

## **IV. RESULTATS**

## 1. DESCRIPCIÓ DELS PARÀMETRES ANATOMOPATOLÒGICS

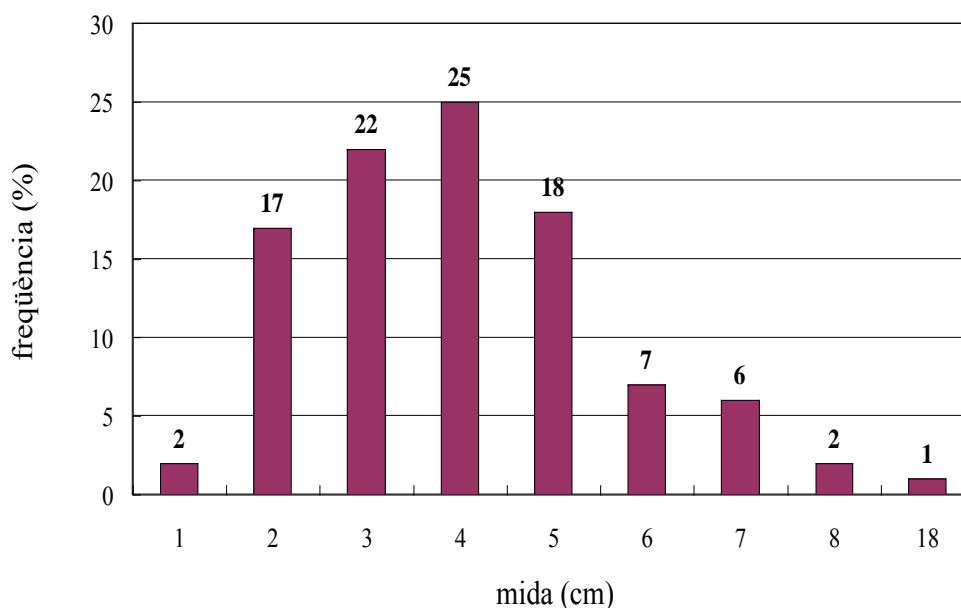
L'examen macroscòpic i microscòpic de les peces de resecció quirúrgica permeté d'obtenir una sèrie de dades d'interès clínic, entre les quals hi destaquem la mida del tumor primari, el seu grau de diferenciació, la infiltració del tumor dins la paret del còlon i el nombre de ganglis limfàtics amb afectació neoplàstica. Tot seguit podeu trobar la descripció completa dels paràmetres esmentats.

### 1.1. Mida del tumor primari

De tots els tumors de la sèrie fou possible d'obtenir-ne la mida. La taula que mostrem a continuació constitueix el sumari de les mesures obtingudes, i reflecteix els moments mitjana aritmètica ( $\bar{x}$ ) i desviació típica ( $s$ ). El gràfic corresponent dóna idea de la distribució dels valors d'aquesta variable discreta. Recordem, però, que a efectes estadístics la mida es tractà com a variable categòrica, integrada per tres categories (vegeu l'*Apartat 2.4.1 del Capítol III*).

**Gràfic 1.** Distribució de freqüències basada en la mida tumoral.

<i>mida (cm)</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	18	$\bar{x} = 4,1$
<i>freqüència</i>	2	17	22	25	18	7	6	2	1	$s = 2,1$



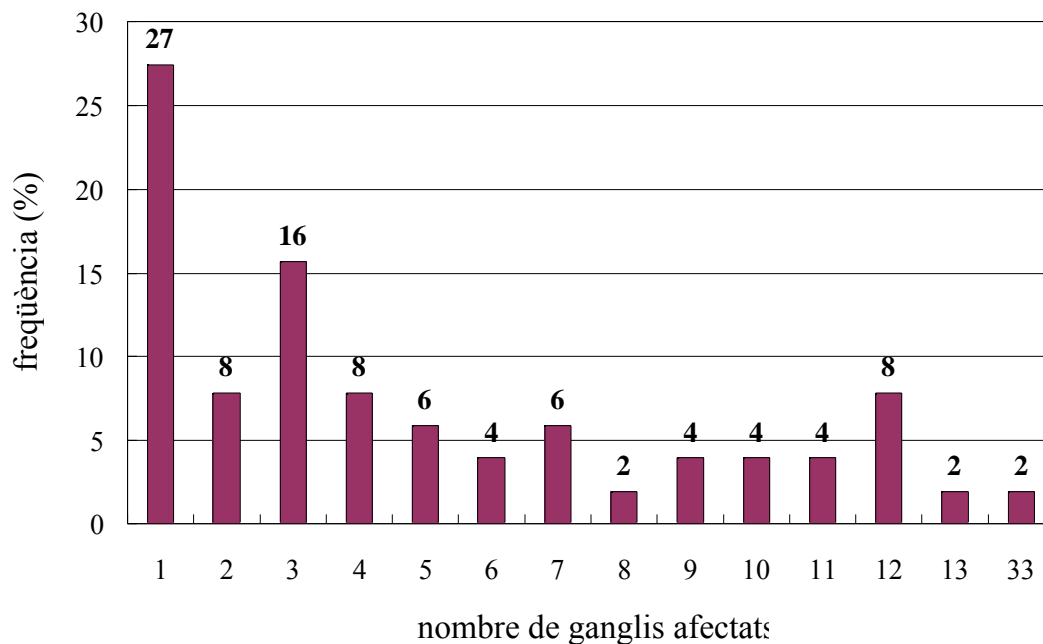
## 1.2. Afectació ganglionar

Les dades a propòsit del grau d'afectació ganglionar dels casos de la nostra sèrie s'obtingueren practicant la dissecció dels ganglis limfàtics a les peces analitzades. La mitjana dels ganglis dissecats fou  $\bar{x} = 16,3$  i la desviació típica  $= 10,0$ . Separant els tumors en base a la presència o no d'afectació neoplàstica ganglionar, la mitjana de ganglis dissecats dels no afectats fou  $\bar{x} = 15,6$ , mentre que la dels afectats fou 16,9. En aquest darrer grup de tumors, amb metastasis ganglionars, el nombre de ganglis afectats resultà ésser molt heterogeni, tal i com pot apreciar-se per les dades i els moments  $\bar{x}$  i que trobareu a la taula que acompanya el Gràfic 2.

Cal dir, però, que també aquest cop, malgrat tractar-se d'una variable discreta, l'afectació ganglionar es tractà estadísticament com a una variable dicotòmica, amb 49 i 51 mostres en les categories de no afectació i afectació, respectivament.

**Gràfic 2.** Distribució de freqüències basada en l'afectació ganglionar.

<i>gg. afectats</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	33	$\bar{x} = 5,3$
<i>freqüència</i>	14	4	8	4	3	2	3	1	2	2	2	4	1	1	$= 5,5$

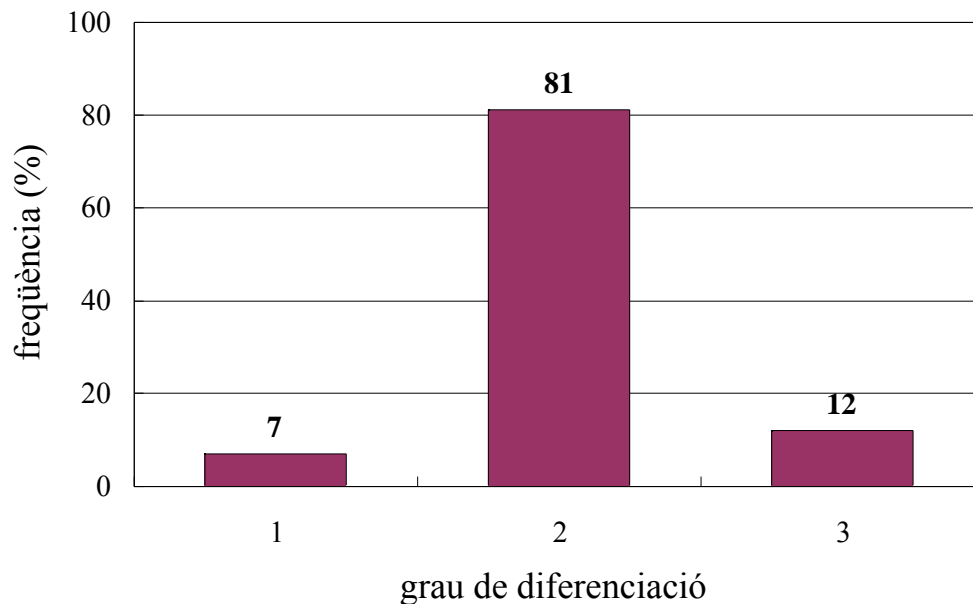


### 1.3. Grau histològic

El grau de diferenciació tumoral fou determinat, també, en totes les neoplàsies. Les lesions es classificaren en tres categories: 1) de grau 1 ó ben diferenciades; 2) de grau 2 ó moderadament diferenciades; i 3) de grau 3 ó mal diferenciades (vegeu l' *Apartat 1.4.1 del Capítol I*). Cal ressaltar que la majoria de tumors pertanyien a la segona categoria, essent la relació dels graus i la distribució de freqüències les mostrades tot seguit:

**Gràfic 3.** Distribució de freqüències basada en el grau histològic.

<i>grau histològic</i>	1	2	3
<i>freqüència</i>	7	81	12



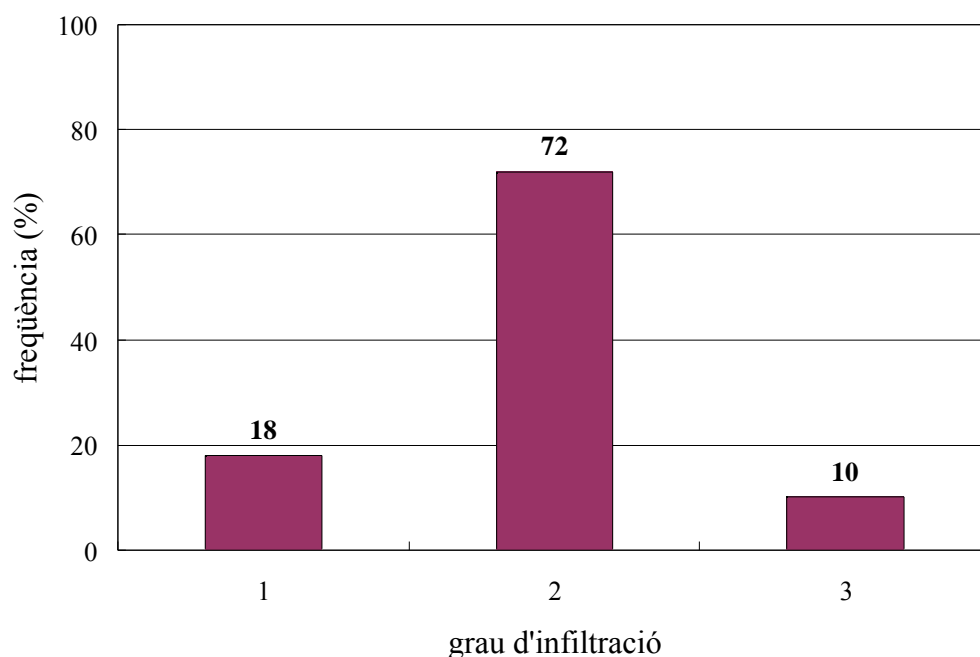
### 1.4. Nivell d'infiltració i estadiatge

El nivell d'infiltració de la paret del còlon, representat pel pT, fou un altre dels paràmetres anatomopatològics obtinguts de totes les neoplàsies estudiades (vegeu l' *Apartat 1.4.2 del Capítol I*). A efectes estadístics, però, deguda la poca potència de les proves que analitzen variables multicategòriques de sèries d'escassa grandària, únicament fou possible d'agrupar els tumors en tres categories: 1) els intramurals, amb un creixement limitat a la paret del còlon, incloent-hi els pT<sub>is</sub>, pT<sub>1</sub> i pT<sub>2</sub>; 2) els pT<sub>3</sub>, amb

extensió a teixit adipós sense afectació de la serosa; i 3) els pT<sub>4</sub>, amb afectació de la serosa. A continuació es mostra, tabulada, la relació dels grups de tumors en base al nivell d'infiltració i, en forma de gràfic, la seva distribució de freqüències.

**Gràfic 4.** Distribució de freqüències basada en el nivell d'infiltració.

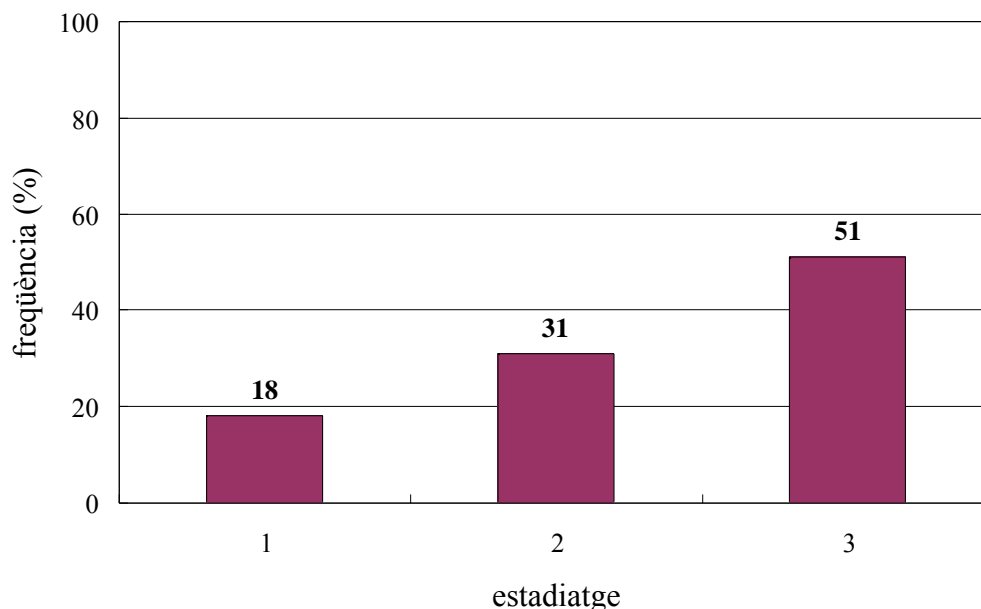
<i>nivell d'infiltració</i>	1	2	3
<i>freqüència</i>	18	72	10



Una altra forma de considerar la infiltració tumoral fou lligant-la a l'afectació ganglionar, que és el què hem definit prèviament com a estadiatge (vegeu també l'*Apartat 1.4.2 del Capítol I*). En aquest cas, es consideraren les següents categories: 1) els tumors d'estadis 0 i I, intramurals sense afectació ganglionar; 2) els d'estadi II, envaint fins a teixit adipós amb o sense afectació de la serosa, i sense metàstasis ganglionars; i 3) el grup dels tumors d'estadis III i IV, amb metàstasis ganglionars i/o a distància, amb independència del nivell d'infiltració. La relació de categories i el gràfic de la distribució de freqüències els podeu trobar a continuació:

**Gràfic 5.** Distribució de freqüències basada en l'estadiatge.

<i>estadiatge</i>	1	2	3
<i>freqüència</i>	18	31	51



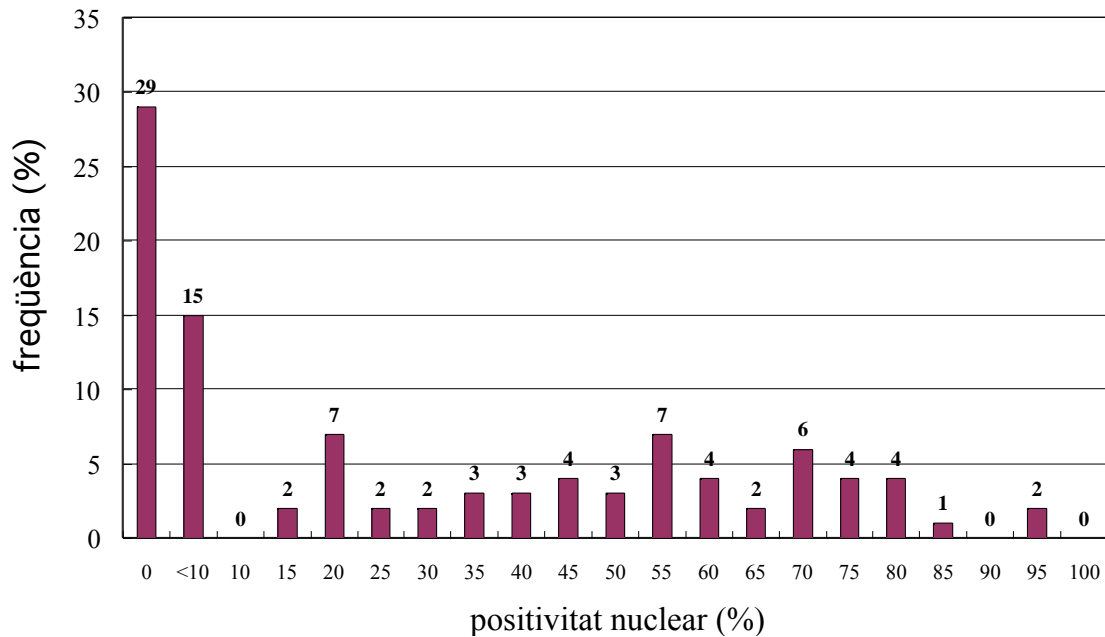
## 2. DESCRIPCIÓ DE L'ESTAT DE P53

### 2.1. Resultats de l'assaig immunohistoquímic

#### 2.1.1. Presència/absència de positivitat IHQ

Els resultats de la IHQ de p53, en base als criteris establerts (vegeu l'*Apartat 2.1.3 del Capítol III*), posaren de manifest la presència de positivitat en 56 dels 100 casos estudiats (56%), valorant-se la resta de casos (44%) com a negatius. Quant al nombre de cèl·lules positives de cada mostra exhibint l'acumulació de la proteïna, l'heterogeneïtat fou remarcable. En la nostra sèrie trobarem representats, pràcticament, tots els percentatges de positivitat nuclear possibles, tal i com pot apreciar-se en el gràfic de distribució de freqüències que mostrem a continuació. Centrant-nos en el grup de tumors positius, aquest rang de percentatges de positivitat oscil·là entre 15-95%, essent la mitjana de  $\bar{x} = 51,9$  i la  $s = 21,9$ .

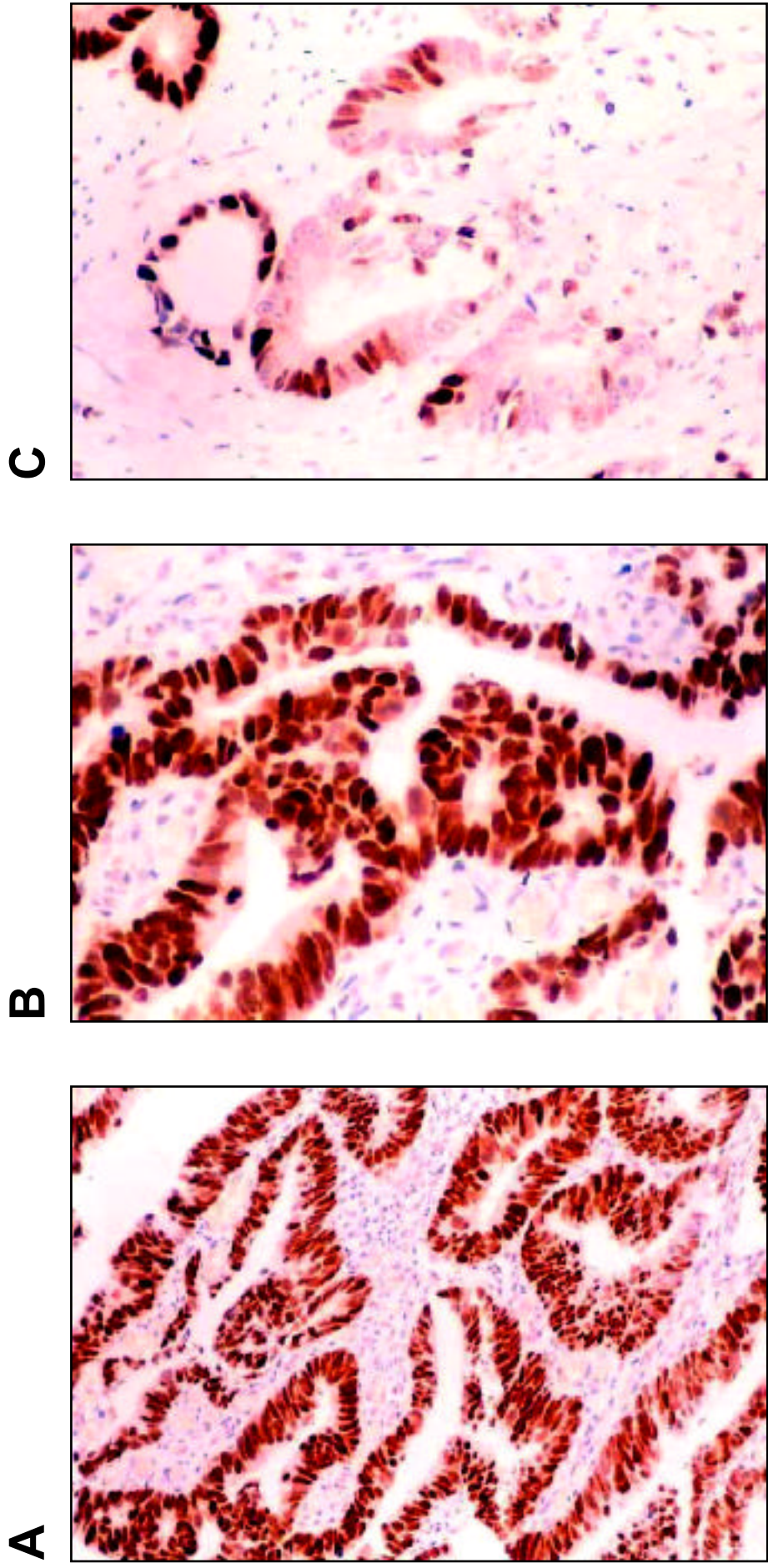
**Gràfic 6.** Distribució de freqüències basada en la positivitat d'IHQ.



En els diferents assaigs realitzats la reactivitat immunohistoquímica es restringí al nucli de les cèl·lules, no observant-se positivitat citoplasmàtica en cap cas. A més, en cada assaig, els corresponents controls positiu i negatiu donaren sempre els resultats esperats. Val a dir que en cap cas estudiat no es detectà immunoreactivitat nuclear en la mucosa còlica adjacent al tumor, la qual cosa confirmà l'especificitat de la reacció alhora que serví d'autocontrol negatiu. Alguns exemples de tumors amb fenotip IHQ positiu podeu trobar-los a la Figura 11.

#### 2.1.2. Classificació per grups en base al grau de positivitat IHQ

Ja hem esmentat que, en base als criteris de positivitat definits prèviament, el nombre de mostres valorades com a negatives fou de 44. Cal notar, però, que dins d'aquest grup s'incloueren diferents tipus de mostres; des d'aquelles en les quals l'absència de cèl·lules positives fou total fins a les que presentaren una positivitat limitada, com a màxim, al 10% (no inclòs). Curiosament, dintre de la nostra sèrie, en totes les mostres negatives deixant de banda aquelles en les que l'absència de positivitat fou total (grup del 0%), la presència de positivitat fou inferior a l'1% (grup de <10%).



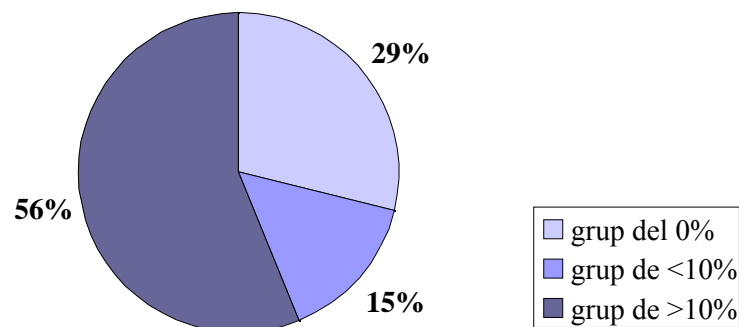
**Figura 11.** Fotografies il·lustratives de la tècnica d'immunohistoquímica aplicada a l'estudi de l'acumulació de la proteïna p53, per a la qual s'utilitza l'anticòs PAb 1801 (podeu consultar més detalls tècnics a l'*Apartat 2.1 del Capítol III*).

A) La secció presenta una positivitat nuclear >90% (100x); B) Detall de la secció anterior (400x); i C) La immunoreactivitat d'aquest tumor correspon al 50% (400x).



Amb tot, malgrat la baixa representació de cèl·lules positives que trobarem en el grup de <10%, volguérem diferenciar expressament aquestes mostres de les que pertanyien al grup del 0%. D'aquesta manera, del grup de mostres negatives en sorgiren dos subgrups que, afegits al grup de positivitat >10% es distribuïren com mostrem a continuació:

**Gràfic 7.** Classificació dels tumors per grups de positivitat d'IHQ.



## 2.2. Resultats de l'anàlisi mutacional del gen *TP53*

### 2.2.1. Obtenció de DNA genòmic i control de qualitat

Com ja hem esmentat al capítol anterior, la nostra sèrie, que en principi havia d'incloure 109 casos, va quedar finalment reduïda a 100 tumors procedents de 96 pacients. Els 9 tumors restants, exclosos d'aquest estudi, ho foren per dos motius:

- Cinc (4,6%), per manca d'amplificació del control de qualitat de  $\beta$ -globina, ja sia del teixit normal o del tumoral.
- Quatre (3,7%), per la baixa qualitat del DNA normal o tumoral obtingut, que impedí parcialment l'amplificació dels exons 4-8 del gen *TP53*, malgrat haver permès l'amplificació del control de qualitat.

Els DNA extrets de cada mostra se sotmeteren a una anàlisi espectrofotomètrica que, a més de permetre quantificar-los, donà estima de llur puresa (vegeu l'*Apartat 2.2.1* del *Capítol III*). La mitjana dels índex  $DO_{260}/DO_{280}$  obtinguts fou  $\bar{x} = 1,58$  ( $s = 0,13$ ).

### 2.2.2. Presència/absència de mutacions

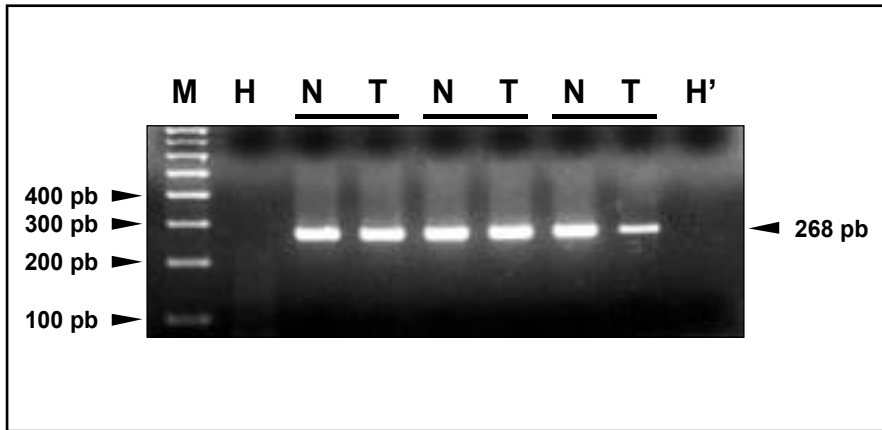
Un cop superats el control d'integritat del DNA i l'amplificació dels cinc exons del gen *TP53* (Figures 12 i 13, respectivament), es procedí a l'anàlisi mutacional. En base als criteris prèviament esmentats (vegeu l'*Apartat 2.2.6* del *Capítol III*), les mostres foren classificades en funció de la presència o absència de mutacions en els exons 4-8 del gen *TP53*. D'ara endavant, doncs, ens referirem a elles en termes de "genotip positiu" i "negatiu". Els resultats revelaren presència de mutacions en 68 dels 100 casos estudiats (68%), amb la consegüent absència en els 32 casos restants (32%) (vegeu la Figura 14). Cal matisar que el nombre de mostres amb genotip positiu no coincidí amb el de mutacions identificades, elevant-se aquest darrer a 73. Això fou degut que cinc dels 68 mutants (7%) presentaren dobles mutacions afectant a més d'un exó.

### 2.2.3. Classificació per grups en base al tipus de mutació

La gran complexitat de l'espectre mutacional obtingut de la nostra sèrie mitjançant l'estudi molecular del gen *TP53*, requerí l'anàlisi dels resultats des de diferents òptiques: en funció del tipus genèric de mutació identificada, dels exons o codons afectats o del canvi de base produït. D'ací que la descripció de les dades l'haguem efectuat en diferents subapartats, cadascun dels quals representa un punt de vista diferent. Cal advertir, però, que és bàsic integrar la informació reflectida en tots els apartats per tal d'arribar a comprendre els resultats.

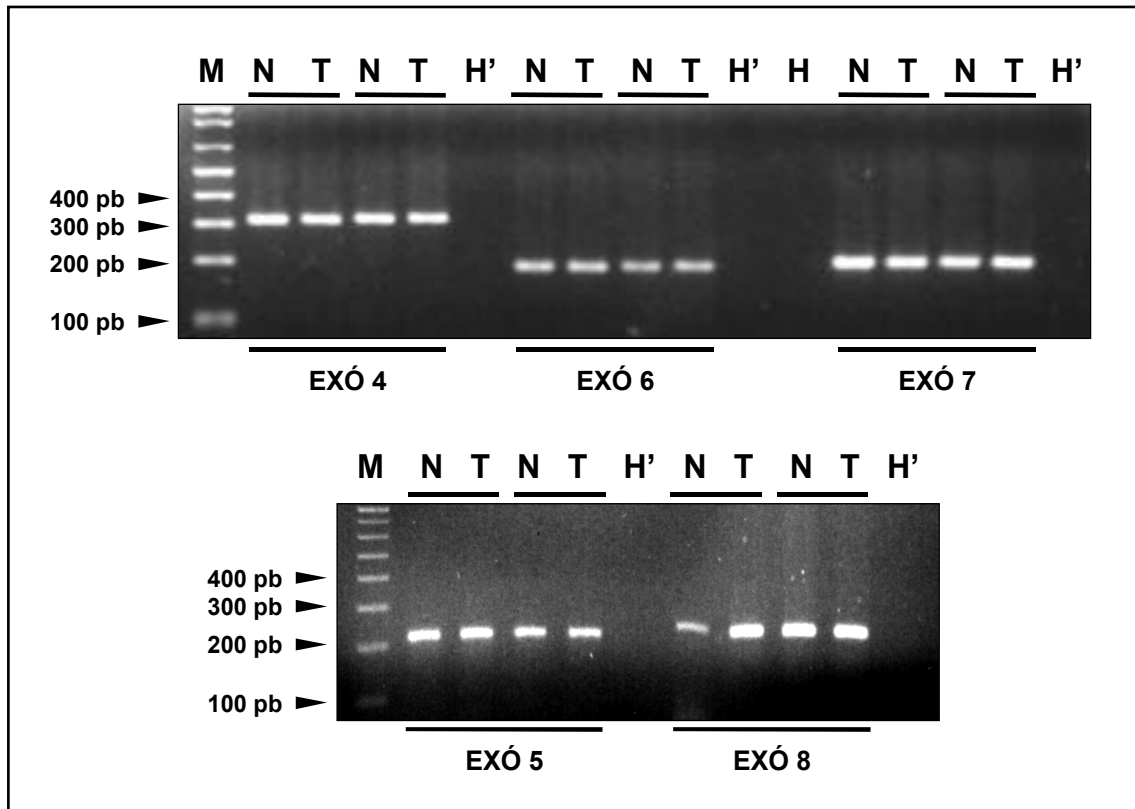
- *Classificació de les mutacions per tipus genèric*

Inicialment, les alteracions obtingudes es classificaren en dos grans grups: 1) aquelles en les que el canvi produït no afectà la longitud de la seqüència consens; i 2) aquelles en les que hi hagué guany o pèrdua de material genètic. Dins del primer grup es trobaven les mutacions de sentit erroni ("missense"), en les quals la substitució d'una base



**Figura 12.** Fotografia representativa del control de qualitat de DNA genòmic. Gel d'agarosa en el que es posa de manifest l'estat òptim del DNA genòmic obtingut a partir de tres parells de mostres (normal i tumor) amb els corresponents controls d'amplificació. Les bandes de 268 pb són productes de PCR del gen de la  $\beta$ -globina humana.

M: marcador de pes molecular (100 Base-pair Ladder) ; N: DNA normal; T: DNA tumoral; H: control de barreja; H': control negatiu.



**Figura 13.** Fotografies per a il·lustrar l'amplificació dels exons 4-8 del gen *TP53*. En els gels d'agarosa poden apreciar-se les bandes pertanyents als productes de PCR de dos parells de mostres (normal i tumor) amb els corresponents controls d'amplificació. La mida dels fragments dels exons 4-8 és de 308, 209, 184, 188 i 213 pb, respectivament.

M: marcador de pes molecular (100 Base-pair Ladder); N: DNA normal; T: DNA tumoral; H: control de barreja; H': control negatiu.

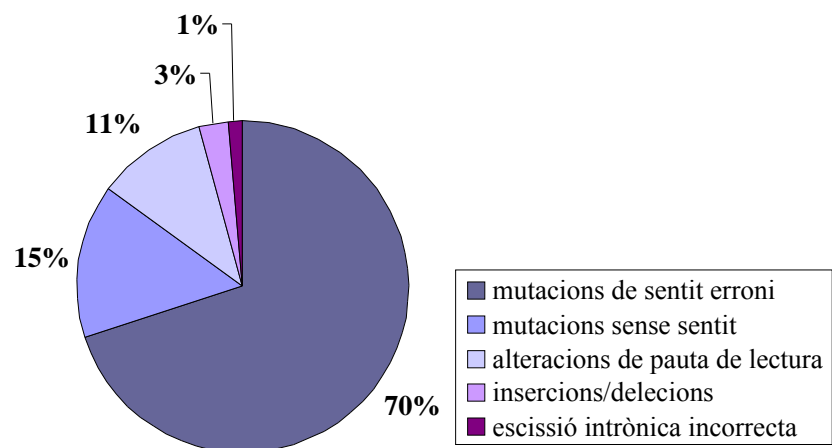
comportava el canvi d'un aminoàcid de la proteïna, les mutacions sense sentit (“nonsense”), en les quals la substitució implicava la finalització prematura de la traducció a nivell del codó afectat i, per últim, les mutacions que alteraven l'escissió d'introns (“splicing”), en les que la substitució es produïa en la frontera intró-exó, afectant la seqüència que permet la correcta escissió. En el segon grup hi trobarem insercions i delecions, que podien ser puntuals i canviar, per tant, la pauta de lectura (“frameshift”), o bé implicar més d'una base, afectant o no l'esmentada pauta.

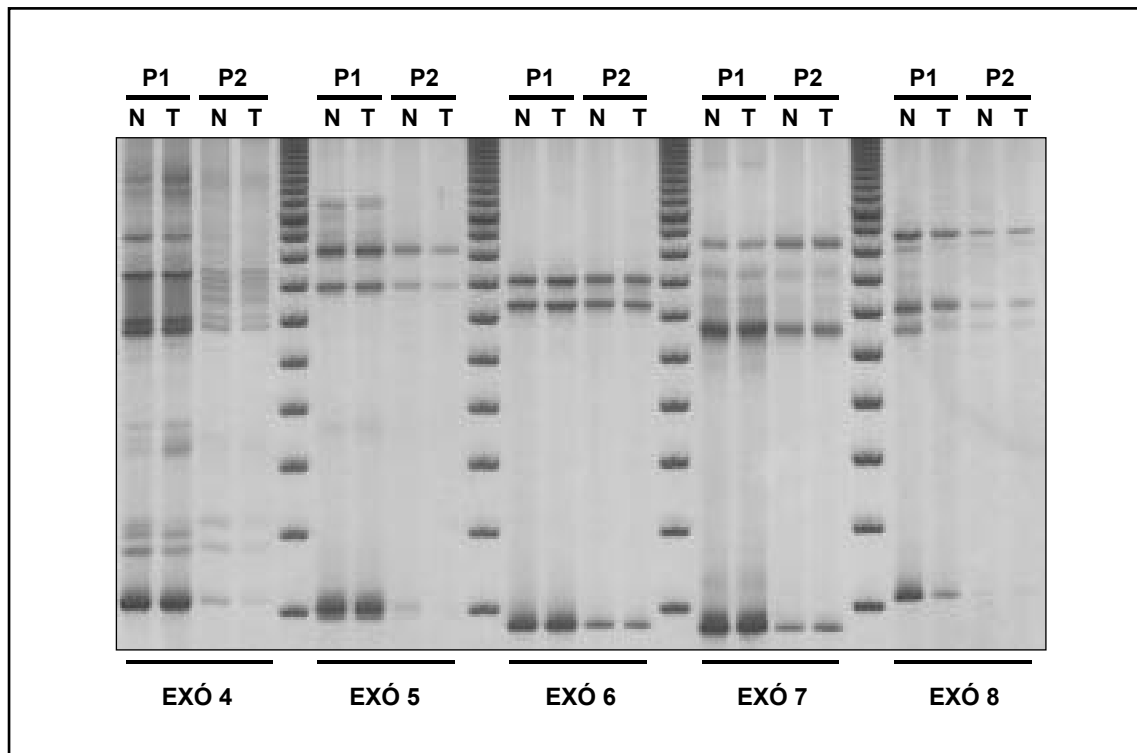
Per tal de simplificar la classificació, les mutacions es van agrupar en cinc blocs: mutacions de sentit erroni (M) (vegeu la Figura 15A), mutacions sense sentit (N) (Figura 15B), mutacions afectant l'escissió intrònica (S), insercions/delecions amb alteració de la pauta de lectura (F), i insercions/delecions sense alteració de la mateixa (D). Un resum esquematitzat de les característiques d'aquests 5 grups es troba en la Taula 13.

Tal i com hem esmentat anteriorment, el nombre de mutacions identificades en la nostra sèrie fou de 73 (corresponents a 68 casos), incloses de diversos tipus. El sumari dels resultats d'aquest apartat es mostren a continuació, en forma de taula i de gràfica:

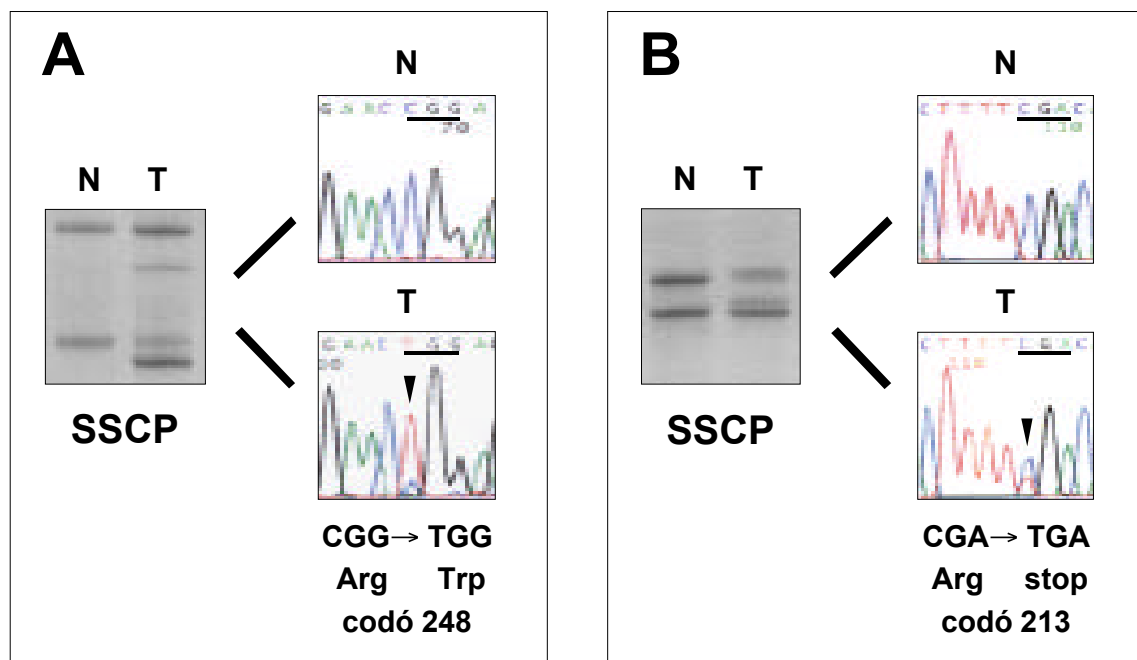
**Gràfic 8.** Classificació de les mutacions basada en el tipus genèric.

<i>tipus genèric de mutació</i>	M	N	F	D	S
<i>freqüència</i>	51	11	8	2	1





**Figura 14.** Fotografia per a il·lustrar l'estudi mutacional del gen *TP53* (exons 4-8). El gel d'acrilamida és representatiu d'un assaig de mobilitat del tipus SSCP per a dos pacients. En el mateix es posa de manifest la igualtat dels patrons de cada parell de mostres de teixit normal i tumoral.  
 N: DNA normal; T: DNA tumoral; P1: pacient 1; P2: pacient 2.



**Figura 15.** Exemples de dues alteracions detectades per SSCP en els tumors colorectals de la nostra sèrie, i resultat de la identificació de les mateixes per seqüenciació. Cal notar que els patrons electroforètics normal i tumoral de cada parell de mostres difereixen ostensiblement.  
 A) Mutació de sentit erroni; B) Mutació sense sentit.

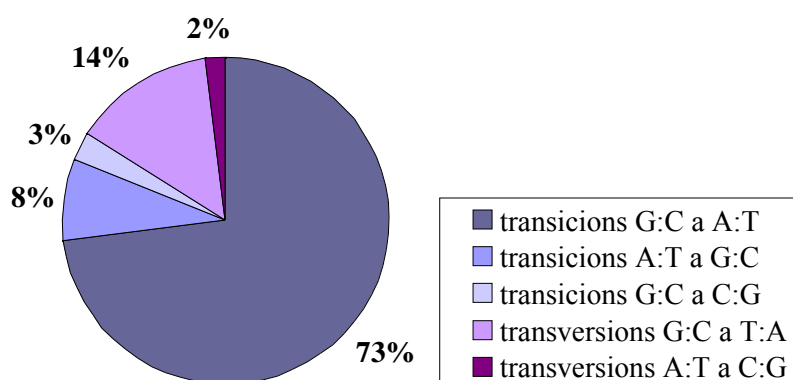
**Taula 13.** Classificació de les mutacions trobades en aquest estudi.

alteracions <u>mantenint</u> la longitud de la seqüència consens	de sentit erroni (M)	<u>no</u> canvien la pauta de lectura	mutacions <u>puntuals</u>
	sense sentit (N)		
	mala escissió intrònica (S)	poden o <u>no</u> canviar la pauta	
alteracions <u>no</u> mantenint la longitud de la seqüència consens	insercions/deleccions d'una base (F)	canvien la pauta de lectura	mutacions <u>no</u> puntuals
	insercions/deleccions de més d'una base (D)	poden o <u>no</u> canviar la pauta de lectura	

- *Classificació de les mutacions per tipus de substitució generada*

Del total de mutacions identificades, 63 (86%) foren puntuals per substitució d'un nucleòtid: 51 de sentit erroni, 11 sense sentit i una d'alteració de l'escissió intrònica. D'aquestes, 53 foren transicions (84%) incloent-hi 46 substitucions de G:C per A:T (73%), 5 d'A:T per G:C (8%) i 2 de G:C per C:G (3%). Les 10 restants implicaren transversions (16%), de les quals 9 suposaren canvis de G:C per T:A (14%) i solament n'hi hagué una d'A:T per C:G (2%). Globalment, mutacions afectant dinucleòtids CpG n'hi hagué 35 (56%), de les quals 33 foren transicions de G:C per A:T. La representació gràfica d'aquestes dades podeu veure-la seguidament:

**Gràfic 9.** Classificació de les mutacions basada en el tipus de substitució.

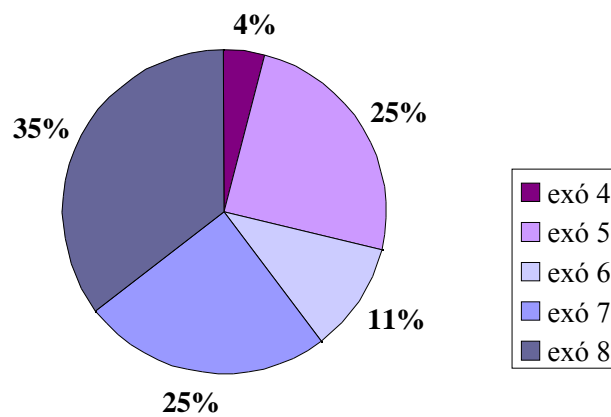


- *Classificació de les mutacions per exons*

L'anàlisi mutacional dels exons 4-8 del gen *TP53* en la nostra sèrie permeté la detecció de mutacions en els cinc exons estudiats. La classificació per exons de les 73 mutacions identificades podeu veure-la tabulada i en forma de gràfic, a continuació:

**Gràfic 10.** Classificació de les mutacions basada en l'exó de *TP53* afectat.

<i>exó afectat</i>	exó 4	exó 5	exó 6	exó 7	exó 8
<i>freqüència</i>	3	18	8	18	26

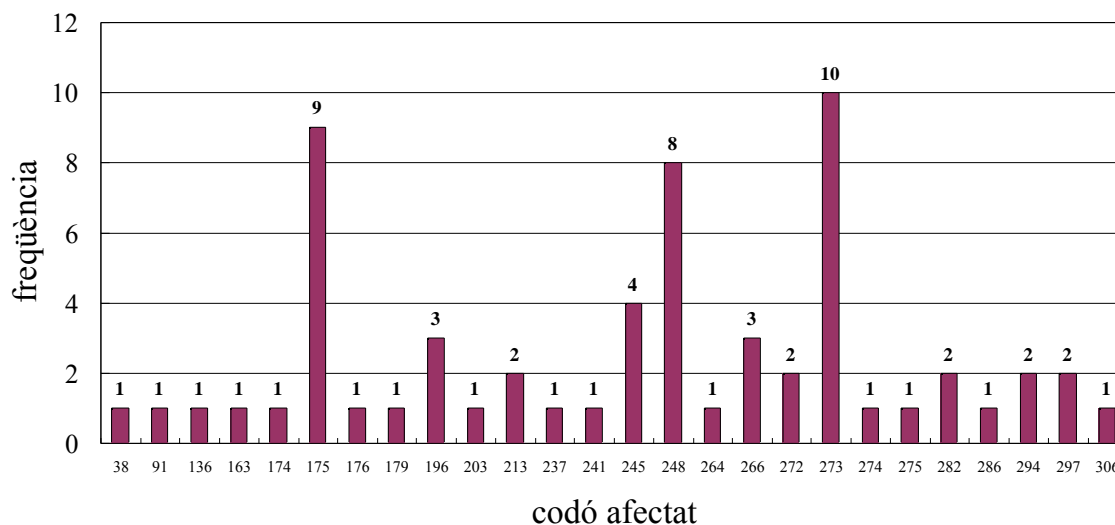


- *Classificació de les mutacions per codons*

Quant a la distribució de mutacions en base al codó afectat cal assenyalar que solament considerarem les alteracions puntuals de la seqüència que comportaren substitució d'una base dins d'un exó –o sia, mutacions de sentit erroni i mutacions sense sentit– i exclouérem, per tant, les alteracions que afectaren l'escissió d'introns i tot tipus d'insercions o delecions.

En total, el nombre d'alteracions que acompliren aquests requisits fou de 62, implicant 26 codons diferents. En el gràfic següent hi ha representats tots els codons alterats amb la seva corresponent freqüència:

**Gràfic 11.** Distribució de freqüències basada en el codó afectat.



Finalment, i de forma explícita, volem fer palesa la complexitat de l'espectre mutacional de la sèrie estudiada. I creiem poder aconseguir-ho mitjançant la tabulació de totes les alteracions obtingudes, especificant-ne la freqüència, la localització i el tipus de mutació (Taula 14). Alhora, la taula haurà de servir de referència per a poder seguir els arguments donats en la discussió a propòsit de les discrepàncies entre el fenotip i el genotip d'algunes de les mutacions identificades (vegeu l'*Apartat 4.1 del Capítol V*). Per aquest motiu, en la mateixa s'inclou una columna que reflecteix els resultats de la immunohistoquímica obtinguts de cadascun dels casos amb mutació. Les mutacions emmarcades formen part del grup de discrepància entre fenotip/genotip.

### **2.3. Comparació entre els resultats d'IHQ i l'estat mutacional**

L'anàlisi comparativa dels resultats obtinguts en practicar les dues estratègies assenyalades posà de manifest l'existència de fortes discrepàncies en alguns subgrups de mostres. Amb tot, no fou fins a l'aplicació de proves estadístiques que confirmàrem la manca de concordança intuïda en comparar els resultats. Tal i com discutirem abastament en el *Capítol V*, les discrepàncies són el reflex de les limitacions inherents a cadascuna de les tècniques per a predir l'estat de la p53.



**Taula 14.** Espectre mutacional de la sèrie estudiada i relació amb el fenotip tumoral de p53.

<i>Freqüència</i>	<i>Exó</i>	<i>Codó</i>	<i>Nucleòtid</i>	<i>Canvi d'aa</i>	<i>Tipus genèric</i>	<i>Acumulació*</i>
1	4	38	CAA TAA	Gln Stop	N	0
<b>1</b>	<b>4</b>	<b>91</b>	<b>TGG → TGA</b>	<b>Trp → Stop</b>	<b>N</b>	<b>≥10%</b>
<b>1</b>	<b>4</b>	<b>93</b>	<b>inserció 1 nt (T)</b>	-	<b>F</b>	<b>≥10%</b>
1	5	136	CAA TAA	Gln Stop	N	0
1	5	152	inserció 1nt (C)	-	F	0
1	5	152-156	deleció 13 nt	-	F	0
1	5	163	TAC TGC	Tyr Cys	M	10%
1	5	174	AGG AGT	Arg Ser	M	10%
9	5	175	CGC CAC	Arg His	M	10%
2	5	175-180	deleció 18 nt	-	D	10%
1	5	176	TGC TAC	Cys Tyr	M	10%
1	5	179	CAT TAT	His Tyr	M	10%
1	6	195-201	deleció 19 nt	-	F	0
3	6	196	CGA TGA	Arg Stop	N	0
1	6	203	GTG TTG		M	10%
1	6	213	CGA TGA	Arg Stop	N	0
1	6	213	CGA TGA	Arg Stop	N	<10%
1	6	214	deleció 2 nt (TA)	-	F	0
1	7	229	deleció 2 nt (TG)	-	F	0
1	7	237	ATG ATA	Met Ile	M	10%
1	7	240	inserció 1nt (T)	-	F	0
1	7	241	TCC TAC	Ser Tyr	M	10%
2	7	245	GGC AGC	Gly Ser	M	10%
1	7	245	GGC GCC	Gly Ala	M	10%
1	7	245	GGC GTC	Gly Val	M	10%
2	7	248	CGG CAG	Arg Gln	M	10%
6	7	248	CGG TGG	Arg Trp	M	10%
1	7	254	deleció 1 nt (C)	-	F	0
1	7	intró 7	G T	-	S	0
1	8	264	CTA CGA	Leu Arg	M	10%
2	8	266	GGA GAA	Gly Glu	M	10%
1	8	266	GGA GTA	Gly Val	M	10%
2	8	272	GTG ATG	Val Met	M	10%
5	8	273	CGT CAT	Arg His	M	10%
<b>1</b>	<b>8</b>	<b>273</b>	<b>CGT → CAT</b>	<b>Arg → His</b>	<b>M</b>	<b>&lt;10%</b>
1	8	273	CGT CCT	Arg Pro	M	10%
1	8	273	CGT CTT	Arg Leu	M	10%
2	8	273	CGT TGT	Arg Cys	M	10%
1	8	274	GTT GCT	Val Ala	M	10%
1	8	275	TGT TAT	Cys Tyr	M	10%
2	8	282	CGG TGG	Arg Trp	M	10%
1	8	286	GAA GGA	Glu Gly	M	10%
1	8	294	GAG TAG	Glu Stop	N	0
1	8	294	GAG TAG	Glu Stop	N	<10%
2	8	297	CAC CGC	His Arg	M	>10%
1	8	306	CGA TGA	Arg Stop	N	0

\* L'acumulació està expressada atenent als grups de positivitat immunohistoquímica.

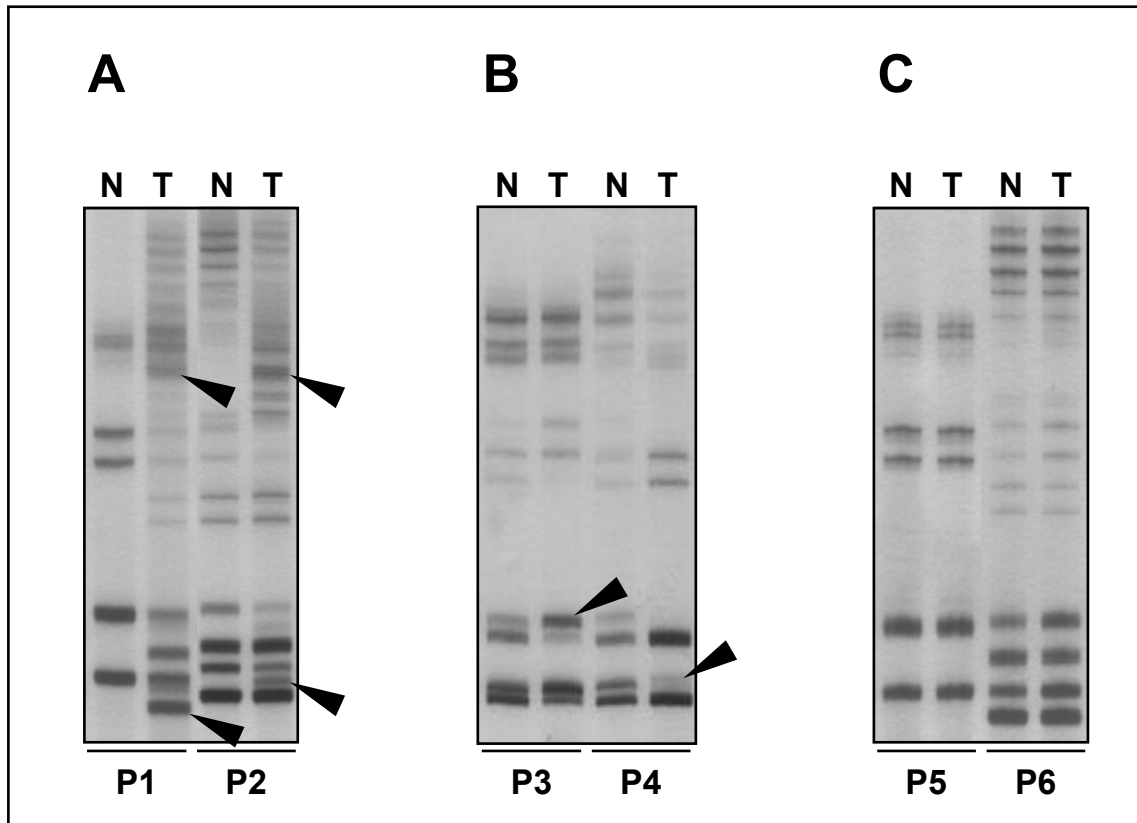
Les mutacions requadrades i **en negreta** formen part del grup de discrepància entre fenotip i genotip.

Dins de la nostra sèrie, foren detectades mutacions de *TP53* en 51 (91%) dels 56 casos amb evidència d'acumulació de la proteïna. D'aquests 51 tumors, 5 resultaren ésser doblement mutats, de forma que el nombre total de mutacions detectades entre els casos positius d'IHQ fou de 56. Quant al tipus genèric de mutació present dins d'aquest grup, s'identificaren 50 mutacions de sentit erroni (89%), 3 sense sentit (5%), 2 delecions de 18 nt (4%) i una alteració de la pauta de lectura (2%).

En relació als casos negatius d'IHQ, considerarem convenient tractar per separat el subgrup de positivitat nuclear inferior al 10% del d'aquells casos amb acumulació indetectable. Dins del primer subgrup, constituït per 15 tumors de <10%, només 2 (13%) resultaren mutats, essent les mutacions identificades de sentit erroni l'una, i sense sentit l'altra. Creiem convenient ressaltar –per la repercussió que això té sobre l'estadística global– que, dels 29 casos amb absoluta manca d'acumulació de p53 (grup del 0%), un total de 15 casos (52%) presentà mutacions dins dels exons estudiats, entre els quals hi hagué 7 mutacions sense sentit (47%), 7 d'alteració de la pauta de lectura (47%) i una afectant la correcta escissió intrònica (6%).

#### **2.4. Resultats de la detecció de LOH al locus TP53**

Com ja s'ha descrit en el capítol anterior, la tècnica utilitzada en el present estudi per a detectar pèrdues al·lèliques de TP53 es basa en l'existència de seqüències microsatèl·lits dins d'aquest locus del cromosoma 17p. Aquesta aproximació metodològica té com a limitació inherent que, de vegades, alguns tumors presenten inestabilitat genòmica a nivell d'aquests microsatèl·lits (vegeu l'*Apartat 2.3.3 del Capítol III*). Dins de la nostra sèrie, la presència d'inestabilitat s'atribuí a 8 tumors (8%), limitant-se la valoració de les pèrdues de TP53 a 92 dels 100 tumors analitzats (Figura 16A). Val a dir que entre els 92 casos sense inestabilitat n'hi hagué 10 (11%) que resultaren no informatius, a causa de la impossibilitat de distingir les dues formes al·lèliques de TP53. Els esmentats tumors es catalogaren d'homozigots per a aquest locus. Així, dels 82 tumors en què poguérem valorar l'estat al·lèlic, cinquanta-dos (63%) presentaren LOH (Figura 16B), mentre que en els 30 casos restants (37%) no s'evidenciaren diferències d'intensitat relativa entre els patrons al·lèlics normal i tumoral (Figura 16C).



**Figura 16.** Fotografies il·lustratives de diversos patrons al·lèlics obtinguts en realitzar els assaigs per a la detecció de LOH de TP53.

N: DNA normal; T: DNA tumoral; P1-6: pacients 1-6.

A) Exemple de tumors en els que es posa de manifest la inestabilitat del marcador. Les fletxes assenyalen l'aparició de bandes atribuïbles al fenomen de lliscament; B) Tumors amb LOH al locus TP53. En aquest cas, les fletxes assenyalen canvis d'intensitat en el patró de bandes dels tumors respecte als corresponents normals, suggestius de pèrdua al·lèlica; i C) Tumors sense pèrdua al·lèlica.

## 2.5. Relació entre l'estat mutacional i la pèrdua al·lèlica a 17p

Pel mateix motiu adduït a l'apartat anterior, l'estudi comparatiu dels resultats obtinguts utilitzant aquestes dues metodologies es realitzà únicament en 82 tumors. D'un total de 61 casos mutats en el gen *TP53*, quaranta-quatre (72%) presentaren pèrdua de l'al·lel concomitant. Dins del grup de 22 tumors en què no es posà de manifest cap mutació, solament detectàrem pèrdues de *TP53* en 8 casos (36%), mentre que en els 14 restants (64%) no poguérem evidenciar diferències entre els patrons al·lèlics corresponents a teixit normal i tumoral, respectivament.

### 3. ANÀLISI ESTADÍSTICA

#### 3.1. Relació entre els paràmetres anatomopatològics i l'estat de p53

L'anàlisi de les relacions entre els paràmetres clinicopatològics i els resultats obtinguts de les aproximacions a l'estat de p53 utilitzant les diferents metodologies, revelà l'existència de dependència estadísticament significativa entre algunes de les variables estudiades.

Així, les pèrdues de 17p –malgrat resultar ésser independents, entre d'altres, del grau histològic i del nivell d'infiltració tumoral–, resultaren dependents de l'estadi ( $p = 0,036$ , prova de la  $\chi^2$ ) i de l'afectació ganglionar ( $p = 0,021$ , prova exacta de Fisher). Els resultats de l'estimació màxim-versemblant de les proporcions i l'aplicació d'interval de confiança, posà de manifest la tendència global creixent dels tumors a perdre l'al·lel normal concomitant a mesura que augmentava l'estadi, i en presència d'afectació ganglionar.

També resultaren dependents la presència de mutació al gen *TP53* i la mida tumoral ( $p = 0,005$ , prova de la  $\chi^2$ ). Ara bé, en aquest cas –i malgrat la comparació de mides per parelles demostrà l'existència de diferències significatives entre les categories 1 (<3 cm) i 3 (>6 cm) d'aquesta variable ( $p = 0,003$ , prova exacta de Fisher)–, els valors dels intervals obtinguts no permeteren confirmar estadísticament una tendència en la presència de mutacions al llarg dels tres valors de mida, malgrat els valors descendents de les estimacions puntuals. L'interval obtingut per a la categoria de mida 3 tingué una amplada molt gran degut a la grandària mostral excessivament petita.

Així, cloent l'apartat que es refereix a la comparació de paràmetres clinicopatològics amb les variables metodològiques, solament resta esmentar que l'anàlisi estadística no posà de manifest cap altra relació de dependència. Un resum dels resultats obtinguts de les relacions analitzades podeu trobar-lo a la Taula 15, en la que s'especifica la prova utilitzada en cada cas i el criteri de valoració de la mateixa. En negreta s'han ressaltat les relacions de dependència.

**Taula 15.** Compendi dels resultats de l'anàlisi estadística de les relacions entre paràmetres clinicopatològics i variables metodològiques.

<i>Relació</i>	<i>Criteri</i>	<i>Conclusió</i>
<u>Prova exacta de Fisher</u>		
	<u>p-valor</u>	
<b>mutació vs. pèrdua de 17p</b>	<b>0,001</b>	<b>dependents</b>
<b>mutació vs. acumulació</b>	<b>2,1×10<sup>-8</sup></b>	<b>dependents</b>
afectació ganglionar vs. acumulació	1,000	independents
afectació ganglionar vs. mutació	0,086	independents
<b>afectació ganglionar vs. pèrdua 17p</b>	<b>0,021</b>	<b>dependents</b>
<u>Prova de la <sup>2</sup></u>		
	<u>p-valor</u>	
mida vs. acumulació	0,356	independents
<b>mida vs. mutació</b>	<b>0,005</b>	<b>dependents</b>
mida vs. pèrdua 17p	0,371	independents
grau vs. acumulació	0,428	independents
grau vs. mutació	0,266	independents
grau vs. pèrdua 17p	0,999	independents
infiltració vs. acumulació	0,165	independents
infiltració vs. mutació	0,894	independents
infiltració vs. pèrdua 17p	0,210	independents
estadi vs. acumulació	0,455	independents
estadi vs. mutació	0,059	independents
<b>estadi vs. pèrdua 17p</b>	<b>0,036</b>	<b>dependents</b>
sexe vs. acumulació	0,303	independents
sexe vs. mutació	0,131	independents
sexe vs. pèrdua 17p	0,346	independents
<u>Regressió logística</u>		
	<u>error*</u>	
edat vs. acumulació	1,000	independents
edat vs. mutació	0,928	independents
edat vs. pèrdua 17p	1,000	independents

\* En regressió logística l'error s'associa a la sensibilitat (1-especificitat).

### 3.2. Comparació entre els resultats de p53 amb diferents metodologies

L'anàlisi realitzada en la nostra sèrie de casos permeté posar de manifest diferències significatives entre els grups en comparar les dades resultants de la IHQ amb les obtingudes mitjançant PCR-SSCP/seqüenciació. L'acumulació de p53 resultà estar estretament lligada a la presència de mutacions en el seu gen ( $p < 0,001$ , prova exacta de Fisher) i, en particular, a les de sentit erroni ( $p < 0,001$ , prova exacta de Fisher). Ara bé, l'aplicació d'interval de confiança per a saber si l'acumulació de p53 era o no una

variable predictiva de mutació que no afecta la pauta de lectura (és a dir, dels tipus M i D segons la nostra classificació) demostrà que no era així; l'estimació puntual de l'error consistent a indicar que un individu amb acumulació presentava una d'aquestes mutacions, quan realment no la tenia, fou del 10,7% amb un 95% de seguretat, podent arribar a ser del 21,9% en el pitjor dels casos.

En una línia similar, de l'anàlisi estadística comparativa dels resultats obtinguts quant a la incidència de mutació de *TP53* i a la presència de pèrdues en aquest mateix locus, en resultà un fort grau de dependència entre ambdues variables. En aquest sentit, cal remarcar que trobarem diferències estadísticament significatives entre els tumors mutats depenent de si aquests presentaven o no pèrdua de l'al·lel concomitant ( $p = 0,004$ , prova exacta de Fisher). Els resultats permeten afirmar que hi ha una presència superior de mutacions de *TP53* entre els tumors que han perdut l'al·lel normal concomitant.

La corba ROC obtinguda a partir de la representació de tots els parells de valors possibles de sensibilitat/especificitat, permeté triar el percentatge de nuclis reactius a partir del qual considerar la IHQ positiva. El percentatge, escollit en base a la garantia de cometre el mínim error –incloent-hi els dos tipus, el fals positiu i el fals negatiu–, fou estimat entre el 2 i el 15%. En aquest rang, per tant, la sensibilitat i l'especificitat de la IHQ assoliren el nivell màxim, essent llurs valors de 0,750 i 0,844, respectivament. El gràfic que mostrem a continuació correspon a la corba ROC obtinguda amb les nostres dades, i en ella hi ha representats numèricament els valors de la sensibilitat obtinguda considerant els diferents llindars de la IHQ. En el mateix hem ressaltat, en negreta, la sensibilitat màxima que garantí el mínim error.

Com a prova complementària que permetés concretar el llindar de sensibilitat obtingut de l'anàlisi per corba ROC, s'utilitzà una aproximació estadística coneguda com a regressió logística. Aquest model proporcionà, també, un ajust significatiu, amb una variabilitat esperada del 29,7%. L'interval de confiança de la predicció permeté, en aquest cas, triar el 15% com a percentatge òptim per a establir el llindar de sensibilitat, romanent la mateixa a nivell del 75%.

Finalment, es calculà l'àrea sota la corba ROC, que resultà ésser del 79,3%. Aquest valor s'associà, en aquest context concret, a la probabilitat que un cas mutat escollit aleatòriament fos correctament classificat amb més seguretat que un cas no mutat igualment escollit aleatòriament (Hanley i McNeil, 1982).

**Gràfic 12.** Representació de la corba ROC de sensibilitat/especificitat.

