

Treball de recerca

GENÈTICA DEL CÀNCER

Estudi del gen EGFR en càncer de pulmó no microcític



MdeMetge

2n de Batxillerat

Supervisat pel Dr. Alfons Navarro

(Universitat de Barcelona – Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques)



Novembre de 2019

Seria injust atribuir-me el mèrit d'aquest treball sense agrair apropiadament a totes aquelles persones l'ajuda que m'han ofert al llarg del camí.

En primer lloc, al Dr. Alfons Navarro per haver-me fet de guia i tutor al llarg de tot el treball i obrir-me les portes del seu laboratori juntament amb el Dr. Marià Monzó.

A continuació, als companys de laboratori Joan, Jordi, Jara, Yan i Bing, que em van acollir amb un somriure des d'un bon principi i han estat sempre disposats a donar-me un cop de mà quan ho he necessitat.

A la tutora del treball, que m'ha ajudat i guiat des del primer dia, sense la qual aquest projecte no hagués estat possible.

I finalment, a tots aquells familiars i amics que m'han encoratjat i mostrat el seu suport constant, cada dia des que vaig començar.

ÍNDIX

| | |
|--|----|
| 0. Introducció..... | 3 |
| 1. El càncer..... | 5 |
| 1.1. Etiologia..... | 5 |
| 1.2. Prevenció..... | 6 |
| 1.3. Principals tipus de càncer..... | 10 |
| 1.4. Càncer de pulmó..... | 13 |
| 2. Càncer de pulmó no microcític..... | 16 |
| 3. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)..... | 20 |
| 4. Detecció de mutacions en el gen EGFR en teixit tumoral humà.... | 24 |
| 4.1. Disseny experimental..... | 24 |
| 4.2. Extracció de DNA de teixit tumoral pulmonar humà..... | 25 |
| 4.3. PCR d'amplificació..... | 28 |
| 4.4. Electroforesi en gel d'agarosa..... | 30 |
| 4.5. Purificació de DNA..... | 32 |
| 4.6. Procés de seqüenciació..... | 33 |
| 5. Anàlisi de resultats i estudi de mutacions..... | 35 |
| 6. Conclusió..... | 41 |
| 7. Referències bibliogràfiques..... | 42 |
| 8. Annexos..... | 45 |

0. Introducció

L'elecció del tema va ser fàcil de dur a terme a causa de la proximitat amb què he viscut el càncer i de l'àmbit mèdic en general durant un període de la meua vida bastant recent. Aquest projecte, a més d'aportar el meu granet de sorra al món de la recerca, m'ha servit per contestar preguntes les quals fins al moment no tenien resposta.

Els tumors són originats per mutacions en el DNA d'algunes de les cèl·lules produïdes per diferents factors. Un dels gens que poden estar afectats és l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), que té un paper força important en l'activació de la divisió cel·lular.

La hipòtesi del treball es basa en que un percentatge elevat de pacients amb càncer de pulmó podrien presentar mutacions en el gen EGFR en les seves cèl·lules tumorals que n'explicaria, en part, l'aparició del tumor

Com a objectius del treball es plantegen el fet d'aprendre a treballar en un laboratori de biologia molecular i aprendre les tècniques més habituals de processament de mostres per fer l'anàlisi mutacional de tumors per tal de determinar, en un petit grup de mostres de teixit tumoral de pulmó, l'estat mutacional del gen EGFR.

Al ser un tema molt dens és necessari dur a terme un treball de documentació a fons per assolir tots els conceptes clinicopatològics i moleculars necessaris i familiaritzar-se amb tot l'àmbit del món de la recerca científica en general.

A través del programa Bojos per la Medicina que organitza la Fundació Catalunya La Pedrera estic assistint a un seguit de sessions teórico-pràctiques sobre diverses àrees de medicina a l'Hospital Clínic de Barcelona, on dues d'elles tracten sobre el càncer.

A més, el dia 1 de febrer vaig inscriure'm al programa FORCES, organitzat per la Universitat de Barcelona, on ofereixen assessorament per a realitzar el treball de recerca. Vaig sol·licitar la única plaça per l'àmbit de «Genètica del DNA del càncer de pulmó» i, a l'acceptar-me, em van seleccionar un tutor, el Dr. Alfons Navarro. Ell, a part d'assessorar-me en el meu treball, em va oferir la possibilitat de realitzar el treball de camp al seu laboratori de la Facultat de Medicina del campus Clínic des del 25 de juny fins a finalitzar el mes de juliol.

El principal problema que ha sorgit al llarg del treball ha sigut el temps. Aquest projecte estava dissenyat en un bon principi per analitzar quatre exons (18, 19, 20 i 21) però el temps no ho ha permès i l'estudi de l'exó 18 va haver de ser descartat. Eren procediments llargs i el fet d'haver d'aprendre-ho tot des de zero no ho va facilitar. Tanmateix estic content amb tota la feina que s'ha fet i aquest treball m'ha servit per entrar al món de la recerca i experimentar en primera persona la vida en un laboratori.

1. El Càncer

El Diccionari Enciclopèdic de Medicina (2000) defineix el càncer com a «*Malaltia de les cèl·lules, les quals han canviat el mecanisme de control que governa la seva proliferació i diferenciació. A conseqüència d'aquest canvi es produeix la multiplicació exagerada invasora de les estructures veïnes i, a partir de les anomenades cèl·lules mare¹, per via limfàtica o hemàtica, les noves colònies tumorals o metastasis.*» (p.256)

El cos humà està conformat per milions de cèl·lules les quals compten totes amb el mateix material genètic. Les cèl·lules sanes creixen, es divideixen i moren per apoptosi² de manera ordenada. Quan es parla de càncer, aquest procés es descontrola i les cèl·lules es reproduïxen de manera caòtica mentre que les cèl·lules que els tocava morir, sobreviuen. Aquest seguit de divisions mitòtiques³ acaba formant masses de cèl·lules anòmales les quals se les denomina amb el nom de tumors.

1.1. Etiologia

El càncer és causat per mutacions genètiques o anomalies epigenètiques⁴ que alteren el cicle cel·lular⁵ de la cèl·lula.

Les mutacions del material genètic poden ser hereditàries, induïdes per factors ambientals, o bé com a resultat d'errors aleatoris en el procés de replicació del DNA.

Un estudi⁶ recent suggereix que dos terços del total de casos de càncer són causats per aquests últims, i això explicaria per què els càncers són molt més comuns en alguns tipus de teixits que en uns altres.

¹ Cèl·lules no diferenciades amb la capacitat de convertir-se en qualsevol tipus de cèl·lula del cos.

² Mort cel·lular programada que inclou degradació del DNA i destrucció nuclear.

³ Divisió cel·lular per mitjà de la mitosi.

⁴ Àrea d'estudi que comprèn totes les molècules adherides a la cadena de DNA.

⁵ Seqüència de processos de divisió i diferenciació que segueix una cèl·lula durant la seva vida.

⁶ «Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology and cancer prevention» realitzat l'any 2017 per Tomasetti, C., Li, L. I Vogelstein, B.

En l'estudi en qüestió es dedicaren a avaluar la incidència del càncer en seixanta-nou països i en tots ells es va trobar una relació entre el risc de patir càncer i el nombre de divisions que patien les cèl·lules mare de cada teixit. Després d'una anàlisi de les dades tenint en compte l'àmplia gama de factors ambientals dels països estudiats i les estimacions d'institucions prestigioses com el «Cancer Research UK» o la «U.S. Centers for Disease Control and Prevention», van ser capaços d'elaborar el dibuix següent, on es mostra de manera clara i visual la incidència del càncer en diferents teixits i segons el seu origen (Figura 1).

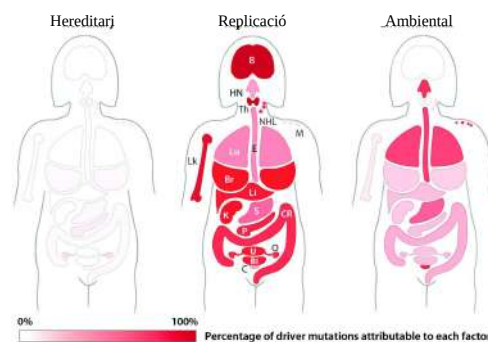


Figura 1: Representació de la incidència dels diferents tipus de càncer segons la seva causa. Font: Universitat de València, estudi de Tomasetti i el seu equip (2017).

Centrant-nos en els diversos factors ambientals, aquests es poden classificar en tres categories:

- Carcinògens⁷ físics, com les radiacions ultraviolades i ionitzants.
- Carcinògens químics, com l'amiant, el fum del tabac i l'arsènic.
- Carcinògens biològics, com determinats virus, bacteris i paràsits.

1.2. Prevenció

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) assegura que almenys un terç de tots els casos de càncer es poden prevenir.

Les principals causes són tabaquisme, falta d'activitat física, mals hàbits alimentaris, consum d'alcohol, contaminació ambiental, radiacions i elements i compostos químics.

⁷ Agent extern que provoca càncer.

El tabaquisme és el factor de risc evitable més important i dels més estudiats a l'hora de determinar les causes del càncer. Es calcula, segons dades del 2004 recopilades per la OMS, que provoca el 22% de morts anuals en tot el món, i que aquell mateix any se li van atribuir 1,6 milions de morts de les 7,4 que va causar el càncer.

Gràcies a l'informe tècnic referent al tabac publicat per l'OMS l'any 1979 s'ha pogut comprovar l'existència d'una relació directa entre la quantitat de fum inhalat i el risc de patir aquesta malaltia. Aquelles persones que fumen cigarrets sense filtre, tenen més possibilitats de contraure la malaltia que les que fumen cigarrets amb filtre, cigars, o en pipa (Figura 2). Així doncs, una persona que fuma més de vint-i-cinc cigarrets cada dia assumeix un risc vint vegades més alt de patir càncer de pulmó que un no-fumador.

Els fumadors en pipa, tanmateix, tendeixen a desenvolupar càncer de cap, coll, boca i llengua amb més freqüència.

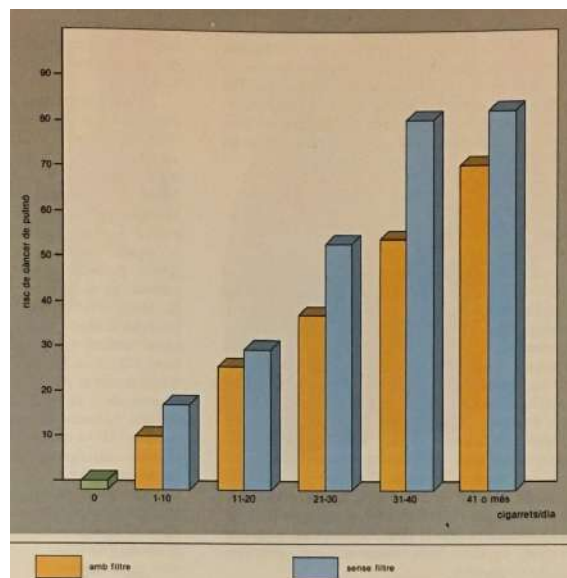


Figura 2: Relació entre el risc de patir càncer i el nombre de cigarrets fumats al dia. Font: Enciclopèdia Catalana de Medicina i Salut Volum 4.

També s'ha comprovat que una vegada es deixa de fumar, el risc de produir un tumor pulmonar disminueix amb el temps (Figura 3). Al cap de quinze anys, les probabilitats de contraure la malaltia per part d'un exfumador gairebé s'equiparen a les d'un no-fumador.

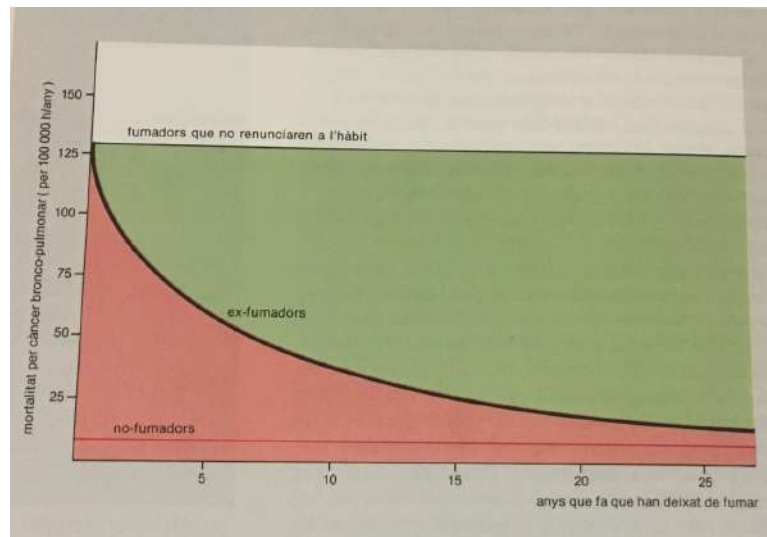


Figura 3: Risc de càncer de pulmó en relació amb el temps.
 Font: Enciclopèdia Catalana de Medicina i Salut Volum 4.

Centrant-nos en els carcinògens principals dins el mateix tabac, les principals substàncies cancerígenes es troben, sobretot, en el quitrà present en el fum. Les més conegudes són els hidrocarburs aromàtics policíclics com el 3,4 benzopirè i el dibenzantracè. Quan aquestes substàncies entren a l'organisme pateixen una sèrie de transformacions a causa d'alguns enzims del nostre cos. Els productes resultants, un cop entren en contacte amb les cèl·lules bronquials, s'uneixen a les proteïnes i als àcids nucleics alterant la reproducció cel·lular i originant la formació de cèl·lules amb estructures diferents a les normals, alhora que es reproduïxen de manera molt més activa. Si el sistema immunitari i les pròpies cèl·lules no ho aturen, s'acaba formant un tumor.

Un altre factor també important a tenir en compte és el sobrepès. La falta d'activitat física juntament amb uns mals hàbits alimentaris i, certa predisposició genètica, comporten el sobrepès d'una gran part de la població. Segons la OMS als Estats Units la població obesa és del 30%, a Espanya baixa una mica però tot i així compta amb un 23%. En quant a problemes de pes, segons la sessió sobre obesitat a la que vaig assistir a través del programa Bojos per la Medicina, aproximadament un 60% de la població espanyola està per sobre del que és considerat un pes saludable.

Segons el Dr. Josep Vidal, endocrinòleg de l'Hospital Clínic especialitzat en obesitat, el qual va impartir la sessió del programa, s'ha comprovat l'existència d'un nexa entre el sobrepès i l'obesitat amb diversos tipus de càncer com el d'esòfag, colo-rectal, mama, endometri, ronyó, etc. No a causa que el greix afecti el DNA, sinó perquè l'excés de greix impedeix una oxigenació fàcil de les cèl·lules i aquesta manca d'oxigen deriva en inflamacions. Les inflamacions molt prolongades d'una zona en concret estan directament relacionades amb l'aparició de tumors.

Seguint amb temes nutricionals, el consum excessiu de carn vermella va associat a un risc més elevat de contraure càncer colo-rectal. Recentment, la OMS ha declarat que el risc de contraure càncer a causa de la carn vermella processada està a un nivell semblant que el del tabac.

L'etanol, un compost químic present en les begudes alcohòliques causant de la sensació d'embriaguesa coneguda vulgarment com a «borratxera», és també un factor a tenir en compte a l'hora de determinar quines són les causes externes del càncer.

Les possibilitats de contraure càncer de boca, fetge o ronyó, augmenten amb la quantitat d'alcohol consumida regularment. Malgrat el risc estigui condicionat pel sexe i l'edat, es pot determinar que no hi ha un consum d'alcohol segur.

La contaminació ambiental, la qual s'entén com la incorporació de substàncies sòlides, líquides o gasoses en diferents medis com poden ser l'aigua, l'aire o el sòl, és la causant d'entre l'1% i el 4% dels casos de càncer globals segons dades de la OMS de l'any 2003.

De radiacions n'existeixen de dos tipus: les no ionitzants, com les que ens arriben del Sol, i les ionitzants, que es produeixen, per exemple, durant l'explosió d'una bomba atòmica. Ambdós tipus, però, tenen un alt impacte en el material genètic de les cèl·lules i poden arribar a originar tumors.

En general, molts dels elements i compostos químics amb els quals estem en contacte són carcinògens, i provoquen l'aparició de càncers en diferents zones del cos. El radó⁸, que sorgeix del terra i dels materials de construcció, causa entre el 3% i el 14% dels càncers de pulmó, fet que el col·loca darrere del fum del tabac en la llista de causes d'aquest tipus de càncer. La taula següent (Figura 4) en fa un resum dels més coneguts relacionant-los amb el tipus de càncer que ocasionen.

| | Exposició a: | Òrgans afectats amb risc de desenvolupar tumors |
|--------------------------|---------------------|--|
| Elements químics | Arsènic | Pell i pulmó |
| | Crom | Pulmó |
| | Níquel | Fosses nassals i pulmó |
| Compostos químics | Amiant | Pulmó |
| | Benzè | Medul·la òssia |
| | Benzidina | Bufeta urinària |
| | Quitrà | Pell |
| | Olis minerals | Pell |
| | Naftilamina | Bufeta urinària |
| | Sutge | Pell i pulmó |
| | Clorur de vinil | Fetge |

Figura 4. Compostos i elements químics carcinògens més comuns i els òrgans que es veuen afectats.
Font: Treball de Recerca de Maria Company, «Detecció i estudi del gen KRAS» (2012).

1.3. Principals tipus de càncer

Els grups sota els quals s'agrupen els diferents càncers que existeixen es diferencien en el tipus de teixit on s'originen.

El tipus de càncer més comú és el carcinoma que té el seu lloc d'origen a la pell o als epitelis que formen els diversos òrgans.

⁸ Gas noble molt radioactiu.

N'existeixen diferents subtipus: l'adenocarcinoma, el qual sorgeix a les cèl·lules glandulars; el carcinoma de cèl·lula basal, que té origen a la capa més profunda de la pell; el carcinoma de cèl·lula escamosa, format a les cèl·lules escamoses que recobreixen la superfície dels òrgans; i per últim, el carcinoma de cèl·lules de transició, el més comú en càncer de bufeta.

El sarcoma és definit per l'Enciclopèdia Mèdica Catalana (2000) com a "*Tumor del teixit connectiu i de sosteniment, de la musculatura i dels vasos sanguinis, d'origen mesenquimàtic, caracteritzat per la seva malignitat clínica: creixement ràpid infiltrant, formació de metàstasis més sovint per via sanguínia i evolució en poc temps cap a la mort. En general és tou i d'aspecte carnós, d'on deriva el seu nom.*" (p.1625)

Aquest tumor es diu que té el seu origen al mesènquima, un teixit embrionari format per cèl·lules estrellades amb grans espais intercel·lulars ocupats per una substància mucinosa, com per exemple col·lagen. D'aquest tipus de teixit se'n deriven diverses variants que constitueixen el teixit conjuntiu, l'esquelet ossi dels vertebrats, molts músculs i tots els òrgans de l'aparell circulatori.

Per altra banda tenim les leucèmies. La leucèmia és un tipus de càncer que comença als teixits que formen la sang a la medul·la òssia. Es caracteritza per la presència de formes primitives de cèl·lules sanguínies tant a la sang com als òrgans en els quals s'infiltra, com el fetge, la melsa, el moll de l'os, els ganglis limfàtics, etc.

Segons el tipus de leucòcits⁹ dominants se'n fa la classificació, i en tots els casos sovint ve acompanyada d'anèmia¹⁰. Durant el transcurs de la malaltia el pacient pot presentar febre, hemorràgies i infeccions.

El sistema immunitari està format per diverses cèl·lules que es troben tant a la sang, com a dins dels òrgans i a la medul·la òssia. Aquesta última,

⁹ Cèl·lules sanguínies, glòbuls blancs.

¹⁰ Falta de ferro a la sang.

concretament, és un teixit tou que es troba a l'interior dels ossos conformada per les cèl·lules mare de glòbuls blancs, glòbuls vermells, plaquetes i cèl·lules plasmàtiques.

El mieloma múltiple es caracteritza per la proliferació de clons de les cèl·lules mare en el moll de l'os, que causen extenses destruccions òssies i envaeixen els ossos veïns.

Aquestes cèl·lules canceroses secreten immunoglobulines M-component, les quals passen a la sang i a l'orina i són les que permeten el diagnòstic de la malaltia. Sovint, el mieloma múltiple va acompanyat d'anèmia, hipercalcèmia¹¹, insuficiència renal i immunodeficiència, que deixa al pacient susceptible a un conjunt variat d'infeccions.

Un limfoma és el càncer d'una part del sistema immunitari específica anomenada sistema limfàtic. Es classifica segons dues categories: limfoma de Hodgkin i limfoma de no Hodgkin.

En el limfoma de no Hodgkin certs tipus de glòbuls blancs, o bé les cèl·lules T o bé les cèl·lules B, es tornen anòmals i comencen a reproduir-se sense cap mena de control. Aquests tipus de cèl·lules viatgen a través dels canals limfàtics¹², els quals arriben a gairebé totes les zones del cos, i això els permet desplaçar-se per arreu amb bastant facilitat. D'aquesta manera aquest tipus de limfoma és capaç de produir metàstasis¹³ de manera ràpida i sense cap mena de patró.

Els metges no en coneixen les causes més enllà de mutacions en el DNA, tot i que sembla ser que les persones amb un sistema immunològic feble o que pateixen infeccions amb certa periodicitat són més propenses a desenvolupar-lo.

¹¹ Taxa de calci en sang per sobre la normalitat.

¹² Vasos pels quals circula la limfa, substància semblant a la sang que, recull el líquid intersticial per retornar-lo a la sang, ajuda en la defensa del cos transportant anticossos i absorbeix els nutrients de l'aparell digestiu i els bolca a la sang a les venes subclàvies, sota la clavícula

¹³ Aparició de cèl·lules tumorals en algun punt de l'organisme com a resultat del desplaçament de cèl·lules malignes d'un tumor preexistent

El limfoma de Hodgkin, en canvi, és ben al contrari. En contraposició amb l'anterior aquest presenta un gangli limfàtic de gran tamany que actua com a tumor principal i que no produeix metàstasis a parts molt allunyades del cos. Primer envaeix els ganglis propers i llavors normalment passa al fetge, als pulmons o a la medul·la òssia.

1.4. El càncer de pulmó

El càncer de pulmó, a més de comptar amb el nombre més elevat de nous casos l'any 2018 segons la institució *Globocan* (Figura 5), és el més mortífer. Un article¹⁴ recent indica que la supervivència dels pacients al cap de cinc anys volta el 15%.

Gràcies a una reducció del consum de tabac, el departament d'informació al pacient de la ASCO (American Society of Clinical Oncology) dictamina que en els homes la mortalitat s'ha reduït un 48% des de l'any 1990, i en les dones un 23% des del 2002.

Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancers, both sexes, all ages

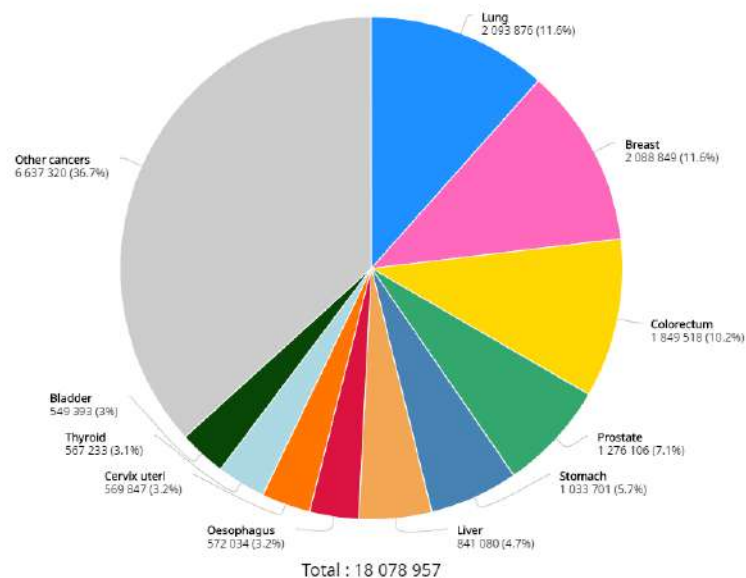


Figura 5: Nombre aproximat de nous casos de càncer a tot el món l'any 2018. Font: *Globocan*

¹⁴ «EGFR Mutations and Lung Cancer» realitzat per Gilda da Cunha Santos, Frnaces A. Shepherd i Ming Sound Tsao.

El 99% dels casos de càncer de pulmó són provocats per carcinomes. Entre tots aquests, segons la tesi doctoral de la Dra. Elena Gallardo Martín, un 44% es tracta de carcinoma de cèl·lula escamosa, seguit per l'adenocarcinoma, que correspon al 28% en el cas dels homes i un 42% en el cas de les dones.

Tanmateix, la combinació de diferents tipus de teixits dins d'un mateix tumor és molt freqüent en els càncers de pulmó, i per tant els metges van decidir dividir els tipus de càncer de pulmó en dos grups, segons l'aspecte que presenten al microscopi les cèl·lules afectades. Existeixen el càncer de pulmó microcític, de cèl·lula petita, i el càncer de pulmó no microcític, de cèl·lula no petita.

El càncer de pulmó microcític, en anglès *small cell lung cancer* (SCLC), representa entre el 12% i el 17% dels tumors malignes diagnosticats als pulmons. Es caracteritza per un tipus de cèl·lules més petites, amb forma de flocs de civada. L'SCLC tendeix a aparèixer a les vies respiratòries més grans com els bronquis primaris i secundaris i, tot i ser més sensible a la quimioteràpia que els tumors no microcítics, presenta un pitjor diagnòstic a causa de la facilitat amb la que forma metàstasis cap a la resta del cos. Sense cap mena de tractament, la seva supervivència és de dos a quatre mesos de vida des del moment del diagnòstic.

El seu tractament sovint combina la quimioteràpia amb la radioteràpia, i segons l'American Cancer Society (ACS), en els tumors localitzats sense afectació als ganglis limfàtics la seva supervivència al cap de cinc anys és del 29%. La poliquimioteràpia¹⁵ ha millorat clarament els resultats i amb un índex de respostes globals de 80-90%. Els pacients amb la malaltia només ubicada al tòrax se n'ha incrementat la supervivència fins als 12-20 mesos, i aquells els quals ja han produït metàstasi compten amb una mitjana de supervivència de 7-11 mesos.

La taxa de supervivència a cinc anys del SCLC segons la ACS és del 6%.

¹⁵ Medicaments quimioteràpics administrats conjuntament per tal de reduir la dosi individual de cadascun i augmentar l'eficàcia d'aquests.

El càncer de pulmó no microcític és el tipus de càncer sobre el qual es basarà el treball de camp d'aquest projecte. En anglès es denomina *non-small cell lung cancer* (NSCLC), i representa l'altre 85% dels diagnòstics de càncers de pulmó. Els tumors de NSCLC generalment el conformen dos tipus histològics: el carcinoma escamós i l'adenocarcinoma.

En general són tumors amb un tipus de cèl·lules més grans, també de creixement ràpid i amb un pronòstic majoritàriament millor que el microcític tot i que depèn molt de cada cas concret.

Es sol tractar amb cirurgia extirpant el tumor en la seva totalitat si es diagnostica precoçment. Tanmateix, si el tumor ja està molt desenvolupat la cirurgia pot endarrerir-se fins després de dur a terme diverses sessions de quimioteràpia i radioteràpia per reduir-ne la mida, o directament no realitzar-se i seguir per altres vies de tractament.

La taxa de supervivència a cinc anys del NSCLC és del 23%, en comparació amb el 6% del càncer de pulmó microcític.

2. Càncer de pulmó no microcític

El càncer de pulmó no microcític es classifica en dos subtipus principals, l'adenocarcinoma i el carcinoma de cèl·lula escamosa. Existeixen més tipus de càncers de pulmó no microcític però ens centrem en aquests dos perquè són els més freqüents.

L'adenocarcinoma és el càncer que es forma a les cèl·lules glandulars dels pulmons. Es forma a partir de versions de cèl·lules immadures que en circumstàncies normals estarien secretant moc. Sol originar-se als alvèols perifèrics dels pulmons i és de creixement lent. El 40% dels càncers de pulmó són d'aquest tipus. És més comú en dones que en homes, i és molt més freqüent en persones que no han fumat mai que en fumadores. Tanmateix, aquestes també compten amb un índex bastant alt d'incidència segons la ACS. Aquesta diferència és produïda bàsicament a causa de que els càncer produïts per fum de tabac tendeixen a ser carcinomes escamosos.

El descobriment de mutacions recurrents en el gen EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), que desenvolupa un paper molt important en l'inici de la divisió cel·lular, està permetent trobar nous medicaments contra l'adenocarcinoma. Es diferencien de la quimioteràpia en què aquesta ataca a totes les cèl·lules que es divideixen ràpidament, en canvi aquests nous fàrmacs que es desenvolupen anomenats anti-EGFR o inhibidors de EGFR, només afecten majoritàriament a les cèl·lules amb alteracions en aquest gen en concret.

El carcinoma escamós, format en les cèl·lules de recobriment dels pulmons, s'inicia normalment als bronquis i no s'estén tan ràpidament com ho fan els altres subtipus. És el segon subtipus de càncer de pulmó no microcític més comú. No obstant, la seva incidència arreu del món ha decaigut molt a causa de la disminució del consum de tabac i el canvi de composició dels cigarrets, que comencen a afavorir més a l'adenocarcinoma.

Cada any, segons un article¹⁶ de la revista Nature, el carcinoma escamós provoca la mort de 400.000 persones.

El tractament d'aquest tipus de càncer no ha variat gaire en les últimes dues dècades, i es segueix tractant a base de quimioteràpia i radioteràpia.

Per tal de poder classificar els diferents tipus de tumors de manera que no facin referència al tipus de teixit, al seu lloc d'origen, o l'aspecte de les cèl·lules, es fa servir el mètode d'estadiatge de la TNM, que proporciona informació sobre l'estat de la malaltia.

La lletra T indica la mida del tumor, la N si hi ha nòduls afectats, és a dir, si ja ha envaït els ganglis limfàtics, i la M fa referència a la presència de metastasi. La Figura 6 fa una descripció detallada de totes les característiques utilitzades a l'hora de calcular l'estadiatge d'un pacient mentre que la Figura 7 s'ocupa de relacionar els tres factors implicats i de calcular l'estadi del pacient.

¹⁶ «*Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers*» (09-09-2012)
Realitzat per la xarxa d'institucions anomenada *The Cancer Genome Atlas Research Network*

| T: Tumor Primario | |
|---|--|
| Tx | Tamaño tumoral no evaluable o tumor demostrado mediante presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales pero no visible mediante técnicas de imagen. |
| T0 | Sin evidencias de tumor primario. |
| Tis | Carcinoma <i>in situ</i> . |
| T1 | Tumor de ≤3cm en su dimensión mayor rodeado de pleura visceral o tejido pulmonar sin evidencia broncoscópica de invasión proximal más allá del bronquio lobar. |
| T1a(mi) | Adenocarcinoma minimamente invasivo. |
| T1a | Tumor ≤1cm en la dimensión mayor. |
| T1b | Tumor >1cm pero ≤2cm en la dimensión mayor. |
| T1c | Tumor >2cm pero ≤3cm en la dimensión mayor. |
| T2 | Tumor >3cm pero ≤5cm o con alguna de las siguientes características : <ul style="list-style-type: none"> - Afecta al bronquio principal sin afectar a la carina. - Invasión de la pleura visceral. - Asociado con atelectasis o pneumonitis obstructiva extensiva hasta la region hilar, afectando a parte o la totalidad del pulmón. |
| T2a | Tumor >3cm pero ≤4cm en la dimensión mayor. |
| T2b | Tumor >4cm pero ≤5cm en la dimensión mayor. |
| T3 | Tumor >5cm pero ≤7cm en la dimensión mayor o con presencia de distintos nodulos tumorales en el mismo lobulo o con afectación de pared torácica, nervio frénico o pericardio parietal. |
| T4 | Tumor >7cm o con presencia de nódulos tumorales en lóbulos ipsilaterales o con afectación de diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, vertebra o carina. |
| N: Afectación linfática regional | |
| Nx | Ganglios linfáticos no evaluables |
| N0 | Ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos |
| N1 | Metástasis en ganglios peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales y intrapulmonares, incluidos aquellos por extensión directa del tumor. |
| N2 | Metástasis en ganglios mediastínicos ipsilaterales o subcarinales. |
| N3 | Metástasis en ganglios mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos ipsilaterales o contralaterales o supraclaviculares. |
| M: Metástasis a distancia | |
| M0 | Ausencia de metástasis a distancia. |
| M1 | Presencia de metástasis a distancia. |
| M1a | Nódulos tumorales separados en lóbulo contralateral, tumor con nódulos pleurales o pericárdicos, o con efusión maligna pleural o de pericardio. |
| M1b | Metástasis extratorácica única. |
| M1c | Metástasis extratorácica múltiple. |

Figura 6: Descripció de tots els conceptes utilitzats durant l'estadiatge del càncer de pulmó segons la IASLC en la 8ª edició del TNM. Font: Adaptació de l'article: «Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eight) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer» (2016) Goldstraw P, de la revista «Journal of thoracic oncology»

| T/M | Subgrupo | N0 | N1 | N2 | N3 |
|-----|------------------|------|------|------|------|
| T1 | T1a(mi) | IA1 | | | |
| | T1a | IA1 | IIB | IIIA | IIIB |
| | T1b | IA2 | IIB | IIIA | IIIB |
| | T1c | IA3 | IIB | IIIA | IIIB |
| T2 | T2a | IB | IIB | IIIA | IIIB |
| | T2b | IIA | IIB | IIIA | IIIB |
| T3 | | IIB | IIIA | IIIB | IIIC |
| T4 | | IIIA | IIIA | IIIB | IIIC |
| M1 | M1a-b | IVA | IVA | IVA | IVA |
| | M1c | IVB | IVB | IVB | IVB |
| Tx | Carcinoma oculto | | | | |
| Tis | Estadio 0 | | | | |

Figura 7: Classificació dels estadis del càncer de pulmó segons la octava edició del TNM (IASLC).
 Font: Adaptació de l'article: «Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eight) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer» (2016) Goldstraw P, de la revista «Journal of thoracic oncology»

El sistema d'estadiatge dels càncers permet classificar tots els tumors que es diagnostiquen i al mateix temps donar informació sobre cada cas concret. Per exemple, sempre que es parli d'un estadi *IIa* de càncer de pulmó, es tractarà d'un tumor d'entre quatre i cinc centímetres sense afectació als ganglis limfàtics pròxims, independentment del tipus histològic del qual es tracti o el lloc dels pulmons on estigui ubicat.

Aquest sistema permet ajudar als professionals a decidir quines vies de tractament es seguiran.

Es consideren casos potencialment quirúrgics fins a l'estadi *IIIa* i a partir de llavors es consideren inoperables. Davant d'aquestes circumstàncies es busquen altres vies de tractament o, en cas de que el pacient es trobi en un estat molt greu, s'apliquen cures pal·liatives per eliminar el dolor i deixar que la malaltia segueixi el seu curs amb la màxima qualitat de vida possible.

3. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

Durant l'etapa de laboratori d'aquest treball s'ha estudiat el DNA del gen EGFR en busca de mutacions que afectin la seva funció normal i per tant puguin ser rellevants en el procés de tumorigènesis¹⁷. Més concretament s'han estudiat els exons 19, 20 i 21, que corresponen al domini catalític de la proteïna (Figura 8), on es sol concentrar un major nombre de mutacions. Per aquesta raó es prioritza l'estudi d'aquests exons en concret envers altres.

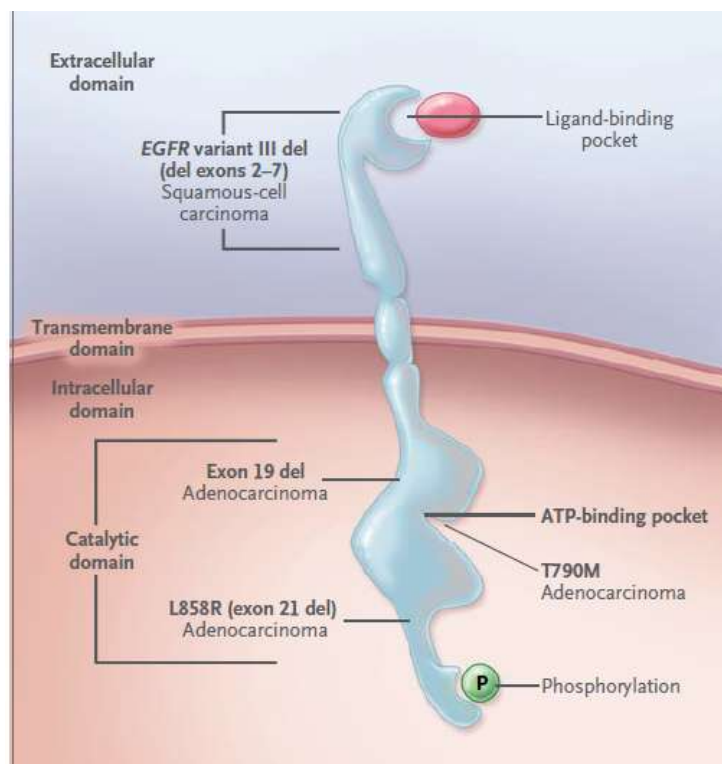


Figura 8: Estructura de la proteïna transmembranosa codificada pel gen EGFR. Font: Article "Molecular origins of cancer: Lung cancer" de la revista *The New England Journal of Medicine*.

En el gens que codifiquen proteïnes els exons són els que contenen la informació per a produir-les. En els eucariotes¹⁸ els exons estan separats per regions llargues de DNA no codificant que reben el nom d'introns. Després de la transcripció¹⁹ de l'RNA missatger, aquest pateix una maduració on, entre d'altres, es tallen i s'eliminen els introns.

¹⁷ Formació de tumors.

¹⁸ Éssers vius on la informació genètica està dins al nucli.

¹⁹ Procés on la informació del DNA passa a RNA per a poder sintetitzar la proteïna.

L'estudi s'ha fet en mostres reals de teixit tumoral de pacients amb adenocarcinomes de NSCLC obtingudes durant biòpsies per mitjà de resecció quirúrgica. S'ha treballat amb pacients en estadis inicials (*I, II i IIIa*) els quals com a primera opció terapèutica, sempre que l'estat del pacient ho permeti, es tracten amb cirurgia.

El gen EGFR codifica per una proteïna transmembranosa que, en presència del seu lligand, s'ajunta amb una segona proteïna EGFR i es produeix un dímer. Al formar-se aquest dímer les dues proteïnes canvien de forma i amb ajut de molècules d'ATP produeixen una fosforilació al citoplasma de la cèl·lula. Aquesta fosforilació dona lloc a l'activació d'una via metabòlica²⁰ (Figura 9) que té com a resultat l'activació de la transcripció de diferents gens relacionats amb diferents activitats cel·lulars: activació de la proliferació, resistència a l'apoptosi, etc.

Aquest procés es troba molt regulat en condicions normals i és totalment dependent de la presència del lligand. Ara bé, quan el gen EGFR es muta, aquesta via s'activa de forma constitutiva, independentment de la presència o absència del lligand. La via es troba activa de forma constant promovent efectes oncogènics. Quan aquest gen es muta, poden observar-se tres situacions diferents. Si està mutat a l'altura de la part de la proteïna que està ubicada fora de la membrana plasmàtica, es produeixen dímers de proteïnes sense la presència del lligand i per tant provoca la fosforilació i la conseqüent divisió cel·lular. Si la mutació es troba a la zona que queda dins la membrana plasmàtica, passaria exactament el mateix. En canvi, si la mutació queda ubicada a la zona de dins de la cèl·lula, es podria produir el cas de que la proteïna EGFR produís fosforilació sense necessitat d'ajuntar-se amb cap altra proteïna homòloga.

²⁰ Una sèrie de reaccions en cadena que acaben donant un o més resultats.

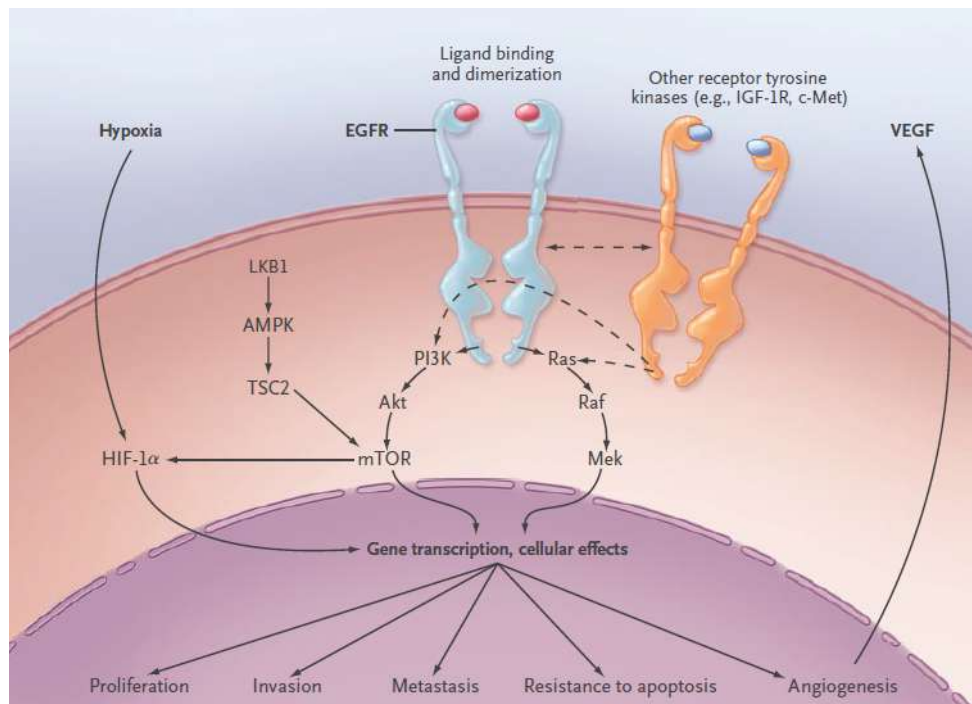


Figura 9: Representació de la via metabòlica que activa el gen EGFR al formar-se un dímer de dues proteïnes idèntiques. Font: Article "Molecular origins of cancer. Lung cancer" de la revista *The New England Journal of Medicine*.

L'adenocarcinoma és el tipus histològic que concentra més tipus de mutacions en aquest gen i gràcies a la recerca actual s'han descobert diferents fàrmacs per tractar pacients amb aquest tipus de càncer que siguin portadors d'aquest tipus de mutacions. En el cas del carcinoma escamós, a part de que les mutacions en EGFR són molt menys freqüents, al incorporar aquest fàrmac al pla de medicació es produeixen sagnats massius que poden derivar en la mort del pacient. És per aquesta raó que no es tracten mai aquests pacients amb inhibidors de EGFR.

En general, els fàrmacs desenvolupats (Figura 10) tracten d'impedir que les dues proteïnes EGFR formin cap dímer, i així impedir la divisió de la cèl·lula cancerosa.

Anti-EGFR drugs in mCRC and NSCLC treatment

| Drug name | Type | Target specificity |
|-------------|--|---|
| Cetuximab | Chimeric mAb | EGFR ECD |
| Panitumumab | Humanized mAb | EGFR ECD, included EGFR S492R mutated (resistant to cetuximab) |
| SYM004 | Oligoclonal mixture of two recombinant chimeric mAbs | EGFR ECD, including mutations of the EGFR, directed against non-overlapping epitopes of the EGFR |
| MM151 | Oligoclonal mixture of three mAbs | EGFR ECD, including mutations of the EGFR, directed towards three different, non-overlapping epitopes of the EGFR |
| Gefitinib | Reversible TKI | EGFR intracellular domain with activating mutations |
| Erlotinib | Reversible TKI | EGFR intracellular domain activating mutations |
| Afatinib | Irreversible TKI | Pan-HER intracellular domain |
| Osimertinib | Irreversible TKI | EGFR intracellular domain with activating mutations and T790M mutation |

- ECD, extracellular domain; EGFR, epidermal growth factor receptor; mAb, monoclonal antibody; mCRC, metastatic colorectal cancer; NSCLC, non-small-cell lung cancer; TKI, tyrosine kinase inhibitor.

Figura 10: Llista de inhibidors de EGFR. Font: Article «Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence» (2016) Troiani T, ESMOOpen

El que anomenem mutacions són una sèrie de modificacions que alteren el DNA. Aquestes mutacions generalment es poden classificar en tres grans grups: les mutacions gèniques, que alteren la seqüència de nucleòtids del gen; les mutacions cromosòmiques, que alteren la seqüència de gens dins un cromosoma; i les mutacions genòmiques, que afecten al nombre de cromosomes.

Nosaltres només estudiarem les mutacions gèniques, i aquestes es poden resumir en les següents (Figura 11):

| TIPUS DE MUTACIÓ | ORIGINAL | | MUTADA |
|------------------|--|-----|--------------------------------------|
| SUBSTITUCIÓ | G CATCCTA | --> | G TGTCCTA |
| INVERSIÓ | ATGAT T CGTCA | --> | ATGAT G CTCA |
| TRANSLOCACIÓ | AGG TACCAT TCC ATGGTA | --> | ACC GGTAT TTG CCATA |
| INSERCIÓ | GCA *TACCG | --> | GCAT TCATACCG |
| DELECIÓ | CACTAG GCATC | --> | CACT *ATC |

Figura 11: Tipus de mutacions gèniques.

4. Detecció de mutacions en el gen EGFR en teixit tumoral humà

4.1. Disseny experimental

Per tal de comprovar la hipòtesi i descobrir si els 46 pacients dels quals en disposem mostres de teixit tumoral pateixen una mutació en el gen *EGFR* en els exons 19, 20 o 21, s'ha de dur a terme una anàlisi de la seqüència obtinguda de DNA de cada mostra i comparar el resultat amb la mostra patró, estàndard, obtinguda del projecte Genoma Humà (Seqüència de DNA normal). Per poder dur a terme aquesta anàlisi, cal fer un procés previ que consta de l'extracció de DNA de les mostres de teixit, seguida de la seva quantificació, fer una reacció de PCR per amplificar l'exó que ens interessa, comprovar que l'amplificació del gen ha sigut correcta i, finalment, la purificació del DNA. Després de realitzar tots aquests processos, la mostra es pot enviar al servei de seqüenciació²¹ on es realitza pel mètode Sanger. Un cop obtinguts els resultats, cal analitzar manualment l'existència de mutacions comparant la seqüència de nucleòtids obtinguda amb la seqüència estàndard.

La variable independent d'aquest projecte, ja que tot el que s'ha analitzat han sigut teixits tumorals, correspon a l'exó analitzat en cada experiment. La variable dependent, també qualitativa, és l'existència o no d'una mutació en el gen de cada mostra en particular.

El grup control, seqüenciant una mostra de teixit sa de cada pacient, no s'ha fet, tot i que en autèntics estudis genètics s'hauria de fer la comparació de les seqüència del teixit tumoral amb una de teixit sa de la mateixa persona. No s'ha dut a terme per simples raons econòmiques i de temps.

Un altre aspecte important és el control de la resta de variables. En els experiments no hem hagut de tenir-ne massa cura per unes quantes raons: cada mostra era única i es comparava amb una seqüència patró, i no amb una mostra del mateix pacient fet que comportaria molta més precisió per evitar

²¹ Procés d'anàlisi de la seqüència de nucleòtids d'una cadena de DNA o RNA.

errors humans; tots els experiments s'han realitzat a dins el mateix laboratori i seguint una rutina per tant es descarten moltes variables com serien la temperatura, el temps a la nevera de cada mostra, etc; i finalment sempre s'ha treballat amb guants i bata, procurant mantenir l'ambient el màxim d'estèril possible.

A més, les condicions de temperatura de la PCR són específiques per a cada exó però iguals en totes les mostres. És a dir, totes les mostres enviades a seqüenciar l'exó 21 van passar per les mateixes condicions de temperatura, però en canvi aquestes condicions són lleugerament diferents de les que es necessiten perquè l'exó 19 s'amplifiqui.

4.2. Extracció de DNA de teixit tumoral pulmonar humà

El material utilitzat és el següent: porexpan amb gel, placa de petri, mostra de teixit tumoral, pinces, etanol 70%, bisturí, kit de Qiagen (Figura 12) (Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AL, Buffer ATL, Buffer AE i Proteinassa K), micropipetes de 1000, 100 i 10 μ L, puntes de 1000, 100 i 10 μ L per les micropipetes, gradeta, dos tubs Eppendorf de 1,5 ml, una columna, vórtex, bany termostàtic, espectrofotòmetre i una microcentrífuga.

Per dur a terme l'extracció primerament s'han d'anar a buscar les mostres al congelador de -80°C. Per fer-ho, disposarem d'un recipient de porexpan amb gel a dins, i una placa de Petri a mode de safata per la mostra. Els teixits s'han de manipular amb compte i per tant s'han d'esterilitzar unes pinces amb etanol i llavors disposar un trosset d'aproximadament 25mg de teixit a sobre una placa de Petri.

El procés d'extracció es fa seguint un protocol específic (veure annex 1). En primer lloc s'ha de triturar la mostra al màxim amb el bisturí afegint 180 μ L de Buffer ATL, que ajuda a aconseguir la lisis cel·lular²². El resultat serà una espècie de gel amb aspecte homogeni que passarem a dins d'un tub Eppendorf

²² Totes les membranes de la cèl·lula es trenquen i el DNA surt del nucli.

de 1,5ml mentre hi afegim 20 μ L de Proteinassa K, un enzim que trenca les proteïnes de membrana i per tant ajuda a aconseguir la lisis. Seguidament, s'han d'aplicar una sèrie de rentats al DNA seguint el protocol per tal d'aconseguir extreure'n la màxima quantitat possible i aconseguir el DNA de la mostra el més pur possible, és a dir, sense proteïnes i sense altres àcids nucleics, com l'RNA.



Figura 12: Kit de Qiagen. Font: Qiagen

El següent pas d'aquest procediment és la quantificació del DNA, que serveix per comprovar tant si l'extracció feta és correcta com per saber si està en una concentració adequada per treballar. La mostra es quantifica amb un espectrofotòmetre (Figura 13). Aquest aparell precisa que es calibri amb anterioritat amb el mateix producte amb el que el DNA està dissolt, fer-ne el que anomenem el blanc. L'espectrofotòmetre funciona de la següent manera: fa incidir sobre les molècules de DNA una llum amb una longitud d'ona específica les quals l'absorbeixen. El DNA té una absorbància màxima de 260 nanòmetres i, calculant la quantitat de llum que s'absorbeix, es pot determinar la concentració de DNA de la mostra en nanograms/microlitre (Figura 14).



Figura 13: Espectofotòmetre NanoDrop ND-1000. Model utilitzat durant l'estudi.

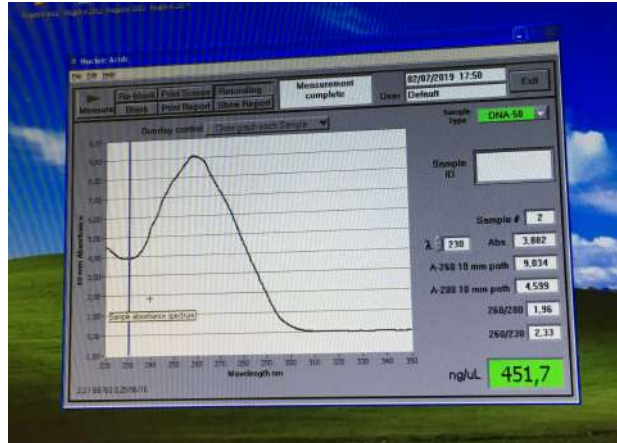


Figura 14: Corba d'absorbància, puresa i resultat de la quantificació

A més, aquest aparell també mesura la puresa de la mostra. Aquest es mesura per mitjà de dues ràtios²³: la 260/280 i la 260/230. Les dues indiquen el grau de puresa del DNA.

La primera indica que el DNA és pur quan el seu valor està entre 1,8 i 2,0. En cas que el valor fos inferior, indicaria que hi ha substàncies residuals que absorbeixen la llum de 280nm.

La segona ràtio funciona de la mateixa manera però els seus valors normals estan entre 2,0 i 2,2. En el cas que sortís inferior significaria que hi ha residus que absorbeixen la llum de 230nm.

Així que el grau de puresa d'ambdues ràtios per poder treballar amb les mostres ha de ser proper a 2,0.

Un dels problemes amb els que ens vàrem trobar va ser que en dues mostres la concentració de DNA era inferior a 100ng/μL, i per tant era necessari concentrar-la ja que no hi hauria suficient quantitat de DNA per amplificar la mostra. En aquests casos, la ràtio de 230/260 podia quedar modificada i sortir molt baixa en la requantificació després de concentrar el DNA però no hi havia manera d'evitar-ho.

²³ Relació quantificada entre dues magnituds que n'indica la seva proporció.

4.3. PCR d'amplificació

PCR són les sigles angleses de la reacció de *Polymerase Chain Reaction*, reacció en cadena de la DNA-polimerasa. Es tracta d'una tècnica de biologia molecular que permet obtenir un gran nombre de còpies idèntiques d'un mateix fragment de material genètic. Serveix per facilitar tots els anàlisis que s'han de dur a terme ja que fa més fàcil identificar amb una molt alta probabilitat d'encert les mutacions que es busquen.

En el nostre cas, l'utilitzem per amplificar els exons 19, 20 o 21, depenent del que ens interessa a cada moment.

És una tècnica basada en les propietats de la DNA-polimerasa, un dels enzims principals que s'encarrega de dur a terme la replicació del DNA de les nostres cèl·lules.

Per tal que funcioni correctament, l'enzim ha de tenir disponible totes les substàncies necessàries i s'aconsegueix afegint a la mostra una MasterMix²⁴ composta per tots els productes i reactius necessaris del Kit TaKaRa LA Taq. Els components del kit són els dNTP (nucleòtids lliures), LA Buffer, que manté el pH constant, els *Primers*²⁵ tan *Forward* com *Reverse* que s'enganxen a la cadena de DNA i serveixen d'inici per tal de que la DNA-polimerasa allargui la nova cadena, una solució de MgCl₂, que permet un medi òptim pel funcionament dels *Primers*, la DNA-polimerasa que en el nostre cas és la Takara LA, i finalment aigua destil·lada.

Les proporcions per una sola mostra són les següents (Figures 15 i 16). És necessari multiplicar cada component pel nombre de mostres que s'analitzen tenint sempre en compte que també s'ha de realitzar un grup control amb la mateixa MasterMix per assegurar-nos que la PCR amplifica el fragment correcte.

²⁴ Solució amb tots els reactius necessaris per la reacció.

²⁵ Petits segments de nucleòtids que serveixen d'inici de la nova cadena que sintetitzarà la DNA-polimerasa.

| PCR MM EGFR 19 | |
|----------------|-----|
| | x1 |
| dNTP | 2,5 |
| La Buffer | 1 |
| MgCl | 0,8 |
| Takara Taq | 0,1 |
| P.Fwd | 0,7 |
| P.Rev | 0,7 |
| H2O | 8 |

Figura 15: Recepta per la MasterMix de l'exó 19 de l'EGFR

| PCR MM EGFR 20 i 21 | |
|---------------------|-----|
| | x1 |
| dNTP | 2,5 |
| La Buffer | 1 |
| MgCl | 1 |
| Takara Taq | 0,1 |
| P.Fwd | 1 |
| P.Rev | 1 |
| H2O | 1,4 |

Figura 16: Recepta per la MasterMix dels exons 20 i 21 de l'EGFR

La mescla de 2µL de mostra i 8µL de MasterMix es col·loca en un dels pous d'una placa de 96 microtubs, la qual es centrifuga i seguidament es deixa a dins la màquina encarregada de propiciar les condicions de temperatura òptimes perquè es produeixi la reacció, el termociclador.

La PCR d'amplificació permet obtenir còpies d'un fragment de DNA a partir d'un mínim original, però per fer-ho primer s'ha de desnaturalitzar la doble hèlix per tal que els enzims actuïn. Així doncs, la reacció funciona per cicles d'altres i baixes temperatures que permeten desfer la doble cadena, que s'uneixin els Primers, allargar les cadenes per mitjà de la DNA-polimerasa, i tornar a ajuntar les cadenes per formar molècules de DNA. Tots aquests passos conformen un cicle, que es va repetint successivament tantes vegades com sigui necessari (Figura 17).

Les meves reaccions solen estar conformades per 35 cicles, i el temps final de la reacció és d'aproximadament una hora. Un cop acabada, per tal de conservar correctament el DNA s'ha de guardar en una nevera a 4°C.

Les condicions de temperatura dels exons 20 i 21 eren les mateixes, però per l'exó 19 variaven. En cada cas calia ajustar quin programa (Figura18) havia de seguir el termociclador.

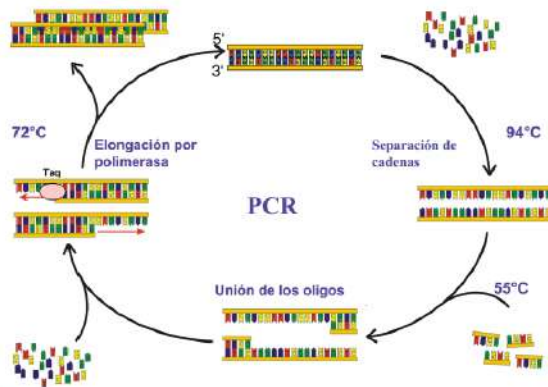


Figura 17: Diferents fases de la reacció PCR.
Font: Padro E. 2010.

| Exemple de condicions de PCR | | |
|------------------------------|-------------|----------|
| Procés | Temperatura | Temps |
| Desnaturalització inicial | 94°C | 30 s |
| 35 cicles | 94°C | 10 s |
| | 65°C | 30 s |
| | 72°C | 30 s |
| Extensió final | 75°C | 5 min |
| Emmagatzament | 4°C | Mantenir |

Figura 18: Condicions de temperatura per un cicle de la reacció PCR

4.4. Electroforesi en gel d'agarosa

Tenint en compte que enviar mostres a seqüenciar és car, abans d'enviar-les cal verificar que la PCR ha sortit correctament, i s'ha amplificat el fragment de DNA que ens interessa. Per fer-ho utilitzem una tècnica habitual als laboratoris clínics, l'electroforesi.

L'electroforesi en gel d'agarosa és una tècnica amb un alt potencial de separació de molècules i es basa en la mida, la forma i la càrrega de les molècules de la mostra. Quan s'aplica un camp elèctric a un material porós com és el gel, el DNA, que està carregat negativament, migra gradualment cap al pol positiu. Durant la preparació del gel es tenyeix amb un colorant sensible a la llum ultraviolada que permet observar el resultat de la migració.

Els exons del gen EGFR tenen un pes molecular concret i per tant amb l'ajuda d'un patró de bandes obtingut de marcadors comercials que es fa córrer al gel juntament amb les mostres es pot saber si el fragment de DNA que ens interessa s'ha amplificat correctament.

La preparació del gel es fa seguint un protocol que en el nostre cas no teníem escrit i que vam haver de memoritzar.

En primer lloc s'han de pesar 0,30g d'agarosa en pols, amb l'ajuda d'una balança, una pipeta pasteur tallada i paper d'alumini. En un matràs s'hi aboquen els 0,30g d'agarosa juntament amb 30ml del tampó d'electroforesi TBE al 10%, que també serveix per mantenir el pH constant. A continuació s'escalfa la solució en un microones fins que comença a bullir i llavors es treu i es deixa refredar deu segons. Així successivament fins que s'aconsegueix una solució d'agarosa amb TBE a l'1% completament transparent. En aquest moment s'afegeixen 4 μ L del tint fluorescent Red Safe.

Un temps enrere s'havia fet servir bromur d'etidi com a tint, però ara ja no s'utilitza perquè és una substància que s'adhereix al DNA, altament tòxica, i s'havia de manipular amb molt de compte. Al laboratori on s'han dut a terme els experiments hi ha una sala només per fer l'electroforesi ja que està contaminada pel bromur d'etidi i no es pot entrar ni treure cap material.

El suport on s'aboca el gel es segella amb cinta adhesiva i es col·loquen una o dues pintes que serveixen com a motlle pels pous on es col·locaran les mostres. Un cop abocada, es deixa polimeritzar²⁶ durant 30 minuts.

Llavors, s'introdueix a la cubeta d'electroforesi, omplerta prèviament amb TBE al 10%, es carreguen les mostres al gel, 2 μ L de mostra mesclat amb 1 μ L de (BUFFER GEL 6x), i s'hi aplica un corrent elèctric de 85V durant 25 minuts.

Cal anar amb compte amb el voltatge i el temps ja que si es deixa massa estona o amb un voltatge massa alt, les mostres podrien arribar fins als pous col·locats més avall o sortir del gel.

Els resultats de l'electroforesi s'obtenen en forma d'imatge en blanc i negre obtingudes amb una càmera de fotografiar. Les diferents línies que ens mostra corresponen a cada mostra de DNA que hi havia carregada al gel. El patró de bandes de l'esquerra ens serveix per mesurar quina és la mida de les molècules de DNA i l'ombra de llum que hi ha per sota de les mostres són els *Primers* que no han acabat de reaccionar durant la PCR, ja que sempre se'n posa en excés (Figura 19).

²⁶ Solidificar

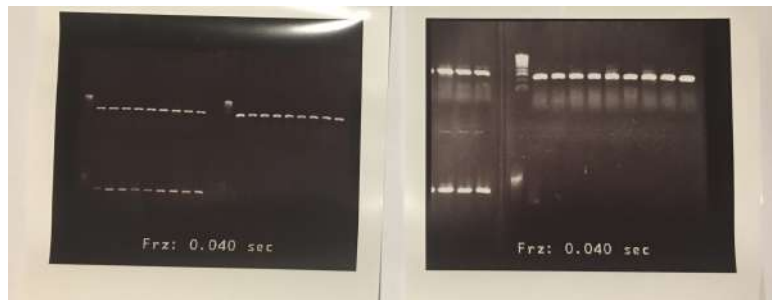


Figura 19: Resultats de l'electroforesi.

4.5. Purificació del DNA

Un cop verificat que la PCR ha sortit com ens esperàvem només queda acabar de preparar les mostres per poder enviar-les a seqüenciar.

Per fer-ho es necessita el kit de purificació d'DNA de QIAgen, una columna, tres tubs, una màquina centrífuga, el vórtex i les micropipetes.

Durant aquest procediment el que s'intenta aconseguir és obtenir el DNA el més net possible eliminant totes les restes de primers, enzim, nucleòtids, sals, etc, que han pogut quedar de la reacció de PCR. Tots els passos a realitzar venen marcats per un protocol que directament facilita l'empresa QIAgen (veure annex 2). Consisteix en una sèrie de rentats amb Buffers i aigua destil·lada, mentre s'hi apliquen diversos períodes de centrifugació per separar les molècules de DNA de les impureses. Al final de cada centrifugació, queda el tub amb les impureses i el Buffer que toqués en aquell moment, i el DNA queda retengut a la columna (Figures 20 i 21).

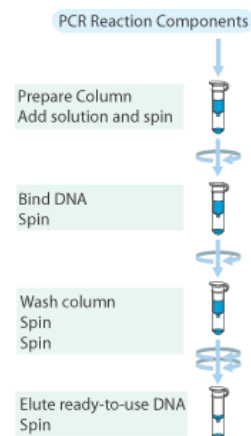


Figura 20: Esquema de la purificació del DNA. Font: Merck KGaA.

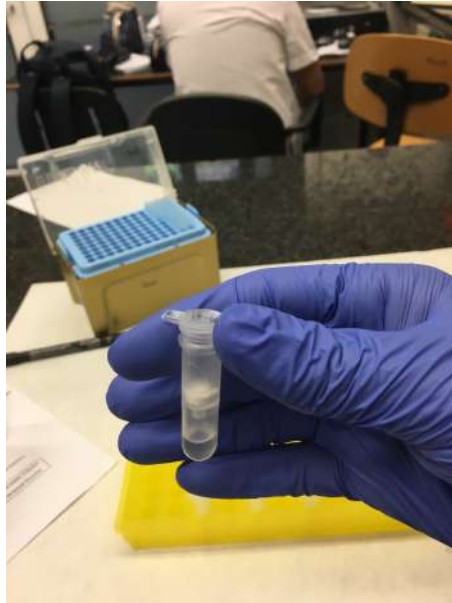


Figura 21: Resultat d'una centrifuga durant la purificació del DNA.

4.6. Procés de seqüenciació

El procés de seqüenciació o de terminació de la cadena utilitzat en aquest projecte és el mètode Sanger, desenvolupat per Sanger l'any 1975. Gràcies a la seva descoberta, es va poder seqüenciar, per primera vegada, el genoma d'un bacteri.

És un mètode semblant al de la PCR d'amplificació, però en aquest cas a més d'afegir dNTPs normals s'hi afegeixen ddNTPs fluorescents. Aquest nucleòtids, a part de produir lluminiscència manquen d'un grup OH final, i per tant darrere seu no es pot formar cap enllaç.

Aquest fet resulta en moltes cadenes de longituds diferents acabades amb un nucleòtid fluorescent. Les mostres es fan córrer a través d'un capil·lar per aconseguir que les cadenes arribin gradualment al detector làser en funció de la seva longitud. Això ens permet saber l'ordre en el que estan posats els nucleòtids dins la cadena de DNA (Figura 22).

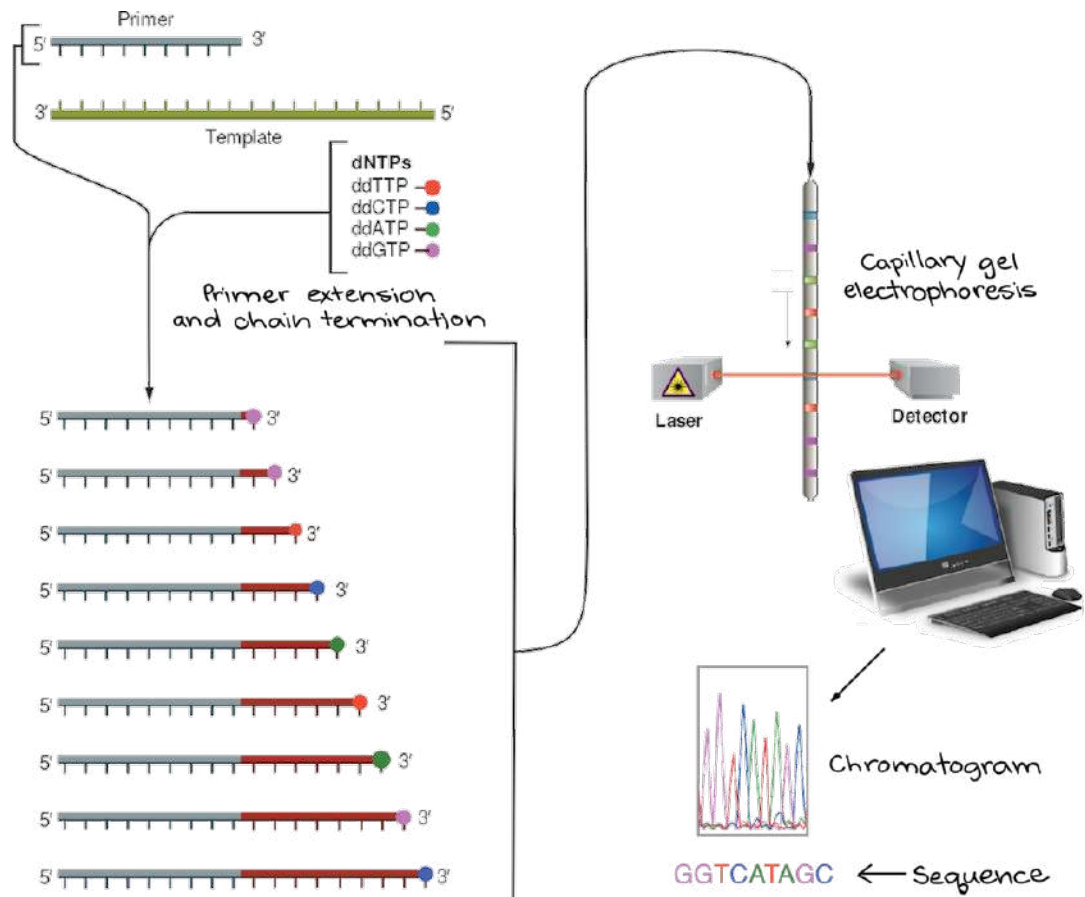


Figura 22: Seqüenciació Sanger. Font: Khan Academy

5. Anàlisi de resultats i estudi de mutacions

Un cop les mostres van ésser seqüenciades pel servei de seqüenciació (empresa STAB Vida a Portugal), vam poder comparar-les amb el patró de la seqüència descrita de *EGFR* que es va poder obtenir gràcies al projecte Genoma Humà de l'any 2003. En els casos en que les mostres foren enviades a seqüenciar amb el *Primer Forward*, els pics representen els següents nucleòtids: els de color vermell la timina; els de color blau la citosina; els de color negre la guanina i els de color verd l'adenina. Si en canvi el Primer que s'afegeix a les mostres és el Reverse, per interpretar els resultats correctament s'ha de llegir de dreta a esquerra i invertir les bases per obtenir la seqüència complementària. És a dir, si als resultats, llegint d'esquerra a dreta es troben les lletres CTA, la cadena de DNA serà del tipus TAG.

Existeixen diversos tipus de mutacions, i cada un s'identifica d'una manera diferent.

Cal clarificar que quan una mostra no està mutada, és a dir, es considera normal, se li dona el nom de *Wild Type* (WT), que traduït literalment significaria tipus salvatge. Se l'anomena així perquè representa que és la seqüència que es trobaria present a la natura.

Començant pels canvis de bases, com que les mostres passen per un capil·lar durant la seqüenciació del DNA, van arribant segons la seva longitud, fet que ens dona la seqüència de bases de la cadena de DNA (Figura 23).

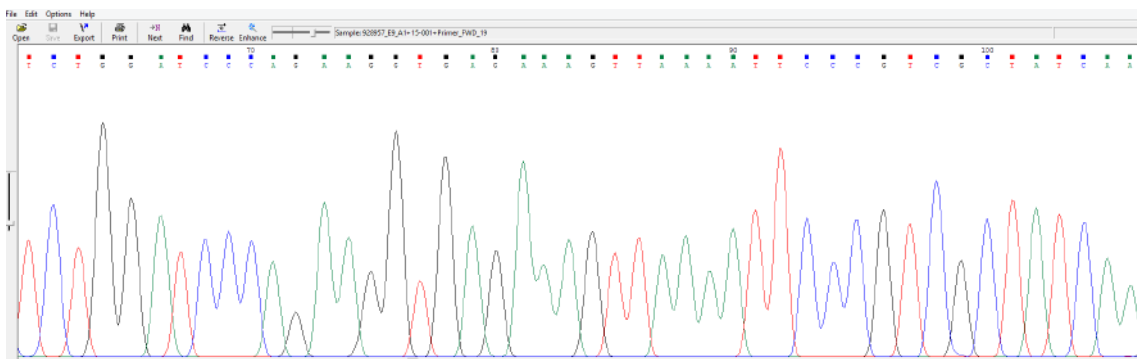


Figura 23: Exemple de Cadena de DNA no mutada.

Ara bé, si arriben dues mostres de la mateixa longitud però amb nucleòtids finals diferents, significa que la màquina llegirà dos pics a la mateixa posició. Això és degut a que no totes les cèl·lules del tumor tindran la mutació, i per tant un cop ens donin els resultats, veurem un doble pic al mateix lloc (Figura 24).

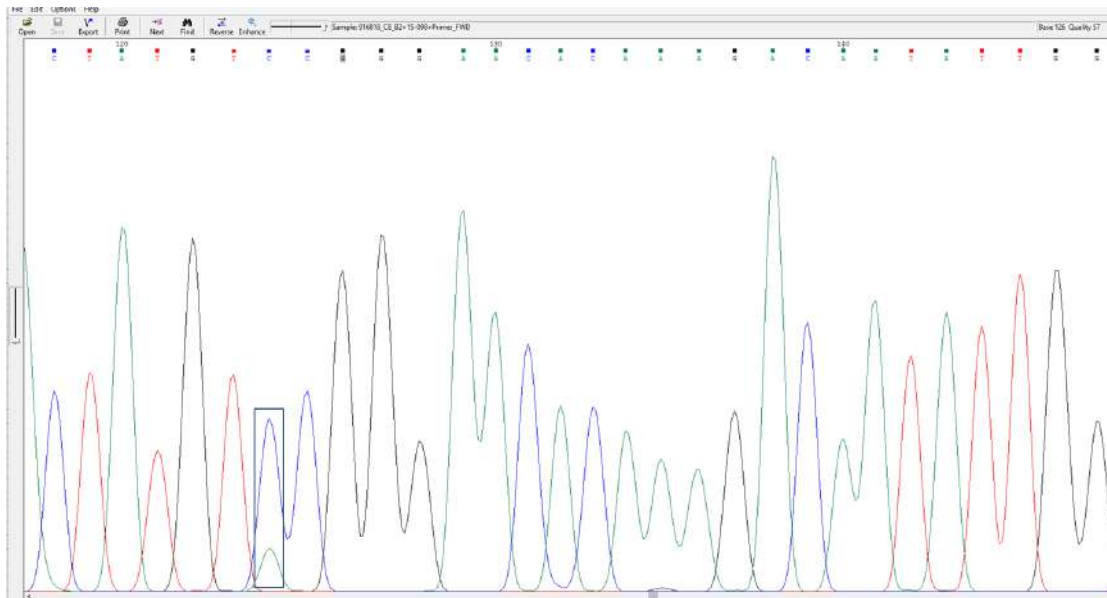


Figura 24: Mostra mutada.

Un cop identificat aquest doble pic, cal localitzar la posició d'aquell nucleòtid en concret dins el gen juntament amb el codó²⁷ del qual en forma part. S'introdueix a la base de dades del COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer), una base de dades que recull gairebé totes les mutacions genètiques amb les que pot comptar un tumor, el qual ens dona el número de referència en concret d'aquella mutació i la freqüència amb la que es detecta, mesurat en les vegades que una mutació ha estat descrita.

En el cas de les delecions i addicions, el que es veu és que a partir d'un punt, totes els pics de les cèl·lules mutades es sobreposen amb els que provenen de la cadena normal de les cèl·lules que no estan mutades. A partir d'una base nitrogenada, es produeix el corriment dels nucleòtids de les mostres amb la mutació, i per tant es veuen tot un seguit de dobles pics com els de la figura

²⁷ Triplet de nucleòtids que durant la síntesi de les proteïnes codifica per un aminoàcid en concret.

anterior. Durant els experiments malauradament no hem detectat cap mutació d'aquest tipus, encara que en l'exó 19 no seria estrany trobar-les.

Els resultats dels experiments realitzats al laboratori per analitzar varis exons, en un total de 46 mostres de teixit humà, es mostren a la taula següent (Figura 25). on es resumeixen quines mostres estan mutades, quina mutació concreta tenen i en quin exó es troben. Alhora aquesta taula ha derivat en la gràfica de la Figura 26, que indica quina quantitat de mostres s'han qualificat com a WT, i la proporció de les mostres mutades detectades en cada exó.

| Pacient | Exó | Canvi de nucleòtid | Canvi d'aminoàcid | Núm. Referència mutació |
|------------|-----|--------------------|-------------------|-------------------------------|
| Pacient 15 | 19 | G/A | Glu/Lys | COSM1738010 / 2245G>A / E749K |
| Pacient 22 | 19 | A/G | Asp/Gly | COSM27042 / 2282A>G / D761G |
| Pacient 42 | 19 | G/A | Glu/Lys | COSM1738010 / 2245G>A / E749K |
| Pacient 1 | 20 | - | - | Mutada |
| Pacient 3 | 20 | - | - | Mutada |
| Pacient 5 | 20 | C/A | Leu/Ile | - |
| Pacient 6 | 20 | C/A | Pro/Thr | - |
| Pacient 7 | 20 | - | - | Mutada |
| Pacient 8 | 20 | - | - | Mutada |
| Pacient 13 | 20 | - | - | Mutada |
| Pacient 14 | 20 | - | - | Mutada |
| Pacient 19 | 20 | - | - | Mutada |
| Pacient 20 | 20 | - | - | Mutada |
| Pacient 34 | 20 | G/A | Asp/Asn | COSM14068 / 2308G>A / D770N |
| Pacient 35 | 20 | - | - | Mutada |
| Pacient 1 | 21 | G/A | Arg/Lys | COSM20893 / 2522G>A / R841K |
| Pacient 3 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 5 | 21 | G/A | Lys/Glu | 2554G>A / K852E |
| Pacient 6 | 21 | A/G | Lys/Arg | COSM26034 / 2624A>G / K875R |
| Pacient 9 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 10 | 21 | G/A | Asp/Tyr | 2554G>A / K852E |
| Pacient 11 | 21 | G/A | Arg/Lys | COSM20893 / 2522G>A / R841K |
| Pacient 13 | 21 | A/T | Glu/Val | COSM4170225 / 2597A>T / E866V |
| Pacient 14 | 21 | G/A | Arg/Lys | COSM20893 / 2522G>A / R841K |
| Pacient 16 | 21 | A/T | Glu/Val | COSM4170225 / 2597A>T / E866V |
| Pacient 17 | 21 | G/A | Lys/Tyr | 2554G>A / K852E |
| Pacient 18 | 21 | G/T | Glu/Asp | COSM219793 / 2598G>T / E866D |
| Pacient 19 | 21 | G/T | Glu/Asp | COSM219793 / 2598G>T / E866D |
| Pacient 21 | 21 | A/T | Glu/Val | COSM4170225 / 2597A>T / E866V |
| Pacient 25 | 21 | G/A | Glu/Lys | COSM53291 / 2485G>A / E829K |
| Pacient 27 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 28 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 29 | 21 | A/T | Glu/Val | COSM4170225 / 2597A>T / E866V |
| Pacient 31 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 32 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 33 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 34 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 35 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 37 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 38 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 39 | 21 | A/T | Glu/Val | COSM4170225 / 2597A>T / E866V |
| Pacient 41 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 42 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 43 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 45 | 21 | - | - | Mutada |
| Pacient 46 | 21 | A/T | Glu/Val | COSM4170225 / 2597A>T / E866V |

Figura 25: Taula de resultats de les anàlisis dels exons

Cal aclarir que un cop es detecta una mutació en un dels exons ja no se n'analitza cap altre exó. És a dir, una mostra mutada en l'exó 21 ja no serà

analitzada en cap altre exó.

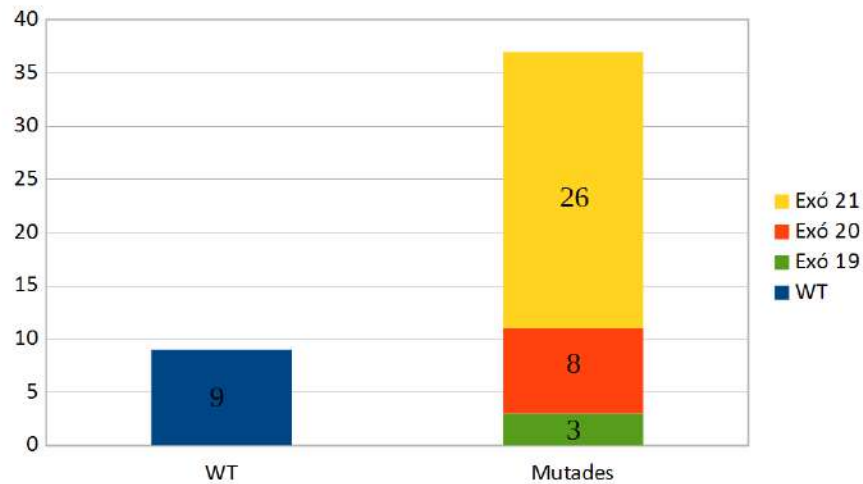


Figura 26: Distribució de les mostres segons si són WT o si estan mutades en algun dels gens.

Es va començar analitzant l'exó 21, detectant quines mostres estaven mutades. De les mostres WT de l'exó 21 se'n va analitzar l'exó 20 i, al seu torn, les mostres WT del 20 van ser analitzades en l'exó 19.

Les mostres considerades mutades però que no compten amb cap número de referència no s'han pogut analitzar bé ja que apareixien de la següent manera (Figura 27) i no ha estat possible donar-les com a WT. Sent així, en un estudi real s'hauria de repetir la seqüenciació una altra vegada i tornar a interpretar els resultats.



Figura 27: Seqüència "bruta".

En un general, on s'haurien de concentrar el major nombre de mutacions seria a l'exó 19, i no al 21, però al fer l'anàlisi amb un volum tan petit de mostres les proporcions queden alterades.

Com en tot treball de camp, durant el procés han anat sorgint una sèrie de complicacions, gairebé totes al realitzar les reaccions de PCR.

Als primers experiments, els exons 18 i 19 no s'amplificaven, i per tant les mostres no servien. Al voler estalviar temps es varen passar a utilitzar directament els exons 20 i 21, però aquests tenien un problema a la recepta de la MasterMix. Per sort, la solució va ser canviar la concentració dels *Primers* i augmentar-la deu vegades.

Més endavant, quan va ser el torn de preparar les reaccions per seqüenciar l'exó 19, vam provar amb la mateixa solució i augmentar la concentració de *Primers* però no va funcionar, i a sobre les mostres van sortir contaminades. Per eliminar aquesta contaminació va ser necessari dur a terme una neteja amb lleixiu i etanol de tot el material (micropipetes, caixes de puntes, campana extractora i gradeta) i llavors realitzar quatre reaccions de prova cadascuna amb una recepta de MasterMix diferent. Es buscava trobar una concentració adient de clorur de magnesi ($MgCl_2$) i de *Primer* tan Forward com Reverse.

A més, es va retocar una condició de temperatura d'una de les fases del cicle de PCR per augmentar l'especificitat dels *Primers* i així que no amplifiquessin la contaminació que pogués haver-hi encara.

Un cop va sortir tot bé dues vegades seguides, es va poder començar a treballar amb l'exó 19.

Resumint, el que més problemes ha donat han sigut les reaccions de PCR, bàsicament perquè són procediments llargs i pels quals fa falta preparar unes quantes mescles.

6. Conclusió

La hipòtesi s'ha confirmat i un nombre important de pacients amb càncer de pulmó no microcític havien estat afectats per una mutació en el gen EGFR. Malauradament totes les mutacions que s'han trobat són per canvi de base, i no hem pogut veure cap addició ni deleció.

S'han detectat 22 mutacions en pacients que, sumant-hi les mostres considerades mutades perquè no podien ser analitzades correctament, fan un total de 37 mostres mutades.

Malauradament, no s'ha disposat de prou temps per analitzar els quatre exons que s'havien plantejat en un principi (18, 19, 20 i 21). Si s'acabés l'anàlisi, potser algun dels nou pacients encara considerats WT es trobaria mutat.

Aquest estudi ha servit per, en els casos on els pacients tenen mutacions molt clares, aportar informació i donar una mica més de llum al seu diagnòstic.

La importància de comprovar l'existència d'una mutació en el gen EGFR en adenocarcinomes rau en la possibilitat de, si el pacient pateix una mutació, oferir-li un pla de medicació més personalitzat i més adient al seu tumor. Segons dades del *National Cancer Institute* (NCI), aquesta millora en el diagnòstic i el tractament ha estat la causa que en els últims anys els pacients amb adenocarcinomes mutats de EGFR tinguin un millor pronòstic a tres anys que els no mutats. Per poc que pugui semblar, un simple canvi de base en la immensitat que és el DNA, pot marcar la diferència.

Personalment crec que encara ens queda un món per arribar a entendre una malaltia tan complexa com és el càncer però estic molt content d'aportar el meu petit granet de sorra per poder avançar cap a un futur millor.

Realitzar aquest projecte al costat d'un equip que et dona tan suport i et recolza tantíssim sempre és un gust i he gaudit moltíssim de tot el treball.

7. Referències bibliogràfiques

American Cancer Society. *Tasas de supervivencia del cáncer de pulmón microcítico*. Recuperat 26 d'abril 2019 des de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pulmon-microcitico/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/tasas-de-supervivencia.html>

American Institute for Cancer Research. (2018). *Worldwide Cancer Data*. Recuperat 26 d'abril 2019 des de <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>

Cancer Research UK. (2017). *Types of cancer*. Recuperat 27 d'abril 2019 des de <https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer#main>

Can Pi. (2018) *EGFR mutations in early-stage and advanced-stage lung adenocarcinoma: Analysis based on large-scale data from China*. *Thoracic Cancer*, 9, 814-819.

David R. Gandara, Peter S. Hammerman, Martin L. Sos, Primo N. Lara, Jr, Fred R. Hirsch. (2015). *Squamous Cell Lung Cancer: From Tumor Genomics to Cancer Therapeutics*. *Clinical Cancer Research*, 21, 2236-2243.

EDVOTEK. *Edvo-kit nº 101, Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa*. Recuperat 3 de setembre 2019 des de <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=16&ved=2ahUKEwiTnuaCtbTkAhUb5uAKHSHDCPYQFjAPegQIBRAC&url=https%3A%2F%2Fwww.edvotek.com%2Fsite%2Fpdf%2F101sp.pdf&usg=AOvVaw1XvPVRj5ejOYTpjlojSjXq>

Elena Gallardo Martín. (2011). *Importancia clínica de los micrnas de la vía de p53 en cáncer de pulmón no microcítico: miR-34a y miR-16*. Tesi doctoral. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

Fundació Enciclopèdia Catalana. (2000). *Diccionari Enciclopèdic de Medicina*. Barcelona.

Fundació Enciclopèdia Catalana. (1990). *Enciclopèdia de Medicina i salut. Volum 4. Aparell respiratori*. Barcelona.

Gilda da Cunha Santos. (2011). EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, 6, 49-69.

Hammerman, P., Lawrence, M., Voet, D. (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489, 519–525.

Hospital Clínic de Barcelona. (2018). *Càncer*. Recuperat 18 d'abril 2019 des de <https://portal.hospitalclinic.org/ca/malalties/cancer/definicio>

Instituto Nacional del Cáncer. *Diccionario del cáncer*. Recuperat 25 d'abril 2019 des de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/sarcoma>

Junta Editorial de Cancer.Net. (2019). *Cáncer de pulmón de células no pequeñas: Introducción*. Recuperat 17 de juny 2019 des de <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-pulm%C3%B3n-de-c%C3%A9lulas-no-peque%C3%B1as/introducci%C3%B3n>

Junta Editorial de Cancer.Net. (2019). *Cáncer de pulmón de células no pequeñas: Estadísticas*. Recuperat 17 de juny 2019 des de <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-pulm%C3%B3n-de-c%C3%A9lulas-no-peque%C3%B1as/estad%C3%ADsticas>

LUNGEVITY. (2019). *Lung Adenocarcinoma*. Recuperat 18 de juny 2019 des de <https://lungevity.org/for-patient/t/-caregivers/lung-cancer-101/types-of-lung-cancer/lung-adenocarcinoma>

Masaya Yotsukura. (2017). Clinical and pathological characteristics of *EGFR* mutation in operable early-stage lung adenocarcinoma. *ELSEVIER. Lung Cancer*, 109, 45-51.

Organització Mundial de la Salut. (2018). *Cáncer*. Recuperat 26 d'abril 2019 des de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Organització Mundial de la Salut. (2018). *Prevención del cáncer*. Recuperat 26 d'abril 2019 des de <https://www.who.int/cancer/prevention/es/>

Roche Pacientes. *Tipos de cáncer de pulmón*. Recuperat 15 d'abril 2019 des de <https://rochepacientes.es/tipos-de-cancer-de-pulmon/#1482318082421-8fa6cbf5-3e55>

Universitat de València. (2017). *Cáncer: Etiología y prevención*. Recuperat 18 d'abril 2019 des de <https://www.uv.es/uvweb/master-investigacion-biomedica/es/master-universitario-investigacion-biomedica/cancer-etilogia-prevencion-1285881692190/GasetaRecerca.html?id=1286001638694>

8. Annexos

Annex 1

Extracción de DNA con el kit de Qiagen (Tejido)

Advertencias:

1. Confirmar que tenemos todo el material y reactivos que nos hagan falta para el experimento.
2. Avisar para pedir material o reactivos en el caso de que quede poco de ellos.
3. Tener la poyata siempre cubierta con un papel absorbente.
4. Usar siempre guantes.
5. Trabajar en campana en caso de utilizar reactivos tóxicos.
6. Cerrar el contenedor de desperdicios cuando esté lleno y sustituirlo por otro nuevo.
7. Apagar y devolver todo a su sitio al finalizar.

Antes de empezar:

1. Encender el termoblock a 56°C para que se vaya calentando.
2. Poner a calentar 1mL de Buffer AE.
3. Añadir Etanol 100% (Ethanol Absolute Pure, PanReac AppliChem) al Buffer AW1 y al AW2 cuando estrenamos el kit para que este a la concentración adecuada y marcarlo en el pote.
4. Partir de un trozo de tejido ≤ 25 mg, triturarlo al máximo con bisturí e ir añadiendo 180 μ L de Buffer ATL vigilando de no generar demasiadas burbujas.
5. Centrifugar a 2.000rpm durante 5 minutos.

Protocolo:

1. Pipetear el lisado y pasarlo a un tubo de 1.5mL.
2. Añadir 20 μ L de Proteinasa K.
3. Añadir 200 μ L de Buffer AL.
4. Realizar un vórtex de 15 segundos.
5. Incubar a 56°C durante mínimo 15 minutos (Si hace falta, dejarlo toda la noche).
6. Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.
7. Añadir 200 μ L de Etanol del 100%.
8. Realizar un vórtex de 15 segundos.
9. Centrifugar a 10.000rpm durante 30 segundos.
10. Mezclar mediante la pipeta con cuidado.
11. Pasar la mezcla a una columna.
12. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto.
13. Descartar el líquido o cambiar la columna de tubo.
14. Añadir 500 μ L de Buffer AW1.
15. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto.
16. Descartar el líquido o cambiar la columna de tubo.
17. Añadir 500 μ L de Buffer AW2.
18. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.
19. Descartar el líquido o cambiar la columna de tubo.
20. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto con la columna vacía.
21. Pasar la columna a un eppendorf de 1.5mL previamente rotulado con el nombre de la muestra y fecha de la extracción.
22. Añadir 70 μ L a 100 μ L de Buffer AE previamente calentado al baño.
23. Esperar 10 minutos a T°C ambiente.
24. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto.
25. Cuantificar con el NanoDrop y rotular la concentración en el eppendorf.
26. Guardar en el congelador de -20°C.

QIAquick PCR Purification Kit Protocol

using a microcentrifuge

This protocol is designed to purify single- or double-stranded DNA fragments from PCR and other enzymatic reactions (see page 8). For cleanup of other enzymatic reactions, follow the protocol as described for PCR samples or use the MinElute Reaction Cleanup Kit. Fragments ranging from 100 bp to 10 kb are purified from primers, nucleotides, polymerases, and salts using QIAquick spin columns in a microcentrifuge.

Important points before starting

- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- All centrifugation steps are carried out at 17,900 × g (13,000 rpm) in a conventional tabletop microcentrifuge at room temperature.
- Add 1:250 volume pH indicator I to Buffer PB (i.e., add 120 µl pH indicator I to 30 ml Buffer PB or add 600 µl pH indicator I to 150 ml Buffer PB). The yellow color of Buffer PB with pH indicator I indicates a pH of ≤7.5.
- Add pH indicator I to entire buffer contents. Do not add pH indicator I to buffer aliquots.
- If the purified PCR product is to be used in sensitive microarray applications, it may be beneficial to use Buffer PB without the addition of pH indicator I.

Procedure

1. **Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of the PCR sample and mix. It is not necessary to remove mineral oil or kerosene.**

For example, add 500 µl of Buffer PB to 100 µl PCR sample (not including oil).

2. **If pH indicator I has been added to Buffer PB, check that the color of the mixture is yellow.**

If the color of the mixture is orange or violet, add 10 µl of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.

3. **Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.**
4. **To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.**
5. **Discard flow-through. Place the QIAquick column back into the same tube.**
Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.
6. **To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.**
7. **Discard flow-through and place the QIAquick column back in the same tube. Centrifuge the column for an additional 1 min.**

IMPORTANT: Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.

8. Place QIAquick column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.
9. To elute DNA, add 50 μ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0–8.5) to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30 μ l elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge.

IMPORTANT: Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 48 μ l from 50 μ l elution buffer volume, and 28 μ l from 30 μ l elution buffer.

Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at -20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

10. **If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel.**

Loading dye contains 3 marker dyes (bromophenol blue, xylene cyanol, and orange G) that facilitate estimation of DNA migration distance and optimization of agarose gel run time. Refer to Table 2 (page 15) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type.