

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE  
VALÈNCIA**

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



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

**Grado en Biotecnología**

**Detección de mutaciones en el oncogén *BRAF* en  
el tratamiento dirigido frente el cáncer colorrectal**

**Trabajo Fin de Grado (TFG)**

**AUTORA:** Irene Jiménez Romero

**TUTOR UPV:** Luis Antonio Tortajada Genaro

**Curso Académico:** 2016/2017

Valencia, Julio de 2017



## **Datos del Trabajo de Fin de Grado**

**Título:** Detección de mutaciones en el oncogén *BRAF* en el tratamiento dirigido frente el cáncer colorrectal.

**Autor/a:** Dña. Irene Jiménez Romero

**Titulación:** Grado en Biotecnología.

**Tutor/a académico:** Prof. D. Luis Antonio Tortajada Genaro.

**Localidad y fecha:** Valencia, Julio de 2016.

## **Resumen**

La presencia de mutaciones somáticas en ciertos genes se asocia a la resistencia a los tratamientos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), implicado en el desarrollo del cáncer del colorrectal. Un ejemplo de son las mutaciones el gen *BRAF*, cuyo papel en el cáncer se asocia principalmente con la peor supervivencia de los pacientes afectados. Es por ello que el análisis mutacional de dicho gen es crítico, no sólo para la selección de pacientes candidatos a recibir terapias basadas en inhibidores de EGFR, sino también para pronosticar la enfermedad. A pesar de la amplia oferta de tecnologías disponibles, no se trata de un campo científico-técnico completado, ya que no todos los sistemas sanitarios poseen la capacidad para incorporar muchas de las técnicas existentes, debido principalmente al coste y al tiempo requerido para el análisis.

El objetivo de este proyecto es contribuir en el desarrollo de un sistema de análisis mutacional del gen *BRAF* basado en una tecnología de biosensado alternativa, que presente altas prestaciones de trabajo y de fácil implantación en los laboratorios clínicos. Se seleccionó la mutación c.1799T>A (V600E), ya que es la más frecuente en cáncer colorrectal metastásico y otros tipos de cáncer. Para el enriquecimiento del alelo mutado respecto al nativo, se estudió el empleo de agentes bloqueantes durante la reacción de amplificación. Para la detección de los productos formados, se estudiaron dos métodos post-amplificación: detección mediante fluorescencia y detección colorimétrica basada en hibridación con sondas específicas inmovilizadas en un biochip de policarbonato. El método propuesto permitió disminuir selectivamente la amplificación de los alelos nativos en un rango aproximadamente del 15-22 % y la discriminación de las subpoblaciones en función del perfil de hibridación con elevada reproducibilidad (desviación estándar < 20 %). La metodología se aplicó al análisis mutacional de muestras de tejidos biopsiados embebidos en parafina y fijados en formalina de pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Se logró la detección de la mutación en los mismos casos reportados mediante una técnica basada en secuenciación de siguiente generación (NGS, siglas en inglés). Los resultados obtenidos muestran el potencial del método y su capacidad para apoyar el desarrollo de tecnologías alternativas, permitiendo el seguimiento y asesoramiento médico personalizado.

## **Palabras clave**

Oncogén *BRAF*, bioanalítica, detección de mutaciones, cáncer colorrectal, tejido biopsiado.

## **Abstract**

The presence of somatic mutations in certain oncogenes is associated with resistance to treatments with monoclonal antibodies against epidermal growth factor (EGFR), involved in the development of colorectal cancer. An example of this phenomenon, are mutations present in *BRAF* oncogene, which role in cancer is mainly associated with the lower survival of affected patients. For this reason, it is critical to perform a mutational analysis of this gene, not only for selection of patients that will benefit from therapies based on inhibition of EGFR, but for establishing the prognosis of the disease. Nevertheless, despite there is a wide offer of available technologies, the scientific-technical field is not completed, so, not all of the sanitary systems have the capacity to incorporate lots of the current techniques, mainly due to the cost and time required for the analysis.

The goal of this project is to contribute in the development of a mutational analysis system based on an alternative biosensing technology that offers optimal properties in its performance as its easy implementation in clinical laboratories. It was selected mutation c.1799 T > A (V600E), as it is the most frequent in metastatic colorectal cancer and in other types of cancer. In order to enrich the mutant fraction respect to the wild type, it was studied the use of blocking agents during the amplification reaction (PCR *Clamp*). For the detection of generated products, there were studied two post-amplification methods: fluorescence detection and colorimetric detection based on a hybridization assay with specific probes in a polycarbonate biochip. The proposed method allowed the selective decrease of amplification of wild type alleles in a range of approximately 15-22 %, as the discrimination of subpopulations due to their hybridization profile with high reproducibility (standard deviation < 20 %). The methodology was applied in mutational analysis of samples from formalin fixed and paraffin embedded biopsy tissues of metastatic colorectal cancer patients. Mutation detection was achieved for the same reported cases by a technique based on next generation sequencing. Obtained results show the potential of the method and will serve to support the development of alternative technologies for monitoring and personalized medical advice for each patient.

## **Keywords**

*BRAF* oncogene, bioanalysis, mutation detection, colorectal cancer, biopsy tissue.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradecer a Ángel Maquieira por mi incorporación al Departamento de Química, y especialmente, a Luis Antonio Tortajada Genaro, por haberme enseñado a ser más ambiciosa, más optimista y siempre dar lo mejor de uno mismo en cualquier tipo de trabajo, gracias por tu dedicación Luis.

Por otro lado, agradecer a todos los miembros del Departamento de Química, por demostrar su profesionalidad y hacerme reír tanto. Concretamente, quiero agradecer la especial atención que ha tenido Ana conmigo, por haberme enseñado y ayudado, y por lo que hemos aprendido y reído juntas en este proceso. A Sara, por haberme guiado y apoyado, y a Eric, por su increíble generosidad y profesionalidad. No quiero terminar estos agradecimientos sin destacar a mis geniales compañeras Paula y Blanca, por haber hecho todo este proceso más ameno y divertido, y porque nos merecemos terminar esta etapa con creces.

También quiero agradecer, cómo no, a los grandes amigos y amigas que me llevo después de estos cuatro años, las risas, llantos, celebraciones y grandes viajes juntos. Por habernos apoyado en todos los episodios de la carrera y habérselo pasado genial cuando las cosas no iban tan bien.

Por último, agradecer a una persona especial, maravillosamente fuerte e inteligente: mi madre. Gracias por haber permitido con tu increíble esfuerzo que yo pueda estudiar, y sacado fuerzas cuando más las necesitaba. Sobre todo, me has enseñado que no importa la edad, situación, condición y demás circunstancias de una persona, nunca es tarde para aprender y superarte a ti mismo.

No quiero terminar estos agradecimientos sin dedicarle este trabajo de fin de grado a mi abuelo, por su increíble lucha, y por la de todas las personas que sufren esta enfermedad. Éste es mi pequeño granito de arena para ti. Gracias por haberme enseñado que hay que vivir cada instante como si fuera el último y sobre todo, gracias por haber confiado en la ciencia. Sin el apoyo a la investigación, nada, absolutamente nada, tendría sentido. Esto es sólo el principio de un mundo mucho mejor.

Muchas gracias a todas y todos.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. El cáncer colorrectal.....	1
1.2. Biomarcadores en cáncer colorrectal .....	1
1.3. Gen BRAF: mutaciones e implicaciones clínicas .....	2
1.3.1. Tipos y frecuencias de las mutaciones en BRAF.....	2
1.3.2. Implicaciones clínicas de la mutación V600E .....	4
1.4. Tecnologías para el análisis genético .....	5
1.4.1. Técnicas de barrido .....	6
a) dHPLC (cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante).....	6
b) SSCP/DGGE .....	6
c) Análisis de alta resolución de fusión o ‘High Resolution Melting Analysis’ (HRM)....	6
1.4.2. Secuenciación.....	6
1.4.3. Técnicas basadas en PCR a tiempo real .....	7
1.4.4. Técnicas de amplificación alelo específica .....	8
1.4.5. Técnicas de enriquecimiento basadas en PCR .....	9
a) PCR Clamp.....	9
b) COLD-PCR .....	9
1.4.6. Otras técnicas .....	9
a) SNaPshot .....	9
b) Droplet digital PCR o Tecnología ddPCR .....	10
c) Micromatrices de ADN .....	10
1.4.7. Comparación de los métodos de análisis genético .....	10
1.4.8. Métodos alternativos .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
3.1. Reactivos .....	15
3.2. Generación de ADN mutante .....	15
3.3. Obtención de muestras de ADN genómico humano .....	16
3.4. Amplificaciones mediante PCR .....	17
3.5. Amplificaciones isoterma .....	17
3.6. Medidas post-amplificación .....	17
3.7. Detección: Preparación del chip.....	18
3.8. Detección: Hibridación, revelado y lectura.....	18
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	19
4.1. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO .....	19
4.1.1. Extracción.....	19
4.1.2. Generación de ADN mutante .....	19
4.2. AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR .....	20
4.3. AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR BLOQUEADA.....	22
4.3.1. Descripción de la estrategia.....	22
4.3.2. Acción de los bloqueantes como cebadores .....	23
4.3.3. Puesta a punto de la PCR bloqueada .....	23
4.4. APROXIMACIÓN ISOTERMA .....	26
4.4.1. Análisis de las propiedades de la Bst ADN polimerasa .....	26

4.4.2.	Diseño de la estrategia.....	27
4.4.3.	Puesta a punto de la amplificación isoterma bloqueada.....	28
4.5.	ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN.....	29
4.5.1.	Diseño del ensayo.....	29
4.5.2.	Ensayos preliminares.....	30
4.5.3.	Desarrollo del ensayo.....	31
4.5.3.1.	Reproducibilidad del ensayo (amplificación bloqueada con hibridación) .....	31
4.5.3.2.	Análisis de pacientes .....	32
4.5.3.3.	Efecto de la concentración de agente bloqueante.....	33
4.6.	ACCIONES FUTURAS.....	34
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>37</b>
<b>ANEXO</b>	.....	<b>i</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Inhibición de B-Raf (Tomada de Sebolt-Leopold y Herrera, 2004). La figura muestra un diagrama de la proteína nativa con el dominio quinasa en la conformación para activarse mediante el sustrato fosforilado. Sin embargo, dicha conformación se ve interrumpida por la presencia de un inhibidor que interacciona con residuos tanto en el P-loop como en el A-loop.....3
- Figura 2.** Mutaciones en BRAF en cáncer (modificada de Holderfield *et al.*, 2014). **A:** dominios funcionales de la proteína afectados por las mutaciones. RBD: ‘Ras Binding Domain’, Dominio de unión de Ras. **B:** Espectro de mutaciones en BRAF en diversos estudios revisados en diferentes tipos de cáncer. También aparece el porcentaje en el número de casos estudiados para los estudios revisados. Ejes horizontales: posiciones 1-766 en la secuencia de aminoácidos. Eje vertical: número de mutaciones.....3
- Figura 3.** Representación de las mutaciones en el dominio tirosina quinasa del gen BRAF (datos obtenidos de COSMIC). A: Adenina, C: Citosina, E: Glutamato, G: Guanina, I: Isoleucina, K: Lisina, L: Leucina, T: Timina, V: Valina.....4
- Figura 4.** Ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (modificada de Walter *et al.*, 2009). Jak: quinasa Janus, PLC: fosfolipasa, STAT: transductor de señales y activador de la transcripción.....4
- Figura 5.** Principales tipos de tecnologías más empleadas en el análisis mutacional de oncogenes en cáncer colorrectal.....5
- Figura 6.** Representación de la tecnología de sondas TaqMan® y Scorpion® en la PCR a tiempo real (modificada de Verweij y Stensvold, 2014). R: reportero. Q: *quencher*.....7
- Figura 7.** Esquema del procedimiento de la metodología propuesta. CD: cebador directo; CR: cebador reverso. AB: Agente bloqueante. V600E: mutación del gen BRAF a estudiar.....13
- Figura 8.** Esquema de la generación del ADN mutante sintético de doble cadena. Etapas: 1) ADN de simple cadena e hibridación del cebador reverso. Elongación y generación de la cadena reversa por la Taq polimerasa. 2) Producto generado: ADN mutante sintético de doble cadena. 3) Desnaturalización, hibridación de ambos cebadores y continuación de los siguientes ciclos de amplificación. 4) Producto final: ADN mutante sintético de doble cadena.....20
- Figura 9.** Señal de fluorescencia post-amplificación variando la temperatura de anillamiento. Ensayos duplicados. Wt: individuo con genotipo nativo; C-: control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde).....20
- Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 3 % de los resultados de la amplificación preliminar. M: marcador de pesos moleculares; C-: control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde); ACTB: gen de referencia control positivo; WT: muestra de ADN nativo a partir de epitelio bucal. MUT: muestra de ADN mutante en BRAF (V600E) a partir de tejido biopsiado embebido en parafina.....21
- Figura 11.** Esquema de la reacción de amplificación bloqueante propuesta. CR: cebador reverso; CD: cebador directo; AB: agente bloqueante; V600E: mutación a estudiar en el gen BRAF.....22
- Figura 12.** Representación de la actuación de los dos bloqueantes sobre el wt según su diseño. 1) Hibridación del agente bloqueante con la secuencia wt e impedimento de la unión del cebador directo. 2) Desestabilización del agente bloqueante al tratar de hibridar con la secuencia mutante. 3) Desplazamiento del agente bloqueante por el cebador directo y amplificación selectiva de la secuencia mutante. CD: cebador directo; CR: cebador reverso; AB: agente bloqueante; V600E: mutación de BRAF.....23
- Figura 13.** Señal promedio obtenida de las amplificaciones de los bloqueantes para observar su comportamiento como cebador.....23

<b>Figura 14.</b> Señal normalizada de amplificación del ADN nativo de un voluntario y del ADN mutante sintético frente a diferentes concentraciones de bloqueante 1 (A) y bloqueante 2 (B). Wt: ADN nativo; mut: ADN mutante (sintético). C-: control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde y con el agente bloqueante correspondiente a 50 nM).....	24
<b>Figura 15.</b> Señal de fluorescencia promedio neta de amplificación simétrica a 25 y 35 ciclos con y sin agente bloqueante a 300 nM de mezclas con diferente proporción de ADN wt/mut.....	25
<b>Figura 16.</b> Gel de electroforesis para las distintas mezclas de ADN nativo/mutante amplificadas a 25 y 35 ciclos, sin (A) y con agente bloqueante a 300 nM (B). C-: control negativo, mezcla de reacción sin ADN molde para A y con bloqueante para B. Wt: ADN nativo. Se muestra la proporción de ADN nativo (el resto corresponde a la de mutante).....	25
<b>Figura 17.</b> Estructura cristalina de la enzima Bst a una resolución de 2.1Å (modificada de Kiefer <i>et al.</i> , 1997). Representación esquemática en la que las hélices se muestran como cilindros azules y las hojas $\beta$ como flechas naranjas. El extremo N-terminal está marcado con el signo ‘*’ y el extremo C-terminal queda detrás de la hélice marcada con el signo ‘+’. A: dominio polimerasa con subdominios dedo, palma y pulgar. B: dominio exonucleasa vestigial.....	26
<b>Figura 18.</b> Esquema del nuevo método basado en la amplificación isoterma utilizando como enzima la Bst ADN polimerasa y dos cebadores. En la figura queda representada el proceso de amplificación de una de las cadenas molde (directa), lo mismo ocurre para la cadena reversa. Wt: variante nativa o ‘wild type’, mut: variante mutante.....	28
<b>Figura 19.</b> Señal de fluorescencia de la amplificación isoterma frente al tiempo (min) de reacción, del ADN nativo sin bloqueante (A) y con el bloqueante 2 a 300 nM (B).....	28
<b>Figura 20.</b> Gel de electroforesis para las distintas mezclas de ADN nativo y mutante, en ausencia de bloqueante (pocillos 1-5) y con adición de agente bloqueante a 300 nM (pocillos 6-10). Los pocillos de ambos extremos corresponden con el marcador de pesos moleculares. Pocillos 1 y 6: 100% de ADN nativo. Pocillos 2 y 7: 75% de ADN nativo y 25% de ADN mutante. Pocillos 3 y 8: 50% de ADN nativo y 50% de ADN mutante. Pocillos 4 y 9: 25% de ADN nativo y 75% de ADN mutante. Pocillos 5 y 10: 100% de ADN mutante. Pocillo 11: control positivo (producto del gen ACTB). Pb: pares de bases.....	29
<b>Figura 21.</b> Resumen del diseño experimental del ensayo de hibridación. 1) Tratamiento de la superficie. 2) Dispensación de nano-gotas. 3) Hibridación selectiva. 4) Detección por reacción colorimétrica. COO-: grupo carboxilo libre; DIG: dioxigenina (marcaje por cebador reverso en la amplificación); Ab 1 <sup>a</sup> : anticuerpo primario; Ab 2 <sup>a</sup> : anticuerpo secundario. HRP: peroxidasa de rábano. TMB: sustrato enzimático 3,3, 5,5’ tetrametilbenzidina.....	30
<b>Figura 22.</b> Intensidad de punto promedio de los arrays para las muestras nativa y mutante sin y con agente bloqueante a 40 nM (3 réplicas).....	32
<b>Figura 23.</b> Intensidad de punto promedio registrada de las sondas nativa y mutante de 4 muestras de voluntarios sanos (A) y 4 pacientes mutantes (B). Arriba, imágenes tomadas del chip y distribución de las sondas específicas en el array.....	33
<b>Figura 24.</b> A: Imágenes registradas tras la hibridación de la muestra mutante. B: Intensidad de señal normalizada en las sondas mutante y nativa a partir de la amplificación asimétrica a diferentes concentraciones de agente bloqueante de una muestra nativa y una mutante. Mut-SWt: muestra mut-sonda wt; Mut-SMut: muestra mut-sonda mut; Wt-SWt: muestra wt-sonda wt; Wt-SMut: muestra wt-sonda mut. C-: control negativo del ensayo.....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación de los principales métodos aptos y empleados para el análisis de <i>BRAF</i> .....	11
<b>Tabla 2.</b> Tipos y propiedades principales de los oligonucleótidos empleados. La variante nucleotídica específica para cada nucleótido queda destacada en la secuencia.....	15
<b>Tabla 3.</b> Reactivos y concentraciones utilizados en la generación de ADN mutante sintético.....	16
<b>Tabla 4.</b> Reactivos y concentraciones utilizados en las reacciones de amplificación (PCR).....	17
<b>Tabla 5.</b> Reactivos y concentraciones utilizadas en las amplificaciones isotermas.....	17
<b>Tabla 6.</b> Concentración promedio del ADN extraído de las diferentes muestras.....	19
<b>Tabla 7.</b> Rendimiento de amplificación de las diferentes muestras. Valores promedio en número de copias tras la amplificación. Desviación estándar calculada a partir de los 4 pacientes y 4 voluntarios. El ADN molde inicial presentó 1333 copias.....	21
<b>Tabla 8.</b> Ajuste logarítmico de la señal de fluorescencia de la amplificación al disminuir la cantidad de ADN inicial.....	24
<b>Tabla 9.</b> Comparación de las principales características entre las ADN polimerasas Bst y Taq (modificada de Oriol y Noboru Inoue, 2001).....	27
<b>Tabla 10.</b> Valores promedio de rendimiento de amplificación expresado en número de copias obtenidas de la PCR simétrica y asimétrica. Desviación estándar relativa (RSD) a partir de 3 réplicas.....	31
<b>Tabla 11.</b> Valores de RSD (%) obtenidos a partir de la intensidad de las sondas tras la hibridación.....	32
<b>Tabla 12.</b> Estimación del tiempo de análisis de la metodología propuesta.....	34

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ACTB:** Actin beta. Actina beta (gen).

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ARMS:** Amplification refractory mutation system. Sistema de amplificación refractaria de mutaciones.

**ASA:** Allele-specific amplification. Amplificación alelo-específica.

**Bloq:** Agente bloqueante.

**BRAF:** B-raf or v-raf sarcoma viral proto-oncogene. Homólogo del proto-oncogén viral de sacroma murino v-raf.

**Bst:** *Bacillus stearothermophilus*. (Referido a la Bst ADN polimerasa).

**CA 19.9:** Carbohydrated antigen 19.9. Antígeno carbohidratado 19.9.

**CEA:** Carcinoembryonic antigen. Antígeno carcinoembrionario.

**COLD-PCR:** Co-amplification at lower denaturation temperature. Co-amplificación a baja temperatura de desnaturalización.

**DGGE:** Denaturation gradient gel electrophoresis. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante.

**dHPLC:** denaturing high performance liquid chromatography. Cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante.

**DIG:** Dioxigenina.

**dNTPs:** deoxynucleotides. Deoxinucleótidos.

**EDC:** 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid. Ácido etilendiaminotetraacético

**EGFR:** Epidermal Growth Factor. Factor de crecimiento epidérmico.

**FFPE:** Formalin fixed paraffin embeded. Fijado en formalina y embebido en parafina.

**FIT:** Faecal immunochemical test. Test inmunoquímico de heces.

**Grb:** Growth factor receptor bound. Receptor de factor de crecimiento unido.

**HRM:** High resolution melting analysis. Análisis de alta resolución de fusión.

**HRP:** Horseradish peroxidase. Peroxidasa de rábano.

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

**LAMP:** Loop mediated amplification. Amplificación mediada por bucle.

**LNA:** locked nucleic acid. Ácido nucleico bloqueante.

**MES:** 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid. Monohidrato de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico.

**Mut:** alelo mutante.

**NGS:** Next generation sequencing. Secuenciación de siguiente generación.

**NRAS:** Neuroblastoma ras viral oncogene homolog. Homólogo del oncogén viral de neuroblastoma ras.

**PBS-T:** Phosphate buffered saline with 0,05 % (v/v) Tween 20. Tampón fosfato salino con 0,05 % (v/v) Tween 20.

**PC:** policarbonato.

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

**PIK3CA:** Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha. Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfato 3-Quinasa Subunidad Catalítica Alfa.

**PNA:** Peptidic nucleic acid. Ácido nucleico peptídico.

**RBD:** Ras binding domain. Dominio de unión a Ras.

**RI:** Reacción isoterma.

**RSD:** Relative standard deviation. Desviación estándar relativa.

**SDA:** Strand displacement amplification. Amplificación por desplazamiento de cadena.

**SNAPshot:** Single nucleotide primer extension. Extensión del cebador de un único nucléotido.

**Sos:** Son of sevenless. Factor de intercambio de nucleótidos de guanina.

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

**SSCP:** Single stranded conformational polymorphism. Polimorfismo de conformación en simple cadena.

**TAE:** Tris, acetate and EDTA. Tris, acetato y EDTA.

**Tm:** melting temperature. Temperatura de fusión.

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

**V600E:** cambio del aminoácido Valina (V) en posición 600 por ácido glutámico (E).

**Wt:** Wild type. Alelo nativo.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado en hombres y el segundo en mujeres en todo el mundo (GLOBOCAN, 2012), y la mitad de los casos ocurren en los países más desarrollados. Además, en España, el cáncer colorrectal fue el tipo de cáncer más diagnosticado de 2015 para la población en general (SEOM, 2016). Supone más de 100.000 casos al año tanto en EE.UU y Europa (Siegel *et al.*, 2017), por lo que constituye uno de los cánceres más importantes. Prácticamente, afecta a hombres y mujeres por igual, siendo la mayoría de pacientes diagnosticados mayores de 50 años.

El cáncer colorrectal se desarrolla en el colon y en el recto, partes fundamentales del sistema gastrointestinal. El colon constituye la primera parte del intestino grueso, un tubo muscular con 1,5 m de longitud. Es donde se absorben el agua y los nutrientes procedentes de la materia alimentaria, de forma que los restos (las heces) se procesan y pasan al recto, los últimos 15 cm del intestino grueso, hasta que finalmente son expulsadas por el ano.

Los tumores malignos pueden originarse en cada una de las tres capas de ambas partes: mucosa, muscular y serosa. Este tipo de cáncer ocurre mayoritariamente por acumulación de cambios genéticos y epigenéticos en las células, produciendo en mayor frecuencia el adenocarcinoma. Este adenocarcinoma se origina en las células glandulares, productoras del mucus para lubricar los conductos. Al principio se forman pólipos (la forma benigna), en la capa interna del colon o del recto, que pueden ir creciendo y atravesar sus paredes, penetrando en el torrente sanguíneo o los ganglios linfáticos, y llegando a otros órganos como el hígado o los pulmones, originando finalmente la metástasis. En los primeros estadios del cáncer aparecen síntomas como el sangrado en el recto, diarrea o pérdida de peso, entre otros. Sin embargo, se trata de un cáncer prácticamente asintomático hasta que los factores de alarma se desarrollan hacia etapas avanzadas.

### 1.2. Biomarcadores en cáncer colorrectal

Los biomarcadores constituyen herramientas precisas para la detección, el diagnóstico y el pronóstico del cáncer en un paciente, permitiendo elaborar un seguimiento y adaptando el tratamiento a las características de cada uno (medicina personalizada).

Un biomarcador es una molécula biológica que constituye un indicador medible por el cual se puede identificar un proceso patológico o en definitiva, una enfermedad. Este tipo de moléculas se encuentran en la sangre, los fluidos corporales o el ADN. Existen biomarcadores predictivos y pronósticos. Los biomarcadores predictivos son aquellos que proporcionan información sobre la respuesta del paciente al tratamiento recibido por lo que su análisis permite la clasificación de los éstos en susceptibles o no de recibir determinados tratamientos. En el caso de los biomarcadores pronósticos, éstos proporcionan información sobre el curso natural de la enfermedad. Se asocian a la probabilidad individual de supervivencia o de reparación de la enfermedad tanto a nivel local como a distancia.

En el cáncer colorrectal, la detección del biomarcador globina humana en las heces mediante un ensayo inmunoquímico (FIT, *Faecal immunochemical test*) se emplea como prueba de alerta (Das *et al.*, 2017). La determinación en sangre del antígeno carcinoembrionario (CEA) y el CA 19.9 es el ensayo más utilizado. CEA es una glicoproteína de simple cadena que se encuentra en niveles elevados durante el desarrollo embrionario, particularmente en el intestino grueso, y también cuando hay presencia de carcinomas en esta región. Se encuentra en niveles elevados en otros tipos de cáncer como el de mama, pulmón o metástasis en el hígado, y además en personas fumadoras o de edad avanzada (Youssef *et al.*, 2013). El CA 19.9 se sintetiza por células pancreáticas o biliares normales, y está presente en grandes cantidades en el jugo pancreático o el gástrico. Las células tumorales también liberan grandes cantidades de este marcador ya que juega un papel importante en la adhesión de las células tumorales a las endoteliales. Se detecta en suero no sólo en el cáncer

colorrectal, sino también en el pancreático o el hepatobiliar. Todo ello sugiere que el análisis de estos biomarcadores es orientativo ya que pueden aparecer en niveles normales y puede existir un cáncer, o aparecer en niveles elevados y que se deba a causas benignas.

El análisis mutacional de ciertos oncogenes, implicados en la ruta de señalización de proliferación celular, permite predecir la respuesta de los pacientes ante ciertos tratamientos (Van Cutsem *et al.*, 2016). Es el caso de la detección de mutaciones en el oncogén *KRAS*, biomarcador predictivo en la respuesta a las terapias basadas en anticuerpos como Cetuximab y Panitumumab. Los pacientes con cáncer colorrectal metastásico se pueden beneficiar de estas terapias, ya sea en forma de monoterapia o en combinación con la quimioterapia. Numerosos estudios han concluido que los pacientes con mutaciones en varios codones de la familia génica *RAS* (*KRAS* y *NRAS*) no se benefician de dichas terapias (Allegra *et al.*, 2015), por lo que la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO), la Red Nacional Comprensiva del Cáncer (NCCN), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Sociedad Europea para la Oncología Médica (ESMO) recomiendan el análisis mutacional en estos codones en pacientes con cáncer colorrectal avanzado candidatos a recibir esta terapia (EMA.EUROPA.EU, 2016; NCCN.ORG, 2016).

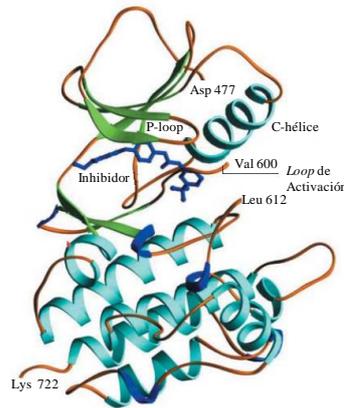
El oncogén *BRAF* es un biomarcador predictivo del cáncer colorrectal avanzado, concretamente, la mutación somática V600E. Esta mutación se relaciona con la falta de respuesta y peor supervivencia ante los tratamientos con anticuerpos monoclonales de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico y que no presentan mutaciones en *KRAS* (Wang *et al.*, 2014). Concretamente, se ha visto que la supervivencia media de estos pacientes con *BRAF* mutante es de 10,4 meses en comparación con los pacientes con tumores no mutantes, cuya supervivencia media es de 34,7 meses. Aproximadamente, del 6 al 8 % de los tumores de cáncer colorrectal son mutantes para *BRAF*. La ESMO recomienda el análisis mutacional de *BRAF* al mismo tiempo que el de *RAS* en pacientes con cáncer colorrectal avanzado para su evaluación pronóstica (Van Cutsem *et al.*, 2016). Por tanto, este biomarcador predictivo constituye una excelente diana de estudio ya que no sólo tiene un papel de clasificación de los pacientes en función del tratamiento más adecuado, sino también permite conocer el curso del cáncer gracias a su papel pronóstico.

### **1.3. Gen BRAF: mutaciones e implicaciones clínicas**

#### **1.3.1. Tipos y frecuencias de las mutaciones en BRAF**

El oncogén *BRAF* (homólogo del oncogén retroviral *v-Raf* de origen murino) codifica la proteína *B-Raf*, una serina/treonina quinasa, que participa en la transmisión de señales químicas desde el exterior hacia el núcleo de las células (**Figura 4**). Concretamente, forma parte de la vía de señalización *RAS/RAF/MAPK*, que controla varias funciones celulares de gran importancia como el crecimiento y división celular (proliferación), la diferenciación y migración de las células, así como la apoptosis. Así, para el funcionamiento normal de las células en el organismo es necesaria una correcta señalización en esta vía.

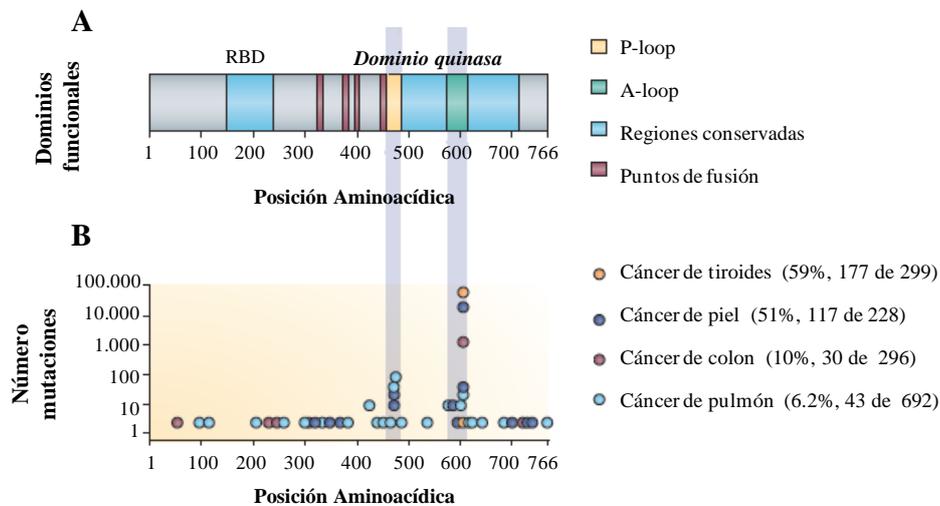
El gen *BRAF* se localiza en la posición 34 del brazo largo (q) del cromosoma 7. Presenta 21 exones y una longitud de 212.438 pb. Codifica para una proteína de 766 aminoácidos y de aproximadamente 84,4 kDa (datos obtenidos de NCBI, 2017; NG\_007873.3).



**Figura 1.** Inhibición de B-Raf (Tomada de Sebolt-Leopold y Herrera, 2004).

La figura muestra un diagrama de la proteína nativa con el dominio quinasa en la conformación para activarse mediante el sustrato fosforilado. Sin embargo, dicha conformación se ve interrumpida por la presencia de un inhibidor que interacciona con residuos tanto en el P-loop como en el A-loop.

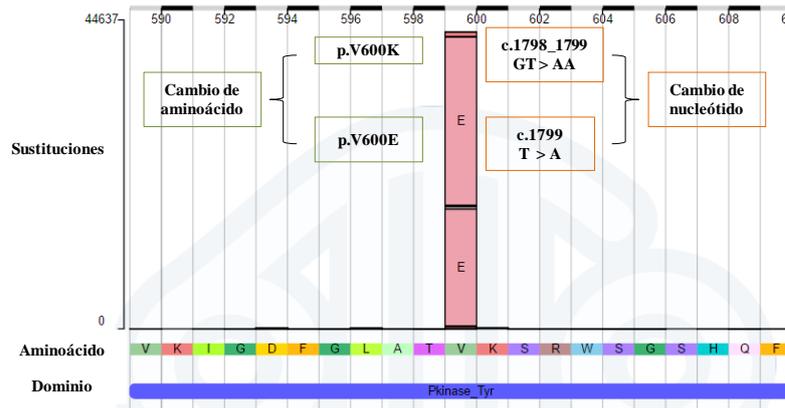
Las mutaciones somáticas en este gen, incluyendo sustituciones, inversiones o deleciones, se comparten en varios tipos de cáncer (**Figura 2**). En pacientes con cáncer de piel (melanomas) y tiroides, la proporción de mutaciones en *BRAF* alcanza un valor superior al del cáncer colorrectal (40% y 12,33%). No obstante, teniendo en cuenta el número de pacientes afectados por cáncer colorrectal, se pone de manifiesto la necesidad de su detección para mejorar los tratamientos administrados (Holderfield *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Mutaciones en *BRAF* en cáncer (modificada de Holderfield *et al.*, 2014).

**A:** dominios funcionales de la proteína afectados por las mutaciones. RBD: ‘*Ras Binding Domain*’, Dominio de unión de Ras. **B:** Espectro de mutaciones en *BRAF* en diversos estudios revisados en diferentes tipos de cáncer. También aparece el porcentaje en el número de casos estudiados para los estudios revisados. Ejes horizontales: posiciones 1-766 en la secuencia de aminoácidos. Eje vertical: número de mutaciones.

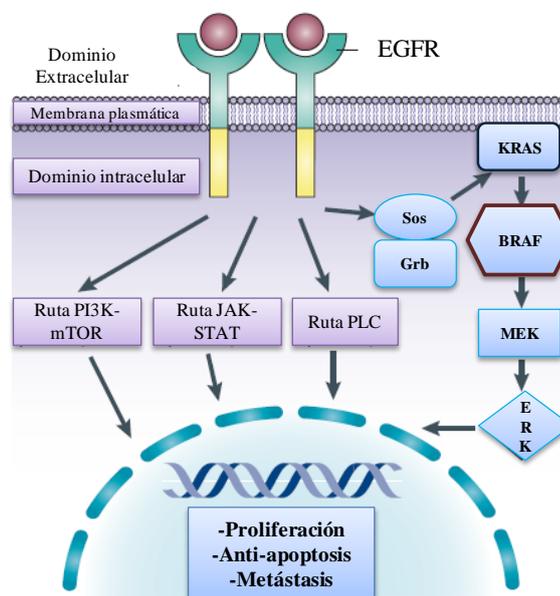
De acuerdo con los datos registrados, el 99,64% de las muestras mutadas presentan una sustitución que provoca una pérdida de sentido (cambio por otro aminoácido diferente), siendo la mutación más frecuente, según el Catálogo de Mutaciones Somáticas (COSMIC), la mutación V600E. Es la sustitución de una timina por una adenina en la posición 1.799 (exón 15), provocando en la secuencia de aminoácidos el cambio de valina en la posición 600 por ácido glutámico (**Figura 3**).



**Figura 3.** Representación de las mutaciones en el dominio tirosina quinasa del gen BRAF (datos obtenidos de COSMIC). A: Adenina , C: Citosina, E: Glutamato , G: Guanina, I: Isoleucina, K: Lisina, L: Leucina, T: Timina, V: Valina.

### 1.3.2. Implicaciones clínicas de la mutación V600E

La proteína B-Raf es un elemento de la ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), crítica en el desarrollo del cáncer (**Figura 4**). Cuando el factor de crecimiento epidérmico interacciona con su receptor, éste homodimeriza y conlleva a su activación en los dominios quinasa intracelulares. A través de proteínas adaptadoras como son Sos y Grb, la cascada de señalización de KRAS se activa, y mediante una fosforilación de las siguientes proteínas participantes, finalmente promueve la transcripción en el núcleo de genes que intervienen en la proliferación celular, la metástasis y la evasión de la muerte celular programada. En consecuencia, para el correcto funcionamiento de la ruta EGFR, ambos genes (KRAS y BRAF) no deben estar constitutivamente activados.



**Figura 4.** Ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (modificada de Walter *et al.*, 2009). Jak: quinasa Janus, PLC: fosfolipasa, STAT: transductor de señales y activador de la transcripción.

La sustitución V600E en el dominio quinasa de B-Raf, provoca su activación constitutiva, sin necesidad de una fosforilación previa, de forma que la cascada de señalización resulta afectada. La conformación inactiva de B-Raf se estabiliza por interacciones entre el A-loop (o *loop* de activación)

y el P-loop del dominio quinasa, tal y como se muestra en el diagrama de la estructura de la proteína (**Figura 1**), concretamente, mediante la interacción de la valina en posición 600 del A-loop con la fenilalanina en posición 468 del P-loop (Holderfield *et al.*, 2014). Cuando la proteína se activa en condiciones normales, se fosforila el A-loop, y cuando se desfosforila, se vuelve a estabilizar la interacción entre ambos dominios. Sin embargo, la mutación V600E provoca un cambio de conformación en el A-loop de tal modo que imita el estado de fosforilación que le proporciona el estado activo. Debido a esto, se han diseñado varios fármacos que inhiben la conformación activa de la proteína, interrumpiendo la unión del sustrato fosforilado al *loop* de activación.

En el caso de las terapias con anticuerpos monoclonales, Cetuximab y Panitumumab, (comercializados como Erbitux y Vecitibix, respectivamente), estos anticuerpos se unen al dominio extracelular de EGFR inhibiendo la activación de la cascada de señalización (impiden la unión del ligando). Esta es la razón por la que las mutaciones en *BRAF* (al igual que en *KRAS*) resultan determinantes en la resistencia de los pacientes ante estas terapias anti-EGFR, ya que independientemente de la señalización por unión del ligando, la vía se encuentra constitutivamente activada (**Figura 4**).

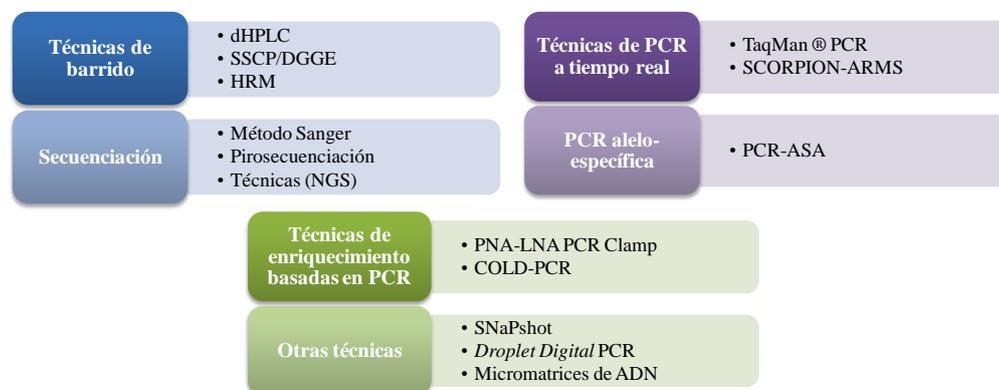
Por tanto, el estado mutacional de *BRAF* presenta varias implicaciones. La primera es que los pacientes con mutaciones en dicho gen, y concretamente la V600E, tienen peor supervivencia y menor probabilidad de beneficiarse de Cetuximab y Panitumumab. La segunda implicación hace referencia a la necesidad de desarrollar tratamientos combinados con estos anticuerpos monoclonales e inhibidores de *BRAF* en la cascada de señalización para los pacientes que *a priori* no pueden beneficiarse de un tratamiento efectivo.

#### 1.4. Tecnologías para el análisis genético

Diferentes autores han recogido las principales técnicas empleadas para el análisis mutacional de oncogenes, aplicadas en tumores sólidos (Mancini *et al.*, 2015; López-Ríos *et al.*, 2013; Heideman *et al.*, 2012; Shackelford *et al.*, 2012; Milbury *et al.*, 2009; Benlloch *et al.*, 2006; Galbiati *et al.*, 2013) (**Figura 5**).

Las muestras de tumores con las que se trabaja de forma rutinaria en los laboratorios clínicos proceden de tejidos biopsiados, embebidos en parafina y fijados en formalina. Sin embargo, este modo de recolección de muestra y este proceso de conservación tiene dos implicaciones en el análisis mutacional. Primero, conlleva una degradación de los ácidos nucleicos, reduciendo el número de copias disponibles. Segundo, las muestras biopsiadas contienen tejidos normales y tumorales, por lo que presentan una elevada cantidad de ADN nativo, dificultando la detección del mutante sobre todo en los análisis en los que se pretende detectar alelos minoritarios.

Por tanto, las técnicas que permitan este análisis requieren una especificidad y sensibilidad definidas para detectar la baja proporción de ADN mutante en un fondo de ADN nativo.



**Figura 5.** Principales tipos de tecnologías más empleadas en el análisis mutacional de oncogenes en cáncer colorrectal.

### 1.4.1. Técnicas de barrido

Existen métodos dirigidos a un análisis preliminar de la presencia o ausencia de la mutación, aunque no son capaces de identificar la sustitución específica.

#### a) dHPLC (*cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante*)

Se trata de una técnica post-PCR, en la que los productos amplificados (ADN mutante y nativo) son separados físicamente debido a las diferencias en sus tiempos de retención en columnas de policarbonato. Su límite de detección puede alcanzar hasta el 1%, aunque depende directamente de su optimización (Shackelford *et al.*, 2012). Esta técnica requiere varios pasos durante el proceso y presenta capacidad limitada de separación electroforética entre los alelos mutantes y nativos.

#### b) SSCP/DGGE

Estas metodologías se basan en la diferente migración de las muestras en gel de electroforesis. El análisis de polimorfismos en la conformación de hebras monocatenarias o SSCP, permite identificar el ADN mutante gracias a su distinta capacidad de migración en el gel por la formación de estructuras secundarias y terciarias, permitiendo discriminar el ADN mutante del nativo. En el caso de la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante o DGGE, se consigue diferenciar el ADN nativo del mutante por la adopción de conformaciones tridimensionales distintas bajo condiciones de desnaturalización débiles.

La principal limitación de estas técnicas es el tamaño del amplicón, ya que resulta imposible una separación con amplicones mayores a 300 pb (Shackelford *et al.*, 2012).

#### c) *Análisis de alta resolución de fusión o 'High Resolution Melting Analysis' (HRM)*

Esta técnica se basa principalmente en la detección de mutaciones o polimorfismos en dobles cadenas de ADN. Mediante el aumento de la temperatura y el uso de un fluoróforo que se intercala en las dobles cadenas, éstas se van desnaturalizando y por tanto la fluorescencia emitida se reduce, generando una curva de desnaturalización específica para cada secuencia de ADN. Es una técnica post-PCR y ampliamente utilizada ya que es rápida, su relación coste/efectividad es muy buena y tiene una elevada sensibilidad. Su límite de detección de mutaciones en presencia de ADN nativo, por lo general, se encuentra entre el 3 y el 10 %, ya que en algunos estudios la pirosecuenciación resulta mejor (Tsiatis *et al.*, 2010).

Para el análisis mutacional de *BRAF*, el HRM se encuentra en la misma línea de sensibilidad que la PCR alelo-específica a tiempo real, y es mejor que la secuenciación o el dHPLC (Pichler *et al.*, 2009). Además, se ha visto que el HRM incrementa su efectividad de dos a cuatro veces más si se emplea en combinación con otras técnicas como SNaPshot (Heideman *et al.*, 2012).

### 1.4.2. Secuenciación

La secuenciación directa es la técnica ampliamente estandarizada para el diagnóstico por su elevada fiabilidad. No obstante, una de las principales desventajas es que su procedimiento conlleva un elevado consumo de tiempo. En el caso de la secuenciación por Sanger, considerada como la técnica '*gold standard*', en el diagnóstico rutinario presenta varias limitaciones, como el requerimiento de varios pasos (PCR, purificación del amplicón, marcaje, etc.) lo que aumenta la probabilidad de contaminación. Además, se requiere una concentración de ADN mutante en la muestra de al menos un 20-25 % (Morandi *et al.*, 2012). Para el análisis mutacional de *BRAF* en pacientes con cáncer colorrectal y a partir de tejidos embebidos en parafina, se ha visto que la PCR a tiempo real presenta la misma fiabilidad que la secuenciación por Sanger, incrementando la relación coste/efectividad (Benlloch *et al.*, 2006).

Una alternativa a la secuenciación directa es la pirosecuenciación, basada en la detección de grupos fosfato liberados tras la incorporación de nucleótidos (secuenciación por síntesis) mediante una reacción quimioluminiscente. La secuencia a analizar es más corta (30-40 pb), pero los límites de detección son menores en comparación con el método Sanger (5-10% del alelo mutado) (Mancini *et al.*, 2015). Se han estudiado y optimizado protocolos que permiten mejorar el límite de detección

de la mutación V600E hasta el 1 % (López-Ríos *et al.*, 2013). Además, existen kits comerciales validados para la detección de las mutaciones más frecuentes en cáncer basados en pirosecuenciación, como es el caso del kit *Therascreen BRAF Pyro Kit* (Qiagen®), que detecta las mutaciones más conocidas en *BRAF* y su uso se extiende a 24 reacciones.

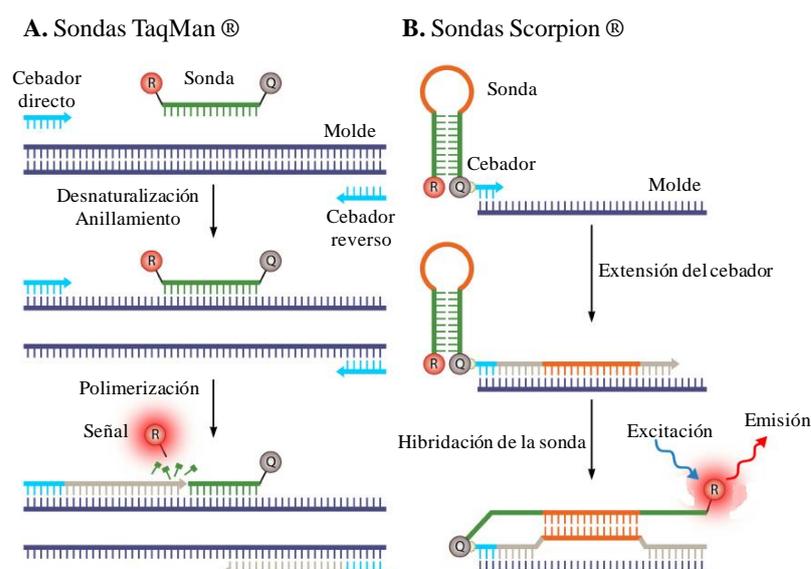
La llegada de las técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS, siglas en inglés) ha conseguido mejorar el límite de detección (1-5 %). Estas tecnologías de alto rendimiento representan el futuro inminente en los estudios de las alteraciones genéticas en cáncer y proporcionan información más extensa de las mismas con menor material tumoral de partida.

Estudios comparativos de estas metodologías demuestran que la sensibilidad analítica de las técnicas NGS es similar a la PCR a tiempo real, resultando ser más ventajosas en el sentido de proporcionar información sobre la frecuencia de las mutaciones así como detectando mutaciones no conocidas (Lu y Lu, 2017). No obstante, el uso rutinario de las técnicas NGS en los laboratorios clínicos requiere estudios de optimización para este tipo de procedimientos (Mancini *et al.*, 2015).

### 1.4.3. Técnicas basadas en PCR a tiempo real

El término ‘a tiempo real’ hace referencia a la detección de los productos amplificados en cada ciclo de la reacción. Los componentes de la mezcla de reacción son los mismos que los de la PCR convencional, excepto el reportero, el cual permite la monitorización de los productos amplificados. Estos sistemas basados en reporteros fluorescentes pueden ser específicos (sondas TaqMan®) y no específicos (SYBR Green). El intercalante SYBR Green presenta afinidad por las dobles cadenas de ADN, y al oxidarse genera una señal fluorescente. Es muy empleado debido a su bajo coste, aunque puede intercalarse en cualquier molécula de doble cadena presente en la reacción, como por ejemplo dímeros de cebadores, y dar resultados inespecíficos.

En cuanto a los métodos específicos, éstos siguen el principio de ‘transferencia de energía de resonancia fluorescente’ o FRET (siglas en inglés) para generar la señal. Esta metodología consiste básicamente en la transferencia de energía de un donador o reportero fluorescente a un aceptor o ‘quencher’, unidos a una sonda (generalmente TaqMan®) que hibrida específicamente a la secuencia diana. Cuando se produce la hibridación, la Taq polimerasa que sintetiza la nueva hebra rompe la unión entre el reportero y el *quencher* de forma que el reportero emite fluorescencia detectada por el equipo (**Figura 6**). El empleo de la PCR a tiempo real con sondas TaqMan® presenta una selectividad entorno al 1% para el alelo mutado (Morlan *et al.*, 2009).



**Figura 6.** Representación de la tecnología de sondas TaqMan® y Scorpion® en la PCR a tiempo real (modificada de Verweij y Stensvold, 2014). R: reportero. Q: *quencher*.

La PCR a tiempo real compite con la secuenciación directa para el análisis mutacional en los laboratorios clínicos. Concretamente, para la detección de la mutación V600E en *BRAF*, se ha visto que la TaqMan® PCR es una tecnología altamente sensible y con relación coste/efectividad mucho mayor que la de la secuenciación (Benlloch *et al.*, 2006).

También existen procedimientos comerciales implementados en los laboratorios clínicos, como es el caso del ensayo COBAS 4800 *BRAF Mutation Test*® (Roche Molecular Diagnostics®) basado en una PCR a tiempo real que mediante dos sondas TaqMan® (nativa y mutante) detecta la mutación V600E en muestras procedentes de tejidos embebidos en parafina.

Se han desarrollado metodologías que emplean la PCR a tiempo real en combinación con otras, como el sistema de amplificación refractaria de mutaciones (ARMS PCR, siglas en inglés) con sondas Scorpion® (*SCORPION-ARMS*). Los ARMS son cebadores diseñados específicamente para hibridar con la secuencia mutante y permitir su amplificación. La detección de estas secuencias amplificadas se lleva a cabo usando los oligonucleótidos bifuncionales denominados *Scorpions*. Éstos, contienen un cebador de PCR unido covalentemente a una secuencia bloqueante que a su vez se acopla a una sonda fluorescente de secuencia complementaria/específica a la secuencia mutante, todo ello formando una estructura de horquilla. En el extremo 5' de la sonda hay un fluoróforo unido que interacciona con el *quencher*, presente en el extremo 3' para impedir la fluorescencia por cercanía física (**Figura 6**).

Durante la PCR, cuando tiene lugar el paso de desnaturalización, se abre la horquilla y la sonda se une al amplicón, produciéndose el aumento de la señal fluorescente (el *quencher* queda alejado del fluoróforo). La secuencia de la sonda no actúa como cebador gracias al bloqueante entre la sonda y el cebador, evitando que la apertura de la horquilla en ausencia de la secuencia diana produzca señal no específica (Thelwell *et al.*, 2000).

La reacción es instantánea, proporciona tiempos de reacción más cortos y una mejor discriminación. Además, esta técnica se caracteriza por ser altamente selectiva, con un límite de detección del 1% de ADN mutado, aunque sólo es capaz de identificar mutaciones conocidas.

Se han desarrollado diversos kits para el empleo de esta técnica, como el *Therascreen BRAF RGQ PCR Kit* (Qiagen®) (230 €), diseñado para determinar varias mutaciones en un total de 24 reacciones en un equipo específico de PCR a tiempo real (*Rotor-GeneQ*).

### 1.4.4. Técnicas de amplificación alelo específica

Uno de los procedimientos más utilizados es la PCR-ASA (*'Allele-Specific Amplification'*) o PCR Alelo-Específica, ya que es una de las metodologías más sencillas y más económicas para la detección de mutaciones puntuales.

Consiste en el empleo de 3 cebadores, uno directo (común para ambos tipos de variantes) y dos reversos. Uno de los reversos es complementario al alelo nativo y el otro es complementario al alelo mutante. Las muestras se preparan en dos mezclas de reactivos, una con el cebador para el alelo mutante y otra con el cebador del nativo. Tras la reacción, mediante una electroforesis en gel de agarosa se puede detectar la presencia/ausencia de alelos mutantes y nativos en la muestra (Laczmanska *et al.*, 2009).

Su selectividad para el alelo mutante se encuentra entre valores de  $10^{-1}$  y  $10^{-3}$  (Milbury *et al.*, 2009). Es considerada una técnica con una sensibilidad significativamente mayor que la secuenciación (puede detectar hasta <1% del ADN mutante), y está indicada para el análisis de mutaciones conocidas en muestras embebidas en parafina y fijadas en formalina que contienen pocas células tumorales (Mancini *et al.*, 2015). No obstante, su principal límite es la presencia de falsos positivos, además de ser muy sensible a pequeños cambios en las condiciones del proceso, lo que disminuye su reproducibilidad (Dominguez y Kolodney, 2005).

#### 1.4.5. Técnicas de enriquecimiento basadas en PCR

Son estrategias que mejoran la selectividad del análisis porque existe un enriquecimiento o amplificación dirigida al aumento de la concentración de ADN mutado frente al nativo.

##### a) PCR Clamp

Mediante un procedimiento de PCR Clamp (PCR bloqueante), se produce la hibridación de oligonucleótidos bloqueantes con la secuencia nativa, de forma que los cebadores se unen preferentemente a las cadenas mutantes, promoviendo su amplificación. La selectividad de esta tecnología se encuentra en el rango del 0,1-1 % (Milbury *et al.*, 2009), aunque requiere de procesos de diseño experimental y optimización del procedimiento a las técnicas existentes.

Esta técnica de enriquecimiento puede emplear ácidos nucleicos peptídicos (PNAs, siglas en inglés) o LNA (*'Locked Nucleic Acid'*), oligonucleótidos con una afinidad elevada por las secuencias de ADN nativo, razón por la cual reciben el nombre de oligonucleótidos bloqueantes.

##### b) COLD-PCR

La coamplificación a baja temperatura de desnaturalización-reacción en cadena de polimerasa, se posiciona un paso por delante de la PCR convencional y es empleada previamente a la secuenciación o a ensayos de genotipado para mejorar la sensibilidad en la detección de los alelos mutados hasta 100 veces más (Jin Li *et al.*, 2008).

Básicamente, la COLD-PCR consiste en una PCR en la que tras el paso de desnaturalización de las cadenas, la temperatura se reduce a un valor tal que se produce una hibridación cruzada de las cadenas de ADN nativas con las de ADN mutado, originándose una incompatibilidad entre ambas cadenas debido a las variaciones nucleotídicas. La temperatura vuelve a elevarse hasta un valor inferior al de *melting* o fusión ( $T_m$ ) de las cadenas completamente emparejadas, de tal modo que las dobles cadenas de ADN mutado y nativo se desnaturalizarán, frente a las completamente emparejadas, que tardarán más en desnaturalizarse. Finalmente, la temperatura se reduce hasta la de alineamiento de los cebadores, que amplificarán las secuencias preferencialmente desnaturalizadas, es decir, las mutantes.

Requiere un control preciso de la temperatura de desnaturalización durante la reacción (dentro de  $\pm 0.3^\circ\text{C}$ ), está restringida al análisis de secuencias cortas ( $\sim 200$  bp) y es susceptible a los errores de la polimerasa. No obstante, su selectividad presenta valores de  $10^{-1}$ - $10^{-4}$  (Jin Li *et al.*, 2008), y sus principales ventajas son la simplicidad en la realización, amplificación de variantes tanto conocidas como desconocidas y aplicabilidad posterior a la secuenciación (Milbury *et al.*, 2009).

#### 1.4.6. Otras técnicas

##### a) SNaPshot

En los laboratorios clínicos también se emplean otras metodologías que caracterizan las mutaciones en *BRAF*, como es el caso de la tecnología SNaPshot, que permite la identificación rápida y simultánea de las mutaciones más importantes.

Su química se basa en la extensión de una única base con nucleótidos didesoxi de un cebador sin marcaje. Estos nucleótidos didesoxi (ddNTPs) están marcados con un color de fluorescencia determinado, de tal modo que tras el registro de la señal, se conoce qué base ha sido incorporada.

Esta tecnología puede analizar hasta diez sustituciones nucleotídicas en una sola reacción, caracterizando específicamente la mutación. Sin embargo, las mutaciones menos frecuentes o raras no son investigadas. La sensibilidad de la técnica es del 5 %, aunque, con la combinación de otras técnicas se consigue mejorar, como la combinación HRM-SNaPshot para la detección de las mutaciones en *BRAF*, con una sensibilidad analítica del 1,25 % (Heideman *et al.*, 2012).

### b) Droplet digital PCR o Tecnología ddPCR

Esta tecnología consiste en una PCR digital que emplea un sistema de gotas específico a partir de una emulsión agua-aceite, de forma que se produce una partición masiva de la muestra en 20.000 gotas (en < 2 min, 8 muestras se convierten en 8 sets de 20.000 gotas). Estas gotas funcionan igual que los tubos individuales en una PCR convencional, pero con la ventaja de que el formato es mucho más pequeño (escala nanolitro) y la amplificación ocurre masivamente, permitiendo la medición de miles de eventos de amplificación independientes a partir de una sola muestra. La cantidad de muestra requerida es mucho menor en comparación con otros sistemas de PCR digital.

Tras la PCR, cada gota se detecta por citometría de flujo y se clasifica en positiva o negativa para la amplificación. A su vez, por fluorescencia se cuantifica el ADN generado. Existen sistemas automatizados que permiten que la tecnología sea accesible al laboratorio de trabajo.

La sensibilidad de esta tecnología es muy elevada, detectando la fracción de ADN mutante en un exceso de ADN nativo de 100.000 veces más, ya que, de media, el enriquecimiento de las moléculas mutantes por reacción es proporcional al número de particiones de la muestra. Por ejemplo, en ensayos para la detección de la mutación V600E en *BRAF*, se ha demostrado que esta tecnología permite detectar una fracción de ADN mutante del 0,001%, 1.000 veces menos que la PCR a tiempo real (Hindson *et al.*, 2011).

Una de las principales desventajas es que requiere un equipamiento especializado y reactivos específicos, como por ejemplo el kit ddPCR™ *BRAF V600 Screening kit*, valorado en 2.000 € y que permite 200 usos. Este kit se emplea en el sistema QX200™, uno de los diferentes equipos que realizan la *Droplet Digital PCR*.

### c) Micromatrices de ADN

Las micromatrices constituyen una herramienta precisa y de bajo coste para el genotipado en paralelo de múltiples marcadores, adecuada para el diagnóstico rutinario en los laboratorios clínicos. Los biosensores de ADN, micromatrices de ADN (*‘microarrays’*) o también llamados comúnmente chips de ADN, se basan en la unión por complementariedad de sondas de ácidos nucleicos de simple cadena. Estos sistemas requieren de la inmovilización de estas sondas en la superficie para reconocer a su secuencia diana complementaria por hibridación.

Se han desarrollado numerosos sistemas basados en esta hibridación en disolución o en soporte sólido, permitiendo la visualización rápida de los resultados mediante marcaposibles variados como la detección quimioluminiscente, colorimétrica, etc., (Sassolas *et al.*, 2008). Ofrecen una elevada sensibilidad. Para las mutaciones en *KRAS* y *BRAF* se ha conseguido una sensibilidad del 0,01 % (Galbiati *et al.*, 2013). Además, existen procedimientos de enriquecimiento de las muestras en ADN mutado y posterior hibridación de las mismas en chips comerciales e implementados en rutina clínica, como es el caso del sistema INFINITI® *KRAS-BRAF Assay* (Autogenomics, Inc.) que permite el análisis de un amplio rango de mutaciones (Weyant *et al.*, 2014).

## 1.4.7. Comparación de los métodos de análisis genético

Muchas de las técnicas de análisis genético son simples de manejar y aplicables de forma rutinaria. No obstante, su selectividad puede no ser suficiente para determinadas mutaciones. Así, surgen las técnicas con mayor selectividad, aunque su aplicación en diagnóstico clínico rutinario se ve afectada por la dificultad en el manejo, el consumo de tiempo o el coste.

Todas ellas tienen como base principal la detección de las mutaciones presentes en las muestras tumorales embebidas en parafina. Estos análisis deben ser rápidos, para la clasificación de los pacientes en el menor tiempo posible, y de bajo coste para su implantación en la mayor parte de laboratorios clínicos.

La secuenciación destaca por la elevada fiabilidad de los resultados, aunque los tiempos de análisis son largos y se requiere mucha cantidad de muestra mutante. Estas dificultades pueden ser

superadas por las tecnologías SSCP, DGGE, dHPLC o HRM, ya que requieren menor cantidad de alelos mutantes y garantizan una evaluación primaria del producto amplificado sin riesgo de contaminación. Sin embargo, no sirven para identificar mutaciones específicas y es necesaria la aplicación consecutiva de un método directo de confirmación de los resultados analíticos (Mancini *et al.*, 2015).

La capacidad de evaluar diferentes muestras en paralelo se consigue con técnicas implementadas clínicamente como la PCR-ASA, ARMS o micromatrices. Todas destacan por su elevada selectividad y multiplexado, aunque en el caso de las variantes de PCR, requieren el uso termocicladores y reactivos especiales de gran coste. En este sentido, el análisis con micromatrices permite la identificación rápida y concreta de la base mutada con un equipamiento de bajo coste. A partir de la información bibliográfica, se han comparado las técnicas empleadas para el análisis de *BRAF*, ordenadas de menor a mayor sensibilidad para el ADN mutante (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Comparación de los principales métodos aptos y empleados para el análisis de *BRAF*.

Método	Sensibilidad (% de ADN mutado)	Características	Tiempo	Ref.
<i>Método Sanger</i>	10-20	Caracterización de todas las mutaciones Requiere elevada cantidad de ADN mutado	2 días (1 o más muestras/encendido, dependiendo de la instrumentación disponible)	Mancini, <i>et al.</i> , 2015.
<i>Piro-secuenciación</i>	1-5	Detecta las variaciones en las 30-40pb desde el cebador Depende de optimización	1 día (hasta 96 muestras/encendido)	López-Ríos <i>et al.</i> , 2013; Mancini <i>et al.</i> , 2015.
<i>SNaPshot</i>	1-5	Caracteriza específicamente la mutación En combinación con otras técnicas aumenta la sensibilidad	7 horas (10 muestras/encendido y análisis)	Heideman <i>et al.</i> , 2012.
<i>SSCP/DGGE</i>	5	Teóricamente, todas las sustituciones nucleotídicas dentro de la secuencia amplificada (PCR)	1 día (aprox. 24 muestras/encendido)	Shackelford <i>et al.</i> , 2012.
<i>dHPLC</i>	3-5	Requieren confirmación	Pocas horas (1 muestra/encendido)	Shackelford <i>et al.</i> , 2012.
<i>HRM</i>	3-5		Pocas horas (96 muestras/encendido)	Tsiatis <i>et al.</i> , 2010.
<i>Scorpion</i>	1	Tiempos de reacción cortos	< 8 h	Thelwell <i>et al.</i> , 2000.
<i>ARMS</i>		Requieren cebadores y sondas específicas para cada variante	< 3 h	Milbury <i>et al.</i> , 2009.
<i>PCR Clamp</i>	0,1-1		< 3 h	Milbury <i>et al.</i> , 2009.
<i>PCR-ASA</i>	0,01	Rápida, sensible Puede dar lugar a falsos positivos	< 3 h	Milbury <i>et al.</i> , 2009.
<i>Micromatrices</i>	0,01	Permiten el multiplexado y son de bajo coste	< 3 h	Galbiati <i>et al.</i> , 2013; Milbury <i>et al.</i> , 2009.

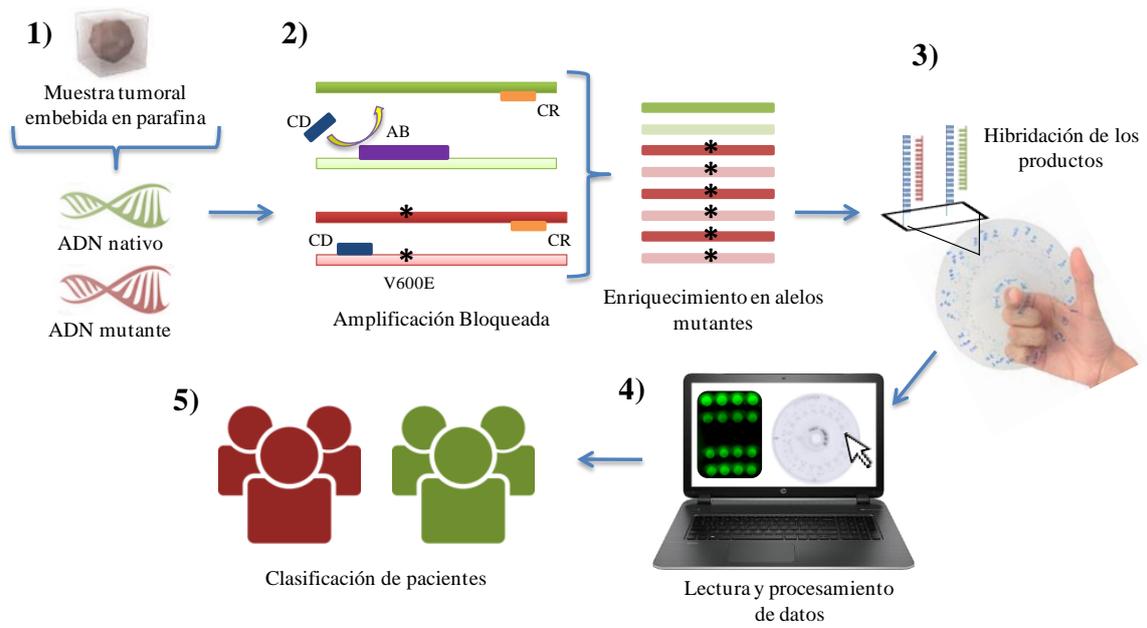
#### 1.4.8. Métodos alternativos

El principal objetivo de las técnicas de análisis mutacional de los genes implicados en cáncer colorrectal (y en el resto de cánceres sólidos), es poder evaluar el perfil molecular y elaborar una terapia personalizada a los pacientes. Además, deben permitir el asesoramiento médico tras la cirugía, pronosticar o monitorizar las recaídas. A pesar de la amplia oferta de tecnologías disponibles, no se trata de un campo científico-técnico completado. Existe una gran variedad de escenarios clínicos no cubiertos, ya que no todos los sistemas sanitarios poseen la capacidad para incorporar muchas de estas tecnologías. Asimismo, la demanda también es variable en función del tipo de mutación, tipo de muestra a ensayar o la preparación de la misma. De este modo, existe una clara necesidad de estrategias que puedan ofrecer resultados en poco tiempo, con una sensibilidad y selectividad definidas. Otro de los retos, es mejorar la capacidad para discriminar la fracción mutante de la nativa en las muestras tumorales, ya que los tejidos biopsiados presentan un exceso de ADN nativo procedente del tejido no tumoral. Diferentes grupos de investigación están estudiando variantes de la PCR que permitan el enriquecimiento y posterior detección del alelo mutado de forma más asequible y efectiva (Milbury *et al.*, 2009; Morandi *et al.*, 2012).

Para el análisis mutacional de *BRAF*, como al resto de genes considerados biomarcadores de enfermedades, es esencial el desarrollo de dispositivos ‘*point-of-care*’ (Jani, 2013). Estos dispositivos se caracterizan por proporcionar pruebas médicas *in vitro* sencillas, rápidas y fiables, a partir de tejidos como epitelial, sangre u orina. Debido a la expansión de los servicios sanitarios, existe una elevada demanda por este tipo de pruebas, para la identificación de pacientes, determinación de la prognosis, monitorización del tratamiento y facilitar la prevención. Ejemplos de dispositivos ‘*point-of-care*’ son las pruebas para la detección del VIH (Virus Inmunodeficiencia Humana), diagnóstico de la tuberculosis o resistencia a antibióticos, entre otros. Las actuales tendencias en este campo son el aumento de la capacidad de multiplexado (detección de múltiples dianas), manteniendo el reducido tamaño, simplicidad y mínima instrumentación de esta aproximación. Todo ello promoverá su extensión desde los laboratorios hasta las clínicas y comunidades más remotas, facilitando la sostenibilidad de los programas de control de enfermedades. Por tanto, los avances en dichos sistemas, en primer lugar, permitirán un mejor flujo en la atención de los pacientes, incrementando la rapidez en las pruebas y en consecuencia, aumentando la variedad de servicios asociados.

Desde el punto de vista de la investigación básica-aplicada, para alcanzar estas tecnologías integradas, una etapa clave es el desarrollo de nuevas metodologías de ensayo (Tortajada-Genaro *et al.*, 2016; Lucas-Garrote *et al.*, 2017). En este sentido, se ha investigado metodologías alternativas basadas en la amplificación isoterma (Asiello y Baumner, 2011). Estos métodos no requieren de ciclos térmicos y emplean enzimas presentes en los mecanismos de síntesis de ADN *in vivo*. Así, la aproximación isoterma se presenta como una alternativa muy interesante para las regiones y/o hospitales sin acceso a tecnologías más económicas y con mayor equipamiento. Además, esta tecnología promueve el futuro diseño de sistemas portátiles y de bajo consumo, que consigan los objetivos de las técnicas de análisis mutacional.

De acuerdo al análisis bibliográfico realizado y a la experiencia del grupo investigador, una vía prometedora son los métodos de biosensado basados en hibridación tras un enriquecimiento de los alelos mutantes mediante la amplificación en presencia de un agente bloqueante (**Figura 7**). Esta metodología cumpliría con los requisitos demandados en la práctica clínica. Consistiría en extraer el ADN de muestras de tejido biopsiado embebidas en parafina y realizar una amplificación mediante el empleo de un agente bloqueante que permita el enriquecimiento de alelos mutantes, superando el problema de su baja concentración. Después del enriquecimiento, los productos (alelos nativos o mutantes) serían detectados mediante un biochip con sondas complementarias para cada uno, permitiendo identificar la mutación presente. Por lo tanto, esta metodología permitiría, mediante un único ensayo, el pronóstico y la clasificación de los pacientes con cáncer colorrectal en el grupo poblacional más adecuado para recibir el tratamiento personalizado.



**Figura 7.** Esquema del procedimiento de la metodología propuesta.

CD: cebador directo; CR: cebador reverso. AB: Agente bloqueante. V600E: mutación del gen *BRAF* a estudiar.

## 2. OBJETIVOS

En este trabajo de fin de grado se pretende conseguir la evaluación de ensayos para el análisis de la mutación V600E presente en el oncogén *BRAF*, con el objetivo de clasificar a los pacientes con cáncer colorrectal. El trabajo se centra principalmente en el empleo de un agente bloqueante de la amplificación del alelo nativo como método de enriquecimiento de alelos mutantes, para la posterior confirmación de la mutación por un ensayo selectivo de hibridación.

Se pretende estudiar metodologías sencillas, económicas, robustas y sensibles que apoyen el posterior desarrollo de herramientas de análisis mutacional para el diseño de tratamientos personalizados en la práctica clínica rutinaria.

Para alcanzar dicho objetivo principal, se propone los siguientes objetivos parciales:

- Estudio de aproximaciones basadas en PCR y evaluar la amplificación isoterma para lograr la amplificación de la región diana.
- Estudio del enriquecimiento de variantes mutantes mediante amplificación bloqueada, optimizando la secuencia y concentración del agente bloqueante.
- Seleccionar las condiciones para la detección de los productos mediante hibridación.
- Analizar muestras de individuos voluntarios y pacientes con cáncer colorrectal.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se ha realizado en el contexto del proyecto ONCOMARKER (MINECO RTC-2015-3625-1) en el que participan el Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), el Hospital Universitario La Fe y las empresas biotecnológicas Imegen (Instituto de Medicina Genómica, S.L) y Celeromics Technologies S.R.L.

#### 3.1. Reactivos

Los oligonucleótidos que actúan como cebadores, bloqueantes o sondas fueron seleccionados para la detección de la mutación c.1799 T > A (V600E) en el gen *BRAF*. Como gen de referencia de la amplificación de ADN humano, se empleó el gen *ACTB* (actina beta), que codifica para seis proteínas diferentes de la actina, altamente conservadas y necesarias para la integridad de las células. Para la selección de ambos conjuntos de oligonucleótidos, se emplearon los programas bioinformáticos OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) y Primer3Plus (<http://primer3plus.com/>).

Los oligonucleótidos diseñados se recogen en la **Tabla 2**. En el caso de los cebadores reversos, se incluyó la funcionalización en el extremo 5' con dioxigenina que permite la posterior detección en los ensayos de hibridación. Las sondas contenían funcionalización amino para permitir el anclaje covalente al sustrato sólido (biochip).

**Tabla 2.** Tipos y propiedades principales de los oligonucleótidos empleados. La variante nucleotídica específica para cada nucleótido queda destacada en la secuencia.

Gen	Tipo oligonucleótido	Secuencia	T <sub>m</sub> Calc (°C)
<i>BRAF</i>	Cebador directo	TGATGGGACCCACTCCATC	59,5
	Cebador reverso	DIG-TTTCTTCATGAAGACCTCACAG	58,4
	Bloqueante 1	CCATCGAGATTTCACTGTAGCTAGA-TTCC	64,1
	Bloqueante 2	CCATCGAGATTTCACTGTAGCTAGACCAATTCC	72,5
	Sonda wt	NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -T <sub>5</sub> -CCATCGAGATTTCACTGTAGCTAGA	64,1
	Sonda mut	NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -T <sub>5</sub> -CCATCGAGATTTCTCTGTAGCTAGACC	68,2
<i>ACTB</i>	Cebador directo	GCACCACACCTTCTACAATGAG	62,1
	Cebador reverso	DIG-GGCCACCAGAAGAGGTAGC	61,6
	Sonda gen	NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -T <sub>5</sub> -CAACCGCGAGAAGATGACCCAGATCA	69,5

T<sub>m</sub>: temperatura de 'Melting' o de fusión; DIG: dioxigenina; wt: nativo o 'wild type'; mut: mutante (mutación c.1799 T > A V600E); NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>: sondas aminadas con adaptador de 6 carbonos.

Para los ensayos de hibridación, los reactivos empleados fueron: hidróxido de sodio (NaOH 1M: 40 g NaOH con 1 L de agua destilada), monohidrato de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), formamida, glicerol (85 x) y Denhardt's (50 x, Thermo Fischer Scientific, EEUU). Las disoluciones stock fueron: de impresión (MES 0.1 M, pH 5.5, EDC 40 mM); hibridación (salino-citrato de sodio (SSC) 20 x: cloruro de sodio 3000 mM, citrato de sodio 300 mM, pH 7.0, con formamida al 10 %); lavado (solución salina tamponada con fosfato y tween 20 (PBS-T): 10 mM de tampón fosfato salino con 0.05 % de tween 20, pH 7.4). Para la detección de los productos mediante electroforesis, se empleó el tampón TAE (Fischer Scientific®, 25 x): Tris (64,36 %), ácido acético, sal de sodio (31,91 %) y ácido etilendiamino tetracético (3,72%), pH 8.3.

#### 3.2. Generación de ADN mutante

Para poner a punto las condiciones del ensayo, se sintetizó un ADN mutante para el oncogén *BRAF* a partir de oligonucleótidos proporcionados por la compañía Eurofins Genomics®. La secuencia del ADN mutante sintético de simple cadena o ssDNA ('single stranded DNA') fue: 5'-

TTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATC TCGATGGAGTGGGTCCCATCA-3'. El nucleótido 53 de la secuencia de 80 nucleótidos corresponde con la posición de la mutación V600E.

El ADN mutante en forma de doble hebra o dsDNA (*'double stranded DNA'*) se obtuvo mediante una amplificación basada en PCR realizada en un termociclador (UNO, VWR®). El oligonucleótido (10 µM) se añadió a una mezcla de reacción descrita en la **Tabla 3**. El programa de termociclado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, anillamiento a 58 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 60 s. Finalmente, un ciclo de extensión final durante 5 min.

Para obtener el rendimiento de la amplificación en número de copias generadas, se cuantificó el producto mediante fluorescencia, empleando el fluoróforo SYBR (intercalante del ADN de doble cadena), 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). Los productos generados se conservaron a -20 °C.

**Tabla 3.** Reactivos y concentraciones utilizados en la generación de ADN mutante sintético.

Reactivos	Concentración
Tampón de reacción 10 x	1 x
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3 mM
dNTPs 10 mM	200 µM
Cebador directo 10 µM	300 nM
Cebador reverso 10 µM	300 nM
Taq 1 U/µL	0,04 U/µL

### **3.3. Obtención de muestras de ADN genómico humano**

Las muestras de ADN nativo se tomaron del epitelio bucal de diferentes voluntarios siguiendo las directrices de la declaración de Helsinki (*"World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects"*, 2014). La extracción del ADN genómico se realizó utilizando el kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen®). Brevemente, los hisopos se sumergieron en 500 µL de PBS (1 x) y 20 µL de Proteínasa K. Se añadieron 20 µL de RNAsa, incubando la solución a temperatura ambiente durante 2 min. Después, se añadió 20 µL de tampón de lisis, y la disolución se incubó a 55 °C durante 20 min, agitando cada 5 min. Se añadieron 500 µL de etanol al 96 % y se vorteoó ligeramente. Después, se transfirió el lisado a la columna PureLink Spin Column, para la centrifugación a 10.000 g durante 1 min. Una vez descartado el líquido en de la parte inferior de la columna, se añadieron 400 µL de tampón de lavad y se centrifugó también a 10.000 g. Tras la centrifugación, se procedió a la elución con tampón Tris a pH 3,6. Las columnas se transfirieron a un tubo Eppendorf estéril y con 25 µL de Tris 10 mM a pH 3,6 se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 1 min. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad por 1 min, y se añadió de nuevo 2,5 µL del tampón Tris a 10 mM. Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 min y se volvió a centrifugar a máxima velocidad, recuperando el ADN.

Las muestras de tumores de cáncer colorrectal procedieron de tejidos biopsiados de pacientes del Servicio de Oncología del Hospital Clínico Universitario de La Fe (Valencia, España). La extracción de ADN a partir de las muestras impregnadas en parafina se realizó en el Servicio de Análisis Clínicos del hospital. Se utilizó los reactivos proporcionados en QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen®).

La concentración de ADN extraído, expresada en ng/µL, se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm con el equipo de espectrofotometría NANODROP 2000 Thermo Scientific.

### 3.4. Amplificaciones mediante PCR

Las amplificaciones de muestras de ADN sintético o genómico (4 ng/μL) se realizaron en base a la mezcla de reacción descrita en la **Tabla 4**. En ciertos experimentos, a la mezcla de reacción se adicionó el agente bloqueante 1 o el agente bloqueante 2 a diferentes concentraciones. En el caso del cebador directo, éste se añadió a una concentración inferior en las amplificaciones asimétricas (diferente proporción de cebadores directo/reverso).

La reacción se realizó en un termociclador (UNOCYCLER, VWR®) siguiendo los mismos pasos descritos para la generación del ADN mutante sintético de doble cadena.

**Tabla 4.** Reactivos y concentraciones utilizados en las reacciones de amplificación (PCR).

Reactivos	Concentración
Tampón de reacción 10 x	1 x
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3 mM
dNTPs 10 mM	200 μM
Cebador directo 10 μM	100 o 300 nM
Cebador reverso 10 μM	300 nM
Bloqueante 10 μM	[0,600] nM
Taq 1 U/μL	0,04 U/μL
ADN sintético o	16.000-40.000 copias
ADN genómico	0,32 ng/μL

### 3.5. Amplificaciones isotermas

Las amplificaciones de muestras de ADN sintético o genómico (4 ng/μL) se realizaron en base a la mezcla de reacción isotérmica que contenía 20 mM de Tris-HCl, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM de KCl, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.1 % de Tween® 20 a un pH de 8.8.

Las amplificaciones isotermas se realizaron mediante un termociclador (ESQUANT TS2, Qiagen®) a una temperatura de 63°C durante 80 minutos y bajo las condiciones expuestas en la **Tabla 5**. Se registró la señal de fluorescencia a tiempo real (cada min) utilizando el fluoróforo SYBR como marcador (470/520 nm) y ROX como control interno (560/620 nm).

**Tabla 5.** Reactivos y concentraciones utilizadas en las amplificaciones isotermas.

Reactivos	Concentración
Tampón RI 10 x	1 x
MgSO <sub>4</sub> 100 mM	6 mM
dNTPs 10 mM	0,4 mM
Cebador directo 10 μM	600 nM
Cebador reverso 10 μM	600 nM
Bloqueante 10 μM	[0,300] nM
Enzima BST 8 U/μL	0,3 U/ μL
ADN sintético o	16.000 - 40.000 copias
ADN genómico	0,32 ng/μL
SYBR 80 x	4 x
Control ROX 50 x	0,5 x

### 3.6. Medidas post-amplificación

La cuantificación del producto de amplificación se realizó mediante fluorescencia, utilizando el fluoróforo SYBR (SYBR Safe, Invitrogen®), 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), midiendo la señal para el canal 480 nm/535 nm.

Se determinó la presencia de producto de amplificación deseado mediante electroforesis en gel de agarosa (Fischer Scientific®) al 3 %. Se llevó a cabo en medio tampón TAE (0,5 x), y los productos de amplificación fueron diluidos (1:2) en tampón de carga. Después de 40 min a 110 V, el gel se

reveló mediante SYBR (5 x, RealSAFE®). La distancia recorrida por los productos fue de 4 cm. El marcador de pesos moleculares fue de 650-25 pb (EXACTGene 50 pb, Mini DNA Ladder, Fischer Scientific®).

### **3.7. Detección: Preparación del chip**

La identificación de los productos generados se realizó mediante un ensayo de hibridación en fase sólida en formato de micromatrices, siendo la plataforma analítica un chip de policarbonato (PC). La activación química de la superficie del chip de PC (Makrolon®) se logró mediante irradiación durante 5 min con luz UV (254 nm, 50mW/cm) con el equipo UVOH 150LAB (FHR, Ottendorf-Okrilla, Alemania), seguido de la inmersión del sustrato en disolución de NaOH 1M a 60 °C durante 10 min. Se lavó con agua destilada, conservándose a 4 °C hasta su uso.

Las sondas aminadas se prepararon en medio MES 0,1 M, pH 5.5 a una concentración de 150 nM con 20 mM de EDC. Las disoluciones fueron impresas (50 nL, 4 filas × 4 columnas, 4 réplicas/sonda, 20 micromatrices) en la superficie activada utilizando un equipo de impresión sin contacto (AD1500, Biodot. Inc., Irvine, CA). Tras 60 min a temperatura ambiente, el chip de PC se lavó con PBS-T y agua destilada, y se secó con aire comprimido, conservándose a 4 °C hasta su uso.

### **3.8. Detección: Hibridación, revelado y lectura**

Para la apertura de las dobles hebras de los amplicones, se preparó una mezcla de: tampón SSC 2 x, formamida 10 x (Scharlab®), Denhardt's (Sigma-Aldrich) 2,5 x (1 % Suero de Albúmina Bovina (BSA), 1 % Ficoll y 1 % polivinilpirrolidona (PVP) con agua), antisonda (1:20) (control positivo del ensayo) y producto de amplificación (1:10). La mezcla se calentó a 98 °C durante 10 min y se incubó 1 min en frío (4 °C). Tras la incubación, se dispensó en el chip, incubándose a 37 °C durante 1 h. El control positivo del ensayo fue: sonda NH<sub>2</sub>-T<sub>10</sub>-TTCCATTGCTTTTTTGATTACAGCCGGTGTA CGACCCT (T<sub>m</sub> = 67,9 °C) anti-sonda: DIG-AGGGTCGTACACCGGCTGTAATCAAA (T<sub>m</sub> = 67,9 °C).

Posteriormente, el chip se lavó con SSC 0,1 x y SSC 0,01 x, y se dispensó 800 µL de la disolución de revelado, compuesta por: 16 µL de una mezcla de un anticuerpo primario de oveja anti-dioxigenina (Abcam) con tampón PBS-T (1:50) y 784 µL de una mezcla de un anticuerpo secundario de conejo anti-anticuerpos de oveja acoplado a HRP (peroxidasa de rábano) (Sigma-Aldrich, 1,75 ppm) con PBS-T (1:500). Se dejó incubar en el chip durante 30 min a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS-T y agua destilada, se dispensaron 800 µL de la solución TMB (0,25 g L<sup>-1</sup> de 3,3, 5,5' tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich) y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Después, el chip se lavó con agua destilada y se realizó la lectura de los resultados.

Para la lectura de los resultados, el chip de PC se escaneó mediante un escáner de oficina (Epson Perfection 1640SU, SEIKO EPSON CORP.) conectado a un ordenador personal mediante un dispositivo universal (USB 2.0) y controlado por un software personalizado. Las imágenes se generaron en escala de grises (16 bits de color, escala 600 ppm). Para el análisis de los datos adquiridos se empleó el programa GenePix Pro® 4000 B, que permitió calcular el promedio de la intensidad de señal de los puntos con respecto al fondo.

Finalmente, los datos registrados se analizaron estadísticamente mediante el programa Stargraphics-Centurion XVI.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

#### 4.1.1. Extracción

Se estudió la capacidad de extracción de ADN dada la complejidad de las muestras clínicas a emplear: tejidos biopsiados embebidos en parafina y fijados en formalina (FFPE). Este modo de conservación es empleado para análisis patológico, sin embargo presenta limitaciones para análisis genéticos, ya que puede alterar la integridad del ADN.

Se extrajeron muestras de epitelio bucal de voluntarios sanos (tejido de referencia) y muestras de biopsias procedentes de pacientes con cáncer colorrectal. En la **Tabla 6** se recoge las concentraciones de ADN genómico obtenidas tras la extracción utilizando la tecnología de columna de centrifugado.

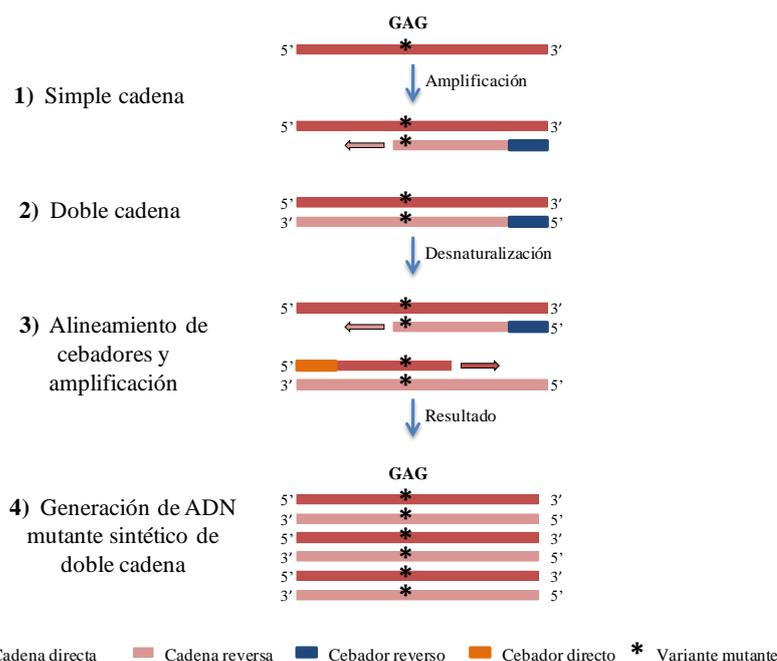
**Tabla 6.** Concentración promedio del ADN extraído de las diferentes muestras.

Número de muestra	Tejido epitelial bucal fresco (ng/μL)	Tejido biopsiado FFPE (ng/ μL)
1	37,8	8
2	19,6	7
3	25,1	11
4	14,8	10

El método seleccionado permitió aislar el ADN con suficiente calidad (alto ratio ácidos nucleicos/proteínas). La concentración de ADN mutante en las muestras de tejido conservado en FFPE fue muy reducida respecto al tejido de referencia, confirmando la fácil degradación de los ácidos nucleicos en el tratamiento de este tipo de tejidos. Las concentraciones de todas las muestras empleadas se ajustaron a 4ng/μL para la conservación hasta su uso.

#### 4.1.2. Generación de ADN mutante

Debido a la baja disponibilidad de las muestras de tejido biopsiado y la elevada presencia de ADN nativo, para la puesta a punto del ensayo, se generó un ADN sintético con la mutación V600E de la región diana del gen. En la **Figura 8** se muestra un esquema representativo del proceso de preparación de este ADN mutante sintético. Partiendo de un oligonucleótido de una única hebra de 80 nucleótidos, se realizó una amplificación basada en PCR. Las medidas de fluorescencia post-amplificación indicaron que se formó  $4 \cdot 10^7$  copias de ADN mutante sintético (doble hebra), considerándose un buen rendimiento de amplificación. Por lo tanto, se logró disponer de una muestra de la mutación en homocigosis (c.1799T>A) y en cantidad controlada.



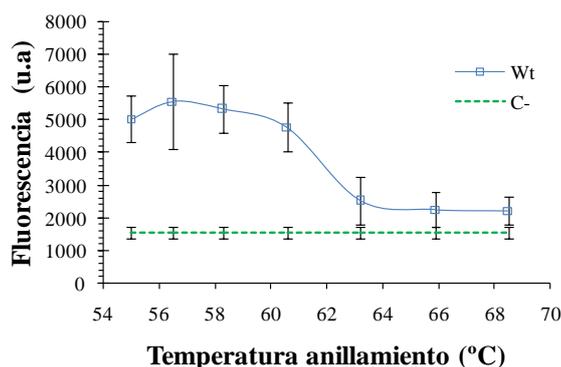
**Figura 8.** Esquema de la generación del ADN mutante sintético de doble cadena.

Etapas: 1) ADN de simple cadena e hibridación del cebador reverso. Elongación y generación de la cadena reversa por la Taq polimerasa. 2) Producto generado: ADN mutante sintético de doble cadena.

3) Desnaturalización, hibridación de ambos cebadores y continuación de los siguientes ciclos de amplificación. 4) Producto final: ADN mutante sintético de doble cadena.

#### 4.2. AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR

Primero, con el objetivo de alcanzar el mayor rendimiento de amplificación del gen diana, se evaluaron las condiciones variables experimentales que afectan al proceso. Partiendo de las condiciones de trabajo establecidas previamente en el grupo de investigación, se estudió la unión de los cebadores durante la reacción de amplificación. Se comparó la cantidad de producto formado en función de las diferentes temperaturas de anillamiento durante el termociclado (**Figura 9**).



**Figura 9.** Señal de fluorescencia post-amplificación variando la temperatura de anillamiento. Ensayos duplicados. Wt: individuo con genotipo nativo; C-: control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde).

Este experimento mostró que a temperaturas de anillamiento superiores a 62 °C no hubo amplificación. Esto es debido a que a dichas temperaturas, el complejo de los cebadores con la cadena diana es inestable termodinámicamente. A temperaturas inferiores a 60 °C, existía una gran diferencia entre la amplificación del gen diana con la del control negativo, siendo 58 °C el valor de temperatura de anillamiento seleccionado al proporcionar el mayor rendimiento de amplificación.

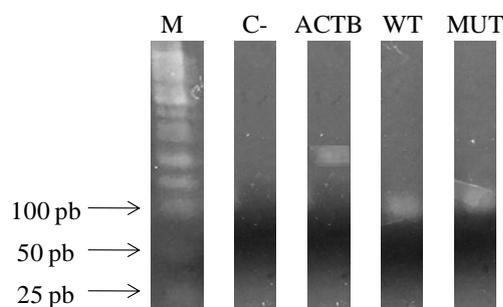
Como control positivo del ensayo de amplificación, se seleccionó el gen endógeno *ACTB* (actina beta). Este gen de referencia se escogió ya que se encuentra altamente conservado en el ADN humano, codifica seis proteínas de actina que presentan una función estructural clave para el mantenimiento de la integridad y el desarrollo celular. Los cebadores se escogieron para generar un producto de tamaño similar al gen diana. Los resultados mostraron que en las condiciones de trabajo, se logró su amplificación con alto rendimiento, lo que permite su empleo como control de la degradación de la muestra y garantizar la fiabilidad del ensayo de amplificación propuesto.

Con el objetivo de evaluar las condiciones de amplificación, se amplificaron las 4 muestras de ADN genómico nativo y las 4 muestras de ADN genómico mutante en *BRAF* (tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina, FFPE). Se cuantificaron dichos productos mediante fluorescencia y se calculó el rendimiento de la amplificación expresado en número de copias (**Tabla 7**). Los resultados indicaron que el rendimiento de amplificación fue adecuado ( $> 10^7$  copias) tanto para el gen control (*ACTB*) como para el gen diana (*BRAF*). Por otro lado, la reproducibilidad del ensayo, expresada como desviación estándar relativa, fue elevada, siendo 2,54% para el control positivo, 5,27% para los voluntarios y 6,3% para los pacientes.

**Tabla 7.** Rendimiento de amplificación de las diferentes muestras. Valores promedio en número de copias tras la amplificación. Desviación estándar calculada a partir de los 4 pacientes y 4 voluntarios. El ADN molde inicial presentó 1333 copias.

Tipo de muestra	Número de copias tras la amplificación	RSD (%)
Tejidos FFPE	$1,3 \cdot 10^7$	6,3
Tejido epitelial bucal	$1,5 \cdot 10^7$	5,3
ACTB (control positivo)	$4,0 \cdot 10^7$	2,6

Se realizó la separación electroforética en gel de agarosa para evaluar la calidad de los productos formados (**Figura 10**).



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 3 % de los resultados de la amplificación preliminar. M: marcador de pesos moleculares; C-: control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde); ACTB: gen de referencia control positivo; WT: muestra de ADN nativo a partir de epitelio bucal. MUT: muestra de ADN mutante en *BRAF* (V600E) a partir de tejido biopsiado embebido en parafina.

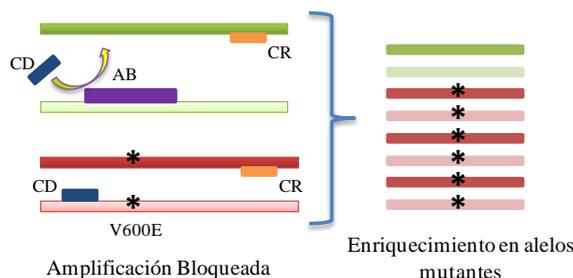
La electroforesis confirmó la adecuada selección de las condiciones de amplificación, al registrarse ninguna banda en el control negativo y una única banda en la mezcla que contenía ADN genómico humano. Los tamaños de banda fueron 170 pb para *ACTB*, 80 pb para el gen *BRAF*. Estos valores son coincidentes con el tamaño esperado a partir de los cebadores diseñados.

### 4.3. AMPLIFICACIÓN BASADA EN PCR BLOQUEADA

#### 4.3.1. Descripción de la estrategia

La amplificación bloqueada consiste en minimizar la formación de producto nativo mediante la adición de determinados oligonucleótidos diseñados que hibridan específicamente con su secuencia diana y, en consecuencia, impiden la extensión por la polimerasa.

En este TFG, se estudió la puesta a punto de la amplificación bloqueada para la detección de la mutación V600E en el gen *BRAF*. La adición de los agentes bloqueantes permitirá el enriquecimiento de la variante mutada aún en presencia de una elevada concentración de la variante nativa (**Figura 11**).

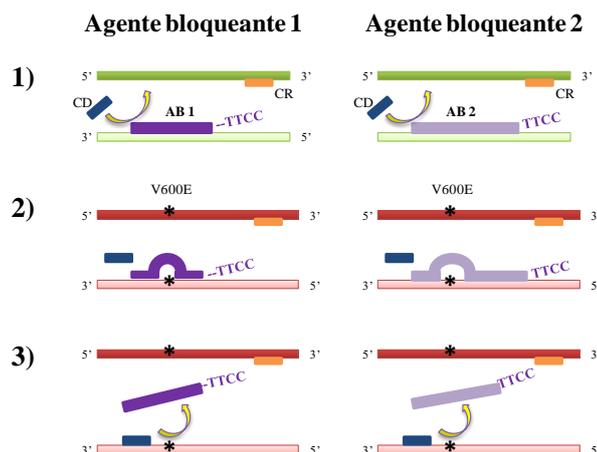


**Figura 11.** Esquema de la reacción de amplificación bloqueante propuesta. CR: cebador reverso; CD: cebador directo; AB: agente bloqueante; V600E: mutación a estudiar en el gen *BRAF*.

A partir de la secuencia diana, se diseñaron dos agentes bloqueantes (**Figura 12**). Presentaban 25 y 29 nucleótidos complementarios al gen diana, respectivamente. Aplicando la herramienta *OligoCalc* en condiciones de *salt adjusted*, se calculó la temperatura de fusión de ambos bloqueantes, siendo 64,1 y 72,5, respectivamente. Estos valores muestran la mayor estabilidad del complejo del bloqueante 2 con el ADN molde, como resultado de las uniones de los 4 nucleótidos adicionales (-CCAA-3').

Por otro lado, los bloqueantes se han diseñado para un ensayo PCR bloqueada en modalidad solapante ('PCR *clamp*'), es decir, que existe una competencia del cebador delantero y el bloqueante por la misma región del alelo nativo. En concreto, solapan el extremo 3' del cebador y el extremo 5' del bloqueante en 5 nucleótidos (-CCATC-). Además, los complejos que el alelo nativo formará con los bloqueantes son más estables que los que formará con los cebadores, siendo las temperaturas de fusión 59,5 °C y 58,4 °C para el cebador directo y reverso respectivamente.

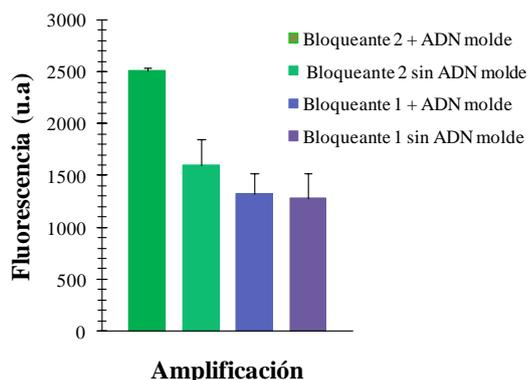
Ambos contenían la base complementaria a la variante nativa en la región central, con el objetivo de maximizar la diferencia de estabilidad entre la variante nativa (nucleótido T) y la mutada (nucleótido A). Para evitar la extensión de los oligonucleótidos bloqueantes, se incorporó en el extremo 3' una cola de nucleótidos no complementaria a la secuencia diana de cuatro nucleótidos (-TTCC-3'). De este modo, la polimerasa no puede acoplarse al complejo bloqueante/ADN molde y adicionar nuevos nucleótidos.



**Figura 12.** Representación de la actuación de los dos bloqueantes sobre el wt según su diseño.  
 1) Hibridación del agente bloqueante con la secuencia wt e impedimento de la unión del cebador directo.  
 2) Desestabilización del agente bloqueante al tratar de hibridar con la secuencia mutante.  
 3) Desplazamiento del agente bloqueante por el cebador directo y amplificación selectiva de la secuencia mutante. CD: cebador directo; CR: cebador reverso; AB: agente bloqueante; V600E: mutación de *BRAF*.

#### 4.3.2. Acción de los bloqueantes como cebadores

Antes de la puesta a punto de la amplificación bloqueada, se determinó si los dos agentes bloqueantes diseñados actuarían como cebadores, ya que es un fenómeno no deseable en el ensayo de enriquecimiento de la variante mutante. Para ello, en la mezcla de reacción PCR se sustituyó el cebador delantero por el agente bloqueante a la misma concentración (300 nM), es decir, existía una relación estequiométrica 1:1 con el cebador reverso. La **Figura 13** muestra las señales obtenidas tras la amplificación de mezclas de reacción estudiadas con ADN molde y sin ADN molde. Los resultados del test t indicaron que no existía diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles negativos, tanto para el bloqueante 1 (p-valor = 0,8, t = -0,3) como para el bloqueante 2 (p-valor = 0,1, t = 5,3). Estos experimentos confirmaron la acción de la cola como elemento de inhibición de la extensión.

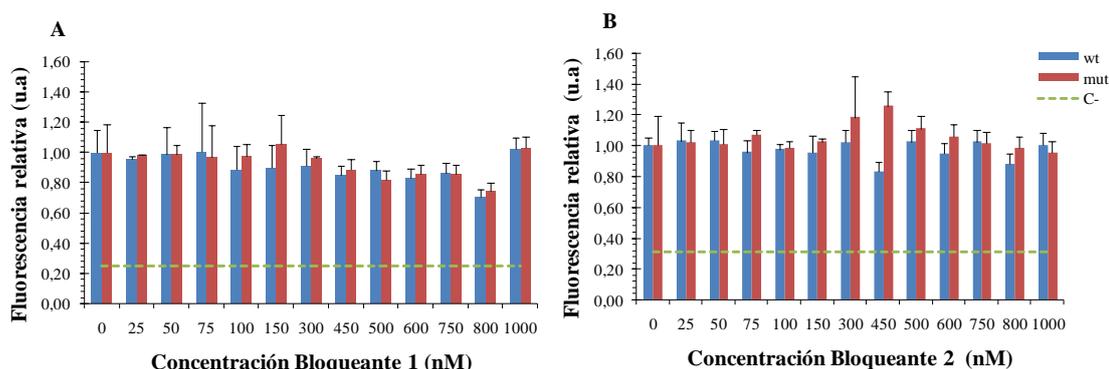


**Figura 13.** Señal promedio obtenida de las amplificaciones de los bloqueantes para observar su comportamiento como cebador.

#### 4.3.3. Puesta a punto de la PCR bloqueada

El objetivo de los siguientes experimentos fue establecer la concentración de agente bloqueante necesario para reducir la amplificación del alelo nativo, afectando mínimamente la amplificación del mutante. Para ello, se prepararon mezclas de reacción que contenían ADN nativo (~17.500 copias iniciales) o ADN mutante sintético (~40.000 copias iniciales) con concentraciones crecientes de los agentes bloqueantes (1 y 2) hasta una relación estequiométrica 3:1 respecto a los cebadores. Tras la

amplificación, se registró la señal de fluorescencia normalizada frente a la obtenida en ausencia de agente bloqueante (**Figura 14**).



**Figura 14.** Señal normalizada de amplificación del ADN nativo de un voluntario y del ADN mutante sintético frente a diferentes concentraciones de bloqueante 1 (A) y bloqueante 2 (B). Wt: ADN nativo; mut: ADN mutante (sintético). C-: control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde y con el agente bloqueante correspondiente a 50 nM).

El análisis ANOVA mostró la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre la señal de fluorescencia del ADN nativo con el aumento de bloqueo, tanto para el bloqueante 1 (p-valor = 0,6388, F-ratio = 0,81) como para el bloqueante 2 (p-valor = 0,3, F-ratio = 1,3). Para la señal de fluorescencia del producto mutante, tampoco se observaron diferencias significativas con el aumento de la concentración de bloqueante 1 (p-valor = 0,2, F-ratio = 1,5) y de bloqueante 2 (p-valor = 0,9, F-ratio = 0,4). La interpretación de estos resultados fue la ausencia de bloqueo en las condiciones de trabajo o la formación de dímeros entre cebadores y/o bloqueante que impidiera una visualización de la disminución de la señal del nativo. En ambas situaciones, se obtendría una señal constante de fluorescencia tras la adición del reactivo SYBR.

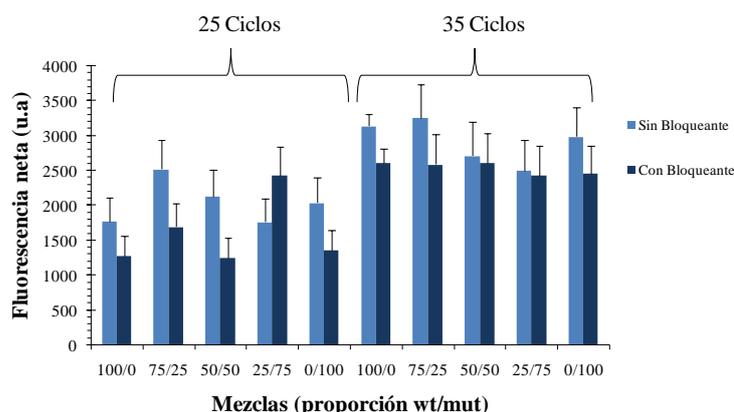
En este punto, se ensayaron diferentes condiciones experimentales que favorecieran el bloqueo y permitieran su seguimiento. Se estudió la amplificación con ambos agentes bloqueantes a diferentes temperaturas de anillamiento durante el termociclado, manteniendo el bloqueante a una concentración de 300 nM (estequiometría 1:1). Las señales de fluorescencia fueron comparables en presencia o ausencia de agente bloqueante (test t pareado: p-valor = 0,6 para bloqueante 1 y p-valor = 0,4 para bloqueante 2). Dado que no existía mejora en la discriminación, se mantuvo una temperatura de anillamiento de cebadores en la amplificación bloqueada de 58 °C.

Otra de la hipótesis planteadas fue un exceso de ADN molde en la mezcla de reacción que conllevara a la existencia de moléculas no bloqueadas, y por tanto, disponibles para la unión del cebador y su extensión. Para evaluar esta posibilidad, se realizó un estudio donde se disminuyera la cantidad de ADN inicial (desde 10.000 hasta 10 copias). Al disminuir la concentración, la fluorescencia debida a los productos formados decreció de forma logarítmica (**Tabla 8**). El comportamiento fue el mismo para ambos bloqueantes.

**Tabla 8.** Ajuste logarítmico de la señal de fluorescencia de la amplificación al disminuir la cantidad de ADN inicial.

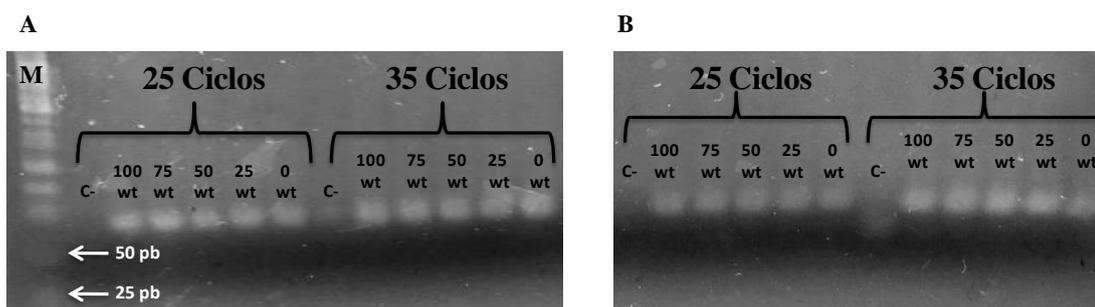
Muestra	Bloqueante	Ecuación	R <sup>2</sup>
Nativa	0 nM	$y = 909,9 \ln(x) + 1389$	0,80
Nativa	300 nM	$y = 962,8 \ln(x) + 1431$	0,90
Mutante (sintético)	300 nM	$y = 1726 \ln(x) + 1344$	0,99

Posteriormente, se planteó la hipótesis de que una amplificación del nativo a 35 ciclos con agente bloqueante podría estar enmascarando el efecto del bloqueo. Para verificar dicha hipótesis, se estudió el efecto del número de ciclos en la amplificación bloqueada, variando entre 20 y 40 ciclos. Se determinó que al aumentar el número de ciclos se incrementaba el rendimiento de amplificación alcanzando la saturación a 35 ciclos. Se observaron pequeñas diferencias entre la presencia/ausencia del bloqueante en la disolución de la PCR que contiene ADN nativo o ADN mutante. Para profundizar en esta línea de trabajo y con el fin de mimetizar las condiciones reales de las muestras de cáncer colorrectal, se preparó un conjunto de mezclas de reacción con diferente proporción ADN nativo/mutante que se amplificaron durante 25 y 35 ciclos (**Figura 15**). Excepto para una de las disoluciones, se observó una ligera disminución de la fluorescencia en presencia del agente bloqueante. El test t indicó la existencia de diferencias significativas entre las mezclas sin y con agente bloqueante (p-valor = 0,0021,  $t = -4,45$  para 25 ciclos y p-valor = 0,0295,  $t = 2,64$  para 35 ciclos).



**Figura 15.** Señal de fluorescencia promedio neta de amplificación simétrica a 25 y 35 ciclos con y sin agente bloqueante a 300 nM de mezclas con diferente proporción de ADN wt/mut.

Con el objetivo de confirmar estos resultados, se realizó una separación electroforética en gel de agarosa de los productos formados (**Figura 16**). No se detectaron bandas de pequeño tamaño que pudieran ser asociadas a la formación de dímeros. No obstante, la intensidad de la banda de 80 pb disminuyó en aquellas mezclas de reacción que contenían el agente bloqueante. Por lo tanto, la estrategia de PCR bloqueada parece ser parcialmente efectiva, pero el sistema de detección post-amplificación basado en fluorescencia no permite un claro seguimiento del proceso.



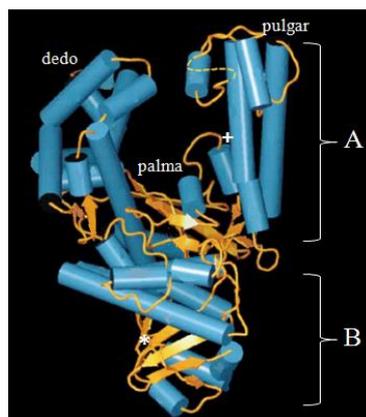
**Figura 16.** Gel de electroforesis para las distintas mezclas de ADN nativo/mutante amplificadas a 25 y 35 ciclos, sin (A) y con agente bloqueante a 300 nM (B). C-: control negativo, mezcla de reacción sin ADN molde para A y con bloqueante para B. Wt: ADN nativo. Se muestra la proporción de ADN nativo (el resto corresponde a la de mutante).

#### 4.4. APROXIMACIÓN ISOTERMA

Paralelamente al estudio de la técnica de enriquecimiento del alelo minoritario basada en la PCR bloqueada, se examinó el desarrollo de una innovadora técnica basada en la amplificación bloqueada isoterma utilizando la enzima Bst ADN polimerasa. Esto permitiría evitar el uso de un termociclador y abriría vías para la integración del ensayo en dispositivos miniaturizados o portátiles.

##### 4.4.1. Análisis de las propiedades de la Bst ADN polimerasa

El reactivo comercial es una enzima de desplazamiento de hebra diseñada *in silico* y homóloga al fragmento largo de la ADN polimerasa I de *Bacillus stearothermophilus* denominada Bst ADN polimerasa. Presenta una velocidad de amplificación, rendimiento, tolerancia a la sal y estabilidad mayor en comparación con la Bst nativa. La temperatura de elongación óptima es de 60-65 °C. Esto ofrece un rango más amplio de condiciones de reacción para optimizar el desplazamiento de la hebra y el anillamiento de los cebadores. Además es deficiente en la actividad exonucleasa en sentido 5' → 3' (**Figura 17**), lo que impide que la hebra de nueva síntesis desplazada sea degradada y que a su vez la extensión de la hebra de nueva síntesis sea bloqueada. Gracias a esta característica se consigue que no disminuya la eficacia y sensibilidad de la técnica. Presenta la desventaja de que carece de actividad exonucleasa de corrección de errores 3'→5'. No obstante, la mutación que se pretende amplificar en este caso, se encuentra en el centro de la secuencia, por lo que a pesar de la tasa de error que presenta dicha enzima, el producto amplificado será mayoritariamente aquel que contenga la variante mutante intacta. Finalmente, según estudios recientes resulta muy adecuada para la amplificación del genoma procedente de tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina (Aviel-Ronen *et al.*, 2006).



**Figura 17.** Estructura cristalina de la enzima Bst a una resolución de 2.1 Å (modificada de Kiefer *et al.*, 1997). Representación esquemática en la que las hélices se muestran como cilindros azules y las hojas  $\beta$  como flechas naranjas. El extremo N-terminal está marcado con el signo '\*' y el extremo C-terminal queda detrás de la hélice marcada con el signo '+'. A: dominio polimerasa con subdominios dedo, palma y pulgar. B: dominio exonucleasa vestigial.

Dadas sus propiedades, esta enzima se ha empleado en el desarrollo de diferentes técnicas de amplificación isoterma. Es decir, no requieren la presencia de ciclos de temperaturas, ya que debido los procesos de desnaturalización y polimerización de las cadenas de ADN se realizan de forma enzimática (desplazamiento de hebra). La Bst es capaz de sintetizar una nueva cadena de ADN mientras disocian el enlace de hidrógeno del ADN molde de doble cadena. Comparado con la Taq polimerasa utilizada en la PCR, permite la síntesis de ácidos nucleicos a temperatura constante mimetizando los sistemas celulares *in vivo*. La **Tabla 9** recoge las principales características de ambas enzimas.

**Tabla 9.** Comparación de las principales características entre las ADN polimerasas Bst y Taq (modificada de Oriol y Noboru Inoue, 2001).

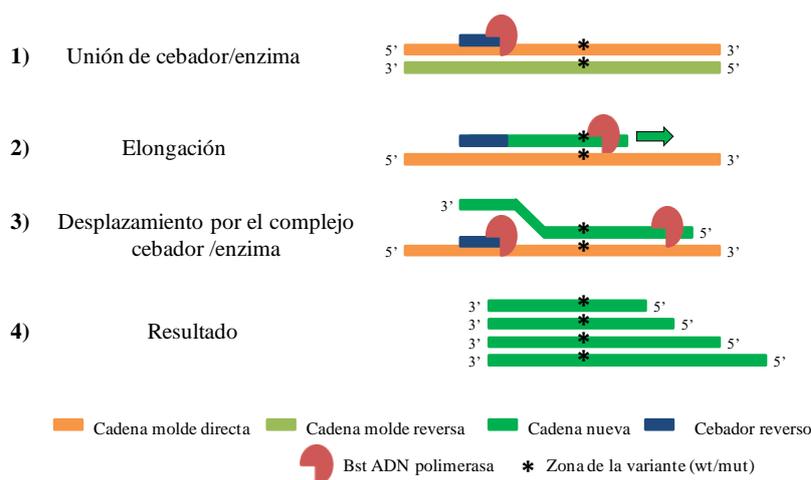
Características	Bst ADN polimerasa	Taq ADN polimerasa
Origen	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Actividad polimerasa	5'→3'	5'→3'
Cebadores	Requeridos	Requeridos
Desplazamiento de cadena	Sí	No
Paso de desnaturalización del ADN	No requerido	Requerido (90-95°C)
Temperatura de reacción	65 °C	75 °C
Inactivación por calor	80 °C	No
Actividad exonucleasa 3'→5'	No	No
Procesividad	++	+

Entre las variantes isotermas que utilizan enzimas con actividad de desplazamiento de hebra destacan la amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) y la amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP).

En la SDA se emplean además un par de cebadores con un sitio de restricción en su secuencia, un par de cebadores para desplazar a los anteriores y una endonucleasa de restricción manteniendo temperaturas próximas a la ambiental. La polimerasa es capaz de desplazar la hebra monocatenaria resultante de un corte en una región específica, y a partir de esta hebra desplazada, iniciar la replicación de ese ADN diana (Walker *et al.*, 1992). En la LAMP se usan dos cebadores internos, y dos externos que reconocen seis secuencias distintas en el ADN molde a una temperatura de 60 °C a 65 °C. Durante la amplificación se forma una estructura en doble asa a partir de la cual se genera una mezcla de productos de doble cadena con diferentes longitudes y múltiples bucles (Notomi *et al.*, 2000).

#### 4.4.2. Diseño de la estrategia

A partir de este análisis de las prestaciones de la Bst ADN polimerasa, en el presente TFG, se ha diseñado una variante de la amplificación SDA utilizando únicamente dos cebadores, el directo y el reverso (**Figura 18**). Aunque el mecanismo de la reacción con dos cebadores no está claro, se estima que la amplificación de la región diana se logra por una serie de pasos repetitivos a una temperatura de 63°C. Tras la unión del cebador, la Bst ADN polimerasa es capaz de separar la doble cadena de ADN por su actividad tipo helicasa a la vez que sintetiza la nueva hebra. Simultáneamente, se forma un nuevo complejo cebador/ADN/enzima, de forma que el extremo 5' de cada cadena queda desplazado por otra nueva cadena en síntesis en la misma dirección. Así, a medida que la reacción avanza se generan miles de copias del ADN que contienen la región de interés, pero productos con diferentes tamaños.



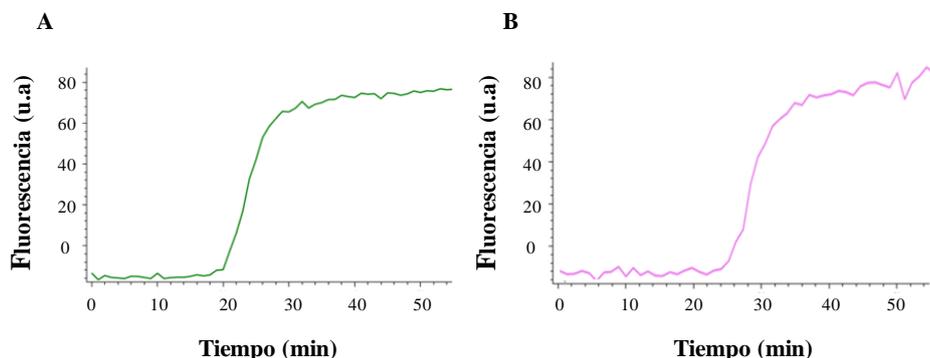
**Figura 18.** Esquema del nuevo método basado en la amplificación isoterma utilizando como enzima la Bst ADN polimerasa y dos cebadores. En la figura queda representada el proceso de amplificación de una de las cadenas molde (directa), lo mismo ocurre para la cadena reversa. Wt: variante nativa o ‘wild type’, mut: variante mutante.

La principal ventaja que supone la amplificación de ADN mediante una aproximación isoterma es que aparte de ser rápida, no requiere el empleo de un termociclador. Por lo tanto, puede llevarse a cabo en dispositivos de calefacción simples tales como baño maría o termobloques de laboratorio. Este hecho la convierte en una opción muy prometedora para la detección de mutaciones de forma rutinaria, ya que implica una disminución en el coste y en el tiempo del método, en consecuencia sería asequible a un mayor número de hospitales.

#### 4.4.3. Puesta a punto de la amplificación isoterma bloqueada

Los experimentos fueron dirigidos a comprobar la capacidad de amplificación de esta estrategia y evaluar el efecto de la presencia de bloqueantes como método de enriquecimiento de las variantes mutantes. Previamente, se comprobó que los bloqueantes no actuaran como cebadores para la amplificación. Para ello, en un tubo de reacción se añadieron el cebador reverso para el gen diana, el bloqueante (1 y 2 en cada caso) y el ADN molde (nativo). En ambos casos no se detectó señal de fluorescencia en ningún ciclo de reacción, por lo que se concluyó que los bloqueantes no actuaron como cebadores en la amplificación del ADN nativo bajo una aproximación isoterma.

Posteriormente, se procedió a realizar una amplificación de una muestra de ADN nativo sin y con bloqueante a una concentración de 300 nM a 63 °C (**Figura 19**).

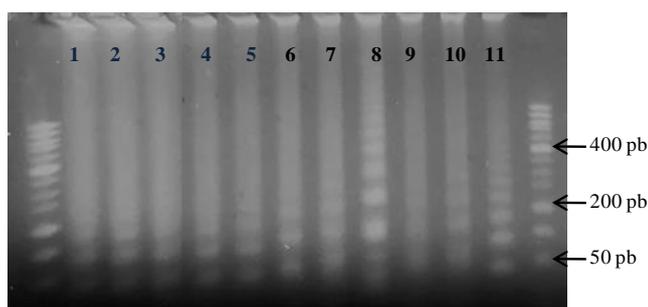


**Figura 19.** Señal de fluorescencia de la amplificación isoterma frente al tiempo (min) de reacción, del ADN nativo sin bloqueante (A) y con el bloqueante 2 a 300 nM (B).

En ausencia del bloqueante, el tiempo para el cual la señal registrada es diferenciable del fondo fue de  $20 \pm 3$  min, mientras que con presencia del bloqueante 2, el tiempo registrado fue de  $23 \pm 3$  min. La fluorescencia en el estado estacionario fue 70 u.a y 75 u.a, respectivamente. Los valores fueron similares utilizando el bloqueante 1. Estos resultados indicaron que se logró amplificar la región

diana pero no se produjo un efecto bloqueante significativo bajo esta aproximación. La interpretación de la ausencia de bloqueo se relacionó con la capacidad de desplazamiento de cadena de la Bst polimerasa. Aunque la estabilidad termodinámica del complejo bloqueante/ADN molde es superior a la del complejo cebador/ADN molde, la enzima desplazaría al bloqueante hibridado con la secuencia diana, y por tanto originaría un proceso de amplificación normal. Se concluiría que la estrategia de amplificación isoterma mediante Bst polimerasa combinada con un agente bloqueante, no es un método apto para el enriquecimiento de variantes mutantes en las condiciones ensayadas.

Para corroborar la formación de producto específico, se llevó a cabo una separación electroforética post-amplificación. Para ello, se prepararon mezclas de ADN nativo y de ADN mutante sintético a diferentes proporciones (relación estequiométrica entre 1:0 a 0:1). La mitad de las mezclas de amplificación contenían además el bloqueante 2 a una concentración de 300 nM. La **Figura 20** muestra la imagen registrada tras la electroforesis en gel de agarosa al 3 % a 110 V.



**Figura 20.** Gel de electroforesis para las distintas mezclas de ADN nativo y mutante, en ausencia de bloqueante (pocillos 1-5) y con adición de agente bloqueante a 300 nM (pocillos 6-10). Los pocillos de ambos extremos corresponden con el marcador de pesos moleculares. Pocillos 1 y 6: 100% de ADN nativo. Pocillos 2 y 7: 75% de ADN nativo y 25% de ADN mutante. Pocillos 3 y 8: 50% de ADN nativo y 50% de ADN mutante. Pocillos 4 y 9: 25% de ADN nativo y 75% de ADN mutante. Pocillos 5 y 10: 100% de ADN mutante. Pocillo 11: control positivo (producto del gen ACTB). Pb: pares de bases.

A diferencia de la PCR donde se generó una única banda, la técnica de amplificación isoterma basada en la Bst polimerasa originó una serie de bandas, correspondiente a los diferentes fragmentos elongados de distinto tamaño. El patrón de bandas fue similar en todos los casos. Por otro lado, se confirmó la ausencia de bloqueo puesto que no hubo disminución de la intensidad de las bandas a medida que se reducía el contenido de ADN nativo.

En conclusión, los resultados avalan el buen funcionamiento de la aproximación isoterma propuesta para diferentes muestras de ADN, resultando rápida, de bajo coste y con un buen rendimiento de amplificación aplicable a diferentes procedimientos. Sin embargo, a pesar de que se requiere una continuación en el estudio de la misma, dicha aproximación no resultó ser exitosa ya que no disminuyó la amplificación del ADN nativo mediante la acción de un agente bloqueante frente al ADN con mutación c. 1799T>A (V600E) en el gen *BRAF*.

## 4.5. ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN

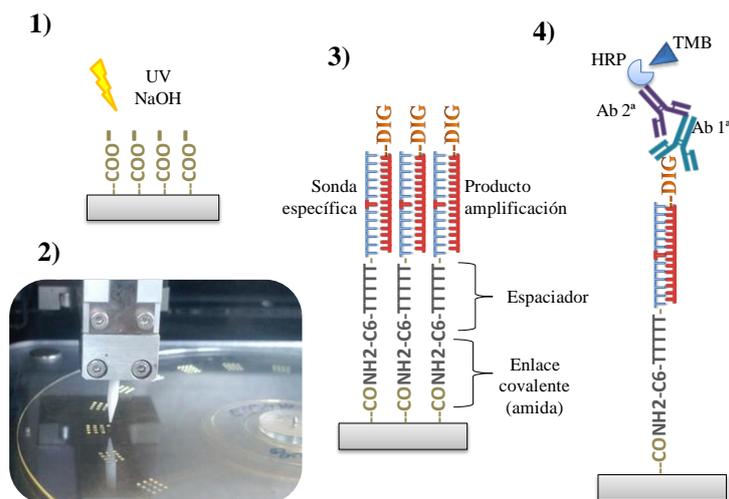
### 4.5.1. Diseño del ensayo

De las dos aproximaciones evaluadas, los experimentos de PCR bloqueada combinada con detección post-amplificación fluorescente mostraron el potencial de la estrategia pero presentaba baja eficacia en el bloqueo de la variante nativa. Por lo tanto, se exploró la combinación de la PCR bloqueada con un ensayo de hibridación con sondas alelo-específicas inmovilizadas en formato micromatriz, con el objetivo de discriminar las subpoblaciones.

A partir de los estudios anteriores realizados por el grupo, se dispone de metodologías capaces de detectar regiones diana en genes específicos y la discriminación de polimorfismos para su genotipado (Tortajada-Genaro *et al.*, 2015, Tortajada-Genaro *et al.*, 2016). Estos ensayos se

caracterizan por ser rápidos (1 h frente a las 12-24 h de otros ensayos), reproducibles y selectivos. En este TFG, se optó por el desarrollo de un ensayo de hibridación mediante un chip de policarbonato (espesor 0,6 mm) sobre el cual se inmovilizaron las sondas complementarias a las secuencias diana de detección. Esto permitirá servir como plataforma modelo para ampliar su uso con otros biomarcadores, es decir, establecer un punto de partida en el desarrollo de una tecnología de biosensado reproducible y asequible.

Entre las distintas aproximaciones descritas, se seleccionó el procedimiento de anclaje covalente y detección colorimétrica, tal como se describe en la **Figura 21**. Esta opción permitirá su futura transferencia a sistemas de biosensado que pueden fabricarse de forma masiva y de fácil implementación en la rutina clínica.



**Figura 21.** Resumen del diseño experimental del ensayo de hibridación. 1) Tratamiento de la superficie. 2) Dispensación de nano-gotas. 3) Hibridación selectiva. 4) Detección por reacción colorimétrica. COO-: grupo carboxilo libre; DIG: dioxigenina (marcaje por cebador reverso en la amplificación); Ab 1ª: anticuerpo primario; Ab 2ª: anticuerpo secundario. HRP: peroxidasa de rábano. TMB: sustrato enzimático 3,3, 5,5' tetrametilbenzidina.

#### 4.5.2. Ensayos preliminares

La preparación del chip se basó en la metodología descrita anteriormente (Lucas-Garrote et. al, 2017) sobre el diseño de las sondas y el tipo de anclaje al chip, y el modo de detección de la hibridación. La activación de la superficie del chip de policarbonato se realizó mediante oxidación con radiación UV y posterior tratamiento con NaOH. La eficacia del procedimiento se estableció a partir de medidas de hidrofobicidad basadas en ángulo de contacto (tres réplicas), que varió de  $91^\circ \pm 1$  iniciales a  $65^\circ \pm 2$  tras el tratamiento. El anclaje de las sondas (nativa y mutante c.1799T>A) se logró por impresión en nano-gotas de disolución que contenía la sonda aminada con un espaciador de 6 carbonos y 5 timinas para mantener una orientación adecuada y favorecer la hibridación. LA eficacia y flexibilidad del proceso se estableció a partir de los controles de hibridación (sistema sonda/anti-sonda). Como control negativo se incorpora en la micromatriz la sonda para el gen humano *NRAS*. Los controles positivos fueron un sistema sonda/anti-sonda y una sonda específica para el gen *ACTB*, cuyo producto se adicionaba en la mezcla de hibridación.

En los experimentos iniciales de hibridación, los productos fruto de la reacción de enriquecimiento de la mutación V600E en *BRAF*, se mezclaron en una disolución con tampón de hibridación SSC, que favorece la formación específica de las dobles hebras (sonda-secuencia complementaria), aportando un pH de 7. La mezcla de hibridación también contenía formamida. Este reactivo pretendía aportar selectividad al ensayo, al favorecer la unión entre sondas totalmente complementarias, ya que desnatura los complejos menos estables, por lo que sólo aquellas secuencias con un 100 % de complementariedad conseguirán superar la desnaturalización. Se empleó un 10 % de formamida como punto de partida en el desarrollo del ensayo propuesto. Sin embargo, no

se observó formación del producto coloreado. Se planteó la hipótesis del bajo número de moléculas disponibles para hibridar, por lo que se formuló una nueva estrategia de amplificación bloqueada: PCR bloqueada asimétrica.

#### 4.5.3. Desarrollo del ensayo

Se estudió la puesta a punto de la PCR asimétrica. En esta variante de la PCR, la concentración de uno de los cebadores es inferior, es decir, que la relación estequiométrica entre el cebador directo y reverso no es 1:1. En concreto, para mejorar el presente TFG, se redujo la concentración del cebador delantero. Se empleó una concentración de 100 nM para el cebador directo y de 300 nM para el cebador reverso (estequiometría 1:3) y se realizaron los mismos experimentos que con la PCR bloqueada simétrica. Se comparó el rendimiento de la amplificación en número de copias entre ambas estrategias y se obtuvo, tal y como se esperaba, un rendimiento de amplificación de las muestras de trabajo inferior a la PCR simétrica (**Tabla 10**).

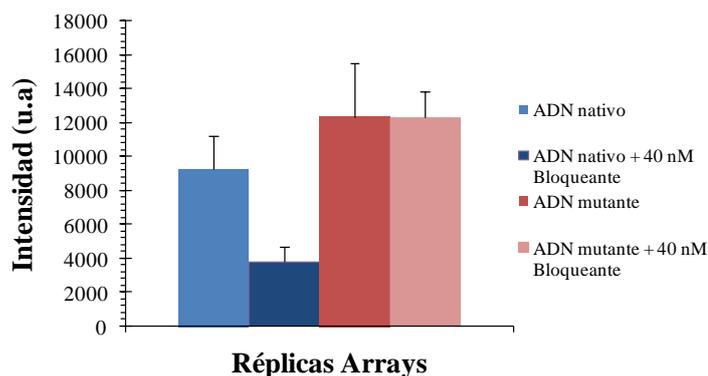
Estos resultados se asociaron a varios fenómenos. Primero, la formación de la hebra diana en mayor proporción, aunque el rendimiento global disminuyó. Segundo, la competición por la unión a la secuencia diana del gen *BRAF* entre el cebador directo y el bloqueante se favoreció para este último. Prácticamente la totalidad del producto generado presentaría marcaje con dioxigenina (gracias al cebador reverso) por lo que esta estrategia permitiría la detección clara del producto coloreado en el proceso de revelado del ensayo de hibridación. Por tanto, la PCR asimétrica disminuye el rendimiento de amplificación debido a la diferencia de proporción entre ambos cebadores, pero aumenta el rendimiento de hibridación, mejorando el seguimiento de los resultados que con la PCR bloqueada simétrica no se esclareció.

**Tabla 10.** Valores promedio de rendimiento de amplificación expresado en número de copias obtenidas de la PCR simétrica y asimétrica. Desviación estándar relativa (RSD) a partir de 3 réplicas.

Tipo de muestra amplificada	Nº copias PCR simétrica	Nº copias PCR asimétrica
ADN nativo	$7,0 \pm 0,6 \cdot 10^7$	$5,5 \pm 0,5 \cdot 10^7$
ADN mutante	$7,7 \pm 0,5 \cdot 10^7$	$5,8 \pm 0,3 \cdot 10^7$
<i>ACTB</i> (gen control positivo)	$19,0 \pm 0,3 \cdot 10^7$	$8,1 \pm 0,1 \cdot 10^7$

##### 4.5.3.1. Reproducibilidad del ensayo (amplificación bloqueada con hibridación)

Primero, se calculó la reproducibilidad del ensayo propuesto, donde se combina la amplificación bloqueada y la hibridación en chip de policarbonato. Para ello, se amplificaron mediante PCR asimétrica, una muestra nativa (~17.500 copias iniciales) y otra mutante a partir de un paciente (~16.00 copias iniciales) sin y con agente bloqueante a 40 nM (3 réplicas) y posteriormente se hibridaron en chip de policarbonato. Como se muestra en la **Figura 22**, la intensidad de los puntos para el ADN nativo se redujo considerablemente con una concentración de agente bloqueante de 40 nM. Mientras que la intensidad del mutante, con y sin bloqueante, se mantuvo. Se realizó un test t para comparar las intensidades de punto de la muestra nativa y la mutante, en presencia y ausencia de agente bloqueante, cuyos resultados fueron los esperados, indicando la no existencia de diferencias significativas en la intensidad de ambos tipos de muestra (p-valor = 0,2, t = -1,4) en ausencia de bloqueante, y la diferencia significativa existente entre ambas muestras debido al bloqueante, que redujo la intensidad de punto del alelo nativo (p-valor = 0,0012, t = -8,0). Estos resultados confirmaron el buen funcionamiento de la amplificación bloqueada y de la hibridación como técnica de detección post-amplificación.



**Figura 22.** Intensidad de punto promedio de los arrays para las muestras nativa y mutante sin y con agente bloqueante a 40 nM (3 réplicas).

Para expresar la variabilidad intra-array (entre los puntos de una misma sonda) e inter-array (entre diferentes arrays para la misma muestra) del ensayo de hibridación, se calculó la desviación estándar relativa (RSD) (**Tabla 11**). Los valores de RSD fueron los esperados, ya que son comparables a los obtenidos en este tipo de sistemas (Tortajada-Genaro, et. al, 2016).

Por tanto, se demostró que el ensayo propuesto en el presente TFG es reproducible y que la amplificación bloqueada asimétrica combinada con la hibridación en chip de policarbonato funciona.

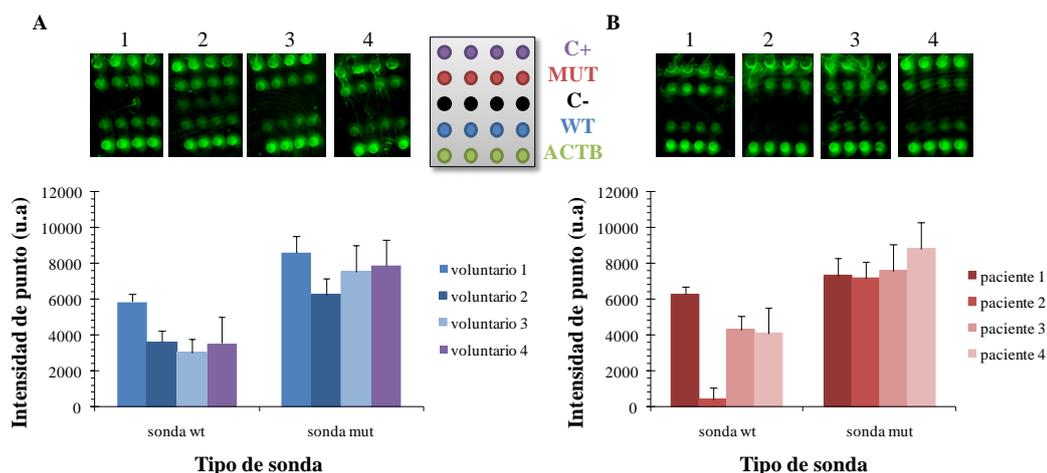
**Tabla 11.** Valores de RSD (%) obtenidos a partir de la intensidad de las sondas tras la hibridación.

Tipo de variabilidad	Sonda Wt	Sonda Mut
Intra-array <sup>(1)</sup>	9-15%	6-15%
Inter-array <sup>(2)</sup>	20%	25%

(1) Calculada a partir de 3 réplicas (4 puntos/réplica). (2) Calculada a partir de 3 réplicas (promedio 4 puntos/réplica) Wt: sonda para el ADN nativo o 'wild type'; Mut: sonda para el ADN mutante.

#### 4.5.3.2. Análisis de pacientes

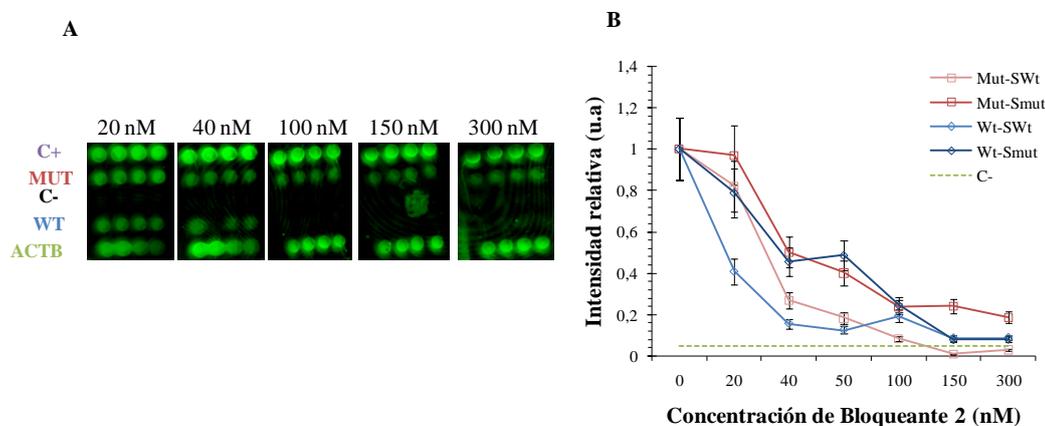
Los siguientes experimentos se enfocaron en la evaluación de las muestras de ADN procedente de voluntarios sanos y de pacientes con cáncer colorrectal metastásico, estas últimas obtenidas del Hospital La Fe de Valencia. En una primera fase del estudio, se amplificaron en ausencia de agente bloqueante e hibridaron 4 muestras de epitelio bucal y 4 muestras de tejido embebido en parafina y fijado en formalina (FFPE). Las imágenes registradas y sus correspondientes intensidades de punto calculadas se recogen en la **Figura 23**. Los valores registrados mostraron que el proceso de hibridación funcionó correctamente. No se registró ninguna señal para el control negativo y señales diferenciables del fondo para los controles positivos (sonda-antisona y gen *ACTB*). Los valores de intensidad de los puntos asociados a la sonda de la variante nativa y mutada, indicaron hibridación preferencial en la sonda mutante en el caso de los pacientes de cáncer colorrectal metastásico. Por lo tanto, se demostró que el método era compatible con el empleo de las muestras FFPE, a pesar de la dificultad asociada a la posible degradación de los ácidos nucleicos. Es decir, el ensayo fue lo suficientemente sensible, incluso con la baja concentración de ADN existente en las mismas. No obstante, en el caso de las muestras nativas, se observó hibridación en ambas sondas (nativa y mutante), sugiriendo ciertos problemas en la selectividad del ensayo. Estos resultados confirmaron la demanda de una etapa bloqueo para minimizar la cantidad de ADN nativo y la necesidad de mejorar las condiciones experimentales de la hibridación, con el objeto de maximizar la capacidad de discriminación de las sondas.



**Figura 23.** Intensidad de punto promedio registrada de las sondas nativa y mutante de 4 muestras de voluntarios sanos (A) y 4 pacientes mutantes (B). Arriba, imágenes tomadas del chip y distribución de las sondas específicas en el array.

#### 4.5.3.3. Efecto de la concentración de agente bloqueante

Con el objetivo de mejorar el ensayo, se realizó una amplificación bloqueada asimétrica en la que se probaron diferentes concentraciones de agente bloqueante para una muestra de ADN nativo (~17.500 copias iniciales) y una muestra de paciente mutante (~16.000 copias iniciales). Tras la hibridación, para ambos tipos de muestra, se detectó producto coloreado en ambas sondas. Mientras que para la muestra nativa no se observó un patrón diferente de hibridación, para la muestra mutante sí se observó el aumento de la selectividad a mayor concentración de bloqueante (**Figura 24**).



**Figura 24. A:** Imágenes registradas tras la hibridación de la muestra mutante. **B:** Intensidad de señal normalizada en las sondas mutante y nativa a partir de la amplificación asimétrica a diferentes concentraciones de agente bloqueante de una muestra nativa y una mutante. Mut-SWt: muestra mut-sonda wt; Mut-SMut: muestra mut-sonda mut; Wt-SWt: muestra wt-sonda wt; Wt-SMut: muestra wt-sonda mut. C-: control negativo del ensayo.

Para la muestra mutante, se vio que la presencia del agente bloqueante afectaba a ambos alelos. Pero, a partir de una concentración de agente bloqueante a 50 nM, las respuestas asociadas a la sonda nativa desaparecieron siendo únicamente detectable las del alelo mutante. En el caso de la muestra nativa, se observó que a medida que se aumentaba la concentración de agente bloqueante, la intensidad de punto de la sonda nativa disminuía, cumpliendo con las expectativas y confirmando el éxito de la amplificación bloqueada. No obstante, la muestra nativa también hibridó con la sonda mutante, incluso siguiendo prácticamente la misma tendencia que la observada para la muestra mutante, sugiriendo la falta de selectividad del ensayo de hibridación.

Seleccionando una concentración de bloqueante de 150 nM, el perfil de hibridación sería el correcto. Para la muestra nativa, no se observa producto coloreado en ninguna de las sondas y para la muestra mutante, se observa únicamente producto en la sonda asociada a la mutación c.7199 T>A.

Los resultados se compararon con los obtenidos por el grupo de investigación del Hospital Universitario Politécnico de La Fe, para las mismas muestras de tejido biopsiado aplicando la metodología basada en una técnica NGS. Existió una coincidencia en la detección e identificación de la mutación c.7199 T>A. Obviamente, la baja escala del estudio de la metodología desarrollada y la tecnología de referencia hacen que la significación estadística de la intercomparación sea limitada. No obstante, pone de manifiesto que el método de enriquecimiento y ensayo de hibridación propuestos son aproximaciones capaces de proporcionar soluciones aplicables a muestras reales, representativas de la problemática de baja concentración de la variante mutante y complejidad de la matriz de un tejido biopsiado.

#### **4.6. ACCIONES FUTURAS**

En este punto de la investigación se ha demostrado que la amplificación bloqueada funciona, ya que, tras la hibridación, se observa una reducción de la señal del alelo nativo y un mantenimiento de la señal del alelo mutante. Además, el ensayo propuesto es reproducible, por lo que, con el estado pre-evaluado, éste presenta indicios de su claro potencial como futura plataforma modelo. Es por ello que es necesario seguir en la mejora del mismo, concretamente, continuando en el estudio de las condiciones de hibridación, para favorecer la hibridación entre sondas totalmente complementarias. Con el objetivo de mejorar y avanzar en el desarrollo del ensayo descrito en el presente TFG, se proponen una serie de experimentos:

- Evaluar en profundidad las condiciones de la amplificación bloqueada (tanto en la variante simétrica como en la asimétrica): número de ciclos, rango de temperaturas óptimo, concentración de cebadores y agente bloqueante (tanto el 1 como el 2) mínima y máxima para observar diferencias claras y estadísticamente significativas entre el alelo nativo y el mutante.
- Estudiar diferentes diseños de agentes bloqueantes para la amplificación bloqueada y sondas. Incluiría diferentes secuencias y modificaciones como PNAs o LNAs de distintas propiedades y características, con el objetivo de mejorar la selectividad en la hibridación y la discriminación perfecta entre alelo mutante y alelo nativo.
- Ensayar diferentes composiciones del tampón de hibridación para favorecer y mejorar la selectividad del ensayo propuesto: diferente porcentaje de formamida y SSC, así como de otros reactivos empleados en la impresión o detección/revelado.
- Realizar dichos experimentos propuestos con muestras embebidas en parafina y fijadas en formalina tanto de pacientes con cáncer colorrectal no mutantes como mutantes en *BRAF*, confirmando la capacidad selectiva del ensayo propuesto.
- Emplear la plataforma modelo establecida con otros genes diana de gran importancia e interés en cáncer colorrectal, para permitir el multiplexado en un único ensayo y, finalmente, el asesoramiento médico adecuado al perfil de cada paciente.

Se evaluó el tiempo requerido para realizar el procedimiento del ensayo presentado, resultando en menos de 5 h de duración, aportando flexibilidad en el diseño, y siendo, por tanto, una propuesta interesante con potencial aplicabilidad en la rutina clínica, sustituyendo a otras técnicas que requieren más tiempo (**Tabla 12**). El tiempo para la realización del ensayo propuesto entra dentro del tiempo requerido para el análisis rutinario en clínica, superando incluso a técnicas implementadas como *SCORPION-ARMS* (8 h) o el método Sanger (1 día). La técnica PCR-ASA, también muy empleada, tarda mucho menos (< 3 h), pero tiene el riesgo de los falsos positivos y los kits comerciales resultan especialmente caros ya que analizan un número limitado de oncogenes y/o mutaciones. Por tanto, teniendo en cuenta que el tiempo es un factor crucial en el análisis, y que el ensayo propuesto se adapta a este requerimiento, otro reto interesante y no menos importante que entra dentro de las acciones futuras, consistiría en optimizar el tiempo de realización del ensayo, convirtiéndole así en una clara propuesta diana para su implementación en clínica.

**Tabla 12.** Estimación del tiempo de análisis de la metodología propuesta.

<b>Procedimiento</b>	<b>Tiempo</b>
Extracción de ADN	40 min
Amplificación bloqueada	90 min
Tratamiento e inmovilización de las sondas en el chip	30 min
Hibridación	80 min
Revelado	30 min
Lectura y procesamiento de datos	20 min
<b>TOTAL</b>	<b>290 min (&lt; 5 h)</b>

## 5. CONCLUSIONES

Este trabajo de fin de grado ha permitido establecer las bases experimentales para apoyar el desarrollo de un ensayo que permita el análisis del estado mutacional del gen *BRAF*, concretamente, de la mutación V600E. Los resultados más destacables obtenidos en el presente trabajo son:

- La adición en la mezcla de PCR de los agentes bloqueantes diseñados, que a una concentración de 50 nM, minimizan la amplificación de los alelos nativos y enriquecen el producto en el alelo mutante.
- La amplificación bloqueada asimétrica favorece la detección mediante el ensayo de hibridación en chip de policarbonato.
- El ensayo propuesto (amplificación bloqueada combinada con hibridación) permite el análisis de muestras de ADN procedentes de tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina, a pesar de que éstos implican la degradación de los ácidos nucleicos, en condiciones de alta reproducibilidad.
- El ensayo propuesto muestra su potencial como plataforma modelo para el desarrollo de un sistema rápido, sencillo y aplicable en la rutina clínica en el análisis mutacional de los genes diana en cáncer.

Aunque es necesario continuar en su desarrollo, frente a las técnicas actualmente comercializadas e implementadas en los laboratorios clínicos, el ensayo propuesto es una clara alternativa más barata, sencilla y flexible. La investigación llevada a cabo en el presente TFG pretende contribuir en el desarrollo de una plataforma modelo que permita la futura generación de sistemas de detección de mutaciones. La aproximación propuesta puede ser potencialmente extrapolada a genes diana como *KRAS*, *NRAS* y *PIK3CA*, permitiendo el diagnóstico, pronóstico y asignación del tratamiento más adecuado para los pacientes, y cuya implementación no se dé únicamente en los laboratorios centralizados.

## 6. REFERENCIAS

- Allegra, A., 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 (ASCO) Update 2015. *Journal Of Clinical Oncology*, 34(2), 179-185.
- Asiello, P. J., & Baeumner, A. J. (2011). Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab on a Chip*, 11(8), 1420-1430.
- Aviel-Ronen, S., Zhu, C. Q., Coe, B. P., Liu, N., Watson, S. K., Lam, W. L., & Tsao, M. S. (2006). Large fragment Bst DNA polymerase for whole genome amplification of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC genomics*, 7(1), 312.
- Benlloch, S., Payá, A., Alenda, C., Bessa, X., Andreu, M., Jover, R. & Massutí, B. (2006). Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 8(5), 540-543.
- Das, V., Kalita, J., & Pal, M. (2017). Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 8-19.
- Dominguez, P. L., & Kolodney, M. S. (2005). Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens. *Oncogene*, 24(45), 6830-6834.
- EMA.EUROPA.EU, (2016). European Medicines Agency-Find medicine-Erbitux, [vista en Abril de 2017]  
Enlace:[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)
- 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.
- GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. ARCI: OMS; [último acceso Abril 2017]. Accesible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Heideman, D. A., Lurkin, I., Doeleman, M., Smit, E. F., Verheul, H. M., Meijer, G. A. & Zwarthoff, E. C. (2012). KRAS and BRAF mutation analysis in routine molecular diagnostics: comparison of three testing methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor-derived DNA. *The Journal of molecular diagnostics*, 14(3), 247-255.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J. & Kitano, T. K. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*, 83(22), 8604-8610.
- Holderfield, M., Deuker, M. M., McCormick, F., & McMahon, M. (2014). Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 14(7), 455-467.
- Jani, I. V. (2013). How point-of-care testing could drive innovation in global health. *The New England journal of medicine*, 368(24), 2319.
- Kiefer, J. R., Mao, C., Hansen, C. J., Basehore, S. L., Hogrefe, H. H., Braman, J. C., & Beese, L. S. (1997). Crystal structure of a thermostable Bacillus DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution. *Structure*, 5(1), 95-108.
- Łaczmańska, I., Pesz, K., & Łaczmański, Ł. (2009). Application of selected methods based on the polymerase chain reaction in medical molecular diagnostics. *Adv Clin Exp Med*, 18, 85-92.

- Lopez-Rios, F., Angulo, B., Gomez, B., Mair, D., Martinez, R., Conde, E. & de Castro, D. G. (2013). Comparison of testing methods for the detection of BRAF V600E mutations in malignant melanoma: pre-approval validation study of the companion diagnostic test for vemurafenib. *PLoS One*, 8(1), e53733.
- 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.
- Lu, Y. Q., & Lu, K. H. (2017). Advancements in next-generation sequencing for diagnosis and treatment of non-small-cell lung cancer.
- Lucas-Garrote, B., Morais, S., & Maquieira, Á. (2017). Dual signal amplification for highly sensitive hybridization microassays on chemically activated surfaces. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 246, 1108-1115.
- Mancini, I., Pinzani, P., Simi, L., Brandslund, I., Vermeersch, P., Di Resta, C. & Pazzagli, M. (2015). Implementation of a companion diagnostic in the clinical laboratory: The BRAF example in melanoma. *Clinica Chimica Acta*, 439, 128-136.
- 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.
- Morandi, L., De Biase, D., Visani, M., Cesari, V., De Maglio, G., Pizzolitto, S. & Tallini, G. (2012). Allele specific locked nucleic acid quantitative PCR (ASLNAqPCR): an accurate and cost-effective assay to diagnose and quantify KRAS and BRAF mutation. *PloS one*, 7(4), e36084.
- Morlan, J., Baker, J., & Sinicropi, D. (2009). Mutation detection by real-time PCR: a simple, robust and highly selective method. *PloS one*, 4(2), e4584.
- NCCN.ORG, (2016). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, [vista en Abril de 2017] Enlace: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp)
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. *NucleicAcids Res.*, 2000, 28, e63.
- Pichler, M., Balic, M., Stadelmeyer, E., Ausch, C., Wild, M., Guelly, C. & Dandachi, N. (2009). Evaluation of high-resolution melting analysis as a diagnostic tool to detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11(2), 140-147.
- Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D., & Blum, L. J. (2008). DNA biosensors and microarrays. *Chemical reviews*, 108(1), 109-139.
- Sebolt-Leopold, J. S., & Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(12), 937-947.
- 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. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). *Cancer statistics, 2017*. CA: a cancer journal for clinicians, 67(1), 7-30
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) 2016: Las Cifras del Cáncer en España. Accesible en: [www.seom.org](http://www.seom.org) [último acceso Abril 2017]
- Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J., & Brown, T. (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research*, 28(19), 3752-3761.
- Tortajada-Genaro, L. A., Mena, S., Niñoles, R., Puigmule, M., Viladevall, L., & Maquieira, Á. (2016). Genotyping of single nucleotide polymorphisms related to attention-deficit hyperactivity disorder. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(9), 2339.

- Tortajada-Genaro, L. A., Rodrigo, A., Hevia, E., Mena, S., Niñoles, R., & Maquieira, Á. (2015). Microarray on digital versatile disc for identification and genotyping of *Salmonella* and *Campylobacter* in meat products. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(24), 7285.
- Tsiatis, A. C., Norris-Kirby, A., Rich, R. G., Hafez, M. J., Gocke, C. D., Eshleman, J. R., & Murphy, K. M. (2010). Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(4), 425-432.
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., & Ciardiello, F. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 27(8), 1386-1422.
- Verweij, J. J., & Stensvold, C. R. (2014). Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical microbiology reviews*, 27(2), 371-418.
- Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G., Malinowski, D. P. *NucleicAcids Res.*, 1992, 20, 1691-1696
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 489-499.
- Wang, Q., Hu, W. G., Song, Q. B., & Wei, J. (2014). Braf v600e mutation as a predictive factor of anti-egfr monoclonal antibodies therapeutic effects in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *Chinese medical sciences journal*, 29(4), 197-203.
- Weyant, G. W., Wisotzkey, J. D., Benko, F. A., & Donaldson, K. J. (2014). BRAF Mutation Testing in Solid Tumors: A Methodological Comparison. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 16(5), 481-485.
- Youssef, E. M., Ewieda, G. H., Ali, H. A., Tawfik, A. M., El, W. M. E. D. A., Ezzat, A. A. & El-Khouly, N. (2013). Comparison between CEA, CA 19-9 and CA 72-4 in Patients with Colon Cancer. *International Journal of Tumor Therapy*, 2(1), 26-34).

# ANEXO

Parte de los resultados del presente TFG se incluyeron en la comunicación tipo póster adjuntada. Se presentó en el *XI INTERNATIONAL WORKSHOP ON SENSORS AND MOLECULAR RECOGNITION* (Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, IDM) con título: ‘Análisis mutacional del oncogén *BRAF* en pacientes con cáncer colorrectal’, recibiendo el premio a mejor comunicación tipo póster, que tuvo lugar en Valencia, días 6 y 7 de Julio de 2017.