

**Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería**

**PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE
SNAPSHOT PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN
LOS ONCOGENES *KRAS* Y *NRAS***

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en
Biotecnología

Valentina Russo – 167851

Tutor: Astrid Agorio

2015

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Valentina Russo, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Pudiendo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Proyecto de grado de la Licenciatura en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Valentina Russo
13 de Abril, 2015

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento es para la Universidad ORT por brindar la Licenciatura en Biotecnología en la que pude encontrar mi vocación.

A mis compañeras de ruta en esta carrera con las cuales no solo compartí el gusto por la investigación, sino también infinidad de experiencias que nos llevaron a cimentar una amistad.

Al laboratorio Genia y especialmente al Dr. Carlos Azambuja quien sin conocerme confió en mí y me dio la oportunidad de realizar este proyecto junto a su equipo de trabajo.

A todo el grupo humano de Genia por recibirme con tanta calidez y hacerme sentir parte de él desde el comienzo.

Por la colaboración recibida de Genia Argentina y Genia Uruguay para que este proyecto pudiera salir adelante.

A mi tutora, PhD. Astrid Agorio, por sus invaluable aportes, su dedicación, su generosidad para compartir sus conocimientos y su confianza en mí.

Por último, a mi familia por apoyarme y acompañarme en los momentos más importantes de mi vida.

ABSTRACT

El cáncer colorrectal (CRC) es la neoplasia digestiva más frecuente a nivel mundial. En Uruguay el 23,8% del total de las muertes se dan a causa de tumores malignos, dentro de los cuales el CRC es el tercero en incidencia en hombres y el segundo en mujeres. Muchos enfoques terapéuticos para el CRC utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGFR participa en cascadas de señalización intracelulares implicadas en funciones de supervivencia celular, progresión del ciclo celular, angiogénesis y metástasis. Las proteínas KRAS y NRAS participan aguas abajo de la vía de EGFR. Mutaciones en los oncogenes que codifican para estas proteínas provocan la activación constitutiva de la vía independientemente de la actividad de EGFR. Pacientes con mutaciones activantes en estos oncogenes presentan baja respuesta a las terapias antitumorales. Por lo tanto, es de gran importancia para el éxito de las correspondientes terapias conocer si los pacientes presentan dichas mutaciones previo a comenzar con la misma.

En este trabajo se puso a punto y validó un protocolo de SNaPshot desarrollado por el Laboratorio Genia para la detección de mutaciones en los oncogenes *KRAS* y *NRAS*. En la puesta a punto se optimizaron las etapas más importantes de la técnica: evaluación de la cantidad y calidad del ADN proveniente de tejidos FFPE; amplificación de los exones 2, 3 y 4 de *KRAS* y *NRAS*; interferencias generadas por actividad reducida en las enzimas de la purificación; reacción de SNaPshot y electroforesis capilar; e interpretación de los resultados mediante análisis bioinformático. Con el estudio de las distintas etapas de la técnica de SNaPshot se establecieron las condiciones de diagnóstico óptimas. Una vez finalizada la primera parte, se procedió a la validación de la técnica. Para la cual se determinó el límite de detección en un valor 12,5%, la especificidad en 100%, la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) en 100% y la exactitud entre 99 y 100%, por comparación de esta técnica con la secuenciación Sanger, secuenciación de nueva generación (NGS) y kit de *Real time* PCR.

Los resultados de este trabajo fueron muy satisfactorios, logrando establecer y validar la técnica de SNaPshot para el diagnóstico de 56 mutaciones somáticas.

PALABRAS CLAVE

Cáncer colorrectal, *KRAS*, *NRAS*, *Companion Diagnostic Test*, SNaPshot, validación de prueba diagnóstica.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Características del cáncer colorrectal (CRC)	14
1.2. Vía de señalización mediada por EGFR	16
1.3. Terapias con anticuerpos monoclonales anti-EGFR	17
1.4. Oncogenes de la vía RAS-RAF-MAPK	19
1.5. Pruebas diagnósticas acompañantes para tratamientos anti-EGFR	22
1.6. Técnica de SNaPshot	24
2. OBJETIVO	27
2.1. Objetivo general	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. METODOLOGÍA	28
3.1. ADN de muestras de tejidos FFPE	28
3.2. ADNs de referencia con mutaciones en KRAS y NRAS	28
3.3. Curva estándar de ADN genómico	29
3.4. Cuantificación de ADN por qPCR	29
3.5. PCR de exones	30
3.6. Electroforesis en gel de agarosa	31
3.7. Purificación y reacción de SNaPshot	31
3.7.1. Purificación con AP y Exol	31
3.7.2. Reacción de SNaPshot	32
3.7.3. Purificación con AP	33
3.8. Electroforesis capilar	33
3.9. Análisis bioinformático	34
3.9.1. Límite del blanco (LB)	34
3.10. Secuenciación de nueva generación (NGS)	34
3.11. Secuenciación Sanger	35
3.12. Kit de Real time PCR	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. PUESTA A PUNTA DE LA TÉCNICA DE SNAPSHOT	36
4.1.1. Evaluación de cantidad y calidad de ADN proveniente de tejidos FFPE	36
4.1.2. Puesta a punto de PCR de exones	43
4.1.3. Purificación	48
4.1.4. Reacción de SNaPshot y electroforesis capilar	49
4.1.5. Análisis de muestras provenientes de tejidos FFPE	63
4.2. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE SNAPSHOT	71
4.2.1. Límite de detección de la técnica de SNaPshot	71
4.2.2. Especificidad de la técnica de SNaPshot	73
4.2.3. Precisión de la técnica de SNaPshot	73
4.2.4. Exactitud (o desempeño) de la técnica de SNaPshot	78
4.2.5. Resumen validación de la técnica de SNaPshot	82
4.3. DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES EN MUESTRAS DE PACIENTES CON mCRC	83
5. ANÁLISIS ECONÓMICO	85
6. DISCUSIÓN GENERAL	86
7. CONCLUSIONES	92

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
9. ANEXOS.....	99
9.1. ANEXO 1. PROTOCOLO INICIAL PARA DIAGNÓSTICO DE <i>KRAS</i> POR LA TÉCNICA DE SNAPSHOT.	99
9.2. ANEXO 2. PROTOCOLO INICIAL PARA DIAGNÓSTICO DE <i>NRAS</i> POR LA TÉCNICA DE SNAPSHOT.	103
9.3. ANEXO 3. GRÁFICA DE AMPLIFICACIÓN TÍPICA EN QPCR.	107
9.4. ANEXO 4. CEBADORES PARA LA REACCIÓN DE SNAPSHOT DEL GEN <i>KRAS</i>	108
9.5. ANEXO 5. ESTUDIO DE POSICIONES DE MUTACIONES Y PICOS WT PARA EL GEN <i>KRAS</i>	109
9.6. ANEXO 6. NOMENCLATURA MUTACIONES PARA LOS GENES <i>KRAS</i> Y <i>NRAS</i>	110
9.7. ANEXO 7. LÍMITE DEL BLANCO.	112

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Número de casos anual por intervalo etario en Uruguay (media entre 2005 y 2009).	13
Tabla 2: ADNs de referencia con mutaciones en los genes KRAS y NRAS provistos por la empresa Horizon Diagnostic.	28
Tabla 3: Características de los cebadores utilizados para la qPCR.	30
Tabla 4: Características de los cebadores utilizados para la PCR de exones.	31
Tabla 5: Características de los cebadores para la reacción de SNaPshot.	33
Tabla 6: Longitudes de onda de absorción y emisión de los fluoróforos acoplados a los ddNTPs de la reacción de SNaPshot detectados en la electroforesis capilar.	34
Tabla 7: Características de los cebadores utilizados para la secuenciación Sanger.	35
Tabla 8: Datos de curvas estándar utilizando los cebadores hTERT163 y hTERT351.	38
Tabla 9: Estudio de posiciones de NRAS para mutaciones e interferencias.	66
Tabla 10: LD para distintas mutaciones en KRAS y NRAS.	72
Tabla 11: Repetibilidad.	75
Tabla 12: Reproducibilidad.	77
Tabla 13: Exactitud.	79
Tabla 14: Resumen de los resultados de la validación de la técnica de SNaPshot.	82
Tabla 15: Mutaciones halladas en los genes KRAS y NRAS, en 100 muestras.	84
Tabla 16: Costo de la técnica de SNaPshot.	85
Tabla 17: Estudio de posiciones de KRAS para mutaciones e interferencias.	109
Tabla 18: Nomenclatura de mutaciones esperadas para los genes KRAS y NRAS.	110
Tabla 19: LB para el equipo ABI3500xL.	112
Figura 1: Número de casos para los distintos tipos de cáncer a nivel mundial.	12
Figura 2: Número de casos de distintos tipos de cáncer en Uruguay.	13
Figura 3: Progresión del cáncer de colo-recto.	14
Figura 4: Vías de señalización mediada por EGFR.	17
Figura 5: Prevalencia de mutaciones asociadas con la resistencia a terapias anti-EGFR en mCRC.	20
Figura 6: Ruta de señalización mediada por EGFR.	21
Figura 7: Asociación entre mutaciones en los genes KRAS, NRAS, BRAF Y PIK3CA exón 9.	22
Figura 8: Esquema de la reacción de SNaPshot.	24
Figura 9: Representación esquemática de la técnica de SNaPshot.	25
Figura 10: Curvas de disociación para los juegos de cebadores hTERT163, hTERT351 y hTERT195 utilizando la curva estándar de ADN genómico.	36
Figura 11: Gráfica ΔRn vs. ciclos de la curva estándar de ADN puro.	39
Figura 12: Gráfica ΔRn vs. ciclos de muestra de ADN proveniente de tejido FFPE.	39
Figura 13: Fluorescencia absoluta vs. ciclos.	41
Figura 14: Curvas de disociación para diluciones seriadas de ADN puro con los tres juegos de cebadores que amplifican los exones 2, 3 y 4 de KRAS y NRAS.	43
Figura 15: Curvas de amplificación para exones 2, 3 y 4 de KRAS y NRAS para las temperaturas estudiadas: 56°C, 58°C y 60°C.	44
Figura 16: Esquema de la posición de los cebadores KRAS ex.4 Fwd, KRAS ex.4 Fwd _{int} , KRAS ex.4 Rv _{int} y KRAS ex.4 Rv sobre la secuencia del exón 4 de KRAS.	45
Figura 17: Curvas de amplificación para el exón 4 de KRAS con los cebadores KRAS ex.4 Fwd _{int} /KRAS ex.4 Rv, KRAS ex.4 Fwd/KRAS ex.4 Rv _{int} , KRAS ex.4 Fwd/KRAS ex.4 Rv.	46
Figura 18: Electroforesis en geles de agarosa al 3% de PCR de exones.	47
Figura 19: Esquema ilustrando los cebadores de SNaPshot sobre los productos amplificados (en la PCR de exones) de los exones 2, 3, 4 del gen NRAS.	48

Figura 20: Predicción de hibridación de los cebadores de SNaPshot para NRAS: NRAS pos.34, NRAS pos.35 y NRAS pos.37.	49
Figura 21: Electroferogramas de la reacción de SNaPshot con la “mezcla global “de cebadores NRAS en presencia o ausencia del cebador NRAS pos. 34.....	51
Figura 22: Electroferogramas de la reacción de SNaPshot con distintas combinaciones de los cebadores NRAS pos.34, NRAS pos.35 y/o NRAS pos.37.....	53
Figura 23: Pruebas para eliminar interferencia entre los cebadores NRAS pos. 34, NRAS pos. 35 y NRAS pos.37.....	55
Figura 24: Gradiente de temperatura para evaluar interferencia de los cebadores de NRAS utilizando la 3 ^{era} condición (NRAS pos. 34 y NRAS pos.37 disminuidos un décimo e igual concentración de NRAS pos.35).....	57
Figura 25: Reacción de SNaPshot para NRAS separando cebadores NRAS pos.34 y NRAS pos.183.	59
Figura 26: Electroferogramas de SNaPshot para KRAS antes y después de la separación de los cebadores KRAS pos.436, KRAS pos.437 y KRAS pos.183.....	61
Figura 27: Ineficiente actividad de la enzima fosfatasa alcalina durante la 1 ^{era} etapa de purificación en muestras de KRAS y NRAS..	63
Figura 28: Ineficiencia de la actividad de la fosfatasa alcalina en la 1 ^{era} etapa de purificación.....	64
Figura 29: Funcionamiento deficiente de la exonucleasa I.....	67
Figura 30: Electroferogramas de muestras analizadas mediante el programa Gene Mapper®.....	69
Figura 31: Gráfica de amplificación típica.	106
Figura 32: Esquema ilustrando los cebadores de SNaPshot sobre los productos amplificados (en la PCR de exones) de los exones 2, 3, 4 del gen KRAS.	107

ABREVIACIONES

- A: Adenina
- ADN: Ácido desoxirribo-nucleico
- APC: Adenomatous polyposis coli
- ARMS: sistema de amplificación de mutaciones refractarias, del inglés Amplified Refractory Mutation System
- ASB-PCR: PCR de alelo específica con un agente bloqueador, del inglés Allele-Specific PCR with a Blocking reagent.
- BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
- C: Citosina
- CDT: Pruebas diagnósticas acompañantes, del inglés Companion Diagnostic Test
- CRC: Cáncer colo-rectal, del inglés colo-rectal cancer
- CT: ciclo umbral, del inglés cycle threshold
- DCC: Eliminado en carcinoma colorrectal, del inglés Deleted in Colorectal Carcinoma
- ddNTP: dideoxinucleótido tri fosfato
- dNMP: deoxinucleótido mono fosfato
- dNTP: deoxinucleótido tri fosfato
- EGF: Factor de crecimiento epidérmico, del inglés Epidermal Growth Factor
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, del inglés Epidermal Growth Factor Receptor
- EMEA: Agencia Europea de Medicamentos
- ErbB: Oncogen viral de leucemia eritroblástica, del inglés Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene
- FDA: Administración de alimentos y medicamentos, del inglés Food and Drug Administration
- FFPE: Fijado con formaldehído y embebido en parafina, del inglés Formaldehyde-fixed paraffin-embedded
- Fwd: directo, del inglés Forward
- G: Guanina
- GDP: Guanosina difosfato
- GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina, del inglés Guanine nucleotide Exchange Factors
- GTP: Guanosín trifosfato
- HB-EGF: factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina, del inglés heparine binding-EGF
- HRAS: Harvey RAS
- HRM: Curva de disociación de alta resolución, del inglés High Resolution Melt
- KRAS: Kristen RAS
- LB: Límite del blanco
- LD: Límite de detección
- MAb: Anticuerpo monoclonal, del inglés Monoclonal Antibody

- MAPK: Proteína-quinasa activadas por mitógenos, del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase
- mCRC: Cáncer colo-rectal metastásico, del inglés metastatic colo-rectal cancer
- MSP: Ministerio de Salud Pública
- NGS: Secuenciación de nueva generación, del inglés Next Generation Sequencing
- NRAS: Neuroblastoma RAS
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction
- PIK3CA: fosfatidilinositol 3-quinasa catalítica alfa
- PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
- qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real, del inglés quantitative PCR
- R2: coeficiente de determinación
- RAS: Rat Sarcoma virus
- RFU: unidades relativas de fluorescencia
- ROX: carboxy-X-rhodamine
- RRHH: Recursos humanos
- Rv: reverso, del inglés Reverse
- SD: Desvío estándar, del inglés Standard Desviation
- SMAD4: S MAD mothers against decapentaplegic
- SNP: Polimorfismo de nucleótido simple, del inglés Single Nucleotide Polymorphism
- SYBR Green: Cianina asimétrica
- T: Timina
- Taq: Thermus aquaticus
- TGF α : Factor de crecimiento transformante α , del inglés transforming growth factor- α
- Tm: Temperatura disociación, del inglés melting temperature
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular , del inglés Vascular Endotelial Growth Factor
- WNT: Wingless e Int
- WT: normal, del inglés Wild-Type

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, ocupando el segundo lugar luego de las enfermedades cardio-vasculares. Según valores de la OMS (Organización Mundial de la Salud), en el año 2012, 8,2 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad siendo el 70% de las muertes provenientes de países con bajos o medianos ingresos (1).

Existen más de 100 tipos distintos de cáncer, siendo los más frecuentes los de próstata, mama, pulmón y cáncer colorrectal (CRC). En la Figura 1 se observa el porcentaje de casos de cáncer para ambos sexos en el total de países estudiados por la OMS (1,2).

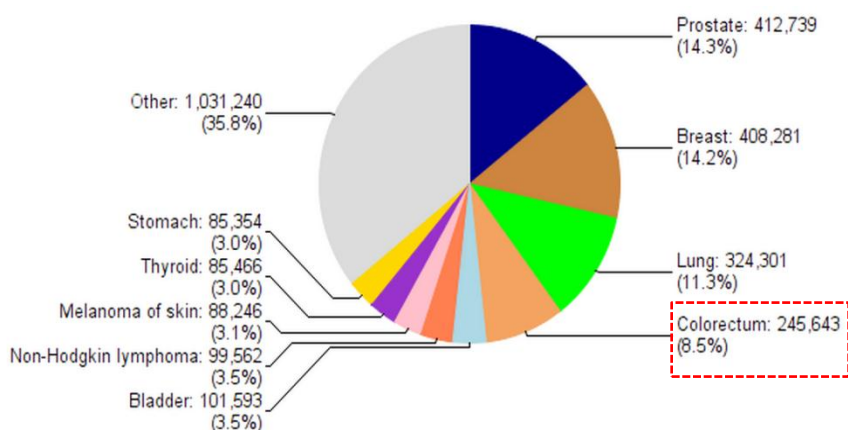


Figura 1: Número de casos para los distintos tipos de cáncer a nivel mundial.
Figura extraída de Globalcan 2012 (2).

En Uruguay, según datos del MSP (Ministerio de Salud Pública), el 23,8% del total de las muertes se dan a causa de tumores malignos, dentro de los cuales el CRC es el tercero en incidencia en hombres y el segundo en mujeres (3,4). En la Figura 2 se observa la alta incidencia de CRC (13,1%) en ambos sexos para todas las edades.

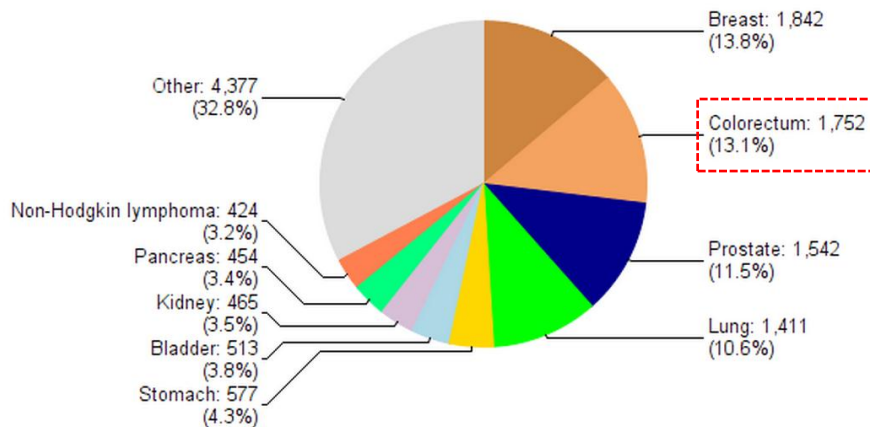


Figura 2: Número de casos de distintos tipos de cáncer en Uruguay. Figura extraída de Globalcan 2012 (2).

El CRC afecta fundamentalmente a la población adulta entre 50 y 70 años de edad. Los datos de la Tabla 1 muestran que el CRC aparece entre los 45 y 50 años con alta tasa de incidencia, lo cual es un elemento a considerar para la detección precoz de la enfermedad (5). A su vez, datos estadísticos de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer muestran que el 55% de los cánceres de colon y recto se detectan en etapas tempranas, y el 45% en etapas avanzadas cuando el cáncer comenzó a extenderse a otros órganos del cuerpo (CRC metastásico o mCRC) (3). Para aquellos pacientes a los que se les detecta la enfermedad en etapas tempranas, logran curarse el 98% de los casos (6).

Tabla 1: Número de casos anual por intervalo etario en Uruguay (media entre 2005 y 2009) (3).

Edades	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54
Cáncer colorrectal	0	0	1	5	9	15	24	44	74	121	230

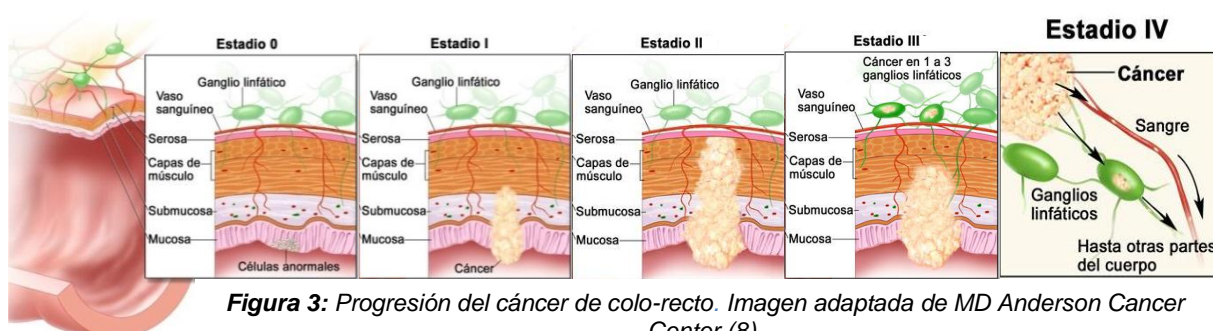
El desarrollo del CRC, al igual que otros tipos de cáncer, es multifactorial pudiéndose generar por distintos factores, entre ellos agentes externos como radiaciones, sustancias químicas, virus o bacterias, o por factores de riesgo como lo es el tabaquismo. Sin embargo, el 30% de los diferentes tipos de cáncer podría prevenirse estudiando el componente genético del mismo en el paciente y actuando en tiempo y forma en caso de detectar un riesgo elevado. Esto demuestra la importancia de contar con terapias, estudios y tecnologías que permitan evaluar dicho componente genético. Uruguay cuenta con las terapias y tecnologías utilizadas en el resto del mundo, principalmente las quimioterapias convencionales en conjunto con tratamientos de anticuerpos monoclonales dirigidos a un blanco específico. También cuenta con análisis genéticos de genes de gran importancia en el CRC (7).

1.1. Características del cáncer colorrectal (CRC)

El CRC es una afección crónica que genera un problema sanitario de gran incidencia en los países occidentales, junto con los tumores de mama y pulmón. La enfermedad se produce cuando las células del colon o recto crecen y se multiplican sin control, dañando e invadiendo el tejido circundante e interfiriendo con la función normal del órgano. El colon ocupa los primeros 180 cm del intestino grueso mientras que el recto junto con el conducto anal se ubican en los últimos 25 cm del mismo. Alrededor de un 70% de los CRCs se encuentran en la primera porción del intestino grueso mientras que el resto aparece en el recto (8,9). En conjunto, se denominan cánceres de colo-recto o colorrectales.

Esta patología se produce de forma progresiva, comenzando por lesiones menores, como pólipos o lesiones displásicas, hasta adenomas, carcinomas intraepiteliales y carcinomas infiltrantes, llegando a generar metástasis a distancia. El problema surge debido a la acumulación de alteraciones oncogénicas generadas a lo largo de la vida, que finalmente dan lugar a la formación de un tumor maligno (10).

En el CRC existen diferentes estadios de la enfermedad, los mismos se esquematizan en la Figura 3. En el estadio 0 (cero) aparecen células anormales en la mucosa de la pared del colon, las cuales se pueden volver cancerosas y diseminarse. Una vez que las células cancerosas invaden las capas internas del colon, se denomina cáncer y se cataloga como estadio I. En la siguiente etapa, estadio II, el tumor invade la submucosa y la capa muscular de la pared del colon. Luego el cáncer se disemina a los ganglios linfáticos o tejidos cercanos, en el estadio III. Por último, en el estadio IV el cáncer se ha diseminado a otros órganos fuera del colon (8,9).



Según datos de Hernández-Losa y col. (11), alrededor de un 25 a 30% de los pacientes que tienen CRC se presentan con tumores metastásicos (estadio IV) a la hora del diagnóstico, y aquellos que se encuentran en estadios II o III, se estima que del 20 al 25% van a progresar a estadios más

avanzados y metástasis. La supervivencia global a 5 años es de aproximadamente el 50%, llegando a ser del 10% en los pacientes con enfermedad en estadio IV.

Dentro de los CRC, se estima que entre un 70 y un 80% se asocia a factores de riesgo como la edad, género, factores ambientales como la dieta y el ejercicio, y enfermedades inflamatorias del intestino. El restante 20 a 30% de los casos son aquellos que presentan componentes hereditarios familiares (10).

A nivel molecular existen dos orígenes diferentes: uno de ellos se encuentra asociado a la inestabilidad cromosómica (85%), mientras que el otro grupo está asociado a la presencia de inestabilidad de microsatélites o a la alteración de genes específicos de reparación del ADN (8-12%). La pérdida de función del gen supresor tumoral APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) y las alteraciones en la ruta de WNT (Wingless e Int) son los cambios más frecuentes. Luego, en fase de adenomas de pequeño tamaño se pueden detectar mutaciones en los oncogenes (gen activado anormalmente por una mutación) KRAS (Kristen RAS), NRAS (Neuroblastoma RAS) y BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*). Posteriormente, en adenomas grandes se pueden observar alteraciones de SMAD4 (*Mothers Against Decapentaplegic*) o DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*). En cuanto a los carcinomas pueden aparecer mutaciones en p53 (supresor tumoral) en conjunto con otras alteraciones genéticas (11).

Una forma de clasificar las alteraciones genéticas que dan lugar al desarrollo del cáncer es diferenciando aquellas centrales que promueven la proliferación celular, denominadas desencadenantes o *drivers*, de las alteraciones genéticas acompañantes, denominadas temporales o *passengers*. Ambas alteraciones ocasionan cambios en las grandes rutas metabólicas celulares, el ciclo celular, la apoptosis, la invasividad y la angiogénesis. En el CRC, la señalización mediada por el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) activa una vía de suma importancia. La activación de EGFR, incremento de los ligandos o las alteraciones de los factores que transmiten la señal de la membrana al núcleo, desencadenan un aumento de la proliferación tumoral (11).

La gran incidencia y alta tasa de mortalidad que presenta el CRC, ha desencadenado el desarrollo y aplicación de distintos protocolos terapéuticos. Muchos de ellos se basan en agentes quimioterapéuticos combinados con anticuerpos monoclonales contra blancos oncogénicos específicos. Los anticuerpos más comúnmente utilizados como tratamiento son específicos para el EGFR (Cetuximab y Panitumumab) y para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Bevacizumab), siendo el primero de ellos el que se estudiará en este trabajo (11).

1.2. Vía de señalización mediada por EGFR

El receptor del EGFR es una glicoproteína transmembrana compuesta por un dominio extracelular aminoterminal para unión a ligandos, una hélice transmembrana hidrófoba, un dominio citoplasmático que contiene un dominio tirosina quinasa y una región carboxiterminal que contiene residuos de tirosina y elementos reguladores del receptor. El gen que codifica para esta proteína en humanos es *EGFR*. Este pertenece a la familia de receptores ErbB (*Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene*), una subfamilia relacionada con los receptores tirosina quinasa donde se encuentran incluidos: EGFR (HER1 o ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER 3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4) (12-15).

La unión de ligandos específicos, tales como el factor de crecimiento transformante (TGF α), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), la anfirregulina, la betacelulina o la epirregulina, a la porción extracelular N-terminal del receptor EGFR induce la dimerización del mismo (formando homodímeros o heterodímeros con otro miembro de la familia de EGFR humana), y activa el dominio quinasa intracelular. El resultado es la autofosforilación de residuos de tirosina en cada unidad del dímero, activando una cascada de señalización intracelular de eventos que incluyen el reclutamiento y la fosforilación de varios factores intracelulares (Figura 4). En ausencia de ligando, el EGFR permanece en un estado basal en el cual su conformación suprime la actividad quinasa y se evita la formación de dímeros (12-15).

Una vez producida la activación de la proteína EGFR, la señal puede dirigirse por cuatro vías de señalización hacia el interior de la célula: 1) RAS-RAF-MAPK, la cual regula la proliferación celular, migración, adhesión, supervivencia y reparación del ADN; 2) PI3K-Akt, el cual controla diferentes procesos biológicos, tales como el crecimiento y la proliferación, la activación transcripcional y la apoptosis; 3) JAK-STAT, la cual regula la división celular, la motilidad, invasión, adhesión, la reparación celular y la supervivencia, y por último la vía de PLC γ que regula señalización mediada por Calcio. En la Figura 4 se presentan las distintas vías de señalización mediadas por EGFR (13,15-17).

La existencia de mutaciones en el gen *EGFR* puede afectar la expresión o actividad del mismo, siendo una causa para el desarrollo de cáncer. Existen mutaciones que llevan a la sobre-expresión del EGFR (conocidas como de regulación positiva) o a la hiperactividad de la proteína, las cuales se han asociado con un gran número de cánceres. Los altos niveles de la proteína EGFR en tumores se han relacionado con una enfermedad agresiva, un mal pronóstico, una disminución de la supervivencia, una mala respuesta a la terapia y al desarrollo de resistencia a los agentes citotóxicos. En consecuencia, la presencia de mutaciones en EGFR y su identificación como un oncogén, ha hecho que dicha proteína sea el objetivo de varias terapias contra el cáncer (11,15,18).

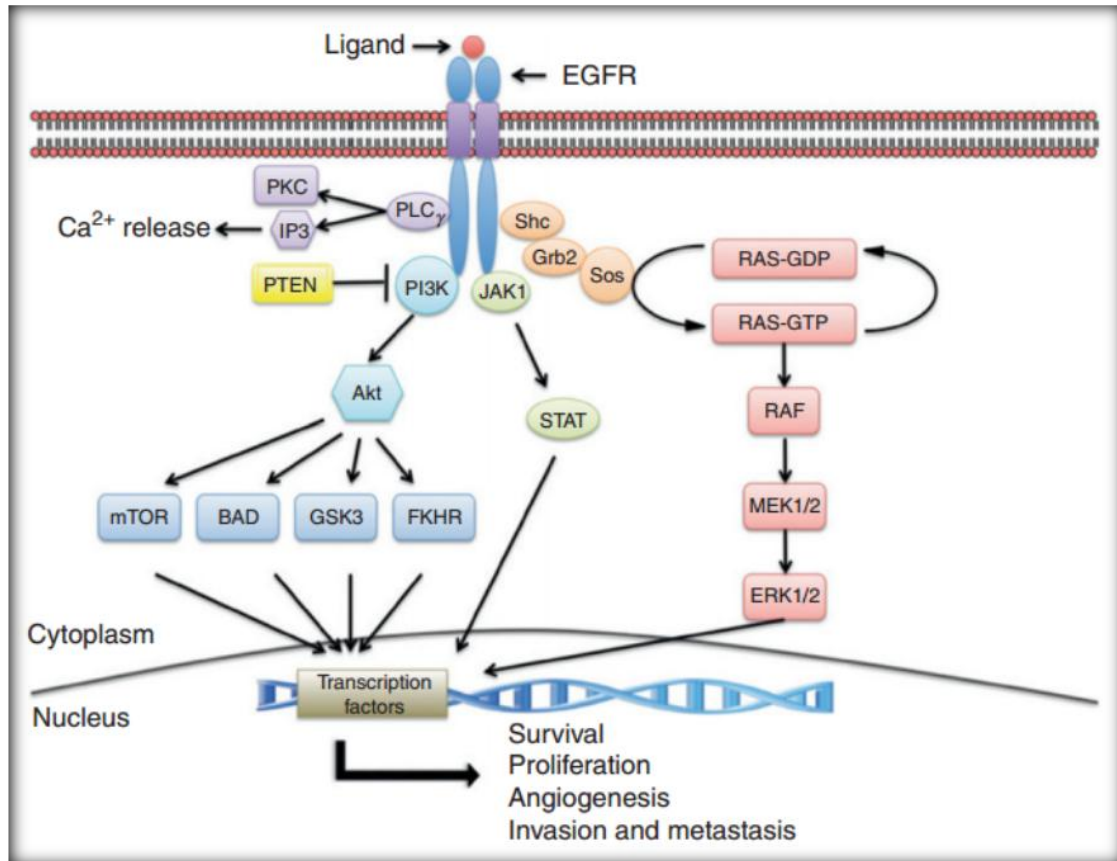


Figura 4: Vías de señalización mediada por EGFR. En rojo: vía RAS-RAF–MAPK; en azul: vía PI3K–Akt; en verde: vía JAK–STAT; y en violeta: vía PLC γ (15).

1.3. Terapias con anticuerpos monoclonales anti-EGFR.

Muchos enfoques terapéuticos están dirigidos a los receptores EGFR, utilizando anticuerpos monoclonales anti-EGFR para lograr una unión específica y bloquear la unión del ligando extracelular al receptor. Al bloquearse el sitio, las moléculas señal ya no pueden activar la función tirosina quinasa de EGFR. Sin dicha actividad, el EGFR es incapaz de auto-activarse, y por lo tanto, no se activa la vía de señalización por debajo de EGFR. De esta forma, el bloqueo de la cascada de señalización en células que dependen de esta vía genera que el crecimiento, la proliferación y la migración tumoral se vean disminuidos (18).

Al día de hoy, existen dos tratamientos específicos contra el EGFR, los cuales utilizan los fármacos Cetuximab o Panitumumab. El Cetuximab, conocido comercialmente como Erbitux®, es un medicamento que se utiliza para el tratamiento del CRC y otros tipos de cáncer de células escamosas que afectan la cabeza y el cuello, como algunos tumores de la boca o la laringe. Se trata de un anticuerpo monoclonal (MAb) quimérico creado a partir de la región variable murina de la línea celular de mieloma 225 y un segmento de la región constante de una inmunoglobulina G humana. Dicho anticuerpo reconoce y se une al dominio extracelular del EGFR con alta afinidad y lo bloquea. La afinidad del mismo es más alta que la que presentan los ligandos propios de la vía (EGF, TGF α y anfirregulina). En más del 80% de los casos de CRC está presente el antígeno EGFR en la superficie celular, generando que dichas células sean sensibles a la acción del fármaco (19). Este medicamento se emplea combinado con otros tratamientos como radioterapia o quimioterapia (13,14,16).

El Cetuximab logra su actividad antitumoral a través de múltiples mecanismos, incluyendo la inhibición del ciclo celular, la promoción de la apoptosis, la angiogénesis, así como de la inducción de una respuesta inmunológica. Como consecuencia, la célula tumoral no recibe las señales bioquímicas que estimulan su propagación y el crecimiento del tumor se enlentece. Este tratamiento mejora la expectativa de vida, sin embargo, no tiene una acción curativa ya que no elimina el tumor (13,14,16).

La utilización de Cetuximab fue aprobada por la Unión Europea en junio del 2004 y renovada en junio del 2010. Inicialmente dicho fármaco fue probado en monoterapias a pacientes con mCRC refractario a la quimioterapia convencional. En estos casos la respuesta fue modesta (8 a 11%), sin embargo cuando el tratamiento se combinó con Irinotecan (fármaco antineoplásico intravenoso) (20), la respuesta se incrementó favorablemente. A su vez, la adición de Cetuximab a un tratamiento con Irinotecan permitió revertir la resistencia a este último en un número significativo de pacientes. Es por ello que hoy en día se utilizan ambos fármacos juntos (14,16,19,21,22).

El otro fármaco existente es Panitumumab, conocido comercialmente como Vectibix®. También pertenece al grupo de los anticuerpos monoclonales y se emplea en el tratamiento de CRC cuando éstos se encuentran en la etapa de metástasis (mCRC). Es un anticuerpo monoclonal IgG₂ completamente humano que se une con alta afinidad al dominio de unión del ligando del EGFR y bloquea la unión de los ligandos específicos de dicho receptor. La utilización de Panitumumab fue autorizada por la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos en septiembre de 2006 y por la EMEA (Agencia Europea de Medicamentos) en diciembre de 2007 (23,24).

El Panitumumab provoca la internalización del EGFR, generando la disminución del número de receptores disponibles en la superficie celular, lo que provoca a su vez la inhibición del crecimiento celular, inducción de la apoptosis y descenso en la producción de citoquinas proinflamatorias y del factor de crecimiento del endotelio vascular. Esta droga ayuda a la supervivencia sin progresión de la

enfermedad. Hoy en día existen datos que demuestran una mejora de los síntomas patológicos o un aumento de la supervivencia con dicho tratamiento (23,24).

En los últimos años, Cetuximab y Panitimumab han probado la efectividad de su acción para el tratamiento de mCRC, en tratamientos combinados con quimioterapias o en monoterapias. Sin embargo su acción depende de la ausencia de mutaciones en ciertos genes que codifican para proteínas específicas de la vía de señalización del EGFR. La vía de la cual se dispone más información debido al gran número de estudios es la vía RAS-RAF-MAPK. Por lo tanto, este trabajo se va a centrar en dicha vía (23,24).

1.4. Oncogenes de la vía RAS-RAF-MAPK

Dentro de la familia de genes RAS existen dos variantes del gen *KRAS* (*KRAS4A*, la cual se expresa débilmente en células humanas y *KRAS4B* expresada fuertemente en humanos), una variante de *NRAS* y otra de *HRAS*. Se encuentran en *loci* separados y tienen una expresión variable en diferentes tejidos, pero sus secuencias, estructuras y funciones son muy similares. Estos genes codifican para las proteínas RAS, las cuales transmiten la señalización producida mediante la activación de receptores de membrana. Las proteínas RAS inactivas están unidas a GDP (Guanosina difosfato), en el momento en que un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) favorece la formación de GTP-RAS (Guanosina trifosfato-RAS), la proteína se activa. Luego, dicho GTP es hidrolizado por la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas RAS, provocando la inactivación de la proteína RAS (11,15,25).

A continuación se describen los genes RAS de mayor relevancia para el mCRC. El gen *KRAS* codifica para una proteína humana de 21kD. Al igual que otros miembros de la familia RAS, la proteína *KRAS* es una GTPasa que participa de forma temprana en muchas vías de transducción de señal. Dicha proteína se encuentra normalmente unida a las membranas celulares debido a la presencia de un grupo isoprenilo en su C-terminal. Su principal función es actuar como un interruptor molecular de encendido/apagado. Una vez que se enciende, recluta y activa las proteínas necesarias para la propagación de la señal mediada por EGFR y de señales de otros receptores. Para ello, se une a GTP en el estado activo y posee una actividad enzimática intrínseca que escinde el fosfato terminal del nucleótido, convirtiéndolo en GDP. Tras la conversión de GTP a GDP, la proteína *KRAS* se encuentra apagada (11,15,25,26).

La proteína *KRAS* es codificada por un oncogén. Una sustitución de un sólo nucleótido, puede generar un cambio de aminoácido y provocar una mutación activante. Cuando hay mutaciones en el gen *KRAS*, la actividad GTPasa de la proteína queda bloqueada y permanece constitutivamente activa y unida a GTP, independientemente de la señal proveniente del EGFR. Mutaciones somáticas en el gen *KRAS* ocurren en un 40% aproximadamente de los casos de mCRCs y suelen ocurrir en los

codones 12 (70 a 80%) y 13 (15 a 20%) del exón 2 (26). Las restantes mutaciones se localizan en los exones 3, en un 2,5% (codones 59 y 61) y 4 en un 3,2% (codones 117 y 146). En la Figura 5 se encuentra representado el porcentaje de mutaciones en los distintos exones de *KRAS*, así como de otras mutaciones con impacto en mCRC (revisión realizada por Misale y col.). Dichas mutaciones pueden provocar diferentes problemas como la generación de carcinomas colorrectales y una baja respuesta a las terapias (25,27,28).

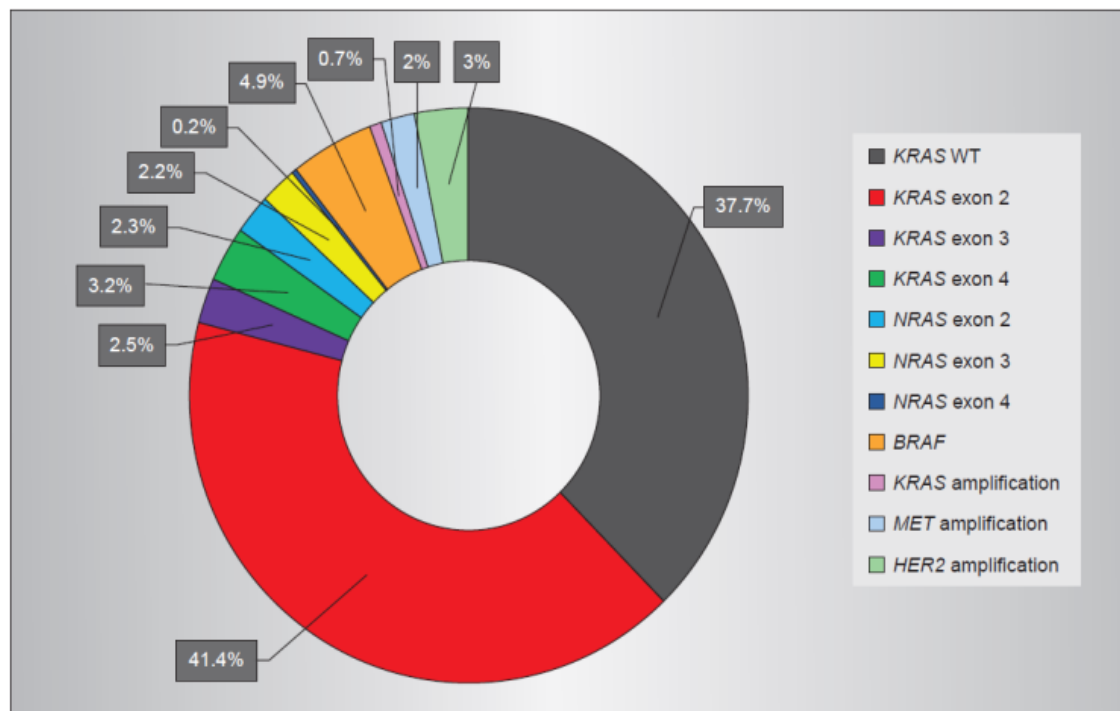


Figura 5: Prevalencia de mutaciones asociadas con la resistencia a terapias anti-EGFR en mCRC. *KRAS* WT representa la suma de los pacientes que responden a la terapia anti-EGFR (aprox. 10%) más los que no se benefician de ésta, incluso con ausencia de mutaciones que generan resistencia primaria (28).

Debido a la falta de respuesta a los tratamientos contra EGFR, en 2008 se hicieron estudios que demuestran que la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* es un factor predictivo. El uso de los fármacos Cetuximab y Panitumumab en pacientes con *KRAS* no mutado (WT) prolonga la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global comparados con el mejor tratamiento de soporte. Es por ello que las pruebas del gen *KRAS* se han convertido en obligatorias para elegir la estrategia terapéutica más adecuada en casos de mCRC (11,25,26,28,29). En la Figura 6 se muestra la comparación entre la vía RAS-RAF-MAPK de una célula con funcionamiento normal de la vía de EGFR (Fig. 6A), una célula con funcionamiento normal de la vía de EGFR a la cual se le aplican los MAb Cetuximab o Panitumumab (Fig. 6B), y una célula con el gen *KRAS* mutado donde se genera la activación de la vía intracelular, independientemente de la acción del MAb usado (Fig. 6C).

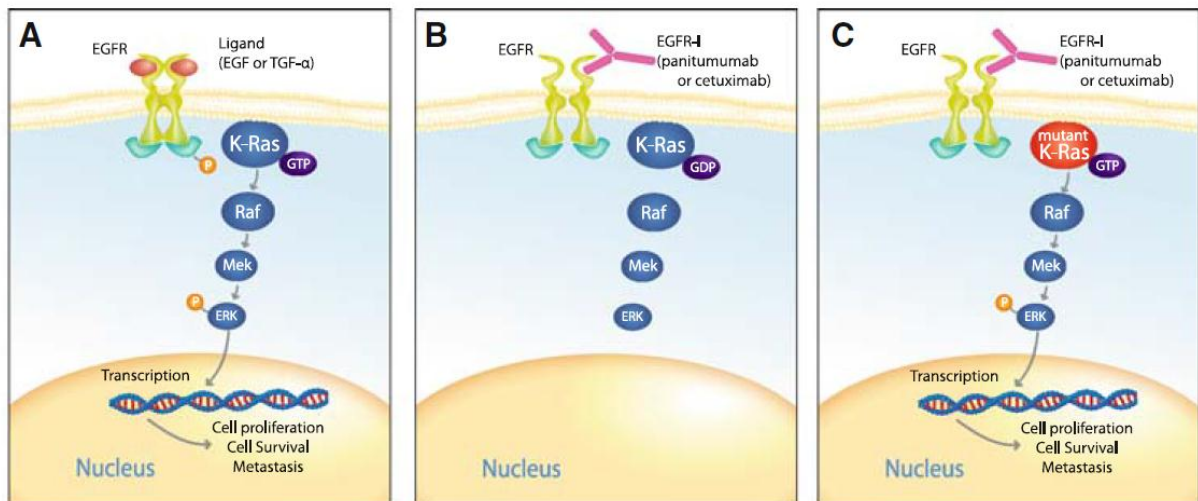


Figura 6: Ruta de señalización mediada por EGFR. (A) Célula con funcionamiento normal de la vía de EGFR; (B) inhibición del EGFR por Cetuximab o Panitumumab, detiene la señalización corriente abajo, (C) mutación en KRAS provoca la activación por unión constitutiva a GTP y permite la señalización corriente abajo independientemente de la acción de Cetuximab o Panitumumab (30).

Como se mencionó anteriormente, aproximadamente 40% de los casos de mCRC presentan mutaciones en el gen *KRAS*, permitiendo que el restante porcentaje de pacientes con mCRC respondan eficientemente a las terapias con anticuerpos anti-EGFR. Sin embargo, entre el 40 al 60% de los pacientes con *KRAS WT* no responden a las mismas. Este problema es debido a la presencia de mutaciones en otros genes de la vía RAS-RAF-MAPK, cuyos cambios provocan una deficiencia en la acción de las terapias, como es el caso del gen *NRAS*.

El gen *NRAS* es un oncogén miembro de la familia de genes *RAS* que codifica para una proteína, NRAS, cuya función es similar a la proteína KRAS. Como todos los genes *RAS* tienen la capacidad de unirse tanto a GTP como a GDP, presenta actividad GTPasa y su función normal es como una proteína G reguladora involucrada en el control normal del crecimiento celular.

Al igual que en el gen *KRAS*, existen mutaciones activantes en los exones 2 (codones 12 y 13), 3 (codones 59 y 61) y 4 (codones 117 y 146). Las mutaciones en *NRAS* no promueven tanto la proliferación celular y la supresión de la diferenciación, sino más bien inducen la sobreexpresión de las funciones anti-apoptóticas. Las mutaciones en este gen se encuentran en el 3-5% de los pacientes con mCRC y se ha demostrado una reducción de la respuesta a Cetuximab y Panitumumab en dichos pacientes (26).

Por otro lado, se encuentra el gen *BRAF* el cual codifica para una quinasa serin-treonina y es el efector que se encuentra por debajo de las proteínas RAS en la vía RAS-RAF-MAPK. Al igual que con los genes anteriores se ha asociado la presencia de mutaciones en el gen *BRAF* con una falta de respuesta a tratamientos con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Dichas mutaciones generan que la vía de señalización a través de MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) se vea constitutivamente

activada. Sin embargo, el carácter de factor pronóstico y predictivo del gen *BRAF* no está corroborado y debería ser confirmado.

Más allá de los tres genes nombrados, existen otros genes subyacentes al receptor de EGFR que pueden estar constitutivamente activados por mutaciones, hasta en el 10% de los casos, como es el caso del gen *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) (Figura 7), o por pérdida de función, como es el caso del gen *PTEN* (*fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa*) hasta en el 40% de los casos (31).

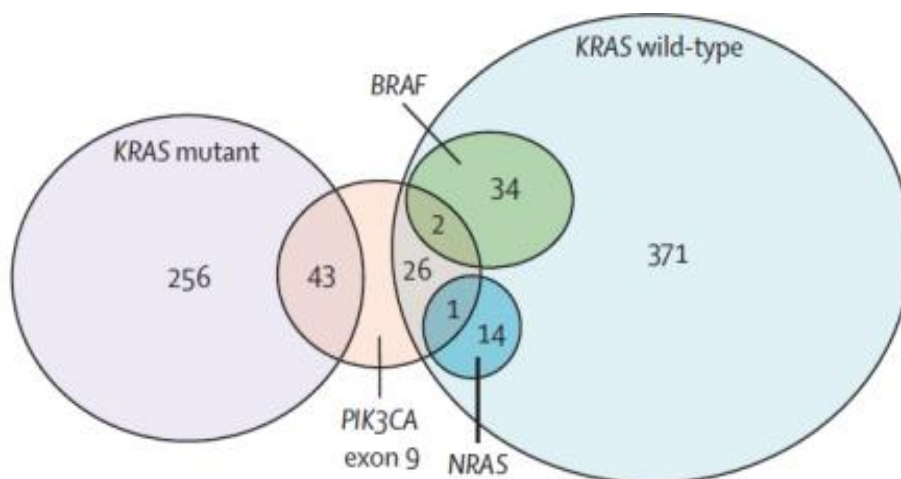


Figura 7: Asociación entre mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* Y *PIK3CA* exón 9. Total de 627 casos estudiados. Tomado de De Roock y col. (31).

1.5. Pruebas diagnósticas acompañantes para tratamientos anti-EGFR

Las pruebas diagnósticas acompañantes (CDT) con fines terapéuticos son estudios que ayudan a los médicos a decidir qué tratamientos recetar, adaptándolos específicamente al paciente. Estos estudios permiten: identificar a los pacientes que tienen más probabilidades de beneficiarse del producto terapéutico; conocer a los pacientes que podrían estar en mayor riesgo de presentar reacciones adversas al tratamiento; monitorear la respuesta al tratamiento para poder ajustarlo y lograr una mejor seguridad y eficacia; identificar a los pacientes para los que el producto terapéutico se ha estudiado adecuadamente y se haya encontrado seguro y efectivo. Un gran reto para las empresas es poder desarrollar estas pruebas durante la generación del fármaco de interés, logrando así un desarrollo conjunto del tratamiento con la prueba específica que aporta información para su uso seguro (22,32).

En lo que respecta al mCRC, hoy en día se encuentran los fármacos Cetuximab y Panitumumab cuya eficiencia depende de la ausencia de mutaciones en los oncogenes *KRAS* y *NRAS*. Es por ello que a

los tratamientos con Cetuximab y Panitumumab se los debe acompañar con CDT que permitan saber si el medicamento será eficaz para un paciente determinado.

Existen distintas metodologías que pueden ser usadas para detectar las mutaciones activantes en los genes *KRAS* y *NRAS*, todas ellas presentan ventajas y desventajas. Además, se debe tener en cuenta que el diagnóstico de los genes *KRAS* y *NRAS* está limitado por dos factores: primero, las células tumorales con el gen mutado se encuentran en minoría con respecto a las células tumorales con el gen *WT* y las células no tumorales; segundo, las muestras utilizadas para la detección de mutaciones provienen de tejido tumoral, al cual se le realiza un proceso de fijación con formalina (FFPE, *Formalin-fixed paraffin-embedded*), donde la integridad del ADN se encuentra seriamente comprometida (25).

La técnica considerada como “*Gold Standard*” para la detección de mutaciones es secuenciación Sanger. Esta técnica permite secuenciar completamente un fragmento específico de ADN posibilitando la detección de cambios en ciertos nucleótidos. En el caso de *KRAS* y *NRAS*, las mutaciones activantes están en posiciones definidas dentro de cada gen, en forma de un simple polimorfismo (SNP, polimorfismo de nucleótido simple). Secuenciación Sanger es una técnica específica pero su sensibilidad es relativamente baja (10-25%) para detectar mutaciones que pueden estar presentes en baja proporción en muestras de tejidos FFPE (29).

Existen otras técnicas alternativas para detectar SNPs basadas en métodos moleculares. Entre ellas está HRM (*High Resolution Melt*), pirosecuenciación y varios métodos basados en PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La qPCR es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. También sirve para identificar muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de disociación (T_m) (33). Comercialmente existe el kit *TheraScreen*, el cual utiliza cebadores ARMS (Amplified Refractory Mutation System) y sondas *Scorpion* para detectar las siete mutaciones más comunes del gen *KRAS* en los codones 12 y 13. Este método presenta mayor sensibilidad que Sanger siendo capaz de detectar mutaciones en *KRAS* cuando las mismas se encuentran en un 5% del ADN total (29,34.) Otra de las metodologías basadas en qPCR utiliza las sondas *TaqMan* combinadas con ASB-PCR (*Allele-Specific PCR with a Blocking reagent*) cuya sensibilidad también llega al 1% (35).

Por otro lado, existen kits para detectar mutaciones en *KRAS* y *BRAF* basados en PCR. Por ejemplo, “*Cobas KRAS mutation kit*”, detecta 21 mutaciones en los codones 12, 13 y 61 de *KRAS*, y “*Cobas BRAF assay*” sólo detecta la mutación V600E de *BRAF*. También se pueden detectar e identificar mutaciones puntuales en los genes *KRAS*, *BRAF*, *PI3K* y *NRAS* mediante PCR múltiple y su posterior visualización mediante la tecnología CLART®, basada en arrays de baja densidad (CLART® CMA) (36).

Las técnicas basadas en PCR y qPCR presentan un problema a la hora de detectar todas las mutaciones de los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* ya que para poder realizarlo se deberían utilizar más de 30 reacciones individuales, aumentando los costos y el tiempo para realizarlo (34).

Los avances tecnológicos de los últimos años han desarrollado una nueva técnica de secuenciación masiva conocida como NGS (Next Generation Sequencing) la cual permite secuenciar un gran número de bases por unidad de tiempo. Utilizando esta técnica se pueden detectar todos los tipos de variaciones genómicas en un único experimento, incluyendo variantes o mutaciones puntuales. Al comienzo la tecnología de NGS estaba dirigida a la investigación. Actualmente se ha comenzado a utilizar en estudios de farmacogenómica, por ejemplo, determinar la respuesta a fármacos, y en la realización de pruebas genéticas para diagnóstico y evolución de las enfermedades. Sin embargo, aún es una técnica cara para diagnóstico (37).

1.6. Técnica de SNaPshot

Una técnica que reúne las condiciones necesarias para la detección de mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* en pacientes con mCRC es la técnica de SNaPshot. La misma consiste en una reacción que permite detectar SNPs en posiciones conocidas del genoma, basándose en la hibridación de un cebador con su secuencia complementaria. En este método la ADN polimerasa extiende el cebador con un único nucleótido, utilizando como sustrato un dideoxinucleótido tri fosfato (ddNTP) marcado con un fluorocromo (cada fluorocromo corresponde a una base distinta), en el extremo 3' de dicho cebador. En la Figura 8 se esquematiza la reacción de SNaPshot (38).

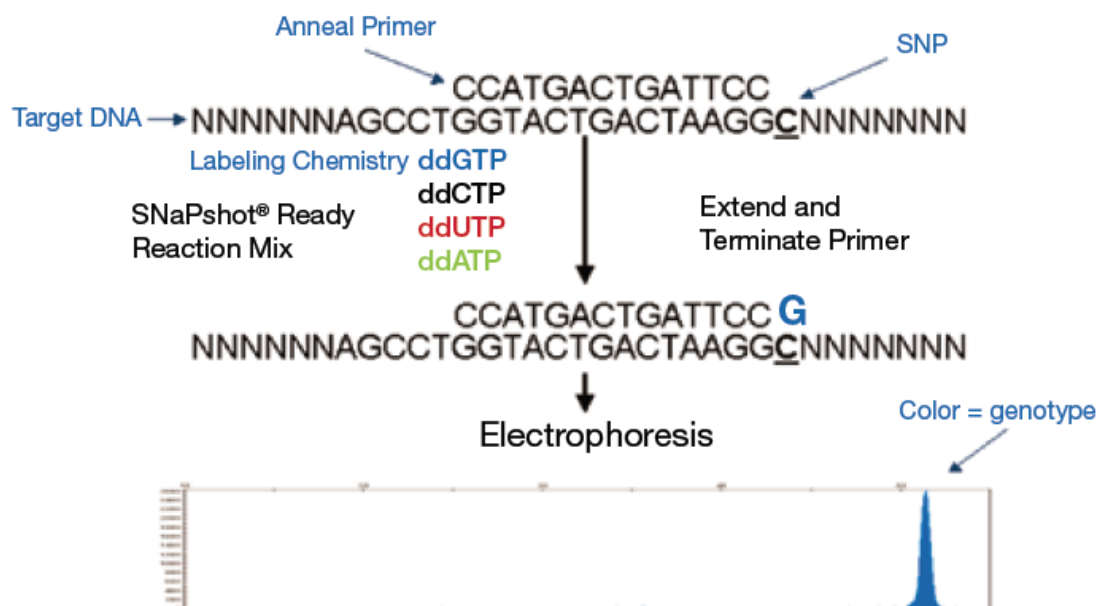


Figura 8: Esquema de la reacción de SNaPshot. Unión de un cebador a su secuencia complementaria con la posterior incorporación de un ddNTP marcado al extremo 3' (38).

La técnica de SNaPshot permite la detección genética múltiple, o sea, que en una única reacción se puedan analizar varios SNPs, independientemente de sus posiciones en el genoma. El análisis de múltiples SNPs tiene distintas aplicaciones, por ejemplo, pruebas diagnósticas para varios tipos de cáncer, investigación de ADN mitocondrial y estudios forenses y antropológicos, entre otros (38).

El diseño de los cebadores de SNaPshot para una detección genética múltiple es una parte fundamental en el desarrollo de la técnica. Los cebadores deben permitir que el ddNTP marcado que se incorpore sea exactamente en la posición correspondiente al polimorfismo que se quiere analizar; no debe existir hibridación cruzada entre los cebadores para evitar interferencias en la visualización del resultado; y deben poder ser diferenciados en una electroforesis. Esto último se puede lograr con la incorporación de una cola poli T en el extremo 5' del cebador, de distintos tamaños en cada cebador (39-42).

Para llevar a cabo esta técnica se requieren distintas etapas (Figura 9): 1) extracción de ADN; 2) amplificación mediante PCR de regiones específicas en el ADN donde se encuentran las mutaciones en estudio; 3) purificación del amplificado con las enzimas fosfatasa alcalina (AP) y exonucleasa I (ExoI), con el fin de eliminar exceso de cebadores y dNTPs (deoxinucleótido tri fosfato); 4) reacción de SNaPshot: incorporación de un único ddNTP marcado con un fluorocromo específico según sea el ddNTP; 5) purificación de los productos de la reacción de SNaPshot con AP, para eliminar el exceso de ddNTP marcados; 6) electroforesis capilar para visualizar cada uno de los ddNTPs incorporados, y posterior análisis bioinformático.

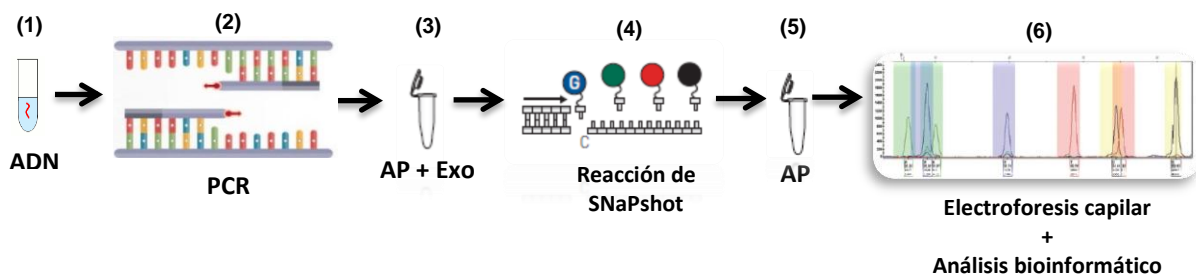


Figura 9: Representación esquemática de la técnica de SNaPshot.

La utilización de SNaPshot como prueba diagnóstica tiene como ventaja ser una técnica rápida, sensible, de alta resolución, robusta y de bajo costo. Esta permite detectar selectivamente múltiples SNPs en ADN dañado y degradado como es el caso de las muestras provenientes de tacos de parafina (FFPE) utilizadas para el análisis de tejidos tumorales, ya que puede funcionar sobre amplicones de muy corta longitud (50-80 pb) (39).

La técnica de SNaPshot tiene similitudes con la secuenciación Sanger, sin embargo, la metodología de SNaPshot permite generar resultados en menor tiempo y costo. Esto es posible porque por SNaPshot se detecta un número discreto de picos, correspondientes a los SNPs estudiados. A su vez, la sensibilidad de SNaPshot es relativamente alta y mayor a la de la secuenciación Sanger. En cuanto a su comparación con NGS, esta última permite examinar múltiples secuencias en poco tiempo, sin embargo, sigue siendo un método muy caro.

Debido al menor costo de la técnica de SNaPshot con respecto a secuenciación Sanger y NGS, y dado que permite la detección de un gran número de mutaciones en una misma reacción, en este trabajo se decidió trabajar con la técnica de SNaPshot como método de diagnóstico para 56 mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS*.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es poner a punto y validar un método basado en la técnica de SNaPshot para la detección de mutaciones en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de los oncogenes *KRAS* y *NRAS* de muestras FFPE de pacientes con mCRC.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Poner a punto las distintas etapas de la técnica de SNaPshot para lograr un correcto funcionamiento de la misma: evaluación de cantidad y calidad de ADN proveniente de tejidos FFPE, PCR de exones, purificación enzimática, reacción de SNaPshot, electroforesis capilar y análisis bioinformático.
- 2) Una vez realizada la puesta a punto, validar la técnica evaluando: límite de detección de la técnica, especificidad, precisión y exactitud.

3. METODOLOGÍA

3.1. ADN de muestras de tejidos FFPE

Las muestras de ADN utilizadas en este trabajo fueron aportadas por el Laboratorio Genia. Las mismas fueron extraídas de tacos de parafina con tejidos FFPE de pacientes con mCRC mediante el kit *QIAamp DNA FFPE Tissue de Qiagen* (específico para muestras parafinadas). Las muestras se trabajaron manteniendo el anonimato del paciente y conforme al consentimiento firmado por este último. En este consentimiento se aclara que “en el caso de que se efectúen publicaciones científicas, las mismas únicamente podrán consistir en datos estadísticos o que no vinculen la muestra con mi identidad, ya que se realizarán bajo la modalidad de disociación irreversible, es decir que nadie podrá relacionar la publicación con mi persona”.

3.2. ADNs de referencia con mutaciones en *KRAS* y *NRAS*

Se utilizaron ADNs de referencia con mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* provistos por la empresa *Horizon Diagnostic*. En la Tabla 2 se especifican cada uno de los ADNs de referencia mediante su número de catálogo, detallando las mutaciones que contienen en forma heterocigota.

Tabla 2: ADNs de referencia con mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* provistos por la empresa *Horizon Diagnostic*. ADNs utilizados en los estudios de límite de detección y especificidad.

Catálogo	Gen	Mutación
HD378	<i>KRAS</i>	c.34G>A p.Gly12Ser
HD379	<i>KRAS</i>	c.34G>C p.Gly12Arg
HD380	<i>KRAS</i>	c.34G>T p.Gly12Cys
HD374	<i>KRAS</i>	c.35G>A p.Gly12Asp
HD376	<i>KRAS</i>	c.35G>C p.Gly12Ala
HD377	<i>KRAS</i>	c.35G>T p.Gly12Val
HD375	<i>KRAS</i>	c.38G>A p.Gly13Asp
HD632	<i>KRAS</i>	c.183A>C p.Gln61His
HD411	<i>KRAS</i>	c.436G>A p.Ala146Thr
HD373	<i>KRAS</i>	WT
HD190	<i>NRAS</i>	c.35G>T p.Gly12Val
HD539	<i>NRAS</i>	c.181C>A p.Gln61Lys
HD534	<i>NRAS</i>	c.182A>G p.Gln61Arg
HD524	<i>NRAS</i>	c.182A>T p.Gln61Leu
HD529	<i>NRAS</i>	c.183A>T p.Gln61His
HD373	<i>KRAS</i>	WT

3.3. Curva estándar de ADN genómico

Se extrajo ADN de sangre para realizar la curva estándar de ADN genómico. Las metodologías de extracción fueron: 1. *DNeasy® Blood & Tissue Handbook: Protocol: Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol)*; 2. *Wizard® Genomic DNA Purification Kit: Isolating Genomic DNA from Whole Blood (300µl or 3ml Sample Volume)*.

El ADN extraído fue llevado a una concentración de 50ng/ul. La técnica utilizada para medir la concentración fue Qubit. Para dicha metodología se utilizaron 199ul de buffer (Qubit® dsDNA HS Buffer, Life Technology #Q32854) y 1ul de reactivo colorimétrico (Qubit® dsDNA HS Reagent, #Q32854). Luego a 198ul de la solución se le adicionaron 2ul de muestra de ADN. El equipo utilizado fue Qubit® 2.0 fluorometer de Invitrogen.

El ADN 50ng/ul se diluyó al tercio de forma seriada hasta una concentración de 0,02ng/ul obteniéndose una curva estándar de ADN para su utilización en la técnica qPCR.

3.4. Cuantificación de ADN por qPCR

Las muestras de ADN provenientes de pacientes con mCRC (ver ítem 3.1) fueron diluídas al medio de forma seriada partiendo de una dilución inicial de 1/10 hasta una dilución 1/160. Dichas diluciones se cuantificaron por qPCR, la cual es una técnica que permite evaluar el nivel de degradación del ADN así como la presencia de inhibidores para la PCR.

La mezcla de reacción para la qPCR se compuso de: Power SYBR® Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems #1408468), cebador Fwd 0,8µM, cebador Rv 0,8µM (Tabla 3), 2ul de la dilución de la muestra de ADN y agua ultra pura (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen #10977-015) para llegar a un volumen de 12,5ul final. Dicha mezcla se realizó en campana para PCR (con tratamiento de luz UV previo a la manipulación del ADN). Para cada ensayo se utilizó un control negativo (C-) con agua ultra pura (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen #10977-015) y la curva estándar de ADN genómico (ver ítem 3.3).

Para la qPCR se utilizó el equipo "7500 Real time PCR System" de Applied Biosystems. Las condiciones de ciclado fueron: 50°C 2'; 95°C 10'; [95°C 15", 60°C 1' (medida fluorescencia)] x 40; 95°C 15"; curva de disociación: 60°C 1'; 95°C 30" (Ramp Rate 1%).

El análisis de los datos se realizó a través del software "HID Real-Time PCR Analysis Software v1.1".

La siguiente tabla presenta los cebadores utilizados en esta etapa. Los mismos fueron diseñados en el Laboratorio Genia.

Tabla 3: Características de los cebadores utilizados para la qPCR.

Nombre	Tm (°C)	Tamaño del amplicón (pb)	Nucleótidos	Interferencia*
hTERT163 Fwd	60,8	163	20	No
hTERT163 Rv	61,2		20	No
hTERT195 Fwd	58,4	195	22	No
hTERT195 Rv	58,0		22	No
hTERT351 Fwd	60,3	351	18	No
hTERT351 Rv	60,8		23	No

*La interferencia refiere al estudio *in silico* de las posibles hibridaciones entre los cebadores mediante el programa de *Multiple primer analyzer de Thermo Scientific (43)*.

3.5. PCR de exones

En la PCR de exones se amplificaron fragmentos de los exones 2, 3 y 4 del gen *KRAS* por un lado, y de los exones 2, 3 y 4 del gen *NRAS* por otro. Los componentes de la mezcla de reacción para la PCR de exones fueron: *Platinum® Multiplex PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems #4464269)*, cada uno de los cebadores 0,8uM (Tabla 4), 2ul de muestra de ADN seleccionada en la qPCR (0,04 a 1,0 ng) y agua ultra pura (*UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen #10977-015*) para llegar a un volumen de 12,5ul. La misma fue realizada en campana para PCR con tratamiento de luz UV previo a la manipulación del ADN. Para cada ensayo se utilizó un control positivo (C+) con 0,02ng/ul de ADN genómico y un control negativo (C-) con agua ultra pura (*UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen #10977-015*).

Para la reacción de PCR se utilizó el termociclador "VERITI®96" de *Applied Biosystems*. Las condiciones de ciclado fueron: 1' 95°C; [15" 95°C; 30" 58°C; 15" 72°C] x35; 10' 72°C.

Tabla 4: Características de los cebadores utilizados para la PCR de exones.

Nombre	Tamaño del amplicón	Tm (°C)	CG %	Nucleótidos
KRAS ex2 F	163	63.9	52.6	19
KRAS ex2 R		60.0	50.0	20
KRAS ex3 F	155	61.3	50.0	20
KRAS ex3 R		68.6	55.0	20
KRAS ex4 F	193	62.1	30.4	23
KRAS ex4 R2		60.8	33.3	27
NRAS ex2 F	128	54.9	45.0	20
NRAS ex2 R		64.9	63.2	19
NRAS ex3 F	103	62.9	45.0	20
NRAS ex3 R		61.3	50.0	20
NRAS ex4 F2	166	63.5	50.0	22
NRAS ex4 R2		63.9	45.0	20

3.6. Electroforesis en gel de agarosa

Se observaron los productos de la PCR por electroforesis en geles de agarosa (*UltraPure™ Agarose, Invitrogen #16500-500*) al 3% en buffer TBE 1X (*UltraPure™ 10X TBE Buffer, Invitrogen #15581-044*). Los ácidos nucleicos se visualizaron mediante *GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000X in Water, Biotium #41003)*, el cual se diluyó a una dilución final de 1X. Como marcador de peso molecular se utilizó *GeneRuler 50pb DNA ladder (Thermo Scientific #R0631)*, cargando 0,6ug en el pocillo. Para sembrar las muestras en el gel se usó buffer de carga (6X *Orange DNA Loading Dye, Thermo Scientific #R0631*) a una dilución final de 1X.

La cuba de electroforesis utilizada fue "Enduro gel XL" de *Labnet International, Inc.* a un voltaje de 8Volts/cm de gel. Para visualizar los geles se utilizó un transiluminador UV de *Labnet International, Inc.*

3.7. Purificación y reacción de SNaPshot

Debido a que el trabajo constó de la puesta a punto y la validación de la técnica de SNaPshot, se tomaron como punto de partida los protocolos existentes en el Laboratorio Genia para detección de mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* (ver Anexo 1 y 2, respectivamente). Dichos protocolos están basados en el artículo Lurkin y col. (42).

3.7.1. Purificación con AP y Exol.

Previo a la reacción de SNaPshot, se realizó la purificación de los productos de la PCR de exones mediante un tratamiento con 0,26U de fosfatasa alcalina (*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific 1U/ul # EF0651*) y 0,2 U de exonucleasa I (*Exonuclease I, Thermo*

Scientific # EN0581) sobre 5ul de producto de PCR, en un volumen final de 6,76ul. Esta etapa se realizó para eliminar el exceso de dNTPs y cebadores, respectivamente. La fosfatasa alcalina es una hidrolasa que elimina dos grupos fosfatos en posición 5' de ADN y dNTPs, liberando un Pi. La exonucleasa I (ExoI) cataliza la reacción de degradación de ADN de cadena simple en dirección 3'-5'. Dicha reacción necesitó una incubación de 60' a 37°C y posterior inactivación de las enzimas 15' a 85°C.

3.7.2. Reacción de SNaPshot

Sobre cada uno de los productos de PCR purificados (*KRAS* y *NRAS*) se hicieron dos reacciones de SNaPshot, en cada una de ellas se utilizó: SNaPshot® Multiplex Kit 1X (Applied Biosystems #1408215), 0,5ul de mezcla de cebadores de SNaPshot, 1,5ul de producto de PCR purificado y agua ultra pura (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen #10977-015) para llegar a un volumen final de 5ul. Con esta reacción se ensayaron diferentes concentraciones y combinaciones de cebadores.

Para la reacción de SNaPshot se utilizó el termociclador "VERITI®96" de *Applied Biosystems*. Las condiciones de ciclado fueron: [10", 96°C; 5" 50°C; 30" 60°C] x 35 ciclos.

Los cebadores de SNaPshot utilizados se presentan en la Tabla 5. Los mismos fueron extraídos del artículo de Lurkin y col. (2010) o diseñados en el Laboratorio Genia.

Tabla 5: Características de los cebadores para la reacción de SNaPshot.

Nombre	Tamaño (nt)	Concentración final en la reacción (uM)
KRAS pos.351	26	0,2
KRAS pos. 436	34	0,25
KRAS pos. 437	38	0,25
KRAS pos. 175	43	0,1
KRAS pos.34	50	0,4
KRAS pos.35	57	0,1
KRAS pos.37	64	1,4
KRAS pos.38	71	0,1
KRAS pos. 176	78	0,1
KRAS pos.181	85	0,08
KRAS pos.182	92	0,2
KRAS pos.183	97	0,2
NRAS pos. 176	24	0,5
NRAS pos. 175	30	0,5
NRAS pos.351	38	0,5
NRAS pos. 436	44	1
NRAS pos. 437	49	0,5
NRAS pos.34	55	0,5
NRAS pos.35	60	0,5
NRAS pos.37	65	0,1
NRAS pos.38	70	0,7
NRAS pos.181	80	1
NRAS pos.182	85	0,2
NRAS pos.183	90	1

3.7.3. Purificación con AP

Una vez realizada la reacción de SNaPshot se realizó una nueva purificación con fosfatasa alcalina para eliminar el exceso de los ddNTPs marcados. Se agregó una unidad de fosfatasa alcalina (*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific 1U/ul # EF0651*) a cada uno de los productos de la reacción de SNaPshot (de 5ul). La reacción se incubó 20' a 37°C y se inactivó la enzima 15' a 85°C.

3.8. Electroforesis capilar

Los productos de la reacción de SNaPshot purificados se corrieron en el secuenciador capilar ABI3500xL *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Para ello, se mezcló primero 11ul de formamida (*Hi-Di™ Formamide #4311320*) con 3ul de escalera interna (*GeneScan™ – 120LIZ™ Size Standard*,

Abi Prism #4322362). Tras vortexear y centrifugar, a 11ul de dicha mezcla se le agregó 3ul de la mezcla de los productos purificados de la reacción de SNaPshot. La mezcla de las dos reacciones de SNaPshot constó de 2ul de la reacción de SNaPshot 1 y 1ul de la reacción de SNaPshot 2.

Las longitudes de onda de absorción y emisión de los fluoróforos usados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Longitudes de onda de absorción y emisión de los fluoróforos acoplados a los ddNTPs de la reacción de SNaPshot detectados en la electroforesis capilar.

Fluoróforo	ddNTP	Color en electroferograma	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)
TAMRA	ddCTP	Negro	542	568*
ROX	ddTTP	Rojo	574*	602
R6G	ddATP	Verde	526	555
R110	ddGTP	Azul	496	520

*La λ_{em} de TAMRA difiere en 6nm con la λ_{abs} de ROX, por lo que puede haber interferencia de ROX sobre TAMRA.

3.9. Análisis bioinformático

Los datos generados en la electroforesis capilar se analizaron por el software “GeneMapper® Software 5” de Applied Biosystems.

3.9.1. Límite del blanco (LB)

Para el LB se realizó un análisis de 50 controles negativos de *KRAS* y 50 controles negativos de *NRAS*. Los picos detectados en la electroforesis capilar fueron evaluados por fluorocromo. Se calculó el promedio de las alturas de los picos, el desvío estándar (SD) y se determinó el valor de 3SD por fluorocromo.

3.10. Secuenciación de nueva generación (NGS)

Los datos de NGS fueron aportados por el Laboratorio Genia Uruguay para la realización de este trabajo. La metodología utilizada fue *Ion PGM™ System* y consistió en: 1. La construcción de la biblioteca genética con el kit de *Ion AmpliSeq™ Primer Pool* más 0,1 a 1 ng de ADN (ítem 3.4.); 2. La cuantificación y normalización de la biblioteca; 3. La preparación para la amplificación clonal mediante el sistema *Ion One Touch™*; 4. La secuenciación utilizando el secuenciador *Ion PGM™* con un chip *Ion 314™ Chip*; 5. El análisis de datos mediante los programas del servidor de *Ion Torrent*. Se utilizaron los cebadores para analizar los genes *KRAS* y *NRAS* a partir del panel *Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Research Panel v2* y el *coverage* utilizado fue de 1000x. La sensibilidad de NGS utilizando *ION PGM* se considera menor o igual a 5% y la especificidad del 100% (44).

3.11. Secuenciación Sanger

Los datos que se muestran de secuenciación Sanger fueron aportados por el Laboratorio Genia Uruguay para la realización de este trabajo.

Para la secuenciación Sanger se utilizó el producto de la PCR de exones purificado. La amplificación para la secuenciación se compuso de: BigDye® Terminator v3.1 kit (Life Technology #4337455), cebador Fwd o Rv 10uM, 1ul del producto de PCR purificado y agua ultra pura (UltraPure™ Distilled Water, Invitrogen #10977-015) para llegar a un volumen de 6ul. Los cebadores utilizados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Características de los cebadores utilizados para la secuenciación Sanger.

Nombre	Tm (°C)	CG%	Nucleótidos
KRAS ex2 R	60.0	50.0	20
KRAS ex3 F	61.3	50.0	20
KRAS ex4 F	62.1	30.4	23
NRAS ex3 R	61.3	50.0	20

Para la reacción de secuenciación Sanger se utilizó el termociclador “VERITI®96” de *Applied Biosystems*. Las condiciones de ciclado fueron: 3’ 95°C; [15’’ 94°C; 10’’ 56°C; 4’ 72°C] x28; 4’ 72°C.

El volumen total de los productos de la amplificación se purificaron con 33ul de *BigDye XTerminator® Purification Kit* (Life Technology #4376484). La reacción se incubó 20’ a temperatura ambiente. Todo el volumen de producto purificado se corrió en el secuenciador capilar ABI3500xL *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*).

3.12. Kit de Real time PCR

Los datos provenientes del kit de *Real time* fueron aportados por el Laboratorio Genia Argentina. Este kit utiliza una reacción de qPCR que permite evaluar las siete mutaciones más frecuentes en el gen *KRAS*, que son: c.34G>A p.Gly12Ser; c.34G>C p.Gly12Arg; c.34G>T p.Gly12Cys; c.35G>A p.Gly12Asp; c.35G>C p.Gly12Ala; c.35G>T p.Gly12Val; c.38G>A p.Gly13Asp. Este kit fue validado por el Laboratorio Genia y tiene una sensibilidad del 5% y una especificidad del 100%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PUESTA A PUNTA DE LA TÉCNICA DE SNAPSHOT

La técnica de SNaPshot que se pone a punto en este trabajo está basada en el artículo publicado por Lurkin y col. (42) Se hicieron modificaciones a la técnica publicada por estos autores con el objetivo de satisfacer las necesidades del diagnóstico de las mutaciones en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de los genes *KRAS* y *NRAS* para pacientes con mCRC, y optimizar su detección.

Para lograr una mejor eficiencia y rendimiento de la técnica de SNaPshot se realizó la puesta a punto de las etapas más importantes: evaluación de cantidad y calidad de ADN proveniente de tejidos FFPE, PCR de exones, purificación enzimática y reacción de SNaPshot.

4.1.1. Evaluación de cantidad y calidad de ADN proveniente de tejidos FFPE

4.1.1.1. Cuantificación por qPCR (elección de cebadores)

En la elección de los cebadores para la cuantificación de las muestras de tejidos FFPE, se tomó en cuenta el cumplimiento de los requisitos necesarios para este trabajo: que amplificaran un único amplicón, que fuera indicado por una única temperatura de disociación (T_m), que tuvieran una alta eficiencia, y que amplificaran un producto con tamaño adecuado para ADNs provenientes de tejidos FFPE. Para ello, se realizó el estudio *in silico* de tres pares de cebadores: hTERT163, hTERT195 y hTERT351, los cuales se compararon según el cumplimiento de los tres requisitos anteriores para elegir el más adecuado para la cuantificación por qPCR.

Para la evaluación de los parámetros antes mencionados, se utilizó ADN genómico. En esta etapa se analizó una curva estándar con diluciones seriadas al tercio: 5,56 / 1,85 / 0,62 / 0,21 / 0,07 / 0,02 (ng/ μ l). Dicha curva se amplificó empleando *SYBR Green* como intercalador inespecífico, realizando una curva de disociación posterior a la PCR.

El primer parámetro estudiado fue la T_m del fragmento amplificado por cada par de cebadores. Para ello, se realizó el estudio sobre la curva estándar de ADN. En la Figura 10 (derivada inversa del valor de fluorescencia, $-R_n$, vs. Temperatura) se presentan las curvas de disociación de los productos amplificados por los pares de cebadores hTERT163, hTERT351 y hTERT195.

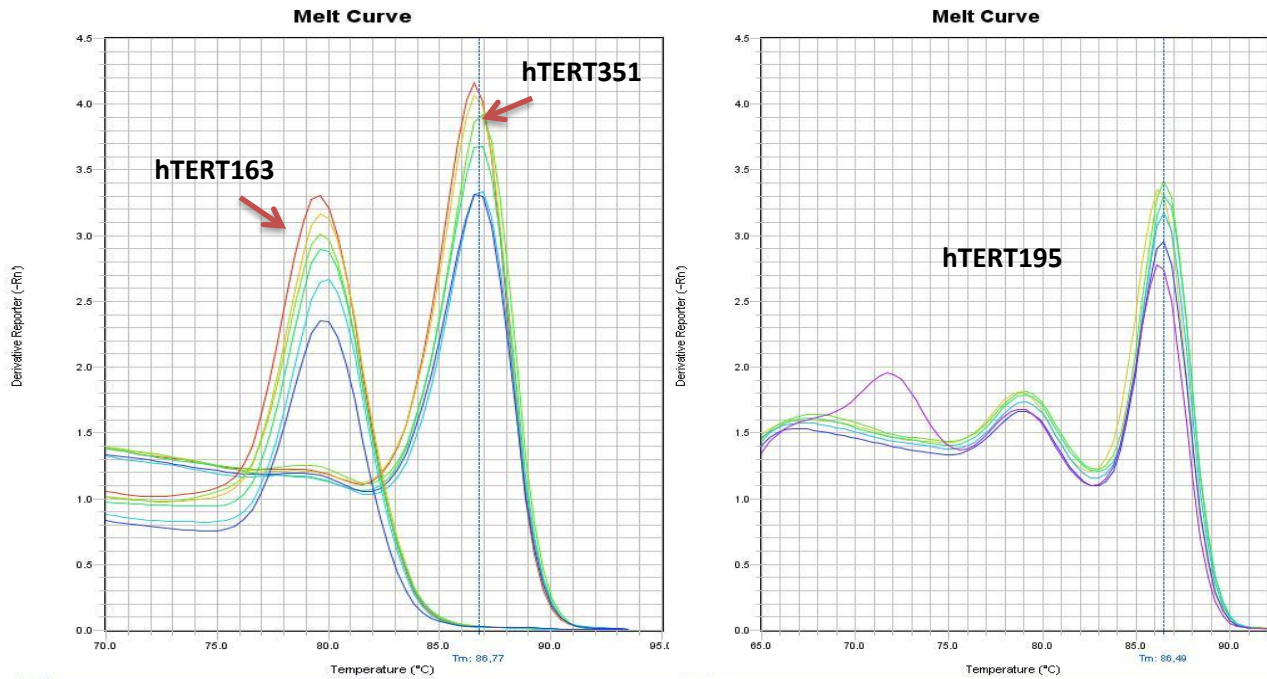


Figura 10: Curvas de disociación para los juegos de cebadores hTERT163, hTERT351 y hTERT195 utilizando la curva estándar de ADN genómico. La T_m del producto amplificado por el par de cebadores hTERT163 fue de 79,5°C, mientras que por los cebadores hTERT351 fue de 86,8°C y por el par de cebadores hTERT195 fue de 86,5°C.

Al observar la Figura 10, se aprecian dos situaciones diferentes. Por un lado el caso de los cebadores hTERT163 y hTERT351 donde cada juego de oligonucleótidos amplifica un producto con una única T_m característica, la cual se mantiene para todas las muestras de ADN estudiadas. Esto significa que ninguno de los juegos de cebadores amplifica fragmentos inespecíficos, lo cual coincide con lo estudiado *in silico*. En cambio, en el caso del par de cebadores hTERT195, se distinguen tres picos distintos, uno a 86,5° que aparece en todas las muestras de ADN, otro a 79°C en todas las muestras, y un tercer pico a 71,5°C que se aprecia únicamente para el ADN 0,02ng/μl (línea violeta). La presencia de más de un pico indica que dicho juego de cebadores no amplifica específicamente un único fragmento y/o que los cebadores hTERT195 se hibridan entre sí y generan una señal.

Una vez evaluadas las T_m de los productos amplificados por los tres juegos de cebadores, hTERT163, hTERT351 y hTERT195, se descartó al par de oligonucleótidos hTERT195 debido a la amplificación de más de un producto.

El segundo parámetro analizado fue la eficiencia de los cebadores. Para ello se estudió la curva estándar de ADN para hTERT163 y hTERT351. En la Tabla 8 se presentan los valores de R^2 (coeficiente de determinación) y pendiente, resultantes de graficar Log [ADN] vs. CT para las curvas estándar, y la eficiencia calculada a partir de la pendiente para las dos PCRs en cuestión.

Tabla 8: Datos de las curvas estándar utilizando los cebadores hTERT163 y hTERT351.

Nombre	R ²	Pendiente	Eficiencia (%)
hTERT163	0,995	-3,351	98,8
hTERT351	0,996	-3,644	88,1

El R² es un parámetro que indica qué tan bueno es un valor con respecto a la predicción de otro. El valor óptimo es 1, sin embargo un valor de R² mayor a 0,99 proporciona una buena confianza en la correlación de dos valores. En este caso, ambos datos de R² fueron cercanos al óptimo. En cuanto a la pendiente, el valor esperado es -3,32 para una eficiencia del 100% (proviene de la ecuación: $CT = \text{pend} \times \text{Log} [\text{ADN}]$). La pendiente se relaciona con la eficiencia mediante la siguiente ecuación: **%Eficiencia = $(10^{-1/\text{pend}} - 1) \times 100$** . En este caso, la eficiencia de la PCR de hTERT163 es superior a la de hTERT351. El rango considerado adecuado para la eficiencia es entre 90 y 110%, siendo valores cercanos a 100% los más deseados. Con los cebadores hTERT163 se logró una eficiencia del 98,8%, mientras que para los oligonucleótidos hTERT351 fue de 88,1%.

Por último, otro factor importante que se tuvo que tener en cuenta a la hora de elegir los cebadores fue el tamaño de los fragmentos generados en la qPCR. En un contexto donde el ADN de las muestras de tejidos FFPE poseen ADN muy degradado (que podría no ser amplificado en la PCR de exones), para poder cuantificar la cantidad de “ADN amplificable”, o sea el ADN posible de ser utilizado en la etapa posterior (PCR de exones), con un tamaño entre 100 y 200pb, se necesitaban cebadores que logran amplificar fragmentos de un tamaño similar. De los cebadores evaluados, hTERT163 y hTERT351, el primero de ellos es el que genera un tamaño de amplicón dentro del rango esperado, 163pb. Cebadores de menor tamaño sobre-estimarían la cantidad de ADN “amplificable” y cebadores de mayor tamaño lo podrían subestimar dependiendo del grado de degradación del ADN.

Una vez que se evaluaron los tres juegos de cebadores, se decidió trabajar con hTERT163 ya que era el único que lograba cumplir los tres requisitos planteados para la qPCR.

4.1.1.2. Evaluación y cuantificación de ADN proveniente de tejidos FFPE

Para el diagnóstico de mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* de pacientes con mCRC se utilizaron muestras provenientes de tejidos FFPE. Dichas muestras debieron ser transferidas a un anatómopatólogo para la identificación de un fragmento de tejido con células tumorales, el cual fue estudiado utilizando la técnica de SNaPshot. Dicha técnica comenzó con una etapa de extracción de ADN mediante el kit de *Qiagen* para muestras parafinadas, para luego cuantificar el ADN por qPCR. Fue en esta última etapa que surgieron inconvenientes a la hora de trabajar con ADN proveniente de tejidos FFPE. Dichos problemas se debieron evaluar y solucionar.

El primer problema fue la cuantificación del ADN útil para realizar la posterior PCR de exones (“ADN amplificable”), ya que este tipo de muestras presentaba un alto porcentaje de ADN degradado. Para solucionar esta dificultad se seleccionaron los cebadores hTERT163 (nombrados anteriormente) que permitieron amplificar un fragmento de tamaño similar a los amplicones de los exones de *KRAS* y *NRAS* (100 a 200pb).

El segundo inconveniente fue la inhibición en la qPCR en un gran número de muestras evaluadas. Dicha inhibición pudo ser debida a la presencia de inhibidores, posiblemente productos co-extraídos con el ADN en la etapa de extracción. Los mismos podrían actuar capturando ácidos nucleicos, inhibiendo la polimerasa o interfiriendo con las condiciones físico-químicas de la reacción de qPCR. Por ello se decidió realizar un estudio con múltiples muestras que permitiera diferenciar aquellas con presencia de inhibición de aquellas que no la presentasen, para poder identificar patrones fuera de lo normal.

Para establecer un punto de referencia en el análisis, se procedió a medir muestras libres de inhibición (ADN genómico “puro”). Se utilizaron diluciones seriadas al tercio desde la concentración inicial de 5,56ng/μl hasta 0,02ng/μl. El comportamiento de estas muestras servirá más adelante como referencia a la hora de evaluar los ADN de tejidos FFPE. Una gráfica de amplificación típica para qPCR se presenta en el Anexo 3.

En la Figura 11 se presenta la gráfica correspondiente a la amplificación de diluciones seriadas de la curva estándar de ADN. Dicha gráfica representa la ΔR_n en función de los ciclos. ΔR_n es la variación de la señal de fluorescencia normalizada en cada ciclo de la reacción de PCR; y es a partir de estos valores que se determina el umbral y posteriormente se calcula el CT (ciclo umbral). Este tipo de gráfica sirve para identificar y examinar las amplificaciones irregulares, determinar el valor del umbral y la línea basal de la reacción (45). En la gráfica de la Figura 11 se encuentran la línea basal y la línea umbral, establecidas por el operador. Tras el análisis, la curva estándar de ADN ($\text{Log}[\text{ADN}]$ vs. CT) presentó una pendiente de -3,351, un R^2 de 0,995 y una eficiencia de 99%.

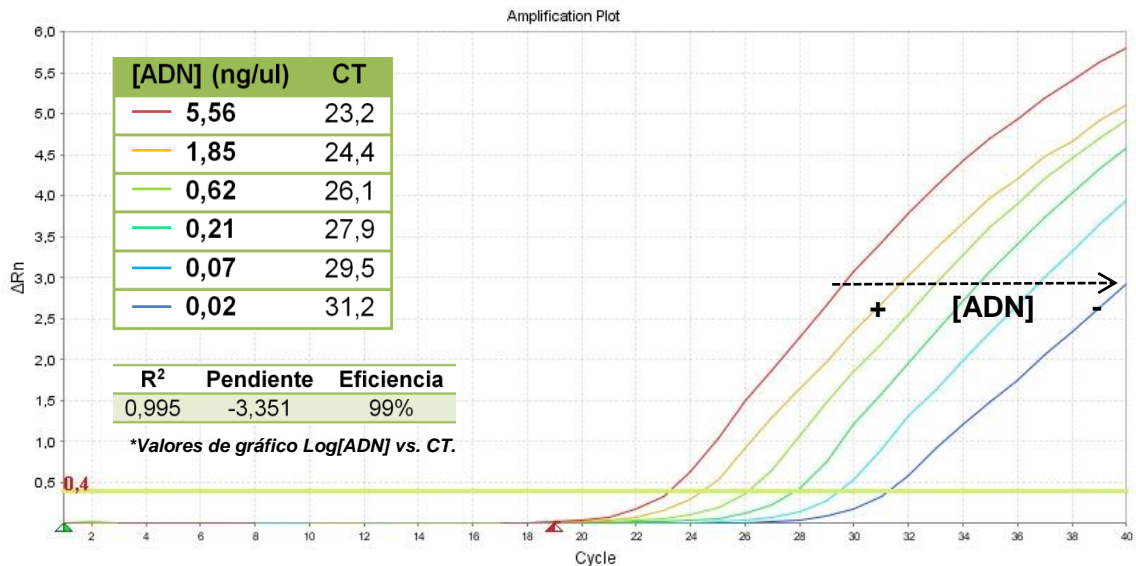


Figura 11: Gráfica ΔRn vs. ciclos de la curva estándar de ADN puro. La línea verde representa el umbral y los triángulos: verde \blacktriangle y rojo \blacktriangle , en el eje X, definen los límites de la línea basal. La concentración de ADN disminuye de izquierda a derecha. La tabla con los valores de R^2 , pendiente y eficiencia se obtuvo de la gráfica Log[ADN] vs. CT.

De los datos de la Figura 11 se desprende que a medida que disminuye la concentración de ADN al tercio, aumenta el CT en un valor de aproximadamente 1,5 entre una dilución y la siguiente. El valor de CT es inversamente proporcional a la concentración de ADN molde inicial (46).

A diferencia de lo observado anteriormente en este ADN genómico “puro” (que no presenta inhibición), existieron muestras, provenientes de ADN extraído de tejido FFPE, que presentaron inhibición en la qPCR. Dicha inhibición se observó en las curvas de amplificación (ΔRn vs. Ciclos). Para ejemplificar los casos de inhibición se presenta una muestra proveniente de tejido FFPE, la misma se diluyó al medio en forma seriada (diluciones 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160) (Figura 12).

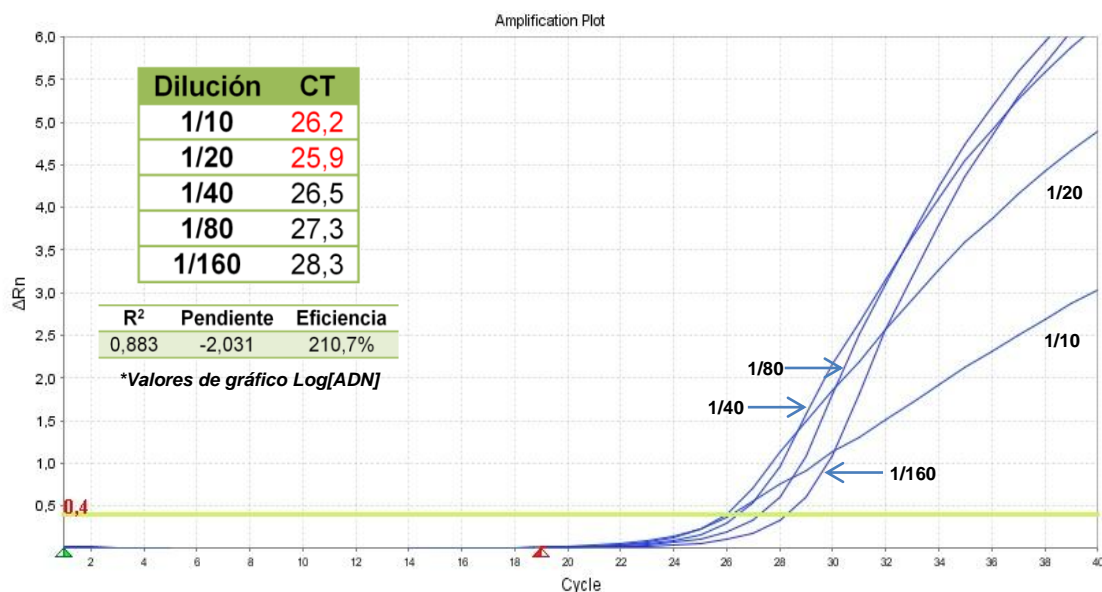


Figura 12: Gráfica ΔRn vs. ciclos de muestra de ADN proveniente de tejido FFPE. La tabla con los valores de R^2 , pendiente y eficiencia se obtuvo de la gráfica Log[ADN] vs. CT.

Si se analizan los datos de la Figura 12 de la misma forma en que se estudió la muestra de ADN puro, se puede calcular el rendimiento (o desempeño) de la amplificación. Al realizar dicho análisis los resultados fueron: $R^2=0,883$, pendiente=-2,031 y eficiencia=210,7%. Las muestras 1/10 y 1/20 presentaron curvas de amplificación con pendientes menores a lo esperado dentro de la fase exponencial. Además, la amplificación para la primera dilución (1/10) se ve después que la dilución siguiente (1/20), CT= 26,2 y 25,9 respectivamente, lo cual no es lo esperado ya que se supone que a mayor dilución menor es la concentración de ADN ($CT \propto 1/[ADN]$). Claramente la amplificación de estas diluciones provocaron una distribución de valores que se aleja de una recta perfecta ($R^2=1$) y, a su vez, generaron que la pendiente se alejase del valor esperado de -3,32. Como consecuencia la eficiencia evaluada no se puede considerar. La mejor explicación para estos datos es la existencia de inhibición de las muestras 1/10 y 1/20. Una forma clara de visualizar esta alteración fue eliminando los puntos de la curva que tuvieron una amplificación distinta a lo esperado y cuya diferencia en ΔCT con la dilución posterior fuera menor a 1. Al eliminar las diluciones 1/10 y 1/20 los valores de la curva Log[ADN] vs. CT se acercaron a lo esperado, siendo la pendiente de -3,143, R^2 de 0,997 y eficiencia de 108%. Con estos datos se puede deducir que la inhibición disminuye en gran medida en la dilución 1/40, ya que al eliminar los puntos anteriores, la curva mejoró. Es a partir de la muestra 1/80 que se vio un ΔCT de 1 con respecto a la dilución posterior, por lo que esta muestra no está inhibida y podría ser utilizada en los pasos posteriores que implican la PCR de exones (ver más adelante).

A medida que se fueron analizando datos de muestras de ADN de tejidos FFPE se apreció que, para algunas muestras, la fluorescencia absoluta era alta a ciclos tempranos en las muestras más concentradas. Esto resultó interesante y se decidió profundizar en esta observación.

En la qPCR existen dos tipos de fluorescencias: aquella que proviene del SYBR Green (Cianina asimétrica) y la fluorescencia del reactivo ROX (carboxy-X-rhodamine). El SYBR Green se une preferentemente a ADN doble cadena pero también se podría unir al ADN de cadena sencilla o ARN con una baja eficiencia. En algunos casos se puede unir a ARN con un rendimiento más bajo que el ADN (45,47). Por otro lado, el ROX es un fluoróforo que está presente en el medio líquido y sirve para normalizar las diferencias en la fluorescencia del SYBR Green que puedan estar ocurriendo debido a las variaciones de volumen (camino óptico) en o entre los tubos de un mismo experimento de qPCR (45,48).

En la Figura 13A se muestra la medida de fluorescencia sin normalizar a lo largo de los ciclos de la qPCR para una muestra de ADN genómico "puro". En cuanto a la señal basal proveniente del SYBR Green, se observa que disminuye conforme se diluye el ADN, señal esperada dado que hay menos sitios de unión para el SYBR Green. A su vez, se aprecia que la fluorescencia entre el ciclo 1 y el 20 es de 200000 RFU aproximadamente, aumentando exponencialmente hasta el ciclo 40 en donde llega al plateau. Por otro lado, la fluorescencia proveniente de ROX es constante en 160000

RFU aproximadamente, lo cual permite continuar trabajando con los valores obtenidos ya que no hay cambios en el volumen entre los pocillos de la placa evaluados.

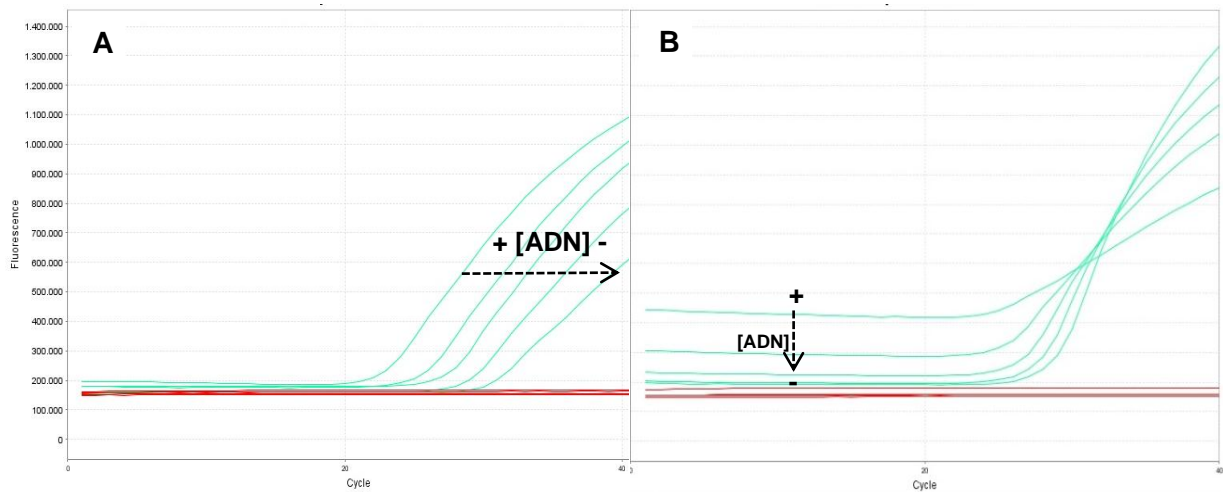


Figura 13: Fluorescencia absoluta vs. ciclos. Color verde: SYBR Green; color rojo: ROX. (A) Muestra ADN genómico "puro", dilución seriadas al tercio. (B) Muestra proveniente de tejido FFPE, diluciones seriadas al medio.

Volviendo al ejemplo de la muestra analizada en la Figura 12, en la gráfica de fluorescencia vs. ciclos (Figura 13B), se observó un nivel de fluorescencia (SYBR Green) de 450000 RFU en ciclos tempranos para la dilución 1/10. Esta fluorescencia disminuyó a medida que se diluyó el ADN. Dichos valores contrastan con los observados para ADN genómico "puro", cuyo valor de fluorescencia fue ≤ 200000 RFU (Figura 13A). En todas las muestras analizadas donde se vio alta fluorescencia en ciclos tempranos, existían indicadores de inhibición en la curva de amplificación, como se observa en la Figura 12 para las diluciones 1/10 y 1/20.

Se podría explicar la alta fluorescencia presente en algunas muestras de tejidos FFPE por la presencia de un nivel extremadamente alto de ADN en las diluciones más concentradas asumiendo que el SYBR Green se incorpora al ADN doble hebra. Dado que las muestras provenientes de tejidos FFPE poseen pocas células es improbable que, tras la extracción de ADN, se obtengan grandes cantidades de ADN genómico. Siendo que las diluciones con alta fluorescencia también mostraron inhibición en la qPCR, se podría hipotetizar que la fluorescencia a ciclos tempranos es debida a impurezas en la muestra y serían éstas impurezas las que podrían estar inhibiendo la qPCR.

Tras el estudio completo de muchas muestras con alta fluorescencia en los primeros ciclos de la qPCR, se estableció empíricamente un valor a partir del cociente entre la fluorescencia (SYBR Green) en el ciclo 5 de la muestra sobre la fluorescencia del ADN puro (ADN 5,56ng/ μ l) y se consideró que un cociente mayor a 1,5 era indicador de impurezas y probablemente de inhibición. Las muestras con valores menores a 1,5 permitieron una correcta visualización del resultado en la electroforesis capilar (último paso de la técnica) y fueron tratadas como referencia para establecer el rango de

fluorescencia. En el caso de la dilución 1/80 de la Figura 12, el cociente fue de 1,3 aproximadamente. Este valor está dentro del rango establecido en este trabajo (menor a 1,5), lo que refuerza la elección tomada a partir del análisis de la curva de amplificación.

La posible inhibición en la qPCR podría deberse: 1) a la existencia de un componente diferente a un ácido nucleico que fluoresca a la misma longitud de onda que el SYBR Green o que se una a éste al comienzo de la reacción y provoque su fluorescencia; 2) a la presencia de ADN muy degradado proveniente de tejido FFPE, no amplificable con los cebadores hTERT163, el cual podría interferir en la reacción de PCR. En el primer caso, el inhibidor podría provenir de los reactivos utilizados en el proceso de parafinado de las muestras FFPE. En el segundo caso, el ADN degradado podría ser consecuencia del tratamiento químico de los tejidos FFPE. En este trabajo no se pretende identificar la/s molécula/s que genera/n la inhibición ni como eliminarla/s. Sin embargo, se realiza un estudio de correlación entre el grado de inhibición y el grado de pureza de la muestra.

4.1.2. Puesta a punto de PCR de exones

En esta etapa se evaluaron la especificidad y la temperatura de hibridación de los cebadores para la PCR de exones, el número de ciclos óptimo para la amplificación y la visualización del producto amplificado en geles de agarosa.

Para evaluar el desempeño de los cebadores se realizó una qPCR con cada par de cebadores para los tres exones (exón 2, 3 y 4) de los genes *KRAS* y *NRAS*, utilizando la curva estándar de ADN "puro" (nombrada anteriormente). Lo primero que se valoró fue la especificidad de los oligonucleótidos dada por la amplificación de un único producto para cada uno de los pares de cebadores (*KRAS* ex.2, *KRAS* ex.3, *KRAS* ex.4, *NRAS* ex.2, *NRAS* ex.3 y *NRAS* ex.4), lo cual se pudo deducir a partir de la curva de disociación del producto amplificado. En la Figura 14 (gráfico $d-Rn/dt$) se presentan las curvas de disociación para los productos amplificados a partir de las diluciones seriadas de ADN puro con los tres juegos de cebadores que amplifican los exones 2, 3 y 4 de *KRAS* y *NRAS*. En dicha figura se distingue un pico único y una misma T_m para todas las diluciones con cada juego de cebadores. Con esto se demostró que cada par de cebadores amplifica un único producto y no había productos inespecíficos.

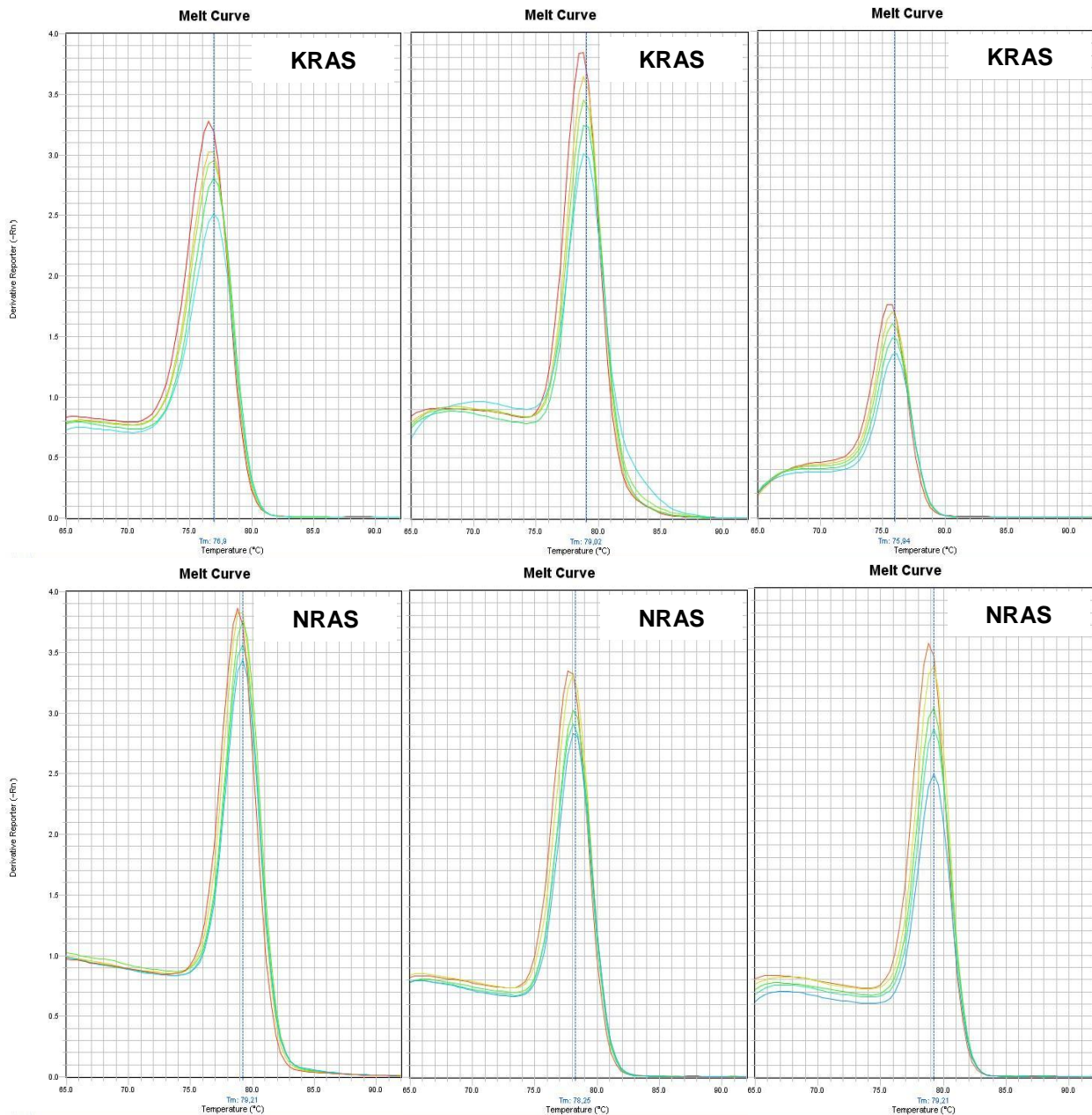


Figura 14: Curvas de disociación para diluciones seriadas de ADN puro con los tres juegos de cebadores que amplifican los exones 2, 3 y 4 de KRAS y NRAS. Arriba: KRAS ex.2 ($T_m=76,9^\circ\text{C}$), KRAS ex.3 ($T_m=79,02^\circ\text{C}$) y KRAS ex.4 ($T_m=75,94^\circ\text{C}$). Abajo: NRAS ex.2 ($T_m=79,21^\circ\text{C}$), NRAS ex.3 ($T_m=78,25^\circ\text{C}$) y NRAS ex.4 ($T_m=79,21^\circ\text{C}$). Se observa un pico único para cada juego de cebadores.

A continuación, se analizaron diferentes temperaturas de hibridación para los cebadores con el propósito de determinar con cuál de ellas se obtenía mejor rendimiento en la PCR. Se evaluaron los pares de cebadores para cada exón por separado (exón 2, 3 y 4) tanto para el gen KRAS como NRAS, utilizando la curva estándar de ADN puro. En la Figura 15 se observan las curvas de amplificación de los tres exones de cada gen a 56°C , 58°C y 60°C .

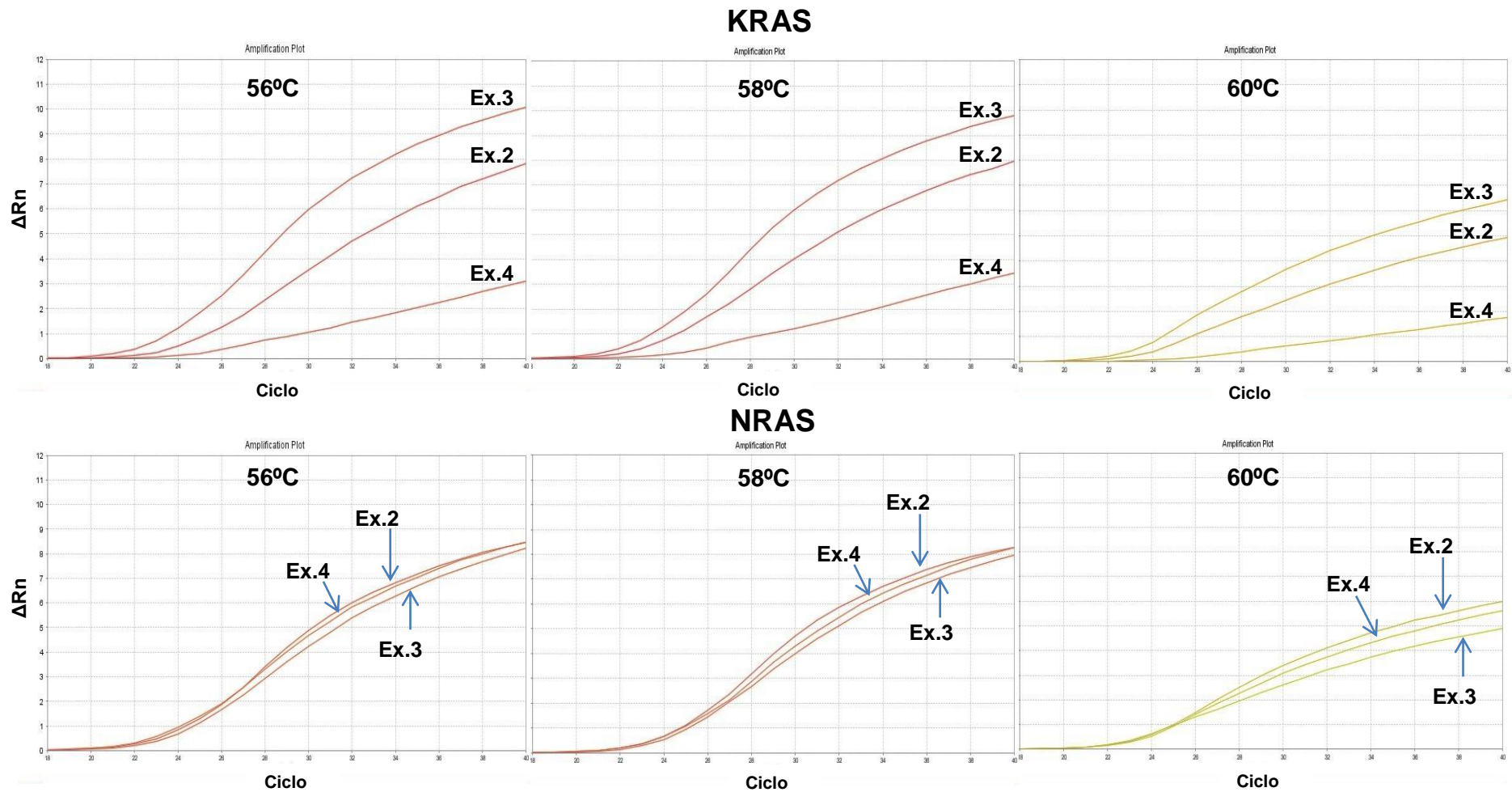


Figura 15: Curvas de amplificación para exones 2, 3 y 4 de KRAS y NRAS para las temperaturas estudiadas: 56°C, 58°C y 60°C.

En lo que respecta a *KRAS*, la eficiencia relativa de la PCR de exones a los 40 ciclos fue diferente para cada uno de los amplicones. Los cebadores para el exón 3 fueron los que tuvieron una eficiencia más alta. En el otro extremo, los cebadores para el exón 4 mostraron niveles de amplificación mucho menores que los pares de cebadores para el exón 2 y 3. En cuanto a las distintas temperaturas de hibridación, se apreció claramente que a 60°C la eficiencia de los tres juegos de cebadores fue más baja que a 56°C y 58°C. Las temperaturas de hibridación a 56°C y 58°C mostraron una eficiencia semejante.

En el caso de *NRAS*, la eficiencia de los pares de cebadores fue similar. Donde la mayor eficiencia fue a 56°C y 58°C, al igual que en *KRAS*.

Finalmente, se decidió utilizar una temperatura de hibridación de 58°C y no de 56°C para poder favorecer las uniones específicas. Además los cebadores para el exón 4, que son los que presentaron menor eficiencia, se mostraron favorecidos a 58°C con un ΔR_n levemente mayor que a 56°C.

Según lo expuesto anteriormente el rendimiento de los cebadores para el exón 4 de *KRAS* fue bajo con respecto a los cebadores para los exones 2 y 3. Con el objetivo de mejorar la PCR del exón 4 de *KRAS*, se ensayaron otros juegos de cebadores que amplificaran este exón. En este experimento se comparó el rendimiento de los cebadores originales (*KRAS* ex.4 Fwd y *KRAS* ex.4 Rv) para el exón 4 con el rendimiento al utilizar cebadores internos en conjunto con los originales (*KRAS* ex. 4 Fwd_{int}/*KRAS* ex.4 Rv y *KRAS* ex.4 Fwd/ *KRAS* ex.4 Rv_{int}). En la Figura 16 se muestra un esquema de la posición de los cebadores sobre la secuencia del exón 4 que se utilizaron en este ensayo.

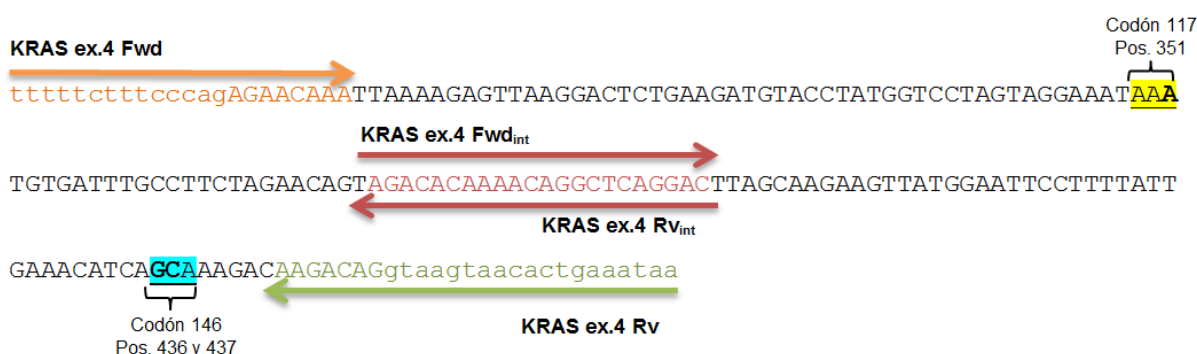


Figura 16: Esquema de la posición de los cebadores *KRAS* ex.4 Fwd, *KRAS* ex.4 Fwd_{int}, *KRAS* ex.4 Rv_{int} y *KRAS* ex.4 Rv sobre la secuencia del exón 4 de *KRAS*. Se indican los codones (subrayados) y las posiciones estudiadas: posición 351, 436 y 437 (en negrita).

En la Figura 17 se observan las curvas de amplificación para las distintas combinaciones de cebadores utilizados en este experimento (*KRAS* ex.4 Fwd / *KRAS* ex.4 Rv, *KRAS* ex. 4 Fwd_{int}/ *KRAS* ex.4 Rv y *KRAS* ex.4 Fwd/ *KRAS* ex.4 Rv_{int}). Según los datos de esta figura, el par de cebadores *KRAS* ex.4 Fwd_{int}/ *KRAS* ex.4 Rv funcionó levemente mejor que los pares *KRAS* ex.4 Fwd/ *KRAS* ex.4 Rv_{int} y *KRAS* ex.4 Fwd/ *KRAS* ex.4 Rv. Para amplificar la región de interés en el exón 4 con los cebadores internos, se deberían utilizar los cuatro cebadores y realizar dos reacciones de PCR por separado. Dado que esto implica un mayor costo de reactivos y pérdida de tiempo, y además no implica una diferencia significativa con respecto al rendimiento de la PCR con el par de cebadores *KRAS* ex.4 Fwd/ *KRAS* ex.4 Rv, se decidió continuar utilizando éstos últimos.

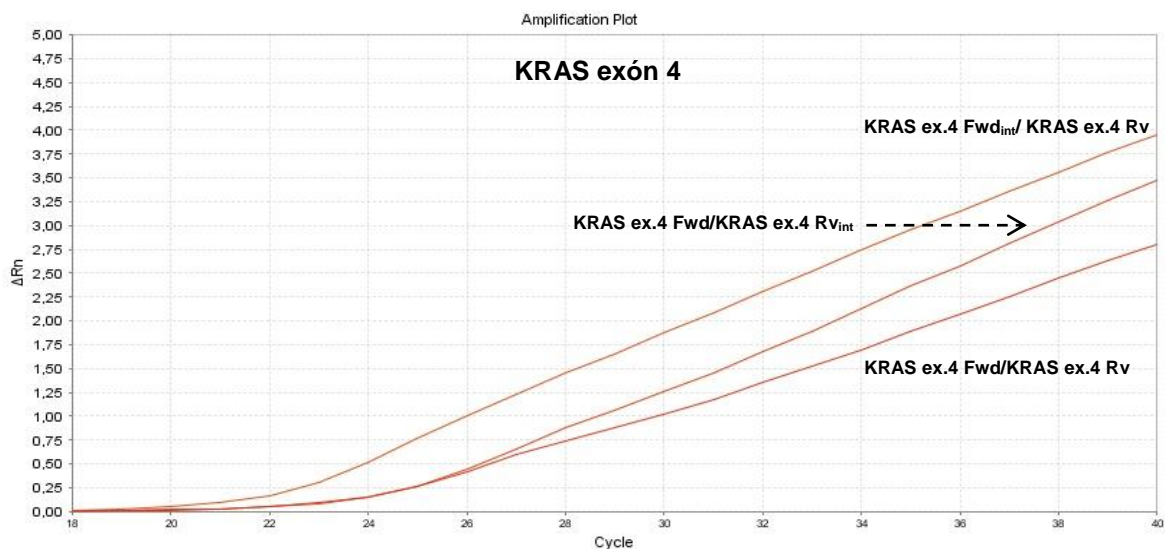


Figura 17: Curvas de amplificación para el exón 4 de *KRAS* con los cebadores *KRAS* ex.4 Fwd_{int}/ *KRAS* ex.4 Rv, *KRAS* ex.4 Fwd/*KRAS* ex.4 Rv_{int}, *KRAS* ex.4 Fwd/*KRAS* ex.4 Rv

Una vez evaluados todos los cebadores para la amplificación de los exones de *KRAS* y *NRAS* se decidió realizar dos reacciones de PCR múltiples, una para los exones de *KRAS* y otra para los exones de *NRAS*, ya que estos genes presentan similitud de secuencia. Según el análisis realizado *in silico* sobre el genoma humano, no habría amplificaciones inespecíficas al juntar los cebadores.

Otra variable que se estudió, en la PCR de exones, fue el número de ciclos de amplificación utilizado. Debido a que las muestras provenientes de tejidos FFPE poseen poca cantidad de ADN y el rendimiento de los pares de cebadores para la amplificación de exones es muy variable entre ellos, se decidió utilizar un alto número de ciclos. Si se observan las curvas de amplificación de la Figura 15 donde se muestra el rendimiento de los distintos pares de cebadores para los tres exones de los genes *KRAS* y *NRAS*, a 30 ciclos el nivel de ADN amplificado se encontró muy lejos del *plateau* mientras que a 35 ciclos dicho nivel fue significativamente más elevado, aunque no llegó al *plateau*. Por lo tanto, se decidió trabajar a 35 ciclos para tener niveles de ADN suficientes para continuar trabajando.

El último punto evaluado en esta etapa fue la visualización del ADN amplificado en geles de agarosa al 3%. Para la PCR de exones se utilizó ADN puro 0,04 ng como control positivo, y a su vez como cantidad mínima aceptable para el trabajo posterior. En la Figura 18 se observan dos geles correspondientes a muestras de *KRAS* (arriba) y *NRAS* (abajo), en los cuales se logran apreciar las bandas correspondientes a las amplificaciones de los distintos exones.

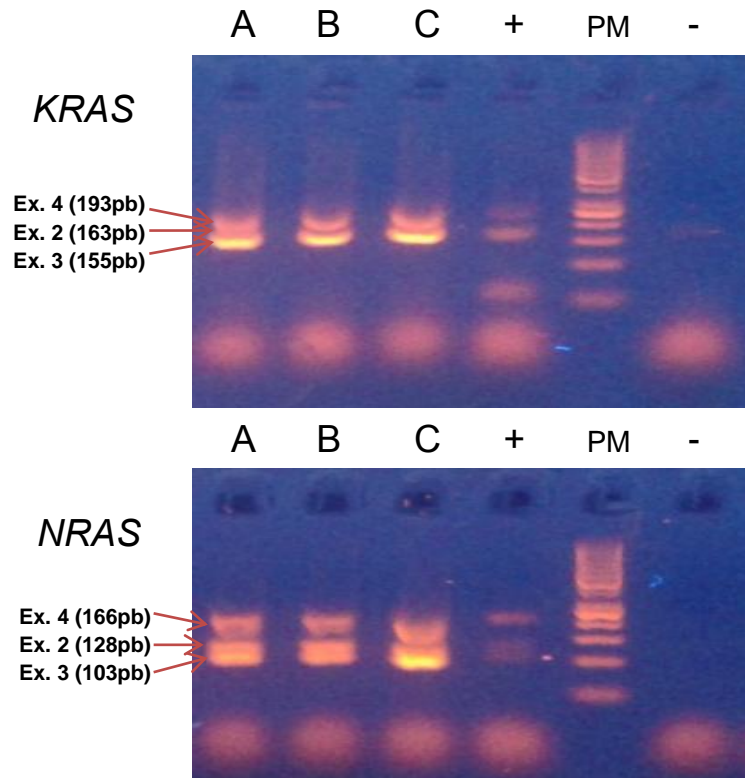


Figura 18: Electroforesis en geles de agarosa al 3% de PCR de exones. Arriba PCR de exones *KRAS* y abajo PCR de exones *NRAS*, a 35 ciclos. **A, B y C:** tres muestras provenientes de tejidos FFPE; **+**: Control positivo con 0,04ng de ADN; **--**: control negativo; **PM:** marcador de peso molecular 50pb.

4.1.3. Purificación

Las etapas de purificación son muy importantes en la técnica de SNaPshot ya que de éstas depende la correcta visualización de los picos tras la electroforesis capilar final. En la primera purificación se utilizan dos enzimas, fosfatasa alcalina y exonucleasa I, para la eliminación del exceso de dNTPs y cebadores, respectivamente. En la segunda etapa de purificación únicamente se utiliza la fosfatasa alcalina para eliminar el exceso de los ddNTPs marcados.

Para comprender las consecuencias de un mal funcionamiento de la purificación se ha de entender el proceso de la reacción de SNaPshot para *KRAS* y *NRAS*. Por ello los detalles sobre este punto se describen más adelante luego de presentar la reacción de SNaPshot y la electroforesis capilar (ítem 4.1.5.1).

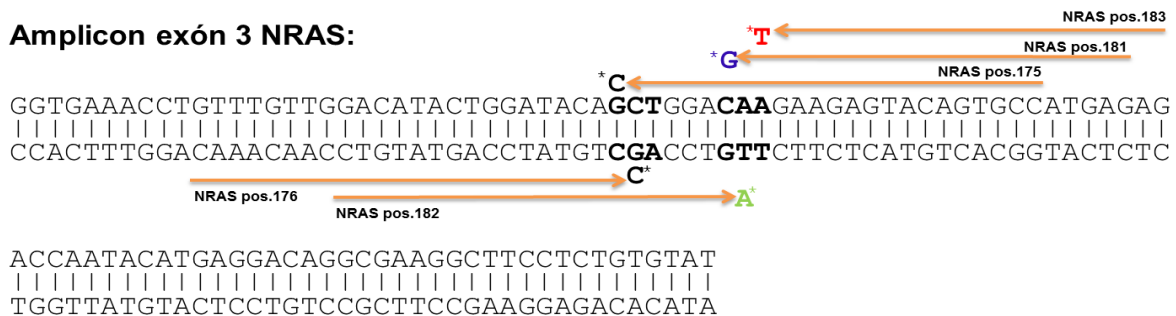
4.1.4. Reacción de SNaPshot y electroforesis capilar

Para la reacción de SNaPshot se utilizaron varios cebadores con el objetivo de detectar de forma simultánea múltiples mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS*. En la Figura 19 y el Anexo 4 se muestran de forma esquemática los cebadores utilizados para las reacciones de SNaPshot de *NRAS* y *KRAS*, respectivamente.

Amplicon exón 2 NRAS:



Amplicon exón 3 NRAS:



Amplicon exón 4 NRAS:



Figura 19: Esquema ilustrando los cebadores de SNaPshot sobre los productos amplificados (en la PCR de exones) de los exones 2, 3, 4 del gen *NRAS*. Las flechas representan los distintos cebadores que al hibridarse a la secuencia de *NRAS* servirán de cebo para la incorporación del nucleótido complementario a la mutación estudiada. Flechas: cebadores SNaPshot *NRAS*; letras en negrita: codones; letras en colores con asterisco: ddNTPs marcados con un fluorocromo (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP).

En un análisis preliminar se investigaron, *in silico*, las posibles interferencias que se podrían generar por formación de dímeros entre los cebadores de SNaPshot mediante el programa *Multiple Primer Analyzer* de *Thermo Scientific* (43). Únicamente algunos de los dímeros predichos podrían interferir en la reacción de SNaPshot. Para el caso de *KRAS* no se detectaron hibridaciones probables. No obstante, en el caso de *NRAS* dos de los dímeros predichos parecían probables de ocurrir dado que los cebadores mostraron un alto nivel de complementariedad entre ellos (mayor al 50%) en su extremo 3'. Los mismos fueron *NRAS* pos.34 con *NRAS* pos.35 y *NRAS* pos.34 con *NRAS* pos.37 (Figura 20).

NRAS pos.34 (arriba) con *NRAS* pos.35 (abajo)

5'-gtgcgcttttcccaacaccac -3'>
< 3'- gacgagggtggtggtg^gtc - 5'

NRAS pos.34 (arriba) con *NRAS* pos.37 (abajo)

5'- gtgcgcttttcccaacaccac - 3'>
< 3'- tggacgagggtggtggtg^g - 5'

Figura 20: Predicción de hibridación de los cebadores de SNaPshot para *NRAS*: *NRAS* pos.34, *NRAS* pos.35 y *NRAS*

Con el resultado del análisis *in silico* se dedujo que el cebador que podría provocar interferencia en la reacción de SNaPshot era *NRAS* pos.34, que al unirse a *NRAS* pos.35 y/o *NRAS* pos.37 podría servir de molde para la polimerasa en la reacción de SNaPshot. De ser cierto, era de esperar que tras la reacción de SNaPshot en el electroferograma final apareciera una señal correspondiente a Citosina (C) en la posición 34, correspondiente a la base complementaria de las G presentes en los cebadores *NRAS* pos.35 y *NRAS* pos.37 justo donde acaba el cebador *NRAS* pos.34 en las hibridaciones predichas (ver Figura 20). Cabe destacar que al utilizar muestras de ADN genómico WT, el nucleótido esperado para la posición 34 de *NRAS* es también una Citosina (ver Figura 19).

Tras las primeras pruebas de la reacción de SNaPshot con muestras de ADN genómico se observó que en los controles negativos de *NRAS* aparecía un pico correspondiente a Citosina en la posición 34. Dada la predicción *in silico* mencionada en el párrafo anterior, se procedió a verificar si la hibridación de los cebadores *NRAS* pos.34 con *NRAS* pos.35 y/o *NRAS* pos.37 era la causa del pico observado.

En primer lugar, se realizaron pruebas con la reacción de SNaPshot a dos temperaturas de hibridación: 50°C y 58°C. Las mismas se hicieron con el objetivo de evaluar el nivel de interferencia a distintas temperaturas de hibridación. Se ensayó a 50°C por ser la temperatura de hibridación

recomendada en el protocolo de SNaPshot de *Invitrogen*. Por otro lado, se ensayó a 58°C con el fin de favorecer interacciones específicas y así prevenir la unión de *NRAS* pos.34 con *NRAS* pos.35 y/o *NRAS* pos.37. En la primera prueba se compararon dos mezclas de cebadores, una conteniendo todos los cebadores de SNaPshot (“mezcla global”, de aquí en más referida como el conjunto total de cebadores de SNaPshot para *KRAS* o *NRAS*) para *NRAS* y otra con todos los cebadores salvo *NRAS* pos.34. Dichas mezclas se probaron para controles positivos (C+) y para controles negativos (C-).

En la Figura 21 se observa claramente que cuando el cebador *NRAS* pos. 34 se encontró presente en la “mezcla global” apareció un pico de igual migración en la electroforesis que la posición 34 en los controles negativos a ambas temperaturas. Por el contrario, cuando no se colocó el cebador para dicha posición en la “mezcla global”, no se observó la posición 34 en los controles positivos, tanto a 50°C como a 58°C, pero tampoco apareció un pico en los controles negativos. Cabe destacar que cuando se utilizó la “mezcla global” sin *NRAS* pos.34, los picos correspondientes a las posiciones 37 y 38 se vieron aumentados.

En cuanto a la comparación de temperaturas de hibridación, se observó que para los controles positivos la intensidad de los picos era levemente mayor a 50°C que a 58°C. En los controles negativos donde aparece la interferencia del pico correspondiente a la posición 34 de *NRAS*, se detectó una alta intensidad tanto a 50°C como 58°C. Esto último indica que la hibridación del cebador *NRAS* pos.34 con *NRAS* pos. 35 y/o *NRAS* pos.37 es fuerte, probablemente favorecida por la alta concentración de oligonucleótidos utilizada en la reacción de SNaPshot.

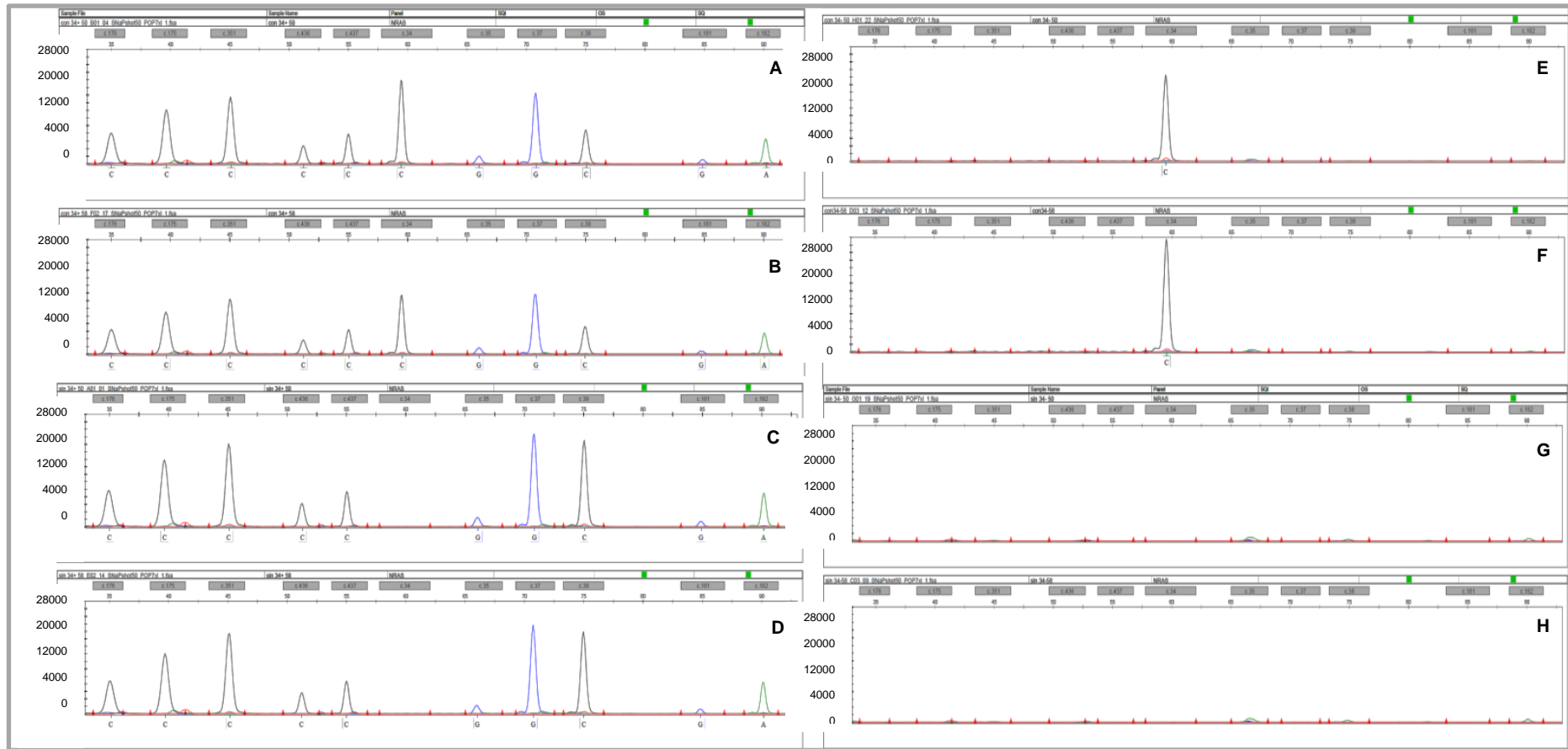


Figura 21: Electroferogramas de la reacción de SNaPshot con la “mezcla global” de cebadores NRAS en presencia o ausencia del cebador NRAS pos. 34. (A) C+ con NRAS pos.34 a 50°C; (B) C+ con NRAS pos.34 a 58°C; (C) C+ sin NRAS pos.34 a 50°C; (D) C+ sin NRAS pos.34 a 58°C; (E) C- con NRAS pos.34 a 50°C; (F) C- con NRAS pos.34 a 58°C; (G) C- sin NRAS pos.34 a 50°C; (H) C- sin NRAS pos.34 a 58°C.

Con las pruebas realizadas se pudo deducir que realmente existía una interferencia generada por el cebador *NRAS* pos. 34, ya que en los controles negativos donde se incluyó dicho cebador en la “mezcla global” apareció un pico con idéntica migración a la correspondiente para la posición 34 de *NRAS*. A continuación se decidió realizar otras pruebas para caracterizar mejor la interferencia generada por el cebador *NRAS* pos.34. Para ello se analizó la posible interacción entre el cebador *NRAS* pos.34 con los cebadores *NRAS* pos.35 y *NRAS* pos.37 a 50°C tanto para controles positivos como negativos.

En la Figura 22 se presentan los electroferogramas de las pruebas realizadas con las distintas combinaciones de cebadores, con el objetivo de caracterizar el pico de la posición 34 de *NRAS* en los controles negativos. Los primeros dos electroferogramas (Figura 22 A y B) representan la reacción de SNaPshot únicamente con el cebador *NRAS* pos.34. En el control positivo se observó el pico correspondiente a Citosina en la posición 34. En el control negativo no apareció dicho pico, lo cual permitió deducir que la Citosina presente en la prueba anterior (Figura 21 E y F) no fue causada por dímeros formados por dicho cebador. Sin embargo, apareció en el control negativo un pico verde de muy baja intensidad que coincidió en tamaño con la posición 34. Dado que en esta reacción sólo estaba presente el cebador *NRAS* pos.34, la única explicación para la presencia de una señal correspondiente a una Adenina es que éste cebador hibride consigo mismo. Observando en detalle la secuencia del cebador *NRAS* pos.34, 5´- T34GTGCGCTTTTCCCAACACCAC - 3´, se pudo visualizar la existencia de complementariedad de bases (indicadas en anaranjado y celeste) si el cebador se plegase sobre sí mismo. En esta estructura secundaria, la última T de la cola T34 quedaría disponible para la incorporación de ddATP en la reacción de SNaPshot. Una señal correspondiente a Adenina en la posición 34 no se observó en muestras con ADN WT, por lo que no es un inconveniente a la hora de evaluar los resultados del diagnóstico de mutaciones en *NRAS* por la técnica SNaPshot.

Los electroferogramas C y D (Figura 22) muestran la reacción con los cebadores *NRAS* pos. 34 y *NRAS* pos.35. En el primer caso (control positivo) aparecen los dos picos esperados, mientras que en el control negativo se observa el pico en la posición 34 con muy alta intensidad (mayor a 30000 UA, con saturación de señal). Esto último permite deducir que hubo hibridación entre ambos cebadores. El hecho de que la intensidad del pico en la posición 34 del control negativo haya sido mucho mayor al pico en la misma posición para el control positivo (18000 RFU aprox.) pudo haber sido debido a la presencia de ADN, el cual competiría por la unión del cebador *NRAS* pos.34. Los casos E a H de la Figura 22 serían análogos a los casos C y D, donde al juntarse el cebador *NRAS* pos. 34 con *NRAS* pos. 37 o los tres cebadores juntos (*NRAS* pos. 34, *NRAS* pos.35 y *NRAS* pos.37), se observó una interferencia en el control negativo con alta intensidad de señal. Esto último indicaría que también existió hibridación entre *NRAS* pos.34 y *NRAS* pos.37.

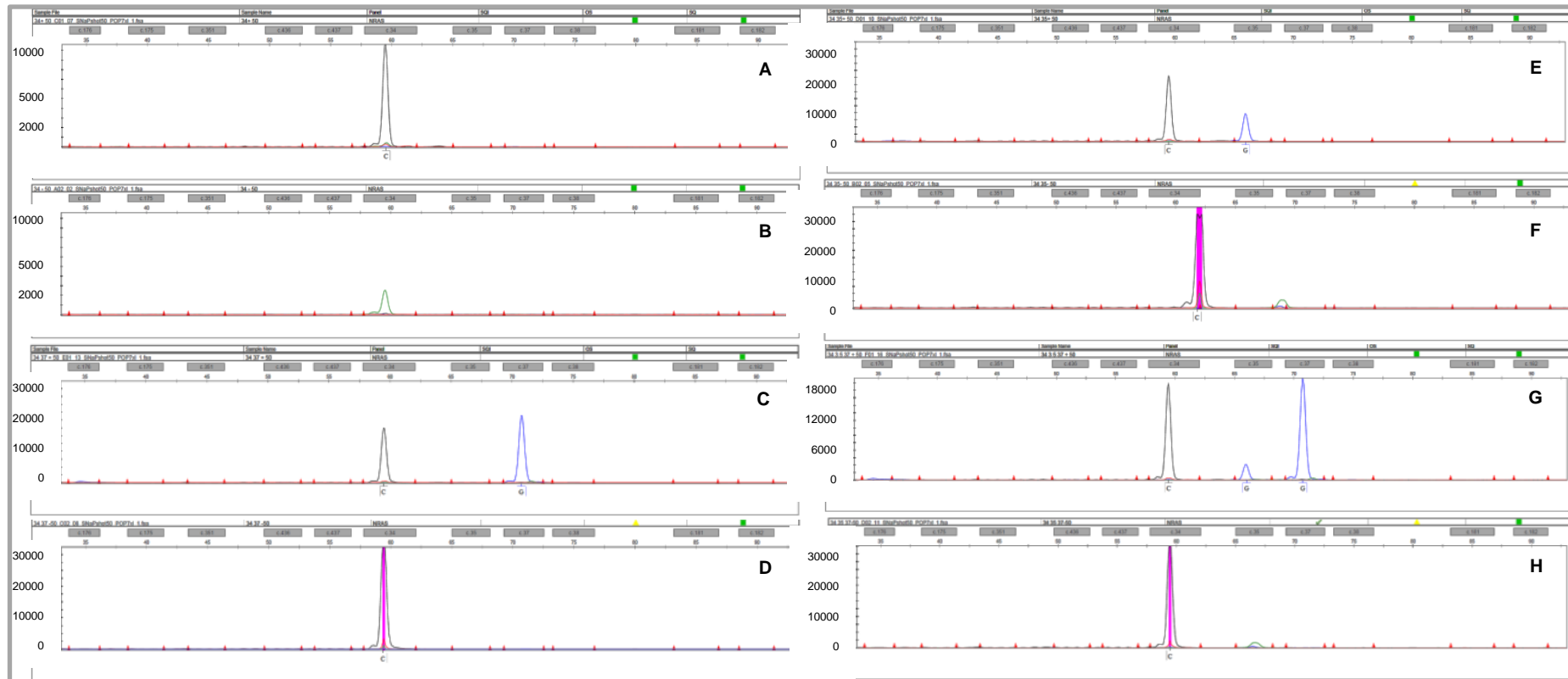


Figura 22: Electroferogramas de la reacción de SNaPshot con distintas combinaciones de los cebadores NRAS pos.34, NRAS pos.35 y/o NRAS pos.37. (A) C+: NRAS pos. 34 y ADN; (B) C-: NRAS pos. 34 y agua; (C) C+: NRAS pos. 34, NRAS pos.35 y ADN; (D) C-: NRAS pos. 34, NRAS pos.35 y agua; (E) C+: NRAS pos. 34, NRAS pos.37 y ADN; (F) C-: NRAS pos. 34, NRAS pos.37 y agua; (G) C+: NRAS pos. 34, NRAS pos.35, NRAS pos.37 y ADN; (D) C-: NRAS pos. 34, NRAS pos.35, NRAS pos.37 y agua.

Con el propósito de eliminar la interferencia de la posición 34 en la reacción de SNaPshot, en una primera instancia, se probó cambiar las proporciones de los tres oligonucleótidos en cuestión (ver Figura 23). Esto se hizo para controles positivos y negativos. Las proporciones ensayadas fueron: 1- concentración de cebadores hasta el momento utilizada (los tres cebadores a una concentración final de 0,5uM) (1^{era} condición); 2- *NRAS* pos. 34 y *NRAS* pos.37 disminuidos un quinto e igual concentración de *NRAS* pos.35 (2^{da} condición); 3- *NRAS* pos. 34 y *NRAS* pos.37 disminuidos un décimo e igual concentración de *NRAS* pos.35 (3^{era} condición); 4- *NRAS* pos. 34 y *NRAS* pos.37 disminuidos un décimo y *NRAS* pos.35 disminuido un quinto (4^{ta} condición).

En todas las pruebas realizadas, en las cuatro condiciones, apareció el pico correspondiente a Citosina en la posición 34 en los controles negativos. En la 1^{era} condición la intensidad del pico en la posición 34 fue mayor a 32000 RFU (saturación de señal), en la 2^{da} condición el pico fue de 10000 RFU, en la 3^{era} condición dicho pico fue de 5000 RFU y en la 4^{ta} condición fue de 8000 RFU. Con estos datos se pudo inferir que la mejor condición era la tercera ya que presentó la menor intensidad de la interferencia en la posición 34. Sin embargo, esto no es satisfactorio ya que se debe obtener un control negativo con ausencia de señales inespecíficas.

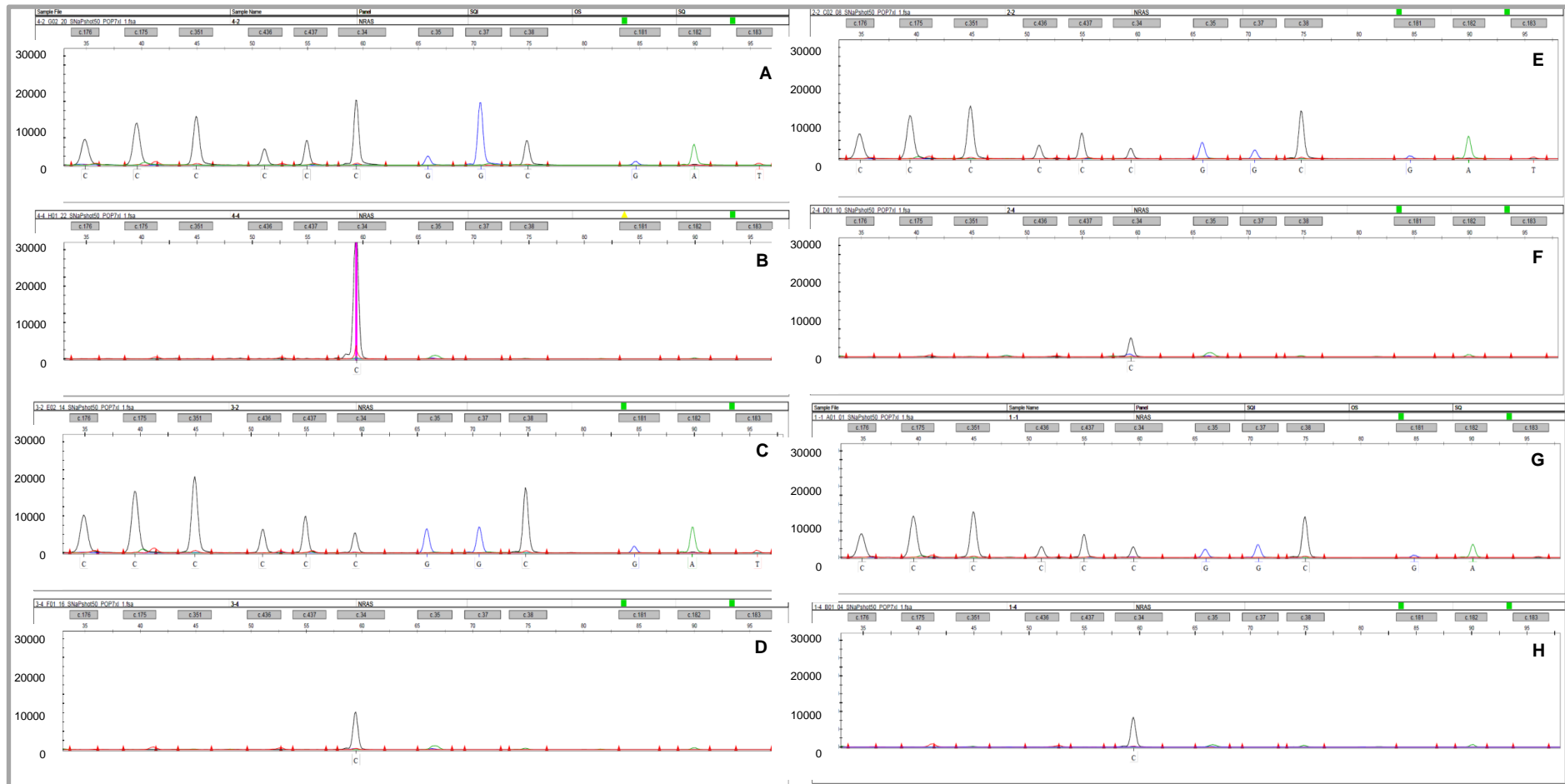


Figura 23: Pruebas para eliminar interferencia entre los cebadores NRAS pos. 34, NRAS pos. 35 y NRAS pos.37. (A) 1^{era} condición C+; (B) 1^{era} condición C-; (C) 2^{da} condición C+; (D) 2^{da} condición C-; (E) 3^{era} condición C+; (F) 3^{era} condición C-; (G) 4^{ta} condición C+; (H) 4^{ta} condición C-.

En un segundo intento por mejorar la reacción de SNaPshot se probó realizar un gradiente de temperaturas (50°C, 58°C, 60°C y 62°C) utilizando la 3^{era} condición con el objetivo de encontrar una temperatura en la cual se eliminase la interferencia. Los electroferogramas correspondientes a las distintas temperaturas se presentan en la Figura 24, donde se observan controles positivos y negativos. Para todas las temperaturas estudiadas apareció un pico en la posición 34 en los controles negativos, que fue disminuyendo a medida que aumentó la temperatura. En los controles positivos, a medida que la temperatura fue aumentando, todos los picos del SNaPshot fueron disminuyendo la intensidad. Por lo tanto, un aumento de temperatura no eliminó la interferencia y a su vez, disminuyó la señal de los demás picos, lo cual no era lo deseable. Por lo tanto, un aumento en la temperatura de hibridación no fue la solución en el problema de la interferencia.

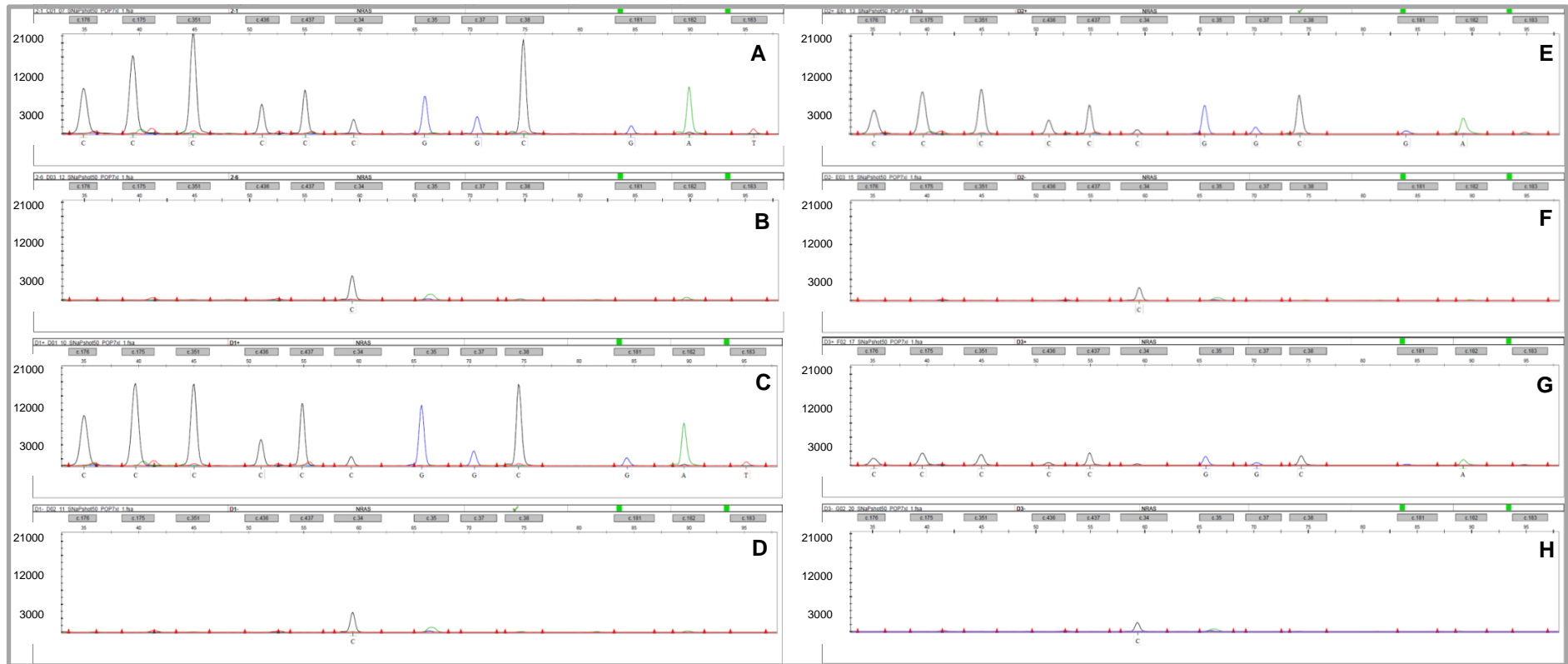


Figura 24: Gradiente de temperatura para evaluar interferencia de los cebadores de NRAS utilizando la 3^{era} condición (NRAS pos. 34 y NRAS pos.37 disminuidos un décimo e igual concentración de NRAS pos.35). (A) C+ a 50°C; (B) C- a 50°C; (C) C+ a 58°C; (D) C- a 58°; (E) C+ a 60°C; (F) C- a 60°C; (G) C+ a 62°C; (H) C- a 62°C.

Dado que ninguna de las condiciones ensayadas logró eliminar de forma completa la interferencia en la posición 34, se decidió separar el cebador *NRAS* pos.34 del resto de los cebadores en la reacción de SNaPshot. Los cebadores *NRAS* pos.35 y *NRAS* pos.37 podían permanecer juntos en la mezcla de cebadores dado que ellos no se hibridan entre sí, lo cual quedó demostrado en las pruebas anteriores.

Dado que en este momento de la puesta a punto resultaba ineludible la separación de *NRAS* pos.34 y por lo tanto la realización de dos reacciones de SNaPshot para *NRAS*, se evaluó la posibilidad de separar algún otro de los cebadores que generase una señal baja en la reacción del SNaPshot inicial para poder mejorarlo. Según los experimentos anteriores (Figura 23 y 24) los picos en las posiciones 181 y 183 eran bajos (señal en pos.183 < señal pos.181 < 1000 UA). Dado que *NRAS* pos.181 y *NRAS* pos.183 poseen prácticamente la misma secuencia, podrían estar compitiendo por la unión al ADN (ver Figura 19).

Con el fin de mejorar las señales en las posiciones 181 y 183, se separó el cebador *NRAS* pos.183 del resto de los cebadores de SNaPshot. De esta forma, se juntaron *NRAS* pos.34 y *NRAS* pos.183 para eliminar el pico inespecífico en los controles negativos y aumentar las intensidades en las posiciones 181 y 183, respectivamente. De acuerdo a esto, se realizaron dos reacciones de SNaPshot para *NRAS* utilizando distintas mezclas de cebadores (mezcla 1: "mezcla global" sin *NRAS* pos.34 y *NRAS* pos.183; mezcla 2: cebadores *NRAS* pos.34 y *NRAS* pos.183) y se compararon las reacciones de controles positivos y negativos (Figura 25).

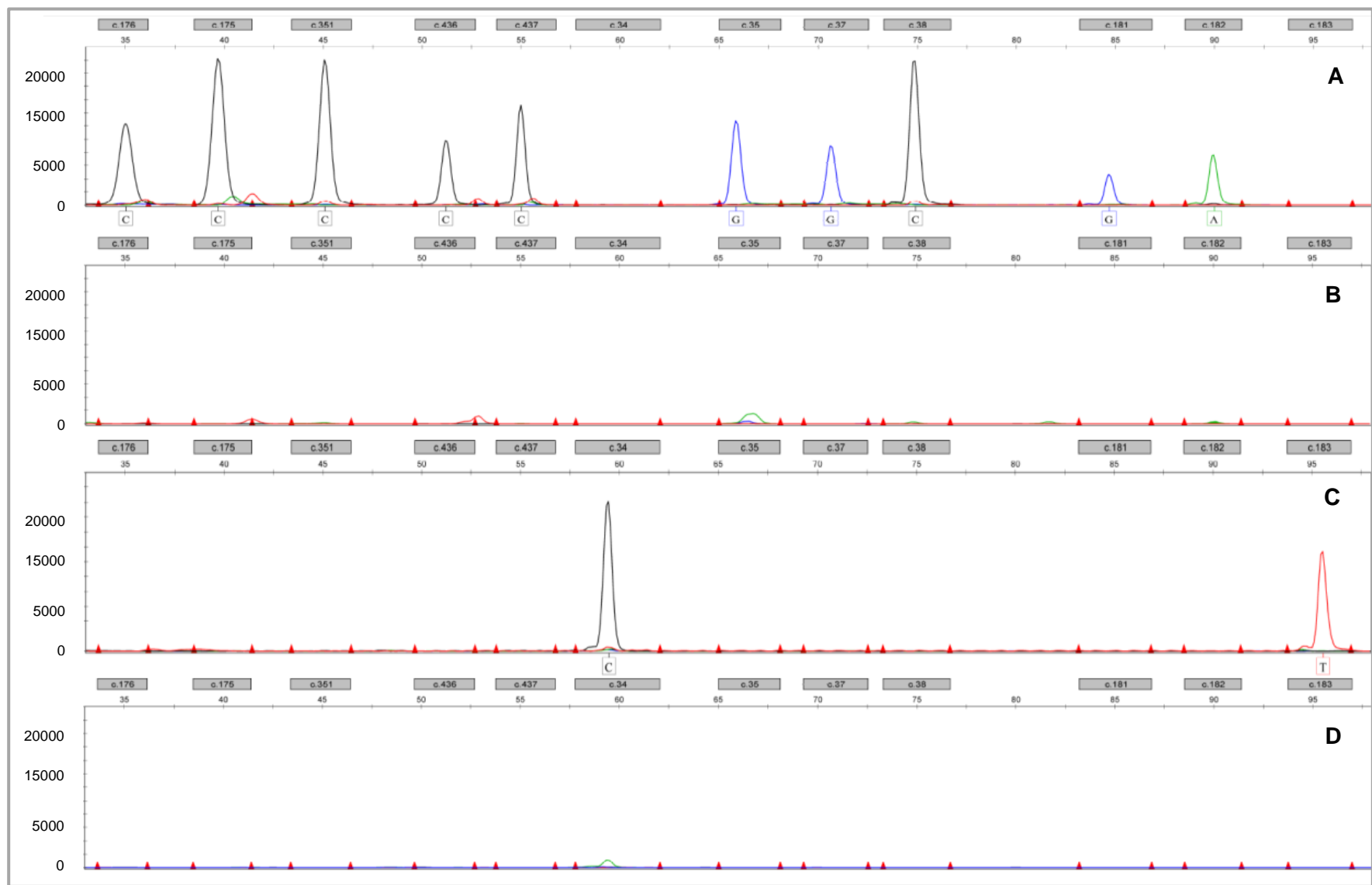


Figura 25: Reacción de SNaPshot para NRAS separando cebadores NRAS pos.34 y NRAS pos.183. (A) C+: “Mezcla global” sin NRAS pos.34 y NRAS pos.183, con ADN; (B) C-: “mezcla global” sin NRAS pos.34 y NRAS pos.183, sin ADN; (C) C+: cebadores NRAS pos.34 y NRAS pos.183, con ADN; (D) C-: cebadores NRAS pos.34 y NRAS pos.183, sin ADN.

En la Figura 25 se observa el resultado obtenido tras la separación de los cebadores para las posiciones 34 y 183 de *NRAS*. Tanto los controles positivos como los controles negativos se comportaron según lo esperado. Por un lado, la ausencia de interferencia en los controles negativos y por otro lado un aumento de señal en los picos para las posiciones 181 y 183. La intensidad en el pico de la posición 183 se vio aumentada en un factor mayor a 14 y la posición 181 aumentó la intensidad en un factor cercano a 5. Así la separación de *NRAS* pos.183 no sólo mejoró la intensidad del pico en la posición 183, sino que también provocó un claro aumento en la posición 181. Con este cambio en la reacción de SNaPshot para *NRAS* se logró un mayor equilibrio en la intensidad de todos los picos estudiados. Cabe destacar que para optimizar el uso de reactivos e instrumentos en la electroforesis capilar se decidió juntar las dos reacciones de SNaPshot en una relación 2:1 (“mezcla global” sin *NRAS* pos.34 y *NRAS* pos.183: cebadores *NRAS* pos.34 y *NRAS* pos.183) en los experimentos posteriores. Para ciertos cebadores se variaron las concentraciones finales con respecto al protocolo original (ver Anexo 2), específicamente para *NRAS* pos.37 (0,1uM), *NRAS* pos.181 (1uM), *NRAS* pos.183 (1uM) y *NRAS* pos.436 (1uM).

Una vez resuelto el problema con los cebadores de SNaPshot para *NRAS* se analizó el caso de *KRAS*. Para éste no se observaron picos inespecíficos en los controles negativos. Sin embargo, cuando se visualizaron los electroferogramas para muestras con ADN la intensidad de los picos era muy heterogénea, siendo las pos. 351, 436, 437 y 183 las de menor intensidad (Figura 26, parte de arriba). Siguiendo la misma estrategia que para *NRAS*, se decidió separar la reacción de SNaPshot en dos. Por un lado se agruparon los cebadores *KRAS* pos.436, *KRAS* pos.437 y *KRAS* pos.183, y por otro lado, se agrupó la “mezcla global” sin *KRAS* pos.436, *KRAS* pos.437 y *KRAS* pos.183. Para favorecer la señal de la posición 351 se subió al doble la concentración del cebador *KRAS* pos.351 en la “mezcla global”.

En la Figura 26 se muestra la diferencia entre un electroferograma previo a la separación de los cebadores y luego de la misma. Tras la experiencia con *NRAS* se preveía un mejor desempeño en la reacción de SNaPshot realizada con tres cebadores, por lo tanto, en este caso también se juntaron las reacciones de SNaPshot justo antes de realizar la electroforesis capilar. La relación utilizada fue 2:1 (2 volúmenes de “mezcla global” sin *KRAS* pos.436, *KRAS* pos.437 y *KRAS* pos.183: 1 volumen de cebadores *KRAS* pos.436, *KRAS* pos.437 y *KRAS* pos.183). Al igual que en *NRAS*, para ciertos cebadores se le variaron las concentraciones finales con respecto al protocolo original (ver Anexo 1), específicamente, para *KRAS* pos.436 (0,25uM), *KRAS* pos.437 (0,25uM), *KRAS* pos.175 (0,1uM), *KRAS* pos.176 (0,1uM) y *KRAS* pos.183 (0,2uM).

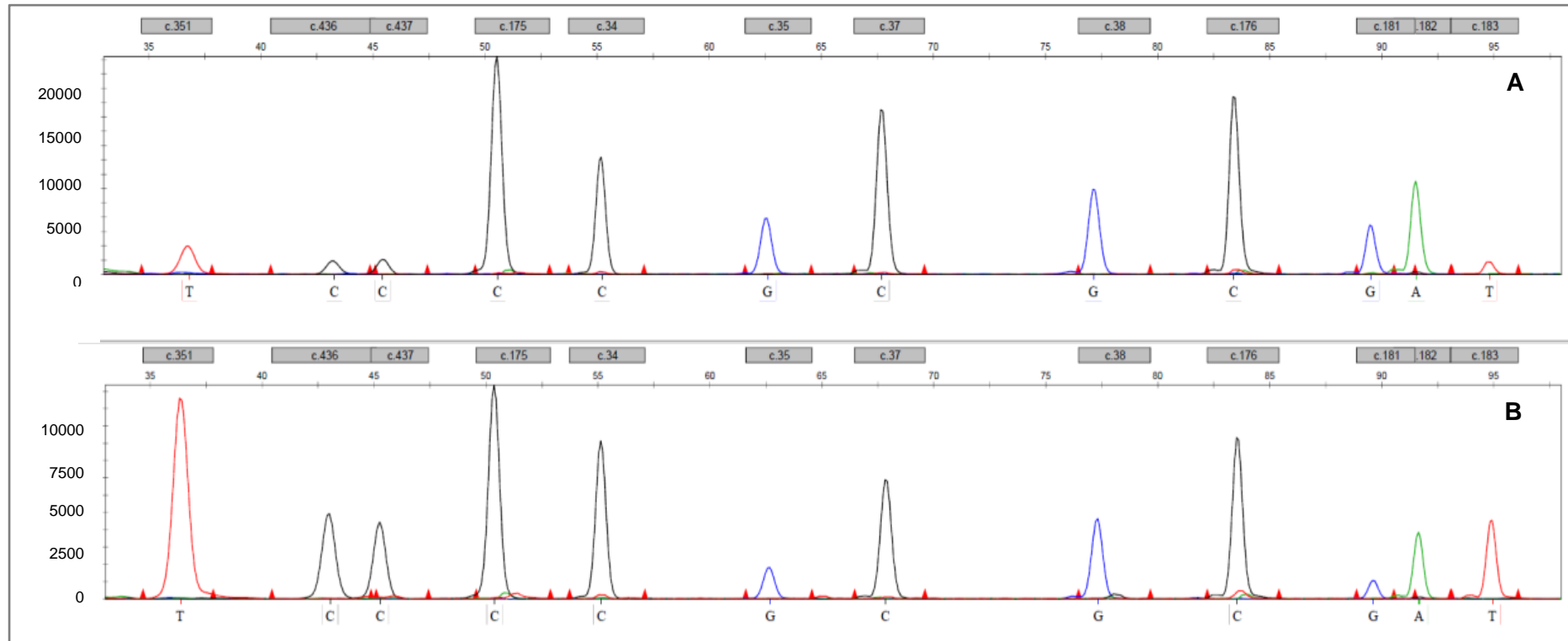


Figura 26: Electroferogramas de SNaPshot para KRAS antes y después de la separación de los cebadores KRAS pos.436, KRAS pos.437 y KRAS pos.183. (A) Reacción antes de separar los cebadores para las posiciones 436, 437 y 183; (B) reacción después de separar los cebadores para las posiciones 436, 437 y 183. En (B) las dos reacciones de SNaPshot se juntaron en una relación 2:1 (2 volúmenes de “mezcla global” sin KRAS pos.436, KRAS pos.437 y KRAS pos.183 : 1 volumen de cebadores KRAS pos.436, KRAS pos.437 y KRAS pos.183).

Los electroferogramas de la Figura 26 muestran un aumento significativo de la intensidad en las posiciones desfavorecidas. Por un lado, en las pos. 351 y pos. 436 se vio un aumento de la intensidad en un factor de 4. Por otro lado, las señales en la pos. 437 y pos. 183 mostraron un aumento de aproximadamente 3 veces. Además, tras la modificación en la reacción de SNaPshot para *KRAS* se logró una intensidad de picos más homogénea.

Tras estas pruebas se consideró finalizada la puesta a punto de la reacción de SNaPshot para *KRAS* y *NRAS*. Recapitulando, se eliminó la interferencia en la reacción de SNaPshot para *NRAS* debida al cebador *NRAS* pos.34 y se homogeneizó la intensidad de señal de los picos en los electroferogramas de SNaPshot para ambos genes.

4.1.5. Análisis de muestras provenientes de tejidos FFPE

4.1.5.1. Interferencias por actividad reducida de las enzimas en la purificación.

En determinadas muestras FFPE se observaron picos inespecíficos que interfirieron con la identificación de los picos en estudio. De acuerdo al perfil de las interferencias, era posible que las mismas se debieran a una actividad ineficiente de alguna de las enzimas utilizadas en la purificación, fosfatasa alcalina y/o exonucleasa I.

Una actividad reducida de la fosfatasa alcalina en la primera etapa de purificación tendría como consecuencia que los dNTPs remanentes de la PCR de exones estuvieran presentes en la reacción de SNaPshot. Estos dNTPs libres podrían competir con los ddNTPs marcados por su unión a los 3'OH libres de los cebadores de SNaPshot. Esto provocaría que la incorporación de los ddNTPs marcados no fuera únicamente a continuación del cebador de SNaPshot (posición en estudio) sino en posiciones posteriores a ésta. A continuación se presentan dos ejemplos de muestras con interferencia probablemente debidas a una actividad ineficiente de la fosfatasa alcalina (Figura 27).

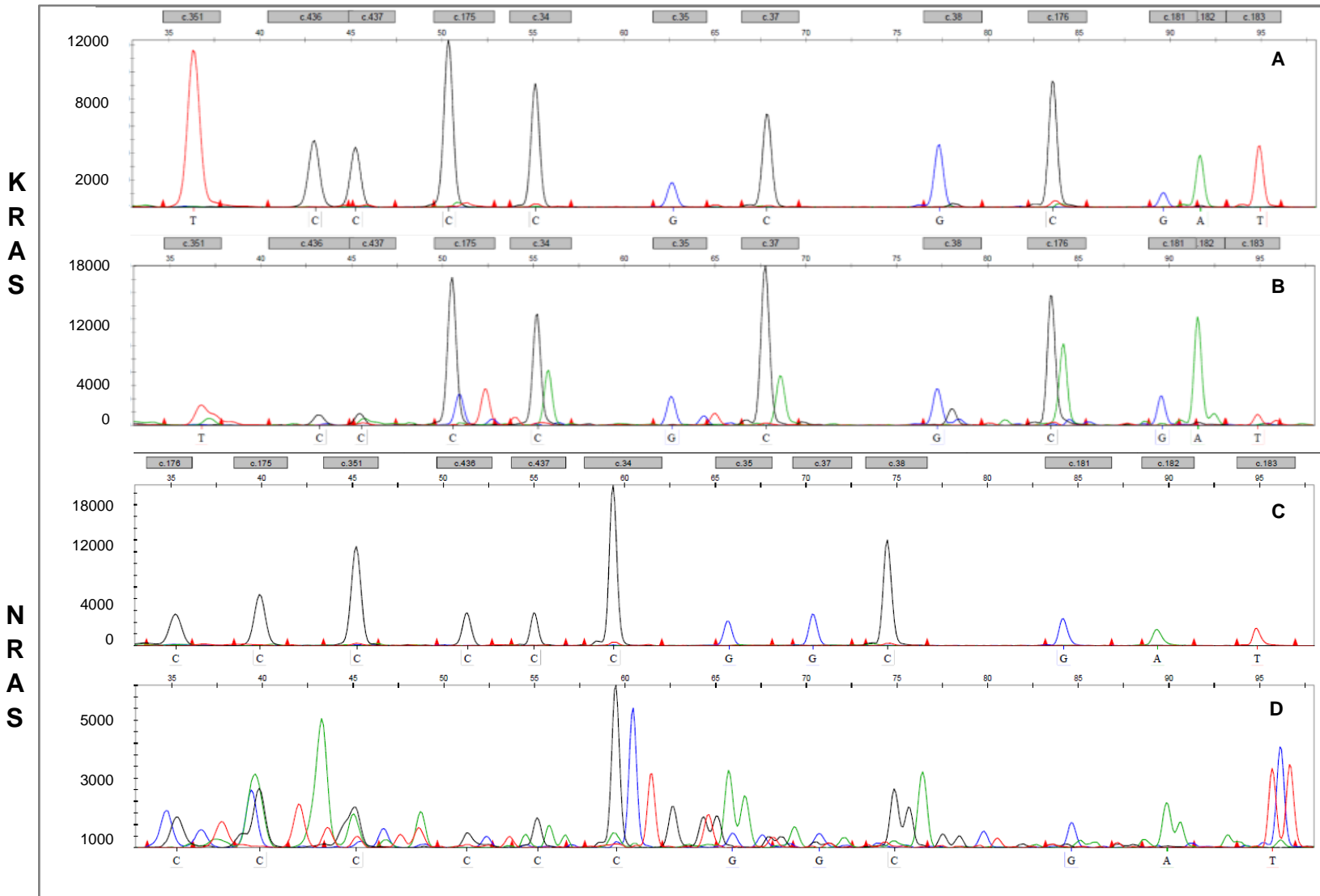


Figura 27: Ineficiente actividad de la enzima fosfatasa alcalina durante la 1^{era} etapa de purificación en muestras de KRAS y NRAS. (A) Electroferograma de muestra KRAS con actividad enzimática eficiente; (B) Electroferograma de muestra KRAS con ineficiente actividad enzimática; (C) Electroferograma de muestra NRAS con actividad enzimática eficiente; (D) Electroferograma de muestra NRAS con ineficiente actividad enzimática.

Para entender la hipótesis planteada, se tomó un ejemplo de interferencia en la posición 34 de *NRAS*. En la Figura 28 se comparan dos muestras, la primera con una adecuada actividad de la fosfatasa alcalina (Fig. 28A) y la segunda con una actividad reducida de la misma (Fig. 28B). En la Figura 28A el pico correspondiente a la posición 34 de *NRAS* (sexto pico en la Fig. 27C) fue una Citosina. Sin embargo, en la Figura 28B, más allá de que se observa dicho pico, a continuación aparecen picos inespecíficos que son consecuencia de la incorporación de dNTPs y ddNTPs en las bases contiguas a la posición estudiada. Como se ve en la Figura 28C los nucleótidos siguientes a la posición 34, siguiendo el sentido del cebador *NRAS* pos.34, son **T G C** (ver Figura 28C) y son éstos los que se visualizan en el electroferograma cuando la actividad de la fosfatasa alcalina no es total. Si se observa atentamente la Figura 28C, se puede ver que la **T** (posición 33) a continuación de la posición 34 aparece después de la **G** esperada para la posición 32. La aparición de los picos no se corresponde a la secuencia lineal del ADN. Esto es debido a la diferencia de peso molecular entre los fluorocromos acoplados a los diferentes ddNTPs, que generan un corrimiento en la migración. La **T**, cuyo fluoróforo es el de mayor tamaño (635Da) apareció después que la **G**, la cual tiene el fluoróforo de menor tamaño (366Da). En cuanto a la **C**, sale en la 4^{ta} posición según lo esperado (más detallado en la Tabla 9).

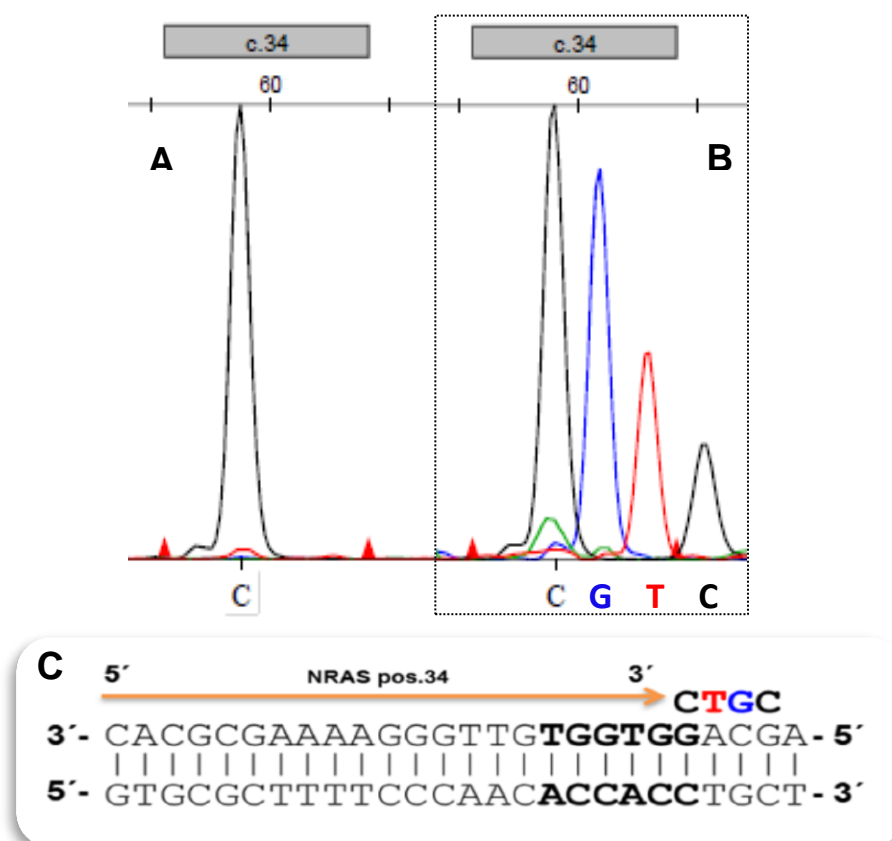


Figura 28: Ineficiencia de la actividad de la fosfatasa alcalina en la 1^{era} etapa de purificación. (A) Electroferograma correspondiente a la posición 34 de *NRAS* tras un correcto funcionamiento de la fosfatasa alcalina; (B) Electroferograma correspondiente a la posición 34 de *NRAS* tras una actividad ineficiente de la fosfatasa alcalina; (A y B) Ampliación de la Figura 27 C y D. (C) Secuencia del exón 2 de *NRAS* que comprende la zona de hibridación del cebador *NRAS* pos.34 y posiciones posteriores al extremo 3' de dicho cebador. La **T** corresponde a la posición 33, la **G** a la posición 32 y la **C** a la posición 31.

Según el protocolo del fabricante de la fosfatasa alcalina, la enzima trabaja adecuadamente si se la incuba a 37°C por 10 minutos. Al comienzo del trabajo se siguió este protocolo, sin embargo, debido a la presencia de picos inespecíficos en los electroferogramas se decidió aumentar el tiempo de incubación a una hora, logrando un mejor rendimiento de la enzima.

Para poder identificar posibles interferencias en caso de una actividad reducida de la fosfatasa alcalina, se realizó un estudio teórico de las posiciones de todas las mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS*. Dicho estudio permitió diferenciar señales debidas a mutaciones de las señales procedentes de la incorporación de ddNTPs marcados en posiciones posteriores a las estudiadas. En la Tabla 9 se muestra el estudio para el gen *NRAS* (una tabla análoga para el gen *KRAS* se encuentra en el Anexo 5 donde se especifican los nucleótidos esperados en cada posición, las posibles mutaciones que se pueden encontrar en cada una de ellas y se indican los tres nucleótidos siguientes a dicha posición en el gen. Éstos últimos son los que podrían interferir en la lectura del electroferograma ya que pueden aparecer en una posición muy próxima a la de las mutaciones.

Tabla 9: Estudio de posiciones de *NRAS* para mutaciones e interferencias. Las letras subrayadas representan las posibles interferencias en los picos del electroferograma.

POSICIÓN	Nucleótido esperado (WT)	Posibles mutaciones (subrayada la mutación coincidente con la posible interferencia)	Los tres nucleótidos siguientes a la posición estudiada en la secuencia de <i>NRAS</i> : posibles interferencias.
<i>NRAS</i> pos.176	C	<u>G</u>	T <u>G</u> G
<i>NRAS</i> pos.175	C	<u>I</u>	<u>I</u> G T
<i>NRAS</i> pos.351	C	<u>G / A</u>	T T G
<i>NRAS</i> pos.436	C	<u>I / G</u>	<u>I</u> G A
<i>NRAS</i> pos.437	C	<u>T</u>	C A A
<i>NRAS</i> pos.34	C	<u>T / G / A</u>	<u>I</u> G C
<i>NRAS</i> pos.35	G	<u>I / C / A</u>	<u>I</u> G G
<i>NRAS</i> pos.37	G	<u>C / A / T</u>	G T G
<i>NRAS</i> pos.38	C	<u>G / A / T</u>	C A C
<i>NRAS</i> pos.181	G	<u>I / C</u>	<u>I</u> C C
<i>NRAS</i> pos.182	A	<u>C / G / T</u>	A G A
<i>NRAS</i> pos.183	T	<u>A / G / C</u>	T G T

Ubicación relativa de picos mutados, según sea el tamaño (Da) del correspondiente fluoróforo:

A (479) x C (430) = desplazado 0,10 dNMP a la izquierda
A (479) x G (366) = desplazado 0,34 dNMP a la izquierda
A (479) x T (635) = desplazado 0,50 dNMP a la derecha
C (430) x A (479) = desplazado 0,15 dNMP a la derecha
C (430) x G (366) = desplazado 0,20 dNMP a la izquierda
C (430) x T (635) = desplazado 0,60 dNMP a la derecha
G (366) x A (479) = desplazado 0,30 dNMP a la derecha
G (366) x C (430) = desplazado 0,20 dNMP a la derecha
G (366) x T (635) = desplazado 0,80 dNMP a la derecha
T (635) x A (479) = desplazado 0,50 dNMP a la izquierda
T (635) x C (430) = desplazado 0,60 dNMP a la izquierda
T (635) x G (366) = desplazado 0,80 dNMP a la izquierda

A partir de esta Tabla 9 se puede deducir que los casos con probabilidad de interferir en el diagnóstico son aquellos donde la ubicación del pico procedente de una mutación coincide con un pico generado por la incorporación de un ddNTP en una posición contigua a la estudiada. Si se toma como ejemplo la posición 34 de *NRAS* (ver Figura 28B y Tabla 9) se observa que si dicha posición estuviera mutada **C** por **T** (mutación: c.34G>A p.Gly12Ser, según nomenclatura de mutaciones, Anexo 6), la **T** estaría desplazada 0,6 dNMP a la derecha de la Citosina. En cambio, si la **T** correspondiera a la señal de un dd**T**TP en la posición 33 del exón 2 de *NRAS*, aparecería con un desplazamiento de 1,6 dNMPs a la derecha (ver Figura 28B): el equivalente a un 1 dNMP por encontrarse en la posición + 1 y 0,6 dNMP por el desplazamiento provocado por el tamaño del fluoróforo.

La exonucleasa I, segunda enzima utilizada en la primera purificación, puede presentar una actividad ineficiente, provocando señal inespecífica al comienzo de la electroforesis capilar. En el transcurso de este trabajo, se observaron problemas con ésta enzima. En la Figura 29 se ejemplifica un caso de una muestra de *KRAS* donde aparecieron picos inespecíficos al comienzo del electroferograma.

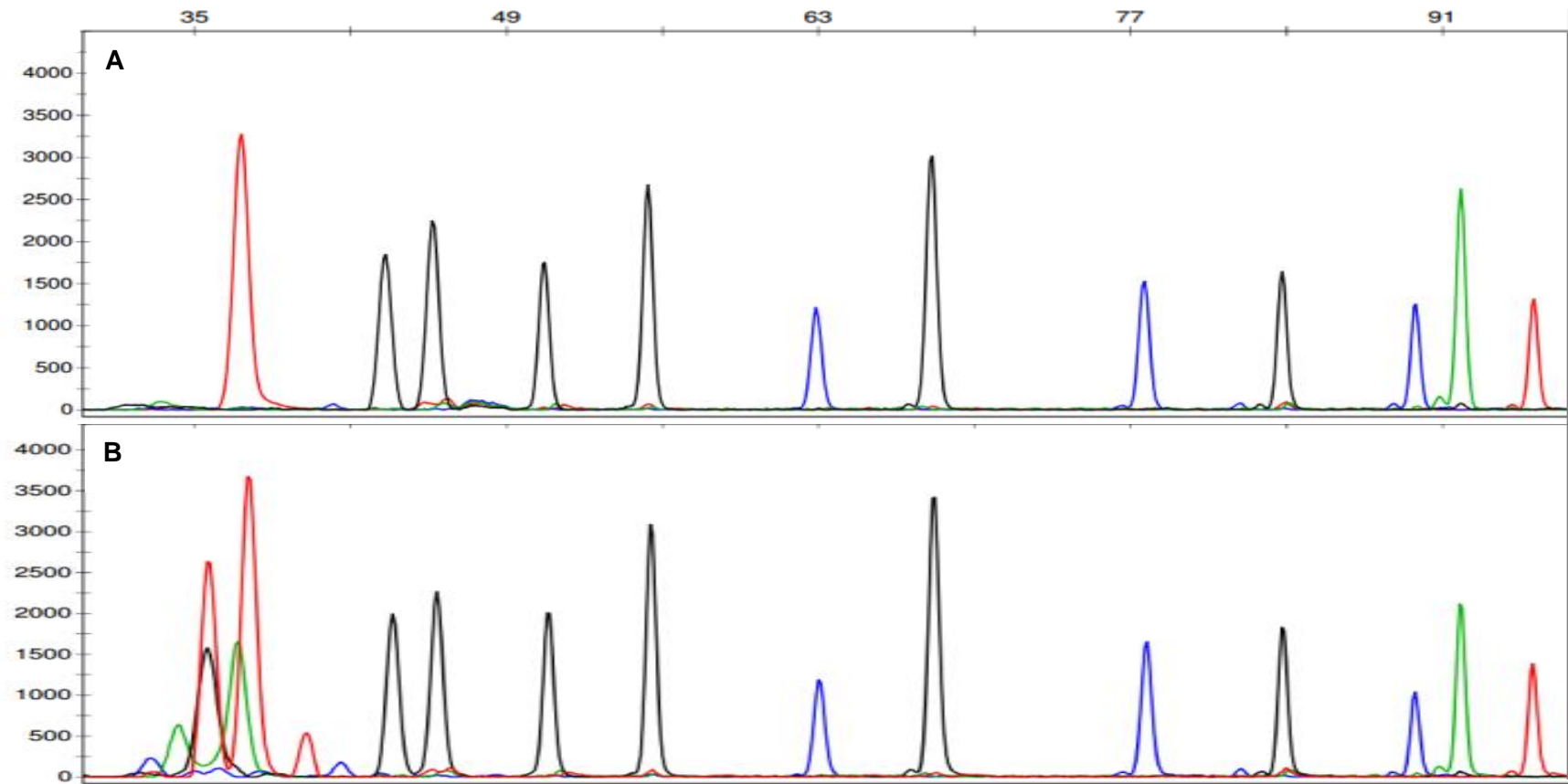


Figura 29: Funcionamiento deficiente de la exonucleasa I. (A) control positivo de KRAS; (B) muestra de KRAS con picos inespecíficos al comienzo del electroferograma.

En la Figura 29 se comparan dos electroferogramas, una muestra con presencia de picos inespecíficos al comienzo del electroferograma (Fig.29B) y un control (Fig.29A). Los picos inespecíficos poseían un tamaño inferior al del cebador *KRAS pos.351* (26nt). Probablemente la causa de la aparición de estos picos haya sido una actividad deficiente de la exonucleasa I, no habiendo eliminado correctamente los cebadores de la PCR de exones. Como consecuencia los cebadores pudieron haberse hibridado al producto de la PCR de exones y haber servido como cebo para la incorporación de ddNTPs marcados de la reacción de SNaPshot.

Para solucionar el problema con la exonucleasa I, se estableció utilizar la cantidad de enzima y condiciones especificadas por el fabricante (*Thermo Scientific*) (ver ítem 0.1), en contraposición al protocolo original donde se utilizaba una menor cantidad de enzima (ver Anexo 1). Tras este cambio en el protocolo no se volvió a observar el fenómeno descrito anteriormente.

4.1.5.2. Muestras analizadas mediante el programa Gene Mapper®

A continuación se muestran ejemplos de resultados de la técnica de SNaPshot para muestras FFPE tras haber incorporado todas las modificaciones presentadas en los ítems anteriores.

En el análisis de los resultados, se utilizó un método objetivo que consistió en un panel realizado con el programa Gene Mapper®. Se consideró ventajosa la utilización de este método frente a la observación manual de los electroferogramas, ya que este último depende de la experiencia y capacidad observadora del operador. Con éste se pudo determinar si un pico correspondía a una mutación o no, según fueran la base y la posición esperadas. En la Figura 30 se presenta un ejemplo de electroferogramas utilizando el panel para el estudio de mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS*.

La Figura 30 presenta dos ejemplos de muestras de pacientes con mCRC que poseían mutaciones en los genes *KRAS* o *NRAS*. En la Figura 30A la mutación hallada fue c.34G>A p.Gly12Ser en el gen *KRAS* y en la Figura 30B la mutación fue c.183A>C p.Gln61His en el gen *NRAS* (ver código de nomenclatura en Anexo 6).

Lo que se observa en la Figura 30 coincide con lo presentado en la Tabla 9 y Anexo 5 en cuanto a la posición de la mutación con respecto al alelo WT. Para el caso de *KRAS* (Figura 30A), el pico correspondiente a la mutación, "T-mut", se encuentra desplazado 0,6 dNMP aprox. a la derecha del pico WT, C. En cuanto a *NRAS* (Figura 30B), el pico correspondiente a la mutación, "G-mut", se encuentra desplazado 0,8 dNMP aprox. a la izquierda del pico WT, T. En ambos casos se ven claramente las mutaciones junto a los picos WT. La presencia de dos picos para una misma posición resalta el hecho de que en este trabajo se analizan mutaciones somáticas y no germinales, ya que provienen de tejido tumoral con presencia de células WT y células mutadas.

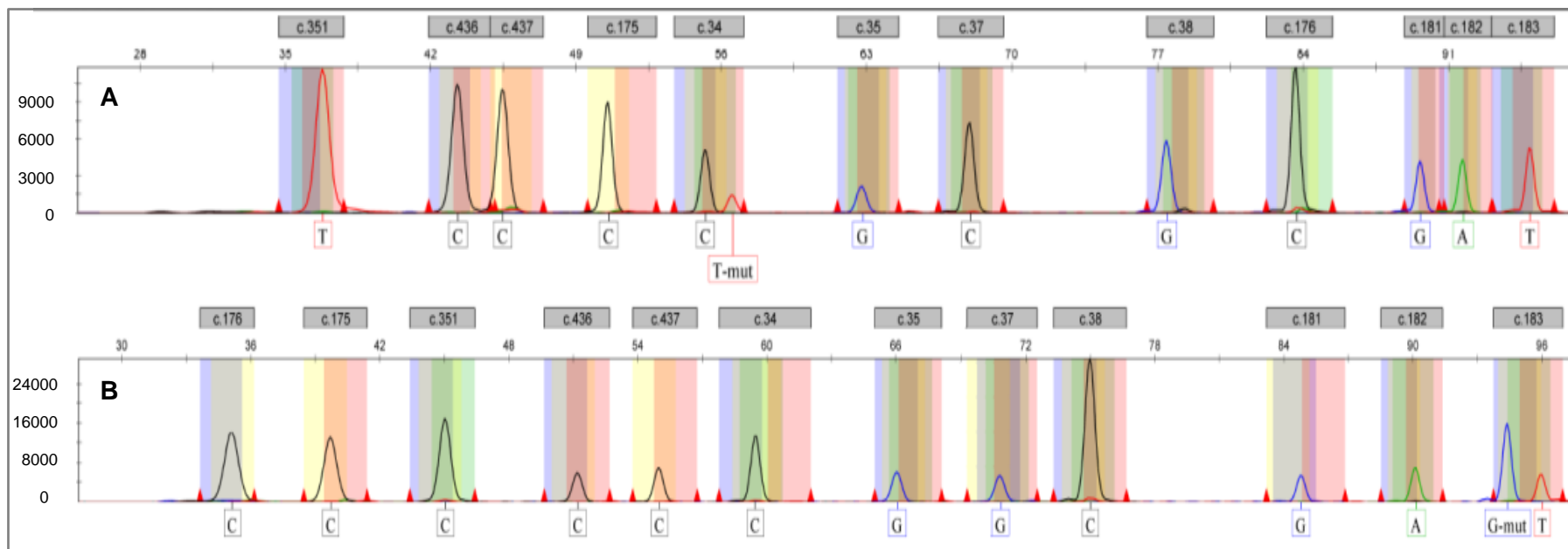


Figura 30: Electroferogramas de muestras analizadas mediante el programa Gene Mapper®. (A) Muestra con mutación en el gen KRAS correspondiente a c.34G>A p.Gly12Ser; (B) muestra con mutación en el gen NRAS correspondiente a c.183A>C p.Gln61His. Nótese que en los electroferogramas las bases para la posición 34 de KRAS y la posición 183 de NRAS detectadas corresponden a las bases complementarias de dichas posiciones en los genes, debido a la orientación antisentido de los cebadores KRAS pos.34 y NRAS pos.183.

4.2. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE SNAPSHOT

Lo estudiado en la sección anterior del trabajo, puesta a punto de la técnica de SNaPshot, permitió evaluar las diferentes etapas de la técnica y optimizar las condiciones de trabajo. Sin embargo, para utilizar la técnica en el diagnóstico de pacientes con mCRC se tuvieron que definir ciertos parámetros y límites dentro de los cuales debían encontrarse los resultados para ser confiables. Por ejemplo, determinar la señal base por encima de la cual se pueda distinguir una señal específica de un ruido de fondo; saber en qué porcentaje es posible detectar una mutación; o definir cuan robusta es la técnica en comparación con otras técnicas de referencia. Todos estos conceptos se encuentran comprendidos en lo que se conoce como validación.

La validación de un procedimiento analítico se realiza para demostrar que un procedimiento es adecuado para su propósito (49). Según la ISO 9000 (50), la validación se define como “la confirmación, a través de la presentación de pruebas objetivas, de que los requisitos para un uso o aplicación específica prevista se han cumplido”. La normativa internacional solicita que se realice para los productos de diagnóstico *in vitro* con el propósito de asegurar sus resultados y, por lo tanto, las decisiones terapéuticas que se tomen en base a ellos.

Para validar la técnica de SNaPshot, los parámetros evaluados fueron: límite de detección, especificidad, precisión y exactitud (o desempeño).

4.2.1. Límite de detección de la técnica de SNaPshot

El límite de detección (LD) permite determinar la cantidad mínima de analito que se puede detectar en una muestra, aunque no necesariamente cuantificar como un valor exacto. Se define como la mínima cantidad de analito que se distingue estadísticamente (el intervalo de confianza se establece generalmente en 95%) del ruido de fondo (control negativo) (49,51,52). En este trabajo se estableció el LD específicamente para las mutaciones estudiadas, partiendo de la base de que se trabajó en condiciones donde se detecta el alelo WT. Para poder determinar el LD se debe establecer previamente el límite del blanco (LB). Este último se define como la mayor medida detectada con cierta probabilidad en una muestra blanco (control negativo) (51).

Con el propósito de determinar el LB, se analizaron 50 controles negativos de *KRAS* y 50 controles negativos de *NRAS*. De cada uno de ellos se obtuvo la señal en la electroforesis capilar para cada fluoróforo. Para cada gen se calculó la señal promedio de los 50 controles negativos y su desvío estándar (SD). En este trabajo, se definió el LB como el ruido promedio de las 50 muestras más 3 SD para poder trabajar con un intervalo de confianza mayor a 99%. En el Anexo 7 se muestran los valores de ruido de fondo para cada fluoróforo según fuera *KRAS* o *NRAS*. Para el análisis de las muestras se tomó como **LB para *KRAS* un valor de 55 RFU** correspondiente al fluoróforo con mayor

ruido de fondo (R6G). De forma análoga se determinó el **LB de NRAS en 118 RFU**, determinado según los valores de R6G.

Una vez establecido el LB se pudo determinar el LD. Conocer el LB permitió diferenciar el ruido proveniente de una señal específica del ruido de fondo. Para definir el LD equivalente al porcentaje mínimo de una mutación en una muestra, se estudiaron ADNs mutados de referencia para *KRAS* y *NRAS*, adquiridos en la empresa *Horizon Diagnostic* (ver ítem 3.2). El estudio consistió en el análisis por triplicado de diferentes muestras con porcentajes variables de ADN mutado: 12,5%, 6,25% y 3,125% (porcentaje de alelo mutado con respecto a alelo WT). Se determinó el LD para cada una de las mutaciones por separado. El valor asignado para cada LD corresponde al mínimo porcentaje de mutación detectada en cada una de las tres réplicas analizadas. Los resultados del LD se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: LD para distintas mutaciones en *KRAS* y *NRAS*. Se realizó el ensayo por triplicado y se estableció el LD para cada mutación como el mínimo porcentaje de mutación para el cual en todas las réplicas analizadas se detectó la mutación.

Catálogo	Gen	Mutación	LD SNaPshot
HD378	<i>KRAS</i>	c.34G>A p.Gly12Ser	12,5%
HD379	<i>KRAS</i>	c.34G>C p.Gly12Arg	6,25%
HD380	<i>KRAS</i>	c.34G>T p.Gly12Cys	6,25%
HD374	<i>KRAS</i>	c.35G>A p.Gly12Asp	12,5%
HD376	<i>KRAS</i>	c.35G>C p.Gly12Ala	6,25%
HD377	<i>KRAS</i>	c.35G>T p.Gly12Val	12,5 %
HD375	<i>KRAS</i>	c.38G>A p.Gly13Asp	12,5%
HD632	<i>KRAS</i>	c.183A>C p.Gln61His	12,5%
HD411	<i>KRAS</i>	c.436G>A p.Ala146Thr	12,5%
HD190	<i>NRAS</i>	c.35G>T p.Gly12Val	6,25%
HD539	<i>NRAS</i>	c.181C>A p.Gln61Lys	6,25%
HD534	<i>NRAS</i>	c.182A>G p.Gln61Arg	12,5%
HD524	<i>NRAS</i>	c.182A>T p.Gln61Leu	12,5%
HD529	<i>NRAS</i>	c.183A>T p.Gln61His	12,5%

* Para todos los casos, la cantidad de ADN genómico utilizado fue de 0,1ng.

En este trabajo se evaluaron los LD para las mutaciones indicadas en la Tabla 10. Cabe destacar que no existe en el mercado ADN de referencia para las otras mutaciones en *KRAS* y *NRAS* estudiadas en este trabajo. Según los resultados de la Tabla 10, los LD estuvieron entre 6,25% y 12,5%. Extrapolando los valores obtenidos a otras mutaciones, se estableció como **LD para la técnica de SNaPshot un valor de 12,5%** (correspondiente al mayor valor detectado).

4.2.2. Especificidad de la técnica de SNaPshot

La especificidad se define como la capacidad de evaluar solamente el analito blanco en presencia de componentes que se espera que se encuentren en la muestra (impurezas, degradantes, matriz, etc.). Para laboratorios de genética molecular, se define como la capacidad de un ensayo de distinguir la secuencia blanco, alelo o mutación, de otras secuencias o alelos presentes en la muestra analizada (49,53).

Para determinar la especificidad de la técnica de SNaPshot se evaluaron diez ADNs de referencia para *KRAS* y seis para *NRAS*, adquiridos en la empresa Horizon Diagnostic (ver ítem 3.2). Dado que cada uno de dichos ADNs contiene una mutación puntual, se pudo evaluar la especificidad de la técnica verificando que la misma lograra detectar cada una de las mutaciones específicamente. Por lo tanto, se evaluaron con la técnica de SNaPshot los 10 ADNs y se comparó la obtención de los resultados esperados, ya sea WT o la mutación puntual correspondiente. Para cada uno de los ADNs de referencia la técnica de SNaPshot detectó específicamente la mutación presente, cualquiera fuera el porcentaje de éste (12%, 6,25% o 3,125%). Por lo tanto, **la especificidad de la técnica de SNaPshot fue del 100%**.

4.2.3. Precisión de la técnica de SNaPshot

La precisión de un procedimiento analítico expresa la proximidad (grado de dispersión) o consistencia entre los resultados obtenidos tras una serie de medidas (muestreo múltiple) de una misma muestra homogénea (49). Para este caso en la técnica de SNaPshot la precisión se consideró a nivel de repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad es la concordancia entre los resultados de ensayos independientes realizados bajo las mismas condiciones operativas (la misma muestra, analizadas por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y en diferentes días) (49,52-54). Mientras que la reproducibilidad se considera la concordancia entre resultados obtenidos en ensayos independientes, realizados sobre la misma muestra en diferentes laboratorios (49,52,54).

4.2.3.1. Repetibilidad de la técnica de SNaPshot

Para evaluar la repetibilidad de la técnica de SNaPshot se analizaron 40 ADNs extraídos de muestras de tejido tumoral en tacos de parafina (FFPE) de pacientes con mCRC. Dichos ADNs fueron evaluados en tres días diferentes por el mismo analista y en el mismo laboratorio para poder compararlos y determinar la concordancia entre los resultados. En la Tabla 11 se detallan los resultados obtenidos para las 40 muestras.

Al observar la Tabla 11 se aprecia que en todos los casos estudiados los resultados obtenidos en las tres réplicas fueron idénticos. De las 40 muestras analizadas, 22 muestras fueron WT y otras 18 mutadas para el gen *KRAS*, y 39 muestras fueron WT y 1 mutada para el gen *NRAS*. Dada la concordancia entre las tres réplicas de las 40 muestras analizadas, se consideró que la **repetibilidad fue del 100%** tanto para la detección de mutaciones en el gen *KRAS* como para la detección de mutaciones en el gen *NRAS*.

Tabla 11: Repetibilidad. Análisis de 40 muestras de tejidos FFPE en el Laboratorio Genia Uruguay.

Muestra	SNaPshot réplica 1		SNaPshot réplica 2		SNaPshot réplica 3	
	KRAS	NRAS	KRAS	NRAS	KRAS	NRAS
1	WT	WT	WT	WT	WT	WT
2	WT	WT	WT	WT	WT	WT
3	WT	WT	WT	WT	WT	WT
4	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5	WT	WT	WT	WT	WT	WT
6	WT	WT	WT	WT	WT	WT
7	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT
8	WT	WT	WT	WT	WT	WT
9	WT	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His
10	WT	WT	WT	WT	WT	WT
11	WT	WT	WT	WT	WT	WT
12	c.437C>T p.Ala146Val	WT	c.437C>T p.Ala146Val	WT	c.437C>T p.Ala146Val	WT
13	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT
14	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT
15	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT
16	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT
17	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
18	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
19	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His	WT
20	WT	WT	WT	WT	WT	WT
21	WT	WT	WT	WT	WT	WT
22	WT	WT	WT	WT	WT	WT
23	WT	WT	WT	WT	WT	WT
24	WT	WT	WT	WT	WT	WT
25	c.34G>A p.Gly12Ser	WT	c.34G>A p.Gly12Ser	WT	c.34G>A p.Gly12Ser	WT
26	WT	WT	WT	WT	WT	WT
27	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT
28	WT	WT	WT	WT	WT	WT
29	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT
30	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT
31	WT	WT	WT	WT	WT	WT
32	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
33	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
34	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
35	WT	WT	WT	WT	WT	WT
36	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
37	WT	WT	WT	WT	WT	WT
38	WT	WT	WT	WT	WT	WT
39	WT	WT	WT	WT	WT	WT
40	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT

4.2.3.2. Reproducibilidad de la técnica de SNaPshot

Para evaluar la reproducibilidad de la técnica de SNaPshot se analizaron las mismas 40 muestras de ADN que para la repetibilidad, pero en este caso el análisis realizado fue en dos laboratorios diferentes: Genia Uruguay y Genia Argentina.

Como se observa en la Tabla 12, hubo concordancia entre los resultados obtenidos por el Laboratorio Genia Uruguay y aquellos obtenidos en el Laboratorio Genia Argentina, tanto para las mutaciones en el gen *KRAS* como para aquellos en el gen *NRAS*. Por lo tanto se consideró que la **reproducibilidad fue del 100%**.

Los resultados obtenidos por el Laboratorio Genia Argentina fueron gentilmente cedidos por los miembros de dicho laboratorio.

Tabla 12: Reproducibilidad. Análisis de 40 muestras de tejidos FFPE en: Genia Uruguay (Laboratorio 1) y Genia Argentina (Laboratorio 2).

Muestra	SNaPshot Laboratorio 1		SNaPshot Laboratorio 2	
	KRAS	NRAS	KRAS	NRAS
1	WT	WT	WT	WT
2	WT	WT	WT	WT
3	WT	WT	WT	WT
4	WT	WT	WT	WT
5	WT	WT	WT	WT
6	WT	WT	WT	WT
7	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT
8	WT	WT	WT	WT
9	WT	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His
10	WT	WT	WT	WT
11	WT	WT	WT	WT
12	c.437C>T p.Ala146Val	WT	c.437C>T p.Ala146Val	WT
13	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT
14	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT
15	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT
16	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT
17	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
18	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
19	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His	WT
20	WT	WT	WT	WT
21	WT	WT	WT	WT
22	WT	WT	WT	WT
23	WT	WT	WT	WT
24	WT	WT	WT	WT
25	c.34G>A p.Gly12Ser	WT	c.34G>A p.Gly12Ser	WT
26	WT	WT	WT	WT
27	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT
28	WT	WT	WT	WT
29	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT
30	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT
31	WT	WT	WT	WT
32	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
33	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
34	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
35	WT	WT	WT	WT
36	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT
37	WT	WT	WT	WT
38	WT	WT	WT	WT
39	WT	WT	WT	WT
40	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT

4.2.4. Exactitud (o desempeño) de la técnica de SNaPshot

La exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre el valor aceptado como verdadero (o el valor de una referencia) y el valor hallado al realizar el ensayo. Para el caso de la técnica de SNaPshot, cuyos resultados son cualitativos, se determinó la concordancia entre los resultados positivos o negativos de la técnica con los resultados considerados verdaderos según la técnica de referencia o valores de ADN de referencia. La exactitud se expresa como la concordancia de positivos (%) y concordancia de negativos (%) (49,51,52).

4.2.4.1. Comparación con técnicas de referencia

Se analizaron 88 muestras de pacientes con mCRC por la técnica de SNaPshot y se comparó con: 1) método de secuenciación masiva NGS (Next Generation Sequencing); 2) método de secuenciación de Sanger; o 3) método de *Real time* (Kit *Real time* previamente validado por el laboratorio Genia Uruguay). La Tabla 13 muestra los resultados de las cuatro técnicas comparadas.

Tabla 13: Exactitud. Comparación de los resultados obtenidos para 88 muestras por la técnica de SNaPshot, NGS, Sanger o kit de Real time.

Código de muestras	SNaPshot		NGS		Sanger	Kit Real time
	KRAS	NRAS	KRAS	NRAS	KRAS	KRAS
1	WT	WT	WT	WT		WT
2	WT	WT	WT	WT		WT
3	WT	WT	WT	WT		WT
4	WT	WT	WT	WT		WT
5	WT	WT	WT	WT		WT
6	WT	WT	WT	WT		WT
7	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	c.34G>T p.Gly12Cys
8	WT	WT	WT	WT		WT
9	WT	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His		WT
10	WT	WT	WT	WT		WT
11	WT	WT	WT	WT		WT
12	c.437C>T p.Ala146Val	WT	c.437C>T p.Ala146Val	WT		WT
13	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	c.34G>T p.Gly12Cys
14	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	c.35G>A p.Gly12Asp
15	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	c.35G>A p.Gly12Asp
16	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	c.35G>A p.Gly12Asp
17	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	c.38G>A p.Gly13Asp
18	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	c.38G>A p.Gly13Asp
19	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His	c.38G>A p.Gly13Asp
20	WT	WT	WT	WT		WT
21	WT	WT	WT	WT		WT
22	WT	WT	WT	WT		WT
23	WT	WT	WT	WT		WT
24	WT	WT	WT	WT		WT
25	c.34G>A p.Gly12Ser	WT	c.34G>A p.Gly12Ser	WT	c.34G>A p.Gly12Ser	c.34G>A p.Gly12Ser
26	WT	WT	WT	WT		WT
27	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	c.35G>A p.Gly12Asp
28	WT	WT	WT	WT		WT
29	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	c.35G>T p.Gly12Val
30	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	c.35G>T p.Gly12Val
31	WT	WT	WT	WT		WT
32	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	c.38G>A p.Gly13Asp
33	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	c.38G>A p.Gly13Asp
34	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	c.38G>A p.Gly13Asp
35	WT	WT	c.436G>A p.Ala146Thr (freq. 8,9%)	WT		WT
36	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	WT	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	c.38G>A p.Gly13Asp
37	WT	WT	WT	WT		WT
38	WT	WT	c.38G>A p.Gly13Asp (freq. 10%)	WT		WT
39	WT	WT	WT	WT		WT
40	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	c.38G>A p.Gly13Asp
41	c.436G>A p.Ala146Thr	WT	c.436G>A p.Ala146Thr	WT	c.436G>A p.Ala146Thr	WT
42	WT	c.182A>T p.Gln61Leu	WT	c.182A>T p.Gln61Leu		WT
43	c.37G>T p.Gly13Cys	WT	c.37G>T p.Gly13Cys	WT		WT
44	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	c.34G>T p.Gly12Cys
45	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT		WT
46	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	c.35G>T p.Gly12Val
47	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	c.35G>A p.Gly12Asp
48	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	c.35G>T p.Gly12Val
49	WT	WT	WT	WT		WT
50	WT	WT	WT	WT		WT
51	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	c.34G>T p.Gly12Cys
52	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	c.35G>T p.Gly12Val
53	WT	WT	WT	WT		WT
54	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT		c.35G>A p.Gly12Asp
55	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	c.35G>A p.Gly12Asp
56	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	c.34G>T p.Gly12Cys	WT		c.34G>T p.Gly12Cys
57	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	WT	WT		c.35G>A p.Gly12Asp
58	WT	WT	WT	WT		WT
59	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT		c.38G>A p.Gly13Asp
60	c.34G>A p.Gly12Ser	WT	c.34G>A p.Gly12Ser	WT		c.34G>A p.Gly12Ser
61	WT	WT	WT	WT		WT
62	WT	WT	WT	WT		WT
63	WT	WT	WT	WT		WT
64	WT	c.181C>A p.Gln61Lys	WT	c.181C>A p.Gln61Lys		WT
65	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT		c.35G>T p.Gly12Val
66	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT		c.35G>A p.Gly12Asp
67	c.34G>T p.Gly12Cys	WT	WT	WT		c.34G>T p.Gly12Cys
68	WT	WT	WT	WT		WT
69	WT	WT	WT	WT		WT
70	WT	WT	WT	WT		WT
71	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT		c.38G>A p.Gly13Asp
72	c.35G>T p.Gly12Val	WT	c.35G>T p.Gly12Val	WT		c.35G>T p.Gly12Val
73	WT	WT	WT	WT		WT
74	WT	WT	WT	WT		WT
75	WT	WT	WT	WT		WT
76	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT		c.35G>A p.Gly12Asp
77	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT		c.35G>A p.Gly12Asp
78	c.34G>A p.Gly12Ser	WT	c.34G>A p.Gly12Ser	WT		c.34G>A p.Gly12Ser
79	WT	c.183A>C p.Gln61His	WT	c.183A>C p.Gln61His		WT
80	WT	WT	WT	WT		WT
81	WT	WT	WT	WT		WT
82	WT	WT	WT	WT		WT
83	WT	WT	WT	WT		WT
84	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT		c.35G>A p.Gly12Asp
85	c.38G>A p.Gly13Asp	WT	c.38G>A p.Gly13Asp	WT		c.38G>A p.Gly13Asp
86	c.35G>A p.Gly12Asp	WT	c.35G>A p.Gly12Asp	WT		c.35G>A p.Gly12Asp
87	WT	WT	WT	WT		WT
88	WT	WT	WT	WT		WT

4.2.4.1.1. Comparación de la técnica de SNaPshot con NGS.

El método de NGS es considerado un método de referencia ya que permite el análisis de la secuencia completa de una región de interés. Además presenta una buena sensibilidad para la detección de SNPs, en el entorno al 5%. Con el propósito de determinar cuán exacta era la técnica de SNaPshot en comparación con NGS se evaluaron 85 muestras por NGS y por SNaPshot (170 reacciones, 85 para el gen *KRAS* y 85 para el gen *NRAS*). En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos con la técnica de SNaPshot y los resultados obtenidos por NGS.

Si se observa la Tabla 13, se aprecia que en los 85 análisis por NGS se identificaron 47 mutaciones para *KRAS* o *NRAS* y 123 no mutados (WT) para *KRAS* y/o *NRAS*. Al comparar NGS con SNaPshot, se obtuvieron los mismos resultados WT para *KRAS* y/o *NRAS*. De éste dato se desprende que hubo 123 verdaderos negativos, o sea que muestras que según la técnica de referencia, NGS, eran negativas también lo fueron para la técnica en estudio. Por otro lado, en NGS se determinó que 47 muestras presentaban mutaciones. De esas 47 muestras mutadas, SNaPshot coincidió en el resultado de 45 de ellas. Las otras 2 que NGS determinó como mutadas, SNaPshot las determinó como WT. Las 45 muestras que coincidieron fueron verdaderos positivos, o sea muestras que tenían mutaciones según NGS, SNaPshot también las detectó. En cuanto a las 2 muestras en las que no coincidió NGS con SNaPshot, como se toma como referencia NGS, se consideró que SNaPshot presentó 2 falsos negativos, resultados que eran positivos según NGS y SNaPshot los detectó como negativos.

A partir de los resultados anteriores se desprende que **la exactitud analítica de la técnica de SNaPshot con respecto a NGS fue de 99%.**

4.2.4.1.2. Comparación de la técnica de SNaPshot con Sanger.

Una vez comparados los resultados de la técnica de SNaPshot para 85 muestras con la técnica de alta sensibilidad, NGS, se decidió comparar con el método "Gold Standard": secuenciación Sanger. Para ello se analizó el gen *KRAS* por el método de Sanger para aquellas muestras que por SNaPshot presentaron mutaciones.

Se evaluó un grupo de 24 muestras (ver Tabla 13) que mostraron poseer una mutación por SNaPshot. En todos los casos los resultados obtenidos por SNaPshot coincidieron con aquellos obtenidos por secuenciación Sanger. Por lo tanto, **la exactitud de la técnica de SNaPshot con respecto a Sanger fue del 100%.**

4.2.4.1.3. Comparación de la técnica de SNaPshot con Kit de *Real time* (Laboratorio Genia).

Una tercera técnica contra la cual se evaluó la exactitud del método de SNaPshot fue la técnica de *Real time*, utilizando el kit de *Real time* PCR del Laboratorio Genia. Este kit fue puesto a punto y validado previamente por el Laboratorio Genia para la detección de las siete mutaciones más frecuentes en el gen *KRAS*, que son: c.34G>A p.Gly12Ser; c.34G>C p.Gly12Arg; c.34G>T p.Gly12Cys; c.35G>A p.Gly12Asp; c.35G>C p.Gly12Ala; c.35G>T p.Gly12Val; c.38G>A p.Gly13Asp.

Para ello, se analizaron 85 muestras (85 reacciones) mediante la técnica de SNaPshot y mediante el Kit de *Real time* para el gen *KRAS* (los datos fueron gentilmente cedidos por el Laboratorio Genia Argentina) (ver Tabla 13). De las 85 muestras estudiadas por ambas técnicas, el kit de *Real time* detectó como WT 46 muestras y 39 con presencia de mutaciones. En cuanto a los resultados por la técnica de SNaPshot, de las 46 muestras WT por el kit, se detectaron 45 como WT y 1 como mutada. Esta última se define como falso positivo, ya que se detectó una mutación cuando, según la técnica de referencia, no fue una muestra mutada. Las 39 muestras mutadas según el kit de *Real time*, también lo fueron según SNaPshot. Por lo tanto, **el resultado de exactitud por comparación de la técnica de SNaPshot con el kit de *Real time* fue de 99%.**

Si se hace una comparación general de los resultados obtenidos con la técnica de SNaPshot con los resultados obtenidos con las otras técnicas de referencia: NGS, Sanger y *Real time* (ver Tabla 13), se puede observar que en todos los casos se logró una exactitud cercana al 100%. En el caso de la comparación con el kit de *Real time*, SNaPshot no coincidió en el resultado de la muestra nº45. Sin embargo, esa muestra analizada por NGS coincidió con la técnica de SNaPshot. Considerando que NGS es la técnica de mayor sensibilidad (aprox. 5%), según éste resultado, se podría deducir que la técnica de SNaPshot tuvo una sensibilidad mayor al kit de *Real time* para esta muestra, dado que coincidió con NGS. Por otro lado en los dos casos en donde SNaPshot no coincidió con NGS (muestras nº35 y nº37, Tabla 13), se aprecia que en ambas muestras NGS detectó mutaciones con frecuencias menores a 12,5% (8,9% y 10%, respectivamente), que es el límite de detección de SNaPshot (y específicamente de las mutaciones c.436G>A p.Ala146Thr y c.38G>A p.Gly13Asp de *KRAS*). Por lo tanto, es esperable que SNaPshot no detecte mutaciones en las muestras 35 y 38, y que NGS sí lo haga.

Cabe destacar que en todos los casos donde SNaPshot y otras técnicas detectaron una mutación en la muestra, la mutación fue la misma según cada técnica.

4.2.4.2. Detección de mutaciones en ADNs de referencia

La segunda forma de determinar la exactitud de la técnica de SNaPshot fue evaluando la capacidad del mismo para detectar las mutaciones o ausencia de ellas en cada uno de los ADNs de referencia adquiridos en la empresa *Horizon Diagnostic*. Estos análisis coincidieron con los realizados para la prueba de especificidad (ver ítem 4.2.2).

Se analizaron 16 ADNs de referencia, 9 mutados para el gen *KRAS*, 5 mutados para el gen *NRAS* y los ADNs WT para ambos genes. Con la técnica de SNaPshot se pudieron identificar todas las mutaciones presentes en cada uno de los ADNs de referencia con una concordancia del 100% para las 14 mutaciones presentes en el estudio. También se evaluaron dos ADN WT, tanto para *KRAS* como para *NRAS*, siendo ambos correctamente genotipados. Por lo tanto, **la exactitud analítica de la técnica de SNaPshot al evaluar ADNs de referencia fue del 100%**.

4.2.5. Resumen validación de la técnica de SNaPshot

En la Tabla 14 se presenta un resumen de la validación de la técnica de SNaPshot. En la misma se indican los valores de los parámetros dentro de los cuales se deben encontrar los resultados obtenidos con la técnica de SNaPshot para ser confiable.

Tabla 14: Resumen de los resultados de la validación de la técnica de SNaPshot.

Parámetro	Actividad	N° de muestras	Tipo de muestras	N° de ensayos	Resultado
Límite del blanco	Análisis de negativos	50	H ₂ O	100	<i>KRAS</i> : 55 RFU
					<i>NRAS</i> : 118 RFU
Límite de detección	Análisis de muestras con porcentaje conocido de cada mutación	14	ADNs de referencia	42	12,5%
Especificidad	Análisis de muestras con mutaciones conocidas	14	ADNs de referencia	42	100%
Repetibilidad	Análisis de un mismo grupo de muestras, realizado 3 días diferentes, por el mismo operador	40	ADNs provenientes de tejido tumoral en taco de parafina	240	100%
Reproducibilidad	Análisis de un grupo de muestras en diferentes laboratorios	40	ADNs provenientes de tejido tumoral en taco de parafina	160	100%
Exactitud	Comparación de métodos	88	ADNs de tejido tumoral en taco de parafina	176*	99-100%
	Análisis de muestras conocidas	16	ADNs de referencia	16	100%

*Los 176 ensayos corresponden a las pruebas realizadas con la técnica de SNaPshot.

4.3. Distribución de mutaciones en muestras de pacientes con mCRC.

Con el propósito de hacer un estudio global de los resultados obtenidos tras la puesta a punto de la técnica de SNaPshot, se analizó un grupo de muestras provenientes de pacientes con mCRC. Para ello se tomaron al azar 100 muestras y se analizaron los genes *KRAS* y *NRAS* con la técnica de SNaPshot. Los datos de este estudio se resumen en la Tabla 15 donde se indica la proporción de muestras mutadas y no mutadas (WT), así como las mutaciones más frecuentemente encontradas.

En la Tabla 15 se observa la prevalencia de mutaciones en *KRAS*, especialmente en el exón 2, siendo un 45% del total de las muestras analizadas. Dentro del exón 2 de *KRAS* la mutación de mayor frecuencia es c.35G>A p.Gly12Asp. Los exones 3 y 4 de *KRAS* no presentaron un porcentaje significativo de muestras mutadas en dichos exones. En lo que refiere a *NRAS*, las mutaciones que aparecieron en las 100 muestras analizadas se encontraron únicamente en el exón 3.

Otro dato interesante que se obtiene de los resultados de la Tabla 15 es que en ningún caso estudiado hubo dos mutaciones a la vez, ya sea en el mismo gen o en los dos genes (*KRAS* y *NRAS*) al mismo tiempo. Para sacar una conclusión al respecto se deberían analizar un número mayor de muestras.

Tabla 15: Mutaciones halladas en los genes *KRAS* y *NRAS*, en 100 muestras.

KRAS	%
WT	49
Mutadas totales	51
➤ Mutados en exón 2	45
• c.34G>A p.Gly12Ser	3
• c.34G>T p.Gly12Cys	7
• c.35G>A p.Gly12Asp	14
• c.35G>T p.Gly12Val	10
• c.37G>T p.Gly13Cys	1
• c.38G>A p.Gly13Asp	10
➤ Mutados en exón 3	3
• c.175G>A p.Ala59Thr	1
• c.181C>A p.Gln61Lys	1
• c.183A>C p.Gln61His	1
➤ Mutados en exón 4	3
• c.436G>A p.Ala146Thr	1
• c.436G>A p.Ala146Thr	1
• c.437C>T p.Ala146Val	1
NRAS	%
WT	94
Mutadas	4
➤ Mutados en exón 3	4
• c.183A>C p.Gln61His	2
• c.182A>T p.Gln61Leu	1
• c.181C>A p.Gln61Lys	1
Totales mutados en KRAS o NRAS	55
Totales WT en KRAS y NRAS	45

5. ANÁLISIS ECONÓMICO

Con el propósito de conocer el costo total al realizar la técnica de SNaPshot para el diagnóstico de mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* en pacientes con mCRC, se realizó un análisis económico. Este análisis incluyó el costo en plásticos, reactivos y recursos humanos (RRHH). En la Tabla 16 se detallan los costos por etapa de la técnica de SNaPshot para el diagnóstico de una única muestra o diez de ellas. El costo en RRHH en base a las horas de trabajo de un operario, se estimó según un tiempo de trabajo máximo.

Tabla 16: Costo de la técnica de SNaPshot. Se presentan los costos de forma diferencial según la etapa de la técnica, los plásticos, reactivos y RRHH. Dichos costos se diferencian según sea 1 muestra o 10 muestras. Los costos en RRHH son iguales para 1 muestra y 10 muestras.

Etapa de la técnica	Costo en RRHH (u\$s7,5/hr)	1 muestra			10 muestras		
		Costo en plásticos (u\$s)	Costo en reactivos (u\$s)	Total 1 muestra	Costo en plásticos (u\$s)	Costo en reactivos (u\$s)	Total 10 muestras
Extracción de ADN	11,3	1,5	11,0	23,8	3,5	110	124,8
Diluciones ADN y qPCR	8,7	2,2	4,1	15,0	41,3	20,0	70,0
PCR de exones y gel agarosa	11,0	1,0	6,5	18,5	3,2	13,0	27,2
Purificaciones	7,5	0,9	3,0	11,4	5,9	30,1	41,7
Reacción de SNaPshot	7,5	1,1	18,3	26,9	15,4	183	205,9
Electroforesis capilar	7,5	0,9	12,0	20,4	2,0	120	129,5
Costo parcial	53,5	7,6	54,9		71,3	476,1	
Costo total			u\$s116				U\$s599

Como se observa en la Tabla 16, el costo total de la técnica de SNaPshot para una única muestra es de u\$s 116. Este costo es relativamente alto si se lo compara con otras técnicas de diagnóstico. Sin embargo, si se analizan diez muestras al mismo tiempo, el costo por muestra pasa a ser de u\$s 60. Esta gran disminución del costo se da porque ciertos plásticos y reactivos se utilizan de igual manera para una muestra como para diez. Además, el costo en RRHH se estimó según un tiempo máximo. Por lo tanto, considerando que el tiempo de trabajo de un operario para analizar una muestra o diez es similar, el costo en RRHH se lo consideró constante.

6. DISCUSIÓN GENERAL

Como se mencionó al comienzo del trabajo, el CRC es una enfermedad que afecta a millones de personas a nivel mundial. En dicha enfermedad puede estar alterada la vía de señalización mediada por EGFR. Dentro de esta vía existen dos proteínas de gran importancia: KRAS y NRAS. Las mismas están codificadas por oncogenes en los cuales la presencia de determinadas mutaciones desencadena la activación constitutiva de la vía de EGFR e impide la respuesta del paciente a tratamientos con anticuerpos monoclonales específicos contra este receptor. Es por este motivo que se necesitan técnicas diagnósticas que permitan saber si el paciente presenta mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* para poder utilizar o no dichos tratamientos. Lo que se realizó en este trabajo fue la puesta a punto y la validación de la técnica de SNaPshot, la cual permite diagnosticar la presencia o ausencia de 56 mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de los genes *KRAS* y *NRAS*.

Al momento de elegir una técnica para trabajar en diagnóstico, la misma debe ponerse a punto para lograr confiabilidad y robustez. Es por este motivo que se realizó una optimización de las etapas de mayor importancia en la técnica de SNaPshot. Los grandes desafíos que se presentaron fueron: la cuantificación de ADN degradado proveniente de tejidos FFPE, la optimización de la PCR de exones, la existencia de interferencias por hibridación de cebadores en la reacción de SNaPshot y la interpretación de los resultados tomando en cuenta interferencias generadas por problemas en la purificación.

La utilización de muestras de tejidos parafinados (FFPE) fue uno de los mayores inconvenientes en la técnica ya que se daban tres fenómenos desfavorables: baja cantidad de ADN, degradación de ADN y existencia de inhibidores de la PCR. Debido al procesamiento de la muestra, desde la obtención del tejido hasta la selección de la porción tumoral en ese tejido por el anatómo-patólogo, la cantidad de células finales de las cuales se pudo obtener ADN fue bajo, en comparación con las presentes en otro tipo de muestras como sangre o saliva. Además, los componentes que acompañaban la muestra y, el tiempo entre la primera etapa y la cuantificación de ADN, hicieron que el ADN se encontrara muy degradado y en presencia de inhibidores.

La degradación del ADN en muestras FFPE imposibilita la amplificación de fragmentos grandes en una PCR. Esto tiene como consecuencia que la cantidad de "ADN amplificable" necesario para la PCR de exones (100-200pb) fuera bajo. "ADN amplificable" se entiende (en este trabajo) como el ADN que puede ser amplificado en la PCR de exones por poseer un tamaño suficientemente grande y poco inhibidor. Para valorar el "ADN amplificable" en contraposición al ADN total se realizó una qPCR. Con esta metodología se logró evaluar el ADN contenido en las diluciones de cada muestra, y encontrar aquella que tuviera una cantidad de ADN aceptable (mayor a 0,02ng/μl) y que a su vez no presentara inhibidores de la PCR.

Por un lado, se seleccionaron los cebadores hTERT163 que permitieron evaluar las muestras en términos de la amplificación de fragmentos similares en tamaño a los que fue necesario amplificar en la PCR de exones. Por otro lado, el estudio de las diluciones seriadas al medio de las muestras en la qPCR permitió evaluar de forma clara la existencia de inhibidores. Para ello fue necesario analizar las curvas de amplificación de cada una de las diluciones de cada muestra. El análisis del comportamiento de las curvas de amplificación fue una manera de detectar la inhibición ya que en aquellas muestras con ausencia de inhibidores, las diluciones seriadas presentaban curvas de amplificación con pendientes paralelas (ver Anexo 3). Sin embargo, cuando se observó una caída de la pendiente en alguna de las diluciones, se denotó inhibición. Si se observa nuevamente la Figura 11, se puede decir que las muestras con ausencia de inhibición presentaron un patrón de amplificación similar entre las diluciones, en donde las pendientes de las diferentes curvas fueron paralelas. Por consiguiente como criterio para el futuro, en el caso en que alguna de las diluciones de una muestra presentase inhibición habría que buscar aquella dilución en donde la diferencia de CT con la dilución posterior sea cercana a 1 y las pendientes sean paralelas. Un ΔCT diferente a 1 es indicador de inhibición en la muestra más concentrada. En cambio si es 1 quiere decir que la muestra más concentrada ya no tiene inhibición.

Para las muestras FFPE estudiadas en este trabajo, estos criterios (ΔCT y curvas paralelas) funcionaron bien para distinguir muestras con niveles de inhibición no muy elevados. Sin embargo, durante el trabajo existieron una proporción significativa de muestras donde no se veía amplificación. Esto podía deberse a ausencia de ADN en las muestras o una inhibición total de las mismas. Por lo tanto, evaluando las curvas de amplificación no se podía detectar el problema. Una forma de distinguir entre una muestra inhibida o sin ADN fue evaluando la fluorescencia en los primeros ciclos de amplificación en la qPCR.

Como se mencionó en resultados y discusión, durante el trabajo se observaron muestras con niveles de fluorescencia muy altos en ciclos tempranos de la qPCR independientemente del nivel de amplificación. Con un estudio de correlación entre muestras inhibidas y no inhibidas, se pudo establecer un valor por encima del cual la muestra presentaría impurezas importantes y probablemente inhibición. Para ello, se realizó el cociente entre la fluorescencia (SYBR Green) en el ciclo 5 de cada muestra sobre la fluorescencia del ADN puro (ADN 5,56ng/ μ l) y se consideró que un cociente mayor a 1,5 era indicador de inhibición. Este coeficiente fue utilizado en este trabajo como otro criterio para evaluar la calidad de las muestras provenientes de tejidos FFPE.

Debido a que la qPCR fue un paso crucial al comienzo de la técnica de SNaPshot porque permitió cuantificar y elegir la dilución de la muestra con la que se continuó trabajando, fue importante verificar que el producto generado en cada qPCR fuera el esperado. Para ello, una opción, en este trabajo, fue analizar la T_m del producto amplificado. Dicha T_m debió ser la misma que la T_m obtenida al amplificar los ADNs de la curva estándar. En aquellos casos donde se encontró una muestra con T_m

distinta a la esperada, se consideró que la concentración relativa de ADN medida por qPCR no era real. Esta diferencia en T_m se podría generar por hibridación de cebadores en muestras donde las condiciones fisicoquímicas de la reacción fueron diferentes a lo habitual. En el caso de muestras FFPE podría ser debido a la presencia de solutos presentes en las propias muestras.

Otro punto importante en la qPCR fue contar con una curva estándar de ADN genómico “puro” con alta eficiencia y R^2 cercanas a los valores óptimos ($R^2=1$ y %ef=100%), ya que a partir de dicha curva se extrapolaron las concentraciones relativas de las muestras.

Retomando los conceptos anteriores sobre la qPCR, se pudieron establecer una serie de criterios para facilitar el análisis de muestras. Los criterios fueron: 1. tomar como referencia la amplificación de la curva estándar realizada con ADN genómico “puro” (R^2 , pendiente, eficiencia, línea de base y umbral); 2. utilizar muestras con una concentración mínima de 0,02ng/μl para proseguir con el diagnóstico (PCR de exones y reacción de SNaPshot); 3. verificar el control negativo; 4. analizar las curvas de amplificación de las diluciones de cada muestra a evaluar: T_m (para verificar que sea el producto esperado), CT de cada dilución, pendiente de la curva de amplificación y fluorescencia en ciclos tempranos. Con estos criterios se mejoró la elección de las diluciones de las muestras, en comparación a como se realizaba anteriormente en el laboratorio.

Luego de la elección de la dilución correcta de la muestra, la técnica continúa con la PCR de exones. Esta etapa está relacionada con la qPCR ya que el funcionamiento de la PCR de exones depende de la adecuada elección de la muestra. Empíricamente se observó que la qPCR era más sensible a inhibidores que la PCR. De hecho, en algunos casos, cuando se observaron los productos de la PCR (en los geles de agarosa al 3%) de muestras con cantidad de ADN cercano a 0,04ng (según qPCR) las bandas se vieron de forma clara y con una intensidad mayor o similar a la del control positivo de 0,04ng (cantidad conocida de ADN). Estos resultados demostraron que la qPCR podía subestimar la cantidad de ADN. A pesar de esto, dado que 0,04ng de ADN equivaldría a 6-7 células humanas (12 a 14 cromosomas), un número de células muy pequeño como para detectar una mutación heterocigota somática, se consideró que era mejor continuar trabajando con muestras con un ADN mayor o igual a 0,02ng/μl según la qPCR, aunque se subestimara la concentración. En resumen, este valor límite permitió evaluar las muestras de tejidos FFPE, donde aquellas con menor concentración que el límite mínimo establecido no debían continuar con el diagnóstico y se debía repetir la extracción de ADN.

En la PCR de exones el mayor inconveniente fue la amplificación del exón 4 de *KRAS*. Con el propósito de solucionar el problema se hicieron pruebas con cebadores internos, los cuales fueron descartados porque no presentaron una eficiencia superior a los cebadores *KRAS* ex4 originales. Como propuesta a futuro se podrían diseñar nuevos cebadores que logran una eficiencia mayor a los usados en este trabajo. Cabe destacar que existe dificultad a la hora de diseñar cebadores que amplifiquen los codones 117 (pos. 351) y 146 (pos.436 y 437) del exón 4 en el mismo fragmento ya

que los mismos se encuentran distanciados por más de 80pb (ver Anexo 4) y en un contexto genómico muy rico en AT. Esto hace que el fragmento generado por los cebadores sea grande y difícil de amplificar desde ADN proveniente de muestras FFPE.

Otro punto importante en la PCR de exones fue la amplificación de varios fragmentos en la misma reacción (los exones 2, 3 y 4 a la vez, para cada gen por separado). Para ello se utilizó una Taq adecuada para reacciones múltiples cuya tasa de error es de 1×10^{-5} pb (según el fabricante). Pese a esto se hicieron ensayos con enzimas Proof-reading (datos no mostrados), cuya tasa de error era menor a la Taq utilizada (1×10^{-6} bp) (55). Sin embargo, la enzima no fue eficiente a la hora de hacer PCRs múltiples. En resumen, en la puesta a punto fue más importante realizar una PCR que permitiera obtener cantidades de producto amplificado suficiente para proseguir con la técnica que tener una alta fidelidad en la amplificación.

En cuanto a la reacción de SNaPshot, etapa de especial interés en este trabajo, se prestó especial atención a los problemas generados por la interferencia provocada por hibridación inespecífica entre cebadores. Como se vio en los resultados del trabajo, el cebador *NRAS* pos.34 se hibridaba con los cebadores *NRAS* pos.35 y *NRAS* pos.37, generando un pico inespecífico en los electroferograma en la posición 34, que provocó confusión a la hora de evaluar resultados de muestras de pacientes con mCRC. La aparición de dicha interferencia sobre-estimaría la presencia del alelo wt en la muestra de tejido FFPE. La estrategia que se tomó para evitar esto fue dividir la reacción de SNaPshot para *NRAS* en dos, separando el cebador *NRAS* pos.34. Los resultados fueron positivos y permitieron resolver el problema. Sin embargo, la separación en dos reacciones generó un aumento en el tiempo operacional y en el costo de realización de la técnica. A pesar de esto, dado que es una técnica de diagnóstico, fue imperioso lograr interpretar correctamente los resultados, por lo que en el balance se favoreció la calidad del diagnóstico frente al aumento del tiempo operacional y el costo.

Con la experiencia adquirida en este trabajo se prevé la posibilidad de detectar más mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* por la técnica de SNaPshot. Esto va a necesitar de un cambio en la técnica de SNaPshot ya que para aumentar el número de mutaciones analizadas se ha de aumentar el número de cebadores en la reacción. La incorporación de nuevos cebadores aumentaría la probabilidad de interferencias como las de la posición 34 de *NRAS*. La solución más probable sería la separación de la reacción de SNaPshot en más de una reacción. Sin embargo, el costo y el tiempo de la técnica aumentarían a medida que se fracciona la reacción de SNaPshot y sería menos interesante como método de diagnóstico.

Al igual que la interferencia provocada por hibridación inespecífica entre los cebadores de SNaPshot, en este trabajo se detectaron picos inespecíficos en aquellos casos donde no hubo una adecuada actividad de las enzimas de la purificación: fosfatasa alcalina y exonucleasa I. Dicha interferencia se solucionó aumentando la cantidad de enzima utilizada y el tiempo de incubación de las mismas. Para

aumentar la confiabilidad del análisis, se realizó un estudio teórico de la ubicación de los picos específicos (WT y mutados) para cada posición, en comparación con los posibles picos generados por un mal funcionamiento de la purificación (ver Tabla 9 y Anexo 5). Esto sirvió de apoyo para la correcta identificación de los picos específicos, generando una mayor precisión en el diagnóstico. A esto se le suman los resultados obtenidos en la validación de la técnica de SNaPshot. El LB permitió diferenciar la señal inespecífica de la señal proveniente de la muestra. Por lo tanto, los picos tenues generados por un ineficiente funcionamiento de la purificación quedaron excluidos de la señal tomada como verdadera.

En la detección de mutaciones, el LD permitió determinar el porcentaje mínimo de cada mutación que se podía detectar en un fondo de alelos WT. Dicho valor fue de 12,5%. A pesar de que el LD podría haber sido menor, haciendo que la técnica fuera más sensible, el hecho de trabajar con muestras de tejidos FFPE hizo que esto se dificultara. Las muestras FFPE poseen muy poco ADN, y como se dijo anteriormente, la cantidad de cromosomas en 0,04ng sería de 12 a 14, un número bajo para detectar una mutación heterocigota somática que puede no estar presente en todas las células. Por lo tanto, si se pretende tener una sensibilidad menor a 10% no se debería ir por debajo de 0,04ng de ADN, sino todo lo contrario y trabajar con muestras cercanas a 1ng.

En lo que respecta al resto de los parámetros estudiados en la validación de la técnica de SNaPshot: especificidad, precisión y exactitud, se puede decir que se obtuvieron resultados favorables, con valores de 100% para los dos primeros parámetros y valores entre 99 y 100% para la exactitud.

En este trabajo también se hizo un análisis estadístico sobre la prevalencia de mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* en pacientes con mCRC. Al realizar un estudio de 100 muestras se observó que las muestras se dividen principalmente en dos grupos mayoritarios: aquellas que no presentaron ninguna de las mutaciones estudiadas en este trabajo (WT=45%) y las que presentaron mutaciones en el exón 2 de *KRAS* (45%). El porcentaje restante se dividió entre las muestras mutadas en los exones 3 y 4 de *KRAS* y los tres exones de *NRAS*. Valores similares a estos se observaron en otros estudios donde la cantidad de muestras estudiadas fue mayor. Si se observa la Figura 5, en la misma se presentan los porcentajes de muestras WT para *KRAS* (37,7%) y muestras mutadas en el gen *KRAS* (47,1%) y en el gen *NRAS* (4,7%). En este trabajo se observó que existe una tendencia similar con respecto al estudio de la Figura 5. Las diferencias que puede haber podrían ser debidas a la sensibilidad de las metodologías utilizadas en cada análisis o al tamaño del espacio muestral. En la Figura 5 cuyos datos son tomados de varios trabajos, la mayoría de ellos utilizó Sanger como método de detección de mutaciones, el cual tiene un LD menor que la técnica de SNaPshot. Por otro lado, los resultados de la Figura 5 provienen del estudio de una cantidad de muestras muy alta, lo que lo hace a un resultado con mayor robustez estadística.

Existen otros genes importantes en la vía de señalización mediada por EGFR que están implicados en el mCRC y podrían condicionar la eficiencia de las drogas anti-EGFR, como por ejemplo *BRAF* y *PIK3CA*. Dichos genes deberán ser diagnosticados en un futuro, al igual que las mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS*. En lo que respecta a la técnica de SNaPshot, la detección de más genes implicaría un aumento del costo y tiempo de ejecución, llegando a un punto donde la técnica de SNaPshot no sería la opción más rentable y eficiente. Como ya se ha mencionado, existen otras técnicas para la detección de varias mutaciones en más de un gen a la vez, sin embargo muchas de ellas son muy costosas o no se ha estudiado con profundidad su aplicación en detecciones múltiples. Una de ellas es la técnica de NGS, la misma permite la secuenciación de múltiples regiones del genoma simultáneamente, lo cual permitiría detectar en una misma reacción mutaciones en varios genes. Es por ello que se considera como perspectiva a futuro la aplicación de NGS en la detección de los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*, con un costo similar o menor a la técnica de SNaPshot para el mismo número de mutaciones analizadas.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró poner a punto las etapas más importantes de la técnica de SNaPshot para la detección de 56 mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS*, generando un protocolo para utilizar en diagnóstico clínico. Se definieron criterios para la elección de las muestras de ADN provenientes de tejidos FFPE para poder amplificar los exones de *KRAS* y *NRAS* por PCR. Se generó una tabla para *KRAS* y *NRAS* con las posiciones de las bases, mutaciones e interferencias que servirá de apoyo para la interpretación de los resultados finales en los diagnósticos futuros. Una vez finalizada la optimización de las etapas más importantes, se definieron los límites y parámetros de la validación. Los mismos permitieron comprobar que la técnica de SNaPshot era una técnica robusta y sensible para el diagnóstico de mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS*. Por lo tanto, se puede decir que se cumplieron con éxito los objetivos planteados en el origen del trabajo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cancer [Internet]. EEUU: World Health Organization; 2015 [citado 2015]. Disponible desde: <http://www.who.int/cancer/en/>
2. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [Internet]. EEUU: World Health Organization; 2015 [citado 2015]. Disponible desde: http://globocan.iarc.fr/Pages/DataSource_and_methods.aspx
3. Barrios E, Garau M, Alonso R, Musetti C. IV atlas de incidencia del cáncer en el Uruguay (2007-2011) [Internet]. Uruguay: Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer; 2014 [citado 2014]. Disponible desde: http://www.comisioncancer.org.uy/uc_394_1.html
4. Uso del Cetuximab en el tratamiento del cáncer colo-rectal metastásico [Internet]. Uruguay: Ministerio de Salud Pública; 2012 [citado 2012]. Disponible desde: <http://www2.msp.gub.uy/andocasociado.aspx?5218,23509>
5. Fenocchi E. Programa de screening de cáncer colo-rectal en Uruguay [Internet]. Uruguay: Instituto Nacional de Oncología; 2002 [citado 2002]. Disponible desde: <http://www.sitiomedico.org/artnac/2002/04/montano3.htm>
6. Cáncer colorrectal afecta a más de 1.500 uruguayos por año [Internet]. Uruguay: Cientochoenta; 2013 [citado 2013]. Disponible desde: http://www.180.com.uy/articulo/32368_Cancer-colorrectal-afecta-a-mas-de-1500-uruguayos-por-ano
7. Pautas de oncología médica para el diagnóstico, tratamiento sistémico y seguimiento [Internet]. Uruguay: Cátedra de Oncología Clínica; 2012 [citado 2012]. Disponible desde: http://www.oncologiamedica.hc.edu.uy/files/Pautas%20de%20Oncologia%20M%C3%A9dica%20-%20Diciembre%202012%20-%20Version%20Final%2022Mayo2013_LIMPIO.pdf
8. Cáncer de colon: Tratamiento (PDQ®) [Internet]. EEUU: Instituto Nacional del Cáncer; 2014 [citado 2014]. Disponible desde: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/colon/Patient/page1>

9. Cáncer de colon [Internet]. España: MD Anderson Cancer Center; 2014 [citado 2014]. Disponible desde: <<http://www.mdanderson.es/cancer/cancer-de-colon>>
10. Gaston D, Giacomantonio C. Genomics of Colorectal Cancer. En: Gaston D, editor. Cancer genomics. Canadá: Elsevier; 2014. p 18.
11. Hernández-Losa J, Sanz J, Landolfi S, López-Ríos F, Palacios J, Bautista M, Díaz-Rubio E, Tabernero J, Foncillas J, Ramón y Cajal S. Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. Rev Esp Patol. 2012; 2 (45):10.
12. Receptor del factor de crecimiento epidérmico [Internet]. EEUU: Wikipedia; 2014 [citado 2014]. Disponible desde: <http://es.wikipedia.org/wiki/Receptor_del_factor_de_crecimiento_epid%C3%A9rmico>
13. Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G. The biological properties of cetuximab. Crit Rev Oncol Hematol. 2008; 68(2):93-106.
14. Wong SF. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. Clin Ther. 2005; 27(6):684-94.
15. Markman B, Ramos FJ, Capdevila J, Tabernero J. EGFR and KRAS in Colorectal Cancer. En: Makowski GS, editor. Advances in clinical chemistry. San Francisco: Elsevier; 2010. pp 71-114
16. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy: focus on cetuximab. Eur J Cancer. 2001; 37 Suppl 4:S16-22.
17. Gómez J, Castro J, Concha A, Felip E, Isla D, López-Ríos F, Paz-Ares L, Ramírez J, Sanz J, Garrido P. Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma de pulmón no microcítico avanzado. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. Rev Esp Patol. 2012; 45:14.
18. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A. Oncogenic Activation of the RAS/RAF Signaling Pathway Impairs the Response of Metastatic Colorectal Cancers to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Therapies. Cancer Res. 2007; 67:6.

19. Cetuximab [Internet]. EEUU: Wikipedia; 2014 [citado 2014]. Disponible desde: <<http://es.wikipedia.org/wiki/Cetuximab>>
20. Irinotecan [Internet]. EEUU: Wikipedia; 2011 [citado 2011]. <<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/i027.htm>>.
21. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 360(14):1408-1417.
22. Brohawn P, Higgs BW, Ranade K, Jallal B, Yao Y. Translating Biomarker Discovery into Companion Diagnostics through Validation and Regulatory Consideration. En: Brohawn P, editor. *Genomic Biomarkers for Pharmaceutical Development*. Maryland: Elsevier; 2014. pp 157-181.
23. Araque P, Salazar M. Panitumumab en carcinoma colorrectal metastásico. *Guía Farmacoterapéutica de Hospitales de Andalucía*. 2009; 1:3.
24. Wu M, Rivkin A, Pham T. Panitumumab: human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptors for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Ther*. 2008; 30(1):14-30.
25. Jancik S, Drabek J, Radzioch D, Hajduch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 1:1-13.
26. Troiani T, Napolitano S, Morgillo F, Ciardiello F, Belli G, Cioffi L, Sirignano C, Martinelli E. Predictive Biomarkers to Anti-EGFR Inhibitors Treatment in the Management of Metastatic Colorectal Cancer. *Carcinog & Mutagen*. 2014:9.
27. Demes M, Scheil-Bertram S, Bartsch H, Fisseler-Eckhoff A. Signature of microsatellite instability, KRAS and BRAF gene mutations in German patients with locally advanced rectal adenocarcinoma before and after neoadjuvant 5-FU radiochemotherapy. *J Gastrointest Oncol*. 2013; 4(2):182-92.
28. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Siena S, Bardelli A. Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discov*. 2014; 4(11):1269-80.


29. Normanno N, Pinto C, Castiglione F, Bardelli A, Gambacorta M, Botti G, Nappi O, Siena S, Ciardiello F, Taddei G, et al. KRAS mutations testing in colorectal carcinoma patients in Italy: from guidelines to external quality assessment. PLoS One. 2011; 6(12):e29146.
30. Siddiqui AD, Piperdi B. KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. Ann Surg Oncol. 2010; 17(4):1168-76.
31. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010; 11(8):753-62.
32. Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff [Internet]. EEUU: Food and Drug Administration; 2014 [citado 2014]. Disponible desde: <<http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-meddev-gen/documents/document/ucm262327.pdf>>
33. Reacción en cadena de la polimerasa [Internet]. EEUU: Wikipedia; 2015 [citado 2015]. Disponible desde: <http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa>
34. Chang KC, Galuska S, Weiner R, Marton MJ. Development and validation of a clinical trial patient stratification assay that interrogates 27 mutation sites in MAPK pathway genes. PLoS One. 2013; 8(8):e72239.
35. Morlan J, Baker J, Sinicropi D. Mutation Detection by Real-Time PCR: A Simple, Robust and Highly Selective Method. Plos One. 2009; 4(2):11.
36. Productos CLART® CMA [Internet]. España: Genómica; 2014 [citado 2014]. Disponible desde: <http://genomica.es/es/diagnostico_in_vitro_productos_clart_cma.cfm>
37. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. Diagn Prenat. 2012; 23(2):11.
38. SNaPshot® Multiplex System for SNP genotyping [Internet]. EEUU: Life Technology Corporation; 2014 [citado 2014]. Disponible desde: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_101014.pdf>

39. Coutinho A, Valverde G, Fehren-Schmitz L, Cooper A, Barreto Romero MI, Espinoza IF, Llamas B, Haak W. AmericaPlex26: a SNaPshot multiplex system for genotyping the main human mitochondrial founder lineages of the Americas. PLoS One. 2014; 9(3):e93292.
40. Esteves L, Bulhões S, Brilhante M, Mota-Vieira L. Three multiplex snapshot assays for SNP genotyping in candidate innate immune genes. BioMed Central. 2013; 6:54.
41. Su J, Zhang XC, An SJ, Zhong WZ, Huang Y, Chen SL, Yan HH, Chen ZH, Guo WB, Huang XS, et al. Detecting the spectrum of multigene mutations in non-small cell lung cancer by Snapshot assay. Chin J Cancer. 2014; 33(7):346-50.
42. Lurkin I, Stoehr R, Hurst CD, van Tilborg AA, Knowles MA, Hartmann A, Zwarthoff EC. Two multiplex assays that simultaneously identify 22 possible mutation sites in the KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA genes. PLoS One. 2010; 5(1):e8802.
43. Multiple Primer Analyzer [Internet]. EEUU: Thermo Scientific; 2015 [citado 2015]. Disponible desde: <https://www.lifetechnologies.com/uy/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html#/legacy=www.thermoscientificbio.com>>
44. Ion AmpliSeq™ Cancer Panel [Internet]. EEUU: Lige Technology Corporation; 2012 [citado 2012]. Disponible desde: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocs/cms_098568.pdf>
45. Normalization of Real-Time PCR Fluorescence Data with ROX Passive Reference Dye [Internet]. Uruguay: Bio-Rad; 2015 [citado 2015]. Disponible desde: <http://www.bio-rad.com/es-uy/applications-technologies/normalization-real-time-pcr-fluorescence-data-with-rox-passive-reference-dye>>
46. Sistemas de detección de patógenos por pcr a tiempo real [Internet]. Microbial S.L.: Parc Científic de la UdG; 2009 [citado 2009]. Disponible desde: http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf>
47. SYBR Green I [Internet]. EEUU: Wikipedia; 2015 [citado 2015]. Disponible desde: http://en.wikipedia.org/wiki/SYBR_Green_I>

48. Experimentos de cuantificación relativa y CT comparativos [Internet]. EEUU: Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System; 2010 [citado 2010]. Disponible desde: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_053237.pdf>
49. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). ICH. 1994; 4:1-16.
50. International Organization for Standardization. Quality Management Systems, Fundamentals and Vocabulary [Internet]. Switzerland: International Organization for Standardization; 2005 [citado 2005]. Disponible desde: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=42180
51. Tholen D, Linner K, Kindratovich M, Armbruster D, Garret P, Junes R, Kroll M, Lequin R, Pankratz T, Scassellati G, et al. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation. EEUU: NCCLS; 2010.
52. Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML. College of American Pathologists Molecular Pathology Resource, C. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. Arch Pathol Lab Med. 2009; 133(5):743-55.
53. Castillo B, González R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev Cubana Farm. 1997; 30(1).
54. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. En: NCCLS, editor. Francia: 2013. p 17.
55. Biotools DNA polymerase [Internet]. España: Biotools B&M Labs. S.A.; 2008 [citado 2008]. Disponible desde: <<http://www.biotools.eu/documentospdf/DNAPolimerasa5U.esp.Ed08.Marzo14.pdf>>

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1. Protocolo inicial para diagnóstico de *KRAS* por la técnica de SNaPshot.

	PROTOCOLO K-RAS SNAPSHOT	Documento: IT.LA073 Versión 2 Fecha: 25/06/2014 Página: 1 de 2
---	---------------------------------	---

Título: Protocolo para detección de mutaciones en gen *KRAS* por SNaPshot.

Quién: Técnico de Laboratorio.

Dónde: En el laboratorio PRE-amplificación y POST-amplificación.

Condiciones necesarias: ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit, Platinum multiplex PCR Mastermix 2X, primers para amplificación de exón-2, exón-3 y exón-4 del gen *K-ras*, primers para SNaPshot para detección de variables: codones 12 y 13 en exón 2, codones 59 y 61 del exón 3 y codones 117 y 146 del exón 4.

Descripción de las actividades:

- Se extrae el ADN mediante el kit "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" de Promega, o mediante el kit "QiaAmp DNA FFPE tissue kit" de Qiagen.
- Se cuantifican mediante Real-Time PCR o mediante el equipo NanoQuant.
- Una vez que esta extraído y cuantificado el ADN se larga una primera reacción de PCR con las siguientes condiciones:

	x1
Platinum multiplex PCR Mastermix 2X (ABI #4464263)	6.25
Primer mix de Amplificación 10x	1.25
ADN (aprox 100ng)	5
Vol final	12.5

Preparación del Primer mix de Amplificación 10X:

Nombre	Volumen (µL) a tomar a partir de la solución 200 µM	Concentración final en el mix 10X
KRAS ex.2 Fw	1.75	7 µM
KRAS ex.2 Rev	1.75	7 µM
KRAS ex.3 Fw	0.75	3 µM
KRAS ex.3 Rev	0.75	3 µM
KRAS ex.4 Fw	a partir de 100uM: 5uL	10 µM
KRAS ex 4.Rev	a partir de 100uM: 5uL	10 µM

*Se prepara el primer mix y se agrega agua hasta llegar a vol. de 50µl.

• **Ciclo Amplificación:**

10 min.....	95°C	} 31 Ciclos
45 seg.....	95°C	
45 seg.....	58°C	
45 seg.....	72°C	
7min	72°C	

- Se corren los productos amplificados en un gel para chequear amplificación y se diluye el producto amplificado según la intensidad de las bandas.

• **Tamaños de los fragmentos:**

Exón 2: 163pb
 Exón 3: 155pb
 Exón 4: 193pb

• **Purificación Exo/SAP de los amplificados:**

	x1
Exonuclease (20U/ul)	0.06
Sap (1U/ul)	1.7
Producto PCR	5

En termociclador: 20 min. a 37°C
 15 min a 85°C.

• **Reacción de SNaPshot:**

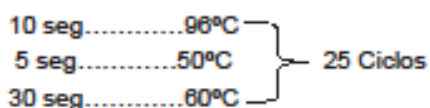
	x1
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix 2X	5
Producto PCR purificado	3
Primer mix Snapshot 10X	1
Agua	1
Vol final	10

Primer mix Snapshot:

Nombre	Volumen (µL) a tomar a partir de la solución 200 µM	Concentración final en el mix 10X
KRAS pos.351	a partir de primer 100uM: 1uL	2uM
KRAS pos. 436	a partir de primer 100uM: 1uL	2uM
KRAS pos. 437	a partir de primer 100uM: 1uL	2uM
KRAS pos. 175	a partir de primer 100uM: 1uL	2uM
KRAS pos.34	1uL	4uM
KRAS pos.35	0.25uL	1uM
KRAS pos.37	3.5uL	14uM
KRAS pos.38	0.25 uL	1uM
KRAS pos. 176	a partir de primer 100uM: 1uL	2uM
KRAS pos.181	0.2uL	0.8uM
KRAS pos.182	0.5uL	2uM
KRAS pos.183	0.2uL	0.8uM

*Se prepara el primer mix y se agrega agua hasta llegar a vol. de 50ul.

• **Ciclo Amplificación SnaPshot:**



• **Purificación SnaPshot:**

Al producto de la reacción de SnaPshot se le agregará 1 unidad de SAP.

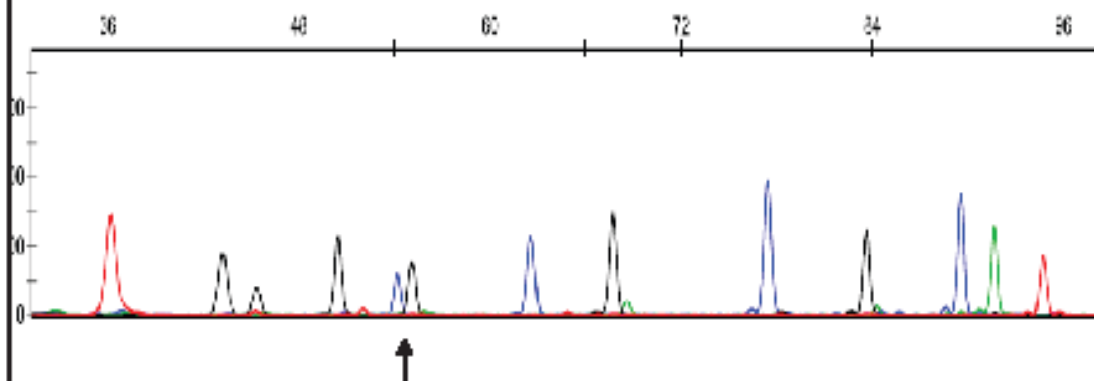
En termociclador: 1hr. a 37°C
 15 min a 85°C.

• **Se procede a correr en el secuenciador capilar:**

Se prepara un mix que contiene 11µL de formamida y 0,5µL de escalera interna GeneScan-120LIZ, por el número de muestras a analizar. Se distribuyen 11µL este mix en una gradilla nueva adicionando 3 µL de la amplificado de SnaPshot purificado.

Resultado esperado:

		Wt	Mut	Codon	Exón
KRAS pos.351	antisense	T	G/A	codon117	exón4
KRAS pos. 436	antisense	C	T/G	codon 146	exón4
KRAS pos. 437	sense	C	T	codon146	exón4
KRAS pos. 175	antisense	C	T	codon 59	exón3
KRAS pos.34	antisense	C	G/A/T	codon 12	exón2
KRAS pos.35	sense	G	C/A/T	codon 12	exón2
KRAS pos.37	antisense	C	G/A/T	codon 13	exón2
KRAS pos.38	sense	G	C/A/T	codon 13	exón2
KRAS pos. 176	sense	C	G	codon 59	exón3
KRAS pos.181	antisense	G	C/T	codon 61	exón3
KRAS pos.182	sense	A	C/G/T	codon 61	exón3
KRAS pos.183	antisense	T	G/A	codon 61	exón3



Caso mutado pos 34 (GCCACG) GxC

No conformidad (qué se hace):

1. Reextraer la muestra en caso de que en la cuantificación no de suficiente ADN
2. Reamplificar con control de inhibición en caso de que la muestra no amplifique pero tenga suficiente ADN
3. Repetir la reacción de Snapshot en caso de que haya exceso o que no haya amplificado

9.2. Anexo 2. Protocolo inicial para diagnóstico de NRAS por la técnica de SNaPshot.

	PROCOLO NRAS SNAPSHOT	Documento: IT.LA.067 Versión 2 Fecha: 25/06/2014 Página: 1 de 2
---	------------------------------	--

Título: Protocolo para detección de mutaciones en gen NRAS por SNaPshot.

Quién: Técnico de Laboratorio.

Dónde: En el laboratorio PRE-amplificación y POST-amplificación.

Condiciones necesarias: ABI PRISM SNaPshot Multiplex Ki, Platinum multiplex PCR Mastermix 2X, primers para amplificación de exón-2, exón-3 y exón-4 del gen N-ras, primers para SNaPshot para detección de variables: codones 12 y 13 en exón 2, codones 59 y 61 del exón 3 y codones 117 y 146 del exón 4.

Descripción de las actividades:

- Se extrae el ADN mediante el kit "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" de Promega, o mediante el kit "QiaAmp DNA FFPE tissue kit" de Qiagen.
- Se cuantifican mediante Real-Time PCR o mediante el equipo NanoQuant.
- Una vez que esta extraído y cuantificado el ADN se larga una primera reacción de PCR con las siguientes condiciones:

	x1
Platinum multiplex PCR Mastermix 2X (ABI #4464263)	6.25
Primer mix de Amplificación 10x	1.25
ADN (aprox 100ng)	5
Vol final	12.5

Preparación del Primer mix de Amplificación 10X:

Nombre	Volumen (µL) a tomar a partir de la solución 200 µM	Concentración final en el mix 10X
NRAS ex.2 Fw	1.75	7 µM
NRAS ex.2 Rev	1.75	7 µM
NRAS ex.3 Fw	0.75	3 µM
NRAS ex.3 Rev	0.75	3 µM
NRAS ex.4 Fw	a partir de 100uM: 5	10 µM
NRAS ex 4.Rev	a partir de 100uM: 5	10 µM

*Se prepara el primer mix y se agrega agua hasta llegar a vol. de 50µl.

• **Ciclo Amplificación:**

10 min.....	95°C	} 31 Ciclos
45 seg.....	95°C	
45 seg.....	58°C	
45 seg.....	72°C	
7min	72°C	

- Se corren los productos amplificados en un gel para chequear amplificación y se diluye el producto amplificado según la intensidad de bandas.

• **Tamaños de los fragmentos:**

Exón 2: 128pb
 Exón 3: 103pb
 Exón 4: 168pb

• **Purificación Exo/SAP de los amplificados:**

	x1
Exonuclease (20U/ul)	0.08
Sap (1U/ul)	1.7
Producto PCR	5

En termociclador: 20 min. a 37°C
 15 min a 85°C.

• **Reacción SnaPshot:**

	x1
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix 2X	5
Producto PCR purificado	3
Primer mix Snapshot 10X	1
Agua	1
Vol final	10

Primer mix Snapshot:

Nombre	Volumen (µL) a tomar a partir de la solución 200 µM	Concentración final en el mix 10X
NRAS pos.34	1.25	5µM
NRAS pos.35	1.25	5µM
NRAS pos.37	1.25	5µM
NRAS pos.38	1.75	7µM
NRAS pos.175	1.25	5µM
NRAS pos. 178	a partir de primer 100µM: 2.5	5µM
NRAS pos.180	0.75	3µM
NRAS pos.181	1.25	5µM
NRAS pos.182	0.5	2µM
NRAS pos.183	1.75	7µM
NRAS pos. 351	a partir de primer 100µM: 2.5	5µM
NRAS pos. 436	a partir de primer 100µM: 2.5	5µM
NRAS pos. 437	a partir de primer 100µM: 2.5	5µM

*Se prepara el primer mix y se agrega agua hasta llegar a vol. de 50µl.

• **Ciclo Amplificación SnaPshot:**

10 seg.....98°C
 5 seg.....50°C
 30 seg.....60°C

} 25 Ciclos

• **Purificación SnaPshot:**

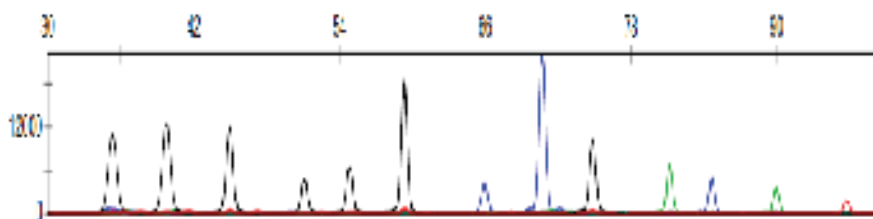
Al producto de la reacción de SnaPshot se le agregará 1 unidad de SAP.
 En termociclador: 1hr. a 37°C
 15 min a 85°C.

• **Se procede a correr en el secuenciador capilar:**

Se prepara un mix que contiene 11µL de formamida y 0,5µL de escalera interna GeneScan-120LIZ, por el número de muestras a analizar. Se distribuyen 11µL este mix en una gradilla nueva adicionando 3 µL de la muestra.

Resultado esperado:

		Wt	Mut	Codon	Exon
NRAS pos.176	sense	C	G	codon59	exón3
NRAS pos.175	antisense	C	T	codon 59	exón 3
NRAS pos. 351	antisense	C	G/A	codon 117	exón 4
NRAS pos. 438	antisense	C	T/G	codon148	exón 4
NRAS pos. 437	sense	C	T	codon 148	exón 4
NRAS pos.34	antisense	C	G/A/T	codon12	exón2
NRAS pos.35	sense	G	C/A/T	codon12	exón2
NRAS pos.37	sense	G	C/A/T	codon13	exón2
NRAS pos.38	antisense	C	G/A/T	codon13	exón2
NRAS pos.181	antisense	G	C/T	codon81	exón3
NRAS pos.182	sense	A	C/G/T	codon81	exón3
NRAS pos.183	antisense	T	A/G/C	codon81	exón3


No conformidad (qué se hace):

1. Reextraer la muestra en caso de que en la cuantificación no de suficiente ADN
2. Reamplificar con control de inhibición en caso de que la muestra no amplifique pero tenga suficiente ADN
3. Repetir la reacción de SnaPshot en caso de que haya exceso o que no haya amplificado

9.3. Anexo 3. Gráfica de amplificación típica en qPCR.

La gráfica de amplificación típica para qPCR (Figura 31) presenta:

- Una fase exponencial (geométrica)
- Una fase lineal
- Una fase de meseta o *plateau*
- Un determinado ruido de fondo
- Una línea basal
- Una línea umbral

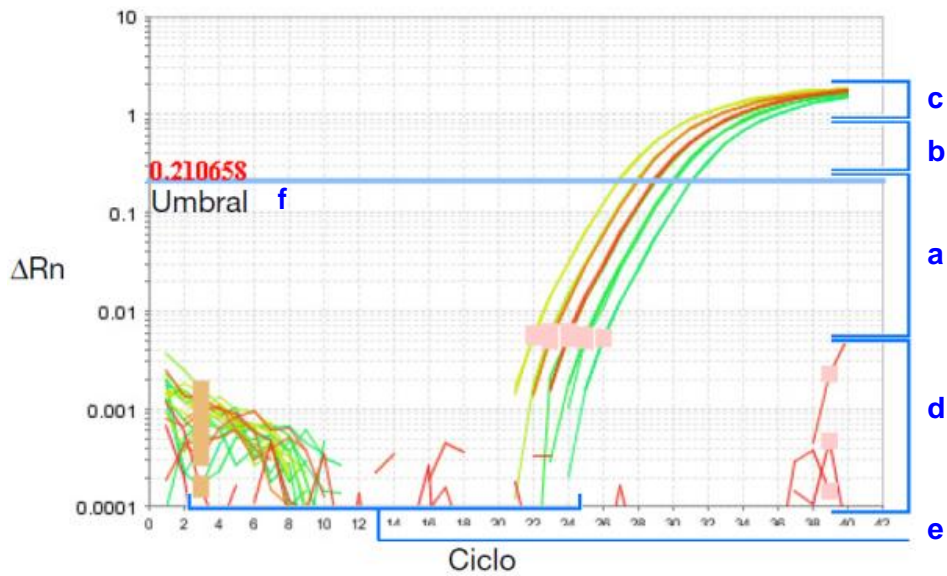
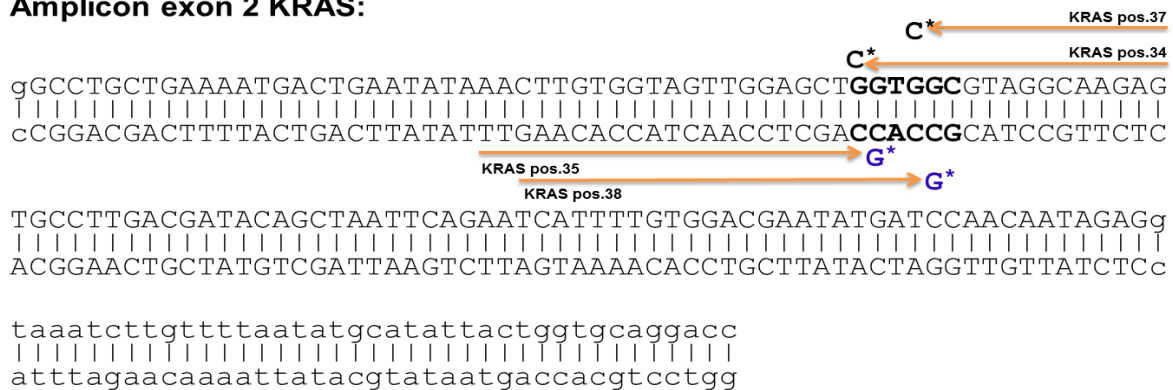


Figura 31: Gráfica de amplificación típica. Las distintas etapas son: a. fase exponencial; b. fase lineal; c. fase de meseta o plateau; d. ruido de fondo; e. línea basal; f. línea umbral.
Adaptado de http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_053238.pdf

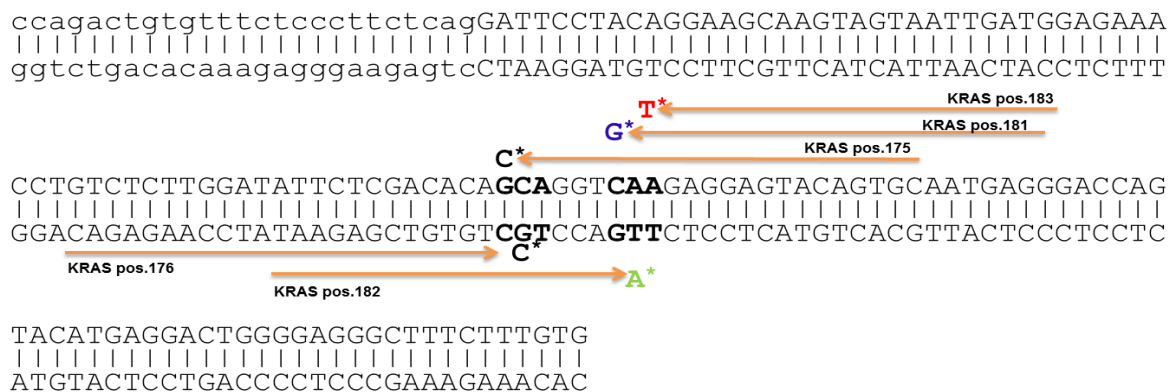
9.4. Anexo 4. Cebadores para la reacción de SNaPshot del gen *KRAS*.

En la figura 32 se presentan los cebadores para la reacción de SNaPshot del gen *KRAS*. Los mismos se encuentran posicionados, según sea fwd o rv, sobre la secuencia del exón correspondiente. Siguiendo a cada cebador se presenta el ddNTP marcado que se incorporaría.

Amplicon exón 2 *KRAS*:



Amplicon exón 3 *KRAS*:



Amplificado exón 4 *KRAS*:

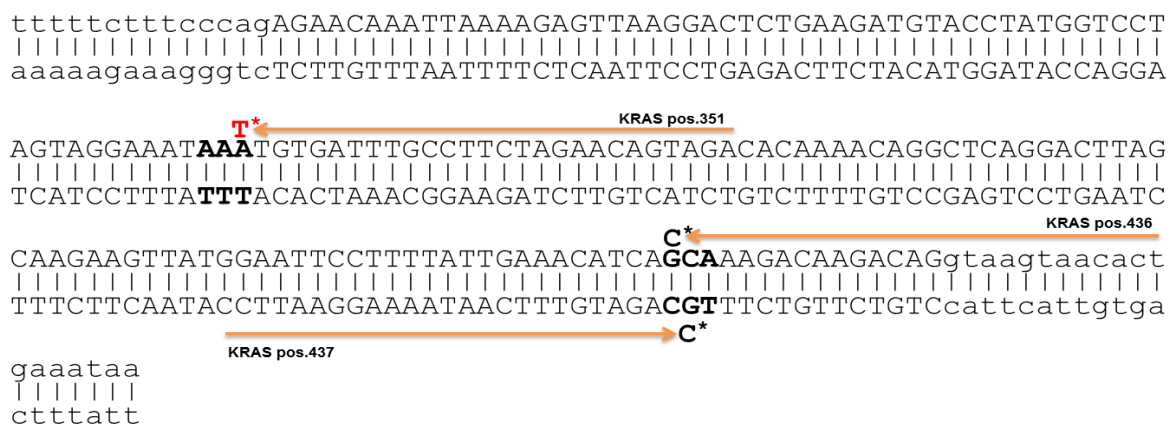


Figura 32: Esquema ilustrando los cebadores de SNaPshot sobre los productos amplificados (en la PCR de exones) de los exones 2, 3, 4 del gen *KRAS*. Las flechas representan los distintos cebadores que al hibridarse a la secuencia de *KRAS* servirán de cebo para la incorporación del nucleótido complementario a la mutación estudiada. Flechas: cebadores SNaPshot *KRAS*; letras en negrita: codones; letras en colores con asterisco: ddNTPs marcados con un fluorocromo (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP).

9.5. Anexo 5. Estudio de posiciones de mutaciones y picos WT para el gen *KRAS*.

En la Tabla 17 se presentan las posiciones de los nucleótidos esperados y las posibles mutaciones para cada una de las posiciones estudiadas del gen *KRAS*.

Tabla 17: Estudio de posiciones de *KRAS* para mutaciones e interferencias. Las letras subrayadas representan las posibles interferencias en los picos del electroferograma.

POSICIÓN	Nucleótido esperado (WT)	Posibles mutaciones (subrayada la mutación coincidente con la posible interferencia)	Los tres nucleótidos siguientes a la posición estudiada en la secuencia de <i>KRAS</i> : posibles interferencias.
<i>KRAS</i> pos.351	T	<u>G</u> / A	<u>T</u> T A
<i>KRAS</i> pos.436	C	<u>T</u> / G	<u>T</u> G A
<i>KRAS</i> pos.437	C	<u>T</u>	A A A
<i>KRAS</i> pos.175	C	<u>T</u>	<u>T</u> G T
<i>KRAS</i> pos.34	C	A / <u>G</u> / T	A G C
<i>KRAS</i> pos.35	G	<u>T</u> / C / A	<u>T</u> G G
<i>KRAS</i> pos.37	C	A / <u>G</u> / T	A C C
<i>KRAS</i> pos.38	G	C / A / <u>T</u>	C G T
<i>KRAS</i> pos.176	C	A / <u>G</u>	A G G
<i>KRAS</i> pos.181	G	C / <u>T</u>	A C C
<i>KRAS</i> pos.182	A	C / <u>G</u> / T	A G A
<i>KRAS</i> pos.183	T	<u>G</u> / A	T G A

Ubicación relativa de picos mutados, según sea el tamaño del correspondiente fluoróforo:

A (479) x C (366) = desplazado 0,10 dNMP a la izquierda
A (479) x G (366) = desplazado 0,34 dNMP a la izquierda
A (479) x T (635) = desplazado 0,5 dNMP a la derecha
C (430) x G (366) = desplazado 0,2 dNMP a la izquierda
C (430) x A (479) = desplazado 0,15 dNMP a la derecha
C (430) x T (635) = desplazado 0,6 dNMP a la derecha
G (366) x C (430) = desplazado 0,2 dNMP a la derecha
G (366) x A (479) = desplazado 0,3 dNMP a la derecha
G (366) x T (635) = desplazado 0,8 dNMP a la derecha
T (635) x G (366) = desplazado 0,8 dNMP a la izquierda
T (635) x A (479) = desplazado 0,5 dNMP a la izquierda

9.6. Anexo 6. Nomenclatura mutaciones para los genes *KRAS* y *NRAS*.

En la Tabla 18 se detallan todas las mutaciones estudiadas en este trabajo con su correspondiente nomenclatura.

Tabla 18: Nomenclatura de mutaciones esperadas para los genes *KRAS* y *NRAS*.

Gen	Exón	Codón	Posición	Nomenclatura
<i>KRAS</i>	2	12	34	c.34G>T p.Gly12Cys
<i>KRAS</i>	2	12	34	c.34G>A p.Gly12Ser
<i>KRAS</i>	2	12	34	c.34G>C p.Gly12Arg
<i>KRAS</i>	2	12	35	c.35G>T p.Gly12Val
<i>KRAS</i>	2	12	35	c.35G>A p.Gly12Asp
<i>KRAS</i>	2	12	35	c.35G>C p.Gly12Ala
<i>KRAS</i>	2	13	37	c.37G>T p.Gly13Cys
<i>KRAS</i>	2	13	37	c.37G>A p.Gly13Ser
<i>KRAS</i>	2	13	37	c.37G>C p.Gly13Arg
<i>KRAS</i>	2	13	38	c.38G>T p.Gly13Val
<i>KRAS</i>	2	13	38	c.38G>A p.Gly13Asp
<i>KRAS</i>	2	13	38	c.38G>C p.Gly13Ala
<i>KRAS</i>	3	59	175	c.175G>A p.Ala59Thr
<i>KRAS</i>	3	59	175	c.175G>T p.Ala59Ser
<i>KRAS</i>	3	59	176	c.176C>A p.Ala59Glu
<i>KRAS</i>	3	59	176	c.176C>G p.Ala59Gly
<i>KRAS</i>	3	61	181	c.181C>A p.Gln61Lys
<i>KRAS</i>	3	61	181	c.181C>G p.Gln61Glu
<i>KRAS</i>	3	61	182	c.182A>C p.Gln61Pro
<i>KRAS</i>	3	61	182	c.182A>T p.Gln61Leu
<i>KRAS</i>	3	61	182	c.182A>G p.Gln61Arg
<i>KRAS</i>	3	61	183	c.183A>C p.Gln61His
<i>KRAS</i>	3	61	183	c.183A>T p.Gln61His
<i>KRAS</i>	4	117	351	c.351A>C p.Lys117Asn
<i>KRAS</i>	4	117	351	c.351A>T p.Lys117Asn
<i>KRAS</i>	4	146	436	c.436G>A p.Ala146Thr
<i>KRAS</i>	4	146	436	c.436G>C p.Ala146Pro
<i>KRAS</i>	4	146	437	c.437C>G p.Ala146Gly
<i>KRAS</i>	4	146	437	c.437C>T p.Ala146Val
<i>NRAS</i>	2	12	34	c.34G>T p.Gly12Cys
<i>NRAS</i>	2	12	34	c.34G>A p.Gly12Ser
<i>NRAS</i>	2	12	34	c.34G>C p.Gly12Arg
<i>NRAS</i>	2	12	35	c.35G>T p.Gly12Val
<i>NRAS</i>	2	12	35	c.35G>A p.Gly12Asp
<i>NRAS</i>	2	12	35	c.35G>C p.Gly12Ala
<i>NRAS</i>	2	13	37	c.37G>T p.Gly13Cys

<i>NRAS</i>	2	13	37	c.37G>A p.Gly13Ser
<i>NRAS</i>	2	13	37	c.37G>C p.Gly13Arg
<i>NRAS</i>	2	13	38	c.38G>T p.Gly13Val
<i>NRAS</i>	2	13	38	c.38G>A p.Gly13Asp
<i>NRAS</i>	2	13	38	c.38G>C p.Gly13Ala
<i>NRAS</i>	3	59	175	c.175G>A p.Ala59Thr
<i>NRAS</i>	3	59	176	c.176C>A p.Ala59Asp
<i>NRAS</i>	3	61	181	c.181C>A p.Gln61Lys
<i>NRAS</i>	3	61	181	c.181C>G p.Gln61Glu
<i>NRAS</i>	3	61	182	c.182A>C p.Gln61Pro
<i>NRAS</i>	3	61	182	c.182A>T p.Gln61Leu
<i>NRAS</i>	3	61	182	c.182A>G p.Gln61Arg
<i>NRAS</i>	3	61	183	c.183A>C p.Gln61His
<i>NRAS</i>	3	61	183	c.183A>T p.Gln61His
<i>NRAS</i>	4	117	351	c.351G>C p.Lys117Asn
<i>NRAS</i>	4	117	351	c.351G>T p.Lys117Asn
<i>NRAS</i>	4	146	436	c.436G>A p.Ala146Thr
<i>NRAS</i>	4	146	436	c.436G>C p.Ala146Pro
<i>NRAS</i>	4	146	437	c.437C>G p.Ala146Gly
<i>NRAS</i>	4	146	437	c.437C>T p.Ala146Val

9.7. Anexo 7. Límite del blanco.

La Tabla 19 presenta los resultados del LB para el equipo ABI3500xL, para cada fluoróforo (R110, R6G, ROX y TAMRA) de cada gen, *KRAS* y *NRAS*.

Tabla 19: LB para el equipo ABI3500xL. Se realizó el promedio y la desviación estándar de cada fluoróforo para cada gen.

KRAS			
Color (Fluoróforo)	Promedio	SD	LB
R110 (Azul)	5,36	8,8	32
R6G (Verde)	7,89	15,62	55
ROX (Rojo)	5,41	3,66	16
TAMRA (Amarillo)	5,83	4,59	20
NRAS			
Color (Fluoróforo)	Promedio	SD	LB
R110 (Azul)	4,92	6,2	24
R6G (Verde)	15,74	33,97	118
ROX (Rojo)	11,11	29,28	99
TAMRA (Amarillo)	8,88	20,85	71