

II. OBJECTIUS

1. OBJECTIU GENERAL

El que ací es vol reflectir és la complexitat que, des del punt de vista assistencial, representa l'abordatge de la p53. La gran disponibilitat de tècniques, cadascuna amb avantatges i inconvenients, i la manca de consens metodològic fa que, de vegades, l'elecció d'una o altra obeeixi raons econòmiques si no pràctiques. Amb aquests antecedents, entenem que l'objectiu que justifica aquest treball és l'establiment d'un protocol d'estudi de l'estat de p53 com a factor pronòstic del carcinoma colorectal.

2. OBJECTIUS ESPECÍFICS

Per tal d'assolir l'objectiu general ens proposem els següents objectius específics:

- Posar a punt la metodologia necessària per a obtenir DNA genòmic de teixit fixat inclòs en parafina, efectuar l'anàlisi mutacional del gen *TP53* –l'amplificació per PCR, el cribratge d'alteracions per SSCP y la confirmació mitjançant seqüenciació directa–, y detectar LOH al locus *TP53*.
- Seleccionar una mostra prospectiva de casos de carcinoma colorectal primari, recollint i tabulant tota la informació clinicopatològica disponible, així com les dades corresponents a la determinació immunohistoquímica rutinària de l'estat de p53.
- Aplicar les tècniques optimitzades amb finalitat de conèixer l'estat del gen *TP53* a l'estudi de la mostra seleccionada, analitzant-ne els resultats i afegint-los a la resta d'informació disponible.
- Efectuar l'anàlisi estadística comparativa dels resultats obtinguts mitjançant les diferents tècniques, i establir correlacions d'aquestes dades amb la resta de la informació clínica obtinguda.

III. MATERIAL I MÈTODES

1. MATERIAL

1.1. Pacients

Per al present treball disposarem, inicialment, d'una sèrie de 109 peces de carcinoma colorectal primari procedents d'individus intervinguts quirúrgicament amb finalitat curativa o pal·liativa, a la demarcació de Barcelona, en el període comprés entre Febrer de 1996 i Juny de 1999. L'estudi, però, va dur-se a terme amb solament 100 tumors procedents de 96 pacients. Els 9 tumors restants van ser exclosos de la sèrie per causes inherents a les mostres, i que seran exposades a l'*Apartat 2.1.1 del Capítol IV*.

Les característiques demogràfiques de la sèrie poden resumir-se amb els paràmetres del sexe i l'edat. La mostra la constituïen 38 dones (40%) i 58 homes (60%), l'edat conjunta dels quals en el moment de l'exèresi estigué compresa entre els 37 i els 93 anys, amb una mitjana d'anys $\bar{x} = 66,2$ i una desviació típica $= 11,6$.

1.2. Peces quirúrgiques

Les peces de resecció seleccionades, obtingudes prospectivament, ho foren directament del laboratori on es dugué a terme l'anàlisi histopatològica. Per al mateix, se seguí un protocol de patologia basat en les recomanacions de l'ADASP (Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology, 1996). El protocol, lluny de l'obligatorietat, fou dissenyat per a poder facilitar als clínic la informació necessària que aportés, a més del diagnòstic, un pronòstic dels tumors. Els paràmetres anatomopatològics inclosos en cada informe poden separar-se en dues categories: la dels morfològics i la dels moleculars. Una relació d'aquests podeu trobar-la en les Taules 5 i 6, respectivament.

Després de l'estudi macroscòpic de la peça, es procedí a la presa de seccions i a la identificació de les claus. Entre elles hi hagué, com a mínim: 1) seccions representatives del tumor, incloent-hi almenys una en relació amb la mucosa veïna, i una altra amb el punt de màxima invasió (si hi havia proximitat a la serosa es procedia al marcat amb tinta xinesa); 2) límits proximal, distal i radial; 3) mucosa còlica normal; 4) lesions associades (els pòlips processats per inclusió total); i 5) ganglis limfàtics.

Taula 5. Relació dels paràmetres morfològics del protocol de patologia oncològica colorectal.

| <i>Paràmetres</i> | <i>Descripció</i> |
|-----------------------------|--|
| <u>Macroscòpics</u> | |
| peça | recte ; colectomia parcial ; colectomia subtotal ; hemicolectomia dreta |
| Ø màxim tumoral | 00 mm ; no avaluable |
| localització | recte ; còlon esquerre ; còlon dret ; cec ; no determinada |
| distància del marge | afectació ; < 1cm ; 00 cm ; no avaluable |
| multifocalitat | absència ; presència (màxim en mm i localització) ; no avaluable |
| tipus macroscòpic | polipoide exofític ; ulcerat ; estenosant ; infiltrant difús |
| perforació | absència ; presència |
| invasió venosa macro | absència ; presència |
| <u>Microscòpics</u> | |
| tipus histològic* | 8140/3 ; 8480/3 ; 8490/3 ; 8560/3 ; 8510/3 ; 8020/3 |
| grau histològic | 1 (ben diferenciat) ; 2 (moderadament diferenciat) ; 3 (mal diferenciat) |
| necrosi tumoral | absència ; presència |
| invasió vascular | absència ; presència (limfàtica / venosa) |
| invasió extramural** | absència ; presència |
| invasió perineural | absència ; presència |
| nivell d'infiltració | pT _{is} ; pT ₁ ; pT ₂ ; pT ₃ ; pT ₄ |
| ganglis limfàtics | absència de metàstasis a 00 ganglis ; metàstasis a 00 de 00 ganglis |
| extensió extracapsular | absència ; presència |
| TNM | pT pN pM |
| <u>Patologia associada</u> | |
| adenomes | absència ; presència (nombre i en mm) |
| - tipus histològic | tubular ; túbulopapil·lar ; papil·lar |
| - displàsia | absent ; moderada ; severa |
| altres patologies | pòlips hiperplàstics ; malaltia inflamatòria intestinal ; diverticles |

* El tipus de carcinoma està basat en la classificació histològica de la OMS dels tumors colorectals (vegeu Taula 1).

** Per invasió extramural s'entén l'afectació de la serosa i/o els òrgans veïns.

En negreta hi ha ressaltats els paràmetres mínims indispensables per a efectuar l'informe d'histopronòstic.

Les seccions de teixit obtingudes es processaren de forma rutinària mitjançant la fixació amb formalina tamponada per un període de 24 h i, subsegüentment, s'inclogueren en parafina. El treball previ a l'anàlisi microscòpica dels casos es completà amb la realització d'una secció de 4 µm de tots els blocs representatius de cada cas, que es tení amb hematoxilina-eosina.

Taula 6. Relació dels paràmetres moleculars del protocol de patologia oncològica colorectal.

| <i>Paràmetres</i> | <i>Descripció</i> |
|-----------------------------|--|
| <u>Immunohistoquímics</u> | |
| MIB-1 (Ki-67, fase S) | baixa ; alta activitat proliferativa (00% de positivitat nuclear) |
| proteïna p53 | negativa ; baixa positivitat ; positiva (00% de positivitat nuclear) |
| timidilat-sintasa (TS) | negativa ; positiva (00%) |
| micrometàstasis (CK)* | negativa ; positiva |
| <u>Genètics</u> | |
| gen <i>TP53</i> (exons 4-8) | detecció i identificació de mutacions per PCR-SSCP/seqüenciació |
| cromosoma 18q** | detecció de pèrdua de heterozigositat al locus TP53 |

* S'efectuà mitjançant l'estudi de PAN K (citoqueratines d'ampli espectre: AE1/AE3).

** Solament s'efectua de forma rutinària en els tumors d'estadi II (pT₃₋₆₄ pN₀ pM₀).

1.3. Teixits

1.3.1. Teixit tumoral (T)

De cada cas es trià un bloc únic en base a dos criteris: la representació de teixit tumoral i la seva preservació. Els blocs escollits correspongueren a seccions amb un elevat contingut de carcinoma i la major proporció de cèl·lules tumorals possibles, sense signes aparents de necrosi i autòlisi.

1.3.2. Teixit normal de control (N)

Paral·lelament, de cada cas es trià un bloc representatiu de teixit normal, constituït de forma majoritària per mucosa còlica a distància del tumor, i amb menor freqüència, per teixit limfoide. Aquests teixits resulten òptims per a l'obtenció de DNA genòmic gràcies al seu contingut ric en cèl·lules nucleades.

2. MÈTODES

2.1. Estudi de la proteïna p53

Els assaigs per a detectar l'acumulació de la proteïna p53 es dugueren a terme, com ja hem explicat, de forma rutinària dins del protocol de patologia colorectal. La tècnica utilitzada fou la immunohistoquímica, utilitzant un protocol d'avidina-biotina sobre seccions tissulars parafinades.

2.1.1. Detecció immunohistoquímica

- *Obtenció i pretractament de les seccions histològiques*

Per a la detecció de la proteïna p53 utilitzarem, per a cada cas, dues seccions de teixit tumoral de 4 µm obtingudes mitjançant microtomia convencional. Els talls foren col·locats en portaobjectes pretractats amb aminopropiltriètoxissilè al 5%, desparafinats en xilol, i rehidratats en H₂O_{dest} previ pas per una bateria d'alcohols de diversa graduació (EtOH 100%, 95%, 70%, 50%).

- *Protocol de recuperació antigènica i blocatge de peroxidases*

Les seccions tissulars rehidratades foren sotmeses a un protocol de recuperació antigènica per calor amb l'ajut d'un microones. Cada tanda de micronització s'efectuà en dues etapes de 5 min i 3 min respectivament, durant les quals el teixit fou incubat en un tampó de citrat 0,1 mol/L a pH 6,0 a la màxima potència. Abans del blocatge de peroxidases endògenes –amb H₂O₂ a l'1% durant 15 min–, les seccions s'incubaren en PBS 15 min.

- *Reacció antígen-anticòs*

A continuació, els teixits foren blocats amb sèrum normal de cavall (Jackson, Westgrove, PE) a concentració 1:20 en PBS/BSA durant 20 min, prèviament a la incubació amb l'anticòs primari. Aquest resultà ésser l'anti-p53 murí PAb 1801 (p53 Ab-2, Oncogene Science, Inc. Cambridge, MA) emprat a una dilució 1:700 en PBS al 2%, i la incubació es dugué a terme ON a 4°C en cambra humida. Després de rentar

amb PBS, les seccions s'enfrontaren a un anticòs secundari biotinitat anti-IgG murina de cavall (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a dilució 1:100 en PBS. La incubació, efectuada a TA, durà 40 min transcorreguts els quals les seccions es rentaren de nou amb PBS.

A continuació es procedí a la incubació amb el complex d'avidina-biotina Vectastain ABC PK 4000 ST (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluït 1:100, l'eliminació del qual s'efectuà altre cop amb PBS. Per al revelatge, les seccions foren exposades a les fosques a una solució de diaminobenzidina (DAB) al 0,05% en PBS-H₂O₂ durant 5 min.

- *Contratinció i muntatge*

La contratinció es realitzà amb hematoxilina de Harris 1:10 durant 10-15 s, eliminant l'excés de colorant amb alcohol àcid (EtOH 80% + HCl 0,35% (v/v)). Després d'incubar-se en aigua amoniacal (12 gotes NH₄OH en 250 mL d'H₂O_{dest}), les seccions foren deshidratades en una bateria d'alcohols i, finalment, muntades en DPX.

2.1.2. Control de qualitat de la immunohistoquímica

Per a cada cas es processaren paral·lelament dues seccions: una, la problema i l'altra, corresponent al control negatiu. La segona secció fou sempre adjacent a la primera i tractada de la mateixa manera, exceptuant que: 1) el protocol de recuperació antigènica en aquest cas fou de tipus enzimàtic i no per calor (saponina al 0,05% en H₂O_{dest} durant 30 min); i 2) per a la mateixa s'ometé la incubació amb l'anticòs primari, substituint-la per una prolongació del blocatge amb sèrum normal de cavall fins a 60 min. Alhora, cada tanda de casos inclogué com a control positiu una secció tissular amb capacitat coneguda d'estabilitzar la proteïna p53.

2.1.3. Criteris d'avaluació dels resultats de la immunohistoquímica

La valoració de resultats de l'assaig per a la determinació de l'acumulació de la proteïna p53 en la nostra sèrie de tumors estan basats, principalment, en dos criteris:

- a) Es pot parlar en termes de positivitat quan la reacció immunohistoquímica que es produeix en una secció de teixit es visualitza, de forma específica, a nivell nuclear.
- b) Cal, a més, que aquesta reacció immunohistoquímica específica afecti, com a mínim, el 10% de les cèl·lules tumorals de la preparació (límit de sensibilitat que es discutirà abastament en el *Capítol V*) per a què aquesta sigui valorada positivament.

2.2. Estudi del gen *TP53*

2.2.1. Obtenció del DNA genòmic

- *Obtenció i microdissecció de les seccions histològiques*

De cadascun dels blocs corresponents a les preparacions escollides (vegeu l'*Apartat 1.3* d'aquest mateix capítol) s'obtingueren, per microtomia convencional, 11 seccions tissulars seriades de 5 µm de gruix. Adherides cadascuna a portaobjectes sense pretractar i assecades a l'aire, foren incubades en estufa seca durant 30 min a 60°C i, així, podien ser conservades durant setmanes sense requerir el processament immediat.

Les seccions tissulars N i T de cada cas, se sotmeteren a microdissecció, separadament. El processament es dugué a terme per tandes de 6 mostres, normalment 3 casos complets amb les corresponents seccions N/T. El protocol seguit, basat en un altre prèviament publicat (Shibata *et al*, 1988), consta d'una sèrie d'incubacions per a desparafinar i hidratar el teixit abans de l'escissió manual de les àrees seleccionades. La desparafinació consistí en una successió d'incubacions: (2×) xilol, 10 min; (2×) EtOH absolut, 10 min. Les últimes seccions de cada mostra es tenyiren amb hematoxilina-eosina per a servir de model en la microdissecció, ja que en elles se seleccionaren i marcaren, amb l'ajut del microscopi òptic, les àrees d'interès. La resta de blanques desparafinades, prèviament assecades a l'aire, es rehidrataren en tampó de rascat (Tris-HCl 50 mmol/L a pH 8,0, EDTA 5 mmol/L, NaCl 0,9 g/L). Eliminat l'excés de tampó amb paper absorbent, les 10 blanques de cada mostra es rascaren amb bisturí estèril, i el teixit escindit es diposità en tubs contenint 600 µL de tampó de digestió (tampó de

rascat complementat amb SDS 1%). La contaminació entre els teixits es minimitza recanviant el bisturí entre mostra i mostra.

- *Extracció del DNA genòmic*

El mètode utilitzat per a obtenir DNA genòmic de material parafinat fou una adaptació de l'extracció amb proteïnasa K-SDS (Sambrook *et al*, 1989). A les mostres de teixit obtingudes per microdissecció s'afegí proteïnasa K de 20 g/L, a concentració final 0,5 g/L. Els tubs vorexats enèrgicament s'incubaren a 37°C en un bloc sec durant 3 dies, amb addició d'enzim fresc cada 24 h (fins a 3 en total). Acabada la digestió, l'enzim s'inactivà 10 min per ebullició. La purificació es realitzà afegint a les mostres una barreja de fenol i cloroform, seguint un mètode basat en la formació d'interfases per successives centrifugacions on roman la proteïna que es desitja eliminar (Sambrook *et al*, 1989). El processament realitzat a cada mostra pot esquematitzar-se de la forma següent: (2×) fenol ; (1×) cloroform (ambdós 1:1 v/v).

Per a la precipitació del DNA genòmic, als 400 µL de fase aquosa obtinguts de cada mostra s'afegí NaCl 5 mol/L (a una concentració final de 0,2 mol/L) i EtOH absolut (2:1 v/v). Un cop vorexades, les mostres romangueren a -20°C ON. L'endemà, els tubs foren centrifugats a 14000 rpm durant 20 min a TA per a facilitar la precipitació. Decantat el líquid, el DNA precipitat fou rentat amb 500 µL d'EtOH del 70%, assecat al buit 10 min a TA i, tot seguit, resuspès en 20-50 µL de TE a 37°C durant aproximadament 60 min abans de procedir a la quantificació (Sambrook *et al*, 1989).

- *Determinació espectrofotomètrica de la concentració de DNA genòmic*

La quantificació del DNA obtingut es realitzà per espectrofotometria. Per a això, es determinà l'absorbància de cada mostra a dues longituds d'ona: 260 i 280 nm, respectivament. La primera lectura permet calcular la quantitat d'àcids nucleics presents en la mostra, equiparant la unitat de densitat òptica (1UDO) a 50 µg/mL de DNA bicatenari. Però alhora, a 280 nm, pot estimar-se la quantitat de proteïna que contamina aquest DNA. És el quocient entre lectures, l'anomenat índex DO_{260}/DO_{280} , el que dona

una idea de la puresa del DNA obtingut, considerant-se pur aquell que presenta un índex entre 1,6 i 1,8 (Sambrook *et al*, 1989).

Per a cada mesura, 2 μL de la mostra corresponent foren diluïts a 1:50 en $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. En finalitzar els càlculs, part del DNA genòmic es diluí a 200 ng/ μL en $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, i aquesta fou considerada la concentració de treball. La resta del DNA genòmic concentrat es congelà a -20°C per a possibles estudis futurs.

2.2.2. Control de qualitat del DNA genòmic

Per a cada cas s'efectuà un control de qualitat consistent en l'amplificació d'un fragment de 268 pb del gen de la α -globina humana mitjançant PCR, utilitzant els encebadors específics que es mostren a la Taula 7 (Bauer *et al*, 1991). La barreja de reacció contenia MgCl_2 1,5 mmol/L i dNTP 200 nmol/L, a més de les concentracions d'enzim i encebadors que s'especifiquen a la Taula 8. La reacció fou mediada pel sistema enzimàtic ExpandTM High Fidelity PCR (Boehringer Mannheim Corp. Indianapolis, IN) integrat per les polimerases Taq i Pwo. La barreja es dugué fins a 24 μL amb $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ alíquotada estèril. Com a substrat afegirem 200 ng de DNA genòmic (1 μL) per reacció, fins a completar el volum final a 25 μL . Les amplificacions es dugueren a terme en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (PE Biosystems, Foster City, CA), en les condicions que s'especifiquen també a la Taula 8. Cada tanda d'amplificació solia incloure 6 mostres (3 parelles N/T) amb els controls corresponents: de barreja i negatiu. En el primer, el substrat fou substituït per idèntic volum d' $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ de la mateixa alíquota usada per a la barreja de reacció. Per al control negatiu, sempre en darrer lloc, l' $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ que reemplaçà la mostra provingué d'una alíquota diferent.

Per a confirmar la correcta amplificació del control de α -globina, 10 μL de cada producte foren sotmesos a electroforesi horitzontal en gel d'agarosa al 2% en $1\times\text{TBe}$, en presència de EtBr. Les curses es realitzaren al potencial de 120V, amb corrent i potència il·limitades, durant 50 min. Finalment, els gels foren visualitzats sota un llum UV i documentats en paper fotogràfic Polaroid Type 667 (Polaroid Corp. Cambridge, MA).

Taula 7. Encebadors emprats per a l'amplificació del control d'integritat i dels loci específics.

| <i>Locus</i> | <i>Cebador</i> | <i>Seqüència</i> | <i>Mida (pb)</i> |
|-----------------------------|----------------------|--|------------------|
| <u>Control d'integritat</u> | | | |
| -globina | PC04 GH20 | 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' | 268 |
| <u>Exons de TP53</u> | | | |
| Exó 4 | P53E4 SE P53E4 AN | 5'-TTCACCCATCTACAGTCCCC-3' 5'-TCAGGGCAACTGACCGTGCA-3' | 308 |
| Exó 5 | P53E5 SE P53E5 AN | 5'-TTCCTCTTCCTACAGTACTC-3' 5'-AGCTGCTCACCATCGCTATC-3' | 209 |
| Exó 6 | P53E6 SE P53E6 AN | 5'-ACAGGGCTGGTTGCCAGGGT-3' 5'-AGTTGCAAACCAGACCTCAG-3' | 184 |
| Exó 7 | P53E7 SE P53E7 AN | 5'-GTGTTATCTCCTAGGTTGGC-3' 5'-GTCAGCGGCAAGCAGAGGCT-3' | 188 |
| Exó 8 | P53E8 SE P53E8 AN | 5'-TATCCTGAGTAGTGGTAATC-3' 5'-AAGTGAATCTGAGGCATAAC-3' | 213 |
| <u>Locus TP53</u> | | | |
| P53CA | TP53 GT TP53 AC | 5'-AGGGATACTATTCAGCCCGAGGTG-3' 5'-ACTGCCACTCCTTGCCCCATTC-3' | 103-135 |

Taula 8. Condicions de PCR del control d'integritat i dels loci específics.

| <i>Locus</i> | <i>Enzim*</i> | <i>Encebadors</i> | <i>Perfil d'amplificació</i> |
|-----------------------------|---------------|-------------------|--|
| <u>Control d'integritat</u> | | | |
| -globina | 1,05 | 0,80 | 94°C, 5 min: 1 segment 94°C, 30 s; 57°C, 30 s; 72°C, 30 s: 35 cicles 72°C, 7 min; 4°C,,: 1 segment |
| <u>Exons de TP53</u> | | | |
| 4, 6 i 7 | 0,7 | 0,16 | 94°C, 5 min: 1 segment 94°C, 30 s; 61°C, 30 s; 72°C, 60 s: 35 cicles 72°C, 7 min; 4°C,,: 1 segment |
| 5 i 8 | 1,05 | 0,20 | 94°C, 5 min: 1 segment 94°C, 30 s; 57°C, 30 s; 72°C, 30 s: 35 cicles 72°C, 7 min; 4°C,,: 1 segment |
| <u>Locus TP53</u> | | | |
| P53CA | 0,7 | 0,40 | 94°C, 5 min: 1 segment 94°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 30 s: 35 cicles 72°C, 7 min; 4°C,,: 1 segment |

* La concentració de la mescla enzimàtica s'expressa en U/volum de reacció.

2.2.3. Amplificació del gen *TP53* per PCR

Totes les mostres que passaren el control de qualitat foren sotmeses a l'amplificació específica dels exons 4-8 del gen *TP53*, altre cop mitjançant la tècnica de PCR. Per a la mateixa s'utilitzaren 5 parells d'encebadors, que s'il·lustren a la Taula 7 (Lianes *et al*, 1994). Amb la finalitat de rendibilitzar temps i recursos establírem condicions d'amplificació iguals per a diferents exons, permetent això l'obtenció simultània dels fragments corresponents als exons 4, 6 i 7 d'una mostra, per una banda, i 5 i 8, per a l'altra. Tot i així, les reaccions es dugueren a terme en tubs separats per a cada exó.

Pel que fa a la composició de les barreges de reacció, coincidiren amb la del control de β -globina quant a concentració de $MgCl_2$ i dNTPs. La quantitat d'encebadors i d'enzim, però, varià entre exons tal i com es mostra a la Taula 8. També en aquest cas, la quantitat de DNA genòmic afegit per reacció fou de 200 ng. Les condicions d'amplificació foren comunes a les usades pel control de qualitat, i iguals per a tots 5 exons exceptuant la $T_{unió}$ dels encebadors. Els detalls del procés d'amplificació els trobareu escrits a la Taula 8. Quant a les característiques de la detecció d'amplificats i llur documentació, coincidiren amb les exposades anteriorment pel control de qualitat.

Durant la realització del present treball la prevenció de la possible contaminació per amplicons va realitzar-se, de forma estricta, mitjançant la pràctica de certes rutines. Entre elles volem destacar les següents:

- 1) Les barreges de PCR es dugueren a terme en una cabina esterilitzada amb raigs UV, mentre que la dispensació de mostra s'efectuà fora de la mateixa, però també dins del que denominem "zona neta" (àrea sotmesa a pressió positiva).
- 2) Les amplificacions es realitzaren en tandes curtes, generalment de 6 mostres, amb els corresponents controls de barreja i negatiu: el primer, per a testar l'estat òptim dels reactius, i el segon, per a descartar la possible contaminació produïda entre les mostres (per arrossegament d'aerosols).
- 3) L'amplificació es dugué a terme en una zona específicament destinada a aquest ús.

- 4) L'anàlisi dels productes amplificats es realitzà en una àrea específicament dissenyada a tal efecte que denominem "zona bruta" (sotmesa a pressió negativa).
- 5) Els frigorífics i congeladors destinats a contenir el material pre- i post-PCR foren independents i es trobaren físicament separats en àrees diferents.

- *Restricció enzimàtica del producte específic de l'exó 4 del gen TP53*

Una sèrie de raons, justificades a l'*Apartat 3.1.1 del Capítol V*, ens dugueren a practicar una restricció enzimàtica dels productes amplificats de l'exó 4 prèvia al cribratge d'alteracions per SSCP. Així, a cada barreja de digestió contenint 5 µL del producte amplificat s'afegiren 2,5 U d'enzim AvaII (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) en presència de Tris-HCl 50 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L i NaCl 50 mmol/L a pH 8,0, segons les especificacions del fabricant. La barreja, d'un volum total de 10 µL, fou incubada a 37°C durant un mínim de 2 h. Transcorregut aquest temps, l'enzim s'inactivà mitjançant l'addició d'un volum equivalent de tampó de SSCP (formamida 95% i blau de bromofenol 0,5%), el mateix utilitzat més tard per a desnaturalitzar les mostres de l'assaig de mobilitat. Finalment, les mostres digerides es conservaren entre 4-8°C fins al moment del cribratge.

2.2.4. Cribratge d'alteracions del gen TP53 per SSCP

Un cop verificada la correcta amplificació dels cinc exons de cada parella de mostres N/T, es procedí al cribratge de possibles mutacions mitjançant un tipus d'assaig de mobilitat electroforètica en gel: el dels polimorfismes conformacionals de cadena senzilla, conegut com a SSCP (Single-Stranded Conformational Polymorphism) (Orita *et al.*, 1989). Aquesta tècnica, que ja hem introduït a l'*Apartat 3.5.2 del Capítol I*, està basada en la diferència de conformació que adopten fragments de DNA monocatenari d'igual longitud, en funció de quina sigui llur seqüència de nucleòtids. Així, distintes conformacions d'un mateix fragment confereixen al mateix mobilitat diferencial, permetent l'assignació de patrons específics per a mostres de seqüència normal respecte a les que presenten alguna mutació.

Pels motius ja adduïts a la *Introducció* –i discutits posteriorment en detall al *Capítol V*–, els assaigs de SSCP es dugueren a terme com a mínim en dues de les tres condicions d'electroforesi posades a punt per a aquest estudi (cursa *ràpida*, cursa *mitja* i cursa *lenta*). Les característiques electroforètiques de les mateixes podeu trobar-les detallades a la Taula 9.

Pel que fa a la preparació de les mostres –exceptuant les de l'exó 4, ja preparades anteriorment–, un μL de cada producte d'amplificació fou barrejat amb 2 μL d' $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ i desnaturalitzat mitjançant incubació a 100°C durant 4 min en presència de tampó de SSCP al 50% (v/v). Un cop desnaturalitzades, aquestes es refredaren immediatament en un bany de gel per un període mínim de 5 min, transcorreguts els quals es carregaren íntegrament els 6 μL en gels d'acrilamida no-desnaturalitzants, preparats comercialment (GeneGel Excel 12.5/24, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). En el cas de l'exó 4, els 6 μL carregats foren part de la mostra prèviament digerida i inactivada, tal i com hem especificat a l'*Apartat 2.2.3* d'aquest mateix capítol.

El format dels gels, cadascun de 24 pous, permeté el cribratge simultani dels 5 exons de 4 mostres, és a dir, l'estudi complet de dos casos amb els corresponents parells N/T. Assolida la separació electroforètica, que s'efectuà en un equip compatible amb els gels comercials (GenePhor, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), aquests se sotmeteren a una tinció argèntica específica dels àcids nucleics (Hiort *et al*, 1994), les característiques de la qual són reflectides a la Taula 10.

Taula 9. Condicions d'electroforesi dels assaigs de cribratge de mutacions i detecció de pèrdua d'heterozigositat (LOH).

| <i>Cursa</i> | <i>Temperatura (°C)</i> | <i>Potencial (V)</i> | <i>Corrent (mA)</i> | <i>Potència (W)</i> | <i>Temps (min)</i> |
|--------------|-------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Ràpida* | 15 | 600 | 25 | 15 | 90 |
| Mitja | 20 | 400 | 15 | 8 | 150 |
| Lenta | 7 | 200 | 10 | 3 | 270 |

* Condicions comunes a les tècniques de SSCP i detecció de LOH.

Taula 10. Protocol de tinció argèntica d'àcids nucleics en gel d'acrilamida.

| <i>Procés</i> | <i>Temps</i> | <i>Solució</i> |
|---------------|--------------|---|
| 1. Fixació | (1×) 7 min | EtOH 10% (v/v) |
| 2. Oxidació | (1×) 3 min | HNO ₃ 1% |
| 3. Rentat | (2×) 30 s | H ₂ O _{dest} |
| 4. Tinció | (1×) 20 min | AgNO ₃ 0,2% |
| 5. Rentat | (2×) 30s | H ₂ O _{dest} |
| 6. Revelatge | a discreció | Na ₂ CO ₃ 0,28 mol/L + formaldehid 0,02% |
| 7. Aturada | >5 min | àcid acètic 2% (v/v) + glicerol 8% (v/v) |

2.2.5. Identificació de les mutacions detectades per SSCP

En aquells casos en els que el cribratge per SSCP revelà alteracions, l'assaig fou repetit exclusivament per a l'exó afectat. Els productes reassajats en qüestió -N i T-, vingueren sempre d'una nova amplificació, descartant-se així la possibilitat que la mobilitat diferencial fos deguda a error de replicació en l'amplificació original.

- *Obtenció de DNA per aïllament de bandes de mobilitat anòmala*

Una sèrie de motius, que exposarem més endavant a l'*Apartat 3.1.2 del Capítol V*, ens portaren a desenvolupar un mètode per a l'enriquiment en DNA presumiblement mutat de les mostres alterades. Aquest mètode consistí en aïllar el DNA de les bandes de mobilitat anòmala, i per a això s'aprofitaren els gels d'acrilamida procedents de les repeticions dels SSCP. Les bandes anòmales, un cop identificades i convenientment numerades, foren escindides amb l'ajut d'un bisturí estèril. Els bocins d'acrilamida contenint una sola banda es dipositaren en tubs estèrils amb 10 µL d'H₂O_{dest}. Per a l'elució del DNA, els tubs s'escalfaren a 65°C en un bloc sec durant 10 min. Transcorreguda la incubació, les mostres es refredaren a TA i, en aquest punt, es conservaren entre 4-8°C fins a ser reamplificades.

- *Reamplificació i purificació del DNA aïllat de gels d'acrilamida*

Per a la reamplificació per PCR del DNA presumiblement mutat es procedí de forma similar a la descrita a l'*Apartat 2.2.3* d'aquest mateix capítol. La diferència es limità al substrat afegit, que en aquest cas fou 1 µL dels eluïts d'acrilamida. La comprovació de la correcta amplificació del DNA aïllat es realitzà en les mateixes condicions d'electroforesi descrites pels productes inicials utilitzant, però, solament 5 µL de cada reamplificat. Els 20 µL restants de cada producte foren purificats per filtració en membrana de cel·lulosa, emprant filtres MICROCON YM-50 Centrifugal Filter Devices (Amicon, Millipore Corp. Bedford, MA). Aquests dispositius permeten la purificació de fragments de DNA de mida superior als 100 pb, eliminant els dNTPs i encebadors sobrants de l'amplificació, a més de dessalar-los. El procediment consistí en un filtratge per centrifugació a 3000 rpm durant 4 min, i posterior recuperació dels productes retinguts en 10 µL d'H₂O_{dest}, part dels quals s'utilitzà per a la seqüenciació.

- *Seqüenciació directa de productes de PCR*

La identificació de mutacions en els exons 4-8 del gen *TP53* es realitzà per seqüenciació directa dels productes de PCR mitjançant la reacció d'extensió enzimàtica coneguda com a seqüenciació cíclica. Per a això s'utilitzà el ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Warrinton, UK), un sistema que utilitza com a enzim per a facilitar la incorporació de dideoxinucleòtids (ddNTPs) marcats amb fluorocroms la AmpliTaq DNA Polymerase FS, i permet gaudir dels avantatges que proporciona el format de kit "llest per a l'ús". En la presentació del mateix s'inclou, entre d'altres reactius, una prebarreja que conté l'enzim, dNTPs i ddNTPs.

Les reaccions, dutes a terme en un volum final de 10 µL, contenien 2 µL de prebarreja, 1 µL de l'encebador en qüestió, 3-6 µL de producte de PCR (30-90 ng) i la resta d'H₂O_{dest}. Cada producte fou seqüenciat sempre en ambdós sentits, utilitzant-se els mateixos encebadors que per a l'amplificació. El perfil de la reacció fou el que segueix: un segment de 94°C 3 min; 25 cicles de 96°C 10 s, T_{unió} 5 s, 60°C 4 min; i un darrer segment de 4°C .

Acabada la reacció, i abans d'analitzar els productes obtinguts, eliminarem dels mateixos l'excés de dNTP no incorporats. Així, els 10 µL de producte foren precipitats afegint-los AcK a concentració final 0,3 mol/L, 10 µg de glucogen i EtOH absolut (2,5:1 v/v). Els tubs s'incubaren 10 min en gel, i després de centrifugar-los a 14000 rpm durant 20 min la solució d'EtOH fou decantada. Un cop rentats amb 200 µL d'EtOH 70% i assecats al buit 10 min a TA, els precipitats foren resuspesos en 20-25 µL de TSR (Template Suppression Reagent) (PE Applied Biosystems, Warrinton, UK). Les mostres així preparades foren desnaturalitzades a 94°C 3 min prèvia electroforesi en capilar de polímer POP-6TM mitjançant l'equip ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems, Foster City, CA). Les dades crues obtingudes del procés s'analitzaren automàticament amb el programa DNA Sequencing Analysis Software versió 3.4 (també de PE Biosystems) i, un cop impresos, els electroferogrames corresponents foren interpretats per dos observadors independentment.

2.2.6. Criteris d'avaluació dels resultats de PCR-SSCP/seqüenciació

També l'estudi del gen *TP53* requerí l'assentament d'uns criteris per a poder atorgar a les mostres la qualitat de mutades. En aquest cas, els criteris foren els següents:

- a) Una mostra tumoral es considerà susceptible de mutació quan presentà un patró de SSCP diferent respecte del normal corresponent i, aquest patró, fou reproducible.
- b) La sospita de mutació hagué de poder-se confirmar mitjançant seqüenciació; una mostra fou considerada definitivament mutada quan l'assaig permeté identificar alguna anomalia respecte la seqüència consens del gen *TP53* (Genbank Accession Number: X54156).
- c) L'absència de mutació en els exons estudiats (4-8) no excloué la possibilitat de mutació en altres regions del gen.

Per contra, en la categoria de no mutats incloem aquells que:

- a) Després del cribratge per SSCP –realitzat com a mínim en 2 de les 3 condicions establertes– no evidenciaren cap anomalia de la mobilitat atribuïble a mutació.

- b) Bo i presentant un patró anòmal de mobilitat, no pogueren reproduir-lo en cap altre assaig de SSCP.
- c) Havent estat seqüenciades, posaren de manifest una seqüència normal.

2.3. Detecció de pèrdues al·lèliques al cromosoma 17p (locus TP53)

L'estudi de pèrdues al·lèliques al cromosoma 17p es realitzà mitjançant la detecció de la pèrdua d'heterozigotitat del locus *TP53*. L'estratègia triada consistí en l'amplificació per PCR d'un marcador polimòrfic prèviament descrit (Jones i Nakamura, 1992), seguida d'una anàlisi electroforètica dels productes obtinguts en gels d'acrilamida no-desnaturalitzants.

2.3.1. Amplificació del marcador p53CA per PCR

El marcador emprat fou un dinucleòtid de repetició altament polimòrfic anomenat p53CA (Litt i Luty, 1989; Weber i May, 1989), el qual amplificarem utilitzant els encebadors que trobareu descrits a la Taula 6 (Jones i Nakamura, 1992). La resta de característiques de la PCR, com ara les condicions de cursa i/o la composició de la barreja de reacció, podeu trobar-les detallades a la Taula 8. Solament resta afegir que la quantitat de DNA genòmic usada per a cada reacció fou de 200 ng, i que, un cop més, confirmarem l'obtenció de productes de PCR mitjançant electroforesi en gel d'agarosa, prèvia a l'anàlisi dels polimorfismes en gel d'acrilamida.

2.3.2. Anàlisi de polimorfismes per electroforesi en gel no-desnaturalitzant

L'anàlisi es dugué a terme gràcies al sistema GenePhor d'electroforesi ja introduït a l'*Apartat 2.2.4* d'aquest mateix capítol. També en aquesta ocasió, els gels d'acrilamida no-desnaturalitzants foren GeneGel Excel 12.5/24 de Pharmacia Biotech. Cada gel, de 24 pous, pogué albergar de l'ordre de 22 mostres (11 parelles N/T), reservant els dos extrems per al marcador de pes molecular 100 Base-pair Ladder (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ). Per a l'aplicació de mostres –4 µL en total–, cada producte d'amplificació fou diluït al 50% en tampó de càrrega (25 mL de GeneGel

HyRes Buffer de Pharmacia Biotech, 80 µL de solució d'Orange G 1%, 40 µL de solució de xilè cianol 1% i 250 µL d'EDTA 0,2 mol/L). Les condicions d'aquesta cursa podeu trobar-les a la Taula 9. Per acabar, els gels sotmesos a tinció argèntica foren assecats al buit sobre paper secant i així, analitzats a doble cec, es conservaren indefinidament.

Des del punt de vista tècnic, solament resta comentar que la modificació aplicada al mètode de Jones i Nakamura, consistent a visualitzar els productes de l'electroforesi mitjançant tinció argèntica, simplificà extraordinàriament l'anàlisi de les pèrdues. El fet de poder realitzar les reaccions d'amplificació "fredes", estalvià l'haver de córrer riscos innecessaris derivats de la utilització de radioisòtops.

2.3.3. Criteris d'avaluació dels resultats de l'anàlisi de polimorfismes

Alhora de valorar els resultats de la LOH del polimorfisme p53CA (una seqüència microsatèl·lit) haguérem de tenir en compte el fet que, com ja hem esmentat a l'*Apartat 2.2.1 del Capítol I*, hi ha tumors que presenten inestabilitat genòmica a nivell de les seqüències microsatèl·lits. En el cas que ens ocupa, el patró electroforètic propi dels tumors inestables, amb fragments al·lèlics en el rang dels 103 als 135 pb, proporciona un bandeig que pot emmascarar, si n'hi han, les delecions. Aquesta limitació, inherent a la tècnica, impedeix valorar la presència de pèrdues al·lèliques al locus TP53 en els tumors que tenen inestabilitat a nivell del mateix.

Així doncs, solament es valorà com a pèrdua al·lèlica un canvi relatiu en la intensitat dels al·lèls del tumor respecte al seu control normal.

2.4. Anàlisi estadística

Per tal d'assolir l'objectiu del present estudi fou necessària l'aplicació de proves estadístiques que permetessin, d'una banda, analitzar la relació de dependència entre les variables estudiades i, d'altra, comparar les diferents metodologies desenvolupades per a conèixer l'estat de p53. Tot seguit mostrem l'estratègia seguida d'acord als requisits.

2.4.1. Descripció de les tècniques utilitzades

Pel fet de constar de diversos tipus de variables –de les quals trobareu una relació, agrupades per categories, a la Taula 11– l'estudi estadístic implicà diferents tècniques per a tractar-les. Foren, però, característiques comunes a totes elles els contrastos estadístics, decidits en base a un nivell de significació de $\alpha = 5\%$, i els intervals de confiança, escollits sempre amb un coeficient del 95%.

L'anàlisi es dugué a terme per fases. En la primera, per a verificar l'existència de relacions entre dues variables dicotòmiques, s'emprà la prova exacta de Fisher (Martín i Luna del Castillo, 1990a). Aquesta tècnica, a diferència de la Chi-quadrat (χ^2), no exigí cap requisit sobre la grandària mostral. Per tal d'analitzar la relació entre una variable categòrica de tres o més classes amb qualsevol altre variable categòrica, s'emprà la prova de la χ^2 (Martín i Luna del Castillo, 1990b). El fet d'exigir que les taules de contingència analitzades amb aquesta tècnica acomplissin els requisits habituals per assolir la distribució asimptòtica de referència per l'estadístic de test, forçà a l'agrupació per categories dins d'algunes variables. L'anàlisi simultània de la relació entre tres variables categòriques es dugué a terme gràcies als models log-lineals, que suposen una potent eina d'anàlisi de taules multidimensionals (Agresti, 1990a).

Aquest tipus d'anàlisi es basa en la comparació dels resultats de la tècnica qüestionada amb els de la tècnica de referència: IHQ vs. PCR-SSCP/seqüenciació, en el nostre cas. Per a això, s'efectua una representació gràfica de la sensibilitat vs. l'especificitat (Hanley i McNeil, 1982; Begg, 1987). La sensibilitat es defineix com la capacitat de la IHQ per a identificar correctament les mutacions de *TP53* detectades utilitzant la PCR-SSCP/seqüenciació, i es determina per la proporció de casos amb coincidència de fenotip i genotip positius. D'altra banda, l'especificitat es defineix com la capacitat de la IHQ per a detectar absència d'expressió de la proteïna p53 en tumors on no s'ha pogut demostrar la presència de mutacions, essent obtinguda en aquest cas per la proporció de casos amb coincidència de fenotip i genotip negatius. Així, el gràfic de la corba ROC és la representació de tots els possibles parells de valors de sensibilitat/especificitat, i permet validar la tècnica de forma objectiva, sense l'arbitrarietat inherent a cada parell

Taula 11. Relació dels tipus de variables estadístiques estudiades.

| <i>Variables (descripció)</i> | <i>Opcions</i> |
|--|--|
| <u>Dicotòmiques</u> | |
| sexe (sexe del pacient) | M (home) vs. F (dona) |
| gg (afectació ganglionar) | N (no) vs. S (si) |
| acumulació (positivitat immunohistoquímica) | N (no) vs. S (si) |
| mutació (presència de mutació) | N (no) vs. S (si) |
| tipus (tipus de mutació) | M (missense) vs. no M (no missense/absent) |
| <u>Categòriques</u> | |
| mida (mida del primari) | 1 (1-3 cm); 2 (4-6 cm); 3 (>6cm) |
| grau (grau de diferenciació tumoral) | 1 (grau 1); 2 (grau 2); 3 (grau 3) |
| infiltració (nivell d'invasió del tumor) | A (T _{is} -T ₂); B (T ₃); C (T ₄) |
| estadi (estadi del tumor primari) | 1 (estadi 0-I); 2 (estadi II); 3 (estadis III-IV) |
| p53 grup (positivitat immunohistoquímica) | 0 (x= 0%); 1 (0<x<10%); 2 (10%) |
| pèrdua 17p (presència/absència de LOH) | P (presència de LOH); N (absència de LOH) |
| inestabilitat (presència/absència d'inestabilitat) | I (inestabilitat); N (absència d'inestabilitat) |
| <u>Discretes</u> | |
| edat (edat del pacient) | rang de 37-93 anys |
| p53% (positivitat immunohistoquímica en %) | rang de 0-90% |

individual de sensibilitat/especificitat (Begg, 1987). Donat que sensibilitat i especificitat estan inversament relacionades, és possible escollir el límit de sensibilitat que proporciona el millor ajust tenint en compte totes dues.

Ja dins d'una segona fase de l'estudi s'analitzaren, en detall, les relacions estadísticament significatives trobades en la primera fase. En concret, pel que fa a les relacions significatives entre dues variables dicotòmiques s'escollí una d'elles com a indicadora, comparant llur presència en termes de proporció, en els dos nivells de l'altre. Així, es calculà l'estimació màxima-versemblant de les dues proporcions implicades i els dos intervals de confiança exactes basats en la distribució de Fisher (Martín i Luna del Castillo, 1990c). Aquests dos intervals es representaren gràficament, permetent això precisar el sentit de les diferències trobades mitjançant les proves de Fisher de la primera fase de l'estudi. En altres casos la relació estudiada fou entre una variable dicotòmica i una categòrica de tres classes. Per tal d'entendre les diferències entre les tres parelles possibles a comparar, s'estudià la significació parella a parella

mitjançant la prova exacte de Fisher rebaixant, però, el nivell de significació individual de cada comparació a $\alpha/3$, seguint la tècnica de Bonferroni (Martín i Luna del Castillo, 1990d). Com en el cas de dues variables dicotòmiques, es calculà l'estimació màxima-versemblant de les tres proporcions a comparar i els seus intervals de confiança exactes, representats gràficament de forma conjunta. Finalment, per a analitzar la relació entre variables discretes i diferents variables dicotòmiques s'utilitzà la regressió logística (Agresti, 1990b).

L'estudi es completà amb la corba ROC (Receiver-Operating-Characteristic curve), i amb el càlcul de l'àrea sota la corba (Hanley i McNeil, 1982; Obuchowski, 1997).

2.4.2. Relació de l'hardware i del software utilitzats

Totes les dades estadístiques foren obtingudes mitjançant un ordinador amb processador Pentium Pro 200 Mhz, sota el sistema operatiu Windows NT 4.0 (Microsoft Corp. Redmond, WA). La relació del software utilitzat podeu trobar-la a la Taula 12.

Taula 12. Relació del software utilitzat per a les proves estadístiques.

| <i>Prova estadística</i> | <i>Software</i> |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| Taules de contingència | SPSS 8.0.1* |
| Prova exacta de Fisher | SPSS 8.0.1 |
| Prova de la Chi-quadrat | SPSS 8.0.1 |
| Models log-lineals | SPSS 8.0.1 |
| Regressions logístiques | SPSS 8.0.1 Statgraphics Plus 4.0** |
| Intervals de confiança exactes | Excel 97*** |
| Corba ROC | Excel 97 |

* SPSS Inc. Chicago, IL.

** Manugistics Inc. Rockville, MD.

*** Microsoft Corp. Redmond, WA.