

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**Biosensado de las mutaciones en el oncogen KRAS en  
pacientes con cáncer de colón basado en la  
amplificación bloqueada**

**TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA**

**ALUMNO:** Carlos Soler del Valle

**TUTOR:** Luis Antonio Tortajada Genaro

**Curso Académico: 2015/2016**

**Valencia, Julio 2016**



## Datos personales

Nombre y apellidos: Carlos Soler del Valle

## Datos del trabajo fin de grado

Título: Biosensado de las mutaciones en el oncogen KRAS en pacientes con cáncer de colón basado en la amplificación bloqueada.

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor/a (académico): Luis Antonio Tortajada Genaro

Fecha de lectura: Julio 2016

## Resumen

La presencia de mutaciones somáticas en ciertos genes se asocia a una resistencia a los tratamientos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de crecimiento epidermal (EGFR), implicado en el desarrollo del cáncer del colon. Entre el 35 a 42% de los adenomas tienen una mutación en el oncogén KRAS, siendo el análisis mutacional crítico para la selección de pacientes candidatos a recibir terapias basadas en inhibidores de EGFR. Sin embargo, no todos los centros hospitalarios disponen de tecnologías para su análisis debido a su elevado coste y complejidad.

El objetivo de este proyecto es contribuir en el desarrollo de métodos de análisis mutacional basado en una tecnología de biosensado alternativa, que presente unas altas prestaciones de trabajo y una fácil implantación en los laboratorios clínicos. Se seleccionaron las mutaciones en el exón 2 codón 12: c.34G>C (p.G12R), c.34G>T (p.G12C) y c.34G>A (p.G12S), debido a sus elevadas frecuencias. Se estudió el empleo de un agente bloqueante durante la amplificación para el enriquecimiento de los alelos mutados respecto al nativo en las muestras a analizar. Para la detección de los productos formados ADN genómico procedentes de tejidos impregnados en parafina y fijados en formalina, se estudiaron dos tecnologías de hibridación/detección (placas poliestireno/lector de placas y discos DVD/lector DVD). El método propuesto permitió disminuir selectivamente la amplificación de los alelos nativos y permitió establecer un límite de asignación para clasificar al paciente en estudio en el grupo poblacional asociado. Las prestaciones analíticas alcanzadas mostraron el potencial del método desarrollado para su uso en la práctica clínica como herramienta de apoyo en la medicina personalizada.

## Palabras clave

Oncogen KRAS, análisis mutacional, biosensores, cáncer de colon, tejido biopsiado

## Abstract

The presence of somatic mutations in certain genes is associated with resistance to treatment with monoclonal antibodies directed against epidermal growth receptor (EGFR), involved in the development of colon cancer. Between 35-42% of adenomas have a mutation in the oncogene KRAS mutational analysis, being critical for the selection of patients eligible for EGFR inhibitors based therapies. However, not all hospitals are able to afford technologies required due to its high costs and specializations.

The goal of this project is to contribute in the development of mutational analysis methods based on biosensing technologies alternatives, which show high performance and are easy to be implemented in clinical laboratories. Mutations in exon 2 codon 12 were selected: c.34G>C (p.G12R), c.34G>T (p.G12C) y c.34G>A (p.G12S), due to its higher frequencies. The use of a blocking reagent was studied during amplification for enrichment of the mutated alleles relative to wild-type alleles. To detect the product formed, two hybridation/detection technologies were studied (polystyrene plates/plate detector and DVD disk/DVD detector). The proposed method achieved to enrich mutant alleles and allowed to establish a discrimination limit to classify patients in their population group associated. The analytical performance achieved showed the potential of the method developed for use in clinical practice as a support tool in personalized medicine.

## Key words

Oncogene KRAS, mutational analysis, biosensors, colon cancer, biopsy tissue

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradecer a Ángel Maquieira por mi incorporación al Departamento de Química, y un especial agradecimiento para Luis Antonio Tortajada Genaro, por haber confiado en mí, haberme dado la oportunidad de desarrollar un trabajo de gran interés para mí y, sobre todo, por su dedicación al proyecto.

Por otro lado, quisiera agradecer a todos los integrantes del Departamento de Química por su amabilidad y el ambiente que han ofrecido en todo momento en el laboratorio. En concreto, agradecer la especial atención que ha tenido Eric, gracias por ayudarme en todos los momentos que te he necesitado y por apoyarme en aquellos momentos malos.

Finalmente agradecer, cómo no, a mi familia por la oportunidad que me han dado, por creer siempre en mí, por el apoyo que me han ofrecido y por ser una familia maravillosa.

No acaban aquí mis agradecimientos sin mencionar al apoyo más grande. Gracias por haberme comprendido, por los sacrificios que haces por mí, pero te estaré eternamente agradecido por ser como eres. Sabes que sin ti no hubiera conseguido nada de esto, mil gracias cariño.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I.I. ¿QUÉ ES EL CÁNCER COLORRECTAL?	1
I.II. BIOMARCADORES EN CÁNCER COLORRECTAL	1
I.III. MUTACIONES EN EL GEN KRAS	2
a) Tipos y frecuencias de las mutaciones	2
b) Implicaciones clínicas	3
I.IV. TECNOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO DE KRAS	4
a) Secuenciación	4
b) HRM	5
c) SSCP/DGGE	5
d) SNAPshot	6
e) Digital PCR	6
f) Micromatrices	6
g) Métodos de enriquecimiento de alelos mutantes	6
h) Comparación de los métodos de análisis	8
I.VI. IMPLEMENTACIÓN EN LABORATORIOS CLÍNICOS	9
a) Métodos comerciales	9
b) Método alternativo	10
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
III.I. RECLUTAMIENTO DE MUESTRAS	13
III.II. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	13
III.III. AMPLIFICACIÓN	13
III.IV. CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN	14
III.V. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	14
III.VI. DETECCIÓN EN PLACA	15
III.VII. DETECCIÓN EN DVD	15
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>16</b>
IV.I. OPTIMIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN KRAS	16
IV.II. EVALUACIÓN DEL AGENTE BLOQUEANTE	17
a) Evaluación del solapamiento	17
b) Efecto de la concentración	20
IV.III. COMPARACIÓN DE FORMATOS DE ANÁLISIS DEL GEN KRAS	22
IV.IV. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO BASADO EN HIBRIDACIÓN	24
a) Condiciones de hibridación selectiva	24
b) Prestaciones analíticas	26
IV.V. APLICACIÓN CLÍNICA	27
a) Análisis de muestras de pacientes	27
b) Comparación con otras tecnologías	28
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>31</b>
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>32</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Nuevos casos de cáncer en Estados Unidos. Figura elaborada a partir de los datos de obtenidos de Siegel, Miller, & Jemal, 2016.-----	1
<b>Figura 2.</b> Esquema de actuación de la proteínas KRAS a través de la señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Normanno et al., 2009). P: phosphate; GRB2: growth factor receptor-bound protein 2; SHC: src homology 2 domain containing; SOS: son of sevenless; GTP: guanine nucleotide triphosphate; GDP: guanine nucleotide diphosphate; GAPs: GTPase Activating Protein; GNEFs: guanine nucleotide exchange factor. -----	2
<b>Figura 3.</b> Representación de las mutaciones sin sentido ocurrentes en el exón 2 posición 34 con respecto al total de mutaciones simples (38.169) para 191.656 muestras testadas (datos obtenidos de COSMIC). A: adenina, Arg: arginina, C: citosina, Cys: cisteína, Gly: glicina, Ser: serina, T: timina.	3
<b>Figura 4.</b> Esquema de bloqueo de la región extracelular de EGFR por parte de cetuximab y panitumumab (Normanno et al., 2009).-----	4
<b>Figura 5.</b> Esquema general de las estrategias de bloqueo, permitiendo la amplificación selectiva de los alelos mutados -----	7
<b>Figura 6.</b> Esquema del procedimiento de la metodología propuesta. -----	11
<b>Figura 7.</b> Señal de fluorescencia de la amplificación variando la temperatura de anillamiento (3 réplicas). -----	16
<b>Figura 8.</b> Señal de fluorescencia de la amplificación para distintas concentraciones de los cebadores directo y reverso (3 réplicas).-----	17
<b>Figura 9.</b> Esquema del método de enriquecimiento de los alelos mutantes. a) alelo nativo b) alelo mutante (c.34G>T). Etapas: 1) Apertura del ADN molde. 2) anillamiento de cebadores y agente bloqueante. 3) etapa de elongación durante PCR. CD: cebador directo, CR: cebador reverso, AB: agente bloqueante. -----	18
<b>Figura 10.</b> Esquema de la amplificación mediante la diferente combinación de cebadores. 1) zona de anillamiento de cada cebador. 2) solapamiento existente en 2 nucleótidos entre el cebador CDi y el agente bloqueante. 3) diferentes productos de amplificación generados según la combinación de cebadores (a-d). La incorporación de agente bloqueante impediría la formación de los productos c y d como consecuencia del solapamiento con el cebador CDi. CDi: cebador directo interno, CDe: cebador directo externo, CRi: cebador reverso interno, CRe: cebador reverso externo, nt: nucleótido. -----	18
<b>Figura 11.</b> Señal de fluorescencia de la amplificación para distintas combinaciones de cebadores, sin y con adición de agente bloqueante (2 réplicas). -----	19
<b>Figura 12.</b> Gel de electroforesis para distintos productos de amplificación, con y sin adición de agente bloqueante (100 nM). Pocillo 1: marcador de pesos moleculares. Pocillos 2 y 3: control negativo y producto 175 pb. Pocillos 4, 5 y 6: control negativo, producto 178 pb (con bloqueante) y producto 178 pb. Pocillos 7, 8 y 9: control negativo, producto 107 pb (con bloqueante) y producto 107 pb. Pocillos 10, 11 y 12: control negativo, producto 124 pb (con bloqueante) y producto 124 pb. Pocillos 13, 14 y 15: control negativo, producto 161 bp (con bloqueante) y producto 161 pb. -----	19
<b>Figura 13.</b> Señal de fluorescencia de la amplificación para distintas concentraciones de agente bloqueante (5 réplicas).-----	20
<b>Figura 14.</b> Cocientes de la señal de fluorescencia de la amplificación de alelo mutante respecto al alelo nativo para distintas concentraciones de agente bloqueante (2 réplicas). -----	21
<b>Figura 15.</b> Gel de electroforesis en agarosa para productos de amplificación de alelo nativo y mutante. Pocillo 1: marcador de pesos moleculares Pocillos 2 y 3: alelo nativo (100 nM), 4 y 5: alelo mutante (100 nM), 6 y 7: alelo nativo (0 nM), 8 y 9: alelo mutante (0 nM). Alelo nativo-Paciente 1 (c.34G). Alelo mutante-Paciente (c.34G>T).-----	21
<b>Figura 16.</b> Formatos de hibridación propuestos para el análisis mutacional del gen KRAS. a) formato placa con lectura por absorbancia. b) formato DVD con lectura por reflexión. -----	23
<b>Figura 17.</b> Tecnología basada en DVD desarrollada por el instituto de investigación IDM. -----	23

<b>Figura 18.</b> Respuestas registradas para el análisis del gen COMT (referencia) y gen KRAS a distintos tiempos. A) plataforma placa. B) plataforma DVD (SNR: cociente señal-ruido). -----	24
<b>Figura 19.</b> Cociente de las señales correspondientes a las sondas del genotipo nativo (c.34G) y genotipo mutante (c.34G>C; c.34G>A; c.34G>T). a) Diferentes concentraciones de SSC (formamida 5 %; 3 réplicas). b) Diferentes concentraciones de formamida (SSC 3 X; 3 réplicas) -----	24
<b>Figura 20.</b> Cociente de las señales correspondientes a las sondas del genotipo nativo (c.34G) y genotipo mutante (c.34G>C; c.34G>A; c.34G>T) para diferentes concentraciones de anticuerpo secundario (2 réplicas). -----	25
<b>Figura 21.</b> Imagen capturada del ensayo en DVD para un voluntario nativo. a) Sin incorporación de agente bloqueante. b) Con incorporación de agente bloqueante (100 nM). CH: control de hibridación. CE: control endógeno. CN: control negativo. -----	26
<b>Figura 22.</b> Señales obtenidas para cada sonda tras la hibridación de extractos de 7 pacientes nativos. Concentración de agente bloqueante 100 nM (3 réplicas).-----	26
<b>Figura 23.</b> Señal obtenida para la sonda c.34G, tras la hibridación de diferentes diluciones del producto de amplificación de un individuo nativo (4 réplicas). -----	27
<b>Figura 24.</b> Factores de discriminación obtenidos a partir de las muestras de los pacientes. -----	28

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción de las mutaciones en la primera base del codón 12 (datos obtenidos de COSMIC). Las frecuencias están basadas respecto a la cantidad total de muestras de carcinoma de colon y recto que poseen mutación. -----	3
<b>Tabla 2.</b> Comparación de los principales métodos empleados para el análisis de KRAS. -----	8
<b>Tabla 3.</b> Comparación de los principales métodos de enriquecimiento de alelos mutantes. -----	9
<b>Tabla 4.</b> Comparación de los principales métodos para el análisis KRAS aprobados y disponibles en Europa (Van Krieken <i>et al.</i> , 2015).-----	9
<b>Tabla 5.</b> Reactivos utilizados en la reacción de amplificación.-----	14
<b>Tabla 6.</b> Sondas empleadas como reactivos para su inmovilización mediante estreptavidina. -----	14
<b>Tabla 8.</b> Número de copias obtenidas tras el método de enriquecimiento mediante agente bloqueante (100 nM).-----	22
<b>Tabla 9.</b> Estimación del tiempo de análisis de la metodología propuesta. -----	27
<b>Tabla 10.</b> Comparación de técnicas de análisis mutacional para el gen KRAS con la metodología propuesta.-----	29

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**CEL I:** Celery extract I. Extracto de Celery I.

**COMT:** Catecol-O-metiltransferasa.

**dUTP:** desoxiuridín trifosfato.

**EGFR:** epidermal growth factor receptor. Receptor del factor de crecimiento epidermal.

**EndoV:** Endonuclease V. Endonucleasa V.

**GDP:** guanosín difosfato.

**GTP:** guanosín trifosfato.

**KRAS:** Kirsten rat sarcoma viral oncogene. Homólogo del oncogén viral del sarcoma de la rata Kirsten.

**LB:** loading buffer. Tampón de carga.

**MutS:** Mutator S. Mutador S.

**MutY:** Mutator Y. Mutador Y.

**PBST:** phosphate buffered saline with 0,05 % (v/v) Tween 20. Tampón fosfato salino con 0,05 % (v/v) Tween 20.

**PCR:** polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.

**ppm:** partes por millón.

**PspGI:** Pyrococcus sp. GI-H.

**SNAPSHOT:** single nucleotide primer extension. Extensión del cebador de un único nucleótido.

**SNR:** cociente señal-ruido.

**SSC:** saline sodium citrate. Citrato de sodio salino.

**TAQ polymerase:** *Thermococcus aquaticus* polimerasa.

**TBE:** Tris Borate EDTA. Tris Borato EDTA.

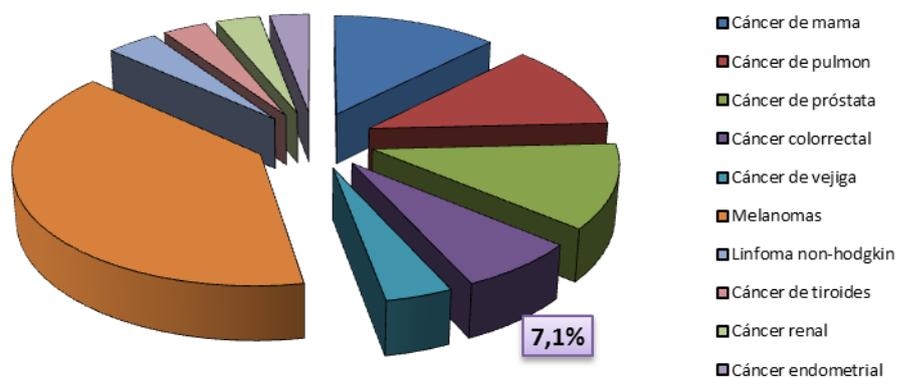
**TDG:** thermostable thymine DNA glycosylase. Timina termoestable ADN glicosilasa.

**TMB:** 3,3',5,5' tetrametilbenzidina.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.I. ¿Qué es el cáncer colorrectal?

El cáncer colorrectal es un tipo de cáncer que comienza en el colon o en el recto, partes del aparato digestivo, cuya función es la absorción de agua y nutrientes de los alimentos y almacenaje de los desechos (materia fecal). Este tipo de cáncer comienza a menudo como un crecimiento que se llama pólipo, que se puede formar en la pared interna del colon o el recto, siendo en gran mayoría adenocarcinomas. Es una de las enfermedades humanas más comunes con más de 100.000 casos/año en Estados Unidos y Europa, siendo el cuarto tipo más común de cáncer (figura 1), representando más del 7 % de nuevos casos de cáncer.



**Figura 1.** Nuevos casos de cáncer en Estados Unidos. Figura elaborada a partir de los datos de obtenidos de SIEGEL, MILLER, & JEMAL, 2016.

### I.II. Biomarcadores en cáncer colorrectal

Actualmente, gracias a los avances en campos como la genética y metabolómica, se ha abierto la posibilidad a lo que se conoce como “Medicina Personalizada”, es un nuevo abordaje que busca adaptar un tratamiento específico a pacientes con particularidades individuales. Para proporcionar tratamientos eficaces a pacientes que realmente se benefician de ellos y limitar los efectos adversos, se realiza la identificación de grupos a través de “biomarcadores”. Los biomarcadores son moléculas que pueden aportar información específica para cada paciente sobre la detección de la enfermedad (diagnóstico), su seguimiento o sobre los fármacos con mayor probabilidad de respuesta en su caso.

Actualmente, el antígeno carcinoembrionario es el único biomarcador diagnóstico. Los genes codificantes para ciertas enzimas hepáticas se utilizan como biomarcadores farmacológicos, puesto que intervienen en el metabolismo de diversos agentes utilizados para combatir el cáncer, como es el caso de la dihidropiridimina deshidrogenasa para el agente 5-fluorouracilo o la uridina difosfato-glucuronosiltransferasa 1A para Irinotecan. Por otro lado, el estado mutacional de gen BRAF es utilizado como biomarcador pronóstico, asociando diversas mutaciones en este gen con un factor de mal pronóstico de la enfermedad (NEWTON *et al.*, 2011).

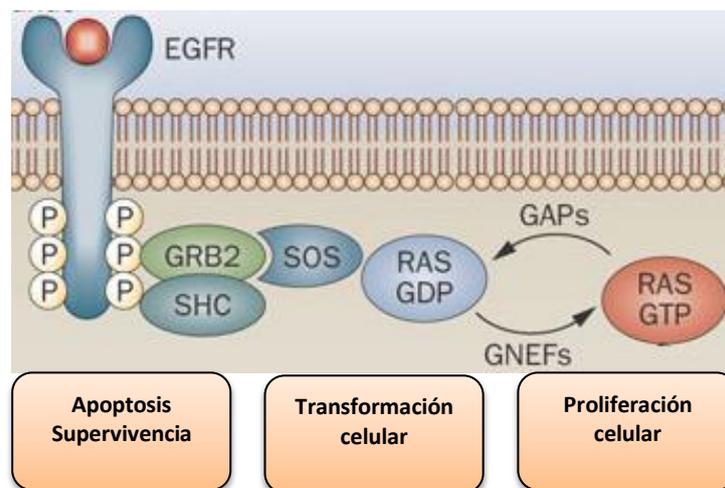
El estado mutacional del gen KRAS es un biomarcador predictivo clave en la práctica de la oncología diaria. La evaluación del estado mutacional se emplea para determinar si el

tratamiento con la terapia dirigida con anti-EGFRs como cetuximab o panitumumab, es indicado para el paciente en estudio (NEWTON *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ-LOSA *et al.*, 2012).

### I.III. Mutaciones en el gen KRAS

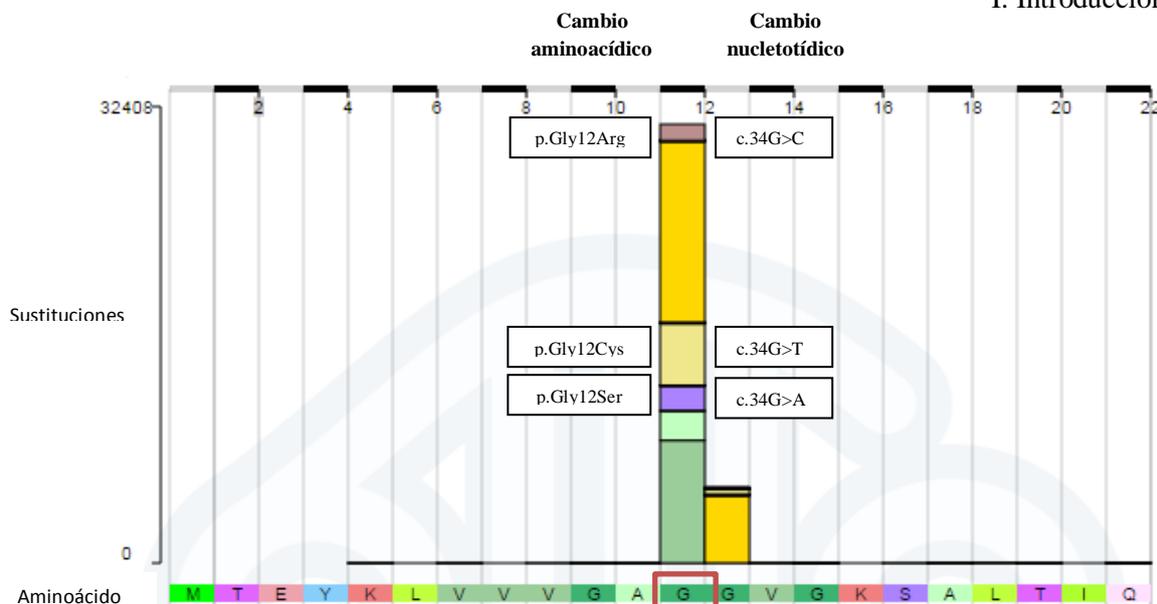
#### a) Tipos y frecuencias de las mutaciones

KRAS (homólogo del oncogén viral del sarcoma de la rata Kirsten) se trata de un gen localizado en 12p12.1, de aproximadamente 38 kb con 6 exones, el cual codifica una proteína de 188 aminoácidos con un peso molecular de 21,3 kDa (datos obtenidos de la base de datos del NCBI, 2016; NG\_007524.1). La proteína participa en la vía de señalización a través del receptor del factor de crecimiento epidermal (figura 2).



**Figura 2.** Esquema de actuación de la proteínas KRAS a través de la señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (NORMANNO *et al.*, 2009). P: phosphate; GRB2: growth factor receptor-bound protein 2; SHC: src homology 2 domain containing; SOS: son of sevenless; GTP: guanine nucleotide triphosphate; GDP: guanine nucleotide diphosphate; GAPs: GTPase Activating Protein; GNEFs: guanine nucleotide exchange factor.

Existen una gran cantidad de mutaciones en este gen, según los datos obtenidos del Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer (COSMIC), siendo las frecuencias 30 % y 33 % de muestras de carcinomas de colon y recto respectivamente. Dentro de estas mutaciones, alrededor del 80 % corresponden con sustituciones nucleotídicas (figura 3). No obstante, mutaciones concretas en diversas posiciones como en los codones 12 y 13, las cuales mantienen a KRAS activo constitutivamente, juegan un importante papel como biomarcadores en pacientes con carcinoma colorrectal, dado que su análisis proporciona información sobre la progresión tumoral, la supervivencia de los pacientes e influye en la respuesta a terapias dirigidas anti-EGFR (JANČÍK, DRÁBEK, RADZIOCH & HAJDÚCH, 2010). Entre estas sustituciones nucleotídicas, encontramos las sustituciones sin sentido en la primera base del codón 12; c.34G>A, c.34G>C, c.34G>T (tabla 1) las cuales producen cambios aminoácidos clave para el funcionamiento de la proteína KRAS.



**Figura 3.** Representación de las mutaciones sin sentido ocurrientes en el exón 2 posición 34 con respecto al total de mutaciones simples (38.169) para 191.656 muestras testadas (datos obtenidos de COSMIC). A: adenina, Arg: arginina, C: citosina, Cys: cisteína, Gly: glicina, Ser: serina, T: timina.

**Tabla 1.** Descripción de las mutaciones en la primera base del codón 12 (datos obtenidos de COSMIC). Las frecuencias están basadas respecto a la cantidad total de muestras de carcinoma de colon y recto que poseen mutación.

Mutación	Cambio aa	Tipo	Secuencia	Frecuencia (%)	COSMIC ID
c.34G>A	p.G12S	Sin sentido	<u>A</u> GTGGC	4,86	COSM517
c.34G>C	p.G12R	Sin sentido	<u>C</u> GTGGC	5,46	COSM518
c.34G>T	p.G12C	Sin sentido	<u>T</u> GTGGC	11,96	COSM516

aa: aminoácido.

Estudios recientes han demostrado que además de las mutaciones en los codones 12 y 13, las mutaciones en los codones 19, 61, 117, 146 y 164 serían interesantes de testar, ya que podrían influir en la respuesta a terapias anti-EGFR (SMITH *et al.*, 2010).

### b) Implicaciones clínicas

Las vías de señalización del EGFR están implicadas en el control de la supervivencia de las células, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la migración celular y la invasión celular/metástasis, por lo que una de las terapias oncológicas es el bloqueo de este receptor. Con este fin, se emplean anticuerpos monoclonales cuya diana molecular es la porción externa del receptor EGFR (figura 4), como son cetuximab y panituximab, impidiendo así que este receptor sea activado.

La proteína KRAS realiza su función en la cascada de transducción a partir del receptor EGFR. La unión de GTP a KRAS, produce un cambio conformacional en la proteína permitiendo que actúe sobre más de 20 efectores downstream, los cuales intervienen en numerosos acontecimientos como son la supresión de la apoptosis, la estimulación del crecimiento celular, angiogénesis, migración y diferenciación (RAJALINGAM *et al.*, 2007). KRAS se encuentra en estado activo cuando está unido a GTP y se encuentra en estado inactivo al estar ligado a GDP. La unión de GTP a KRAS es promovida por las proteínas factores de intercambio del nucleótido guanina, mientras que KRAS posee actividad GTPasa intrínseca. Las mutaciones sobre el gen KRAS, sobre todo en los residuos aminoacídicos 12, 13 y 61,

disminuyen la actividad GTPasa intrínseca de KRAS, lo cual resulta en una activación constitutiva del mismo (JANČÍK *et al.*, 2010). Debido a que KRAS actúa downstream al receptor EGFR las terapias anti-EGFR resultan ineficaces para aquellos individuos que posean mutaciones que hacen que permanezca la proteína KRAS activa. En diversos estudios se ha demostrado que el estado de la mutación de KRAS es predictivo para la respuesta a cetuximab (LIÈVRE *et al.*, 2006), así como para panitumumab (AMADO *et al.*, 2008)

Tanto la Sociedad Europea para la Oncología Médica (ESMO), la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO), la Red Nacional Comprensiva del Cáncer (NCCN) como la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) recomiendan la realización de un test previo de mutaciones en el gen KRAS en pacientes con cáncer colorrectal metastásico para predecir la respuesta al tratamiento con anti-EGFRs (EMA.EUROPA.EU, 2016; NCCN.ORG, 2016)

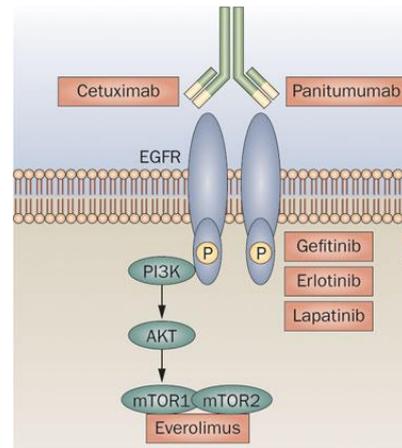
#### ***1.IV. Tecnologías para el análisis genético de KRAS***

Debido a que el análisis mutacional del gen KRAS en los codones 12 y 13 se ha convertido en una práctica estándar antes del tratamiento mediante terapia anti-EGFR, es importante poseer análisis clínicos que sean fiables, rápidos y económicos para la detección de estas mutaciones (PINTO *et al.*, 2011).

Más de 60 tecnologías han sido utilizadas para el análisis genético de KRAS, la mayoría de ellas se pueden clasificar dentro de las categorías de secuenciación, análisis de alta resolución de fusión (HRM), polimorfismos en la conformación de hebras monocatenarias (SSCP), electroforesis en gel gradiente desnaturizante (DGGE), cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante (DHPLC), SNaPshot, análisis mediante micromatrices y PCR alelo específica (tabla 2), así como una serie de kits comerciales aprobados para el diagnóstico in vitro. Todas estas técnicas se han aplicado en el análisis clínico de KRAS, cada una posee sus propias características, con sus ventajas y desventajas pertinentes (SHACKELFORD *et al.*, 2012).

##### *a) Secuenciación*

El método de secuenciación por Sanger, es un método comúnmente utilizado en los análisis mutacionales de KRAS. De hecho, es considerada como la técnica gold-standard por muchos investigadores, debido a su capacidad de identificar todas las pares de bases mutadas, por lo que es ampliamente utilizada para confirmar los resultados obtenidos mediante otras técnicas tales como HRM, SSCP y DGGE, las cuales no pueden identificar los cambios en las bases específicas (PINTO *et al.*, 2011; SHACKELFORD *et al.*, 2012). No obstante, su límite de detección es relativamente modesto comparado con otras técnicas de análisis. Diversos estudios han demostrado que la secuenciación por Sanger requiere al menos que el 15-50 % del ADN muestra sea de KRAS mutante para una detección fiable, lo cual es insuficiente para muestras clínicas con bajos niveles de células tumorales o de ADN (WEICHERT *et al.*, 2010). Se ha demostrado que este método posee menos sensibilidad en la detección de sustituciones en bases de la primera posición del codón 12 comparado con otras sustituciones (SHACKELFORD *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Esquema de bloqueo de la región extracelular de EGFR por parte de cetuximab y panitumumab (NORMANNO *et al.*, 2009).

La llegada de las técnicas de secuenciación de siguiente generación ha conseguido mejorar el límite de detección de las técnicas de secuenciación hasta un 1-5 %, además permite el screening de un gran número de pacientes a partir de una cantidad de ADN limitada (VAN KRIEKEN *et al.*, 2015). Sin embargo, requieren de la validación del procedimiento así como de controles internos para valorar la reproducibilidad, ya que usan algoritmos específicos para valorar la calidad de cada lectura alineando la secuencia con un genoma de referencia y, consecuentemente perdiendo la detección de algunas mutaciones. Con lo que respecta a la secuenciación basada en pirosecuenciación, el mayor límite de los mismos es la capacidad de secuenciación, ya que sólo es capaz de secuenciar aproximadamente de 40 a 50 bases, además posee dificultades en realizar medidas precisas en repeticiones de homopolímeros mayores a 5 nucleótidos. Una variedad de estudios han demostrado que el límite de detección mediante esta técnica se encuentra aproximadamente entre el 1,25 % y el 6 % de ADN mutante (VAN KRIEKEN *et al.*, 2015).

En general los métodos de secuenciación ofrecen resultados modestos, son tecnologías que carecen de suficiente sensibilidad para algunas muestras clínicas y requieren elevados tiempos de realización (VAN KRIEKEN *et al.*, 2015). Existen estudios que se han centrado en mejorar esta sensibilidad pero todavía no alcanzan los niveles conseguidos mediante tecnología de micromatrices o análisis de PCR alelo específica (SHACKELFORD *et al.*, 2012).

### *b) HRM*

Los métodos basados en el análisis de alta resolución de fusión (HRM) se han usado para el análisis mutacional de KRAS. Se compara la desnaturalización de la doble cadena de ADN y las concomitantes, con menores intensidades de emisión fluorescente, en cada temperatura, diferenciando las secuencias mutantes de las nativas (FRANKLIN *et al.*, 2010). El límite de detección de esta técnica está en el rango de 3 al 10 % de ADN mutante con ADN nativo. HRM es un método con buena relación coste/efectividad y adecuado para el análisis clínico. Por ello, es un método recomendado para análisis de alto rendimiento (SHACKELFORD *et al.*, 2012).

Para muestras sumergidas en parafina, HRM ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 88 % y 80 % respectivamente (SHACKELFORD *et al.*, 2012). Sin embargo, en otros estudios mostraron una especificidad del 61 % (FRANKLIN *et al.*, 2010), ya que resulta una técnica fiable cuando se usa ADN genómico, pero posee grandes dificultades a la hora de trabajar con muestras de tejido. Debido a que no proporciona información sobre la mutación, y a la baja fiabilidad a la hora de analizar muestras de tejidos, se recomienda que los resultados positivos de HRM sean confirmados mediante secuenciación o mediante análisis por PCR alelo específica. Además, se ha demostrado que es necesaria la presencia de al menos de 3-10 % de células mutadas en la muestra para la detección de las mutaciones mediante HRM (SHACKELFORD *et al.*, 2012).

### *c) SSCP/DGGE*

Las metodologías basadas en migración en gel de electroforesis como son los polimorfismos en la conformación de hebras monocatenarias (SSCP) y la electroforesis en gel gradiente desnaturalizante (DGGE), son menos empleados que otros métodos para el análisis de KRAS. Mediante SSCP, se identifica el ADN mutante por la distinta capacidad de formar estructuras secundarias y terciarias por parte del ADN de simple cadena mutante, poseyendo diferente patrón de migración en el gel de electroforesis comparado con el nativo. Mientras que en el método DGGE, ambos ADN, tanto mutante como nativo, se someten al gel de electroforesis con condiciones de desnaturalización débiles, en las que el ADN con mutaciones

adopta conformaciones tridimensionales más complejas, resultando en una diferente migración en el gel.

Mediante estas tecnologías, la eficiencia en la detección disminuye al incrementar el tamaño del amplicón, siendo muy difícil de realizar para tamaños superiores a 200 bp e imposible para amplicones mayores a 300 bp. Además, como la técnica HRM, SSCP y DGGE no pueden identificar las bases mutadas, por lo que más aún sus resultados deben ser confirmados (SHACKELFORD *et al.*, 2012).

#### *d) SNAPshot*

La química de SNAPshot está basada en la extensión de una única base didesoxi marcada mediante un fluoróforo de un cebador no marcado. Posterior a la electroforesis y la detección de la fluorescencia, para los alelos que han incorporado la base, aparecen sus picos de diferente color en el electroferograma. Para un total de 372 muestras analizadas, esta metodología mostró una sensibilidad del 97,5 %. Por el contrario, esta técnica solamente puede detectar una mutación presente en al menos el 5 % de las células de la muestra, lo cual es una clara desventaja a la hora de su aplicación clínica (PINTO *et al.*, 2011).

#### *e) Digital PCR*

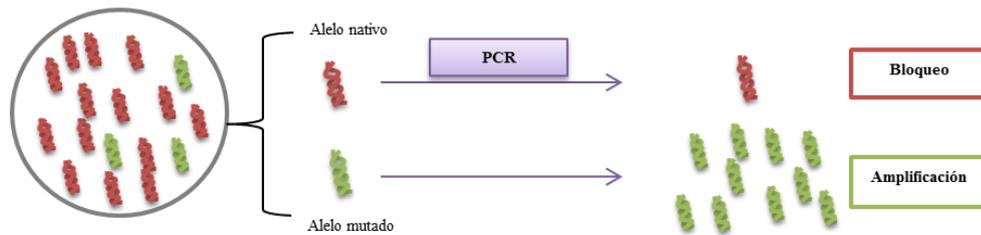
El método de digital PCR (PCR de únicas moléculas) como método de detección, se basa en la amplificación de moléculas individuales de ADN. El ADN se diluye hasta conseguir una molécula de ADN por reacción, permitiendo la detección de un mutante en  $10^3$  alelos nativo en numerosas reacciones de PCR en paralelo y alcanzando límites de detección menores al 0,1 % para mutaciones específicas. Teóricamente a más reacciones más selectividad, sin embargo en la práctica digital PCR está limitada a la ocurrencia de errores en la PCR (MILBURY *et al.*, 2009).

#### *f) Micromatrices*

La tecnología de micromatrices de ADN permite superar la gran mayoría de desventajas de las técnicas anteriores, siendo una técnica con gran capacidad en la aplicación clínica. Esta tecnología, que se basa en la inmovilización de sondas para el biosensado de las muestras de ADN, ofrece bajos costes, alta sensibilidad siendo capaz de detectar 0,01 % de alelos mutados en un fondo de ADN nativo, así como permite un genotipado en paralelo preciso de múltiples marcadores, adecuado para el análisis rutinario en el diagnóstico médico (GALBIATI *et al.*, 2013). Además, ofrece un protocolo simple y rápido, sin necesidad de equipos de laboratorio más allá del estándar (AUSCH *et al.*, 2009), por lo que se estima como una estrategia rápida que ofrece los resultados de los análisis en cortos periodos de tiempo, tal y como es requerido por las EQA comentadas anteriormente (VAN KRIEKEN *et al.*, 2013).

#### *g) Métodos de enriquecimiento de alelos mutantes*

Se ha puesto mucho empeño en el desarrollo de tecnologías basadas en PCR con una selectividad mayor para potenciar la detección de mutaciones somáticas de bajo nivel y alelos minoritarios en un exceso de muestra nativa (figura 5), lo cual resulta una tarea esencial para el análisis mutacional del gen KRAS a partir de muestras embebidas en parafina. La aplicación clínica y los ajustes para el diagnóstico requieren que estas técnicas sean precisas y coste-efectivas, además de que sean fáciles de optimizar, realizar y analizar. Diversas estrategias se han desarrollado siguiendo esta pauta.



**Figura 5.** Esquema general de las estrategias de bloqueo, permitiendo la amplificación selectiva de los alelos mutados

El empleo de enzimas como herramientas para enriquecer alelos mutantes ha tenido una gran aplicabilidad. Un claro ejemplo es el empleo de enzimas de restricción termoestables que cortan selectivamente las muestras de ADN nativo durante la PCR, mostrando una gran sencillez y bajo coste en su aplicación así como una gran selectividad para el enriquecimiento de mutaciones conocidas. La selectividad de estas estrategias es de la detección de un alelo mutante entre  $2,5 \times 10^3$  alelos nativos, alcanzando el orden de  $10^8$  al realizar más de una ronda de enriquecimiento. No obstante, estas enzimas de restricción se pueden emplear bajo un enfoque contrario, digiriendo selectivamente los alelos mutantes para su posterior amplificación, aunque muestran una frecuencia de detección inferior de alelos mutantes en un fondo de  $1,6 \times 10^6$  de alelos nativos. Además del uso de enzimas de restricción, se han usado enzimas que detectan desajustes como MutS, MutY, TDG, EndoV o CEL I. La sensibilidad de estas técnicas depende mucho de la selectividad y eficiencia de las enzimas usadas. En comparación con las endonucleasas de restricción, la selectividad de este tipo de enzimas es mucho menor (MILBURY *et al.*, 2009). La combinación de uno de estos métodos que emplean enzimas con PCR a tiempo real, posee la capacidad de detectar un mutante en un fondo de  $2 \times 10^3$  alelos nativos, pudiendo alcanzar un mutante en  $10^3$  alelos nativos (MILBURY *et al.*, 2009).

Una nueva tecnología para el enriquecimiento muy prometedora es COLD-PCR (coamplificación a baja temperatura de desnaturalización- reacción en cadena de la polimerasa). Esta tecnología se basa en la observación de que a temperaturas próximas a la temperatura de desnaturalización, el porcentaje de desnaturalización es sensible a la secuencia exacta de ADN en la cual mutaciones puntuales generan diferencias sustanciales. COLD-PCR permite la amplificación mediante PCR de los alelos mutados de hasta 100 veces mayor al nativo. Además es una técnica de simple uso, no requiere protocolos extensos o el uso de cebadores alelo específicos, sondas o enzimas. Por el contrario, posee varias desventajas: es necesario un control preciso de la temperatura de desnaturalización durante la PCR (dentro de  $\pm 0.3^\circ\text{C}$ ), está restringida al análisis de secuencias cortas de aproximadamente 200 bp, es vulnerable a errores de la polimerasa y la variabilidad del enriquecimiento de la mutación depende de su posición en el ADN y del tipo de sustitución nucleotídica (LI *et al.*, 2008).

Los ensayos de bloqueo alelo específico en PCR, han sido ampliamente utilizados para la detección de variantes genéticas. Un método que ofrece alta selectividad se basa en el uso combinado de la polimerización activada por pirofosfatos (PAP) y ASA (amplificación específica de alelo). PAP-ASA, utiliza oligonucleótidos alelo específicos ( $P^*$ ), los cuales son activados por pirofosforólisis amplificando el ADN durante la PCR. Este método es capaz de detectar un alelo mutante desde  $10^6$  a  $10^9$  alelos nativos. Sin embargo, esta estrategia no ofrece los resultados teóricos en la práctica, en la cual mostraba resultados de un mutante en  $10^4$  alelos nativo (MILBURY *et al.*, 2009). Por otro lado, existen técnicas que utilizan como agentes bloqueantes oligonucleótidos 3' terminal modificados sin activación por pirofosforólisis. El

diseño de estos agentes puede coincidir con el diseño del cebador, estrategia denominada AS-NEPB-PCR (bloqueo mediante cebadores no extendibles, específico de alelo-reacción en cadena de la polimerasa) o diferir. Bajo esta aproximación se han alcanzado sensibilidades del 0,1 % con un 100 % de especificidad, haciéndolo adecuado para la detección de mutaciones de baja frecuencia, como las que encontramos para el análisis de KRAS (MILBURY *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013).

#### *h) Comparación de los métodos de análisis*

Los métodos empleados para el análisis mutacional del gen KRAS se basan en diferentes principios, pero todos ellos tienen como objetivo la detección de las mutaciones presentes en las células tumorales que se encuentran en las muestras embebidas en parafina. Estos análisis deben ser rápidos, con el objetivo de clasificar al paciente en el menor tiempo posible, y baratos para su implantación en la mayor parte de laboratorios clínicos.

Una de las tecnologías más desarrolladas para este análisis es la de secuenciación. Sin embargo, presenta elevados tiempos para el análisis, así como requiere la presencia de una gran cantidad de alelos mutantes presentes para su detección. Estas dificultades se pueden superar con las tecnologías de HRM, SSCP y DGGE, las cuales pueden obtener los resultados en menos de 24 horas y requieren de una menor cantidad de alelos mutantes presentes en las muestras. No obstante, estas tecnologías no ofrecen la posibilidad de analizar varias muestras en paralelo y requieren de la confirmación de sus resultados mediante secuenciación. La capacidad de testar diferentes muestras en paralelo se pueden alcanzar con las técnicas de digital PCR y micromatrices. El análisis basado en digital PCR, aunque ofrece un gran multiplexado, requiere de termocicladores especiales de gran coste, mientras que los análisis basados en micromatrices, no sólo ofrecen una gran capacidad de multiplexado, sino que permiten la identificación de la base mutada (tabla 2).

**Tabla 2.** Comparación de los principales métodos empleados para el análisis de KRAS.

<b>Técnicas de genotipado</b>	<b>Sensibilidad (% mutado)</b>	<b>Características</b>	<b>Referencia</b>
<i>Método Sanger</i>	15-50	Requiere mayor cantidad de ADN mutado para su detección. Detecta cualquier	PINTO <i>et al.</i> , 2011; SHACKELFORD <i>et al.</i> , 2012
<i>Pirosecuenciación</i>	1,25-6	Requiere equipamiento especial (pirosecuenciador). Problema de lectura de homopolímeros de más de 5 nucleótidos.	SHACKELFORD <i>et al.</i> , 2012
<i>HRM</i>	1(3)-10	Precisa equipamiento específico. Requiere experiencia en biología molecular	PINTO <i>et al.</i> , 2011; SHACKELFORD <i>et al.</i> , 2012
<i>SSCP/DGGE</i>	1	Requiere equipamiento especial. Precisa experiencia en HPLC.	SHACKELFORD <i>et al.</i> , 2012
<i>SNAPshot</i>	5	Alta precisión en los resultados. Flexible a otras mutaciones.	PINTO <i>et al.</i> , 2011
<i>Digital PCR</i>	0,1-10 <sup>-3</sup>	Requiere uso de termocicladores especiales.	MILBURY <i>et al.</i> , 2009
<i>Micromatrices</i>	<0,01	Bajo coste. Sensibilidad adecuada para diagnóstico médico. Resultados rápidos No detecta mutaciones que no son conocidas.	GALBIATI <i>et al.</i> , 2013; MILBURY <i>et al.</i> , 2009; SHACKELFORD <i>et al.</i> , 2012

Las tecnologías existentes tratan de detectar las mutaciones presentes a partir de muestras embebidas en parafina y fijadas en formalina. Sin embargo, la baja presencia de alelos mutantes con respecto a alelos nativos en estas muestras requiere de una alta selectividad no alcanzada por las tecnologías recogidas en la tabla 2. Los métodos de enriquecimiento de alelos mutantes (tabla 3), permiten obtener una mayor selectividad, detectando la presencia de mutaciones en un gran fondo de alelos nativos.

**Tabla 3.** Comparación de los principales métodos de enriquecimiento de alelos mutantes.

Técnicas de genotipado	Sensibilidad (% mutado)	Características	Referencia
<i>Enzimas</i>	4x10 <sup>-4</sup> - 1,6x10 <sup>-6</sup>	Sólo detecta mutaciones que generan lugar de restricción (enzimas de restricción). Sólo detecta mutaciones reconocidas por las enzimas (enzimas que detectan desajustes).	MILBURY et al., 2009
<i>PCR tiempo real</i>	5x10 <sup>-4</sup>	No hay kit comercial. Requiere termociclador de tiempo real.	MILBURY et al., 2009
<i>COLD-PCR</i>	1-0,1	Sólo detecta mutaciones específicas. Requiere amplia experiencia en biología molecular. Se puede asociar con técnicas de secuenciación y pirosecuenciación.	MILBURY et al., 2009
<i>PAP-ASA</i>	10 <sup>-4</sup>	Sensibilidad real menor que la teórica.	MILBURY et al., 2009
<i>Agente bloqueante sin activación</i>	0,1	Sólo detecta mutaciones conocidas Ensayo simple. Adecuado para trabajar en paralelo con varios ensayos de mutaciones.	MILBURY et al., 2009; WANG et al., 2013

## I. VI. Implementación en laboratorios clínicos

### a) Métodos comerciales

La ventaja de los métodos comerciales es el proceso de validación a los que han sido sometidos (están regulados por la Directiva Europea 98/78/CE), por lo que no es necesaria la realización de pruebas adicionales de calidad. Los métodos para el análisis de KRAS, que se encuentran aprobados por la Comisión Europea se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Comparación de los principales métodos para el análisis KRAS aprobados y disponibles en Europa (VAN KRIEKEN *et al.*, 2015).

Método de diagnóstico in vitro	Método de detección	Sensibilidad (% mutado)
CRC RAScan™ (SURVEYOR®/WAVE®)	Cromatografía	2-5
CRC RASseq™	Secuenciación Sanger	5-10
Therascreen® KRAS and NRAS Pyro	Pirosecuenciación	1-7
Agenad OncoCarta™	Espectrometría de masas	5-10
LightMix® NRAS ex2-4 KRAS ex4	HRM	1
Therascreen® KRAS RGQ PCR	PCR tiempo real	1-6
cobas KRAS mutation test	PCR tiempo real	5
Randox biochip array	Hibridación	1
INFINITI® KRAS	Hibridación	-
KRAS StripAssay®	Hibridación	1
EnteroGen® KRAS	PCR tiempo real	<1
LightMix® KRAS codon 12/13	HRM	1
PNAclap™	PCR tiempo real	<1
RealQuality RI-KRASMuST	PCR tiempo real	1

Los métodos que ofrecen una mayor selectividad, por debajo del 1 % de mutado, son EnteroGen® KRAS o PNAclamp™. No obstante, esta selectividad es insuficiente para la cantidad de ADN mutante presente en las muestras embebidas en parafina.

### *b) Método alternativo*

La gran mayoría de las técnicas poseen amplias dificultades para su aplicación clínica, ya sea por un límite de detección insuficiente para las muestras empleadas en la clínica o sus elevados costes limitan solamente a laboratorios de grandes hospitales. Por otro lado, los esquemas de Evaluación Externa de la Calidad (EQA), recomiendan la obtención de los resultados del análisis de KRAS en no más de diez días laborables (VAN KRIEKEN *et al.*, 2013), consiguiendo que los pacientes se beneficien de la mejor estrategia de tratamiento. Estos plazos no son alcanzables por algunas estrategias anteriormente planteadas debido a los extensos protocolos empleados y la baja rentabilidad de analizar pocas muestras. Existe una clara necesidad de desarrollar estrategias que puedan ofrecer los resultados en poco tiempo para que los pacientes se puedan beneficiar del tratamiento más adecuado para cada uno de ellos. Además, es necesario implantar que la técnica sea de fácil acceso sin necesidad de adquirir instrumentación costosa y de gran tamaño. Por otra parte, el análisis mutacional del gen KRAS se realiza a partir de muestras de tejido embebidas en parafina y fijadas en formalina. Estas muestras, pese a que un experto patólogo secciona la región tumoral, poseen una mayor cantidad de ADN perteneciente a alelos nativos respecto a alelos mutantes. Esta mayor presencia de alelos nativos hace que ciertas técnicas actuales den lugar a falsos negativos, por su baja sensibilidad. Por último, la mayoría de técnicas presentan baja multiplexidad, es decir, analizan una única mutación por ensayo. Sin embargo, las guías actuales obligan al análisis de varias mutaciones, e incluso las investigaciones recientes recomiendan aumentar este número.

Se propone, como tecnología alternativa, un método de biosensado basado en hibridación tras un enriquecimiento de los alelos mutantes mediante el empleo de un agente bloqueante (figura 6). Esta metodología cumpliría todos los requisitos demandados para la práctica clínica. Consiste en extraer el ADN de muestras de tejido biopsiadas embebidas en parafina y realizar una técnica de enriquecimiento de los alelos mutantes mediante el empleo de un agente bloqueante 3' modificado en la amplificación, para superar el problema de la baja proporción de alelos mutantes. Una vez se aumenta la proporción de alelos mutantes, los productos amplificados se detectan mediante sondas de ADN, que permiten identificar todas las mutaciones posibles en un único ensayo y clasificar al paciente en el grupo poblacional correspondiente para realizar el tratamiento personalizado.

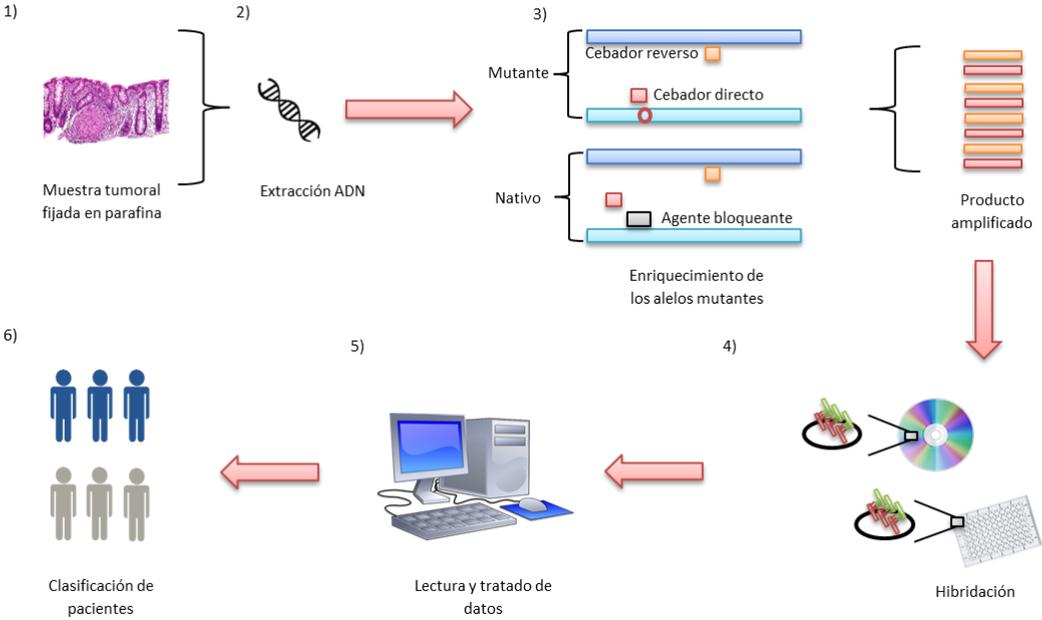


Figura 6. Esquema del procedimiento de la metodología propuesta.

## **II. Objetivos**

En este trabajo fin de grado se pretende poner a punto una técnica para el análisis genético del gen KRAS con el objetivo de clasificar pacientes en función del estado mutacional del primer nucleótido del exón 2, codón 12. El trabajo se centra principalmente en el empleo de un agente bloqueante de la amplificación de los alelos nativos como método de enriquecimiento de los alelos mutantes, para la posterior determinación de las mutaciones por un ensayo selectivo de hibridación.

Para la consecución de este objetivo principal se fijan los siguientes objetivos parciales:

- Lograr la amplificación de la región en estudio
- Optimizar la secuencia y concentración del agente bloqueante.
- Seleccionar el formato de hibridación para realizar el análisis genético.
- Poner a punto las condiciones que permitan la asignación del estado mutacional
- Analizar muestras de individuos voluntarios y pacientes con cáncer colorrectal.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### *III.I. Reclutamiento de muestras*

La obtención de muestras de alelos nativos se realizó a partir de diferentes voluntarios con su correspondiente consentimiento, como regula la declaración de Helsinki ("World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects", 2014). Mientras que las muestras de alelos mutantes se obtuvieron del hospital La Fe a partir de diferentes pacientes que sufren de cáncer colorrectal a los cuales se les ha realizado una biopsia y se ha fijado la muestra en parafina. Este estudio se ha realizado en el contexto del proyecto ONCOMARKER (MINECO RTC-2015-3625-1).

#### *III.II. Extracción de ADN genómico*

La extracción de ADN a partir de las muestras impregnadas en parafina se realizó en el hospital mediante QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen), obteniéndose la extracción de ADN directamente.

Para llevar a cabo la extracción de ADN de los voluntarios (alelos nativos), se empleó la serie PureLink Genomic DNA kits (Invitrogen). Se procedió a seguir el protocolo de extracción de ADN a partir de la lisis de células humanas bucales obtenidas mediante hisopos. Al frotis bucal se añadieron 500  $\mu$ L de PBS (1 X) y 20  $\mu$ L de Proteinasa K. Posteriormente se añadieron 20  $\mu$ L de RNasa, manteniendo la solución a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añadió el mismo volumen de tampón de lisado. Esta disolución se incubó a 55 °C durante 20 minutos agitando cada 5 minutos. Los restos de lisado se recuperaron mediante centrifugación y añadiendo 500  $\mu$ L de etanol (96-100 %). Se añadieron 640  $\mu$ L del lisado recuperado a la columna (PureLink Spin Column), y se centrifugó a 10000 xg durante 1 minuto. Se añadieron 500  $\mu$ L de tampón de lavado 1 y se centrifugó como anteriormente. Se añadieron 500  $\mu$ L de tampón de lavado 2 y se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos. Finalmente se añadieron 25-200  $\mu$ L de tampón de elución, se dejó incubar durante 1 minuto y se recuperó el ADN por centrifugación. Se obtuvo la concentración de ADN (ng/ $\mu$ l), utilizando un espectrofotómetro (NANODROP 2000, Thermo Scientific) a partir de la absorbancia a 260 nm.

#### *III.III. Amplificación*

Se realizó la amplificación a partir de las muestras de ADN genómico de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 5. La reacción se realizó en un termociclador (UNO, VWR®) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, anillamiento a 57 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 60 segundos, finalmente un ciclo de extensión final durante 5 minutos. El empleo de agente bloqueante quedó restringido a las reacciones en las cuales se requirió el bloqueo de la amplificación de la muestra nativa.

**Tabla 5.** Reactivos utilizados en la reacción de amplificación.

Reactivos	Concentración
Tampón 10 X	1 X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3 mM
dNTPs 10 mM	200 µM
Digoxigenina-dUTPs 100 µM	10 µM
Cebador directo 10 µM	300 nM
Cebador reverso 10 µM	300 nM
Bloqueante 10 µM*	100 nM
Taq 1 U/µL	0,5 U
ADN 4 ng/µL	4 ng

El rendimiento de la amplificación se determinó mediante fluorescencia, utilizando el fluoróforo SYBR (intercalante del ADN), diluyendo el producto de amplificación (1:100) en 100 µL. La lectura se realizó mediante un lector de placas multipocillo (Wallac, model Victor 1420 multilabel counter, Finland). Se determinó la presencia de producto de amplificación deseado mediante gel de agarosa (3 %). La electroforesis se llevó a cabo en medio tampón TBE (0,5 X), y los productos de amplificación fueron diluidos (1:2) en tampón de carga. El gel se reveló mediante SYBR (2 X).

#### III.IV. Condiciones de inmovilización

La inmovilización sobre la placa de poliestireno de 96 pocillos (Corning® 96 well plates, Sigma-Aldrich) se realizó mediante incubación (100 µL) de 0,2 ppm de estreptavidina y 20 nM de sonda, durante 12 horas a 37 °C. Finalmente, se lavó con PBST (tampón fosfato salino (PBS) 1X que contiene 0,05 % (v/v) tween 20, pH 7,4) y agua.

La inmovilización de las sondas sobre el DVD se realizó en formato de micromatriz (50 nL, 4 filas × 7 columnas, 4 réplicas/sonda, 20 micromatrices) mediante un dispensador de bajo volumen y sin contacto (AD-1500, Biodot, Irvine, CA). Las condiciones de impresión (tampón carbonato; glicerol (2 %); estreptavidina (10 ppm); sonda (100 nM)), variaron para la sonda del control positivo (tampón carbonato; glicerol (2 %); estreptavidina (5 ppm); sonda (10 nM)) puesto que generaba una señal muy intensa. Una vez realizada la impresión, el disco se dejó incubando 12 horas (4 °C) y se lavó con PBST y agua.

#### III.V. Diseño de oligonucleótidos

Las sondas utilizadas como reactivos se recogen en la tabla 6, todas ellas se encuentran biotiniladas en el extremo 3' para su inmovilización mediante estreptavidina.

**Tabla 6.** Sondas empleadas como reactivos para su inmovilización mediante estreptavidina.

Nombre	Secuencia	Mutación
Control hibridación	BIOTINA-TG-TTTTTTTTTGAACCTTCGCTCACCGCCGATC CTTGGAAGCGAAGTGGCCGGCTAGGTTGTCCCTTCTCTAT-DIG	-
Control endógeno	BIOTINA-TG-TTTTTTTTTTAAGACAGCCGACTGCGTGTGAT	-
c.34G	BIOTINA-TG-TTTTTTTTTT-GTTGGAGCTGGTGCCGTAGGC	WT
c.34G>T	BIOTINA-TG-TTTTTTTTTT-AGTTGGAGCTGTGGCGTAGG	p.G12C
c.34G>A	BIOTINA-TG-TTTTTTTTTT-AGTTGGAGCTAGTGGCGTAGG	p.G12S
c.34G>C	BIOTINA-TG-TTTTTTTTTT-AGTTGGAGCTCGTGGCGTAGG	p.G12R
Control negativo	BIOTINA-TG-TTTTTTTTTT-GCAGTCCCTCCATGATCACGGCCATCA	-

Arg: arginina; Cys: cisteína ;DIG: digoxigenina;Gly: glicina; Ser: serina; WT: nativo

### ***III.VI. Detección en placa***

La placa se lavó 3 veces con PBST más agua destilada. Los productos amplificados (1  $\mu\text{L}$ ) se mezclaron con 99  $\mu\text{L}$  de tampón de hibridación 5 X (SSC, 1 X tampón salino sodio citrato: NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM, pH 7) y se calentaron a 95 °C durante 5 minutos para conseguir la desnaturalización en hebras monocatenarias. Los productos desnaturalizados se dispensaron en cada pocillo de la placa y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C. Tras la incubación y el posterior lavado mediante SSC 0,1 X y SSC 0,01 X, se dispensaron 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de anticuerpo primario de oveja anti-digoxigenina (Sigma-Aldrich, 1 ppm) y un anticuerpo de conejo anti-anticuerpos de oveja acoplado a HRP (peroxidasa de rábano) como secundario (Sigma-Aldrich, 1,75 ppm) en PBST (1:2000) y se dejó incubar durante 25 minutos a temperatura ambiente. Tras el consiguiente lavado mediante PBST y agua destilada, se dispensaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución TMB (0,25 g L<sup>-1</sup> de 3,3',5,5' tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich) y 0,002 M de peróxido de hidrógeno (Scharlab, 35 %) en tampón citrato (pH 5,5) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras la incubación mediante TMB, fue necesario parar la reacción añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de 2,5 M ácido sulfúrico (Scharlab, 90 %). Finalmente, la reacción se midió por absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 650 nm) con un lector de placas multipocillo (Wallac, model Victor 1420 multilabel counter, Finland).

### ***III.VII. Detección en DVD***

Se realizó un primer lavado mediante PBST y agua, para eliminar el exceso de estreptavidina. Se prepararon las disoluciones (50  $\mu\text{L}$ ) para cada producto de amplificación (1:10) en tampón de hibridación SSC 3 X con formamida (Scharlab, 25 %) y Denhardt's (Sigma-Aldrich, 2,5 X). Se incubaron a 95 °C durante 10 minutos y se dispensaron en las micromatrices incubándose durante 1 hora a 37 °C. A continuación se realizó un lavado con SSC (0,1 X) y SSC (0,01 X).

Para el revelado se empleó un anticuerpo primario de oveja anti-digoxigenina (2 ppm) y un anticuerpo de conejo anti-anticuerpos de oveja acoplado a HRP (peroxidasa de rábano) como secundario (2,5 ppm) en PBST (800  $\mu\text{L}$ ), y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un lavado, mediante PBST y agua. Se dispensaron 800  $\mu\text{L}$  del reactivo TMB y se paró la reacción mediante agua transcurridos 1,5 min. La lectura de los resultados se realizó mediante un lector de discos digitales ópticos (Lab-Player), en modo reflexión. Utilizando el programa desarrollado en el grupo de investigación, se procesaron las imágenes de las micromatrices para obtener las intensidades de cada punto corregidas respecto del fondo.

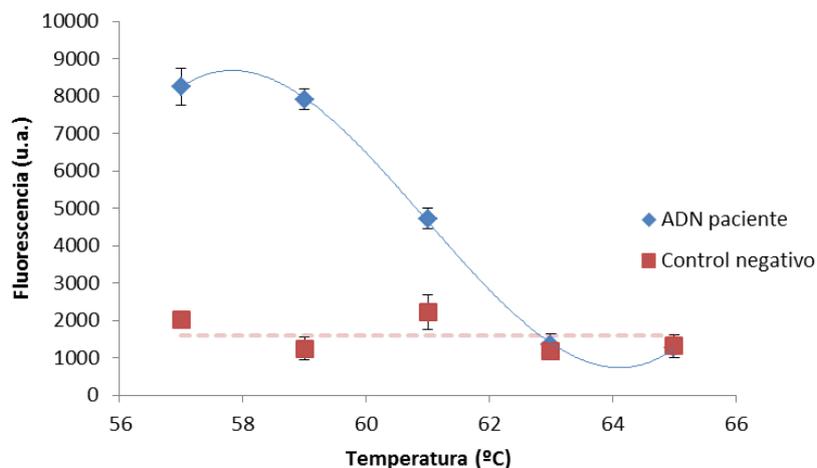
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.I. Optimización de la amplificación del gen KRAS

En la práctica clínica actual, las pruebas del estado mutacional del gen KRAS se llevan a cabo a partir de muestras de tejido impregnadas en parafina y fijadas en formalina. En estas muestras, tanto en su conservación como en el proceso de extracción de ADN, se degrada una gran parte de los ácidos nucleicos que contiene, por lo que es crítica una buena amplificación para poder detectar las mutaciones presentes. Se usó el gen COMT (Catecol-O-metiltransferasa), que se encuentra expresado constitutivamente, como control endógeno del ensayo.

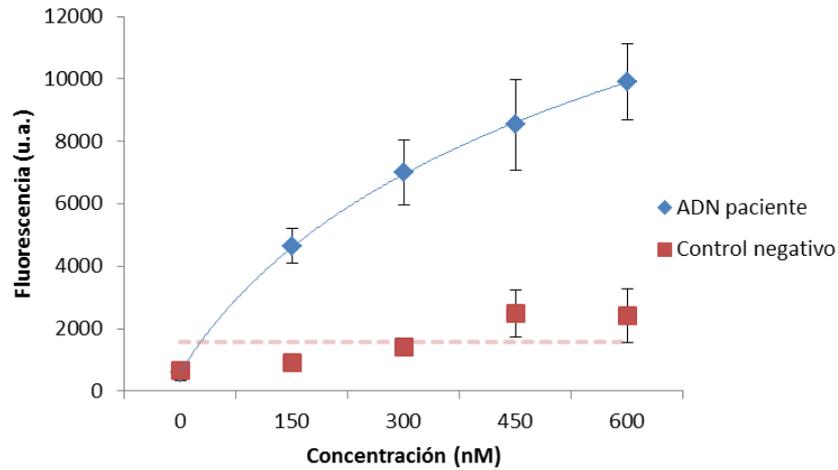
Se realizaron experimentos preliminares en la amplificación del gen control y del gen diana. Además se ensayaron dos cebadores delanteros (externo e interno) y dos cebadores traseros (externo e interno) para el gen KRAS. La separación electroforética de los productos resultantes originaron bandas de tamaño 175 pb para el gen COMT y de 178, 161, 124 y 107 pb para las diferentes combinaciones de cebadores del gen KRAS.

Con el objetivo de alcanzar el mayor número de copias posible, se amplificó el gen KRAS variando la temperatura de anillamiento (figura 7) y, variando las concentraciones de ambos cebadores, tanto del directo como del reverso (figura 8).



**Figura 7.** Señal de fluorescencia de la amplificación variando la temperatura de anillamiento (3 réplicas).

Como se puede observar en la figura 8, a temperaturas superiores a 62 °C no existía amplificación alguna. Este efecto se puede explicar como consecuencia de la ausencia de anillamiento de los cebadores debido a que a estas temperaturas hacen termodinámicamente inestable la hibridación. A temperaturas inferiores a 60 °C existía una gran diferencia entre la amplificación del gen diana y la reacción de amplificación negativa (control negativo), siendo la temperatura óptima la de 57 °C, dado que ofrecía el rendimiento máximo y bajos rendimientos negativos.



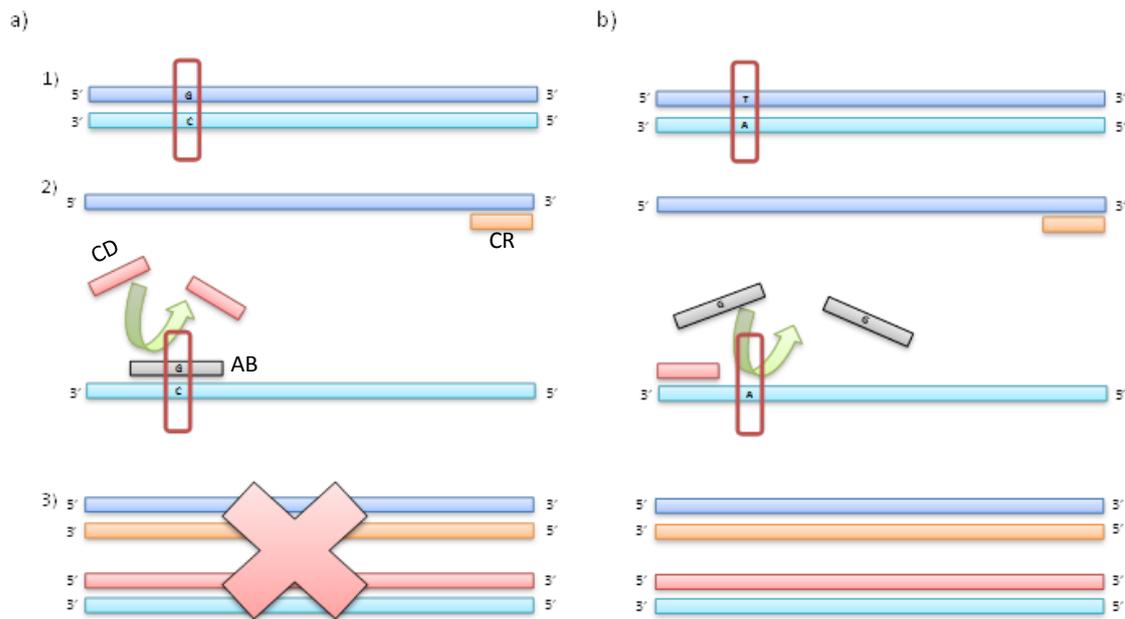
**Figura 8.** Señal de fluorescencia de la amplificación para distintas concentraciones de los cebadores directo y reverso (3 réplicas).

El rendimiento en la amplificación aumentó al incrementar la concentración de los cebadores. Se concluyó que una concentración de 300 nM ofrecía un rendimiento suficiente, con un bajo consumo de reactivos y, por tanto, se estableció como la concentración óptima.

#### ***IV.II. Evaluación del agente bloqueante***

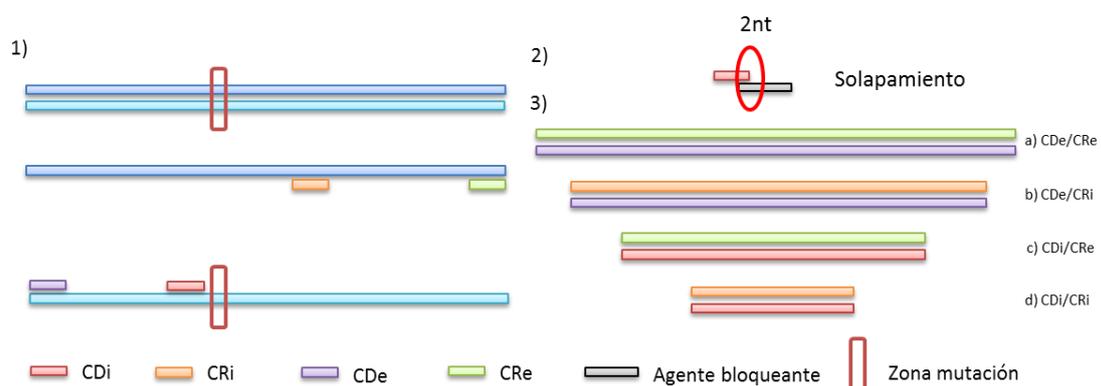
##### ***a) Evaluación del solapamiento***

Puesto que las muestras de tejido impregnadas en parafina y fijadas en formalina poseen una baja proporción de alelos mutantes respecto a los nativos, se pretende minimizar la amplificación de la variante nativa con el objetivo de poder detectar las mutaciones con la selectividad que alcanza la tecnología propuesta. El enriquecimiento de los alelos mutantes se realizó a partir del uso de un oligonucleótido (agente bloqueante) complementario con la secuencia del alelo nativo (figura 9). Debido a que la polimerasa requiere de un grupo hidroxilo 3' libre para la incorporación de un nuevo nucleótido y posterior elongación de la hebra de ADN, se empleó un oligonucleótido didesoxi, es decir, un fragmento de ADN que posee un nucleótido con ausencia del grupo hidroxilo en la posición 3'.



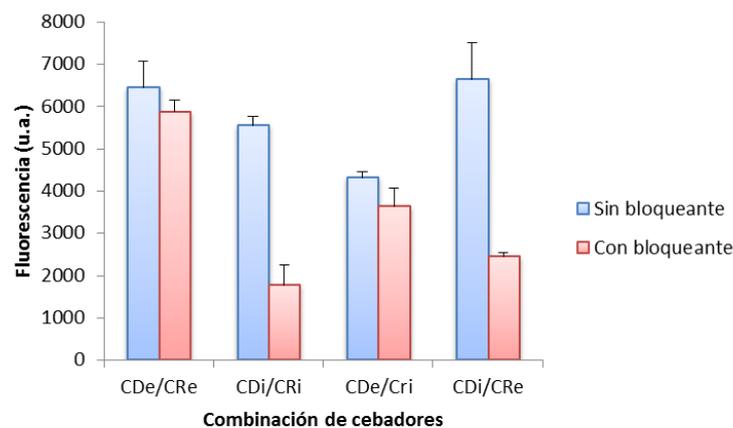
**Figura 9.** Esquema del método de enriquecimiento de los alelos mutantes. a) alelo nativo b) alelo mutante (c.34G>T). Etapas: 1) Apertura del ADN molde. 2) anillamiento de cebadores y agente bloqueante. 3) etapa de elongación durante PCR. CD: cebador directo, CR: cebador reverso, AB: agente bloqueante.

Los agentes bloqueantes utilizados para disminuir la amplificación selectiva de un alelo se pueden diseñar de dos formas: manteniendo una complementariedad parcial con el cebador directo, lo cual impide la amplificación por PCR por la ausencia de anillamiento del cebador (amplificación bloqueada en la etapa de anillamiento) o, sin complementariedad con el cebador, consiguiendo el bloqueo en la etapa de elongación (sí que existe anillamiento del cebador directo). Dado que el agente bloqueante utilizado solapa en dos nucleótidos con el cebador directo interno (CDi), se evaluó su diseño en la amplificación de diferentes productos del gen KRAS (figura 10).



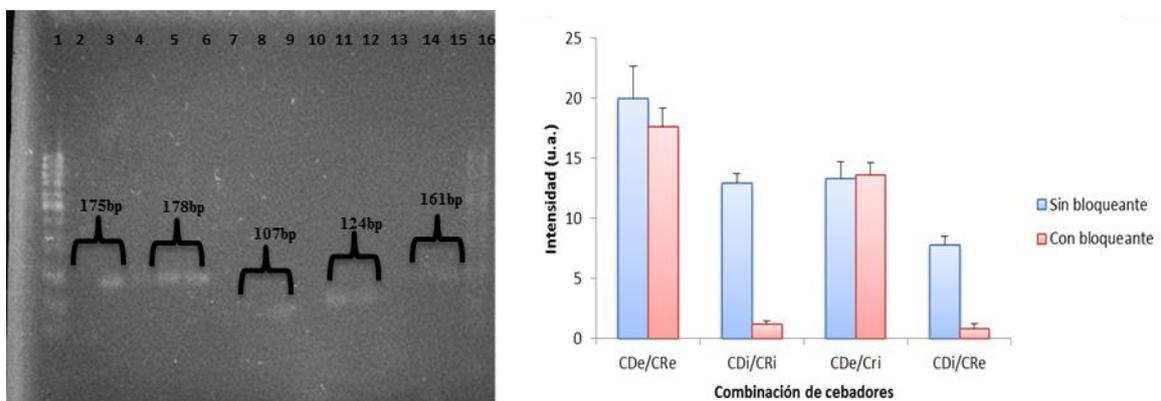
**Figura 10.** Esquema de la amplificación mediante la diferente combinación de cebadores. 1) zona de anillamiento de cada cebador. 2) solapamiento existente en 2 nucleótidos entre el cebador CDi y el agente bloqueante. 3) diferentes productos de amplificación generados según la combinación de cebadores (a-d). La incorporación de agente bloqueante impediría la formación de los productos c y d como consecuencia del solapamiento con el cebador CDi. CDi: cebador directo interno, CDe: cebador directo externo, CRi: cebador reverso interno, CRe: cebador reverso externo, nt: nucleótido.

En las amplificaciones realizadas mediante el cebador directo externo (CDe/CR*e*; CDe/CR*i*), el cual no solapa, la adición de agente bloqueante no alteraba la formación de producto (señales del mismo orden). Mientras que en las amplificaciones realizadas mediante el cebador directo interno la adición de agente bloqueante disminuía la formación de productos de amplificación (figura 11). Este bloqueo en los productos amplificados mediante el cebador directo interno es debido a que el agente bloqueante, como se ha comentado anteriormente, solapa en 2 nucleótidos con el mismo, por lo que impide la amplificación en la etapa de anillamiento, demostrando que la incorporación de este agente bloqueante en la amplificación mediante otro cebador directo externo (CDe), no evita el anillamiento del cebador y consiguientemente la amplificación.



**Figura 11.** Señal de fluorescencia de la amplificación para distintas combinaciones de cebadores, sin y con adición de agente bloqueante (2 réplicas).

Esta disminución de la amplificación tras la adición de agente bloqueante se corroboró mediante un gel de electroforesis (figura 12). La ausencia o presencia de banda asociada a los productos formados de las diferentes combinaciones de cebadores dependió de la incorporación o no del oligonucleótido complementario a la variante nativa.



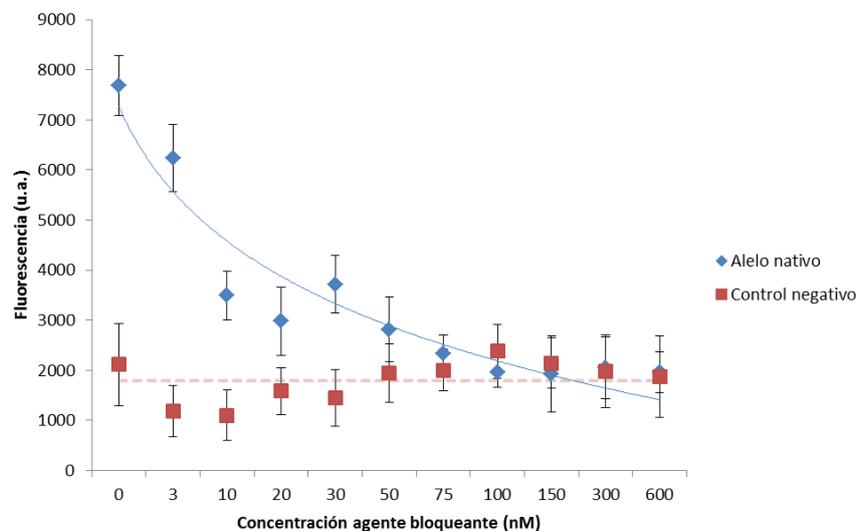
**Figura 12.** Gel de electroforesis para distintos productos de amplificación, con y sin adición de agente bloqueante (100 nM). Pocillo 1: marcador de pesos moleculares. Pocillos 2 y 3: control negativo y producto 175 pb. Pocillos 4, 5 y 6: control negativo, producto 178 pb (con bloqueante) y producto 178 pb. Pocillos 7, 8 y 9: control negativo, producto 107 pb (con bloqueante) y producto 107 pb. Pocillos 10, 11 y 12: control negativo, producto 124 pb (con bloqueante) y producto 124 pb. Pocillos 13, 14 y 15: control negativo, producto 161 pb (con bloqueante) y producto 161 pb.

La imagen capturada del gel de electroforesis fue tratada para obtener las intensidades de cada banda (ImageJ, NIH). A partir de las intensidades obtenidas, se concluyó mediante un test estadístico (ANOVA), que para los productos de amplificación generados a partir del cebador directo externo, la incorporación o no de agente bloqueante no poseía efecto significativo (valor  $p=0,6908$ ). Sin embargo, los productos de amplificación generados a partir del cebador directo interno, la incorporación o no de agente bloqueante poseía efecto significativo debido al solape existente con el agente bloqueante (valor  $p=0,0009$ ).

#### b) Efecto de la concentración

Se estudió el efecto de la concentración de agente bloqueante en la amplificación de extracciones de alelos nativos y mutantes para obtener la concentración óptima que conseguía la amplificación de los alelos mutantes, disminuyendo la amplificación de los alelos nativos.

A medida que se aumentó la concentración de agente bloqueante, disminuía el rendimiento de la amplificación gradualmente (figura 13). La concentración de 100 nM ofrecía una disminución de la amplificación del alelo nativo lo suficientemente alta, por lo que se estableció como la concentración óptima para la reacción de bloqueo, ya que concentraciones superiores ofrecen unos resultados que no mejoran excesivamente al alcanzado por esta concentración, aumentando el consumo de reactivos.

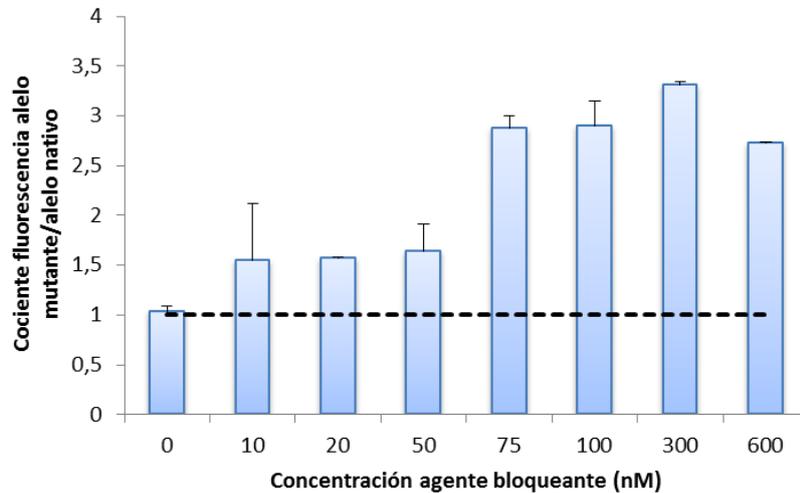


**Figura 13.** Señal de fluorescencia de la amplificación para distintas concentraciones de agente bloqueante (5 réplicas).

Dado que el agente bloqueante (18pb) es complementario a la zona de mutación (complementario para nucleótido nativo: GGT), debería hibridar selectivamente para el alelo nativo impidiendo su amplificación, y enriqueciendo el porcentaje de alelos mutantes (c.34G>T, c.34G>A, c.34G>C). Se estudió la selectividad del bloqueo mediante el cociente de la señal obtenida por los alelos mutantes respecto a la obtenida por el alelo nativo. Así, cocientes superiores a 1 demuestran una mayor señal de los alelos mutantes respecto al nativo.

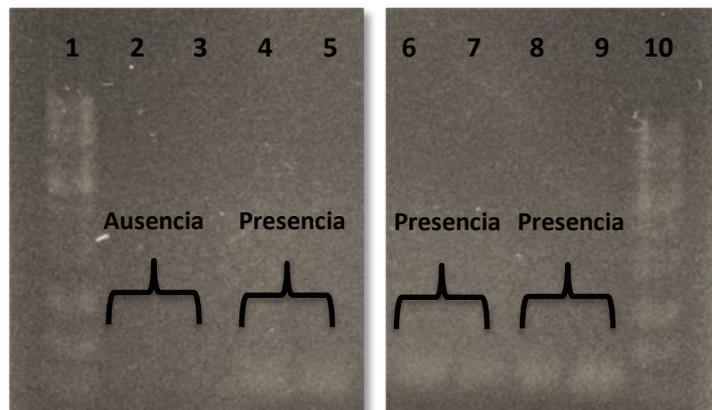
Para una concentración de 0 nM de agente bloqueante (figura 14), la señal de fluorescencia obtenida de la amplificación del alelo mutante era equivalente a la obtenida de la amplificación del alelo nativo (cociente igual a 1). A medida que aumentó la concentración de

agente bloqueante, el cociente de las fluorescencias de alelo mutante/alelo nativo fueron aumentando gradualmente, hasta conseguir una señal de 3 veces mayor por parte de alelo mutante respecto a nativo. Estos resultados son fruto de la disminución en la amplificación del extracto de ADN de alelo nativo, manteniéndose constante la amplificación del alelo mutante y, por tanto, aumentando el cociente entre sus señales de fluorescencia.



**Figura 14.** Cocientes de la señal de fluorescencia de la amplificación de alelo mutante respecto al alelo nativo para distintas concentraciones de agente bloqueante (2 réplicas).

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos por fluorescencia, se realizó un gel de electroforesis con los productos de amplificación de extractos nativos y mutantes para distintas concentraciones de agente bloqueante. Para una concentración de 100 nM de agente bloqueante, la banda para el alelo mutante (c.34G>T) fue detectada, mientras que no existía la banda correspondiente al alelo nativo (figura 15).



**Figura 15.** Gel de electroforesis en agarosa para productos de amplificación de alelo nativo y mutante. Pocillo 1: marcador de pesos moleculares Pocillos 2 y 3: alelo nativo (100 nM), 4 y 5: alelo mutante (100 nM), 6 y 7: alelo nativo (0 nM), 8 y 9: alelo mutante (0 nM). Alelo nativo-Paciente 1 (c.34G). Alelo mutante-Paciente (c.34G>T).

El análisis de la imagen del gel de electroforesis permitió el cálculo del cociente de señales alelo mutante (p.G12C) respecto al alelo nativo. Cuanto mayor era la concentración de agente bloqueante, el cociente de señales era superior. El análisis de la varianza de las señales indicó que la intensidad de la banda del alelo nativo disminuía (valor  $p=0,0007$ ), y la del mutante se mantenía constante (valor  $p=0,1161$ ). Se seleccionó una concentración de 100 nM de

agente bloqueante dado que se minimizó la amplificación del alelo nativo con un consumo reducido de reactivos.

A partir de las fluorescencias obtenidas, se estimó el número de copias alcanzadas tras el empleo de una concentración de 100 nM de agente bloqueante (tabla 8). Además, se calculó un factor de bloqueo ( $F_{b,i}$ ) para cuantificar la disminución de la amplificación de la variante en cuestión:

$$F_{b,i} = \frac{C1}{C2}$$

Donde: C1: número de copias sin bloqueo, C2: número de copias con bloqueo.

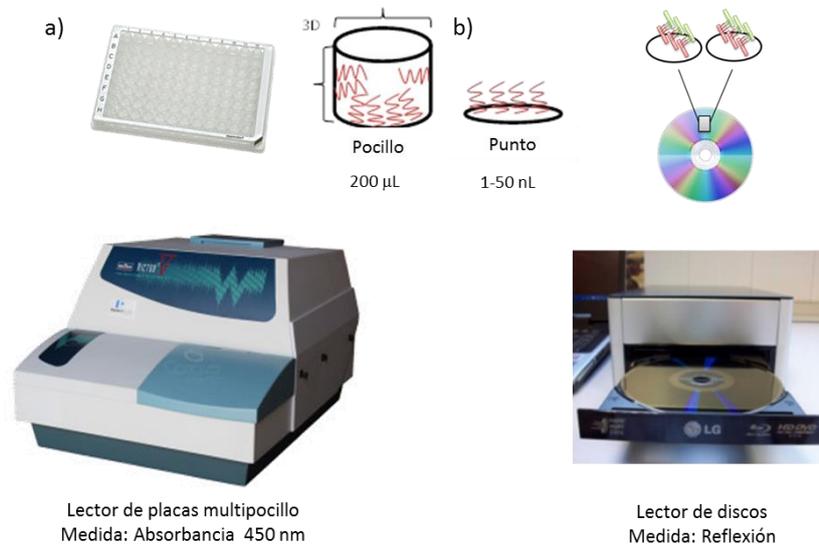
**Tabla 7.** Número de copias obtenidas tras el método de enriquecimiento mediante agente bloqueante (100 nM).

Muestra	Sin bloqueante (n° copias)	Con bloqueante (n° copias)	$F_{b,i}$
Nativo	$4,16 \times 10^8$	$1,73 \times 10^4$	23900
Mutante (c.34G>T)	$3,54 \times 10^8$	$1,90 \times 10^8$	1,9

Dado que el factor de bloqueo para el alelo nativo fue de 23900 y para el mutado de 1,9, se demostró que el uso de un agente bloqueante (100 nM) solapante con el cebador directo es un método efectivo para el enriquecimiento de los alelos mutantes.

#### ***IV.III. Comparación de formatos de análisis del gen KRAS***

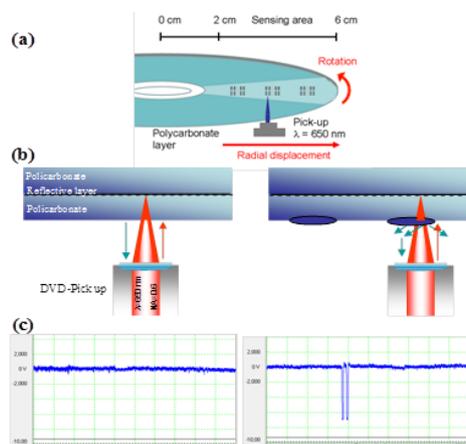
Para discriminar entre las diferentes mutaciones se estudió un sistema de detección de los productos de amplificación basado en un ensayo de hibridación con lectura óptica. Dado las necesidades clínicas, el análisis mutacional del gen KRAS exige una plataforma tecnológica que ofrezca una alta capacidad de análisis en paralelo de diferentes muestras para disminuir tanto los tiempos como los costes por análisis (figura 16). Se escogieron como formatos de análisis plataformas como la placa ELISA (SANTIAGO-FELIPE *et al.*, 2014) y los discos de DVD (TORTAJADA-GENARO *et al.*, 2012), las cuales han sido desarrollados como plataformas de hibridación con sondas de ADN por el Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM).



**Figura 16.** Formatos de hibridación propuestos para el análisis mutacional del gen KRAS. a) formato placa con lectura por absorbancia. b) formato DVD con lectura por reflexión.

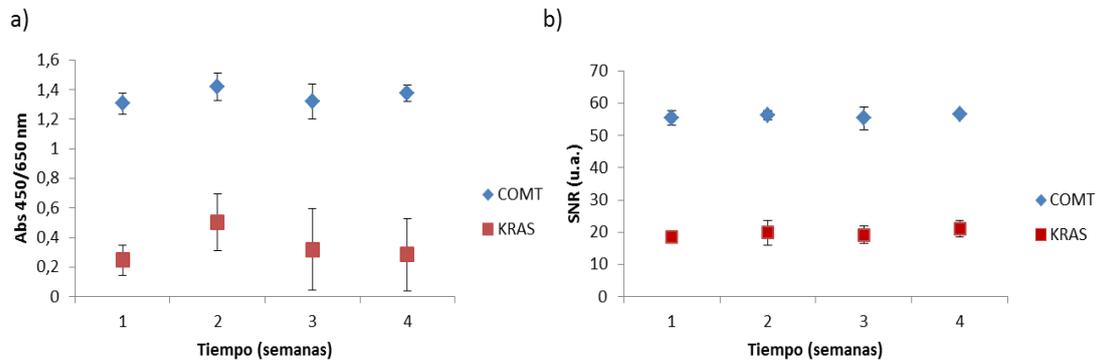
La realización de ensayos de hibridación en plataformas de la placa poliestireno de 96 pocillos (ampliamente utilizada para ELISA) permite una detección en fase homogénea acoplada a un lector de placas (absorbancia a 450 nm). La superficie bionalítica es grande, porque es posible inmovilizar sondas en el fondo y en las paredes del pocillo. Respecto a la tecnología de medida, es un equipo estándar en los laboratorios clínicos lo que permitía una implementación rápida en la práctica rutinaria.

La tecnología de disco compacto DVD (figura 17) se basa en la inmovilización de las sondas de ADN en el sustrato de policarbonato de los discos, para posteriormente capturar los resultados mediante un lector de discos (Lab-Player) capaz de obtener los resultados de todo el disco a partir de la reflexión del haz de un láser ( $\lambda=650$  nm,  $NA=0,6$ ). Esta tecnología ofrece una alta portabilidad de los resultados, ya que el detector Lab-Player se puede transportar de forma fácil y sencilla debido a su pequeño tamaño. La tecnología presenta una gran robustez, pudiéndose obtener los resultados en cualquier laboratorio, además es una tecnología muy flexible, ya que permite la posibilidad de adaptación a cualquier tipo de ensayo. En comparación con la plataforma de placa de poliestireno, permite un mayor multiplexado de las muestras y, más aún, ofrece un gran ahorro en cuanto al consumo de reactivos (1-50 nL/punto por los 200  $\mu$ L/pocillo de la placa ELISA).



**Figura 17.** Tecnología basada en DVD desarrollada por el instituto de investigación IDM.

Se compararon ambos formatos, realizando ensayos replicados durante 4 semanas (figura 18). Sin embargo, los resultados obtenidos en placa presentaban una alta irreproducibilidad ( $s=0,112$ ;  $RSD=33,35\%$ ), muy superior a las prestaciones marcadas para el ensayo. Estas variaciones se atribuyeron a un proceso de inmovilización de la estreptavidina sobre la superficie de poliestireno no óptimo. Los valores registrados para el formato de disco DVD fueron satisfactorios.



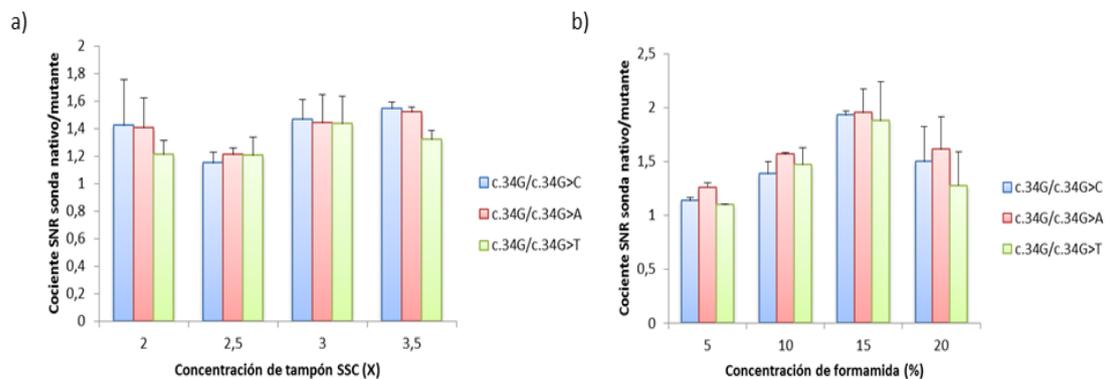
**Figura 18.** Respuestas registradas para el análisis del gen COMT (referencia) y gen KRAS a distintos tiempos. A) plataforma placa. B) plataforma DVD (SNR: cociente señal-ruido).

#### IV.IV. Puesta a punto del ensayo basado en hibridación

##### a) Condiciones de hibridación selectiva

La hibridación específica entre la sonda y el producto de amplificación tiene lugar bajo unas determinadas condiciones experimentales. Se seleccionó tampón SSC porque proporciona un pH de 7 y una fuerza iónica adecuada para la formación de la doble hebra entre los productos amplificados desnaturalizados y las sondas de ADN inmovilizadas. No obstante, nuestro objetivo es el de diferenciar entre productos de amplificación que varían en un único nucleótido, por lo que la hibridación selectiva de cada sonda con su producto es clave. Por ello se incorporó formamida a la mezcla de hibridación, ya que ésta interacciona con las hebras de ADN, facilitando que el producto solamente hibride con la sonda totalmente complementaria.

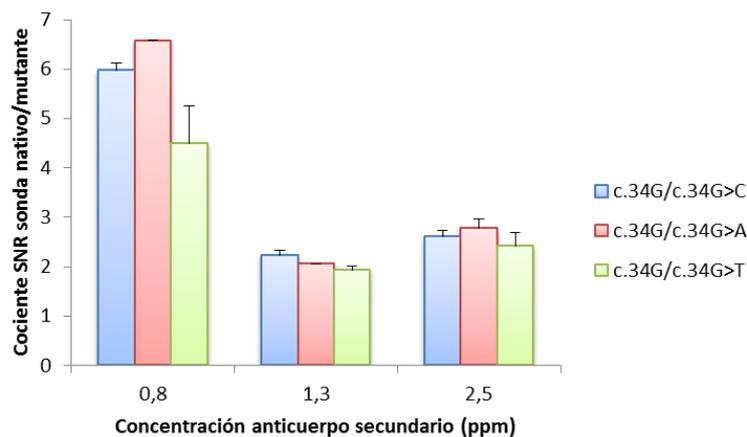
Con el objetivo de determinar la condición óptima para que ocurra la hibridación entre la sonda correspondiente al producto amplificado, se estudió el efecto de la concentración de tampón de hibridación y la concentración de formamida (figura 19).



**Figura 19.** Cociente de las señales correspondientes a las sondas del genotipo nativo (c.34G) y genotipo mutante (c.34G>C; c.34G>A; c.34G>T). a) Diferentes concentraciones de SSC (formamida 5%; 3 réplicas). b) Diferentes concentraciones de formamida (SSC 3 X; 3 réplicas)

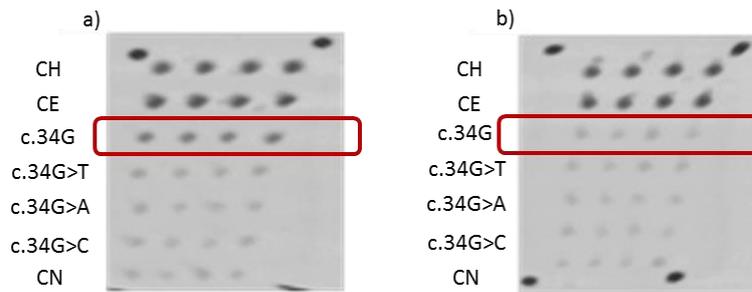
En condiciones de baja formamida (5 %), el producto amplificado hibridaba inespecíficamente, independientemente de la concentración de SSC, originando cocientes entre la señal de la sonda nativa con respecto a las sondas mutantes cercanos a 1 (figura 19a). El análisis estadístico (ANOVA) mostró que no existían diferencias significativas entre las respuestas para las distintas sondas: c.34G/c.34G>C ( $p=0,0653$ ); c.34G/c.34G>A ( $p=0,0772$ ); c.34G/c.34G>T ( $p=0,0727$ ). En condiciones restringentes de tampón (SSC 3 X), el aumento de la concentración de formamida, los cocientes fueron más favorables (figura 19b). Las diferencias de señales fueron significativas: c.34G/c.34G>C ( $p=0,0001$ ); c.34G/c.34G>A ( $p=0,0005$ ); c.34G/c.34G>T ( $p=0,0211$ ). La mayor diferencia entre cocientes se alcanzó para SSC 3 X y formamida 15 %.

La etapa de inmunorevelado de los productos hibridados fue estudiada. El revelado se basa en el sistema digoxigenina/anticuerpo de oveja anti-digoxigenina/anticuerpo de conejo anti-anticuerpos de oveja acoplado a HRP (peroxidasa de rábano)/TMB descrito en Tortajada-Genaro *et al.*, 2012. Se revisó la concentración de anticuerpo secundario para minimizar una interacción inespecífica (figura 20). A una concentración de 0,8 ppm, las señales de las sondas no complementarias disminuyeron, siendo el cociente de señales de 6, mejorando las condiciones estándar (2,5 ppm).

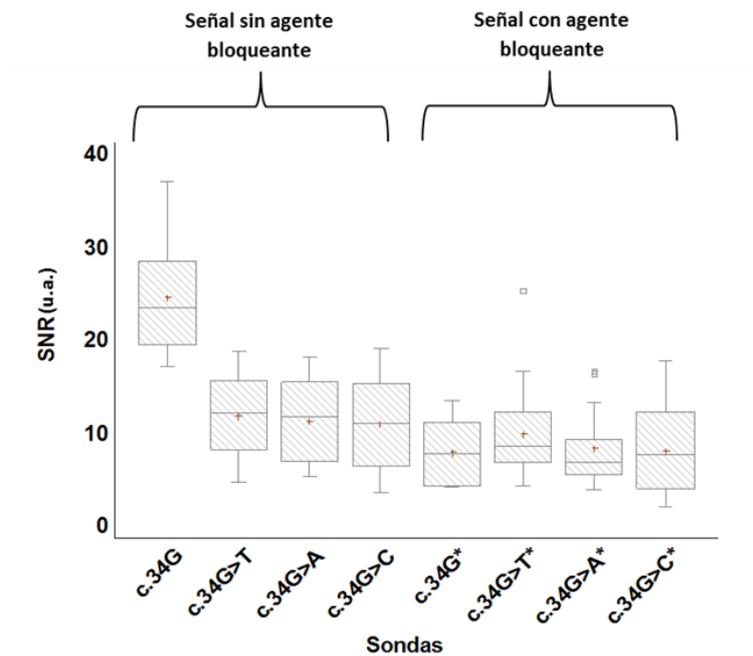


**Figura 20.** Cociente de las señales correspondientes a las sondas del genotipo nativo (c.34G) y genotipo mutante (c.34G>C; c.34G>A; c.34G>T) para diferentes concentraciones de anticuerpo secundario (2 réplicas).

Se estudió el efecto de la presencia del agente bloqueante en el ensayo de hibridación, registrando las señales para los productos de amplificación, con y sin presencia de agente bloqueante, de 7 pacientes con la variante nativa. Se registraron las imágenes de las micromatrices (figura 21) y se midieron las intensidades de cada punto (figura 22). Un análisis de la varianza (ANOVA) mostró que la incorporación de agente bloqueante (100 nM) en la amplificación, disminuía la señal del alelo nativo de forma significativa siendo comparables a las señales de las sondas no diana (valor  $p=0,0100$ ). Estos resultados confirmaron que la incorporación de agente bloqueante en la amplificación impedía la elongación del gen KRAS nativo de forma suficiente para originar una respuesta negativa en un ensayo de hibridación.



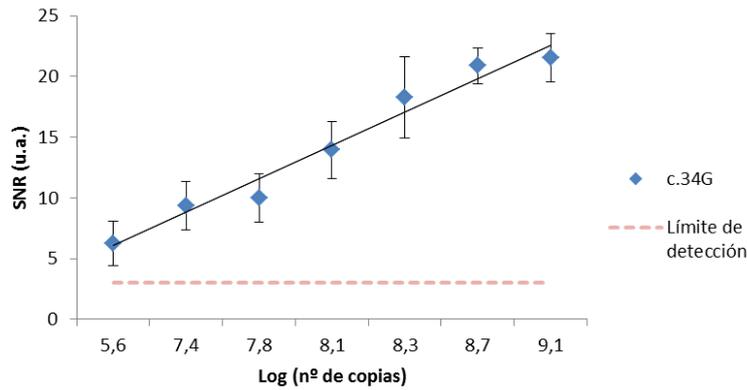
**Figura 21.** Imagen capturada del ensayo en DVD para un voluntario nativo. a) Sin incorporación de agente bloqueante. b) Con incorporación de agente bloqueante (100 nM). CH: control de hibridación. CE: control endógeno. CN: control negativo.



**Figura 22.** Señales obtenidas para cada sonda tras la hibridación de extractos de 7 pacientes nativos. Concentración de agente bloqueante 100 nM (3 réplicas).

#### b) *Prestaciones analíticas*

Se realizó una estimación de la capacidad de detección de la técnica de hibridación a partir de una dilución seriada del producto de amplificación (figura 23). SNR por debajo de 3 se consideran como respuestas negativas, por lo que el mínimo número de copias que podríamos detectar mediante esta metodología estaría por debajo de  $4,31 \times 10^5$ . Teniendo en cuenta el número de copias medido a través del rendimiento de amplificación, el ADN de alelo mutante generarían señales de 19,1 ( $1,90 \times 10^8$ ), y el ADN de alelo nativo generarían un SNR por debajo de 6 ( $1,73 \times 10^4$ ). A partir de esta estimación teórica, se podría discriminar la presencia de mutaciones mediante esta técnica.



**Figura 23.** Señal obtenida para la sonda c.34G, tras la hibridación de diferentes diluciones del producto de amplificación de un individuo nativo (4 réplicas).

Además, se estimó la reproducibilidad de la metodología de detección a partir de las desviaciones de las señales obtenidas para un individuo en diferentes ensayos replicados. La técnica demostró una alta reproducibilidad intra-matriz, es decir señales entre distintos puntos de una micromatriz ( $s=0,695$ ,  $RSD=3,34\%$ ) e intra-disco, entre distintas micromatrices de un mismo disco ( $s=0,829$ ,  $RSD=3,96\%$ ). Además, la reproducibilidad inter-disco, señales obtenidas de distintos discos, fue adecuada ( $s=0,910$ ,  $RSD=4,25\%$ ).

Por otro lado, se evaluó el tiempo requerido para cada una de las etapas del ensayo (tabla 9). El tiempo total de análisis sería de 10 horas, es un tiempo que se encuentra holgadamente en los límites establecidos por los esquemas de Evaluación Externa de la Calidad para el análisis y clasificación de los pacientes con cáncer colorrectal. Además es inferior a la mayoría de metodologías del mercado para el análisis mutacional del gen KRAS, que necesitan más de 24 horas.

**Tabla 8.** Estimación del tiempo de análisis de la metodología propuesta.

Protocolo	Tiempo (minutos)
Extracción ADN	180
Amplificación	120
Impresión/disco	20
Inmovilización sondas	480/60
Hibridación	180
Lectura	20
Tratado de los datos	20
<b>Total</b>	<b>1020/600</b>

#### IV.V. Aplicación clínica

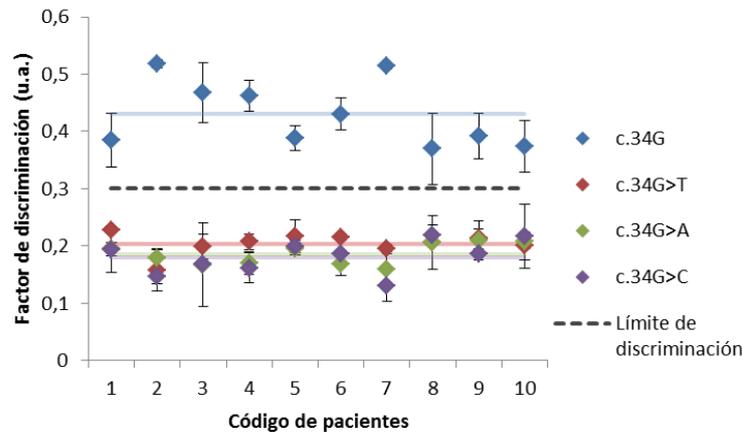
##### a) Análisis de muestras de pacientes

Se procedió a aplicar el método desarrollado para el análisis mutacional de diferentes extractos de ADN de pacientes nativos. Se calculó un factor de discriminación ( $F_{d,i}$ ) para cada sonda:

$$F_{d,i} = \frac{S_i}{\sum S_t}$$

Donde  $S_i$  es la señal de la sonda a evaluar y  $\sum S_t$  es el sumatorio de todas las señales (c.34G; c.34G>T; c.34G>A; c.34G>C).

La Figura 24 muestra los factores obtenidos para los pacientes. Se observó que la sonda nativa originaba factores en el intervalo 0,37-0,52, mientras que las sondas mutantes en el intervalo 0,23-0,13. Por lo tanto, se estableció el límite de  $F_{d,i} > 0,3$  para asignar a dicho paciente en el grupo población asociado (c.34G; c.34G>T; c.34G>A; c.34G>C).



**Figura 24.** Factores de discriminación obtenidos a partir de las muestras de los pacientes.

Demostrado el principio analizando un conjunto de paciente nativos, los siguientes pasos, fuera del alcance del presente TFG, implicarían un análisis de un conjunto de muestras de validación para la asignación de los distintos genotipos mutantes.

#### b) Comparación con otras tecnologías

Con las condiciones alcanzadas del ensayo, las prestaciones fueron contrastadas con las correspondientes tecnologías implementadas en laboratorios de investigación y clínicos (tabla 10). Se compara la tecnología HRM, la cual se basa en la desnaturalización de la doble cadena de ADN con una detección de entre 3-10 % de alelos mutados, y la tecnología COBAS®, la cual se basa en PCR a tiempo real con una detección de alrededor del 5 % de alelos mutados. En el primer caso se utilizan instrumentos de qPCR de alta gama y en el segundo un instrumento específico para esta aplicación. La tecnología COBAS® se encuentra implementada en el hospital La Fe, siendo evaluada durante una estancia en el laboratorio de Biología Molecular.

Las mayores diferencias son el coste y la capacidad de analizar varios pacientes en paralelo. Las técnica de COBAS® (cobas z 480 real-time PCR analyzer; alrededor de 18.000€) y de HRM (Applied Biosystems High Resolution Melt Module for ViiA™, 15.000€) requieren de una instrumentación más costosa que el método propuesto (Lab-Player; 300 €) y mucho más voluminosa. La capacidad de analizar un gran cantidad de pacientes en paralelo alcanzada por la tecnología de este trabajo fin de grado (veinte pacientes/lectura) no la alcanzan ni la metodología de HRM (un paciente/lectura) ni tecnología COBAS® (ocho pacientes/lectura).

Por otro lado, la técnica de HRM sólo permite discernir si la muestra posee mutación o no, sin embargo, tanto la técnica de COBAS® como el método propuesto, permiten detectar mutaciones en diferentes posiciones siendo muy importante puesto que la última actualización (ALLEGRA et al., 2015) hace obligatoria la comprobación del estado mutacional de diferentes posiciones en el gen KRAS (exón 2: codón 12, codon13; exón 3: codón 59, codón 61; exón 4: codón 117, codón 146). No obstante, el método propuesto permite identificar el cambio nucleotídico de todas las posiciones, mientras que COBAS®, al ser una tecnología muy cerrada, sólo identifica la mutación en diversas posiciones, por ejemplo, las mutación del primer

nucleótido del exón 2 codón 12 se encuentran en la misma mix de PCR detectando solamente si existe mutación sin identificar el cambio.

**Tabla 9.** Comparación de técnicas de análisis mutacional para el gen KRAS con la metodología propuesta.

Propiedad	Método propuesto	HRM	COBAS®
Detector			
Tiempo de análisis	+++	++	+++
Coste	+++	++	+
Sencillez	+++	++	+++
Reproducibilidad	++	+++	+++
Cantidad de muestra	+++	++	+++
Selectividad	+++*	++	+++
Multiplexicidad	+++	+	+
Información mutacional	+++	+	+

+: Aceptable, ++: buena, +++: muy buena, \*: estimado

## V. CONCLUSIONES

Este trabajo fin de grado ha permitido establecer la bases experimentales para desarrollar un ensayo para analizar el estado mutacional del primer nucleótido del exón 2 codón 12 del gen KRAS. Los resultados más destacables obtenidos en este trabajo son:

- La adición de un agente bloqueante, complementario al alelo nativo y solapante al cebador directo, en la mezcla de reacción de la PCR minimiza específicamente la amplificación de los alelos nativos (factor bloqueo= 23900), enriqueciendo los alelos mutantes presentes.
- La plataforma basada en la tecnología DVD para el análisis mutacional del gen KRAS ofrece mejores resultados que la plataforma basada en el uso de una placa de poliestireno de 96 pocillos.
- Las prestaciones analíticas alcanzadas y de análisis de muestras muestran el potencial del método desarrollado.

Frente a las técnicas actualmente comercializadas, el método propuesto es una clara alternativa más barata, sencilla y versátil que permitiría su implementación no sólo en laboratorios centralizados. Aunque es necesario avanzar en el desarrollo, los resultados son realmente prometedores para facilitar el acceso de los avances de la medicina personalizada de manera universal. Lo que finalmente se traduce en contribuir en la mejora de la calidad de vida de los pacientes con cáncer colorrectal.

## VI. REFERENCIAS

ALLEGRA, C., RUMBLE, R., HAMILTON, S., MANGU, P., ROACH, N., HANTEL, A., & SCHILSKY, R. (2015). Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. *Journal Of Clinical Oncology*, 34(2), 179-185.

AMADO, R. G., WOLF, M., PEETERS, M., VAN CUTSEM, E., SIENA, S., FREEMAN, D. J., ... & PATTERSON, S. D. (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(10), 1626-1634.

AUSCH, C., BUXHOFER-AUSCH, V., OBERKANINS, C., HOLZER, B., MINAI-POUR, M., JAHN, S., ... & KRIEGSHÄUSER, G. (2009). Sensitive detection of KRAS mutations in archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue using mutant-enriched PCR and reverse-hybridization. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11(6), 508-513.

DIRECTIVA 98/79/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 27 de octubre de 1998 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. DO, L 331, p. 1.

EMA.EUROPA.EU., (2016). *European Medicines Agency - Find medicine - Erbitux*, visto el 31 de Enero de 2016 [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000558/human\\_med\\_000769.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000558/human_med_000769.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)

FRANKLIN, W. A., HANEY, J., SUGITA, M., BEMIS, L., JIMENO, A., & MESSERSMITH, W. A. (2010). KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(1), 43-50.

GALBIATI, S., DAMIN, F., PINZANI, P., MANCINI, I., VINCI, S., CHIARI, M., ... & FERRARI, M. (2013). A new microarray substrate for ultra-sensitive genotyping of KRAS and BRAF gene variants in colorectal cancer. *PloS one*, 8(3), e59939.

HERNÁNDEZ-LOSA, J., SANZ, J., LANDOLFI, S., LÓPEZ-RÍOS, F., PALACIOS, J., BAUTISTA, M. D., ... & RAMÓN, S. (2012). Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. *Revista Española de Patología*, 45(2), 76-85.

JANČÍK, S., DRÁBEK, J., RADZIOCH, D., & HAJDÚCH, M. (2010). Clinical relevance of KRAS in human cancers. *BioMed Research International*, 2010.

LI, J., WANG, L., MAMON, H., KULKE, M. H., BERBECO, R., & MAKRIGIORGOS, G. M. (2008). Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nature medicine*, 14(5), 579-584.

LIEVRE, A., BACHET, J. B., LE CORRE, D., BOIGE, V., LANDI, B., EMILE, J. F., ... & ROUGIER, P. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer research*, 66(8), 3992-3995.

- MILBURY, C. A., LI, J., & MAKRIGIORGOS, G. M. (2009). PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. *Clinical chemistry*, 55(4), 632-640.
- NCCN.ORG,. (2016). *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*, visto el 31 de Enero de 2016 [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp)
- NEWTON, K., NEWMAN, W., & HILL, J. (2011). Review of biomarkers in colorectal cancer. *Colorectal Disease*, 14(1), 3-17.
- NORMANNO, N., TEJPAR, S., MORGILLO, F., DE LUCA, A., VAN CUTSEM, E., & CIARDIELLO, F. (2009). Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(9), 519-527.
- PINTO, P., ROCHA, P., VEIGA, I., GUEDES, J., PINHEIRO, M., PEIXOTO, A., ... & ALVES, F. (2011). Comparison of methodologies for KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer. *Cancer genetics*, 204(8), 439-446.
- RAJALINGAM, K., SCHRECK, R., RAPP, U. R., & ALBERT, Š. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1177-1195.
- SANTIAGO-FELIPE, S., TORTAJADA-GENARO, L., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, A. (2014). Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis. *Analytica Chimica Acta*, 811, 81-87.
- SHACKELFORD, R. E., WHITLING, N. A., MCNAB, P., JAPA, S., & COPPOLA, D. (2012). KRAS Testing A Tool for the Implementation of Personalized Medicine. *Genes & cancer*, 3(7-8), 459-466.
- SIEGEL, R., MILLER, K., & JEMAL, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 66(1), 7-30.
- SMITH, G., BOUNDS, R., WOLF, H., STEELE, R. J. C., CAREY, F. A., & WOLF, C. R. (2010). Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours—implications for personalised cancer medicine. *British journal of cancer*, 102(4), 693-703.
- TORTAJADA-GENARO, L., SANTIAGO-FELIPE, S., MORAIS, S., GABALDÓN, J., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, Á. (2012). Multiplex DNA Detection of Food Allergens on a Digital Versatile Disk. *J. Agric. Food Chem.*, 60(1), 36-43.
- VAN CUTSEM, E., KÖHNE, C. H., LÁNG, I., FOLPRECHT, G., NOWACKI, M. P., CASCINU, S., ... & SCHLICHTING, M. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of Clinical Oncology*, JCO-2010.
- VAN KRIEKEN, J. H. J., ROULEAU, E., LIGTENBERG, M. J., NORMANNO, N., PATTERSON, S. D., & JUNG, A. (2015). RAS testing in metastatic colorectal cancer: advances in Europe. *Virchows Archiv*, 1-14.

VAN KRIEKEN, J. H., SIEBERS, A. G., NORMANNO, N., BLACKHALL, F., BOONE, E., BOTTI, G., ... & LANZARA, A. (2013). European consensus conference for external quality assessment in molecular pathology. *Annals of oncology*, 24(8), 1958-1963.

WANG, H., JIANG, J., MOSTERT, B., SIEUWERTS, A., MARTENS, J. W., SLEIJFER, S., ... & WANG, Y. (2013). Allele-specific, non-extendable primer blocker PCR (AS-NEPB-PCR) for DNA mutation detection in cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 15(1), 62-69.

WEICHERT, W., SCHEWE, C., LEHMANN, A., SERS, C., DENKERT, C., BUDCZIES, J., ... & RÖCKEN, C. (2010). KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(1), 35-42.

World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. (2014). *J Korean Med Assoc*, 57(11), 899.