

Irene Jiménez Romero¹, Ana Lázaro Zaragoza¹, Sara Martorell Tejedor¹, Luis A. Tortajada Genaro^{1,2}, Ángel Maquieira Catalá^{1,2}

¹Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM)

Universitat Politècnica de València-Universitat de València. Camino de vera s/n, 46022 Valencia. ²Departamento de Química, Universitat Politècnica de València. Camino de vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: irjiro@etsiamn.upv.es

RESUMEN

La investigación se centra en el desarrollo de un ensayo para el análisis mutacional del oncogén *BRAF*. El interés clínico reside en que su estado mutacional tiene un papel pronóstico en los pacientes con cáncer colorrectal avanzado (supervivencia media con *BRAF* mutante 10,4 meses en comparación con los pacientes no mutantes, con media de supervivencia de 34,7 meses). La proteína B-raf controla funciones celulares como la división, migración y apoptosis. Las terapias con anticuerpos monoclonales (Cetuximab y Panitumumab) inhiben la activación de la señalización al unirse a EGFR. Sin embargo, *BRAF* mutado hace que los pacientes tengan menor probabilidad de beneficiarse de estas terapias, por lo que conocer su estado mutacional permite un mejor manejo de los pacientes.



BASE TEÓRICA

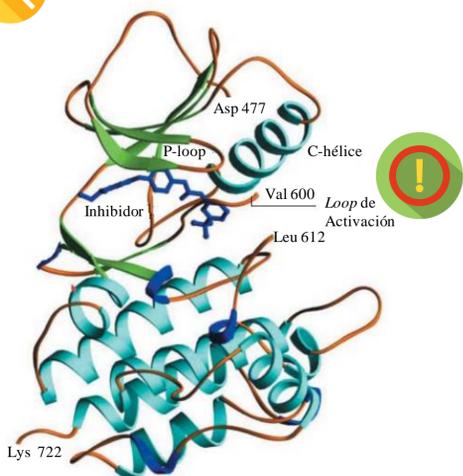


Figura 1. Inhibición de B-Raf.

La conformación inactiva implica la interacción entre el A-loop (Loop de Activación) y el P-loop. Cuando la proteína se activa, el A-loop se fosforila en la Valina 600. La mutación V600E (cambio de valina por glutámico) mimetiza el estado activado. Se han desarrollado inhibidores que interactúan entre el P-loop y A-loop para interrumpir la conformación activa.

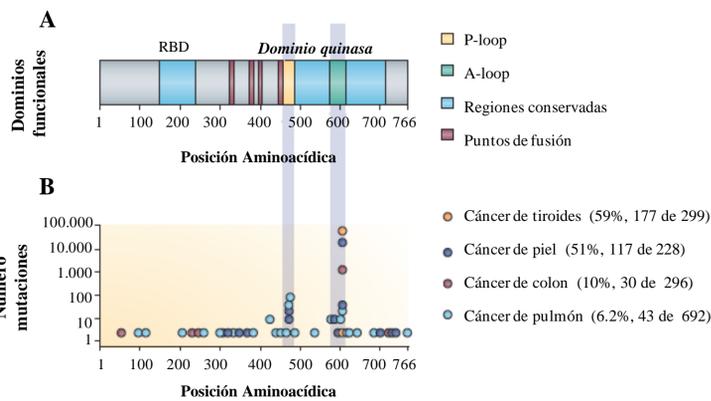


Figura 2. Mutaciones en *BRAF* en cáncer. La sustitución de la Valina en posición 600 por Ácido Glutámico en el dominio quinasa (A) es la mutación más común (B).

El análisis a partir de muestras de tumores de tejidos biopsiados embebidos en parafina y fijados en formalina (FFPE) implica:

1. La posible degradación de los ácidos nucleicos.
2. Elevada relación ADN nativo/mutante, dificultando la detección del mutante.
3. Las técnicas de análisis mutacional deben ser rápidas, con elevada relación coste/efectividad y sensibilidad.

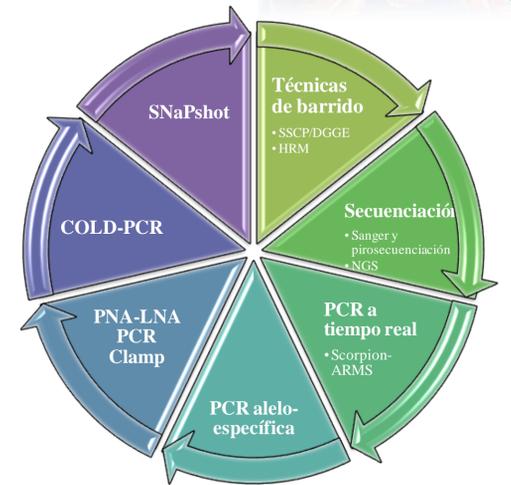


Figura 3. Principales tipos de tecnologías más empleadas en el análisis mutacional de oncogenes en cáncer colorrectal.

PROPUESTA

Se propone un ensayo basado en el enriquecimiento de la muestra en alelos mutantes (*BRAF* V600E) mediante una amplificación bloqueada de alelos nativos, para la posterior confirmación de la mutación por un ensayo selectivo de hibridación.

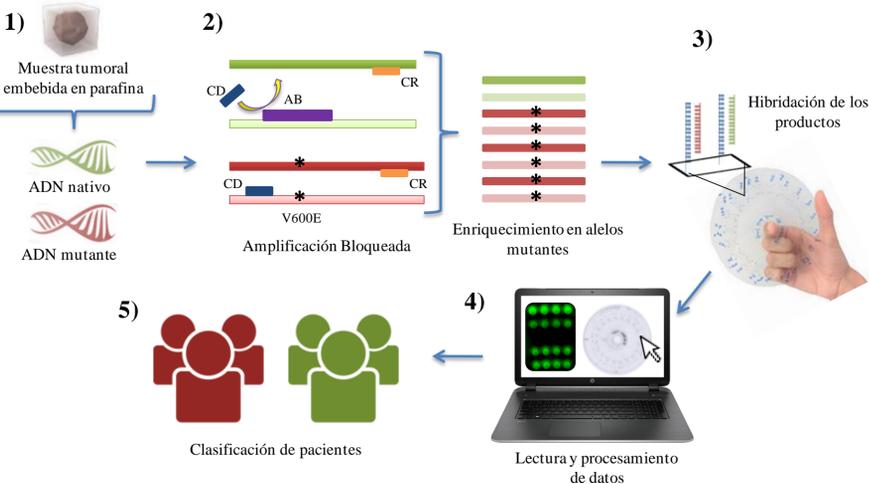


Figura 4. Esquema de la metodología propuesta.

CD: cebador directo; CR: cebador reverso; AB: agente bloqueante; V600E: mutación más frecuente en *BRAF*.

PUESTA A PUNTO DE LA AMPLIFICACIÓN

Tipo de muestra	Nº de copias	RSD (%)
FFPE	1,3 · 10 ⁷	6,4
Epitelio bucal	1,5 · 10 ⁷	5,3
ACTB (control positivo)	4,0 · 10 ⁷	2,6

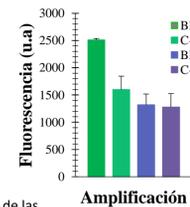
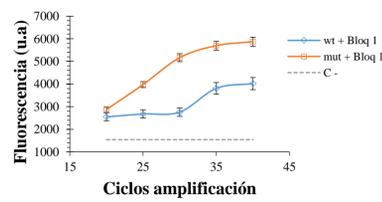


Figura 5. Número de copias promedio tras la amplificación (58°C 35 Ciclos) de las muestras de trabajo. Muestras FFPE: muestras embebidas en parafina de pacientes con mutación V600E; Muestras epitelio bucal: muestras de individuos sanos (ADN nativo); ACTB: control positivo de la amplificación, gen endógeno de referencia; RSD: Desviación Estándar Relativa (Relative Standard Deviation)



Se observa que 58 °C como temperatura de anillamiento y 35 ciclos de reacción son valores óptimos para la amplificación bloqueante.

Figura 7. Señal de amplificación a diferentes ciclos. Wt: ADN genómico nativo de un voluntario; wt + Bloq 1: ADN genómico nativo con 300 nM de bloqueante 1; mut + Bloq 1: ADN mutante sintético con 300 nM de bloqueante 1. C-: control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde).

Figura 6. Señal de amplificación de los bloqueantes para observar su comportamiento como cebador. C-1: control negativo 1 (cebador reverso y Bloqueante 1 a 300 nM sin ADN molde). C-2: control negativo 2 (cebador reverso y Bloqueante 2 a 300 nM sin ADN molde).

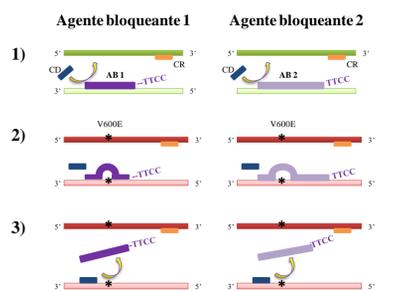


Figura 8. Diseño y efecto de los agentes bloqueantes sobre el ADN nativo (verde) y mutante (rojo). AB1: agente bloqueante 1. AB2: agente bloqueante 2. Ambos presentan una cola de nucleótidos en el extremo 3' no complementaria; AB 2 es más largo que AB 1.

PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE HIBRIDACIÓN

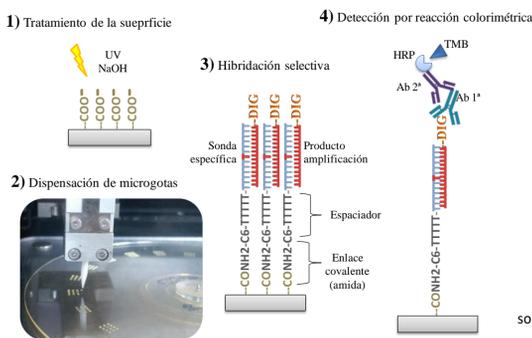


Figura 9. Resumen del diseño experimental del ensayo de hibridación en chip de policarbonato de los productos amplificados. COO-: grupo carboxilo libre; DIG: dioxigenina (marcaje proporcionado por el cebador reverso); Ab 1^o: anticuerpo primario; Ab 2^o: anticuerpo secundario. HRP: peroxidasa de rábano. TMB: sustrato enzimático 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina.

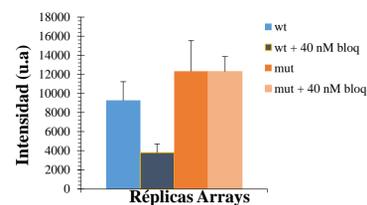


Figura 10. Intensidad de punto promedio de los arrays wt y mutante sin y con agente bloqueante a 40 nM.

REPRODUCIBILIDAD

Tabla 1. Valores de RSD (%) obtenidos a partir de la intensidad de las sondas tras la hibridación del producto amplificado a partir de una muestra de ADN nativo (epitelio bucal) y mutante (paciente).

Tipo de variabilidad	Sonda Wt	Sonda Mut
Intrararray (1)	9-15 %	6-15 %
Interarray (2)	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; Mut: sonda para el ADN mutante.

SELECTIVIDAD DE LAS SONDAS

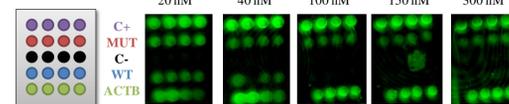
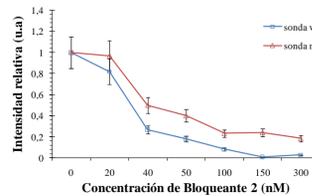


Figura 11. Intensidad relativa de señal en la sonda mutante y wt de una muestra de paciente con diferente concentración de agente bloqueante. Sonda wt: sonda específica para el ADN nativo; sonda mut: sonda específica para el ADN mutante (V600E). C-: control positivo de hibridación. C-: control negativo de hibridación. ACTB: control positivo amplificación.

CONCLUSIONES

1. La metodología de enriquecimiento del alelo mutante funciona correctamente bajo las condiciones ensayadas (58 °C 35 Ciclos).
2. Ambos agentes bloqueantes (con diseños diferentes) mostraron el mismo efecto sobre el ADN nativo.
3. Una amplificación con agente bloqueante a 100-300 nM permite mejorar la selectividad de la sonda en el ensayo de hibridación.
4. Esta metodología permite el desarrollo de un único ensayo que permita el pronóstico y la clasificación de los pacientes con cáncer colorrectal en el grupo poblacional más adecuado para recibir el tratamiento personalizado.
5. En la vía del ensayo propuesto, esta tecnología supone el inicio en la generación de sistemas que permitan su uso rutinario en el ámbito clínico.

AGRADECIMIENTOS

PROYECTO ONCOMARKER (MINECO RTC-2015-3625-1), CTO 2013-45875-R, FEDER y GVA PROMETEO II/2014/040

REFERENCIAS

- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. *Cancer Statistics: a cancer journal for clinicians*, 2017. 67(1), 7-30.
- Di Nicolantonio, et. al. *Journal of clinical Oncology*, 2008. 25(35), 5705-5712.
- Holderfield, M., et. al. *Nature reviews Cancer*, 2014, 14(7), 455-467.
- Sebolt-Leopold, J.S. Herrera, R., *Nature Reviews Cancer*, 2004. 4(12), 937-947.