

¿Es posible utilizar las muestras de colecistectomías con cáncer en investigación?: Calidad del ADN de muestras obtenidas del sistema público y privado de salud

IVÁN ROA¹, GONZALO DE TORO², TAMARA SÁNCHEZ³, JEANNIE SLATER³, ANNE MARIE ZIEGLER⁴, ANAKAREN GAME^{4,A}, LEONARDO ARELLANO⁵, KURT SCHALPER³, XABIER DE ARETXABALA⁶

Quality of DNA from archival pathological samples of gallbladder cancer

Background: The quality of the archival samples stored at pathology services could be a limiting factor for molecular biology studies. **Aim:** To determine the quality of DNA extracted from gallbladder cancer samples at different institutions. **Material and Methods:** One hundred ninety four samples coming from five medical centers in Chile, were analyzed. DNA extraction was quantified determining genomic DNA concentration. The integrity of DNA was determined by polymerase chain reaction amplification of different length fragments of a constitutive gene (β -globin products of 110, 268 and 501 base pairs). **Results:** The mean DNA concentration obtained in 194 gallbladder cancer samples was 48 ± 43.1 ng/ μ l. In 22% of samples, no amplification was achieved despite obtaining a mean DNA concentration of 58.3 ng/ μ l. In 81, 67 and 22% of samples, a DNA amplification of at least 110, 268 or 501 base pairs was obtained, respectively. No differences in DNA concentration according to the source of the samples were demonstrated. However, there were marked differences in DNA integrity among participating centers. Samples from public hospitals were of lower quality than those from private clinics. **Conclusions:** Despite some limitations, in 80% of cases, the integrity of DNA in archival samples from pathology services in our country would allow the use of molecular biology techniques.

(Rev Med Chile 2013; 141: 1529-1533)

Key words: DNA neoplasm; Gallbladder neoplasms; Molecular biology.

¹Creative Bioscience
Santiago, Chile.

²Servicio de Anatomía
Patológica. Hospital de
Puerto Montt, Chile.

³Servicio Anatomía
Patológica. Clínica Alemana
de Santiago, Chile.

⁴Facultad de Medicina.
Universidad del Desarrollo.
Santiago, Chile.

⁵Servicio Anatomía
Patológica. Clínica
Avansalud. Santiago, Chile.

⁶Departamento de Cirugía.
Clínica Alemana de
Santiago, Chile.

^aEstudiante de Medicina.

Financiado por: Proyecto
Fondecyt 1120208.

Recibido el 5 de marzo de
2013, aceptado el 29 de
octubre de 2013.

Autor de Correspondencia:
Iván Roa E.
Avenida Del Valle Norte
857. Oficina 102
Ciudad Empresarial.
Huechuraba Santiago.
Chile.
E-mail: ivanroaesterio@
gmail.com

La mortalidad por cáncer de vesícula biliar en Chile continúa siendo un problema de salud pública¹. Entre las causas de mortalidad por tumores malignos, ocupa el segundo lugar en la mujer y sexto en el hombre, con una incidencia de 26,2 y 9,4 \times 100.000 habitantes y una tasa de mortalidad de 15,6 y 6,0 \times 100.000 habitantes en mujeres y hombres, respectivamente². Aun cuando importantes aspectos clínicos y epidemiológicos han sido reportados, la caracterización genético-

molecular del cáncer vesicular dista mucho de la información existente en otras neoplasias del tubo digestivo³, pulmón⁴ o mama⁵. Este fenómeno probablemente es debido a su baja incidencia en la mayoría de los países desarrollados, por lo cual su estudio ha sido relegado a un plano secundario⁶⁻⁸. Lamentablemente, muchos trabajos en el área de la biología molecular incluyen erróneamente además del cáncer vesicular, a cánceres de los conductos biliares e, inclusive, de los conductos hepáticos,

como un solo grupo de tumores, lo cual disminuye y restringe el valor de las observaciones^{9,10}. Los trabajos existentes en esta área corresponden a pequeñas casuísticas o son producto de recopilaciones de casos de distintas instituciones y, a veces, de distintos países, lo que también le resta validez a los resultados. En la actualidad se desconocen importantes aspectos genéticos, epigenéticos, así como las principales vías metabólicas que están involucrados en la génesis y desarrollo del cáncer vesicular¹¹. La actual terapia personalizada que se está utilizando en otros cánceres como los de mama, pulmón y colon hacen mandatorio realizar estudios en el cáncer vesicular dado su importancia en nuestro país^{12,13}.

En la actualidad, al igual que hace décadas atrás, la mayor parte de los pacientes tanto en el sistema público como privado de salud, son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad, con escasas posibilidades terapéuticas^{14,15}. Las piezas quirúrgicas provenientes de estas intervenciones son procesadas rutinariamente en los servicios de Anatomía Patológica, muchas veces sin las debidas precauciones para conservar este material en condiciones que pudiesen permitir la realización de estudios posteriores con técnicas de biología molecular. Largos períodos de isquemia fría, fijación inadecuada, procesamiento no estandarizado, almacenamiento en condiciones no óptimas, son sólo algunos de los factores que determinan la pérdida de gran cantidad de dicho material¹⁶⁻¹⁸. La ausencia de bancos de tumores en la mayor parte de los servicios asistenciales, también, ha impedido la recolección de tejidos frescos que pudiesen ser utilizados en investigación a nivel genético-molecular. No existe información en nuestro medio respecto de la calidad e integridad del ADN presente en el material de piezas de colecistectomías con cáncer en los archivos de los distintos servicios de Anatomía Patológica.

El objetivo de este trabajo fue determinar la cantidad y calidad (integridad) del ADN en muestras de colecistectomías con cáncer en distintos centros asistenciales, tanto de sistema público como privado de salud.

Material y Método

Casos

Se estudian 194 casos de cáncer vesicular avanzado, la mayoría correspondientes a cole-

cistectomías completas (89%), parciales (7%) y metástasis de cáncer vesicular (4%). Los casos fueron seleccionados en forma aleatoria en los distintos centros asistenciales públicos (H1 n = 34; H2 n = 57 casos) y privados (C1 n = 30; C2 n = 68; C3 n = 5). Las muestras fueron enviadas sin ningún elemento que permitiera la identificación a excepción de su origen. Cada uno de los casos habían sido obtenidos y procesados de acuerdo a las condiciones locales, desde su extracción quirúrgica, período de isquemia fría, tiempo de fijación hasta el procesamiento histológico de la muestra, etc. En cada uno de los centros participantes se seleccionó una inclusión histológica que incluyera un área representativa de la lesión tumoral. De cada una de estas muestras se realizaron 5 cortes histológicos de 10µm de espesor y mediante micro-disección manual bajo visión microscópica, se seleccionaron las áreas correspondientes a tejido tumoral. Posterior a la disección se realizó extracción de ADN de acuerdo a protocolos estándares con kits comerciales disponibles en nuestro medio y cuyos protocolos se resumen a continuación. Finalmente, se realizó la amplificación de un gen constitutivo (β -globina) para demostrar la integridad del ADN del material extraído con productos de tamaño conocido de 110pb, 268pb y 501pb.

Protocolo de extracción cuantificación y amplificación de ADN

En los cortes seleccionados se realizó la desparafinización en baños de xilol e hidratación en concentraciones decrecientes de alcoholes hasta el agua y posterior mantención de las muestras en solución tamponada. La disección de las áreas seleccionadas se realizó con bisturí estéril o agujas 21G y posteriormente los fragmentos obtenidos resuspendidos y centrifugados por 5 min a 13.000 rpm. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit AxyPrep Multisource Genomic DNA Mini-prep ki Axygen® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN extraído se realizó por medición a 260 nm en un espectrofotómetro (Scandrop AnalytiKJena®). La amplificación del gen de la β -globina se realizó con los siguientes partidores: Forward: β -1 5'-TCAACCCTACAGTCACCCAT-3'; Reverse: β -2 5'-CTAACAATTACGAACAGCAATGAG-3', con un tamaño esperado del amplificado de 501 pb. La mezcla utilizada para la reacción contenía: 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de Cloruro de Magnesio, 12,5 pmol

de cada partidor, 1 U de Taq polimerasa (Gotaq Flexi DNA polymerase Promega®) y 5 µl de ADN en estudio, en un volumen de reacción de 50 µl. El programa de amplificación para β-1 y β 2 consistió en denaturación a 94°C por 4 min, seguida por 35 ciclos con denaturación 94°C, alineación/hibridización a 56°C por 30 seg, y elongación a 72°C por 30 seg, con un paso final de elongación a 72°C por 7 min. La verificación de los productos se realizó por electroforesis en geles de agarosa a 2%. Las muestras que resultaron negativas fueron amplificadas con partidores para productos de menor tamaño: Forward PCO3: 5`ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3`; Reverse PCO4: 5`CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3`; GH20: 5`GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3` con productos de amplificación esperados de 268pb y 110pb, en similares condiciones a las antes descritas.

Análisis estadístico

Se realizó mediante test de χ^2 y test exacto de Fisher para las tablas de contingencia y t-test para los promedios de muestras independientes.

Resultados

De las 194 muestras de las cuales se extrajó ADN, se logró obtener una concentración promedio de ADN de 48,2 ng/µl (DS \pm 41,3 con un mínimo de 2,05 y un máximo de 219,2 ng/µl). En 157 de los casos (80,9%), se logró amplificación de productos de al menos 110 pb, en 129 (66,5%) de 268pb. En 22,2% se logró amplificación de productos de al menos 501 pb (Tabla 1). En

19,1% de las muestras, la marcada degradación y fragmentación no permitió la amplificación de los tamaños mínimos señalados, por lo cual, estas muestras fueron desestimadas para ser utilizadas en un eventual estudio. Si bien se observaron diferencias marcadas en las concentraciones de acuerdo al origen de las muestras, estas no fueron significativas. Un hecho similar se observó respecto de la concentración de ADN y el tamaño de los productos obtenidos. El promedio de concentración de ADN para las muestras que amplificaron fragmentos de 110 pb fue de 72,6 ug/ul, y de 42,3 ng/µl para los casos que amplificaron 501 pb (Figura 1). En cambio, en los casos en los que no se logró amplificación la concentración promedio de ADN fue de 58,3 ng/µl. Es decir, no hubo relación entre la cantidad medida como concentración (ng/µl) e integridad del ADN medida a través de la capacidad de amplificación de los diferentes tamaños de los productos ($p = 0,7$).

En relación al grado de integridad del ADN y el origen de las muestras, los hallazgos se resumen en la Tabla 2. El porcentaje de muestras que no ampli-

Tabla 1. Tamaño de los productos de amplificación del ADN en muestras de vesícula biliar fijadas en formalina e incluidas en parafina

	Tamaño de productos de ADN (pb)		
	110pb	268pb	501pb
n°	157	129	43
%	80,9	66,5	22,2

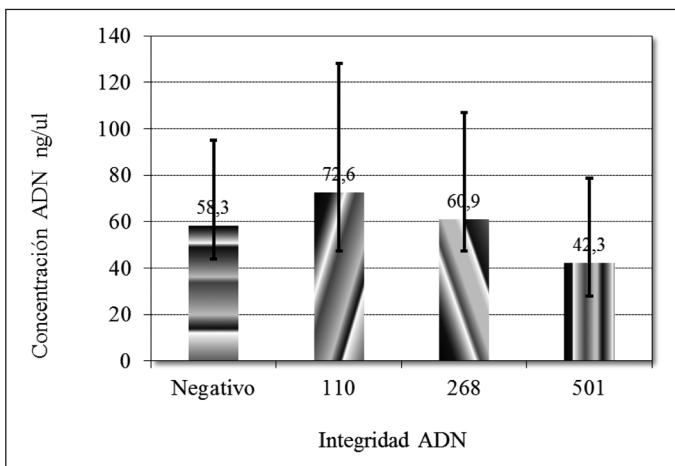


Figura 1. Concentración del ADN (ng/µl) y tamaño de los productos amplificados (pb). Se grafica las concentraciones promedio (ng/µl) con sus respectivas desviaciones estándares de acuerdo al tamaño de los productos amplificados. Se observa la ausencia de relación entre la concentración del ADN (ng/µl) obtenido y los tamaños de los productos (integridad).

Tabla 2. Distribución porcentual de la integridad del ADN de las muestras medida a través del tamaño de los productos amplificados y origen

Origen	Integridad ADN				n
	0	110pb	268pb	501pb	
C1	16,6	6,7	40,0	36,7	30
C2	20,6	10,2	39,8	29,4	68
C3	0,0	0,0	60,0	40,0	5
H1	29,5	8,8	55,9	5,8	34
H2	24,6	31,6	33,3	10,5	57

ficaron productos de al menos 110 pb, fluctuaron entre 16,6% (C1) y 29,5% (H1). En los casos en que se logró amplificación de productos de 501 pb, las diferencias observadas en las muestras de los distintos centros fueron aun mayores (5,8% versus 40%). En 30-40% de las muestras provenientes de clínicas privadas se obtuvieron amplificados de al menos 501 pb, en cambio, en las muestras provenientes de los hospitales, sólo 5,8% y 10,5% de los casos lograron productos amplificados de este tamaño respectivamente.

Discusión

Nuestro estudio, que incluye un número importante de casos provenientes de distintos centros del país, muestra la cantidad y calidad del ADN medida a través de la integridad (tamaño de los productos amplificados) que están presentes en las muestras de cáncer de la vesícula biliar en los archivos de los servicios de Anatomía Patológica en nuestro país. Se demuestra que en algunos centros, la cifra de muestras inadecuadas puede alcanzar cifras de hasta 30% de los casos. Este hecho debería tenerse en consideración al momento de planificar un estudio, a fin de estimar a priori el tamaño muestral requerido, considerando el importante número de casos que tendrían que excluirse dada la mala calidad del ADN. Frente a esto, sugerimos hacer pequeños estudios pilotos para probar la integridad del ADN (medición de productos amplificados de distintos tamaños), en vez de determinarlo en etapas intermedias o tardías del estudio y de esta manera evitar el costo y esfuerzo que eso significa. Sin embargo, podemos señalar que en 80% de los casos fue posible

amplificar productos de al menos 110 pb, lo que abre buenas perspectivas al estudio y caracterización molecular del cáncer de la vesícula biliar en Chile con el material actualmente archivado en los servicios de Anatomía Patológica, tanto de hospitales como de clínicas privadas.

Es llamativa la ausencia de relación entre la concentración e integridad del ADN en el material estudiado, proveniente de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina. En la gran mayoría de las muestras, a pesar de haberse obtenido una adecuada cantidad de ADN (concentración medida por espectrofotometría), este parámetro por sí mismo no permite asegurar la integridad de este ADN. Su fragmentación y degradación impide la amplificación de fragmentos de unos pocos pares de bases. De esta manera, consideramos que, para el material de archivo fijado en formalina e incluido en parafina, es conveniente privilegiar la determinación de la integridad a través de la amplificación de productos de tamaño conocidos, en vez de la cantidad de ADN que se puede lograr, ya que esta variable depende predominantemente de la cantidad de tejido procesado. Estos hallazgos nos han llevado a modificar el enfrentamiento con este tipo de muestras y hacer, antes que nada, cortes iniciales de prueba para determinar directamente la integridad del ADN, en vez de seleccionar áreas de interés, hacer múltiples cortes, microdisecar y posteriormente extraer ADN, medir su concentración para finalmente determinar su integridad, lo que conlleva una pérdida de tiempo, esfuerzos y recursos.

A estos hallazgos se le deben agregar factores deletéreos pre-analíticos que influyen en la preservación de las muestras y que no dependen de los servicios de Anatomía Patológica (forma de extracción de la muestra, período de isquemia, fijación y manejo de la muestra). Debemos señalar que no es posible considerar al actual procesamiento histológico de las muestras como un proceso estandarizado y controlado todo lo que fuese deseable. Estos factores a la postre son determinantes en la calidad de la muestra para distintos estudios complementarios, como los inmunohistoquímicos y actualmente los de biología molecular.

A lo anterior se debe sumar la rápida y espontánea degradación enzimática que sufre el ADN y el ARN, así como el deletéreo efecto de la formalina, que es el más amplio y difundido fijador

de tejidos utilizado en Anatomía Patológica, con innumerables factores adversos. La formalina, un aldehído que proporciona una eficaz y económica conservación de la estructura macro y microscópica, su acción sobre moléculas complejas como enzimas, proteínas y ácidos nucleicos conlleva, además, una rápida inactivación, pérdida de la estructura e irreversible fragmentación de las biomoléculas. Entre los efectos más importantes de la formalina, se ha demostrado la producción de entrecruzamientos entre ácidos nucleicos y proteínas¹⁹, la hidrolización de los puentes fosfodiéster del ADN²⁰ y la modificación covalente del ARN con adición de grupos metilos en las bases²¹.

A pesar de todo lo señalado, un número importante de reportes han demostrado, que es posible obtener cantidades suficientes de ADN, ARN y proteínas, para estudios de genómica, transcrip-tómica y metabolómica, algunos de acentuada sofisticación y complejidad de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina²²⁻²⁴.

Así, las muestras de tejidos almacenadas históricamente en los servicios de Anatomía Patológica, a pesar de haber sido sometidas a severas condiciones, están siendo cada vez más utilizadas en investigación molecular. Sin dudas, se requieren modificaciones en el manejo y procesamiento de este tipo de muestras en nuestro medio, a fin de mejorar su calidad y su potencial uso en investigación.

En el caso del cáncer vesicular, existen muchas particularidades propias y que lo hacen diferente a cualquier otro proceso carcino-genético (litiasis e inflamación), cuyo estudio a nivel molecular podría permitir mejorar la comprensión acerca de la carcinogénesis en el ser humano.

Podemos concluir que las muestras de colecistectomías en las que se demuestra un cáncer y que se encuentran almacenados en los servicios de Anatomía Patológica en nuestro país, son potencialmente utilizables para técnicas de biología molecular, dándole una nueva oportunidad a un valioso material a nuestro alcance, para el estudio y caracterización de los tumores malignos de mayor importancia en nuestra población.

Referencias

1. <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/72205a1420599f92e04001011f016d02.pdf>. 2010.
2. Andia ME, Hsing AW, Andreotti G, Ferreccio C. Geographic variation of gallbladder cancer mortality and risk factors in Chile: a population-based ecologic study. *Int J Cancer* 2008; 123 (6): 1411-6.
3. Luo Y, Wang L, Wang J. Developing proteomics-based biomarkers for colorectal neoplasms for clinical practice: Opportunities and challenges. *Proteomics Clin Appl* 2012; 7 (1-2): 30-41.
4. Aisner DL, Marshall CB. Molecular pathology of non-small cell lung cancer: a practical guide. *Am J Clin Pathol* 2012; 138 (3): 332-46.
5. Fuksa L, Micuda S, Grim J, Ryska A, Hornychova H. Predictive biomarkers in breast cancer: their value in neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Invest* 2012; 30 (9): 663-78.
6. Eslick GD. Epidemiology of gallbladder cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39 (2): 307-30.
7. Randi G, Malvezzi M, Levi F, Ferlay J, Negri E, Franceschi S, et al. Epidemiology of biliary tract cancers: an update. *Ann Oncol* 2009; 20 (1): 146-59.
8. Shaffer EA. Epidemiology and risk factors for gallstone disease: has the paradigm changed in the 21st century? *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7 (2): 132-40.
9. Marino D, Leone F, Cavalloni G, Cagnazzo C, Aglietta M. Biliary tract carcinomas: From chemotherapy to targeted therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 85 (2): 136-48.
10. Jensen LH. Biliary-tract cancer: improving therapy by adding molecularly targeted agents. *Lancet Oncol* 2012; 13 (2): 118-9.
11. Maurya SK, Tewari M, Mishra RR, Shukla HS. Genetic aberrations in gallbladder cancer. *Surg Oncol* 2012; 21 (1): 37-43.
12. Jagannath P, Callery M. Molecular prognostic markers in gallbladder carcinoma. *HPB (Oxford)* 2012; 14 (9): 571-2.
13. Andrén-Sandberg A. Molecular biology of gallbladder cancer: potential clinical implications 10.4103/1947-2714.101979. *N Am J Med Sci* 2012; 4 (10): 435-41.
14. Mazer LM, Losada HF, Chaudhry RM, Velázquez-Ramírez GA, Donohue JH, Kooby DA, et al. Tumor characteristics and survival analysis of incidental versus suspected gallbladder carcinoma. *J Gastrointest Surg* 2012; 16 (7): 1311-7.
15. de Aretxabala X, Roa I, Burgos L, Losada H, Roa JC, Mora J, et al. Gallbladder cancer: an analysis of a series of 139 patients with invasion restricted to the subserosal layer. *J Gastrointest Surg* 2006; 10 (2): 186-92.
16. Wang Q, Zhang J, Chen TY, Chen ZW, Chen MB, Lineaweaver WC, et al. DNA degradation in nuclei of muscle cells followed by ischemic injury in a rabbit amputation model. *Microsurgery* 2006; 26 (5): 391-5.

17. Parker MD, Chambers PA, Lodge JB, Pratt JR. Ischemia-reperfusion injury and its influence on the epigenetic modification of the donor kidney genome. *Transplantation* 2008; 86 (12): 1818-23.
18. Portier BP, Wang Z, Downs-Kelly E, Rowe JJ, Patil D, Lanigan C, et al. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2013; 26 (1): 1-9.
19. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* 1999; 27 (22): 4436-43.
20. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1991; 39 (3): 351-4.
21. Feldman MY. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1973; 13: 1-49.
22. Deshpande V, Nduaguba A, Zimmerman SM, Kehoe SM, Macconnaill LE, Lauwers GY, et al. Mutational profiling reveals PIK3CA mutations in gallbladder carcinoma. *BMC Cancer* 2011; 11: 60.
23. Shafizadeh N, Grenert JP, Sahai V, Kakar S. Epidermal growth factor receptor and HER-2/neu status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in adenocarcinomas of the biliary tree and gallbladder. *Hum Pathol* 2010; 41 (4): 485-92.
24. Ooi A, Suzuki S, Nakazawa K, Itakura J, Imoto I, Nakamura H, et al. Gene amplification of Myc and its coamplification with ERBB2 and EGFR in gallbladder adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2009; 29 (1): 19-26.