <i>TP53</i>	138
6. Estat mutacional del gen <i>TP53</i> vs. pèrdua al·lèlica al propi locus	139
6.1. Comparació dels resultats de SSCP/seqüenciació amb els de LOH.....	139
6.2. Valoració de la conveniència de conèixer l'estat al·lèlic de <i>TP53</i>	141

	pàgina
7. Proposta d'aproximació metodològica a l'estat de p53.....	142
7.1. Abordatge de la primera alteració per a la inactivació del gen <i>TP53</i>	142
7.2. Abordatge de la segona alteració per a la inactivació del gen <i>TP53</i>	143
VI. CONCLUSIONS	145
VII. BIBLIOGRAFIA	149
VIII. ADDENDA	181

IL·LUSTRACIONS

	pàgina
I. FIGURES	
Figura 1	13
Figura 2	15
Figura 3	18
Figura 4	21
Figura 5	33
Figura 6	44
Figura 7	46
Figura 8	47
Figura 9	49
Figura 10	53
Figura 11	99
Figura 12	102
Figura 13	102
Figura 14	104
Figura 15	104
Figura 16	110
 II. TAULES	
Taula 1	4
Taula 2	6
Taula 3	28
Taula 4	59
Taula 5	72
Taula 6	73
Taula 7	79
Taula 8	79
Taula 9	82

	pàgina
Taula 10	83
Taula 11	89
Taula 12	90
Taula 13	105
Taula 14	108
Taula 15	112
Taula 16	120
Taula 17	129
Taula 18	131
Taula 19	139

III. GRÀFICS

Gràfic 1	93
Gràfic 2	94
Gràfic 3	95
Gràfic 4	96
Gràfic 5	97
Gràfic 6	98
Gràfic 7	100
Gràfic 8	103
Gràfic 9	105
Gràfic 10	106
Gràfic 11	107
Gràfic 12	114