

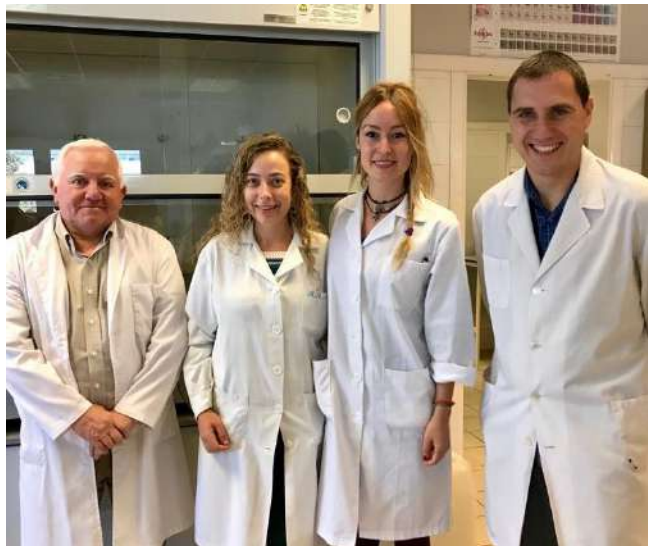
**PO-BIO-07: DETECCIÓN DE MUTACIONES EN ONCOGENES EN EL TRATAMIENTO
DIRIGIDO AL CÁNCER COLORRECTAL**

L.A. Tortajada-Genaro^{1,2}, S. Martorell², A. Lázaro², S. Palanca³, A. Maquieira^{1,2}

(1) Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, camí de Vera s/n, 46022. Valencia, luitorge@qim.upv.es

(2) Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), UPV-UV

(3) Lab. Biología Molecular (Servicio de A. Clínicos). Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia



INTRODUCCIÓN

Durante muchos años, la atención sanitaria se ha basado principalmente en dar a los pacientes el tratamiento en función de sus antecedentes médicos personales y su estado fisiológico. Sin embargo, la diversidad en la eficacia de los tratamientos indica que es necesaria una medicina también basada en las características moleculares de la enfermedad [1]. Así, la llamada "Medicina Personalizada" pretende seleccionar los tratamientos según las características de cada paciente, de tal manera que estos se apliquen a grupos específicos de enfermos y se alcancen mejores resultados terapéuticos, reduciendo efectos secundarios indeseables y costes económicos [2]. Este nuevo paradigma es posible porque actualmente se dispone de información sobre las asociaciones entre variantes genéticas y el riesgo de aparición de ciertas patologías o la respuesta del paciente a fármacos, etc [3].

Una problemática concreta es el caso del cáncer colorrectal, cuya incidencia en España (25.000 casos/año) y mortalidad (12.000 casos/año) son elevadas. La presencia de mutaciones somáticas en ciertos genes (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR*) se asocia a una resistencia a los tratamientos con anticuerpos monoclonales (Cetuximab y Panitumumab). Las agencias de medicamentos europea y estadounidense obligan a realizar un análisis

mutacional en ciertos exones en pacientes con enfermedad avanzada, antes de administrar el tratamiento farmacológico, ya que sólo debe realizarse cuando no existan mutaciones [4].

Desde el punto de vista analítico, la discriminación correcta de las mutaciones implicadas es un gran reto dado que la muestra típicamente está compuesta mayoritariamente de ADN salvaje con una cantidad minoritaria de ADN mutante, que se diferencia en uno o dos nucleótidos respecto a la secuencia nativa [5]. Además, la identificación del cambio genético específico es crucial, ya que esta información ayuda a una mejor clasificación del paciente en el grupo poblacional correspondiente y a establecer el tratamiento a seguir [6].

Entre las técnicas actuales, muy sofisticadas y de altas prestaciones, destacan la secuenciación automática, pirosecuenciación y PCR en tiempo real [7]. No obstante, el desafío científico-técnico sigue estando vigente por sus limitaciones como baja sensibilidad y capacidad de trabajo, elevado coste y/o largos tiempos de repuesta [8]. Por ello, hay demanda de nuevos modos de obtener resultados analíticos que presenten ventajas respecto a las metodologías ya existentes. Una interesante aproximación se basa en ensayos de hibridación en chip que permite la detección de varias mutaciones relevantes de forma simultánea [9].

En este trabajo, se pretende desarrollar un método de biosensado sencillo, sensible, selectivo y robusto para la detección simultánea de mutaciones en los genes implicados en cáncer.

Para ello, se ha puesto a punto una amplificación bloqueada que logra el enriquecimiento de los alelos minoritarios. Esto facilita su biosensado mediante un ensayo de hibridación en formato micromatriz y lectura óptica. Al utilizar sondas alelo-específicas, los perfiles de hibridación son distintos, discriminando entre las diferentes variantes genéticas de interés.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La Figura 1 muestra las etapas de la metodología desarrollada para biopsias de tejidos de colon. Tras la extracción del ADN genómico de las muestras, se

realiza el enriquecimiento de la variante mutante mediante PCR bloqueada. El proceso se basa en la adición de un oligonucleótido específico a la mezcla de reacción. Este oligonucleótido es complementario a la secuencia nativa y, por tanto, formará un complejo más estable con la variante nativa que con la variante mutada. De este modo, los cebadores diseñados, próximos a la zona de mutación, se unirán solamente en aquellas moléculas accesibles, activando el proceso de elongación mediante la acción de la polimerasa. El resultado es una amplificación preferente de las variantes mutadas (sin bloquear) frente a las variantes nativas (bloqueadas). Los productos formados son incubados en un chip que contiene las sondas específicas inmovilizadas en formato de micromatriz. Trabajando en condiciones restrictivas, se logra una hibridación altamente dirigida. La imagen resultante del sensado óptico colorimétrico es procesada para obtener un perfil molecular característico que permite su clasificación en el correspondiente grupo poblacional, en función de unos valores límites preestablecidos.

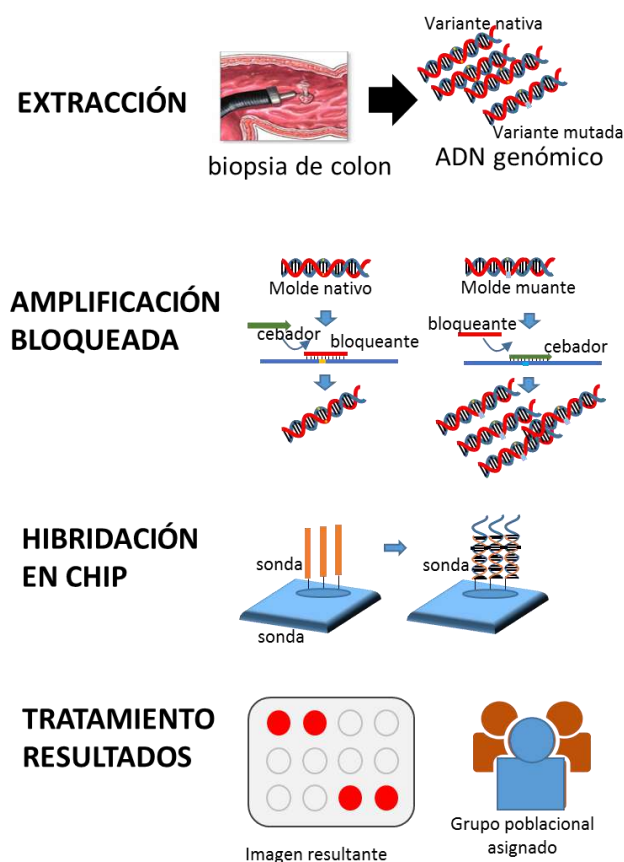


Figura 1.- Esquema de las etapas del ensayo propuesto.

RESULTADOS

Diseño de oligonucleótidos. En primer lugar, se seleccionaron las mutaciones más prevalentes, es decir, aquellas que suponen el 95% de las descritas en pacientes con cáncer colorrectal metastático. Corresponden con variantes en los oncogenes localizadas en los codones 12 y 61 de *KRAS*; en el 61 de *NRAS*; en el 1047 de *PIK3CA*; y en el 600 de *BRAF*. Se diseñaron los cebadores, sondas y oligonucleótidos que actuarían como agentes bloqueantes, teniendo en cuenta los parámetros termodinámicos de los complejos que se forman durante la reacción [10]. El criterio de diseño para los bloqueantes fue que la diferencia de estabilidad entre las variantes nativa y mutante fuera superior a 4 kcal/mol (energía libre de Gibbs). Otro parámetro fue que hubiera un solapamiento entre el bloqueante y el cebador superior a 3 nucleótidos, para favorecer la competición por el ADN molde.

Amplificación bloqueada. Para la puesta a punto del método, se utilizó ADN mutante de líneas celulares (nativas y mutantes) y mezclas en distintas proporciones. Se estudiaron las condiciones de reacción de la amplificación basada en PCR y de la amplificación bloqueada para los genes diana. Los resultados indicaron que las variables más importantes fueron la temperatura de hibridación de los cebadores (óptimo 58 °C), y la concentración de bloqueante (óptimo 50 nM). Aunque los rendimientos de amplificación en condiciones bloqueadas eran inferiores, se alcanzaron valores adecuados de acuerdo a la sensibilidad requerida en los ensayos clínicos. Por lo tanto, se demostró que era posible aplicarse incluso en muestras de tejido tumoral donde el número de copias existentes de las mutaciones es muy pequeño y/o ha habido una degradación del ADN por el tipo de conservación de las biopsias.

Hibridación en chip. Se seleccionó un formato de ensayo basado en la inmovilización de las sondas sobre policarbonato porque se trata de un termoplástico con excelentes propiedades ópticas y adaptables a la fabricación de dispositivos de diagnóstico [11]. Respecto al revelado, se optó por un reconocimiento basado en anticuerpos combinado con una amplificación enzimática [12]. De este modo, cuando se producía la hibridación entre el producto de la PCR y la sonda específica, se originaba un

depósito sólido coloreado que podía ser detectado por un fotómetro (región visible).

Los experimentos se centraron en establecer las condiciones de hibridación (composición del medio de reacción, temperatura, tiempo, lavados, etc.) que originasen una detección selectiva de las mutaciones de los diferentes genes y de los codones distintos del mismo gen. Bajo las condiciones optimizadas, se obtuvieron los perfiles de hibridación en función de los perfiles moleculares. A modo de ejemplo, la Figura 2 muestra los resultados de la hibridación del producto de amplificación nativo de *KRAS* codón 12 (c.34G) en un chip donde se habían anclado covalentemente (vía enlace carbodiimida) las sondas del genotipo nativo de todos los genes en estudio. Se comprueba que el método es altamente selectivo, puesto que sólo se obtuvo señal en las sondas complementarias al producto hibridado (SNR>25), mientras que en el resto la señal es prácticamente nula (SNR<5).

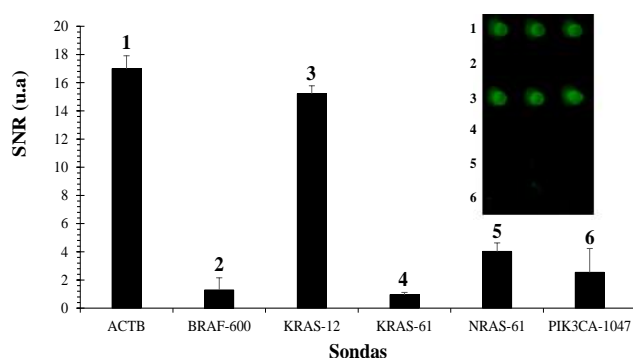


Figura 2.- Imagen de la región del chip y relación señal-ruido (SNR) obtenidos para cada sonda en un ensayo de hibridación de una mezcla que contiene el producto de amplificación nativo del gen *KRAS* codón 12 (c.34G) y el del gen *ACTB* (control endógeno positivo). Sondas nativas: *ACTB* (1), *BRAF* codón 600 (2), *KRAS* codón 12 (3), *KRAS* codón 61 (4), *NRAS* codón 61 (5) y *PIK3CA* codón 1047 (6).

Para evaluar la sensibilidad del ensayo, entendida como la capacidad para discernir entre distintas proporciones nativo/mutante, se utilizaron mezclas que contenían diferentes proporciones de ADN mutante. Como se observa en la Figura 3, correspondiente al método aplicado a la detección del codón 61 del gen *KRAS*, se obtuvo un perfil de hibridación diferencial. Aplicando el ANOVA, se confirmó que únicamente existían dichas diferencias significativas en la señal de la sonda asociada a la mutación c.183A>C respecto al resto de sondas (p-

valor=0,0001). Por lo tanto, se identificó correctamente la formación de los complejos homoduplex entre la sonda y el producto de PCR bloqueada, incluso cuando la proporción del mutante es baja. El mínimo porcentaje de la variante mutante detectado fue entre 1 % y 10 %, dependiendo de la mutación estudiada.

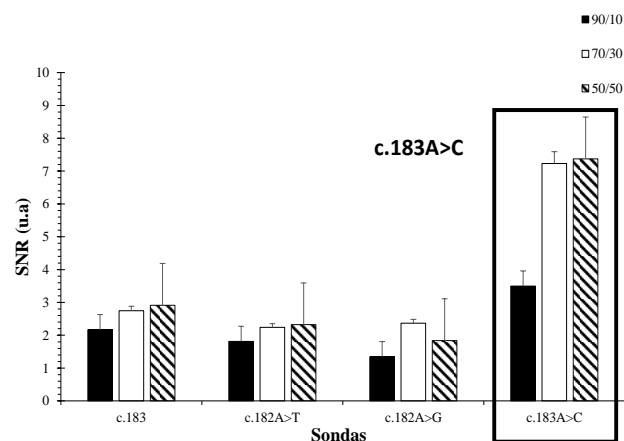


Figura 3.- Señales obtenidas para cada sonda tras la hibridación de productos de PCR bloqueada con 50 nM de bloqueante obtenidos a partir de mezclas de ADN genómico con distintas proporciones nativo/mutante. Gen: *KRAS* codón 61. Muestra: Mutante en c.183A>C

Aplicación: análisis de muestras clínicas. Se estudiaron tejidos embebidos en parafina y fijados en formamida procedentes de pacientes de cáncer de colon metastático (CCRM) atendidos en el Hospital Politécnico La Fe. Los resultados obtenidos en la extracción del ADN genómico confirmaron la dificultad de los ensayos genéticos en este tipo de muestras porque las cantidades aisladas de ADN no degradado fueron bajas (< 200 ng/μL). En esta fase de la investigación, se ha evaluado la capacidad del método para discriminar las variantes mutantes en una pequeña población de pacientes (Tabla 1).

Al comparar los resultados con los obtenidos por la metodología basada en secuenciación (*Next-generation sequencing*), la coincidencia fue del 100% tanto en la detección como en la identificación. Por tanto, aunque se ha realizado a baja escala, las metodologías se han validado y son aplicables a muestras reales, permitiendo la correcta asignación del perfil genético de los pacientes con CCRM.

XXI SEQA. VALENCIA. SEPTIEMBRE 2017
PREMIO SEQA MEJORES COMUNICACIONES EN FORMA DE POSTER

Tabla 1. Asignación de los pacientes a los grupos poblacionales obtenida con el método desarrollado y con el método de referencia (NGS)

	Hotspot	Método desarrollado	Método referencia
1	<i>KRAS-12</i>	Nativo	Nativo
2	<i>KRAS-61</i>	Nativo	Nativo
3	<i>NRAS</i>	Nativo	Nativo
4	<i>BRAF</i>	Nativo	Nativo
5	<i>PIK3CA</i>	Nativo	Nativo
6	<i>KRAS-12</i>	c.34G>T	c.34G>T
7	<i>KRAS-61</i>	c.183A>C	c.183A>C
8	<i>NRAS</i>	c.181C>A	c.181C>A
9	<i>BRAF</i>	c.1799T>A	c.1799T>A
10	<i>PIK3CA</i>	c.3140A>G	c.3140A>G

[2] Gonzalez-Angulo et al. (2010) *J Clin Oncol*, 28(16), 2777-2783.

[3] Douillard et al. (2013) *N Engl J Med*. 12;369(11):1023-34.

[4] Garrido et al. (2012) *Clin Transl Oncol*. 14(5), 338-49.

[5] Thomas et al. (2007) *Nat Genet*. 39(3), 347-51.

[6] Allegra et al. (2015) *Journal of clinical Oncology*, 34(2), 179-185.

[7] Milbury et al. (2009) *Clin Chem*, 55(4), 632-640.

[8] Song et al. (2016) *Nuc Acids Res*, e146.

[9] Steinbach et al. (2015) *Analyst*, 140(8), 2747-2754.

[10] Tortajada-Genaro et al. (2017) *J. Pharm Biomed Anal*, 136, 14-21.

[11] Yamanaka et al. (2017) *Microchim Acta*, 184(5), 1453-1462.

[12] Tortajada-Genaro et al. (2016) *Anal Bioanal Chem*, 408(9), 2339-2345.

CONCLUSIÓN

Aunque es necesario estudiar con mayor profundidad las condiciones de amplificación de la PCR bloqueada, la combinación de esta técnica junto con un ensayo de hibridación ha permitido aumentar la concentración relativa de los alelos mutantes así como asignar correctamente su perfil molecular. Frente a las técnicas actualmente comercializadas, el método desarrollado de biosensado permite la detección simultánea de distintas mutaciones, proporcionando resultados en poco tiempo (8-10 horas), selectivos, sensibles (factores de respuesta relativos superiores a 5), reproducibles (desviación estándar inferior al 13 %), y muy económicos (inferior a 20 €). Por tanto, es una opción prometedora para el análisis mutacional rutinario de genes implicados en cáncer cuya caracterización es necesaria para aplicar tratamientos personalizados.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto ONCOMARKER (MINECO RTC-2015-3625-1), INTERBIOINTER (CTQ2013-45875-R), BIHOLOG (MINECO CTQ2016-75749-R) y GVA FEDER PROMETEO II 2014/040.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Hamburg et al. (2010) *New England Journal of Medicine*, 363(4), 301-304.

