



CIO Centro
de investigaciones
oncológicas.



Análisis de oncogenes prevalentes en biopsias líquidas de melanoma cutáneo

Centro de Investigaciones Oncológicas-Fundación Cáncer (CIO-FUCA)

Lucía Correa

Directora: Dra. Mariana Aris

2022

Agradecimientos

A mi familia por apoyarme siempre, por darme la oportunidad de estudiar y de elegir esta carrera.

A mi novio por ser mi compañero de vida y de estudio, por ayudarme e incentivarme siempre.

A Mel y Meri por todos los días de estudio, por la compañía en los últimos años de carrera y por su apoyo. A Lari, Agus y Aye por todos los momentos compartidos durante esta etapa. Gracias chicas por su amistad.

A la UNSAM por darme el lugar para estudiar la carrera que elegí.

Al laboratorio CIO-FUCA por brindarme el espacio para realizar mi tesina, y a todo su equipo por ser siempre tan compañeros y transmitirme tan buena energía.

A Mariana, mi directora de tesis, por acompañarme y guiarme durante todo este trabajo y motivarme cuando algo se complicaba.

A la Fundación Cáncer FUCA, a la Fundación Sales, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por su contribución con fondos para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Resumen | 4 |
| Siglas | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| 1-Melanoma cutáneo (MC) | 8 |
| 1.1-Biología Molecular del Melanoma Cutáneo | 13 |
| 1.2-Diagnóstico molecular | 16 |
| 2-Biopsias líquidas | 17 |
| 2.1-Relevancia clínica | 19 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 20 |
| 1-Hipótesis | 21 |
| 2-Objetivo general | 21 |
| 3-Objetivos específicos | 21 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 1- Población de estudio | 22 |
| 2- Obtención de biopsias líquidas | 22 |
| 3-Optimización de la determinación de los niveles de BRAF, NRAS y TERT por PCR cuantitativa | 22 |
| 3.1. Obtención de controles | 23 |
| 3.2.Diseño de primers y sondas | 24 |
| NRAS | 24 |
| BRAF | 24 |
| TERT | 25 |
| 3.3.Optimización de primers por PCR de punto final | 25 |
| NRAS | 26 |
| BRAF | 26 |
| TERT | 26 |
| 3.4.Análisis de los productos de PCR | 28 |
| 3.5.PCR Cuantitativa | 29 |
| NRAS | 29 |
| BRAF | 30 |
| TERT | 31 |
| 4- Procesamiento de muestras para ddPCR | 34 |
| 5- Optimización de la determinación de los niveles de BRAF, NRAS y TERT por PCR digital | 34 |
| NRAS | 34 |
| BRAF | 35 |
| TERT | 36 |
| 6- Análisis de biopsias líquidas por PCR digital | 38 |
| 7- Análisis de correlaciones | 40 |

| | |
|---|-----------|
| RESULTADOS | 41 |
| 1- Optimización de la detección de variantes prevalentes en oncogenes de melanoma cutáneo | 41 |
| 1.1-NRAS | 41 |
| 1.2-BRAF | 49 |
| 1.3-TERT | 51 |
| Combinación #1 | 51 |
| Combinación #2 | 52 |
| 2- Determinación de los niveles de ADNct en biopsias líquidas de melanoma cutáneo | 64 |
| DISCUSIÓN | 70 |
| BIBLIOGRAFÍA | 73 |
| ANEXO TEÓRICO | 76 |
| 1-PCR de punto final | 76 |
| 2-PCR Touchdown | 77 |
| 3-PCR Touch-up (TU) | 78 |
| 4-PCR Cuantitativa y PCR digital | 78 |
| ANEXO DE CÁLCULOS | 81 |
| 1-NRAS | 81 |
| 2-BRAF | 84 |

Resumen

Introducción. El melanoma cutáneo (MC) es el cáncer de piel con mayor tasa de mortalidad. Un desafío actual es establecer parámetros que permitan un rápido seguimiento de la respuesta clínica de los pacientes a diferentes terapias. Por lo que planteamos como hipótesis de trabajo que la determinación de los niveles de ADN circulante tumoral (ADNct) en muestras de biopsias líquidas de pacientes con melanoma metastásico sería un biomarcador de la carga tumoral sistémica del paciente, con impacto tanto en el pronóstico inicial como en la respuesta clínica al tratamiento asignado. Y como objetivo analizar los niveles de oncogenes prevalentes en ADNct en biopsias líquidas de plasma sanguíneo de una población de pacientes con melanoma cutáneo metastásico, y su correlación con la evolución clínica.

Metodología. Se analizó una cohorte de 19 pacientes con MC: 4 estadio III y 15 estadio IV; 5 pacientes recibieron inhibidores y 14 inmunoterapia. Se recolectó sangre anticoagulada con EDTA a las 0,6, y 12 semanas desde el inicio del tratamiento, purificando el ADN circulante libre de células del plasma. Se trabajó en la optimización de ensayos para la detección de biomarcadores en oncogenes prevalentes en MC por PCR digital: $BRAF^{V600E}$ junto a $BRAF^{V600K}$ ($BRAF^{V600MUT}$), $NRAS^{Q61K}$ junto a $NRAS^{Q61R}$ ($NRAS^{Q61MUT}$), y $pTERT^{-124}$ junto a $pTERT^{-146}$ ($pTERT$). Los ensayos de detección por sondas de hidrólisis (sistema fluoróforo/bloqueador) fueron diseñados en el laboratorio y optimizados en forma secuencial por PCR de punto final, PCR cuantitativa, y PCR digital.

Resultados. Se optimizaron las reacciones $BRAF^{V600mut}$ y $NRAS^{Q61mut}$ para PCR digital, estableciendo un LOB/LOD de 1/5 y 5,47/10,90 respectivamente. Con respecto al análisis de las biopsias líquidas de los pacientes, se obtuvo ADN circulante libre de células en todas las muestras de plasma (n=48), con biomarcador evaluable en 16/19 casos. En los casos $BRAF^{V600MUT}$, en aquellos pacientes libres de enfermedad no se detectó ADNct. En aquellos con enfermedad estable o respuesta parcial, se observó una disminución a cero de los niveles de ADNct. Aquellos que progresaron presentaron ADNct>10% al inicio y ADNct>0% al final del período de seguimiento. En los casos $BRAF^{V600WT}$, uno con enfermedad estable presentó disminución a cero de ADNct $NRAS^{Q61MUT}$, y otro con progresión niveles estables de ADNct.

Conclusiones. El análisis de esta población inicial revela que se detectó ADNct en pacientes con MC de diferentes estadios clínicos, tratados con inhibidores o con inmunoterapia. Los niveles iniciales de ADNct y sus variaciones reflejaron la respuesta clínica al tratamiento. Estos resultados destacan el potencial de las biopsias líquidas para monitorear la evolución clínica de los pacientes en tiempo real y en forma no invasiva.

Palabras clave: biopsias líquidas, melanoma cutáneo, oncogenes, ADN circulante tumoral, PCR digital

Siglas

Control sin templado (NTC, *non-template control*)
Melanoma cutáneo (MC)
Proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)
MAPK quinasa quinasa (MAPKKK)
Valina (V)
Ácido glutámico (E)
Lisina (K)
Glutamina (Q)
Arginina (R)
Leucina (L)
Fosfatidilinositol-3-Quinasa (PI3K)
Transcriptasa reversa del gen de la telomerasa (TERT)
Promotor TERT (TERTp)
Factores de transcripción E-26 (ETS)
Factor complejo ternario (TCF)
ADN libre de células circulantes (ADNclc)
PCR cuantitativa (qPCR)
Ácido desoxirribonucleico (ADN)
ADN circulante tumoral (ADNct)
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
PCR digital por gotas (ddPCR)
Marcadores de peso molecular (MPM)
Deoxinucleótidos trifosfato (dNTP)
Límite de blanco (LoB)
Límite de detección (LoD)
Instituto Alexander Fleming (IAF)
Touchdown (TD)
NGS (*next generation sequencing*)
Factores de intercambio de guanina (GEF)
Proteínas activadoras de GTPasa (GAP)
Neurofibromina 1 (NF1)
Proteínas MAP quinasas quinasa quinasa 1 activada por mitógeno (MAP2K1)
Proteína quinasa quinasa 2 activada por mitógeno (MAP2K2)
Proteína quinasa 3 activada por mitógeno (MAPK3 o ERK1)
Proteína quinasa 1 activada por mitógeno (MAPK1 o ERK2)
Receptor tirosina quinasa (RTK)
Factor complejo ternario (TCF)
Mecanismos de mantenimiento de los telómeros (TMM)
PCR en tiempo real (RT-qPCR)
Células tumorales circulantes (CTC)
MicroARN (miARN)

ARN no codificantes (ARNnc)

Gen Septin-9 (SEPT9)

Promedio de falsos positivos (Δ FP)

Copias de ADNc por pocillo de reacción (ADNc CPP)

Copias de ADNc por ml de plasma (ADNc CPMP)

Fracción alélica mutacional (FAM)

Los resultados de esta tesis fueron parcialmente presentados en el IV Congreso Latinoamericano de Farmacogenética y Medicina Personalizada (2021):

ANÁLISIS DE BIOMARCADORES PREVALENTES POR PCR DIGITAL EN BIOPSIAS LÍQUIDAS DE MELANOMA CUTÁNEO

LL Correa, MM Barrio, MB Sánchez, A Blanco, P Mandó, Y Pflüger, M Angel, M Bianchini, V Taly, M Chacon, J Mordoh, M Aris

Este trabajo obtuvo una mención por mejor trabajo, otorgado por la Sociedad Latinoamericana de Farmacogenética y Medicina Personalizada.

INTRODUCCIÓN

1-Melanoma cutáneo (MC)

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos, células que producen el pigmento melanina y que derivan de la cresta neural. La mayoría de los melanomas son cutáneos (MC), se originan en la piel, pero también surgen en las mucosas o en otros sitios a los que migran los melanocitos desde la cresta neural, como la úvea del ojo (melanoma ocular). Los melanomas uveales son muy diferentes al melanoma cutáneo en aspectos como la incidencia, los factores pronósticos, las características moleculares y el tratamiento (NIH, 2022).

Aunque el melanoma cutáneo constituye ~5% de todos los cánceres de piel, representa >75% de las muertes. La tasa de supervivencia relativa a 5 años de los pacientes con enfermedad localizada o regional es del 98% y 64%, respectivamente. Por el contrario, la tasa de supervivencia a 5 años cae al 23% en pacientes con melanoma metastásico. Una de las complicaciones más comunes que experimentan los pacientes con melanoma avanzado es la metástasis en el cerebro, que se diagnostica en >60 % de los casos y se identifica en hasta el 80% de los pacientes en la autopsia (Rebecca W. et al, 2020).

El melanoma cutáneo presenta una incidencia creciente principalmente en las poblaciones de piel clara de todo el mundo. El aumento del riesgo de melanoma cutáneo se debe a una exposición elevada y en crecimiento a la radiación ultravioleta; así como a factores que incluyen antecedentes familiares, fenotipos pigmentarios, número de nevos melanocíticos, la longitud de los telómeros e inmunosupresión (Landi *et al.*, 2020).

La **Figura 1** es una representación esquemática de la estructura normal de la piel en la que se indican los principales tipos de células que se encuentran en cada compartimento. En términos generales, existen dos compartimentos grandes, la epidermis avascular y la dermis vascular, con muchos tipos de células distribuidas en una matriz de tejido conectivo, formada en gran parte por fibroblastos. En condición fisiológica, los melanocitos se disponen a nivel de la capa basal epidérmica y contactan con los queratinocitos por medio de sus dendritas, a razón de un melanocito por cada 40 queratinocitos (unidad melánica epidérmica), o un melanocito por cada 9 células basales. La piel normal tiene melanocitos, que son las células en las que se origina el melanoma (NIH, 2022). Los melanocitos se derivan de las células de la cresta neural y migran al compartimento epidérmico cerca de la octava semana de edad gestacional. Los melanocitos contienen melanina, que se empaqueta en los melanosomas y se transporta a los queratinocitos cercanos para inducir la pigmentación de la piel (NIH, 2022).

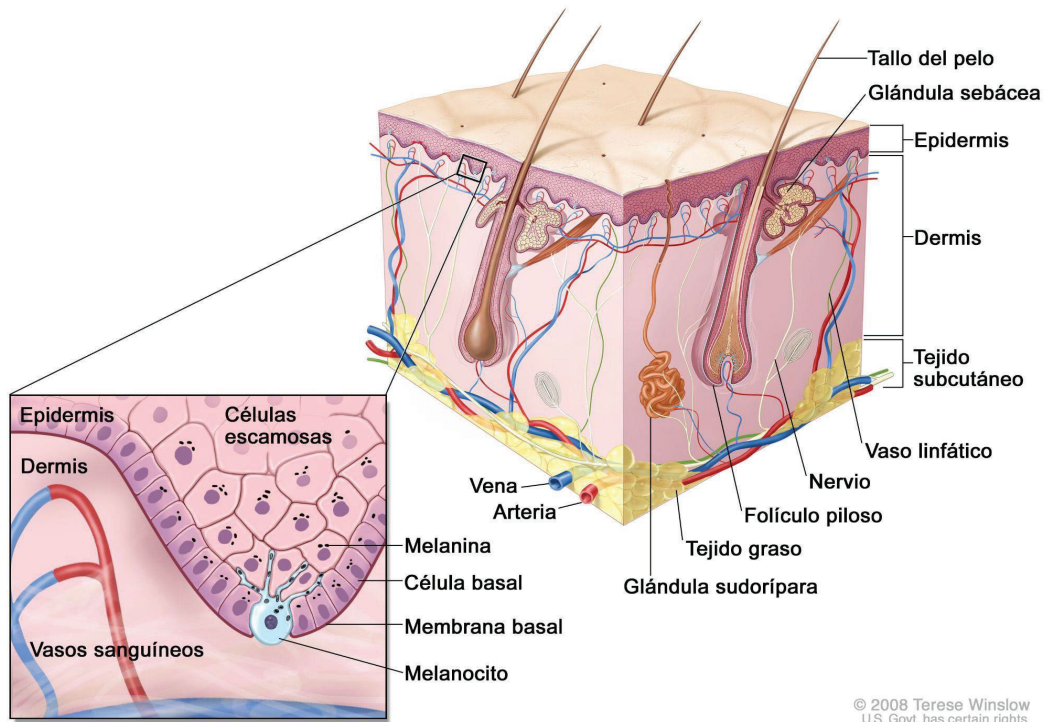


Figura 1. Representación esquemática de la estructura normal de la piel (NIH,2022).

En la **Figura 2** se observan lesiones de melanomas con asimetría, bordes irregulares, variación de color y diámetro grande.



Figura 2. Distintas lesiones de melanoma cutáneo (NIH, 2022).

Una vez diagnosticado un melanoma, se hacen pruebas para saber si las células cancerosas se diseminaron en la piel y en otras partes del cuerpo. La estadificación es la determinación del estado de progresión de la enfermedad tumoral, y depende del espesor del tumor primario, su diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos regionales y a otras partes del cuerpo (sistema TNM, AJCC-UICC), junto a otros factores clínicos e histopatológicos (Gershenwald et al., 2018). La información que se obtiene de este proceso determina el estadio de la enfermedad, lo cual es importante para planificar el tratamiento.

Los siguientes estadios clínicos se utilizan en la estadificación del melanoma cutáneo:

Estadio 0 (melanoma *in situ*)

En el estadio 0 (**Figura 3**), se encuentran melanocitos anormales en la epidermis. Es posible que estos melanocitos anormales se vuelvan cancerosos y se diseminen al tejido normal cercano. El estadio 0 también se llama melanoma *in situ* (NIH, 2021).

Stage 0 Melanoma

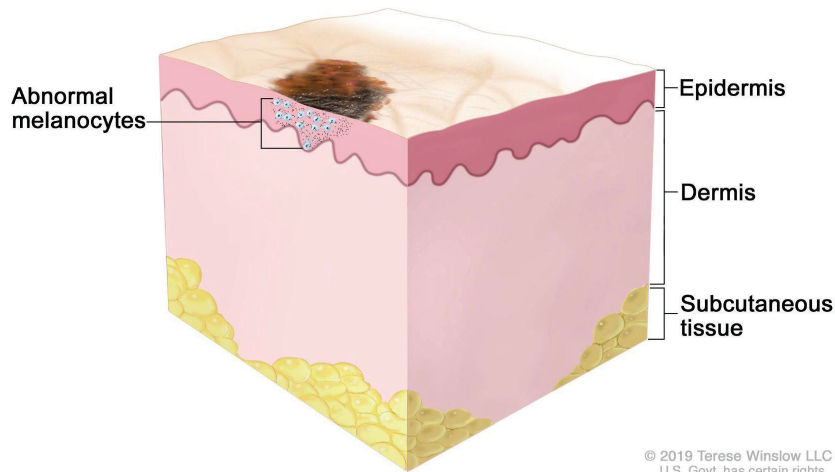


Figura 3: Representación del estadio 0 (melanoma *in situ*) de melanoma cutáneo (NIH, 2021).

Estadio I

En el estadio I (**Figura 4**), el cáncer se formó, ocurrió la transformación tumoral de los melanocitos en melanoma. El estadio I se divide en los estadios IA y IB. En el estadio IA, el tumor no mide más de 1 mm de grosor. En el estadio IB, el tumor mide más de 1 mm, pero no más de 2 mm de grosor. A veces puede haber ruptura de la epidermis o ulceración. Los melanomas que están ulcerados tienden a presentar un peor pronóstico (NIH, 2021).

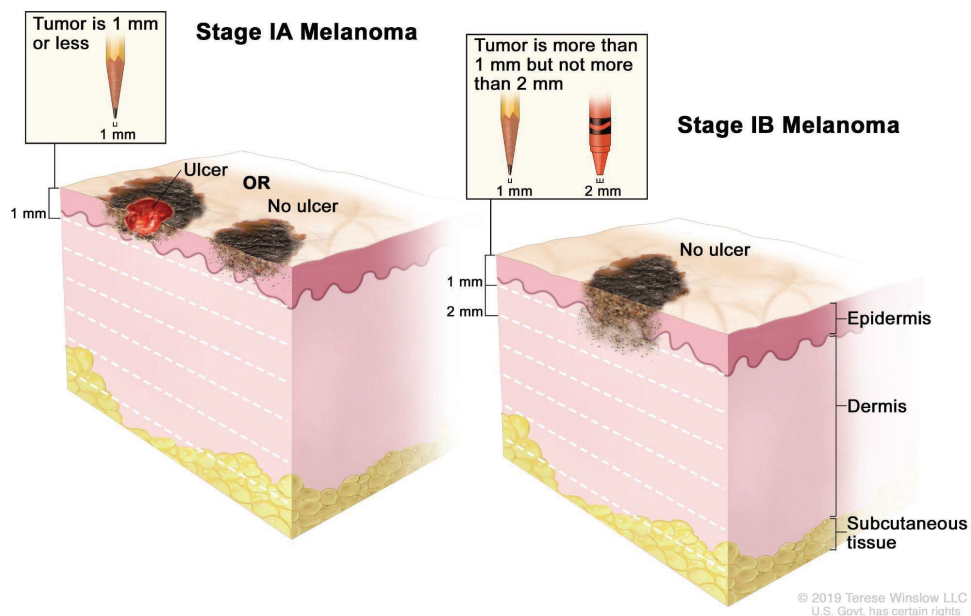


Figura 4: Representación del estadio IA y IB de melanoma cutáneo (NIH, 2021).

Estadio II

El estadio II se divide en los estadios IIA, IIB y IIC, dependiendo de la medida del tumor (mm), del grosor (mm), y de la presencia o ausencia de ulceración (NIH, 2021).

Estadio III

El estadio III (**Figura 5**) se divide en los estadios IIIA, IIIB, IIIC y IIID. En todos los casos se encuentra cáncer en por lo menos 1 ganglio linfático regional al tumor primario. Varía la medida del tumor (mm), la presencia o ausencia de ulceración, el número de ganglios linfáticos afectados, si son micro/macrometástasis, y si hay ruptura capsular del ganglio (NIH, 2021).

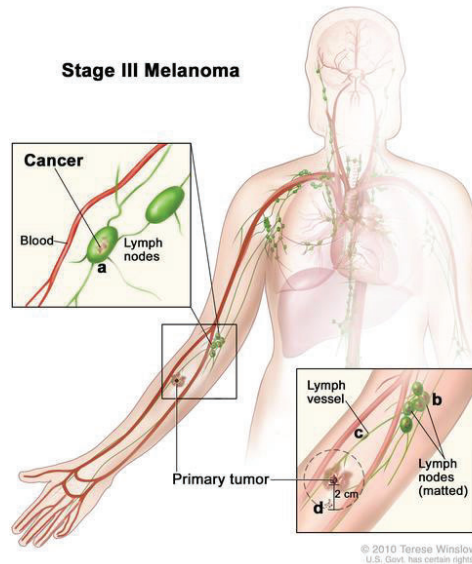


Figura 5: Representación del estadio III de melanoma cutáneo (NIH, 2021).

Estadio IV

En el estadio IV (**Figura 6**), el cáncer se ha diseminado a lugares alejados del sitio original, como piel o ganglios linfáticos lejanos, pulmón, hígado, médula espinal, hueso, tejido blando (incluso el músculo), tubo gastrointestinal, y cerebro (NIH, 2021).

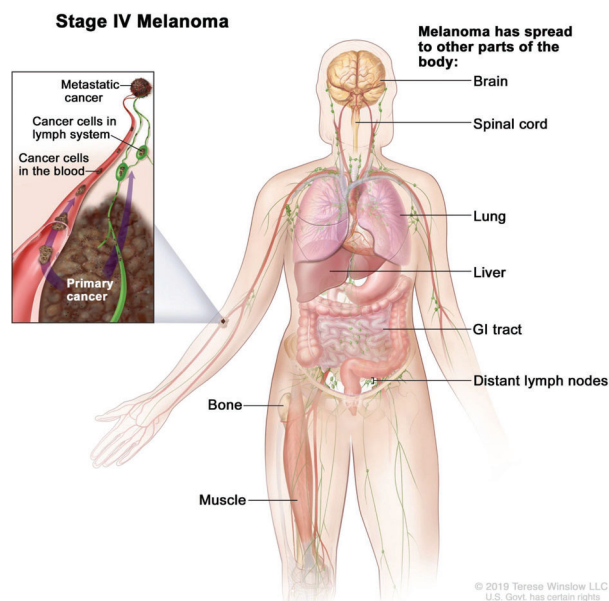


Figura 6. Representación del estadio IV de melanoma cutáneo (NIH, 2021).

El cáncer se disemina en el cuerpo de tres maneras: a través del tejido, del sistema linfático y la sangre. En el tejido, el cáncer se disemina desde donde comenzó y se extiende hacia las áreas cercanas. También puede colonizar el sistema linfático, y de ahí entrar en circulación linfática y/o sanguínea, llegando a otros tejidos y formando metástasis en otras partes del cuerpo. El tumor metastásico es el mismo tipo de cáncer que el tumor primario. Por ejemplo, si el melanoma se disemina al pulmón, las células cancerosas en el pulmón son, en realidad, células tumorales de melanoma. La enfermedad es melanoma metastásico, no cáncer de pulmón. En ocasiones el melanoma recidiva después del tratamiento, es decir que el cáncer puede regresar en el área donde comenzó o en otras partes del cuerpo, como los pulmones o el hígado (NIH, 2021).

El inicio y la progresión del melanoma cutáneo están finamente impulsados por alteraciones genéticas específicas. Aunque se pueden encontrar cientos de genes mutados en un solo caso de melanoma cutáneo, sólo algunas mutaciones en genes clave son verdaderos "impulsores" del tumor (*driver mutations*). El melanoma puede presentar mutaciones en oncogenes conocidos que luego resultan hiperactivos en las células del melanoma, lo que garantiza un crecimiento tumoral descontrolado. También pueden ocurrir mutaciones en los genes supresores de tumores que controlan el crecimiento celular y que cuando mutan, estos genes pierden su función permitiendo el crecimiento tumoral sin control (Scatena, 2021).

Una vez analizado el estadio del cáncer se puede determinar el tratamiento más adecuado para el paciente de melanoma. Los tratamientos estándar son:

Cirugía: Es el tratamiento primario que se usa para el melanoma en cualquier estadio (NIH, 2021).

Quimioterapia: se usan medicamentos para interrumpir la formación de células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o al impedir su multiplicación (NIH, 2021).

Radioterapia: se usan rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir que se multipliquen (NIH, 2021).

Terapia dirigida: La terapia dirigida es un tipo de tratamiento para el que se utilizan medicamentos u otras sustancias a fin de identificar y atacar células cancerosas específicas. Por lo general, las terapias dirigidas causan menos daño a las células normales que la quimioterapia o la radioterapia (NIH, 2021).

- La terapia con inhibidores de la transducción de señales se usa para tratar pacientes con melanoma avanzado o tumores que no es posible extirpar, algunos de ellos son:

Inhibidores BRAF (dabrafenib, vemurafenib, encorafenib) que bloquean la actividad de proteínas elaboradas por los genes BRAF mutados (NIH, 2021).

Inhibidores MEK (trametinib, cobimetinib, binimetinib) que bloquean unas proteínas llamadas MEK1 y MEK2 que afectan la multiplicación y supervivencia de las células cancerosas (NIH, 2021).

Las combinaciones de inhibidores BRAF e inhibidores MEK que se usan para tratar el melanoma son Dabrafenib y trametinib, Vemurafenib y cobimetinib o Encorafenib y binimetinib (NIH, 2021).

Inmunoterapia: Se usa el sistema inmunitario del paciente para combatir el cáncer. Se utilizan sustancias elaboradas por el cuerpo o en el laboratorio para impulsar, dirigir o restaurar al sistema inmunológico del cuerpo contra el cáncer (NIH, 2021). Hay distintos tipos de inmunoterapias, las principales son:

- Terapia con inhibidores de puntos de control inmunológico.
- Terapia con inhibidor de CTLA-4:

CTLA-4 es una proteína en la superficie de las células T que ayuda al cuerpo a mantener bajo control las respuestas inmunitarias y evitar una reacción exacerbada. Cuando CTLA-4 se une a otra proteína que se llama B7 en una célula cancerosa, impide que la célula T destruya la célula cancerosa. Los inhibidores de CTLA-4 se unen a CTLA-4 y permiten que las células T destruyan las células cancerosas al impedir la unión con B7. El ipilimumab es un anticuerpo monoclonal inhibidor de CTLA-4 (NIH, 2021).

- Terapia con inhibidores de PD-1 y PD-L1:

PD-1 es una proteína de la superficie de las células T que ayuda a mantener bajo control las respuestas inmunitarias del cuerpo. PD-L1 es una proteína que se encuentra en algunos tipos de células cancerosas. Cuando PD-1 se une a PD-L1, impide que la célula T destruya la célula cancerosa. Los inhibidores de PD-1 y PD-L1 evitan que las proteínas PD-1 y PD-L1 se unan entre sí, lo que permite que las células T destruyan células cancerosas. El pembrolizumab y el nivolumab son anticuerpos monoclonales inhibidores de PD-1 (NIH, 2021).

1.1-Biología Molecular del Melanoma Cutáneo

La vía RAS/MAPK consiste en una cadena de proteínas intracelulares que regula las funciones fisiológicas de las células, incluido el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis. Los genes RAS incluyen NRAS, HRAS y KRAS, una familia multigénica que codifica GTPasas unidas a nucleótidos de guanina. La vía de señalización comienza con la interacción entre un ligando y un receptor de superficie celular, ya sea un receptor acoplado a proteína G o un receptor tirosina quinasa (Figura 7). Esto conduce a la activación de RAS mediante la conversión de RAS-GDP en RAS-GTP. A diferencia de los factores de intercambio de guanina (GEF), las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) catalizan la hidrólisis de GTP por RAS, ya que RAS en sí tiene una actividad de GTPasa intrínseca baja (Al Mahi et al.,2022). En particular, la neurofibromina 1 (NF1) regula negativamente este paso a través de la actividad de la proteína activadora de GTPasa que convierte el RAS-GTP activo en el RAS-GDP inactivo (Al Mahi et al.,2022).

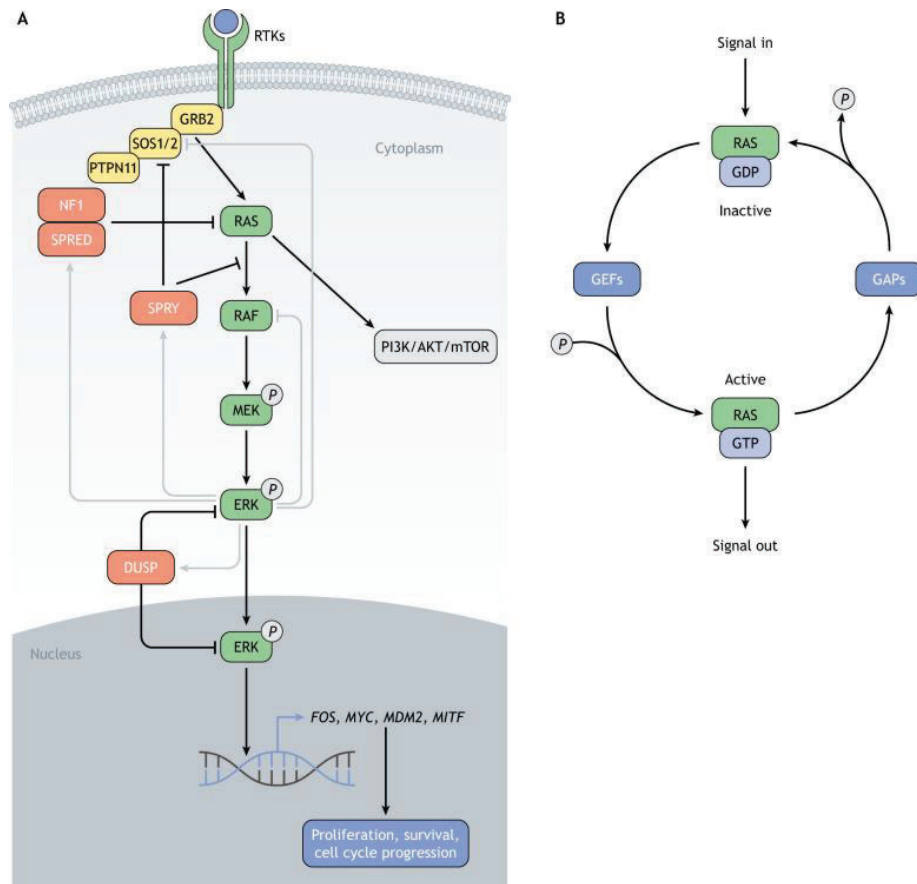


Figura 7: Esquema de la Vía MAPK (Al Mahi et al.,2022).

La proteína RAS activa interactúa con muchos mediadores río abajo, sobre todo al unirse al dominio de unión a RAS del protooncogén BRAF o Raf-1, serina/treonina quinasa (RAF1). Esto da como resultado la homodimerización y la activación de RAF que luego activa las proteínas MAP quinasa quinasa 1 activada por mitógeno (MAP2K1) y proteína quinasa quinasa 2 activada por mitógeno (MAP2K2) a través de su fosforilación. Estos a su vez fosforilan y activan la proteína quinasa 3 activada por mitógeno (MAPK3 o ERK1) y/o la proteína quinasa 1 activada por mitógeno (MAPK1 o ERK2), los efectores de la vía que controlan la progresión del ciclo celular (Al Mahi et al.,2022). Por lo tanto, la desregulación de la vía MAPK es uno de los eventos clave en la oncogénesis del MC, y la mayoría de los melanomas muestran la activación de esta vía (Kiuru et al.,2017).

Amplificaciones cromosómicas o mutaciones activadoras del receptor tirosina quinasa (RTK) *KIT* se encuentran en 5 a 10% de los melanomas cutáneos y confieren independencia de los factores de crecimiento externos, por lo que representan una fuente importantes de hiperactivación de la vía MAPK (Al Mahi et al.,2022). La proteína NF1, neurofibromina 1, regula negativamente las proteínas RAS a través de su actividad GTPasa. Los melanomas con mutaciones en NF1 generalmente ocurren en pieles expuestas al sol de manera crónica o en personas mayores, muestran una alta carga de mutaciones y son de tipo salvaje (WT) para BRAF y NRAS. El gen NF1 en 17q11.2 consta de 60 exones y genera varias isoformas empalmadas alternativamente. La mayoría de las mutaciones en NF1 son mutaciones de pérdida de función.

Estos incluyen mutaciones de sentido erróneo, sin sentido, de cambio de marco y del sitio de empalme, inserciones, deleciones, deleciones grandes, incluido el gen NF1 y posiblemente otros genes flanqueantes, y translocaciones. Por lo tanto, el gen ha sido clasificado como un supresor de tumores (Kiuru et al., 2017).

En conclusión, las lesiones genéticas causan la hiperactivación de la vía MAPK que impulsa la transformación oncogénica y mantiene el crecimiento del cáncer, siendo la vía MAPK la principal vía afectada en el melanoma cutáneo.

Las mutaciones de los oncogenes BRAF y NRAS son las alteraciones genéticas más frecuentes con tasas de mutación de aproximadamente 50% y 28%, respectivamente (Vallée et al., 2019) (Hayward et al., 2017). La activación de los oncogenes BRAF y NRAS por mutaciones conducen a la señalización constitutiva de la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y, por lo tanto, promueven el crecimiento tumoral y la progresión tumoral (Heppt et al., 2017). Estas mutaciones suelen ser mutuamente excluyentes (García Alvarez et al., 2021). Los datos de secuenciación de genoma completo de los melanomas mostraron que, además de las mutaciones en melanomas BRAF y NRAS, las mutaciones recurrentes del promotor *TERT* fueron las alteraciones genómicas más frecuentes con un porcentaje del 69% (Hayward et al., 2017).

El gen BRAF se encuentra en el cromosoma 7 (7q34) y codifica la proteína BRAF, una enzima intracelular de 94 kDa de 766 aminoácidos involucrada en la vía de señalización MAPK. BRAF, así como las isoformas ARAF y CRAF, es una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK) (Ottaviano et al., 2021).

En cuanto al melanoma cutáneo, las alteraciones más frecuentes y relevantes en la secuencia del gen BRAF son mutaciones puntuales (SNP) en el exón 15, afectando al codón V600. BRAF^{V600E} es, a nivel mundial, la mutación más frecuente observada en pacientes con melanoma cutáneo, y representa el 70% de todas las mutaciones BRAF (50%) conocidas en la posición V600. Consiste en un cambio de aminoácido de valina (V) a ácido glutámico (E), lo que resulta en una conformación catalíticamente activa de BRAF, con un aumento de 480 veces en la actividad quinasa en comparación con la proteína nativa. BRAF^{V600K} es la segunda mutación más común (10-20% de todas las mutaciones BRAF^{V600}) y consiste en un cambio de aminoácido, una valina (V) reemplazada por una lisina (K) (Ottaviano et al., 2021) (Hayward et al., 2017). Los melanomas cutáneos que albergan mutaciones BRAF^{V600E} y BRAF^{V600K}, incluso si son similares desde un punto de vista molecular, tienen características clínico-patológicas distintas. De hecho, los melanomas cutáneos con mutaciones BRAF^{V600K} se consideran más agresivos que los BRAF^{V600E} (Ottaviano et al., 2021). Los melanomas BRAF^{V600K} suelen aparecer en pacientes de edad avanzada, en la cabeza, el cuello y en la piel dañada crónicamente por el sol. Los datos muestran una carga mutacional tumoral más alta en los melanomas V600K y que varios grupos de genes, en particular genes supresores de tumores y proto-oncogenes, están mutados con mayor frecuencia en este genotipo (Da Silva et al., 2020).

NRAS fue el primer oncogén reconocido en el melanoma y las mutaciones en NRAS representan el 28% (García Alvarez et al., 2021). El oncogén NRAS es un miembro de la superfamilia de GTPasas p21, que tienen actividad GTPasa intrínseca, actuando como un interruptor molecular para la transmisión de señales de células reguladoras. Estas proteínas participan en la activación de la vía MAPK / Fosfatidilinositol-3-Quinasa (MAPK / PI3K), durante la

proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Scatena *et al.*, 2021). Aunque las mutaciones *NRAS* asociadas con la transformación maligna se han detectado predominantemente en los codones 12, 13 (exón 2) y 61 (exón 3), la mutación del gen *NRAS* más común en el melanoma cutáneo ocurre en la posición aminoacídica 61 con una frecuencia del 80% (Scatena *et al.*, 2021). En esta última posición se han reportado mutaciones que llevan al cambio del aminoácido glutamina (Q) por arginina (R≈38%), lisina (K≈34%) ó leucina (L≈10%) (García Alvarez *et al.*, 2021). Estas mutaciones bloquean *NRAS* en un estado de unión a GTP que deteriora su actividad GTPasa, dando como resultado una activación constitutiva de la señalización de MAPK. Estas alteraciones provocan la desregulación del ciclo celular y las señales de proliferación celular (García Alvarez *et al.*, 2021). El melanoma con mutación en *NRAS* difiere del melanoma con mutación en *BRAF* desde un punto de vista clínico. Los pacientes suelen ser mayores (> 55 años), con historia de exposición previa a los rayos UV. Las lesiones tienen predisposición a las extremidades superiores, y presentan mayor profundidad (índice de Breslow). En cuanto al pronóstico, similar al melanoma mutante en *BRAF*, la mutación *NRAS* se ha relacionado con rasgos de enfermedad agresivos, y con un mayor riesgo de afectación visceral y cerebral (García Alvarez *et al.*, 2021).

El gen *TERT* está situado en el cromosoma 5p15.33 en humanos y es una parte integral y esencial de la holoenzima telomerasa, cuya función es mantener la integridad de los telómeros. El gen *TERT* tiene una longitud de 42 kb y consta de 15 intrones y 16 exones con un núcleo promotor de 260 pb. El dominio de la transcriptasa inversa está codificado por 5-9 exones. La región del promotor del gen *TERT* (*pTERT*) contiene cajas de GC donde se une el factor de transcripción Sp1 por motivos dedos de zinc, que aumenta la transcripción del gen *TERT*, y cajas E donde se pueden unir tanto a los potenciadores como a los represores de la transcripción. *TERTp* carece de una caja TATA pero contiene sitios de unión para numerosos factores de transcripción (Dratwa *et al.*, 2020). Más del 80% de los tumores adoptan diversas estrategias reguladoras, conocidas como mecanismos de mantenimiento de los telómeros (TMM), que se basan en la reactivación de la telomerasa (Dratwa *et al.*, 2020). Se han informado mutaciones somáticas C → T altamente recurrentes en el promotor del gen *TERT* en una frecuencia aproximada del 69% en melanoma cutáneo (Thomas *et al.*, 2019). La mayoría son transiciones que ocurren en las posiciones -124 o -146 río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Las mutaciones en estas posiciones crean tramos de nucleótidos idénticos de 11 pb que contienen un sitio de unión por consenso para los factores de transcripción E-26 (ETS) en la subfamilia del factor complejo ternario (TCF) (Thomas *et al.*, 2019). Otro punto de acceso *TERT* son las mutaciones promotoras notificadas en melanomas que crean sitios de unión ETS / TCF que ocurren en las posiciones -57A> C, -124_125CC> TT o -138_139CC> TT desde el sitio de inicio (Thomas *et al.*, 2019).

1.2-Diagnóstico molecular

Las técnicas de diagnóstico basadas en pruebas moleculares son una gran alternativa para brindar un diagnóstico adecuado durante el curso de ciertas enfermedades. Los sistemas de identificación de mutaciones que se aplican de forma rutinaria en los laboratorios de anatomía patológica se pueden clasificar en métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

secuenciación y métodos basados en PCR en tiempo real (RT-qPCR) (Rodríguez-peralta et al. 2014).

La secuenciación por Sanger es la técnica molecular más utilizada para el análisis y detección de mutaciones puntuales. Permite detectar qué cambio nucleotídico se encuentra en la región de estudio cuando se lo compara con la secuencia consenso, es una técnica de costo accesible. Sin embargo, aunque ha ido mejorando es una técnica con un límite de sensibilidad del 20%, que puede dar lugar a falsos negativos (Curry et al. 2012).

Otro de los métodos más utilizados en los servicios de anatomía patológica es PCR cuantitativa en tiempo real, donde se realiza la identificación de biomarcadores moleculares en tumores, mediante el lector de fluorescencia (**Anexo, pág. 78**). Entre las ventajas del método de RT-qPCR se destaca una alta sensibilidad del 95%. Sin embargo, esta metodología está inicialmente diseñada para detectar una sola mutación.

Por otro lado, la prueba diagnóstica cobas 4800 BRAF/V600 fue inicialmente diseñada para determinar mutaciones en el oncogén BRAF^{V600E} pero también es capaz de detectar el 70% de las mutaciones en V600K, así como las mutaciones de V600D y V600E2. Entre sus ventajas destacan que es una técnica muy rápida en un sistema automatizado (Richter et al. 2013). Entre sus desventajas se destacan que no permite la identificación del cambio nucleotídico que se realiza en la secuencia en el oncogén BRAF.

La PCR digital por gotas (ddPCR) es uno de los métodos más sensibles para la detección de mutaciones somáticas y actualmente es uno de los mejores métodos utilizados en el análisis de ADNct. La ddPCR se basa en la partición de una mezcla de reacción de PCR con ADN molde en 10.000-20.000 gotas, de forma tal que cada gota tiene una secuencia objetivo (**Anexo, pág.78**).

La tecnología de secuenciación sigue evolucionando y ofrece un análisis más profundo y complejo de los componentes genéticos de un melanoma. La secuenciación de próxima generación (NGS, *next generation sequencing*), o secuenciación masiva en paralelo, permite la secuenciación de todo el exón o todo el genoma. Las plataformas moleculares de secuenciación múltiple están disponibles para examinar mutaciones en el oncogén BRAF en el melanoma cutáneo, y el mejor enfoque tecnológico continúa siendo desarrollado, todas estas técnicas son eficientes con buena reproducibilidad para detección. De esta manera, se puede obtener un balance positivo entre costo y beneficio de cada una de estas técnicas para el diagnóstico molecular.

2-Biopsias Líquidas

La genotipificación de tejidos tumorales es “el” método estándar tradicionalmente aceptado en el diagnóstico del cáncer para identificar alteraciones genómicas humanas. Sin embargo, esta técnica tiene sus limitaciones. Es un método invasivo, no es aplicable para pequeñas cantidades de tejido tumoral, cuando el tumor no es operable, o en el seguimiento en el tiempo de regímenes de tratamientos contra el cáncer. La biopsia líquida es una alternativa prometedora que se basa en la detección de biomarcadores presentes en los fluidos corporales.

Según el Instituto Nacional del Cáncer, un biomarcador se define como "una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros fluidos corporales o tejidos que es un signo de un proceso normal o anormal, o de una condición o enfermedad". Un biomarcador apropiado debe ser estable, para sobrevivir a los procedimientos de muestreo y almacenamiento, y fácilmente detectable. La aplicación de la biopsia líquida tiene varias ventajas sobre las biopsias de tejido, como el procedimiento de muestreo no invasivo que permite tomar muestras en forma reiterada en el tiempo, y así realizar un monitoreo en tiempo real del estado clínico del paciente (Szilágyi *et al.*, 2020). La principal biopsia líquida utilizada es la sangre, que consiste en el aislamiento y análisis de componentes derivados o asociados a tumores que circulan en el torrente sanguíneo (Figura 8).

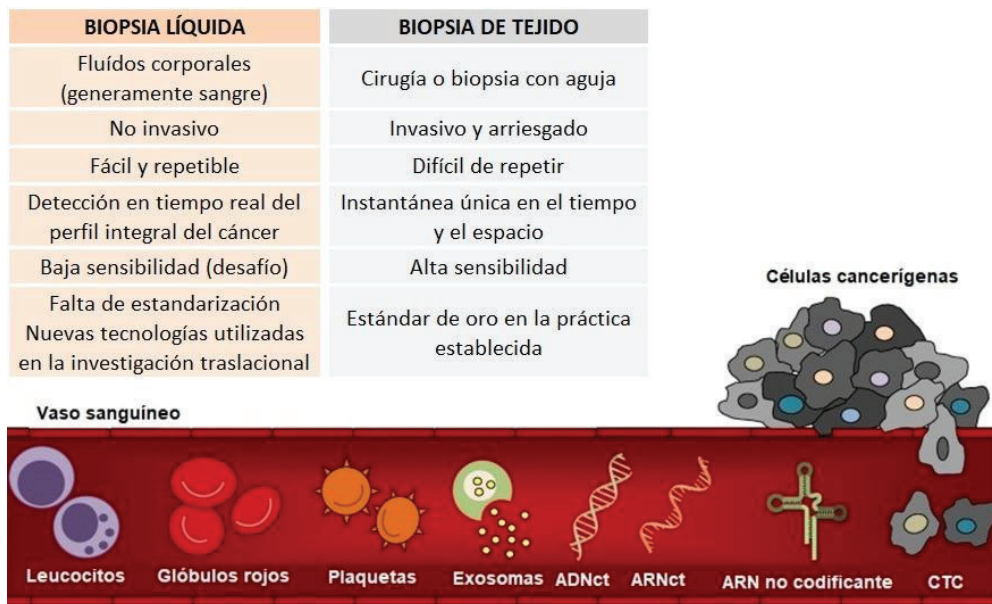


Figura 8: Componentes derivados o asociados a tumores que circulan en el torrente sanguíneo: Células tumorales circulantes (CTC), leucocitos circulantes, ADN tumoral circulante libre de células (ADNct), microARN (miARN) y ARN no codificantes (ARNnc) (Russano *et al.*, 2020).

El ADN circulante libre de células (ADNcl) son fragmentos cortos (normalmente 130-180 pares de bases) de ADN bicatenario que está presente en la sangre y otros fluidos corporales. Se cree que su origen se debe principalmente a la muerte celular apoptótica o necrótica, aunque también se han sugerido mecanismos de liberación activa (Valpione *et al.*, 2018). Este último implica la formación de microvesículas (exosomas) o complejos de proteínas con ácido nucleico circulante, presentando una alta estabilidad en los fluidos corporales, lo que los convierte en candidatos de biomarcadores adecuados detectables mediante métodos como PCR o secuenciación (Szilágyi *et al.*, 2020). La evidencia acumulada sugiere que los ADNcl podrían ser biomarcadores prometedores en el diagnóstico y pronóstico del cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurológicas y diabetes (Szilágyi *et al.*, 2020). En pacientes con cáncer, los niveles de ADN circulante tumoral (ADNct) se encuentran frecuentemente elevados, incluyendo al melanoma cutáneo (Valpione *et al.*, 2018). Uno de los usos más poderosos de ADNct está relacionado con la identificación de mutaciones específicas de tumores que se derivan de las células cancerosas, siendo necesaria la estandarización de métodos para su detección. El análisis del ADNct permite la aplicación clínica de biopsias líquidas tanto para el diagnóstico como para la

implementación de estrategias de medicina personalizada y su seguimiento en el tiempo (Valpione *et al.*, 2018).

2.1-Relevancia clínica

El uso de biopsias líquidas en el ámbito clínico ha ido en aumento en los últimos años, no sólo por la facilidad de obtención de muestras del paciente sino también por la posibilidad de obtener información en diferentes estadios de la enfermedad y de detección y pronóstico precoces. Las características de ADNclc son diferentes en pacientes con cáncer que en pacientes sanos. Se han notificado niveles bajos de ADN libre de células en pacientes sanos que normalmente no superan los 25ng/ml de plasma (Rodríguez J., 2021). En pacientes con cáncer existen niveles más altos de ADNclc debido a los niveles elevados de ADNct, particularmente en enfermedad metastásica de cualquiera de los tumores sólidos analizados hasta el momento (Rodríguez J., 2021). Esto se correlaciona con la carga tumoral, el estadio, la vascularización, el recambio celular y la respuesta a la terapia. Sin embargo, no todos los tumores metastásicos parecen tener el mismo impacto en los niveles de ADNct, y por ello se requiere más investigación. La armonización de estudios y estudios comparativos es crucial para proporcionar evidencia clara de la utilidad clínica de ADNct en tumores sólidos metastásicos. Por lo tanto, las biopsias líquidas proporcionan información que es útil para la detección temprana y de casos de alto riesgo, la elección y respuesta al tratamiento y, la detección temprana de recaídas en pacientes con cáncer. De hecho, las imágenes radiológicas sólo pueden detectar tumores cuando tienen un tamaño de aproximadamente 7 a 10mm, donde ya contienen alrededor de mil millones de células (Rodríguez J., 2021). En este contexto, sin duda existe un potencial para el uso de biopsias líquidas en una etapa en la que puede ser curable. Además, existe una correlación entre los niveles de ADNclc y el cáncer antes de que comience el tratamiento; los niveles altos y persistentes de este tipo de ADN pueden indicar una recaída y probablemente sean un signo de mal pronóstico. En el caso de pacientes con cáncer localizado, la presencia de células tumorales circulantes o altos niveles de ADNct podría contribuir a la identificación de pacientes con mayor riesgo de recurrencia, en los que se podría considerar la terapia adyuvante (Rodríguez J., 2021). Los altos niveles de ADNct también permiten la determinación de mutaciones específicas en los genes conductores de cáncer, como los que codifican EGFR, KRAS, BRAF y PIK3CA, que son predictivos de la respuesta a diferentes inhibidores. Se pueden encontrar biomarcadores personalizados que posteriormente se utilizan para detectar enfermedad residual o monitorear los niveles tumorales durante la terapia (Rodríguez J., 2021). Otro uso de las biopsias líquidas en la práctica clínica es la detección de resistencia adquirida a las terapias dirigidas teniendo en cuenta que los tumores adquieren resistencia a través de la aparición de mutaciones de resistencia, que a su vez dan lugar a la activación de vías de señalización alternativas, aumento de la expresión de genes antiapoptóticos o reducción de la unión a fármacos. Por lo tanto, la biopsia líquida es una herramienta útil en la recaída del paciente, la necesidad potencial de seguimiento continuo y la selección apropiada de una segunda línea de respuesta efectiva para el paciente (Rodríguez J., 2021). Actualmente, el número de proyectos/estudios de investigación académicos y privados para encontrar nuevas aplicaciones para el ADNct en el cáncer está aumentando en

todo el mundo. Por lo tanto, ADNct podría convertirse en una herramienta común en los laboratorios clínicos y patológicos, siendo necesario su estandarización (Eslami-S Z et al.,2020).

Un ejemplo de caso, es un estudio en 640 pacientes en lo que se ha detectado ADNct en >75% de las biopsias líquidas analizadas de pacientes con tumores de páncreas, ovario, CCR, vejiga, gastrointestinal, mama, hepatocelular, cabeza y cuello, y MC. Además, se detectó ADN circulante en muestras donde no se pudieron detectar células tumorales circulantes, lo que provee evidencia de que son entidades diferentes y de las bondades de estudiar al ADN circulante como primera aproximación (Bettegowda C, et al. 2014).

En pacientes con MC tratados tanto con terapias dirigidas como con inmunoterapia, se reportaron trabajos de asociación de los niveles de ADNct a la respuesta, progresión libre de enfermedad y supervivencia (Santiago-Walker A. et al., 2015)(Schreuer M. et al, 2016)(Cabel L., et al., 2017) (Lee J.H., et al., 2017). Niveles iniciales de ADNct elevados estuvieron asociados a un mal pronóstico, y su incremento durante el tratamiento anticipó su progresión; mientras que niveles no detectables de ADNct se asociaron a una respuesta favorable luego de su discontinuación.

Por otro lado, existen pruebas basadas en ADNct aprobadas por la FDA como el ensayo de metilación del gen Septin-9 (*SEPT9*) para la detección del cáncer colorrectal (Song et al. 2017) o el “dispositivo innovador”, CancerSEEK, un método basado en la evaluación de proteínas circulantes y ADNct por espectrometría de masas y, secuenciación para la detección de cáncer en etapa temprana en pacientes asintomáticos mayores de 65 años (Eslami-S Z et al.,2020).

Como antecedentes relacionados a biopsias líquidas en el CIO-FUCA, se estableció una colaboración con el Instituto Alexander Fleming (IAF) para evaluar en una población de pacientes con MC los niveles de ADNct en biopsias líquidas de plasma sanguíneo y su correlación con la evolución clínica. Este proyecto fue iniciado por mi directora de Tesis, la Dra. Mariana Aris, donde se analizó por PCR digital (ddPCR) la variante prevalente en MC BRAF^{V600E}. Este proyecto dio origen al objetivo de esta tesis, que es la optimización y análisis de las variantes prevalentes en MC BRAF^{V600K}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}, pTERT¹²⁴, pTERT¹⁴⁶.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1-Hipótesis

La determinación de los niveles de ADN circulante tumoral (ADNct) en muestras de biopsias líquidas de pacientes con melanoma metastásico sería un biomarcador de la carga tumoral sistémica del paciente, con impacto tanto en el pronóstico inicial como en la respuesta clínica al tratamiento asignado.

2-Objetivo general

El objetivo de este proyecto consistió en analizar los niveles de oncogenes prevalentes en ADN circulante tumoral (ADNct) en biopsias líquidas de plasma sanguíneo de una población de pacientes con melanoma cutáneo regional metastásico, y su correlación con la evolución clínica.

3-Objetivos específicos

1. Optimización de la detección de los niveles de variantes prevalentes de los oncogenes BRAF, NRAS y TERT por PCR digital: BRAF^{V600K}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}, pTERT⁻¹²⁴, pTERT⁻¹⁴⁶.
2. Determinación de los niveles de ADN circulante tumoral por detección de variantes prevalentes en BRAF, NRAS y hTERT por PCR digital, en muestras de plasma sanguíneo de una población de pacientes con melanoma metastásico al momento del diagnóstico y con seguimiento al tratamiento asignado a las 6 y 12 semanas.
3. Evaluación de la correlación de los parámetros analizados en el ADN circulante tumoral con la evolución clínica de los pacientes de este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Población de estudio

Se analizaron muestras de plasma sanguíneo de pacientes con MC metastásico (estadios III-IV AJCC-UICC) del Instituto Alexander Fleming (IAF), con seguimiento clínico y acceso a los datos clínicos correspondientes. Este proyecto de investigación ha sido aprobado por el Comité de Bioética del IAF. Todos los pacientes que prestaron su conformidad por escrito fueron incluidos en el estudio. Los datos fueron analizados de manera anonimizada por codificación, para asegurar la protección de datos personales (Ley 25.326). Se analizó una cohorte inicial de 19 pacientes con MC: 4 estadio III y 15 estadio IV (n=19); 5 recibieron inhibidores y 14 inmunoterapia.

2- Obtención de biopsias líquidas

Se contó, previo al inicio del proyecto, con muestras de plasma provenientes de 20 ml de sangre de los pacientes participantes de este estudio al inicio del tratamiento (t0), a las 6 (t1) y a las 12 semanas (t2). El plasma se obtuvo por centrifugación en gradiente de la sangre a través del medio Ficoll-Paque, y fue almacenado en alícuotas a -80°C hasta su procesamiento para la purificación de ADN circulante.

El ADN circulante libre de células de biopsias líquidas se aisló con el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El procedimiento consta de 4 pasos (lisis, unión, lavado y elución) y se llevó a cabo utilizando columnas QIAamp en un colector de vacío. El ADNlc fue almacenado en alícuotas a -80°C hasta su análisis por PCR digital.

3-Optimización de la determinación de los niveles de BRAF, NRAS y TERT por PCR cuantitativa

Para la detección de las variantes puntuales por PCR digital se usaron *primers* específicos de la región en combinación con sondas de hibridación (sistema fluoróforo-extintor) de diseño propio, que detectan el alelo WT (fluoróforo HEX o VIC según corresponda) ó el alelo mutado de interés (fluoróforo FAM) en una sola reacción. Se optimizó la detección de las variantes BRAF^{V600K}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}, TERT⁻¹²⁴ y TERT⁻¹⁴⁶ en forma secuencial. En primer lugar se optimizó las condiciones de ciclado de la PCR con los *primers*, evaluando diferentes concentraciones de *primers*, uso de aditivos, y condiciones de ciclado: temperatura y tiempo de *annealing* y, número de ciclos por PCR de punto final (**Anexo, pág. 76**). Se evaluó la eficiencia y especificidad de amplificación por curvas de desnaturalización y electroforesis, utilizando una mezcla de reacción con un fluoróforo que detecta ADN doble cadena (*Eva Green*). Una vez establecido el ciclado de reacción, se evaluó la especificidad de las sondas por PCR cuantitativa, usando como controles líneas celulares y plásmidos disponibles en el laboratorio. Finalmente se optimizó el sistema por PCR digital previo al análisis de las muestras.

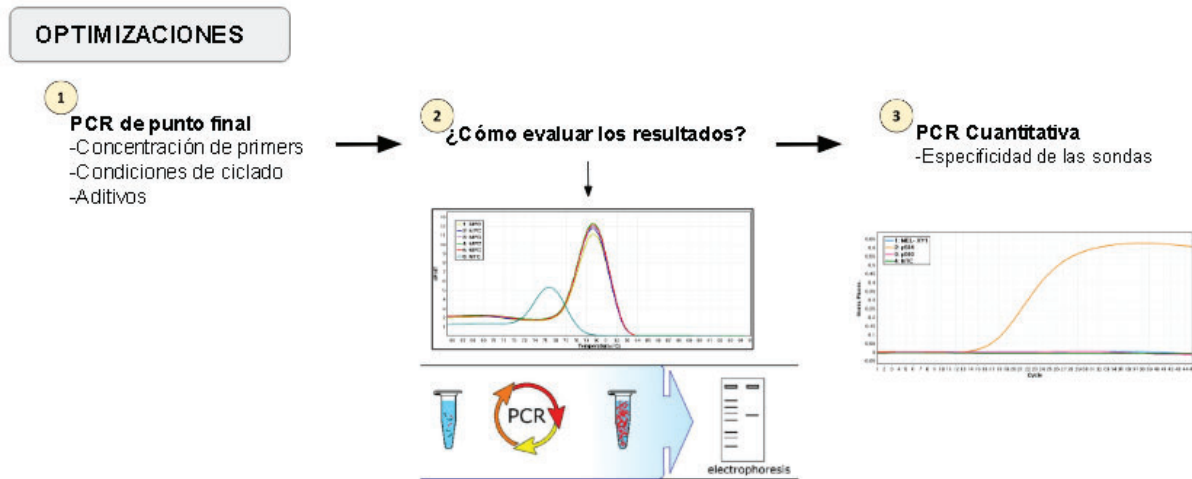


Figura 9: Representación de los pasos de optimización para la determinación de los niveles de BRAF, NRAS y TERT por PCR cuantitativa.

Si bien la aplicación final de este trabajo es la PCR digital, considerando que la optimización de las sondas fue por qPCR ya que el equipo de PCR digital fue un servicio externo, buscamos obtener un sistema que pueda utilizarse para ambas técnicas contemplando las condiciones óptimas para cada una.

3.1. Obtención de controles

Se realizó el cultivo de líneas celulares de melanoma cutáneo humano para utilizar el ADN genómico como control positivo en la detección de las variantes de NRAS (NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}), BRAF (BRAF^{V600K}, BRAF^{V600E}) y TERT (TERT¹²⁴, TERT¹⁴⁶).

Para las variantes de NRAS se cultivaron las líneas celulares MEL-XY1 (NRAS^{Q61K} Heterocigota) y MEL-XY9 (NRAS^{Q61K}); para las variantes de BRAF se cultivaron las líneas celulares MEL-XX4 (BRAF^{V600E}) y MEL-XY10 (BRAF^{V600K}); y para TERT las líneas MEL-XX15 (TERT¹²⁴, TERT¹⁴⁶) y MEL-XY2 (TERT¹⁴⁶). Como control *wild type* (wt) se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC), obtenidas a partir de voluntarios sanos.

Los genotipos de las líneas celulares se determinaron por cromatograma de Sanger (A. Bianchi, “CORRELACIÓN ENTRE ALTERACIONES GENÉTICAS Y LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES CON MELANOMA CUTÁNEO HUMANO TRATADOS CON LA VACUNA CSF-470 O CON INTERFERÓN ALFA-2B”, Tesis de Licenciatura en Biotecnología, UADE 2017).

Para la obtención del ADN genómico (ADNg) de las líneas celulares se utilizó el protocolo correspondiente al reactivo *DNAZOL* (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante.

En forma complementaria, como control positivo se purificó ADN plasmídico. Se utilizaron plásmidos pGEM-T con insertos de 301 pb específicos de las variantes NRAS^{Q61K} y NRAS^{Q61R}, pGEM-T-hNRAS(Q61K) (p580) y pGEM-T-hNRAS(Q61R) (p584). Se realizó el cultivo de bacterias ya transfectadas con los respectivos plásmidos con medio selectivo LB-ampicilina. Se hizo crecer las bacterias a 37°C durante 16hs (ON) en agitación (180 rpm) con la tapa en posición intermedia para que entre aire. La transformación de las bacterias fue realizada en experimentos previos del laboratorio.

Para la purificación de los plásmidos se utilizó el kit de minipreparación de Invitrogen™ PureLink™. Luego se determinó la absorbancia del ADN por espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Scientific). Se analizó la absorbancia del ADN a 230, 260 y 280nm. Estas relaciones de absorbancia son una medida de la pureza del ADN que absorbe a 260 nm, mientras que las proteínas y ciertos grupos fenólicos absorben a 280 nm y contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos absorben a 230 nm.

Los genotipos de los plásmidos se determinaron por cromatograma de Sanger (en colaboración con Sánchez María Belen (CIO-FUCA), datos no publicados).

Por otro lado, también se utilizaron productos de PCR como controles homocigotas para las variantes de BRAF y NRAS en concentraciones de 10^8 mol/ μ l.

Como control de especificidad se utilizó en todas las reacciones de PCR un control sin templado (NTC), para evaluar que no haya contaminación de los reactivos. Si se obtuviera producto de PCR en el NTC podría deberse a la formación de dímeros de *primers* ó a la contaminación de algún reactivo.

3.2. Diseño de primers y sondas

NRAS

Se realizó el diseño de *primers* específicos, a través de la herramienta bioinformática Primer-BLAST, que flanquean las mutaciones puntuales de interés (NRAS^{Q61K} y NRAS^{Q61R}) con el fin de generar amplicones de 89 pb.

Primers diseñados (Amplicón 89 pb):

Forward (sentido -): GTTATAGATGGTGAAACCTGTTTGT (Tm:59.6°C)

Reverse (sentido +): TCCTCATGTATTGGTCTCTCATGG (Tm:59.7°C)

Se emplearon sondas de hidrólisis de diseño propio, con sistema 5'-3' fluoróforo-extintor (5' FAM/HEX-3' IABkFQ) y nucleótidos LNA (IDT), específicas para cada variante (NRAS^{Q61}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}). Cuando se incorporan a una sonda de oligonucleótidos, los monómeros de ácido nucleico bloqueado (LNA) imparten una mayor estabilidad estructural, lo que da como resultado una mayor temperatura de hibridación.

Las sondas para los alelos mutantes estaban asociadas al fluoróforo FAM, y la sonda para la detección del alelo WT estaba asociada al fluoróforo HEX. Se utilizó esta estrategia de detectar ambas variantes en un mismo canal ya que el equipo de PCR digital (QX200, BioRad) utilizado permite sólo la detección de dos intensidades de fluorescencia (FAM y HEX/VIC).

BRAF

Se contó con *primers* específicos, por experimentos realizados previamente, para la detección de la variante BRAF^{V600E}, que flanquean las mutaciones puntuales de interés (BRAF^{V600E} y BRAF^{V600K}), con el fin de generar amplicones de 72 pb.

Primers diseñados:

Forward (sentido -): GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG (Tm: 57,63°C)

Reverse (sentido +): CTGATGGGACCCACTCCATC (Tm:59,53°C)

Se utilizaron sondas de hidrólisis de diseño propio, con sistema fluoróforo-extintor Taqman-MGB (5'FAM/VIC-3'NFQ), es decir que en su extremo 5' tienen un indicador fluorescente y en el extremo 3' un extintor no fluorescente (NFQ).

Las sondas para los alelos mutantes BRAF^{V600E} y BRAF^{V600K} están asociadas al fluoróforo FAM, y la sonda para la detección del alelo WT estaba asociada al fluoróforo VIC.

TERT

Se diseñaron y evaluaron 9 pares de *primers* que flanquean las mutaciones puntuales del promotor de TERT (pTERT⁻¹²⁴ y pTERT⁻¹⁴⁶), que generan amplicones entre 83 y 160 pb. Esto fue necesario ya que es una región rica en GC, de difícil amplificación y detección.

Se muestran los 2 juegos de *primers* específicos más representativos.

Combinación #1:

Forward 1(sentido -): GCGCCGCGAGGAGAGG (Tm: 62,84°C)

Reverse 1(sentido +): CCTGCCCTTCACCTTCCAG (Tm:62,49°C)

Tamaño amplicón: 143 pb

Combinación #2:

Forward 2(sentido -): GCGCCGCGAGGAGAGG (Tm:62,84°C)

Reverse 2(sentido +): GGACCCCGCCCGT (Tm:60,37°C)

Tamaño amplicón: 106 pb

Se usaron sondas de hidrólisis de diseño propio, con sistema 5'-3' fluoróforo-extintor (5'FAM/HEX - 3'NFQ) y nucleótidos LNA (IDT), específicas para cada variante. Se usó una sola sonda para la detección de las 2 variantes, asociada al fluoróforo FAM. Las sondas para los alelos mutantes están asociadas al fluoróforo FAM y la sonda para la detección del alelo WT está asociada al fluoróforo HEX.

3.3.Optimización de primers por PCR de punto final

La especificidad de los *primers forward* y *reverse* para cada reacción se evaluó mediante la amplificación por PCR de punto final de dos pasos. Para ello se buscó optimizar las condiciones de la PCR con la mezcla de reacción, *Mix Type-it Eva Green 2X (Qiagen)*, que permite evaluar curvas de desnaturalización (*melting*) post-PCR. Las optimizaciones de *primers* se llevaron a cabo en un termociclador Veriti de *Applied Biosystems*.

Para evaluar las condiciones de reacción, se tomó en cuenta la temperatura de *melting* de cada combinación de *primers*, calculada a partir de su secuencia con *Primer Blast*.

En todas las combinaciones evaluadas se probaron distintas concentraciones de *primers* para que estas reacciones fueran aplicables tanto para qPCR como para dPCR teniendo en cuenta que si bien ambos métodos buscan una detección eficaz de las diferentes variantes, mientras que para qPCR se busca una reacción con una eficiencia de amplificación idealmente del 100%, en dPCR esto no es necesario pero sí lo es la amplificación y detección del amplicón de interés.

NRAS

Se optimizó el ciclado en un rango de temperatura 56-57-58-59-60°C y la mezcla de reacción a utilizar (**Tabla 2**), evaluando las concentraciones de *primers* 0,8 μM y 0,25 μM (**Tabla 1**) con la línea celular MEL-XY1 como control positivo.

Tabla 1: Optimización de *primers*: Reactivos para la mezcla de reacción con [*primers*]= 0,8 μM y [*primers*]= 0,25 μM para la amplificación de la región NRAS^{Q61}.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| Type-it HRM PCR Kit (Qiagen) | 2X | 1X | 10 |
| Primer Fw | 10 μM | 0,8 μM^* | 1,6 |
| Primer Rv | 10 μM | 0,8 μM^* | 1,6 |
| ADN genómico | 20 ng/ μl | 40 ng/reacción | 2 |
| H ₂ O | - | - | 4,8 |
| Volumen Final | - | - | 20 ul |

*Para una concentración (cc) final de *primers* de 0,25 μM se usó un volumen de 0,5 μl por reacción.

Tabla 2: Optimización de *primers*: Condiciones de ciclado para la amplificación de la región NRAS^{Q61}.

| Ciclado | | |
|--|-------------------------|-----|
| Desnaturalización inicial | 95°C x 10' | |
| Desnaturalización | 95°C x 15'' | 45X |
| Gradiente de temperatura y tiempo de hibridación/extensión | 56-57-58-59-60°C x 30'' | |
| Desnaturalización final | 98°C x 10' | |
| | 4°C x 10' | |

BRAF

En este caso no fue necesario hacer la optimización de los *primers* porque ya estaba puesta a punto para BRAF^{V600E}.

TERT

→ **Combinación #1 de *primers*:**

Se probó optimizar la reacción de PCR para este juego de *primers* en un rango de temperatura de 59-61°C a una concentración de *primers* 0,4 μM y en un rango de 56-58°C con una concentración de *primers* 0,25 μM (**Tabla 3 y 4**).

Tabla 3. Optimización de *primers*: Reactivos para la mezcla de reacción con [*primers*]= 0,4 μM y [*primers*]= 0,25 μM de la combinación #1 para la amplificación de la región pTERT.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| Type-it HRM PCR Kit (Qiagen) | 2X | 1X | 10 |
| Primer Fw | 10 μM | 0,4 μM^* | 0,8 |
| Primer Rv | 10 μM | 0,4 μM^* | 0,8 |
| ADN genómico | 20 ng/ μl | 40 ng/reacción | 2 |

| | | | |
|------------------|---|---|-------|
| H ₂ O | - | - | 6,4 |
| Volumen Final | - | - | 20 ul |

*Para una concentración (cc) final de *primers* de 0,25µM se usó un volumen de 0,5 µl por reacción.

Tabla 4. Optimización de *primers*: Condiciones de ciclado con la combinación #1 de *primers* para la amplificación de la región pTERT.

| Ciclado | | |
|--|--------------------|------|
| Desnaturalización inicial | 98°C x 5' | |
| Desnaturalización | 98°C x 15'' | 40X* |
| Gradiente de temperatura y tiempo de extensión/hibridación | 59-60-61°Cx 25'' * | |
| Desnaturalización final | 98°C x 5' | |
| | 4°C x 10'' | |

*Segunda reacción (0,25 µM): 56-58°C x 25 seg y 40 ciclos.

→ **Combinación #2 de *primers*:**

Se probó optimizar el sistema en un rango de temperatura de 58-59-60-61°C y con una concentración de *primers* 0,4 µM (**Tabla 5 y 6**).

Además se probó un ciclado de PCR *TOUCHDOWN* (Ciclado 2) para un rango de temperatura de 58-59-60°C a una concentración de *primers* 0,4µM (**Tabla 5 y 7**).

Se probó un ciclado *TOUCH UP* (Ciclado 3) en un rango de temperatura de 56-57-58°C a una concentración de *primers* 0,25µM con un tiempo de hibridación/extensión de 25 segundos y con el uso del aditivo *Enhancer* 20X (**REACTIVOS*¹**, **Tabla 5 y 8**) con la finalidad de buscar condiciones de amplificación específicas. También se evaluó un rango de temperatura de 59-60-61 °C con un tiempo de hibridación/extensión de 20 segundos con las mismas condiciones de reacción.

El aditivo *Enhancer* se basa en la combinación de los reactivos, Betaína, DTT, DMSO y BSA con una concentración final de 0,54 M, 1.34 mM 1.34% y 11 ug/ml respectivamente.

Tabla 5. Optimización de *primers*: Reactivos para la mezcla de reacción con [*primers*]= 0,8 µM , 0,4 µM y 0,25 µM de la combinación #2 para la amplificación de la región pTERT.

| REACTIVOS*¹ | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| <i>Type-it HRM PCR Kit</i> (Qiagen) | 2X | 1X | 10 |
| <i>Primer Fw</i> | 10 µM | 0,4 µM* | 0,8 |
| <i>Primer Rv</i> | 10 µM | 0,4 µM* | 0,8 |
| ADN genómico | 20 ng/µl | 40 ng/reacción | 2 |
| H ₂ O | - | - | 4,8 |
| Volumen Final | - | - | 20 ul |

*Para una concentración (cc) final de *primers* 0,25µM se utilizó un volumen de 0,5 µl por reacción.

*¹Aditivo *Enhancer* 20X: 1µl por reacción

Tabla 6: Optimización de *primers*: Condiciones de ciclado con la combinación #2 de *primers* para la amplificación de la región pTERT.

| Ciclado (1) | | |
|--|----------------------|-----|
| Desnaturalización inicial | 98°C x 5' | |
| Desnaturalización | 98°C x 15'' | 40X |
| Gradiente de temperatura y tiempo de extensión/hibridación | 58-59-60-61°C x 25'' | |
| Desnaturalización final | 98°C x 5' | |
| | 4°C x 10' | |

Tabla 7: Optimización de *primers*: Condiciones de ciclado *TOUCHDOWN* con la combinación #2 de *primers* para la amplificación de la región pTERT.

| Ciclado Touchdown (2) | | |
|--|--|-----|
| Desnaturalización inicial | 98°C x 5' | |
| Desnaturalización | 98°C x 15'' | |
| Gradiente de temperatura y tiempo de extensión/hibridación | [15'' 98°C / 25'' 68°C] $\Delta T=0,6^{\circ}\text{C}$ | 15X |
| | [15'' 98°C / 25'' 58-59-60°C] | 20X |
| Desnaturalización final | 98°C x 5' | |
| | 4°C x 10' | |

Tabla 8: Condiciones del ciclado *TOUCH-UP* con la combinación #2 de *primers* para la amplificación de la región pTERT.

| Ciclado TOUCH-UP (3) | | |
|--|---|-----|
| Desnaturalización inicial | 98°C x 5' | |
| Desnaturalización | 98°C x 15'' | |
| Gradiente de temperatura y tiempo de extensión/hibridación | [15'' 98°C / 20'' 53°C] $\Delta T=+0,6^{\circ}\text{C}$ | 10X |
| | 15'' 98°C 25'' 56-57-58°C o 20'' 59-60-61°C] | 35X |
| Desnaturalización final | 98°C x '' | |
| | 4°C x 10' | |

3.4. Análisis de los productos de PCR

Curva de desnaturalización (melting)

Las curvas de disociación del producto de PCR se realizaron luego de la desnaturalización final a 95°C. Primero se genera una hibridación completa a una temperatura basada en los valores de T_m , seguido de un aumento gradual de la temperatura hasta 95°C. La intensidad de la fluorescencia se controla durante este aumento de temperatura, lo que da como resultado, a través del *software* del equipo Rotor-Gene Q de Qiagen, la generación de una curva de desnaturalización. Al analizar la primera derivada de dicha curva (dF/dT vs Temperatura de fusión en °C), puede evaluarse fácilmente la homogeneidad de los productos de la PCR, incluida la

presencia de dímeros de *primers*, determinando así la especificidad de la reacción de PCR (Qiagen, 2022).

Cada pico de una curva de desnaturalización corresponde a la temperatura (T_m) donde la mitad (50%) de las moléculas de ADN se encuentran asociadas al fluoróforo. Generalmente se espera que para un amplicón haya un sólo pico de fusión pero, hay que considerar que puede ocurrir una desnaturalización parcial del ADN (estado intermedio que no sea ni ADN doble cadena ni ADN monocatenario), por ejemplo en productos ricos en GC, obteniendo más de un pico, entonces para una misma banda obtenida por electroforesis se pueden obtener más de un pico en la curva de fusión (Downey, N., 2017).

Electroforesis

Los productos de PCR para las diferentes condiciones analizadas también se evalúan por electroforesis. Como las moléculas de ADN tienen carga negativa uniforme, su separación en el campo electroforético estará condicionada por el tamaño del amplicón.

Se realizaron electroforesis en geles de Agarosa 2% a 90 voltios constantes por 60 minutos utilizando Buffer TBE pH=8. Se utilizó el Ladder de Promega para 100 pb.

Composición del Buffer TBE 5X (1000 ml) pH 8.3: 54 g Tris(hidroximetil)aminometano + 27,5 g ácido bórico + 20 ml EDTA 0,5M (pH 8.0).

3.5.PCR Cuantitativa

Para evaluar la detección específica de cada sonda se las analizó por PCR cuantitativa con los controles correspondientes. Estas optimizaciones se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene Q de Qiagen. Una vez que se observó que cada sonda es específica por separado, se continuó a optimizar el sistema de PCR digital para el análisis de las muestras.

NRAS

Se adicionaron las sondas de hibridación con una relación de concentración 1:1 con los *primers*, a la reacción de PCR optimizada (temperatura de hibridación/extensión=60°C), para evaluar su especificidad de detección por PCR cuantitativa (**Tabla 9, Tabla 10**). Esto se realizó de dos maneras, combinando las tres sondas en una reacción y evaluando cada sonda por separado en simultáneo. Se decidió combinar las tres sondas para optimizar el uso de las muestras.

Para llevar a cabo esta reacción se utilizó la *Mix de ddPCR Supermix* de BioRad, que es la que se va a utilizar en la PCR digital. Como controles se utilizaron el ADN genómico de la línea PBMC (NRAS^{Q61WT}), el plásmido pGEM-T-hNRAS(Q61K) (p580) y el plásmido pGEM-T-hNRAS(Q61R) (p584). La concentración del stock de plásmidos fue de 50 pg/μl lo cual es equivalente a $5 \cdot 10^7$ cpm (Copias de ADN por microlitro).

Los resultados se observan en curvas de intensidad de fluorescencia versus número de ciclos, a través del equipo Rotor Gene (Qiagen). El valor umbral Ct (*threshold cycle*) hace referencia al ciclo en el que se produce un cambio significativo de fluorescencia.

Además, se realizó la misma reacción pero con una relación de *primers*/sonda 4:1 para comprobar si para las condiciones óptimas para ddPCR hay amplificación y detección específica.

Tabla 9: Optimización de *primers/sondas* (1:1): Reactivos para la mezcla de reacción para la detección de las regiones NRAS^{Q61}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|--------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|
| Mix ddPCR (BioRad) | 2X | 1X | 10 |
| <i>Primer Fw</i> | 10 µM | 0,25 µM | 0,5 |
| <i>Primer Rv</i> | 10 µM | 0,25 µM | 0,5 |
| Sondas | 20X | 0,25µM | 1,3 |
| ADN | 5.10 ⁻⁷ cpm* | 5.10 ⁻⁶ cpm*/µl | 2 |
| H ₂ O | - | - | 5,7 |
| Volumen final | - | - | 20 |

*Cpm: Copias de ADN por microlitro

cc: Concentración

Tabla 10: Optimización de *primers/sondas*: Condiciones de ciclado para la detección de las regiones NRAS^{Q61}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R} por PCR cuantitativa.

| Ciclado | | |
|--|-------------|-----|
| Desnaturalización inicial | 95°C x 5´ | 45X |
| Desnaturalización | 95°C x 15´´ | |
| Gradiente de temperatura y tiempo de hibridación/extensión | 60°C x 30´´ | |
| Desnaturalización final | 98°C x 5´ | |
| | 4°C x 10´ | |

BRAF

La relación de *primers/sonda* utilizada fue 4:1 (0,8 µM /0,2 µM). Las condiciones de reacción corresponden a la reacción previamente optimizada para BRAF^{V600E}. Se utilizaron controles homocigotas para la mutación BRAF^{V600E} (A), el control WT BRAF^{V600} (B) y el control homocigota para la mutación BRAF^{V600K} (C).

Tabla 11. Optimización de *primers/sondas* (4:1): Reactivos para la mezcla de reacción para la detección de las regiones BRAF^{V600}, BRAF^{V600E} y BRAF^{V600K}.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| Mix ddPCR BioRad | 10X | 1X | 10 |
| Mix <i>Primers/Sonda</i> | 20X | 1X | 1 |
| ADN | 10 ⁻⁸ molec/µl | 10 ⁻⁷ molec/µl | 2 |
| H ₂ O | - | - | 7 |
| Volumen final | - | - | 20 |

cc: Concentración

Tabla 12. Optimización de *primers*/sondas: Preparación de Mix de sondas/*primers* 20X con una relación de concentración 2:1.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Mix Sonda/Primers 20X |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| <i>Primer Fw</i> | 50 μ M | 0,8 μ M | 16 μ M |
| <i>Primer Rv</i> | 50 μ M | 0,8 μ M | 16 μ M |
| Sonda mutada | 100 μ M | 0,2 μ M | 4 μ M |
| Sonda WT | 100 μ M | 0,2 μ M | 4 μ M |

cc: Concentración

Tabla 13. Optimización de *primers*/sondas: Condiciones de ciclado para la detección de las regiones BRAF^{V600}, BRAF^{V600E} y BRAF^{V600K} por PCR cuantitativa.

| Ciclado | | |
|---|-------------|-----|
| Desnaturalización inicial | 95°C x 5' | |
| Desnaturalización | 95°C x 15'' | 45X |
| Temperatura y tiempo de extensión/hibridación | 60°C x 30'' | |
| Desnaturalización final | 98°C x 5' | |
| | 4°C x 10' | |

TERT

Se adicionaron las sondas de hibridación con los *primers*, a la reacción de PCR optimizada, para evaluar su especificidad de detección por PCR cuantitativa. Se utilizaron las mismas condiciones de ciclado y el aditivo 7-deaza-dGTP (7-desaza-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato), un análogo de base (Guanina) desestabilizador de la estructura de ADN, para las dos combinaciones de *primers*.

Cuando se evalúan las sondas, se usa la mix de ddPCR y se evalúan las condiciones ideales para esa mix (tiempo de extensión=40 segundos; temperatura de hibridación/extensión = 60°C) y ddPCR (*primers* 0,8 μ M).

Se muestra el ciclado (**Tabla 14**) utilizado para ambos juegos de *primers* y la preparación de la mezcla de sondas 20X (**Tabla 15**) necesaria para la reacción final.

Tabla 14. Optimización de *primers*/sondas: Condiciones de ciclado generales para la detección de las regiones pTERT⁻¹²⁴ y pTERT⁻¹⁴⁶ por PCR cuantitativa.

| Ciclado | | |
|---|-------------|-----|
| Desnaturalización inicial | 95°C x 10' | |
| Desnaturalización | 98°C x 15'' | 45X |
| Temperatura y tiempo de extensión/hibridación | 60°C x 40'' | |
| Desnaturalización final | 98°C x 5' | |
| | 4°C x 10' | |

Tabla 15. Optimización de *primers*/sondas: Preparación de Mix de sondas 20X.

| MIX SONDAS | cc Stock | cc 1X | cc 20X |
|-------------------|-----------------|--------------|---------------|
| Sonda Q61K | 25 μ M | 0,2 μ M | 4 μ M |
| Sonda Q61R | 25 μ M | 0,2 μ M | 4 μ M |
| Sonda Wt | 25 μ M | 0,2 μ M | 4 μ M |

cc: Concentración

Combinación #1 *primers*/sondas:

A continuación se presenta la tabla con los reactivos de la mezcla de reacción para la PCR cuantitativa.

Tabla 16. Optimización de *primers*/sondas combinación #1: Reactivos para la mezcla de reacción para la detección de las regiones pTERT⁻¹²⁴ y pTERT⁻¹⁴⁶ por PCR cuantitativa.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| Mix ddPCR BioRad | 10X | 1X | 10 |
| <i>Primer Fw</i> | 10 μ M | 0,8 μ M | 1,6 |
| <i>Primer Rv</i> | 10 μ M | 0,8 μ M | 1,6 |
| ADN | 20 ng/ μ l | 40 ng/ μ l | 2 |
| Mix Sonda htert | 20X | 1X | 1 |
| 7-deaza-dGTP | 5000 μ M | 200 μ M | 0,8 |
| H ₂ O | | | 3 |
| Volumen Final | | | 20 |

cc: Concentración

En el ejemplo de aplicación, la muestra proveniente de un tumor se analizó con las condiciones de reacción mencionadas anteriormente más la adición de Betaína 0,5 M (Stock: 5M).

Combinación #2 *primers*/sondas:

Contemplando que en reacciones realizadas previamente el aditivo Betaína favorece la amplificación de regiones ricas en GC , se decidió analizar la reacción con y sin este aditivo.

Tabla 17. Optimización de *primers*/sondas combinación #2: Reactivos para la mezcla de reacción para la detección de las regiones pTERT⁻¹²⁴ y pTERT⁻¹⁴⁶ por PCR cuantitativa.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen por reacción (ul) |
|--|-----------------|-----------------|----------------------------------|
| <i>Mix Type-it Qiagen Eva Green 2X</i> | 10X | 1X | 10 |
| <i>Primer Fw</i> | 10 µM | 0,8 µM | 1,6 |
| <i>Primer Rv</i> | 10 µM | 0,8 µM | 1,6 |
| DNA | 20 ng/µl | 40 ng/µl | 2 |
| 7-deaza-dGTP | 5000 µM | 200 µM | 0,8 |
| Mix Sonda htert | 20X | 1X | 1 |
| Betaína | 5 M | 0,5 M | 2 |
| H ₂ O | | | 1 |
| Volumen Final | | | 20 |

cc: Concentración

Determinación del estatus mutacional de oncogenes prevalentes en una muestra de MC

Se recibió una muestra de un paciente (L-C) con un tumor de metástasis ganglionar de MC fijada en formol e incluida en parafina. Se realizaron 5 cortes de 4 µm del taco, se realizó la purificación de ADNg con el *kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Life-Technologies)* según las instrucciones del fabricante, verificando la cantidad y calidad del ADN purificado por espectrofotometría según lo descrito. A continuación se determinó el estatus mutacional del tumor en NRAS^{mut}(NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}), BRAF^{mut}(BRAF^{V600K}, BRAF^{V600E}) y pTERT (TERT⁻¹²⁴, TERT⁻¹⁴⁶) por PCR cuantitativa con las reacciones puestas a punto.

NRAS

Se utilizó el control homocigota para la mutación NRAS^{Q61K}, el control WT NRAS^{Q61} y el control para la mutación NRAS^{Q61R} obtenidos de productos de PCR (Concentración stock= 10⁸ cpm).

BRAF

Se utilizó el control homocigota para la mutación BRAF^{V600E} (A), el control WT BRAF^{V600} (B) y el control homocigota para la mutación BRAF^{V600K} (C) obtenidos de productos de PCR (Concentración stock= 10⁸ cpm).

TERT

Se utilizó la línea celular MEL-XY2 como control heterocigota, la línea celular PBMC como control WT y el control sin templado.

4- Procesamiento de muestras para ddPCR

Las reacciones de ddPCR se preparan de manera similar a las reacciones en tiempo real. Se utilizan sondas de hidrólisis marcadas con FAM y HEX (o VIC), *primers* y reactivos desarrollados específicamente para la detección por ddPCR de *Bio-Rad*. En este caso, se utilizó la mezcla ddPCR *Supermix for Probes* (No dUTP) de BioRad.

Las sondas para cada alelo mutante están asociadas al fluoróforo FAM y la sonda para la detección del alelo WT está asociada al fluoróforo HEX o VIC, ya que el equipo de PCR digital (QX200, BioRad) permite sólo la detección de dos canales.

El sistema QX200 ddPCR de Bio-Rad combina la tecnología de microgotas de emulsión de agua y aceite con la microfluídica. Inicialmente las muestras se prepararon en placas de 96 pocillos ya que las mezclas de reacción deben mezclarse muy bien previo a la generación de microgotas. Luego, las muestras se colocan en un generador de microgotas QX200 en placas DG8 (DG8 Cartridge). En los 8 pocillos inferiores se carga el aceite y en los 8 pocillos superiores se forman las microgotas. Cada placa DG8 genera ocho pocillos de microgotas. Cualquier pocillo no utilizado debe llenarse con buffer control ddPCR 1X. Para la generación de microgotas, se transfieren 20 µl de una reacción de PCR a las filas intermedias de la placa DG8. Lo recomendable es preparar una reacción inicial que sea un poco más de 20 µl (22–25 µl) para garantizar que se transfieran 20 µl de mezcla. Las microgotas generadas se transfieren a una placa de 96 pocillos para PCR en un termociclador. Las reacciones de PCR digital se llevaron a cabo en un termociclador Veriti de Applied Biosystems.

Después de la amplificación por PCR del ácido nucleico objetivo en las microgotas, se coloca la placa en un lector QX200, que analiza cada gota individualmente utilizando un sistema de detección de dos fluoróforos (configurado para detectar FAM y HEX [o VIC]). El muestreador automático del lector de microgotas recoge las microgotas de cada pocillo de la Placa de PCR.

El *software* QuantaSoft mide el número de microgotas positivas y negativas para cada fluoróforo en cada muestra. Luego, el *software* ajusta la fracción de gotitas positivas a un Algoritmo de Poisson para determinar la concentración de la molécula de ADN objetivo en unidades de copias/µl de reacción.

5- Optimización de la determinación de los niveles de BRAF, NRAS y TERT por PCR digital

Para los ciclados de reacción de ddPCR se utilizó una transición de temperaturas más lenta entre una temperatura y otra. En este caso, usamos una transición 50% más lenta que los ciclados utilizados en un ciclado convencional de PCR, lo cual es equivalente a ~2°C/segundo que es lo que recomienda BioRad.

NRAS

Para la determinación de las variantes NRAS^{Q61K} y NRAS^{Q61R}, se utilizó la reacción de diseño propio optimizada por qPCR para la amplificación de la región de interés (89 pb) con las sondas 5'-3' fluoróforo-extintor (5' FAM/HEX - 3' NFQ) con nucleótidos LNA (IDT), específicas para cada variante. Se decidió trabajar con la mezcla de las 3 sondas en una sola reacción, para optimizar el uso de las muestras de plasma. Además, en cuanto a su utilidad clínica, tiene la misma indicación terapéutica tanto la variante NRAS^{Q61K} como la NRAS^{Q61R}.

Como controles se utilizaron ADNg de la línea celular MEL-XY9 (NRAS^{Q61K}), PBMC de donantes como control negativo, y un control sin templado (NTC).

La relación de *primers*/sonda utilizada fue de 4:1 (0,8µM/0,2µM).

Tabla 18. Optimización por ddPCR: Reactivos para la mezcla de reacción para la determinación de los niveles de NRAS^{Q61}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|-----------------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| Mix BioRad | 2X | 1X | 11 |
| Sondas (Q61K/Q61R/Wt) | 20X | 1X | 1,1 |
| <i>Primers Fw</i> | 50 µM | 0,8µM | 0,352 |
| <i>Primers Rv</i> | 50 µM | 0,8µM | 0,352 |
| ADN | - | - | 9,196 |
| H2O | - | - | 1,804 |
| Volumen final | - | - | 22 |

cc: Concentración

Tabla 19. Optimización por ddPCR: Preparación de la mezcla de sondas 20X.

| Mix SONDAS | cc Stock | cc 1X | cc 20X |
|-------------------|-----------------|--------------|---------------|
| Sonda Q61K | 25 µM | 0,2 µM | 4 µM |
| Sonda Q61R | 25 µM | 0,2 µM | 4 µM |
| Sonda Wt | 25 µM | 0,2 µM | 4 µM |

cc: Concentración

Tabla 20. Optimización por ddPCR: Ciclado de ddPCR para la determinación de los niveles de NRAS^{Q61}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}.

| Ciclado ddPCR | | |
|---|-------------|------------------------------------|
| Desnaturalización inicial | 95°C x 10' | 40X Rampa al 50% (~2°C/seg.) |
| Desnaturalización | 98°C x 15'' | |
| Temperatura y tiempo de extensión/hibridación | 60°C x 30'' | |
| Desnaturalización final | 98°C x 10' | |
| | 4°C | |

BRAF

Se utilizó el sistema de sondas de hidrólisis optimizado, con sistema fluoróforo-extintor Taqman-MGB (5'FAM/VIC - 3'NFQ). Las sondas para los alelos mutantes BRAF^{V600E} y BRAF^{V600K} están asociadas al fluoróforo FAM y la sonda para la detección del alelo WT está asociada al fluoróforo VIC. Como se mencionó anteriormente, se utilizó esta estrategia de detectar ambas variantes en un mismo canal ya que el equipo de PCR digital (QX200, BioRad) utilizado permite sólo la detección de dos intensidades (FAM/VIC).

Como controles se utilizaron ADNg de la línea celular MEL-XY3 (BRAF^{V600E}), PBMC de donantes como control negativo, y un control sin templado (NTC).

Para el análisis de las muestras se utilizó una relación de *primers*/sonda 4:1 (0,8µM/0,2µM). El ciclado de reacción para el análisis de las muestras fue el siguiente:

Tabla 21. Optimización por ddPCR: Reactivos para la mezcla de reacción para la determinación de los niveles de BRAF^{V600}, BRAF^{V600E} y BRAF^{V600K}.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| Mix BioRad | 2X | 1X | 11 |
| Mix Sondas/ <i>Primers</i> | 20X | 1X | 1,1 |
| ADN | - | - | 9,9 |
| H ₂ O | - | - | 0 |
| Volumen final | - | - | 22 |

cc: Concentración

Tabla 22. Optimización por ddPCR: Preparación de mezcla de *primers*/sondas 20X.

| Mix Sondas/<i>Primers</i> | cc Stock | cc 1X | cc 20X |
|----------------------------------|-----------------|--------------|---------------|
| <i>Primer Fw</i> | 50 μM | 0,8 μM | 16 μM |
| <i>Primer Rv</i> | 50 μM | 0,8 μM | 16 μM |
| Sonda Mt | 100 μM | 0,2 μM | 4 μM |
| Sonda WT | 100 μM | 0,2 μM | 4 μM |

cc: Concentración

Tabla 23. Optimización por ddPCR: Ciclado de ddPCR para la determinación de los niveles de BRAF^{V600}, BRAF^{V600E} y BRAF^{V600K}.

| Ciclado ddPCR | | |
|---|-------------|------------------------------------|
| Desnaturalización inicial | 95°C x 10' | |
| Desnaturalización | 98°C x 15'' | 40X Rampa al 50% (~2°C/seg.) |
| Temperatura y tiempo de extensión/hibridación | 60°C x 30'' | |
| Desnaturalización final | 98°C x 10' | |
| | 4°C | |

TERT

Se adicionaron las sondas de hibridación con los *primers*, a la reacción de PCR optimizada, para evaluar su especificidad de detección por ddPCR. Se probaron distintas concentraciones de aditivos, teniendo en cuenta las condiciones ideales para la mix y la técnica. Se utilizó el aditivo 7-deaza-dGTP (7-desaza-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato).

En primer lugar, se evaluó la reacción por ddPCR con la línea celular MEL-XX15 como control positivo y la línea celular PBMC como control negativo para ambas combinaciones de *primers*. También se utilizaron controles sin templado.

Tabla 24. Optimización por ddPCR (1): Reactivos para la mezcla de reacción para la determinación de los niveles de pTERT⁻¹²⁴ y pTERT⁻¹⁴⁶.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| Mix BioRad | 2X | 1X | 11 |
| Sondas Mt+Wt | 20X | 1X | 1,1 |
| Pr Fw | 10 μM | 0,8μM | 1,76 |
| Pr Rv | 10 μM | 0,8μM | 1,76 |
| ADN | 15 ng/μl | 30 ng/reacción | 2 |
| 7-deaza-dGTP | 5000 μM | 200 μM | 0,88 |
| H2O | - | - | 3,5 |
| Volumen final | - | - | 22 |

cc: Concentración

Tabla 25. Optimización por ddPCR: Preparación de la mezcla de sondas 20X.

| Mix Sondas | cc Stock | cc 1X | cc 20X |
|-------------------|-----------------|--------------|---------------|
| Sonda Mt | 25 μM | 0,2 μM | 4 μM |
| Sonda WT | 25 μM | 0,2 μM | 4 μM |

cc: Concentración

Tabla 26. Ciclado de ddPCR (1) para la determinación de los niveles de pTERT⁻¹²⁴ y pTERT⁻¹⁴⁶.

| Ciclado ddPCR | | |
|---|-------------|-----------------------------|
| Desnaturalización inicial | 95°C x 10' | |
| Desnaturalización | 94°C x 30'' | 40X |
| Temperatura y tiempo de extensión/hibridación | 60°C x 40'' | Rampa al 50% (~2°C/seg.) |
| Desnaturalización final | 98°C x 10' | |

Además, se evaluó la adición del aditivo Betaína:

1-Sondas: [0,2 μM], aditivo 7-deaza-dGTP a 200μM y aditivo Betaína 0,5 M

2-Sondas: [0,2 μM], aditivo 7-deaza-dGTP a 200μM

Tabla 27. Optimización por ddPCR (2): Reactivos para la mezcla de reacción para la determinación de los niveles de pTERT⁻¹²⁴ y pTERT⁻¹⁴⁶.

| REACTIVOS | cc Stock | cc Final | Volumen (ul) 1X |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------------|
| Mix BioRad | 4X | 1X | 5,5 |
| Sondas Mt+Wt | 20X (4 μM) | 0,2 μM | 1,1 |
| Pr Fw | 10 μM | 0,8μM | 1,76 |
| Pr Rv | 10 μM | 0,8μM | 1,76 |
| ADN | 20 ng/μl | 40 ng/reacción | 2 |
| 7-deaza-dGTP | 5000 μM | 200 μM | 0,88 |
| Betaína | 5 μM | 0,5 μM | 2,2 |
| H2O | - | - | 6,8 ¹ / 9 ² |
| Volumen final | - | - | 22 |

cc: Concentración

Tabla 28. Ciclado de ddPCR (3) para la determinación de los niveles de pTERT⁻¹²⁴ y pTERT⁻¹⁴⁶.

| Ciclado ddPCR | | |
|--|-------------|------------------------------------|
| Desnaturalización inicial | 95°C x 10´ | |
| Desnaturalización | 94°C x 30´´ | 40X Rampa al 50% (~2°C/seg.) |
| Temperatura y tiempo de extensión/hibridación | 60°C x 40´´ | |
| Desnaturalización final | 98°C x 10´ | |

6- Análisis de biopsias líquidas por PCR digital

Se utilizaron controles para establecer el límite de blanco (LOB) y el límite de detección para cada ensayo (LOD). El LOB se refiere al número de falsos positivos para cada reacción de PCR digital; y el LOD al mínimo número de microgotas que se pueden distinguir de manera confiable del LOB o ruido.

La **Tabla 29** informa la determinación del LoB y LoD según los niveles promedio de falsos positivos (Λ FP) asumiendo un modelo de distribución de Poisson. Para esto se hizo la determinación experimental del Λ FP con réplicas con 5000 copias de ADNg PBMC, WT para todas las variantes analizadas, considerando la **ecuación (1)**.

$$(1) \Lambda FP = \frac{\Sigma \text{Eventos falsos positivos}}{\text{Número de reacciones}} * 1,1 \text{ (10\% Volumen muerto)}$$

Tabla 29. Valores de LoB y LoD calculados a partir de diferentes niveles promedio de falsos positivos (Milbury *et al.*, 2014).

| Δ_{FP} | LoB | LoD |
|---------------|--|---|
| 0 | 0 | 3 |
| 0-0.05 | 1 | 5 |
| >0.05 | $\Delta_{FP} + 1.645 \sqrt{\Delta_{FP} + 0.8}$ | $(1.645 + \sqrt{1.645^2 + 4LoB})^2 / 4$ |

Para realizar los cálculos mostrados en la **Tabla 32, 33 y 35 (Anexo)** el programa de análisis *Quantasoft* suma los resultados de copias/ μ l de cada pocillo de las reacciones duplicadas de cada muestra y los promedia con el fin de disminuir el error. Para calcular las copias/ml de plasma (ecuación 2), se multiplicó al promedio de las copias/ μ l de reacción por el volumen total de reacción con su error correspondiente (10%), y se multiplicó por dos para contemplar el duplicado. A partir de la purificación de 3 ml de plasma por muestra se lograron eluciones de ADNclc de 60 μ l, es decir, por cada ml de plasma se obtuvieron 20 μ l de ADNclc. A su vez, por cada reacción con cada marcador se utilizaron \approx 10 μ l de muestra y se realizaron por duplicado, es decir que se utilizaron 20ul de ADNclc totales por cada marcador estudiado provenientes de 1 ml de plasma. Por lo tanto, si calculamos las copias obtenidas de las dos reacciones realizadas, obtenemos las copias/ml plasma (ADNc-CPMP). Considerando que el límite de detección del blanco (LOB) se restó únicamente para los cálculos de las variantes mutacionales, la **ecuación (2)** es la siguiente:

$$(2) \frac{\text{copias}}{\text{ml plasma}} = 2 * ((\text{Promedio} \frac{\text{copias}}{\text{ul reacción}} * \text{Volumen de reacción} * \text{Error(vol)}) - \text{LoD})$$

Siendo,

LoD=se calcula a partir del LoB con la tabla 29

LoB=se determina experimentalmente

Volumen de reacción= 20 μ l

Error del volumen de reacción= 10% (1,1)

Por lo tanto, la ecuación se puede simplificar de la siguiente manera:

$$(2) \frac{\text{copias}}{\text{ml plasma}} = 2 * ((\text{Promedio} \frac{\text{copias}}{\text{ul reacción}} * 20 \mu\text{l} * 1,1) - \text{LoD})$$

$$(\text{ADNc CPMP}) = \frac{\text{copias}}{\text{ml plasma}} = 2 * (\text{ADNc CPP} - \text{LoD})$$

Siendo,

ADNc CPP= Copias de ADNc por pocillo de reacción

ADNc CPMP= Copias de ADNc por ml de plasma

Entonces,

si ADNc CPP -LoD >0 : evento positivo

si $ADNc - LoD < 0$: evento negativo

Por lo tanto, se calculó la fracción alélica mutacional (FAM%) a través de la siguiente **ecuación (3)** para las muestras con eventos positivos:

$$(3) \text{ FAM}\% = \frac{\text{copias Mt/ml plasma}}{\text{copias Mt/ml plasma} + \text{copias Wt/ml plasma}} * 100$$

Siendo,

Copias Mt: copias de ADNclc mutado

Copias Wt: copias de ADNclc *wild type*

7- Análisis de correlaciones

Se evaluaron los niveles iniciales de ADNct en cada muestra y a lo largo del tiempo, integrando todos los biomarcadores analizados (BRAF^{V600E}, BRAF^{V600K}, BRAF^{V600} (WT), NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}, NRAS^{Q61} (WT)), y su posible asociación con la evolución clínica de los pacientes al tratamiento asignado por métodos estadísticos.

RESULTADOS

1- Optimización de la detección de variantes prevalentes en oncogenes de melanoma cutáneo

1.1-NRAS

Primer paso de optimización: Optimización de la mezcla de reacción con un gradiente de temperatura de hibridación 56-60°C y con una concentración de *primers* de 0,8 µM, utilizando como control positivo la línea celular MEL-XY1 NRAS^{Q61K} heterocigota.

Curvas de desnaturalización

En la **Figura 10** se observan las curvas de fusión correspondientes a las primeras condiciones de ciclado evaluadas (**Materiales y métodos, Tabla 2**) con la *Mix Type-it Eva Green 2X* de *Qiagen*, a una concentración de *primers* de 0,8µM, analizando un gradiente de temperatura para definir una $T_{hibridación}$ idónea. Se utilizó la línea celular MEL-XY1 como control positivo.

Se puede distinguir una única curva definida con un único pico para cada temperatura de $T_{hibridación}$ evaluada y, ya que el pico de cada una de ellas coinciden en una misma temperatura de fusión podría estimarse que corresponde al mismo amplicón objetivo. Por otro lado, se distingue una curva de menor temperatura de fusión y menor intensidad de fluorescencia que se estima que se debe a la formación de dímeros de *primers*.

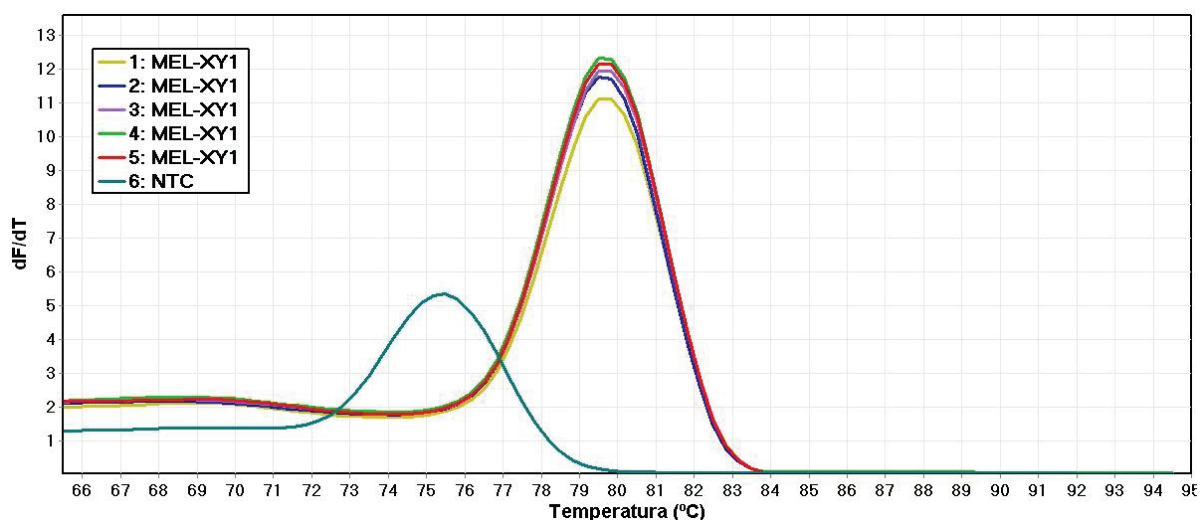
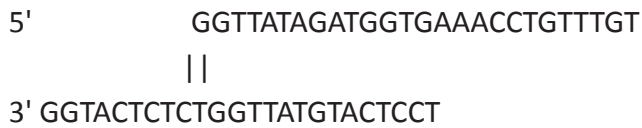


Figura 10. Optimización de condiciones de reacción para la amplificación de NRAS^{Q61} por PCR. Curvas de desnaturalización de los productos de PCR amplificados obtenidas a partir de graficar la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (dF/dT) contra la temperatura (°C). Se analizó un gradiente de temperatura de *melting* de 56-60°C, referenciado del 1 al 5 respectivamente, con una concentración de *primers* 0,8µM. NTC: control sin templado (6).

Electroforesis en gel

En la **Figura 11** se puede distinguir una única banda bien definida, para las temperaturas de hibridación evaluadas (56-60°C), con el tamaño esperado del amplicón (89 pb). En el caso de la muestra NTC se observa una banda de menor tamaño al producto esperado, que podría

corresponder a la formación de dímeros de *primers* considerando que su tamaño teórico es de 47 pb.



Los resultados obtenidos por la curva de fusión y el electroforesis en gel son coincidentes con lo esperado, es decir, que las condiciones de reacción resultaron óptimas para todo el gradiente de temperatura analizado, detectando un sólo producto del tamaño esperado. En consecuencia, se prosiguió a optimizar la concentración de *primers* con el fin de disminuir la amplificación inespecífica atribuible a la formación de dímeros de *primers*.

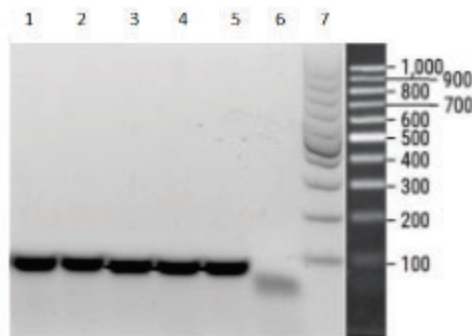


Figura 11 . electroforesis en gel de los productos de PCR obtenidos con una concentración 0,8 μ M de *primers*.
Calles: 1 Tann 56°C; 2 Tann 57°C; 3 Tann 58°C; 4 Tann 59°C; 5 Tann 60°C ; 6 NTC; 7 MPM

Segundo paso de optimización: Se estableció un gradiente de temperatura de hibridación 56°C-60°C con una concentración de *primers* 0,25 μ M utilizando la línea celular MEL-XY1 como control positivo.

Si bien se observaron resultados similares a toda temperatura, desconocíamos si al variar la concentración de *primers* la reacción iba a continuar siendo igual de versátil. Por lo tanto, decidimos estudiar esta variable nuevamente en todo el rango de temperatura para confirmar que, ajustando la concentración de *primers* en el sistema, continuaba funcionando correctamente.

Curva de desnaturalización

En la **Figura 12** se observa una única curva para todo el gradiente de temperatura evaluado que coinciden en una misma temperatura de fusión. No se observa ninguna curva para la muestra NTC, pudiendo corresponder a la disminución de la concentración de *primers* a 0,25 μ M que evita la formación de dímeros de *primers*. Teniendo en cuenta que los dímeros de *primers* son productos inespecíficos y que su formación disminuye el rendimiento de la reacción PCR, se puede explicar que al evitar dicha hibridación aumenta el rendimiento, favoreciendo la amplificación específica de producto.

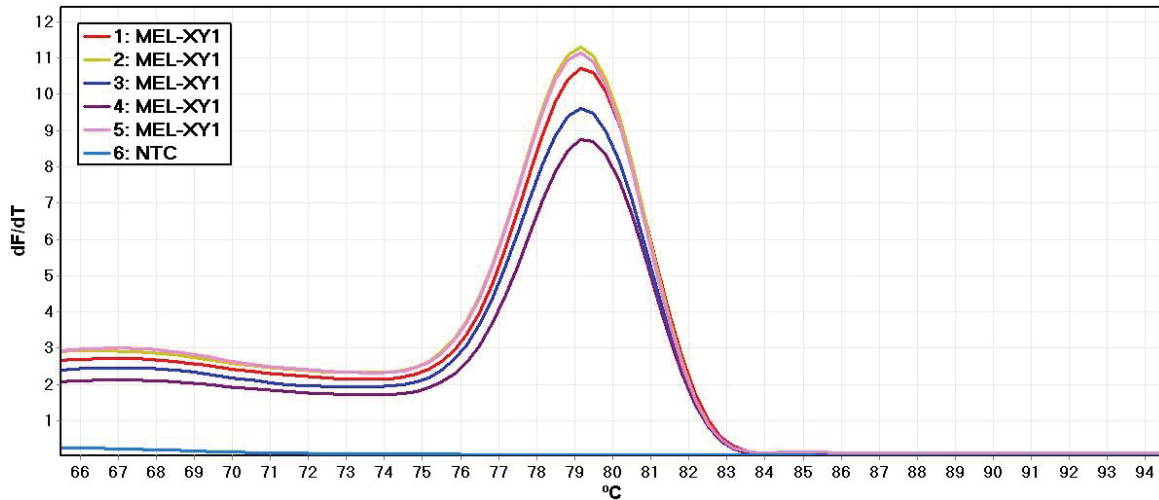


Figura 12. Optimización de condiciones de reacción para la amplificación de NRAS^{Q61} por PCR. Curvas de desnaturalización de los productos de PCR amplificados obtenidas a partir de graficar la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (dF/dT) contra la temperatura (°C). Se analizó un gradiente de temperatura de melting de 56°C-60°C, referenciado del 1 al 5 respectivamente, con una concentración de *primers* 0,25µM. NTC: control sin templado.

Electroforesis en gel

En la **Figura 13** se puede distinguir una única banda definida para cada temperatura analizada correspondiente al amplicón esperado de 89 pb. En el caso de la muestra NTC no se observa ninguna banda, lo que indica que ya no hay formación de dímeros de *primers* y, que coincide con los resultados obtenidos en el análisis por curvas de desnaturalización.

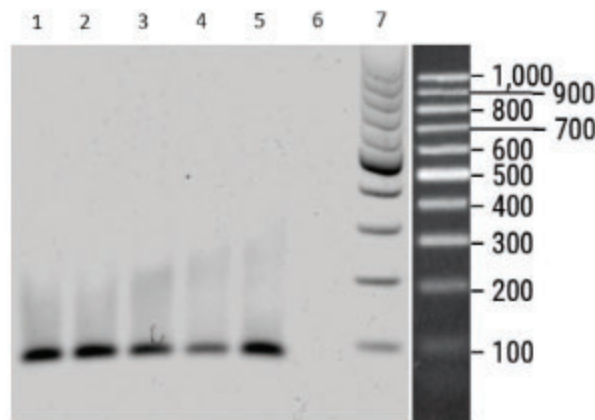


Figura 13. electroforesis en gel de los productos de PCR obtenidos con una concentración 0,25µM de *primers*.
Calles: 1 Tann 56°C; 2 Tann 57°C; 3 Tann 58°C; 4 Tann 59°C; 5 Tann 60°C; 6 NTC; 7 MPM

PCR Cuantitativa

Se evaluó la especificidad de detección de las tres sondas juntas en una mezcla de reacción, combinando una sonda para detectar la secuencia WT NRAS^{Q61} WT (HEX), una sonda para la mutación NRAS^{Q61R} (FAM) y una sonda para la mutación NRAS^{Q61K} (FAM). Se utilizó una concentración de *primers* 0,25µM (relación *primers*/sonda 1:1) y una temperatura de hibridación de 60°C.

Como controles se utilizaron la línea celular MEL-XY1 heterocigota para la mutación NRAS^{Q61K}, el plásmido pGEM-T-hNRAS(Q61R), el plásmido pGEM-T-hNRAS(Q61K) y el control sin templado.

Por lo tanto, en el canal HEX se detectó únicamente el control con la región WT con la sonda con la secuencia WT (**Figura 14**) y en el canal FAM, se detectaron únicamente los controles con la secuencia mutada con las sondas mutadas como se esperaba (**Figura 15**).

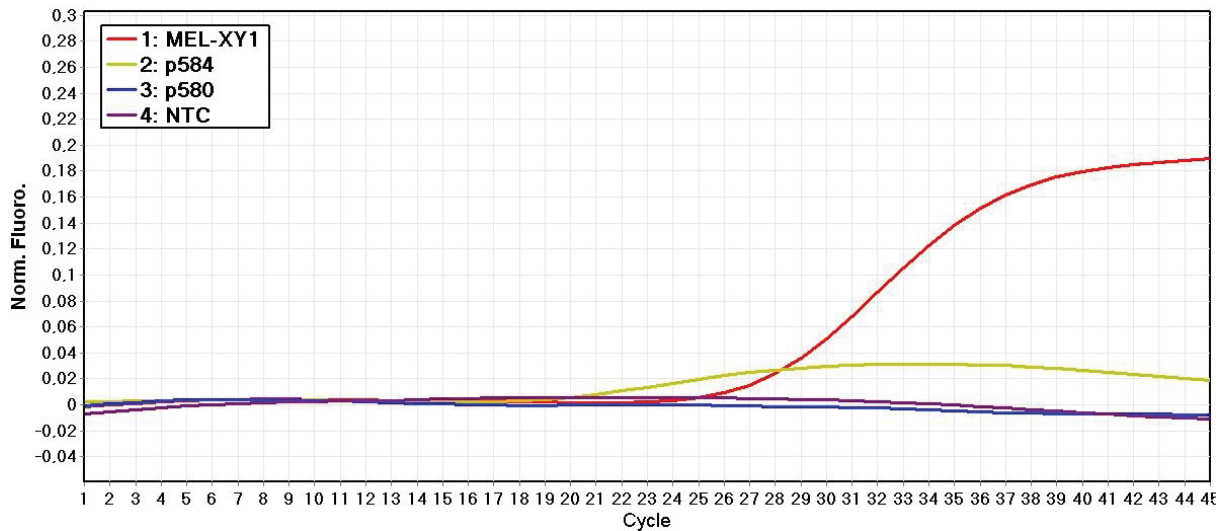


Figura 14: Amplificación y detección por sondas en el canal HEX (detección alelo WT) de las variantes NRAS: NRAS^{Q61}, NRAS^{Q61K}, y NRAS^{Q61R}. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. NTC: control sin templado.

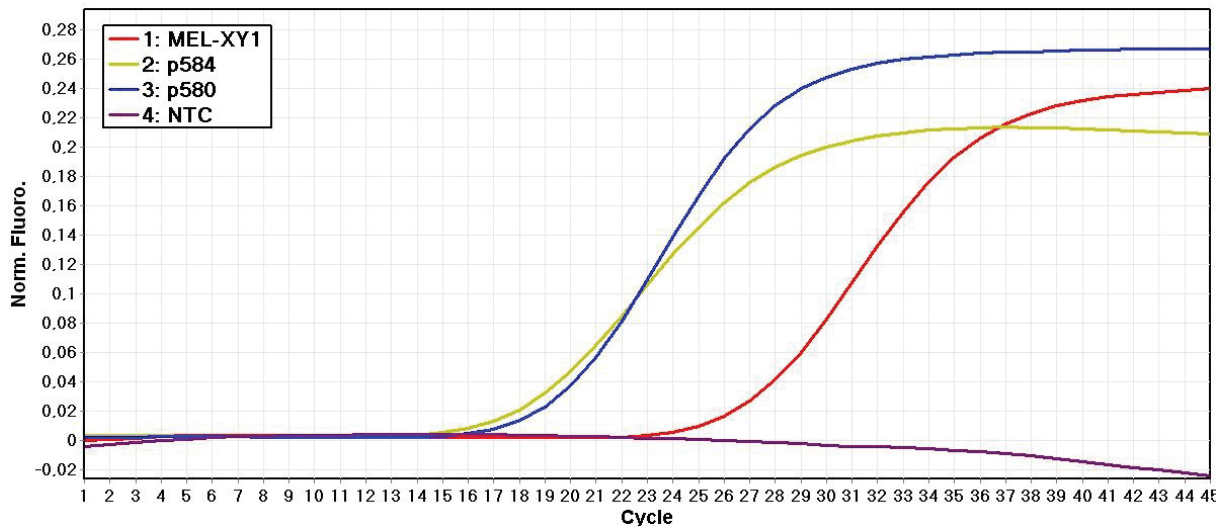


Figura 15: Detección por sondas en el canal FAM (detección del alelo mutado) de las variantes NRAS: NRAS^{Q61}, NRAS^{Q61K}, y NRAS^{Q61R}. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. NTC: control sin templado.

En forma paralela, utilizando los mismos controles, se verificó que la detección de las sondas para las mutaciones NRAS^{Q61K} y NRAS^{Q61R} no presentara variaciones trabajando con las sondas por separado (**Figura 16 y 17**) con respecto a las tres sondas juntas, observando un Ct equivalente. De esta forma, se pueden utilizar las tres sondas juntas para analizar las muestras de biopsias líquidas por PCR digital, optimizando su uso.

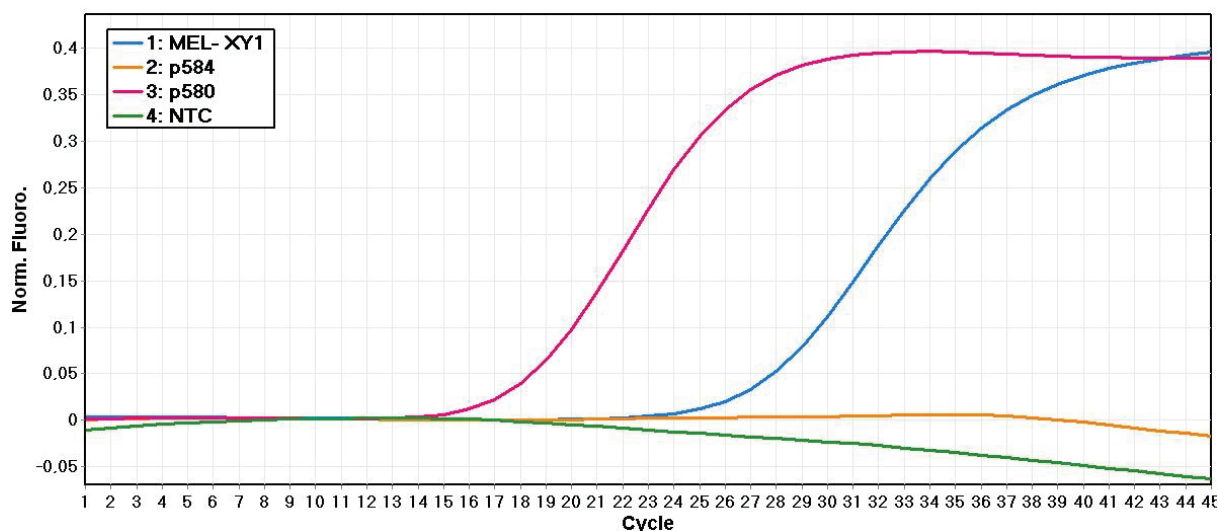


Figura 16. Detección específica de la sonda para la mutación NRAS^{Q61K} a través del canal FAM. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. NTC: control sin templado.

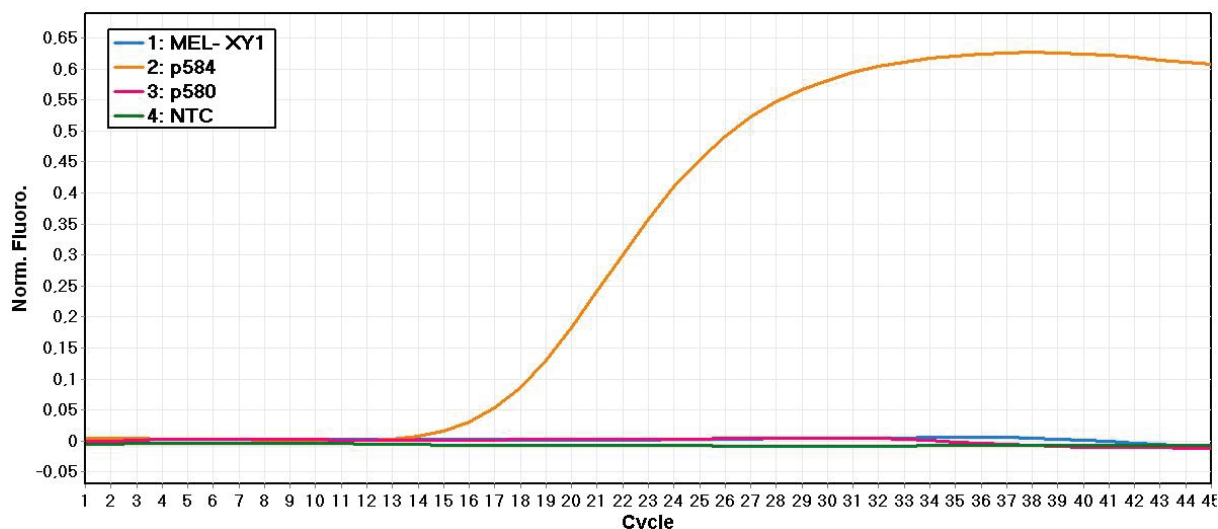


Figura 17. Detección específica de la sonda para la mutación NRAS^{Q61R} a través del canal FAM. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. NTC: control sin templado.

Los resultados con una relación de *primers*:sonda 4:1 resultaron ser similares (*datos no mostrados*) lo cual indica que en las condiciones óptimas para ddPCR también hay amplificación y detección específica.

Ejemplo de aplicación: determinación del estatus mutacional de NRAS^{Q61} en una muestra de tumor por PCR cuantitativa

A continuación se muestran los resultados de utilizar el sistema diseñado de detección, combinando las tres sondas, para la región mutante del gen NRAS^{Q61} en la muestra de una metástasis de MC en ganglio linfático de un paciente (L-C) por PCR cuantitativa. Se utilizaron controles homocigota para cada variante de NRAS: NRAS^{Q61}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R} obtenidos de productos de PCR.

Se encontró que la muestra presentó amplificación tanto para el canal FAM como HEX, indicando que la muestra es NRAS^{mut} heterocigota (**Figura 18 y 19**). Luego, se analizó la amplificación de las sondas por separado, determinando que la muestra presenta la variante NRAS^{Q61R} (**Figura 21**).

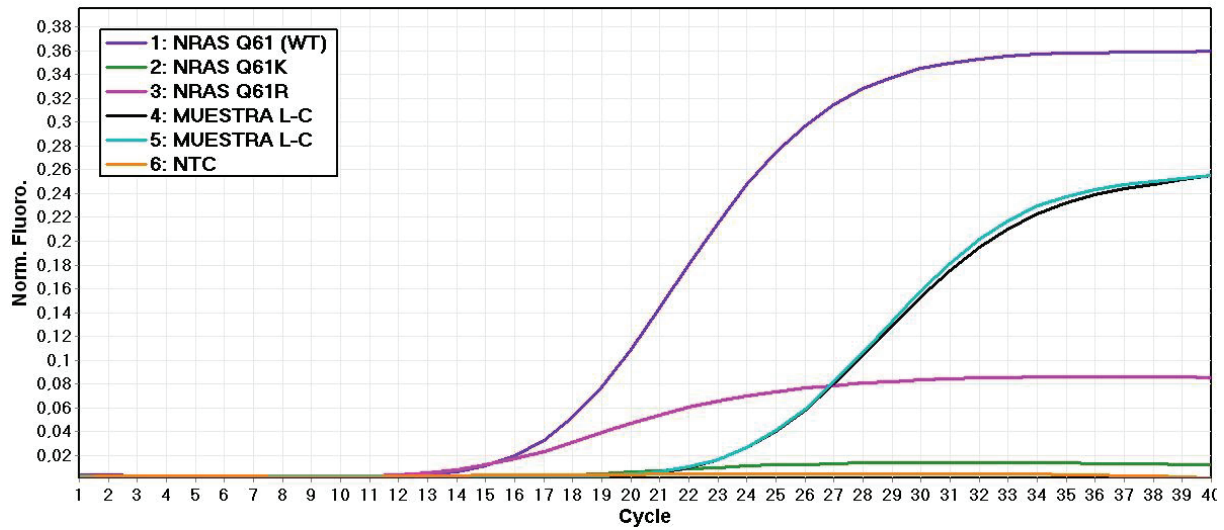


Figura 18: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal HEX a una temperatura de hibridación/extensión de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la MUESTRA L-C. NTC: control sin templado.

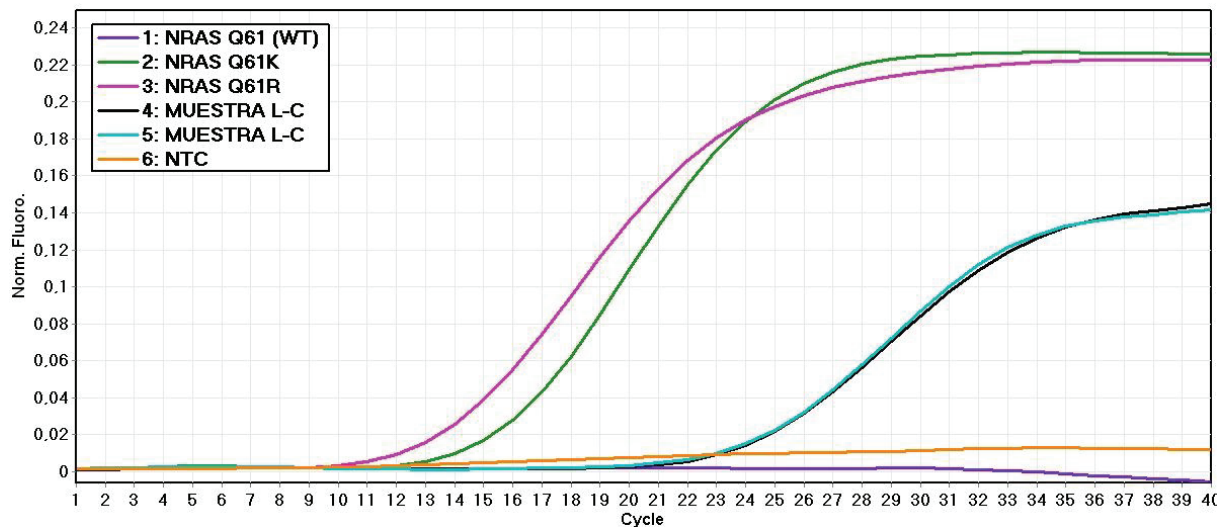


Figura 19: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal FAM a una temperatura de hibridación/extensión de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la MUESTRA L-C. NTC: control sin templado.

Se observó que la muestra problema presentó el alelo WT NRAS Q61 (**Figura 20**).

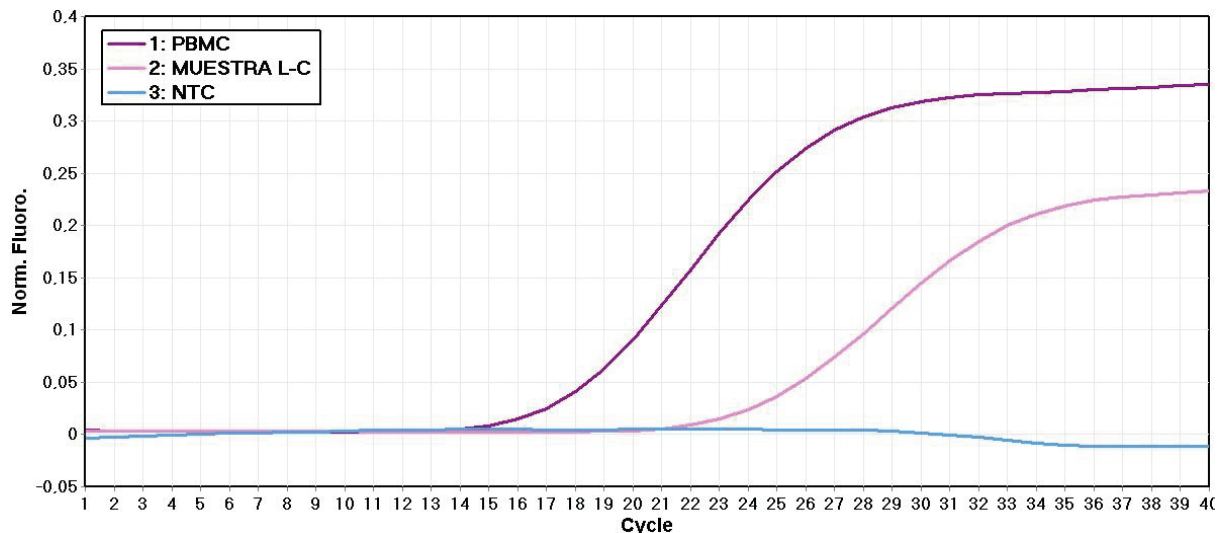


Figura 20: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal HEX a una temperatura de hibridación/extensión de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la MUESTRA L-C con la sonda NRAS^{Q61}. Control negativo: PBMC. NTC: control sin templado.

Al confirmar el resultado se observó que la muestra problema sí presentó la variante NRAS Q61R (**Figura 21**). Por lo tanto, se confirma que la muestra es NRAS Q61R heterocigota.

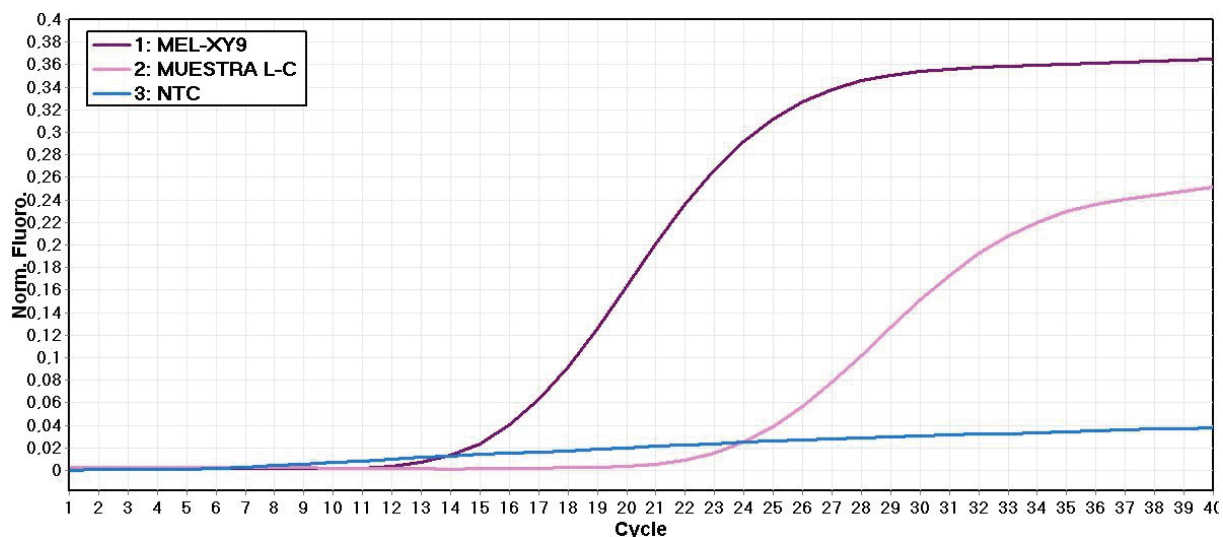


Figura 21: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal FAM a una temperatura de hibridación/extensión de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la MUESTRA L-C con la sonda NRAS^{Q61R}. Control positivo: MEL-XY9:NRAS^{Q61R}. NTC: control sin templado.

Se confirmó que la muestra problema no presentó la variante NRAS Q61K (**Figura 22**).

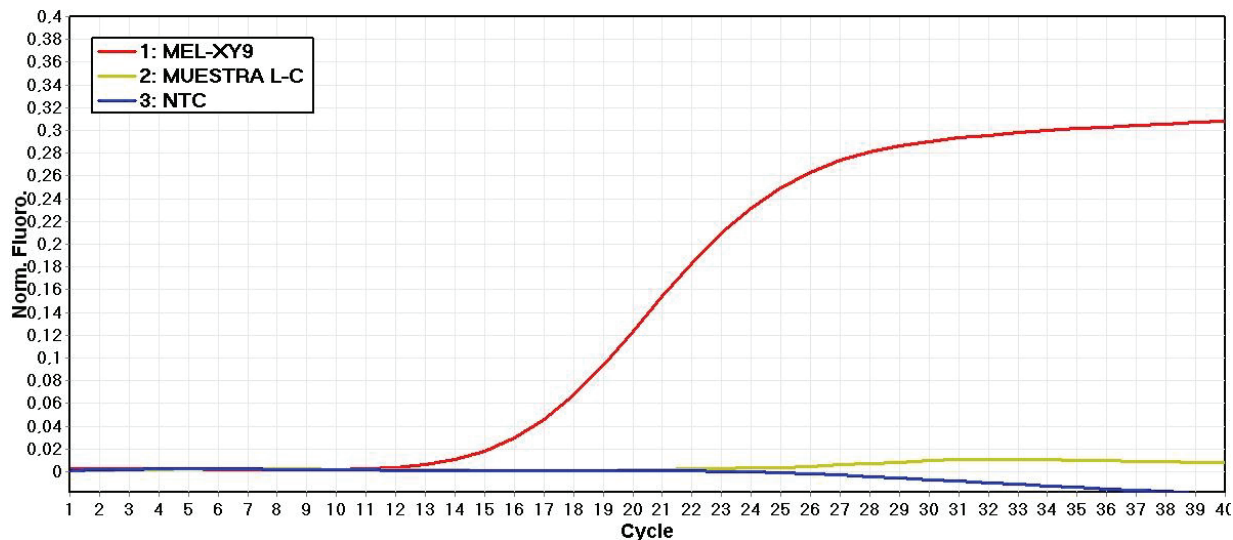


Figura 22: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal FAM a una temperatura de hibridación/extensión de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la MUESTRA L-C con la sonda NRAS^{O61K}. Control positivo: MEL-XY1: NRAS^{O61K}. NTC: control sin templado.

PCR digital

En principio, se determinaron los valores del LoB y LoD (**Materiales y Métodos, pág. 38**). A partir del análisis por PCR digital de ADN NRAS^{O61} (WT) en 7 pocillos (**Figura 23**), se determinó un valor promedio de falsos positivos (AFP) de 2,22, resultando un LoB=5,47 y LoD=10,90 (**Tabla 31, Anexo**).

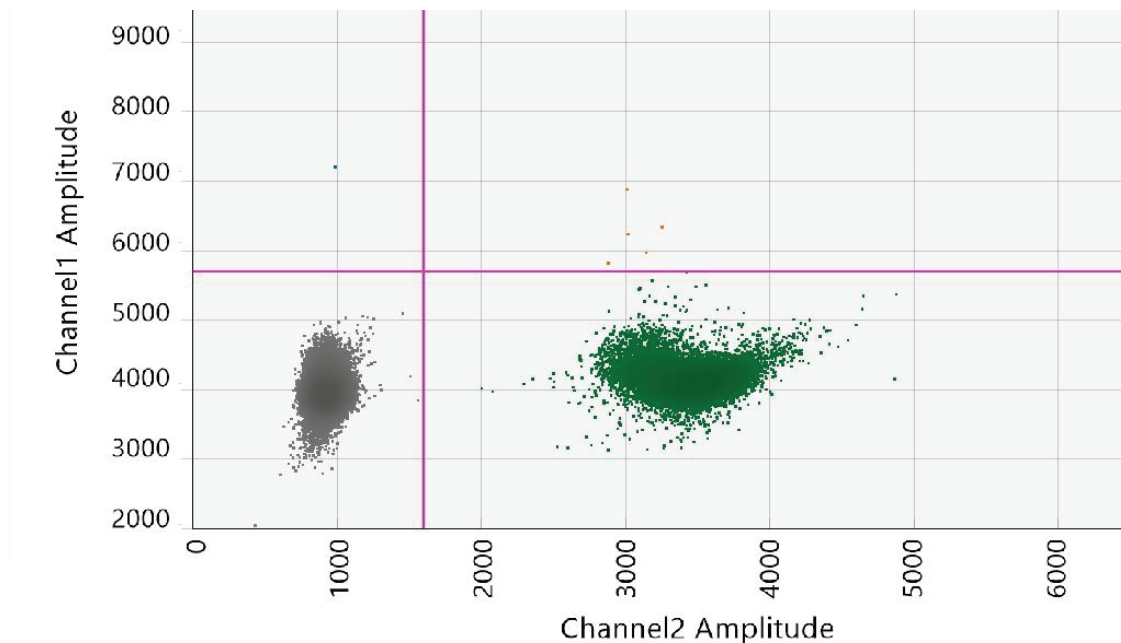


Figura 23. Determinación del LOB/LOD para la reacción de NRAS. Gráfico de puntos 2D de PCR digital por gotas de las 7 réplicas con ADN control NRAS^{O61}. En el eje Y se muestra la amplitud del fluoróforo FAM (Canal 1) y en el eje X se muestra la amplitud del fluoróforo HEX (Canal 2). En azul se observan eventos MT positivos, en verde eventos WT positivos, en negro eventos doble negativos y en naranja doble positivos. Umbral utilizado: 1600/5700.

1.2-BRAF

PCR Cuantitativa

Como las condiciones de reacción para la detección de BRAF^{V600E} ya estaban puestas a punto, se analizó si la detección de la sonda BRAF^{V600K} era específica, y si se podía combinar en un solo ensayo con las sondas BRAF^{V600} y BRAF^{V600E} para la optimización del uso de la muestra (Relación de *primers*/sonda 4:1, temperatura de hibridación=60°C). Para esto se evaluó si la detección de la sonda es específica para la variante BRAF^{V600K} únicamente con la sonda para la región BRAF^{V600} (WT) utilizando controles homocigotas para la mutación BRAF^{V600E} (A), el control WT BRAF^{V600} (B) y el control homocigota para la mutación BRAF^{V600K} (C) (Figura 24 y 25).

Una vez que se comprobó su especificidad se continuó a combinar las tres sondas para los análisis subsiguientes.

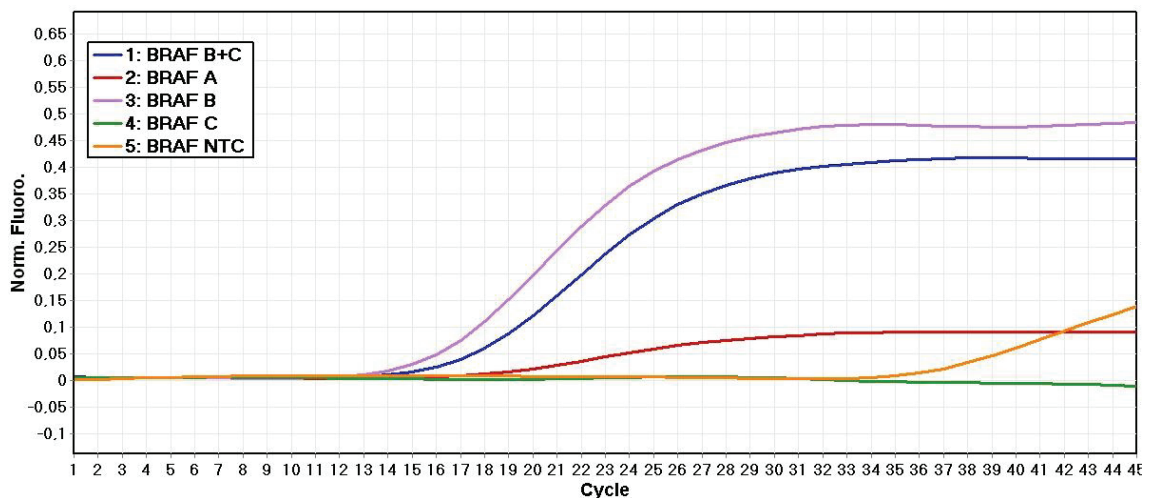


Figura 24. Amplificación y detección con sonda específica para la región WT a través del canal VIC. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. Controles: BRAF^{V600E} (A), BRAF^{V600} (B), BRAF^{V600K} (C). NTC: control sin templado.

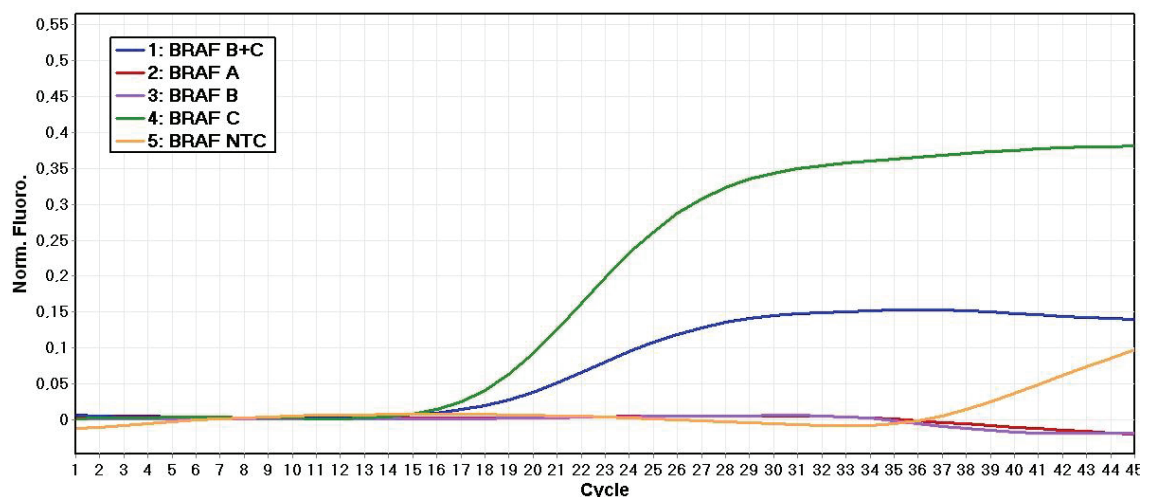


Figura 25. Amplificación y detección con sonda específica para la región mutada BRAF^{V600K} a través del canal FAM. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. Controles: BRAF^{V600E} (A), BRAF^{V600} (B), BRAF^{V600K} (C). NTC: control sin templado.

Ejemplo de aplicación: determinación del estatus mutacional de BRAF^{V600} en una muestra de tumor por PCR cuantitativa

A continuación se observan los resultados de utilizar el sistema diseñado de detección para la región mutante del gen BRAF en la muestra de un paciente (paciente L-C) por PCR cuantitativa combinando las tres sondas (**Figura 26 y 27**). Como controles se utilizaron el producto de PCR homocigota para la mutación BRAF^{V600E} (A), el homocigota para la mutación BRAF^{V600K} (C) y el producto de PCR WT, BRAF^{V600} (B). Se encontró que la muestra presenta amplificación únicamente en el canal VIC, a través de la detección con las sondas, por lo que la muestra es BRAF^{V600} (WT).

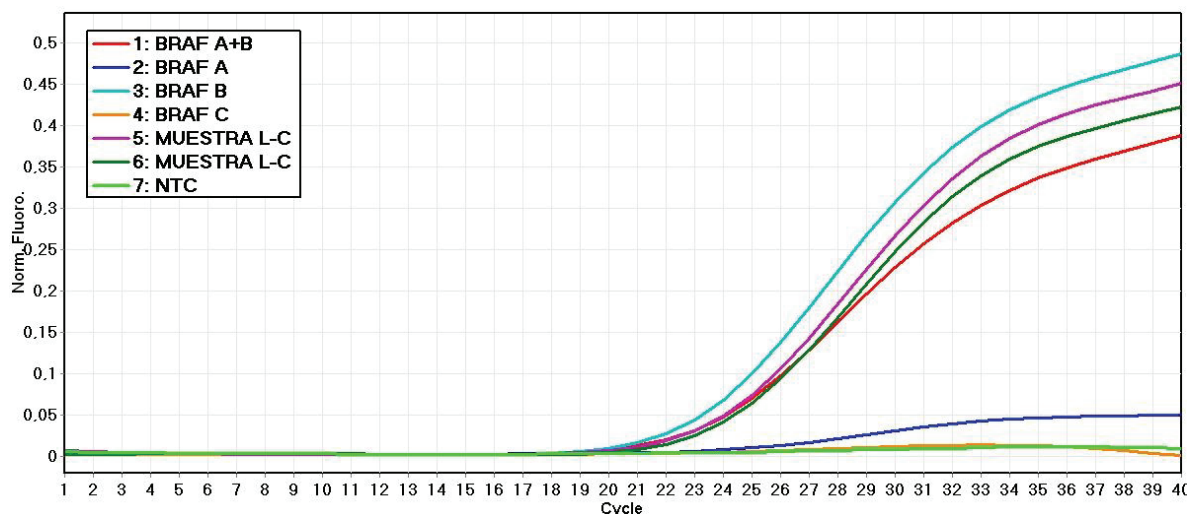


Figura 26. Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal VIC a una temperatura de hibridación de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la muestra L-C. Controles: BRAF^{V600E} (A), BRAF^{V600} (B), BRAF^{V600K} (C). NTC: control sin templado.

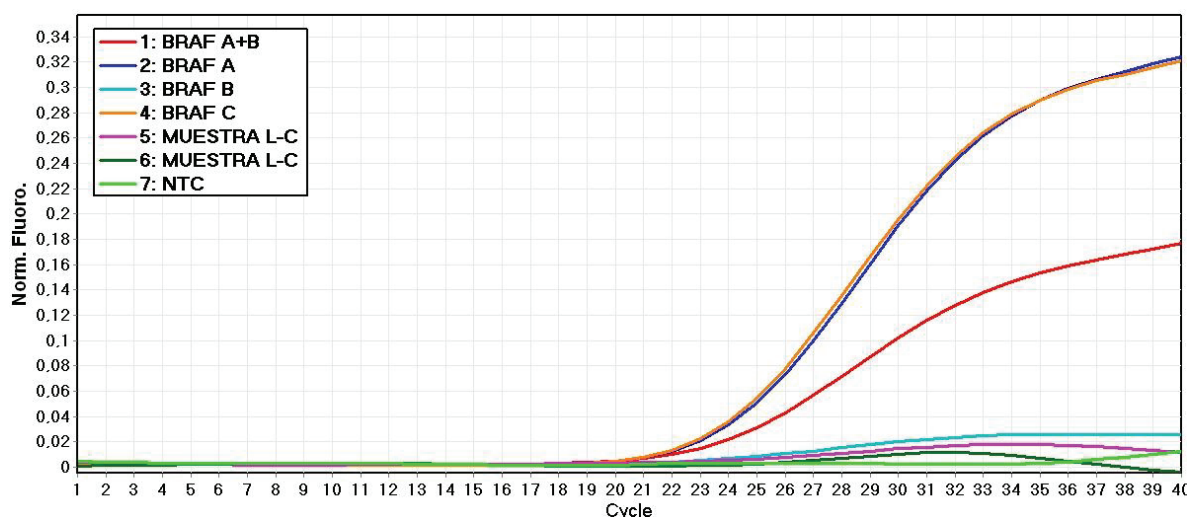


Figura 27: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal FAM a una temperatura de hibridación de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la muestra L-C. Controles: BRAF^{V600E} (A), BRAF^{V600} (B), BRAF^{V600K} (C). NTC: control sin templado.

PCR digital

Se decidió utilizar los valores obtenidos previamente para BRAF^{V600E}, LoB=1 y LoD=5 (Tabla 34). De esta forma, se pudieron hacer los cálculos respectivos con los resultados de las muestras.

1.3-TERT

Combinación #1

Optimización de PCR

Se optimizó la mezcla de reacción con un gradiente de temperatura de hibridación de 59-61°C y con una concentración de *primers* de 0,4µM utilizando la línea celular MEL-XX15 como control positivo.

Se puede distinguir una única curva definida con un único pico para cada temperatura de $T_{hibridación}$ evaluada y, ya que el pico de cada una de ellas coinciden en una misma temperatura de fusión podría estimarse que corresponde al mismo amplicón objetivo. Por otro lado, en el control NTC se distingue una curva de menor temperatura de fusión y menor intensidad de fluorescencia que se estima a la formación de dímeros de *primers* (Figura 24).

Curva de desnaturalización

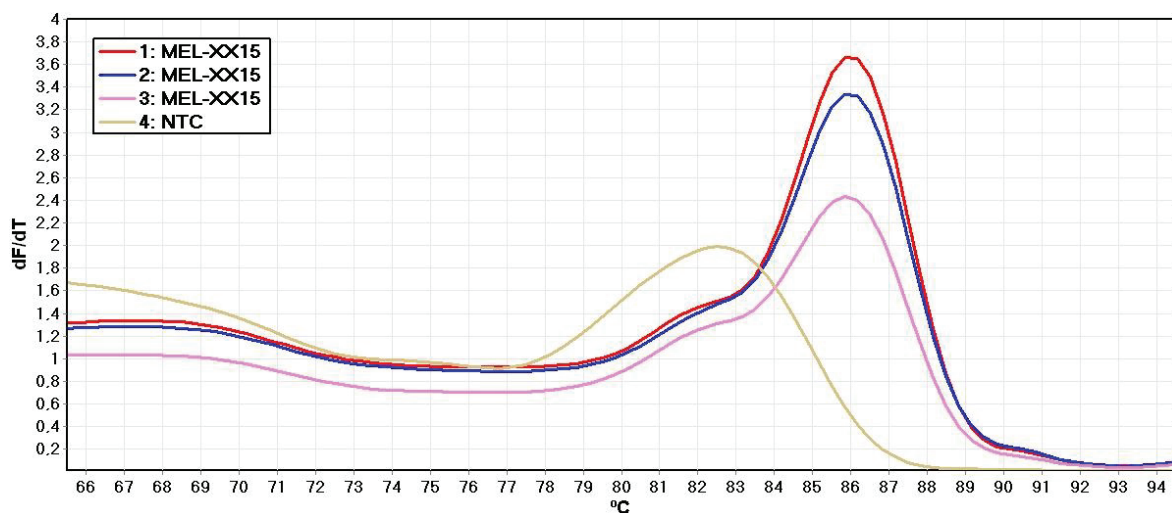


Figura 28. Curvas de desnaturalización de los productos de PCR amplificadas obtenidas a partir de graficar la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (dF/dT) contra la temperatura ($^{\circ}C$). Se analizó un gradiente de temperatura de *melting* de 59-61°C, referenciado del 1 a 3 respectivamente, con una concentración de *primers* 0,4 µM. Se utilizó la línea celular MEL-XX15 como control positivo. NTC: control sin templado.

Electroforesis en gel

En la Figura 25 se puede distinguir una banda definida de mayor intensidad para cada temperatura analizada correspondiente al amplicón esperado de 146pb. En el caso de la muestra NTC se observa una banda de menor tamaño de baja intensidad que podría corresponder con la formación de dímeros de *primers* y, que coincide con los resultados obtenidos en el análisis por curvas de desnaturalización.

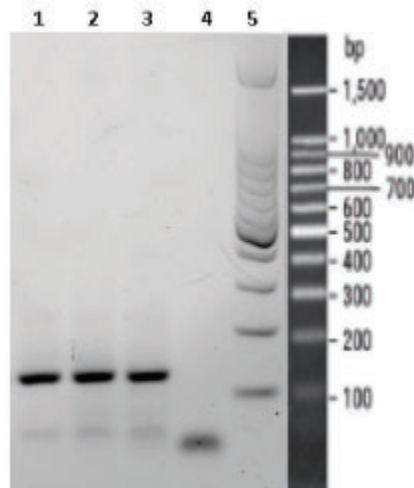


Figura 29 . electroforesis en gel de los productos de PCR obtenidos con una concentración 0,4 μ M de *primers*. Calles: 1 Tann 59°C; 2 Tann 60°C; 3 Tann 61°C; 4 NTC; 5 MPM

Se realizó un segundo paso de optimización de la mezcla de reacción con un gradiente de temperatura de hibridación de 56-60°C y con una concentración de *primers* 0,25 μ M con el fin de aumentar la especificidad de la reacción. Se observaron resultados similares pero con la desaparición de los dímeros de *primers* (*datos no mostrados*). Por lo tanto, estas serían las condiciones óptimas para qPCR.

Combinación #2

Optimización de PCR

Primer paso de optimización: Optimización de la mezcla de reacción con un gradiente de temperatura de hibridación de 59-61°C y con una concentración de *primers* de 0,4 μ M utilizando la línea celular MEL-XX15 como control positivo.

Curva de desnaturalización

Se puede distinguir una única curva definida con un único pico para cada temperatura de $T_{hibridación}$ evaluada y, ya que el pico de cada una de ellas coinciden en una misma temperatura de fusión, podría estimarse que corresponde al mismo amplicón objetivo. Por otro lado, en el control NTC se distingue una curva de menor temperatura de fusión y menor intensidad de fluorescencia, que se estima que se debe a la formación de dímeros de *primers* (**Figura 30**).

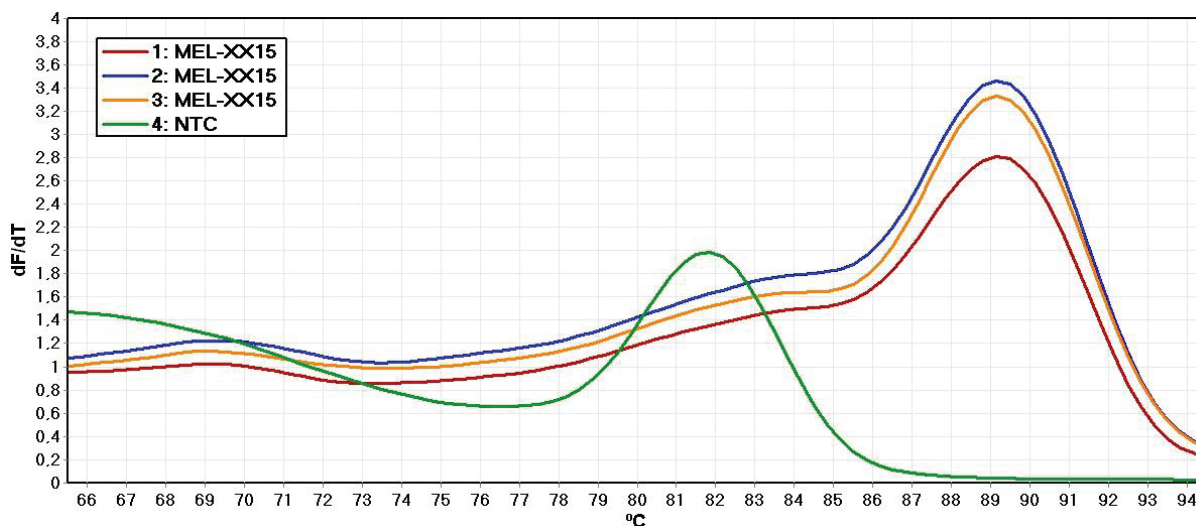


Figura 30. Curvas de desnaturalización de los productos de PCR amplificados obtenidas a partir de graficar la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (dF/dT) contra la temperatura ($^{\circ}C$). Se analizó un gradiente de temperatura de melting de 59-61 $^{\circ}C$, referenciado del 1 al 3 respectivamente, con una concentración de *primers* 0,4 μ M. NTC: control sin templado.

Electroforesis en gel

En la **Figura 31** se pueden distinguir dos bandas definidas de mayor intensidad para cada temperatura estimando que uno de los productos es inespecífico. En el caso de la muestra NTC se observa una banda de menor tamaño que podría corresponder con la formación de dímeros de *primers*. Por lo tanto, se pasaron a evaluar otras condiciones para aumentar la especificidad de la reacción.

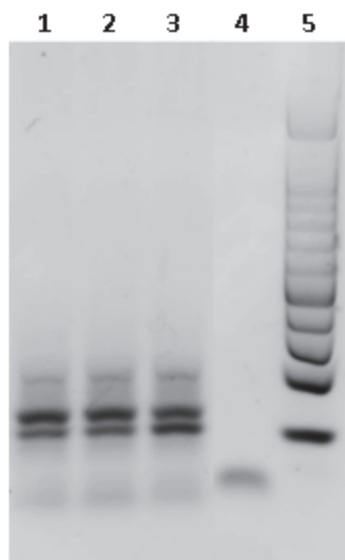


Figura 31. electroforesis en gel de los productos de PCR obtenidos con una concentración 0,4 μ M de *primers*. *Calles*:1 Tann 59 $^{\circ}C$; 2 Tann 60 $^{\circ}C$; 3 Tann 61 $^{\circ}C$; 4 NTC; 5 MPM

Segundo paso de optimización: Optimización de la mezcla de reacción con un ciclado TOUCHDOWN en un rango de temperatura de 58-59-60 $^{\circ}C$ con una concentración de *primers* 0,4 μ M.

Curva de desnaturalización

Se puede distinguir un único pico para cada temperatura de $T_{\text{hibridación}}$ evaluada y, ya que el pico de cada una de ellas coinciden en una misma temperatura de fusión podría estimarse que corresponde al mismo amplicón objetivo. En el control NTC no se distingue amplificación (**Figura 32**).

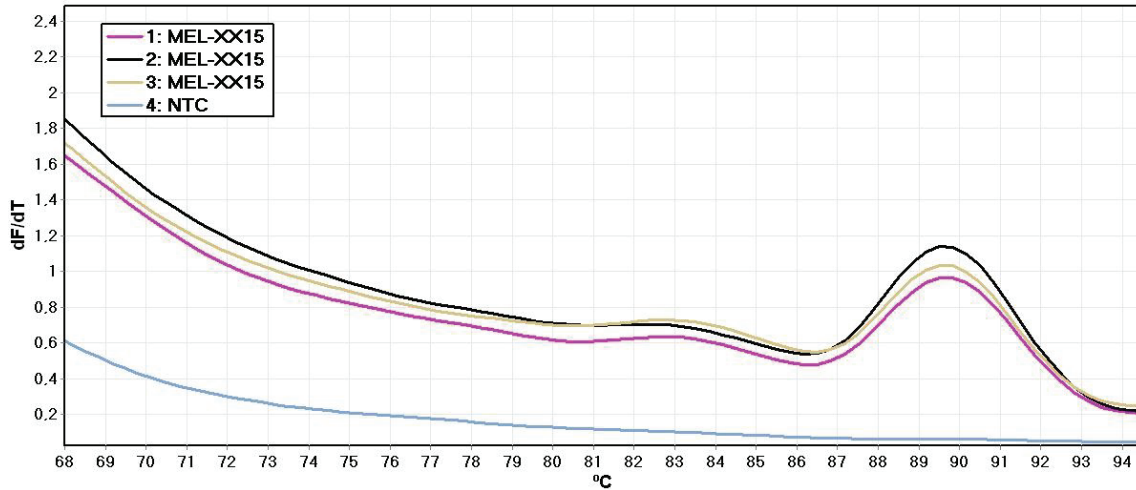


Figura 32. Curvas de desnaturalización de los productos de PCR amplificados obtenidas a partir de graficar la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (dF/dT) contra la temperatura (°C). Se analizó un gradiente de temperatura de *melting* de 58-60°C, referenciado del 1 al 3 respectivamente, con una concentración de *primers* 0,4 μM . Se utilizó la línea celular MEL-XX15 como control positivo. NTC: control sin templado.

Electroforesis en gel

En la **Figura 33** se pueden observar tres bandas para cada temperatura, dos de mayor intensidad, lo que podría corresponder con amplificación inespecífica. En el caso de la muestra NTC no se observa amplificación por lo que, a priori no habría formación de dímeros de *primers*.

Se decidió continuar evaluando condiciones más específicas para la reacción con el fin de obtener una única banda para cada temperatura.

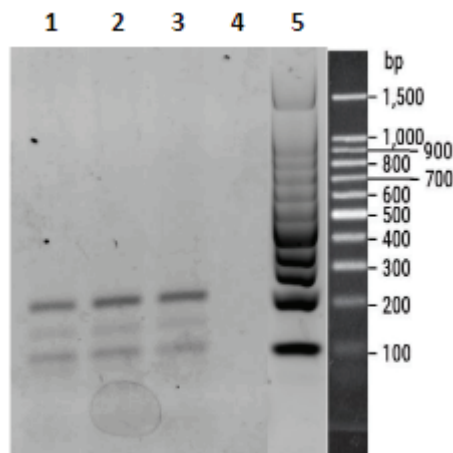


Figura 33. electroforesis en gel de los productos de PCR obtenidos con una concentración 0,4 μM de *primers*. Calles: 1 Tann 58°C; 2 Tann 59°C; 3 Tann 60°C; 4 NTC; 5 MPM

Tercer paso de optimización: Optimización de la mezcla de reacción con ciclado TOUCH-UP con y sin aditivo *Enhancer 20X* en un rango de temperatura de 56-61°C con una concentración de *primers* 0,25 µM.

Curva de desnaturalización

Se observa un único pico definido para cada temperatura de $T_{hibridación}$ evaluada con y sin aditivo y, ya que el pico coincide en una misma temperatura de fusión, en cada condición analizada, podría estimarse que corresponde al mismo amplicón objetivo.

Para el rango de temperatura evaluado 56-58°C, en el control NTC hubo amplificación, que podría corresponder con la formación de dímeros de *primers* (**Figura 34**). En cambio, para el rango de temperatura 59-61°C no parecen formarse (**Figura 35**).

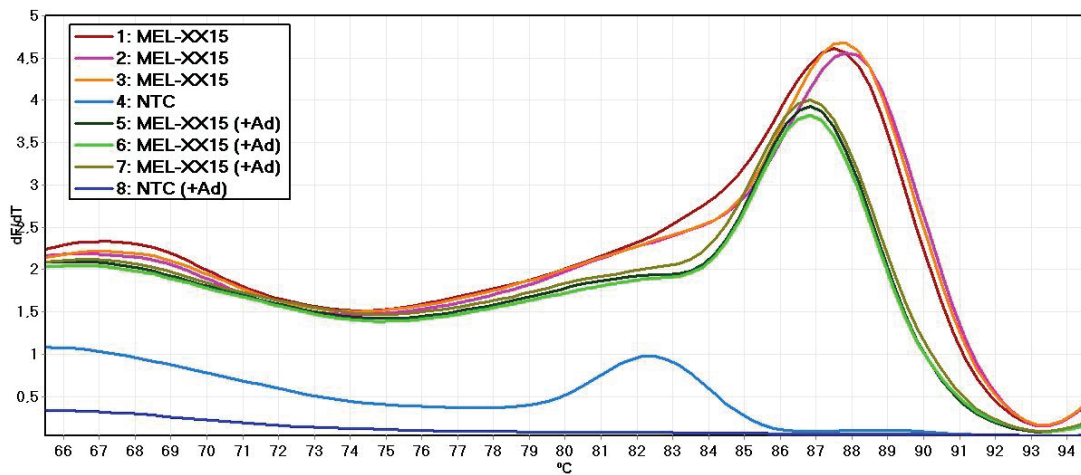


Figura 34. Curvas de desnaturalización de los productos de PCR amplificados obtenidas a partir de graficar la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (dF/dT) contra la temperatura (°C). Se analizó un gradiente de temperatura de *melting* de 56-58°C con una concentración de *primers* 0,25 µM con aditivo (+Ad), referenciado del 1 al 3, y sin uso de aditivo, referenciado del 5 al 7. Se utilizó la línea celular MEL XX15 como control positivo. NTC: control sin templado.

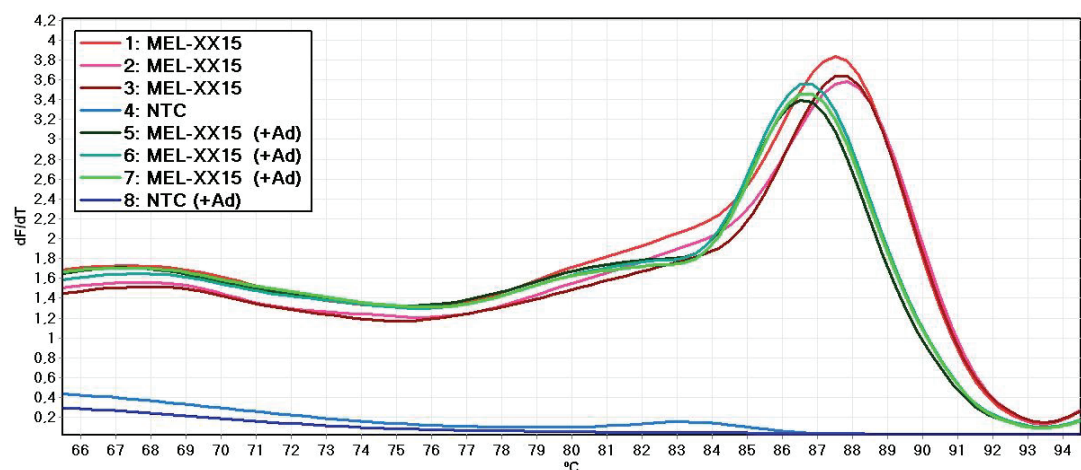


Figura 35. Curvas de desnaturalización de los productos de PCR amplificados obtenidas a partir de graficar la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (dF/dT) contra la temperatura (°C). Se analizó un gradiente de temperatura de *melting* de 59-61°C con una concentración de *primers* 0,25 µM con aditivo (+Ad), referenciado del 1 al 3, y sin uso de aditivo, referenciado del 5 al 7. NTC: control sin templado.

Electroforesis en gel

En la **Figura 36-A** se pueden distinguir bandas inespecíficas con mayor intensidad en las reacciones sin aditivo. En las reacciones que se incorporó aditivo la intensidad de las bandas inespecíficas disminuye para cada temperatura evaluada, sin embargo, no parece ser un cambio significativo.

En la **Figura 36-B** no se observan cambios en los resultados con y sin aditivo en el rango de temperatura correspondiente.

En el caso de la muestra NTC no se observa amplificación para ninguna de las condiciones por lo que no habría formación de dímeros de *primers*.

Por lo tanto, los siguientes estudios se realizaron con las condiciones óptimas para la PCR digital ya que no se encontraron otros parámetros de ciclado que hicieran más específica la reacción.

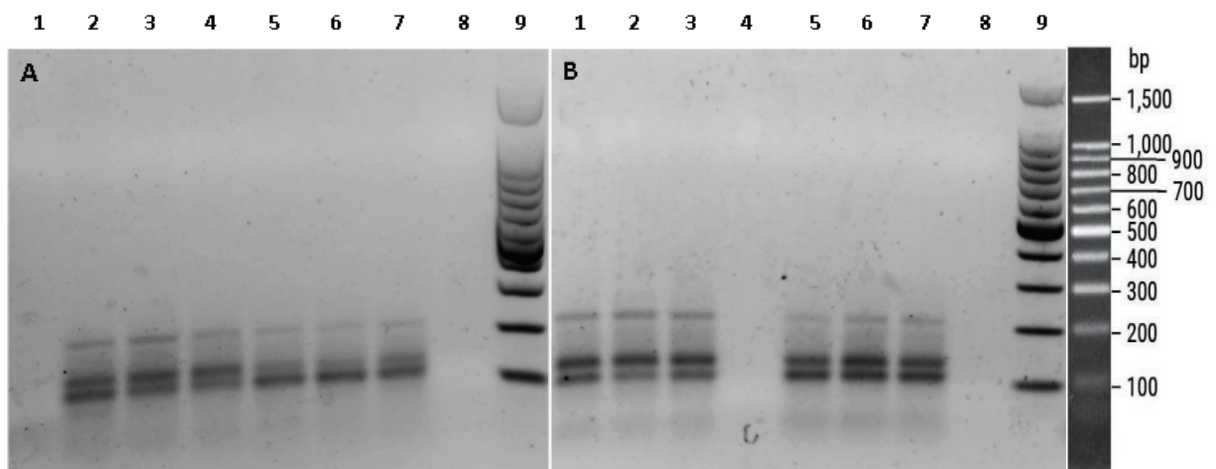


Figura 36. A. electroforesis en gel de los productos de PCR obtenidos con una concentración $0,25\mu\text{M}$ de *primers* en un rango de temperatura de $56-58^\circ\text{C}$ con y sin uso de aditivo *Enhancer 20X*. **Sin Aditivo:** Calles: 1 NTC; 2 Tann 56°C ; 3 Tann 57°C ; 4 Tann 58°C . **Con aditivo:** Calles: 5 Tann 56°C ; 6 Tann 57°C ; 7 Tann 58°C ; 8 NTC; 9 MPM.

B. electroforesis en gel de los productos de PCR obtenidos con una concentración $0,25\mu\text{M}$ de *primers* en un rango de temperatura de $59-61^\circ\text{C}$ con y sin uso de aditivo *Enhancer 20X*. **Sin Aditivo:** Calles: 1 Tann 59°C ; 2 Tann 60°C ; 3 Tann 61°C ; 4 NTC. **Con aditivo:** Calles: 5 Tann 59°C ; 6 Tann 60°C ; 7 Tann 61°C ; 8 NTC; 9 MPM.

PCR Cuantitativa

Combinación #1

En principio se evaluó esta combinación por PCR cuantitativa manteniendo las condiciones de reacción iniciales pero no se detectó señal de fluorescencia de las sondas (*datos no mostrados*), a pesar de haber amplificación de producto, confirmado por electroforesis (**Figura 25**). Por lo tanto, se evaluó el efecto del aditivo 7-deaza-dGTP. Para realizar la qPCR se utilizó como control la línea celular MEL-XX15 heterocigota y una relación de *primers*/sonda 4:1 ($0,8\mu\text{M}/0,2\mu\text{M}$) a una temperatura de hibridación de 60°C . La reacción se realizó por duplicado. Se detectó señal tanto en el canal FAM (MUT) como en HEX (WT) (**Figura 37 y 38**), resultando un impacto positivo del aditivo 7-deaza-dGTP en la detección de las sondas.

Por otro lado, para el ejemplo de aplicación a través del análisis de la muestra L-C se utilizaron las mismas condiciones de reacción adicionando el aditivo Betaína $0,5\text{ M}$ con el fin de hacer más específica la reacción (**Figura 39 y 40**).

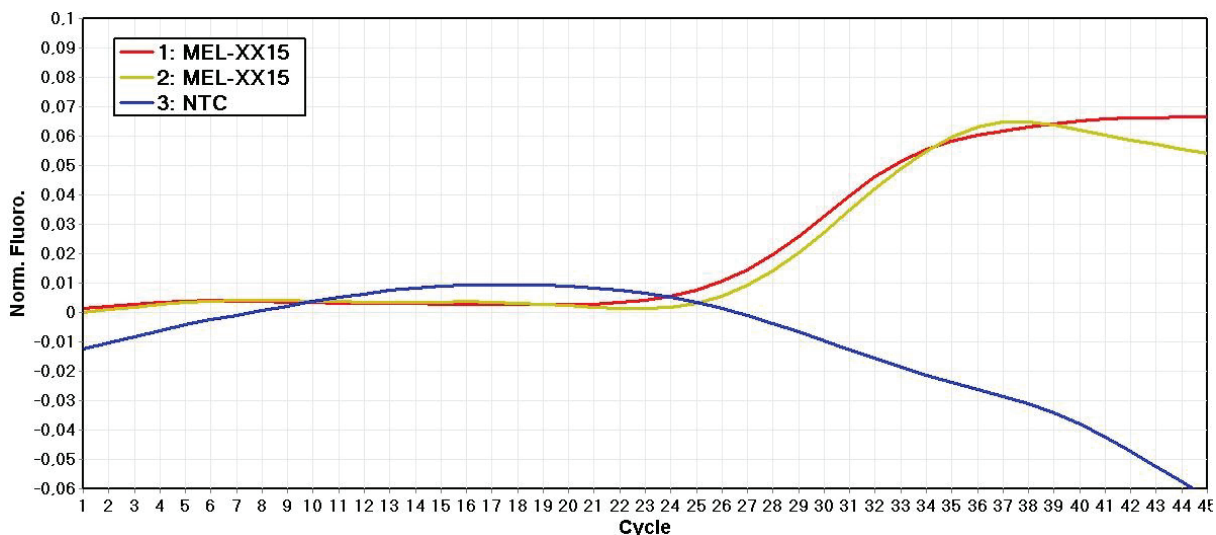


Figura 37: Combinación 1: Amplificación y detección de la línea celular heterocigota MEL-XX15 (línea control) por sondas en el canal HEX (detección del alelo *wild type*) por duplicado a una temperatura de hibridación de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. Se utilizó una concentración de *primers*/sonda 4:1 (0,8µM/0,2µM) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 µM). NTC: control sin templado.

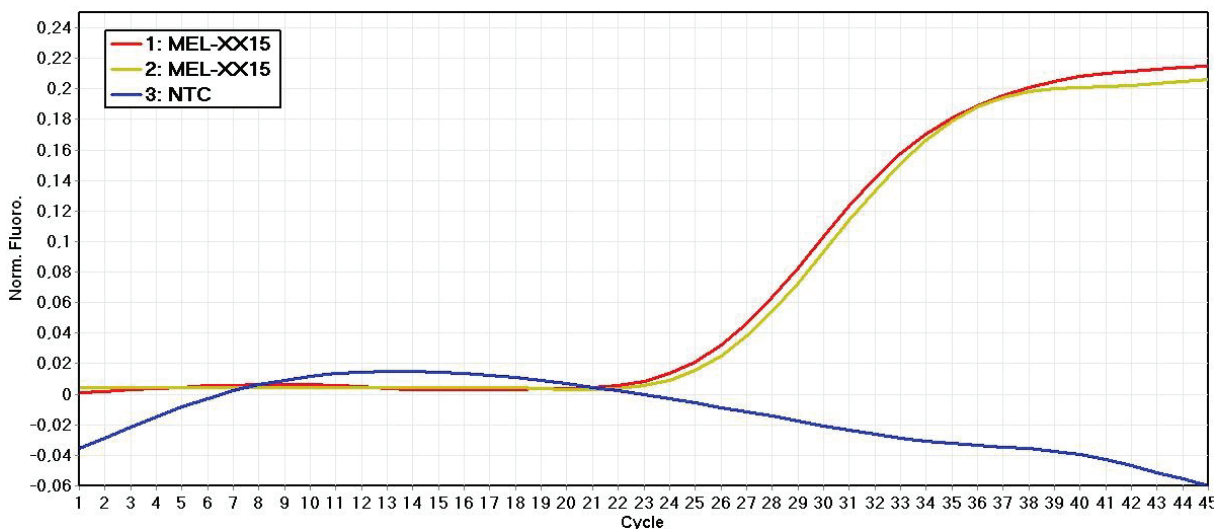


Figura 38: Combinación 1: Amplificación y detección de la línea celular heterocigota MEL-XX15 (línea control) por sondas en el canal FAM (detección del alelo mutado) por duplicado a una temperatura de hibridación de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. Se utilizó una concentración de *primers*/sonda 4:1 (0,8µM/0,2µM) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 µM). NTC: control sin templado.

Ejemplo de aplicación: determinación del estatus mutacional del pTERT en una muestra de tumor por PCR cuantitativa

A continuación se muestran los resultados de utilizar el sistema diseñado de detección para la región mutante del promotor del gen TERT en la muestra de un paciente (paciente L-C) por PCR cuantitativa. Se realizó a través de la combinación #1 de *primers* con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP con una concentración 200 µM con **(Figura 39 y 40)** y sin Betaína 0,5 M **(Figura 41**

y 42). La finalidad de utilizar la Betaína es hacer más específica la reacción. A través de nuestro sistema se pudo detectar que la muestra analizada presentó mutación en pTERT.

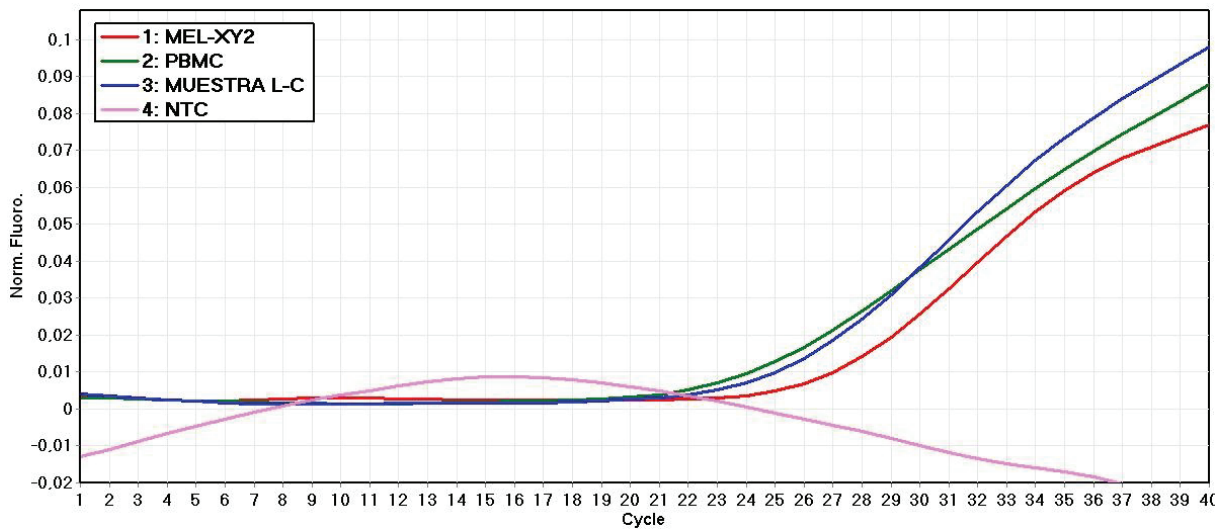


Figura 39: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal HEX a una temperatura de hibridación de 60°C. La línea celular MEL-XY2 se utilizó como control positivo y la línea celular PBMC como control negativo. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la muestra L-C. Se utilizó una concentración de *primers*/sonda 4:1 (0,8µM/ 0,2µM) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 µM) con Betaína 0,5 M. NTC: control sin templado.

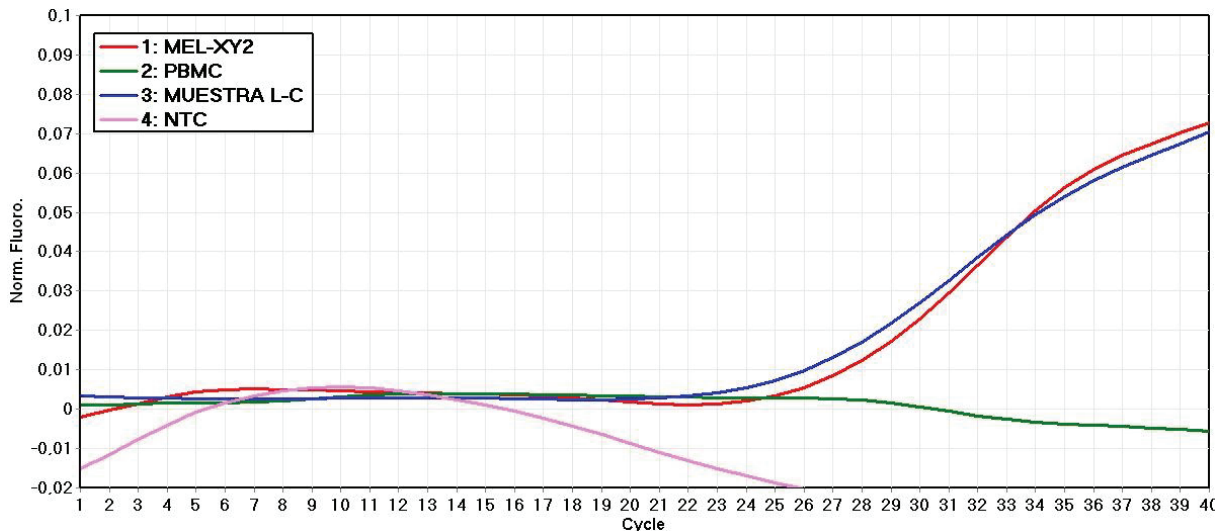


Figura 40: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal FAM a una temperatura de hibridación de 60°C. La línea celular MEL-XY2 se utilizó como control positivo y la línea celular PBMC como control negativo. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la muestra L-C. Se utilizó una concentración de *primers*/sonda 4:1 (0,8µM/ 0,2µM) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 µM) con Betaína 0,5 M. NTC: control sin templado.

A continuación, se muestran los resultados de no utilizar el aditivo Betaína en la reacción.

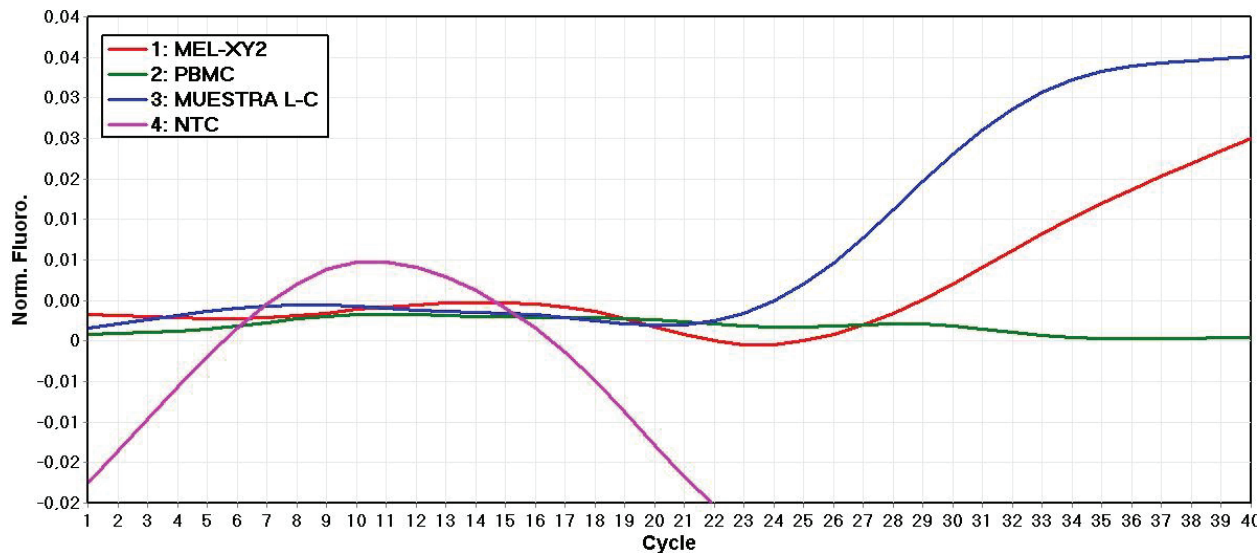


Figura 41: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal FAM a una temperatura de hibridación de 60°C. La línea celular MEL-XY2 se utilizó como control positivo y la línea celular PBMC como control negativo. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la muestra L-C. Se utilizó una concentración de *primers/sonda* 4:1 (0,8µM/ 0,2µM) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 µM) sin Betaína 0,5 M. NTC: control sin templado.

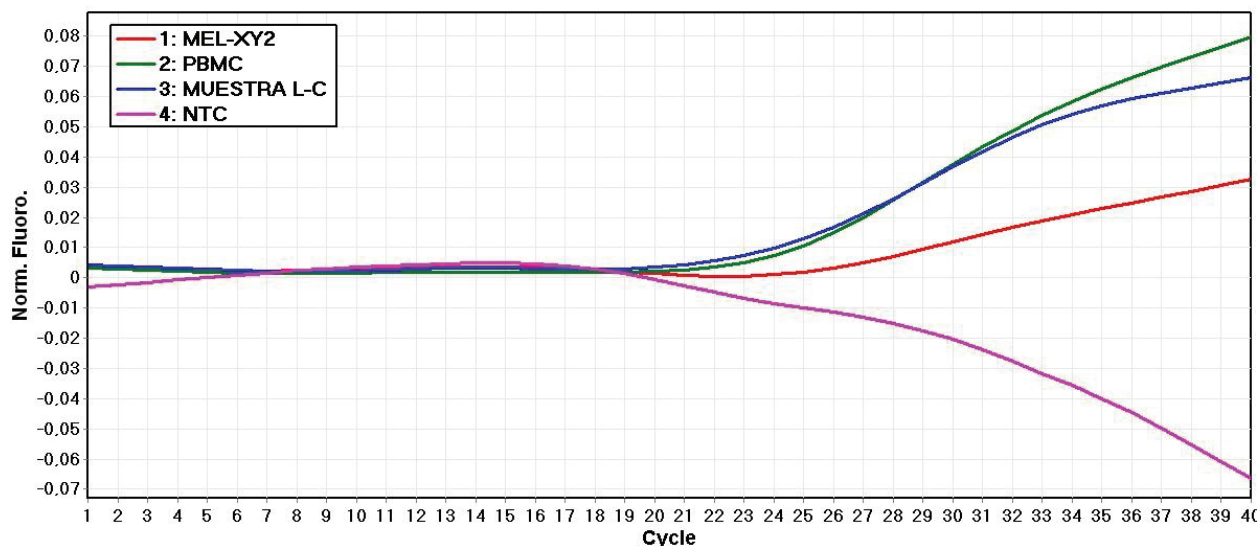


Figura 42: Muestra L-C: Amplificación y detección con sondas en el canal HEX a una temperatura de hibridación de 60°C. La línea celular MEL-XY2 se utilizó como control positivo y la línea celular PBMC como control negativo. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control y la muestra L-C. Se utilizó una concentración de *primers/sonda* 4:1 (0,8µM/ 0,2µM) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 µM) sin Betaína 0,5 M. NTC: control sin templado.

Combinación #2

PCR Cuantitativa

Para realizar la PCR cuantitativa se utilizó como control la línea celular MEL-XY2 heterocigota y una relación de *primers/sonda* 4:1 (0,8µM/ 0,2µM) a una temperatura de hibridación de 60°C con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 µM) con Betaína 0,5 M, que resultó favorecer la detección de las sondas (**Figura 43 y 44**).

También se muestra la reacción con el aditivo 7-deaza-dGTP (200 μ M) sin el uso de Betaína (Figura 45 y 46).

En el canal HEX se detectó únicamente el control con la región WT con la sonda con la secuencia WT. En el canal FAM, se detectaron únicamente los controles con la secuencia mutada con las sondas mutadas como se esperaba.

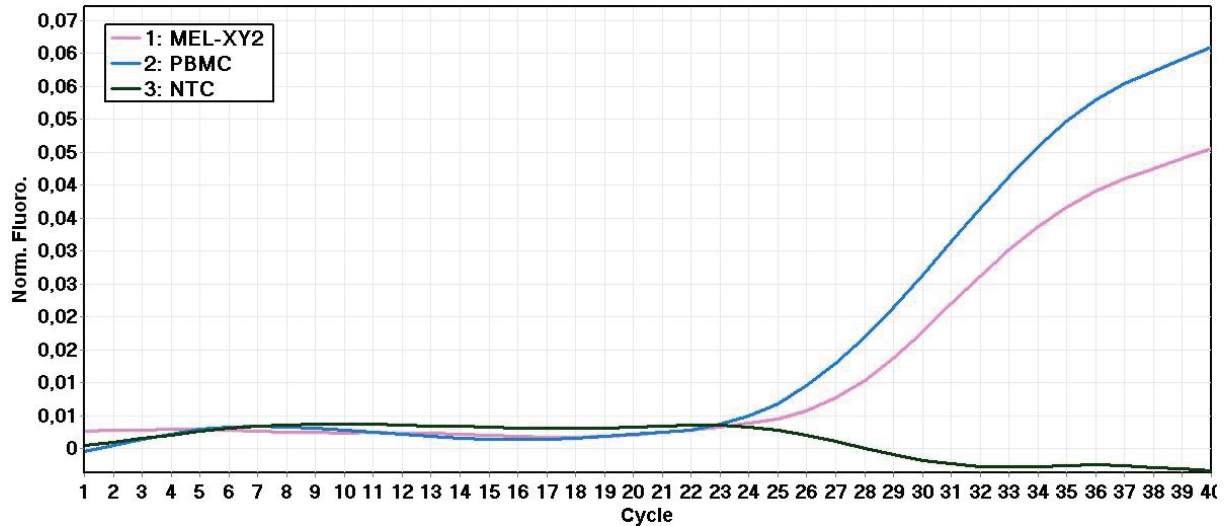


Figura 43: Combinación 2: Amplificación y detección de la línea celular heterocigota MEL-Xy2 (línea control) por sondas en el canal HEX (detección del alelo *wild type*) por duplicado a una temperatura de hibridación de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. Se utilizó una concentración de *primers*/sonda 4:1 (0,8 μ M/0,2 μ M) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 μ M) con Betaína 0,5 M. NTC: control sin templado.

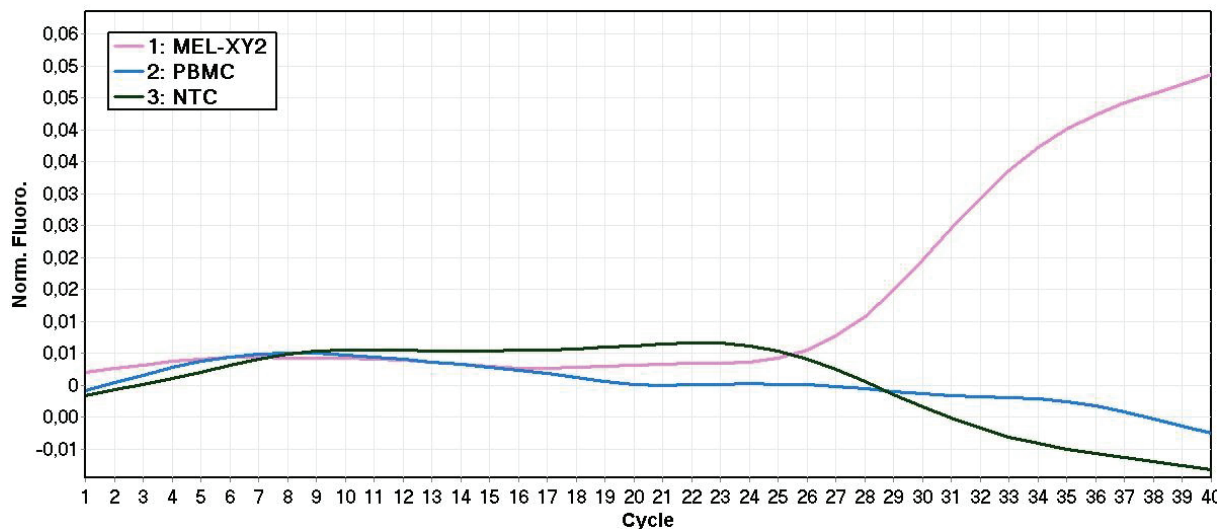


Figura 44: Combinación #2: Amplificación y detección de la línea celular heterocigota MEL-Xy2 (línea control) por sondas en el canal FAM (detección del alelo mutado) por duplicado a una temperatura de hibridación de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. Se utilizó una concentración de *primers*/sonda 4:1 (0,8 μ M/0,2 μ M) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 μ M) con Betaína 0,5 M. NTC: control sin templado.

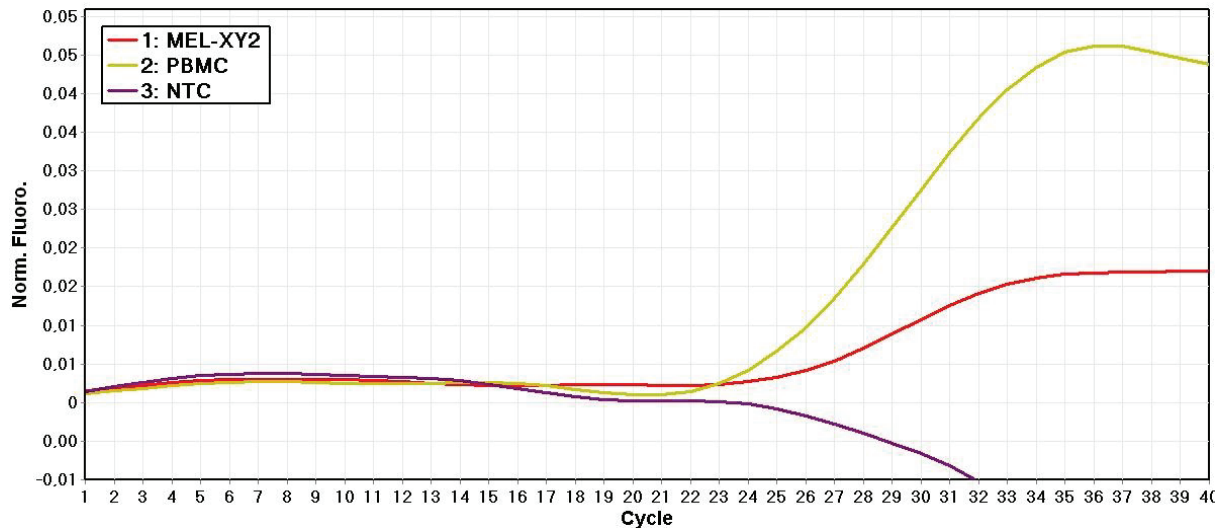


Figura 45: Combinación 2: Amplificación y detección de la línea celular heterocigota MEL-XY2 (línea control) por sondas en el canal HEX (detección del alelo *wild type*) por duplicado a una temperatura de hibridación de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. Se utilizó una concentración de *primers*/sonda 4:1 (0,8µM/0,2µM) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 µM). NTC: control sin templado.

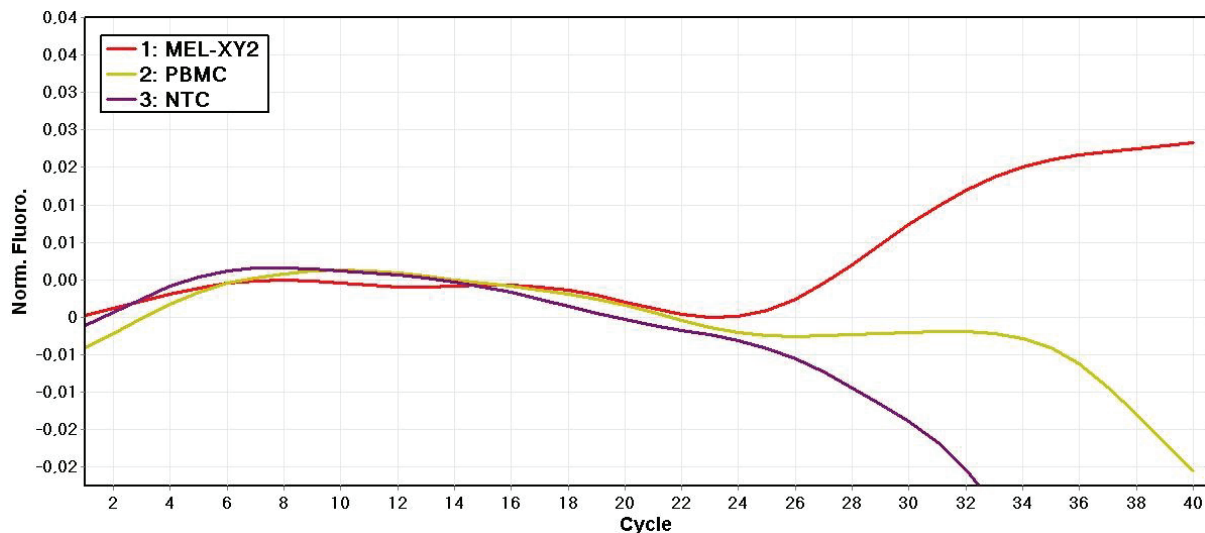


Figura 46: Combinación #2: Amplificación y detección de la línea celular heterocigota MEL-XY2 (línea control) por sondas en el canal FAM (detección del alelo mutado) por duplicado a una temperatura de hibridación de 60°C. Se grafica intensidad de fluorescencia normalizada (eje Y) en función del número de ciclo (eje X). En el recuadro se indican los colores con los que se detectó cada control. Se utilizó una concentración de *primers*/sonda 4:1 (0,8µM/0,2µM) con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200 µM). NTC: control sin templado.

PCR digital

En la **Figura 47 y 48** se muestran los resultados de utilizar la línea celular MEL-XX15 como control heterocigota para cada juego de *primers* con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP para las combinaciones #1 y #2. Se puede observar que se separa una nube de eventos doble negativos y otra doble positivos, no se observaron nubes con eventos simple positivos, MUT y WT, como se esperaba para un control heterocigota. Por lo tanto, se continuó probando otras condiciones de mezcla de reacción que puedan mejorar los resultados.

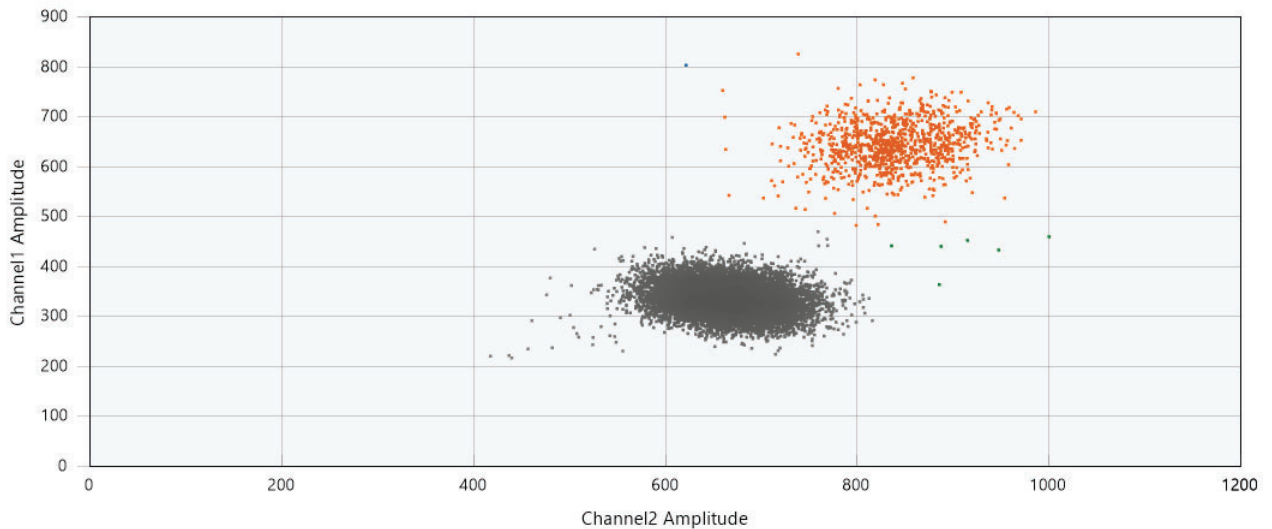


Figura 47: Gráfico de puntos 2D de PCR digital por gotas del control positivo MEL-XX15 con la combinación #1 de *primers*. En el eje Y se muestra la amplitud del fluoróforo FAM (Canal 1) y en el eje X se muestra la amplitud del fluoróforo HEX (Canal 2). En azul se observan eventos MT positivos, en verde eventos WT positivos, en negro eventos doble negativos y en naranja doble positivos.

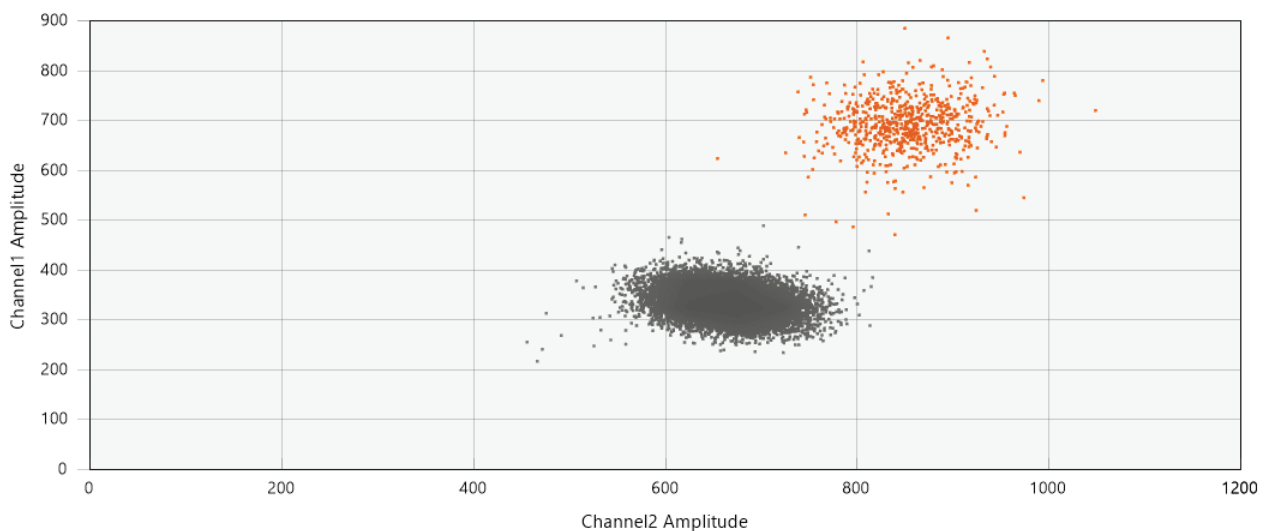


Figura 48: Gráfico de puntos 2D de PCR digital por gotas del control positivo MEL-XX15 con la combinación #2 de *primers*. En el eje Y se muestra la amplitud del fluoróforo FAM (Canal 1) y en el eje X se muestra la amplitud del fluoróforo HEX (Canal 2). En azul se observan eventos MT positivos, en verde eventos WT positivos, en negro eventos doble negativos y en naranja doble positivos.

En las **Figuras 49 y 50** se muestra el control positivo MEL-XY2 con la combinación #1 de *primers* con y sin Betaína (0,5M) y el aditivo 7-deaza-dGTP como ejemplos representativos. Se observa que sin Betaína no se consiguió obtener eventos simples positivos como se esperaba. En el caso de la reacción con el agregado de Betaína se observa la presencia de una nube de eventos doble positivos unida a la nube de eventos simples negativos sin conseguir la nube de eventos simples positivos y la separación entre las mismas.

Considerando que por PCR Cuantitativa la amplificación y detección con y sin adición de Betaína 0,5 M en presencia del aditivo 7-deaza-dGTP resultó ser específica para ambos juegos de

primers se podría decir que queda pendiente analizar condiciones que sean más óptimas para el análisis por PCR digital.

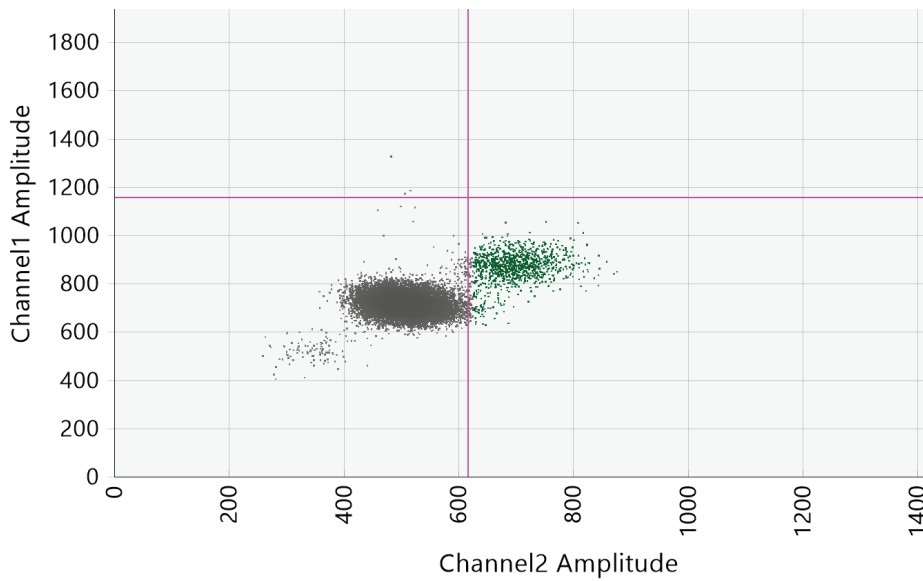


Figura 49: Gráfico de puntos 2D de PCR digital por gotas de la amplificación y detección de la línea control MEL-XY2 con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP 200 μ M. En el eje Y se muestra la amplitud del fluoróforo FAM (Canal 1) y en el eje X se muestra la amplitud del fluoróforo HEX (Canal 2). En azul se observan eventos MT positivos, en verde eventos WT positivos, en negro eventos doble negativos y en naranja doble positivos.

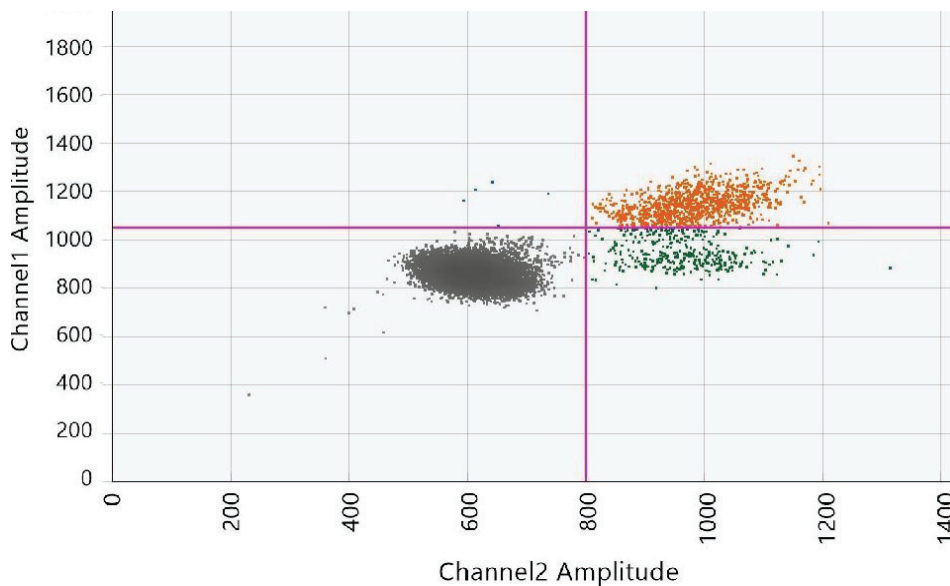


Figura 50: Gráfico de puntos 2D de PCR digital por gotas de la amplificación y detección de la línea control MEL-XY2 con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP 200 μ M y Betaína 0,5 M. En el eje Y se muestra la amplitud del fluoróforo FAM (Canal 1) y en el eje X se muestra la amplitud del fluoróforo HEX (Canal 2). En azul se observan eventos MT positivos, en verde eventos WT positivos, en negro eventos doble negativos y en naranja doble positivos.

Al analizar pTERT, no se lograron obtener condiciones óptimas para ddPCR, por lo que no se procedió determinar el LoB y el LoD. Queda pendiente el análisis de otras variables para evaluar si este sistema sirve para la detección de pTERT por ddPCR.

2- Determinación de los niveles de ADNct en biopsias líquidas de melanoma cutáneo

En primer lugar se muestran gráficos de puntos 2D con resultados representativos para $NRAS^{Q61mut}$ y $BRAF^{V600mut}$. Los controles utilizados mostraron resultados según lo esperado. A continuación se muestra la línea celular MEL-XY9, control positivo heterocigota para la variante $NRAS^{Q61K}$.

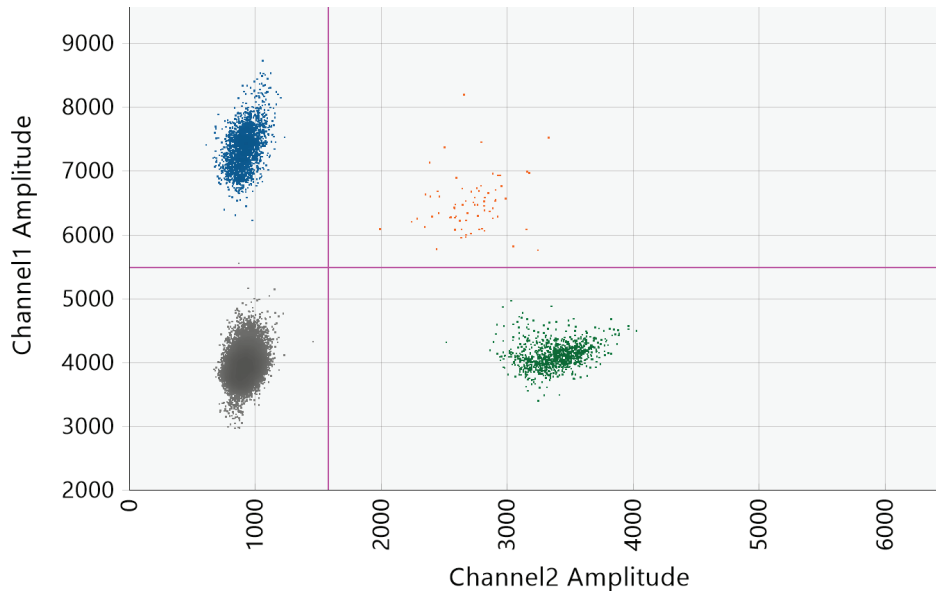


Figura 51. Gráfico de puntos 2D de PCR digital por gotas del control positivo (Línea celular heterocigota MEL-XY9). En el eje Y se muestra la amplitud del fluoróforo FAM (Canal 1) y en el eje X se muestra la amplitud del fluoróforo HEX (Canal 2). En azul se observan eventos MT positivos, en verde eventos WT positivos, en negro eventos doble negativos y en naranja doble positivos.

En la **Figura 52** se muestran dos gráficos de puntos en 2D representativos, correspondientes a la muestra 2 a tiempo t0 y t1, de la detección de las variantes $NRAS^{Q61K}$ y $NRAS^{Q61R}$ en las muestras referenciadas en la **Tabla 30**.

En esta muestra se observó que a tiempo 0, es decir, antes del tratamiento, se obtuvo un porcentaje de FAM de 13,4% pero luego de 6 semanas de la aplicación del tratamiento en el paciente la FAM disminuyó a 0.

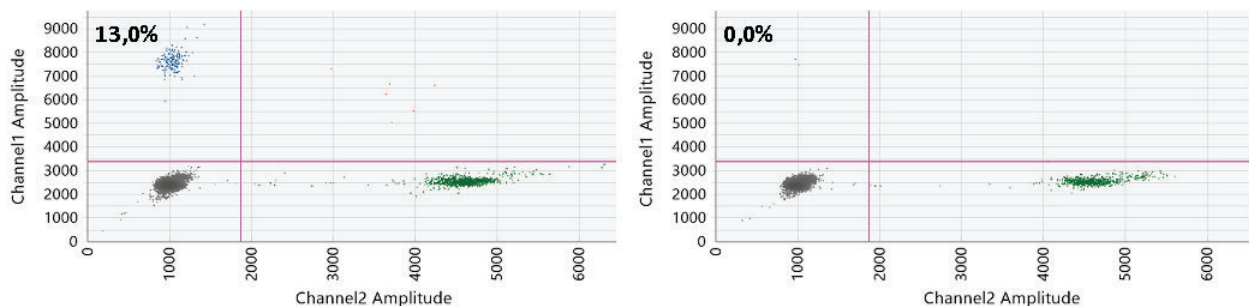


Figura 52. Gráfico de puntos 2D de PCR digital por gotas de la muestra 2 a tiempo t0 (A) y a tiempo t1 (B). En el eje Y se muestra la amplitud del fluoróforo FAM (Canal 1) y en el eje X se muestra la amplitud del fluoróforo HEX (Canal 2). En azul se observan eventos MT positivos, en verde eventos WT positivos, en negro eventos doble negativos y en naranja doble positivos. Los porcentajes indicados corresponden a la fracción alélica mutacional (FAM%).

A continuación se muestra para BRAF^{V600mut} un control positivo (**Figura 53**) y la muestra 2 (**Figura 54**) como ejemplos representativos, con descripción de los resultados obtenidos en la **Tabla 30**.

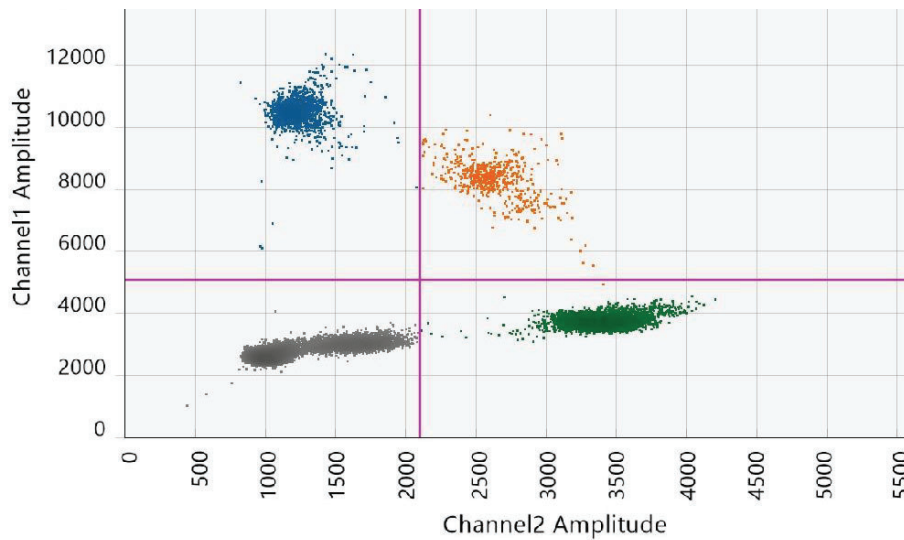


Figura 53: Gráfico de puntos 2D de PCR digital por gotas del control positivo (Línea celular heterocigota MEL-XY3) para la mutación BRAF^{V600K}. En el eje Y se muestra la amplitud del fluoróforo FAM (Canal 1) y en el eje X se muestra la amplitud del fluoróforo HEX (Canal 2). En azul se observan eventos MT positivos, en verde eventos WT positivos, en negro eventos doble negativos y en naranja doble positivos.

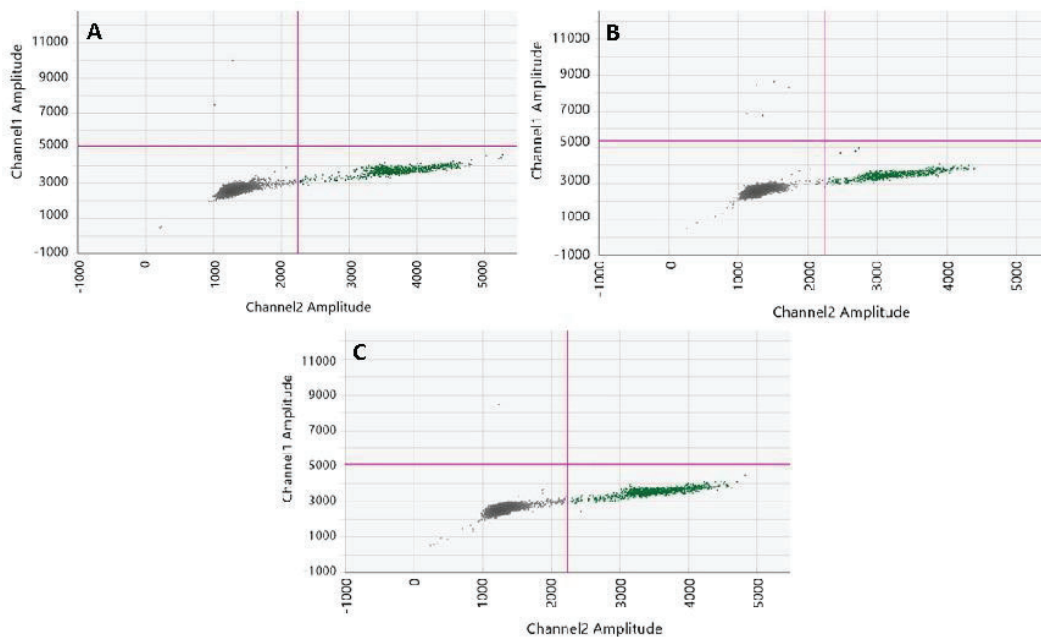


Figura 54: Gráfico de puntos 2D de PCR digital por gotas de la muestra 2 a tiempo t0 (A), tiempo t1 (B) y tiempo t2 (C). En el eje Y se muestra la amplitud del fluoróforo FAM (Canal 1) y en el eje X se muestra la amplitud del fluoróforo HEX (Canal 2). En azul se observan eventos MT positivos, en verde eventos WT positivos, en negro eventos doble negativos y en naranja doble positivos.

En la **Tabla 30** se muestran todos los resultados de PCR digital de los niveles de BRAF^{V600mut} y NRAS^{Q61mut} en todas las muestras analizadas, analizando NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R} y BRAF^{V600K},

A continuación, se muestran los diferentes análisis realizados con los datos de la **Tabla 30**. En primer lugar se analizaron las características generales de la población de estudio. En estos 19 casos analizados, un 84% se refiere a pacientes con metástasis a distancia ó enfermedad avanzada (MC estadio IV) (**Figura 55A**). El 74% de los mismos fueron tratados con inmunoterapia (**Figura 55B**); presentando diferentes respuesta clínicas al tratamiento al momento de la evaluación (*tiempo final*), ya sea al final de la medición a las 12 semanas ó al determinar la progresión, lo que ocurriese primero (**Figura 55C**). El 84% de las muestras contaban con determinación previa del estatus mutacional BRAF^{V600} (**Figura 55D**), en uno de los casos se analizó una de muestra con MC metastásico de un paciente, determinando que la misma era NRAS^{Q61R} (**ver ejemplo de aplicación, pág. 45**).

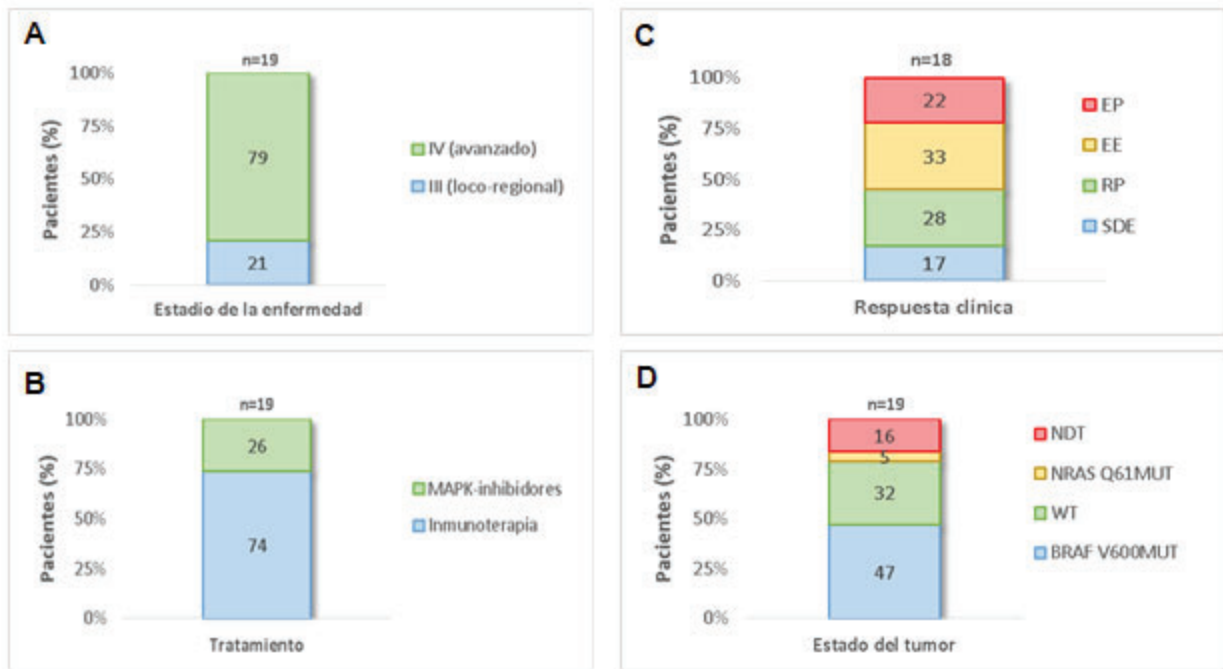


Figura 55: Población de estudio. **(A)** Estadio clínico AJCC-UICC. **(B)** Tratamientos asignados. **(C)** Respuesta clínica al tratamiento asignado: SDE, sin evidencia de enfermedad; RP, respuesta parcial; EE, enfermedad estable; EP, progresión. **(D)** Estado mutacional determinado en el tumor: BRAF^{V600MUT}, NRAS^{Q61MUT}, WT, NDT (no determinado).

A través del análisis de BRAF^{V600mut} y NRAS^{Q61mut} por PCR digital, se pudieron determinar diferentes estatus mutacionales en las muestras de plasma, BRAF^{V600mut}, BRAF^{V600}(WT), NRAS^{Q61mut} y NRAS^{Q61}(WT), incluso en casos en donde no se conocía el estatus mutacional del tumor (**Figura 56A**). A continuación se analizaron los valores de ADNct en el tiempo, a través de sus variaciones en los niveles de FAM, tomando como puntos de referencia las mediciones iniciales y finales, y agrupando a los pacientes según su respuesta clínica al tratamiento (**Figura 56 y 57**). Al tiempo inicial, todos los pacientes SDE presentaron niveles indetectables de ADNct, los pacientes RP niveles bajos o nulos de ADNct, mientras que en su mayoría de los pacientes EE se detectó ADNct, siendo estos niveles mayores al 10% en todos los pacientes EP (**Figura 56B**). Al tiempo final, todos los pacientes SDE mantuvieron sus niveles de ADNct indetectables, todos los pacientes RP negativizaron su ADNct, los pacientes SE presentaron un patrón más diverso, con incrementos y disminuciones en los niveles de ADNct, y ningún pacientes EP pudo negativizar los niveles de ADNct (**Figura 56C**). Al agrupar los pacientes según su carga de enfermedad, se

detectaron niveles significativamente mayores de ADNct en los pacientes EE y EP con respecto a los pacientes SDE y RP antes de iniciar el tratamiento (**Figura 58A**), y en las mediciones finales, lo que indica una relación entre los niveles de ADNct y la carga de enfermedad (**Figura 58B**).

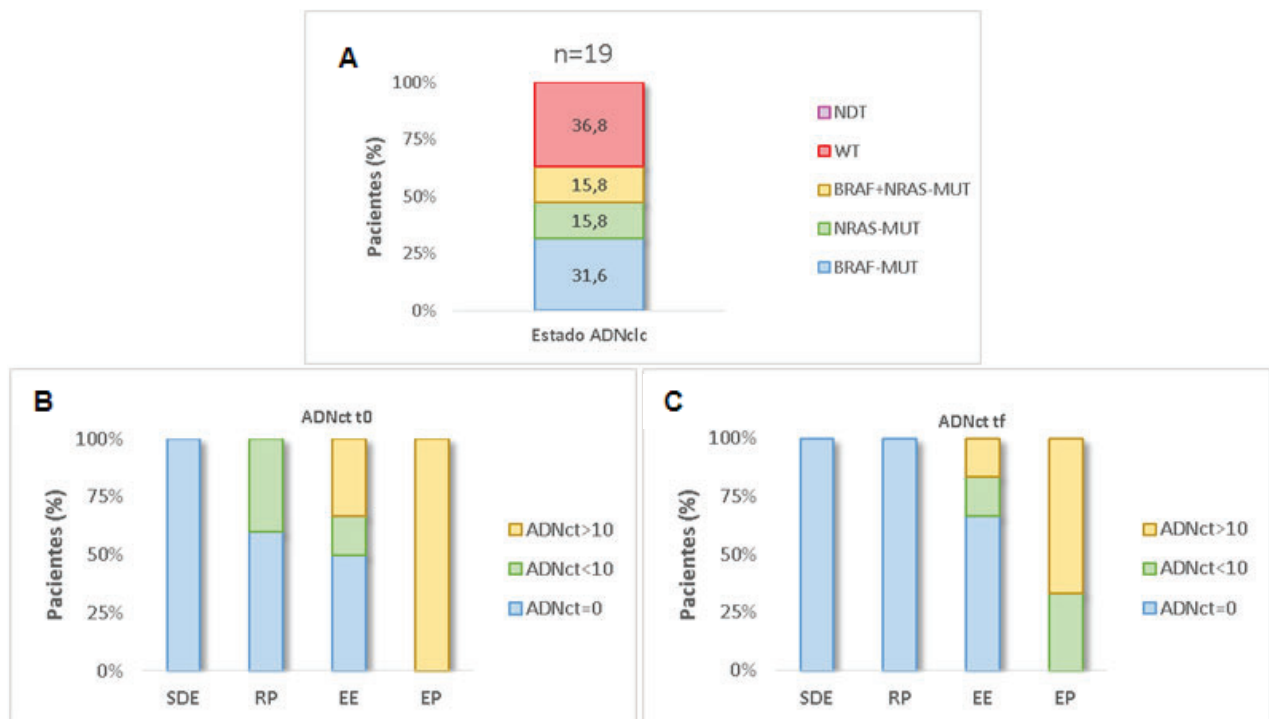


Figura 56: (A) Estado mutacional del ADNct. (B) Estratificación para cada grupo de pacientes según los niveles iniciales (t0) de ADNct (ADNct=0%, ADNct<10%, ADNct>10%). (C) Estratificación para cada grupo de pacientes según los niveles finales (tf) de ADNct (ADNct=0%, ADNct<10%, ADNct>10%). Niveles totales ADNct= ADNct BRAFV600MUT + ADNct NRASQ61MUT. SDE, sin evidencia de enfermedad; RP, respuesta parcial; ES, enfermedad estable; EP, progresión.

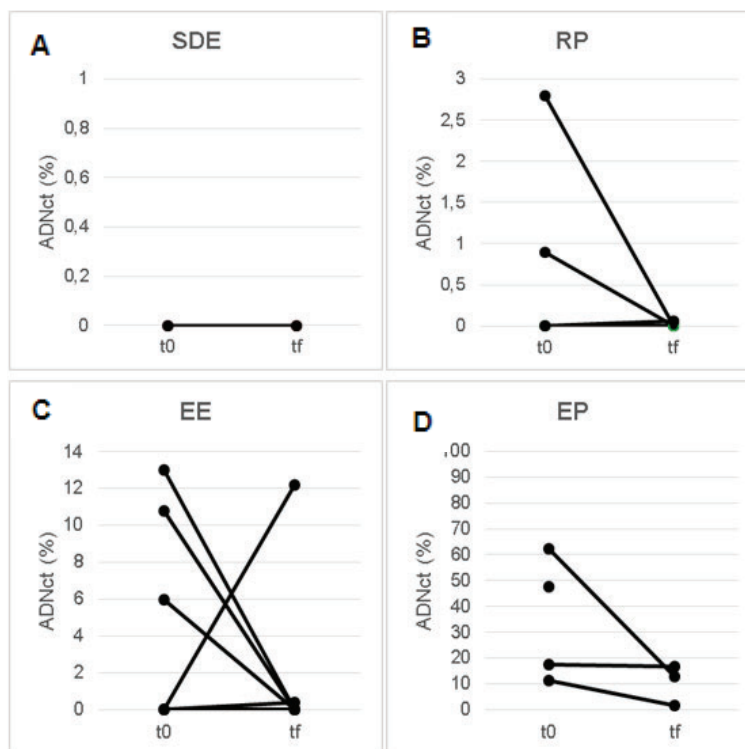


Figura 57: Análisis de ADNct. (A-D) Niveles iniciales (t0) y finales (tf= t1 ó t2) de ADNct (%) según la respuesta clínica al tratamiento: SDE, sin evidencia de enfermedad; RP, respuesta parcial; ES, enfermedad estable; EP, progresión.

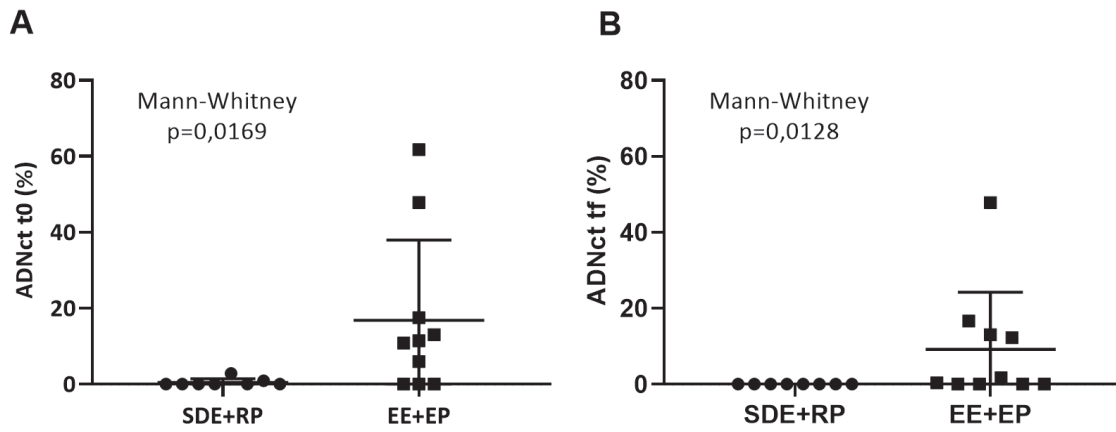


Figura 58: Comparación en los niveles de ADNct (%) iniciales **(A)** y finales **(B)** entre los pacientes SDE y PR con respecto a los pacientes EE y EP, según el test de Mann-Whitney. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$. SDE, sin evidencia de enfermedad; RP, respuesta parcial; EE, enfermedad estable; EP, progresión.

DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el objetivo principal de esta tesis, el análisis de los niveles de oncogenes prevalentes en ADN circulante tumoral (ADNct) en biopsias líquidas de melanoma cutáneo, el principal desafío fue precisamente la optimización de reacciones de diseño en el laboratorio para la detección de estas variantes prevalentes.

Para lograr este objetivo en la detección de las variantes del oncogén NRAS (NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}, NRAS^{Q61}) se comenzó con la optimización de la mezcla de reacción con los *primers* diseñados a través de una PCR de punto final. Se evaluó la temperatura de hibridación en un gradiente de 56-60°C, obteniendo un único pico de fusión y banda por electroforesis del tamaño del amplicón esperado, indicando que esta reacción sería específica en un amplio rango de temperatura. También se puso de manifiesto el impacto de la concentración de *primers* en su formación de dímeros, disminuyendo al evaluar 0,25µM con respecto a 0,8µM. Luego de la optimización con los *primers* se adicionaron las sondas de hibridación. La detección se realizó a través de un sistema versátil, basado en un sistema fluoróforo/bloqueador, que permitió la detección por qPCR como también por ddPCR (**anexo teórico, págs 78-80**). Para la reacción por PCR cuantitativa se utilizó una relación de sondas:*primers* 1:1 (0,25µM) y una temperatura de hibridación de 60°C, buscando condiciones óptimas para esta técnica. Se usaron controles homocigotas, en el canal HEX se detectó únicamente el control con la región WT con la sonda con la secuencia WT y en el canal FAM, se detectaron únicamente los controles con la secuencia mutada con las sondas mutadas como se esperaba. De esta manera, se comprobó que las sondas eran específicas para cada variante por PCR cuantitativa. Este sistema permitió la detección de mutaciones por PCR cuantitativa, en ADN proveniente de secciones de tejido fijado en formol e impregnado en parafina (FFPE) como se observó en el ejemplo de aplicación, la muestra resultó ser NRAS^{Q61R} (**Resultados, págs 46-47**). Como perspectiva a futuro cabe mencionar que se puede profundizar las condiciones de reacción para obtener una eficiencia de reacción idónea para qPCR.

Por otro lado, se procedió a optimizar esta reacción para ddPCR, usando con una relación sondas:*primers* 4:1 (0,8µM:0,2µM) (*Datos no mostrados*). Se determinó el LoB a partir de 7 reacciones con ADN control NRAS^{Q61} (WT), con un AFP de 2,2, obteniendo un valor de LoB de 5,47 y un valor de LoD de 10,90. Con estos datos y los valores de copias/µM (cpm) de las muestras de pacientes se logró calcular tanto el nº de copias de ADNct/ml de plasma y la FAM. Esto permitió la detección de mutaciones en ADNct proveniente de biopsias líquidas de MC por ddPCR, y la optimización del uso de las muestras, al combinar las 3 sondas en una sola reacción.

Una estrategia similar se realizó para el análisis de la variante BRAF^{V600K}. Teniendo en cuenta que las condiciones de reacción ya se encontraban optimizadas para BRAF^{V600E} a través de PCR de punto final, se probaron directamente las condiciones para la PCR cuantitativa con una relación de sondas:*primers* de 4:1 (0,8µM/0,2µM). Las sondas resultaron ser específicas por qPCR para todas las variantes analizadas en BRAF^{V600} (BRAF^{V600} BRAF^{V600E} BRAF^{V600K}), por lo que se analizó también la muestra proveniente de tejido FFPE la cual resultó ser BRAF^{V600} (WT). Luego se procedió al análisis por ddPCR de las muestras de pacientes con las condiciones ideales para ddPCR. Se utilizaron los valores de LoB=1 y LoD=5 obtenidos en los análisis previos de BRAF^{V600E}.

Por otro lado, la optimización de la reacción para la detección de variantes en el promotor de TERT (pTERT) fue la más desafiante debido a su región rica en GC, lo cual dificultó la optimización tanto de la PCR por punto final, como de las sondas por qPCR y ddPCR. En primer lugar se optimizaron las condiciones de ciclado de la PCR, evaluando diferentes concentraciones de *primers*, uso de aditivos, y condiciones de ciclado. En total se probaron nueve pares de *primers*, aunque se eligieron para mostrar los dos juegos que dieron resultados más representativos (combinación #1 y #2). La combinación #1 se logró optimizar en forma simple pero al evaluar esta combinación por PCR cuantitativa no se detectó señal de fluorescencia de las sondas, a pesar de haber amplificación de producto, confirmado por electroforesis. Por lo tanto, se evaluó el efecto del aditivo 7-deaza-dGTP, con impacto positivo en la detección de las sondas. Una vez que se confirmó la especificidad de las mismas se evaluó la muestra de tejido FFPE, la cual resultó positiva para la mutación en pTERT, y la combinación de los aditivos Betaína con 7-deaza-dGTP, la cual favoreció la detección de las sondas. En el caso de la combinación #2, se realizaron tres pasos de optimización para los *primers*, ciclado de 2 pasos convencional, PCR TOUCHDOWN y PCR TOUCH-UP (**Anexo, pág. 77 y 78**). Sin embargo, no se encontraron condiciones de reacción con la especificidad deseada, para la detección de un solo producto. Para realizar la PCR cuantitativa se utilizó como control la línea celular MEL-XY2 heterocigota y las condiciones iniciales de reacción, una relación de *sondas:primers* 4:1 (0,8µM/0,2µM) a una temperatura de hibridación de 60°C con el uso del aditivo 7-deaza-dGTP (200µM), comparando con y sin Betaína 0,5M. De esta forma se confirmó la especificidad de las sondas.

Se pasó a probar el sistema por ddPCR utilizando controles positivos y negativos con ambos juegos de *primers* en las condiciones iniciales e ideales para esta técnica (concentración de *primers* 0,8µM y temperatura de hibridación=60°C) para las combinaciones #1 y #2, observando que las poblaciones de eventos doble negativos, simples positivos y doble positivos no se separaban bien. Por lo tanto, se analizó el efecto del aditivo Betaina 0,5M en la combinación #1. Dado que tampoco se consiguió optimizar el sistema de ddPCR de esta manera, no se procedió a determinar el LOB/LOD ni a analizar las muestras de biopsias líquidas con esta reacción. En conclusión, queda pendiente analizar otras condiciones de reacción para el oncogén pTERT que permitan obtener resultados por ddPCR específicos, como los obtenidos por PCR cuantitativa, con los eventos de los 4 cuadrantes bien definidos.

Con respecto a la población de estudio, se analizó un cohorte de validación de 19 pacientes con melanoma cutáneo, la mayoría con enfermedad diseminada (estadio IV) (84%) y con estatus mutacional de BRAF^{V600} determinado previamente en 84%. La mayoría de los pacientes fueron tratados con inmunoterapia (74%), presentando diferentes respuestas clínicas al tratamiento al momento de la evaluación, desde sin evidencia de enfermedad hasta progresión. Esto influyó que en algunos casos no se pudieran obtener muestras en todos los tiempos planificados. Se pudo obtener ADN circulante libre de células en todas las muestras de plasma disponibles. Se analizaron los biomarcadores BRAF^{V600MUT} y NRAS^{Q61MUT} por PCR digital, determinando un biomarcador evaluable en 84% de los casos. No hubo contradicciones entre el estatus mutacional de BRAF^{V600} detectado en tejido y en la biopsia líquida. Incluso, se pudo determinar el estatus mutacional de las variantes analizadas en algunos pacientes que no tenían determinación previa en el tumor. Con respecto al análisis de los niveles de ADNct en el tiempo, en los casos BRAF^{V600MUT}, en aquellos pacientes libres de enfermedad no se detectó ADNct. En

aqueellos con enfermedad estable o respuesta parcial, se observó una disminución a cero de los niveles de ADNct. Aquellos que progresaron presentaron ADNct>10% al inicio y ADNct>0% al final del período de seguimiento. En los casos *BRAF*^{V600WT}, uno con enfermedad estable presentó disminución a cero de ADNct *NRAS*^{Q61MUT}, y otro con progresión niveles estables de ADNct.

En esta población inicial, observamos que los niveles iniciales de ADNct y sus variaciones reflejaron la respuesta clínica al tratamiento, tanto inhibidores como inmunoterapia. A menor ADNct, mejor respuesta. Los pacientes que presentaron algún tipo de respuesta negativizaron sus niveles de ADNct, mientras que los progresaron no. Estos resultados destacan el potencial de las biopsias líquidas para monitorear la evolución clínica de los pacientes en tiempo real y en forma no invasiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Al Mahi A. y Ablain J. RAS pathway regulation in melanoma. *Dis Modelo Mec.* 2022 1 de febrero; 15(2): dmm049229. doi: 10.1242/dmm.049229.
- Bettegowda C., Sausen M., Leary R. J. et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med* (2014) 6:224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094.
- Cabel L., Riva F., Servois V., et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Ann Oncol* (2017) 28:1996–2001. doi:10.1093/annonc/mdx212
- Curry, Jonathan L. et al. 2012. “Molecular Platforms Utilized to Detect BRAF V600E Mutation in Melanoma.” *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*: 267–73.
- Da Silva, I. P. et al. (2019) “Distinct molecular profiles and immunotherapy treatment outcomes of V600E and V600K BRAF-mutant melanoma.
- Dratwa, M. et al. (2020) “TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation,” *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2020.589929.
- Downey, N (2017). qPCR Melt Curve Analysis: Explaining Multiple Peaks. <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>.
- Eslami-S Z., Cortés-Hernández L. E., Cayrefourcq L. and Alix-Panabières C. The Different Facets of Liquid Biopsy: A Kaleidoscopic View. *Cold Spring Harb perspectiva Med.* 2020 junio; 10(6): a037333. doi: 10.1101/cshperspect.a037333
- Garcia-Alvarez, A., Ortiz, C. and Muñoz-Couselo, E. (2021) “Current Perspectives and Novel Strategies of NRAS-Mutant Melanoma,” *OncoTargets and Therapy*, Volume 14, pp. 3709–3719. doi: 10.2147/ott.s278095.
- Gershenwald, J. E., Scolyer, R. A. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol* (2018) 25:2105–2110. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6513-7>.
- Hayward, N. K. et al. (2017) “Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes,” *Nature*, 545(7653), pp. 175–180. doi: 10.1038/nature22071.
- Heppt, M. v. et al. (2017) “Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care,” *BMC cancer*, 17(1), p. 536. doi: 10.1186/s12885-017-3529-5.
- Kiuru M. y Busam K. J. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Lab Invest.* 2017 Feb; 97(2): 146–157. doi: 10.1038/labinvest.2016.142
- Landi MT, Bishop DT, MacGregor S, et al. Genome-wide association meta-analyses combining multiple risk phenotypes provide insights into the genetic architecture of cutaneous melanoma susceptibility. *Nature Genetics.* 2020;52(5):494-504. doi:10.1038/s41588-020-0611-8.
- Lee J.H., Long G. V., Boyd S., et al. Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann Oncol* (2017) 28:1130–1136. doi:10.1093/annonc/mdx026

- NHI. Tratamiento del melanoma (PDQ)—Versión para profesionales de salud. Información general sobre el melanoma. Actualizado el 27 de Octubre de 2022. https://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/pro/tratamiento-melanoma-pdq#_1
- NHI. Genética del cáncer de piel (PDQ)—Versión para profesionales de salud. Estructura de la piel. Actualizado el 28 de junio de 2022. https://www.cancer.gov/types/skin/hp/skin-genetics-pdq#_81_toc
- NHI. Tratamiento del melanoma (PDQ)—Versión para pacientes. Estadios del melanoma. Actualizado el 2 de Diciembre de 2021. https://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/paciente/tratamiento-melanoma-pdq#_135.
- Ottaviano, M. et al. (2021) “BRAF gene and melanoma: Back to the future”. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms22073474.
- PCR Methods—Top Ten Strategies. <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html>
- Rebecca V. W. , Somasundaram R, Herlyn M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. *Nat Commun*. 2020; 11: 2858. doi: 10.1038/s41467-020-15546-9.
- Richter, Anna et al. 2013. “A Multisite Blinded Study for the Detection of BRAF Mutations in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Malignant Melanoma.” *scientific reports* 3: 1659.
- Rodríguez-peralta, José Luis et al. 2014. “Patología y Recomendaciones Para La Determinación de Biomarcadores En El Melanoma Metastásico.” De, Nacional España, Sociedad Anatomía, De Sociedad, De Oncología 47(1): 9–21.
- Rodríguez J., Avila J., Rolfo C. et al. When Tissue is an Issue the Liquid Biopsy is Nonissue: A Review. *Oncol Ther*. 2021 Jun; 9(1): 89–110. doi: 10.1007/s40487-021-00144-6.
- Rowther F. B. , Kardooni H. and Warr T. *TOUCH-UP Gradient Amplification Method*. *J Biomol Tech*. 2012 Apr; 23(1): 1–3. doi: 10.1007/jbt.12-2301-004
- Russano M., Napolitano A., Ribelli G., Iuliani M. , Simonetti S. , Citarella F., Pantano F. , Dell'Aquila E., Anesi C. , Silvestris N. Argentiero A. , Solimando A., Vincenzi B. , Tonini G. antini, Santini. Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors: the potentiality of blood samples. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020; 39: 95. doi: 10.1186/s13046-020-01601-2.
- Santiago-Walker A., Gagnon R., Mazumdar J., et al. Correlation of BRAF mutation estatus in circulating-free DNA and tumor and association with clinical outcome across four BRAFi and MEKi clinical trials. *Clin Cancer Res* (2015) doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0321
- Scatena, C., Murtas, D. and Tomei, S. “Cutaneous Melanoma Classification: The Importance of High-Throughput Genomic Technologies,” *Frontiers in Oncology* 2021; 11: 635488. doi: 10.3389/fonc.2021.635488.
- Schreuer M, Meersseman G, Van Den Herrewegen S, Jansen Y, Chevolet I, Bott A, Wilgenhof S, Seremet T, Jacobs B, Buyl R, et al. Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *J Transl Med* (2016) 14:95. doi:10.1186/s12967-016-0852-6

- Szilágyi, M. et al. (2020) "Circulating cell-free nucleic acids: Main characteristics and clinical application," *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, pp. 1–20. doi: 10.3390/ijms21186827.
- Thomas, N. E. et al. (2019) "Utility of TERT Promoter Mutations for Cutaneous Primary Melanoma Diagnosis," *The American Journal of dermatopathology*, 41(4), pp. 264–272. doi: 10.1097/DAD.0000000000001259.
- Type-it HRM PCR Kit. Accessed October 4, 2021. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/detection/ish-and-northern-blotting/snp-detection/type-it-hrm-pcr-kit/>
- Vallée, A. et al. (2019) "Prospective evaluation of two screening methods for molecular testing of metastatic melanoma: Diagnostic performance of BRAF V600E immunohistochemistry and of a NRAS-BRAF fully automated real-time PCR-based assay," *PLoS ONE*, 14(8). doi: 10.1371/journal.pone.0221123.
- Valpione, S. et al. (2018) "Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients," *European Journal of Cancer*, 88, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ejca.2017.10.029.
- What is High Resolution Melting (HRM)? | Bio-Rad Laboratories. Accessed October 4, 2021. <https://www.bio-rad.com/es-ar/applications-technologies/what-high-resolution-melting-hrm?ID=LUSOIH97Q>.

ANEXO TEÓRICO

1-PCR de punto final

La PCR es una técnica de biología molecular capaz de amplificar enzimáticamente, a través de la adición de nucleótidos, una sola molécula de ADN en millones de copias en poco tiempo. La amplificación se logra mediante una serie de tres pasos: (1) **desnaturalización**, en la que el ADN de doble cadena se desnaturaliza con temperatura, separándose en ambas cadenas; (2) **hibridación**, en la que los *primers* se unen a su región complementaria en el ADN objetivo; y (3) **extensión**, en la que la ADN polimerasa extiende el extremo 3' de cada *primer* a lo largo de las cadenas de ADN objetivo. Estos pasos se repiten (“ciclan”) de 30 a 45 veces para producir exponencialmente copias exactas del ADN objetivo (Szilágyi, 2020).

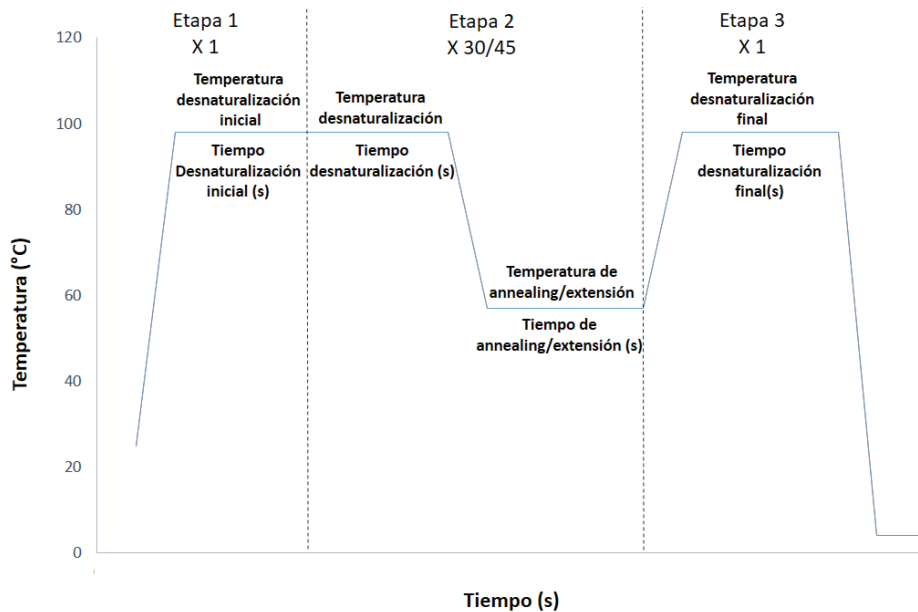


Figura 58: Ciclado de PCR de dos pasos según Temperatura (°C) vs Tiempo (s).

El paso de **desnaturalización inicial** se realiza habitualmente a 94–98°C durante 1–5 minutos. El tiempo y la temperatura de este paso pueden variar según la naturaleza del ADN objetivo. La **temperatura de annealing o hibridación** ($T_{hibridación}$) se determina según la **temperatura de melting o fusión** (T_m) de los *primers* u *oligonucleótidos* seleccionados para la amplificación por PCR. T_m se define como la temperatura a la que el 50% de los *primers* y su secuencia complementaria forman un dúplex. Una regla general es comenzar con una $T_{hibridación}$ 3–5°C más baja que la T_m más baja de los *primers* (Szilágyi, 2020). Para optimizar la $T_{hibridación}$ se pueden realizar gradientes de temperatura y evaluar al mismo tiempo para las distintas $T_{hibridación}$. El siguiente paso en la PCR es la **extensión** del extremo 3' de los *primers* complementarios a la cadena objetivo de ADN. La actividad polimerasa 5'→ 3' de la ADN polimerasa incorpora deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) y sintetiza las cadenas hijas. La temperatura de extensión ($T_{extensión}$) se eleva a la temperatura óptima de la enzima para su máxima actividad. Si la $T_{hibridación}$ del *primer* está dentro de los 3°C de la $T_{extensión}$, se pueden combinar en un solo paso llamado **PCR de dos pasos**, en lugar de la PCR convencional de tres pasos. La PCR de dos pasos acorta el tiempo necesario para el proceso de PCR, ya que no es necesario cambiar y estabilizar las

temperaturas entre la hibridación y la extensión (Szilágyi, 2020). El tiempo de extensión de la PCR depende de la velocidad de síntesis de la ADN polimerasa y de la longitud del ADN objetivo a amplificar. El tiempo de extensión típico para la Taq ADN polimerasa es de 1 min/kb (Qiagen,2021) (Biorad,2021).

Para evaluar la especificidad del producto de amplificación de la PCR, se puede analizar su curva de desnaturalización y su corrida electroforética. La función de dichas técnicas es la de evaluar si se formó un producto único y específico, si hay presencia de dímeros de *primers* o productos inespecíficos. La electroforesis proporciona evidencia cualitativa del número y tamaño de fragmentos de ADN amplificados en la muestra. Esto lo logra a través de la migración diferencial de las moléculas, bajo la incidencia de un campo eléctrico, generada por diferencias de masa ya que el ADN tiene carga negativa homogénea. Para conocer el tamaño de los amplicones se utilizan marcadores de peso molecular (MPM) que son fragmentos de ADN de tamaño conocido. Por otro lado, para obtener las curvas de desnaturalización se utiliza el colorante fluorescente Eva Green, el cual es un agente intercalante saturante de ácidos nucleicos doble cadena. El pico de la derivada de la curva de desnaturalización (dF/dT vs Temperatura de fusión en °C) corresponde a la temperatura donde la mitad de las moléculas de ADN se encuentran asociadas al fluoróforo (T_m). Cuanto mayor tamaño tenga el amplicón de ADN a desnaturalizar mayor será su temperatura de fusión (Qiagen, 2021). A medida que disminuye la cantidad de ADN doble cadena, disminuye linealmente la intensidad de fluorescencia. Los datos se recopilan normalmente en un rango de temperatura de 65 a 95°C en incrementos de 0,2 -1°C (Biorad,2021).

2-PCR Touchdown

La generación de múltiples productos inespecíficos en las reacciones de PCR a menudo es causado por una baja temperatura de fusión (T_m) o estimaciones y condiciones de *annealing* inadecuadas. *Touchdown* (TD) PCR ofrece un medio simple y rápido para optimizar las PCR, aumentando la especificidad, la sensibilidad y el rendimiento, sin la necesidad de optimizaciones prolongadas y/o el rediseño de *primers*. Emplea una temperatura de hibridación inicial por encima de la temperatura de fusión proyectada (T_m) de los *primers* que se utilizan, luego pasa progresivamente a una temperatura de hibridación más baja y permisiva en el transcurso de ciclos sucesivos. Cualquier diferencia en la T_m entre el *annealing* correcto e incorrecto producirá una ventaja exponencial del doble o hasta del cuádruple por ciclo, por ejemplo disminuyendo la temperatura de *annealing* de la reacción 0,5 °C por ciclo se obtiene una ventaja exponencial del doble. La TD-PCR es especialmente útil para templados que son difíciles de amplificar, como templados con estructuras secundarias extensas, islas de alto % G+C en genomas y dianas de organismos con >60% de contenido de G+C. También se puede usar de forma estándar para mejorar la especificidad y la formación de productos. El procedimiento dura entre 90 y 120 minutos, dependiendo de la longitud del templado (Thermofisher).

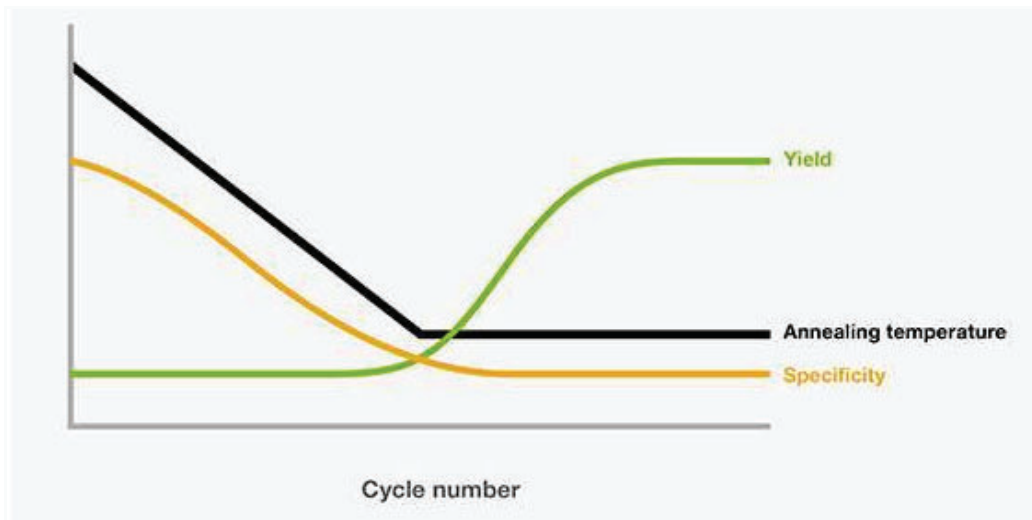


Figura 59. *Touchdown* PCR. El método promueve la especificidad (curva amarilla) al comenzar con una temperatura de *annealing* superior a la óptima, que se reduce gradualmente (línea negra) a medida que continúa el ciclo hasta que se alcanza la temperatura de *annealing* óptima. El rendimiento del amplicón previsto (curva verde) se acumula considerablemente con la temperatura de hibridación optimizada (Thermofisher).

3-PCR *Touch-up* (TU)

Es una técnica de amplificación única que funciona de manera eficiente y específica en un rango de temperatura, en lugar de a una temperatura específica, durante todo el proceso de amplificación. La PCR de gradiente TU es útil para templados que son difíciles de amplificar y requieren una optimización extensa. Los ciclos iniciales proporcionan condiciones favorables para que se produzca la amplificación, mientras que los ciclos posteriores permiten una amplificación más específica. Por lo tanto, consiste en comenzar por temperaturas más bajas que la temperatura de *annealing* hasta alcanzar la misma (Rowther,2012).

4-PCR Cuantitativa y PCR digital

La detección de mutaciones siempre ha representado un desafío tecnológico porque sólo un pequeño subconjunto de células tumorales alberga estas mutaciones, y los métodos a menudo tienen una sensibilidad limitada para su determinación. Además, si bien los tumores liberan ADN a circulación, la cantidad de ADN circulante libre de células presente en las biopsias líquidas es escaso por naturaleza requiriendo de un método sensible para su estudio. La PCR digital por gotas (ddPCR) es uno de los métodos más sensibles para la detección de mutaciones somáticas y actualmente es uno de los mejores métodos utilizados en el análisis de ADNct. La ddPCR se basa en la partición de una mezcla de reacción de PCR con ADN molde en 10.000-20.000 gotas, de forma tal que cada gota tiene una secuencia objetivo. Por lo tanto, en cada partición se lleva a cabo una PCR de punto final, permitiendo la medición de miles de eventos de amplificación independientes dentro de una sola muestra, lo que implica una mayor sensibilidad (Colozza-Gama *et al.*, 2021). La ddPCR utiliza microfluidos para dividir las muestras en gotitas de agua suspendidas en aceite (Sun *et al.*, 2021).

Cada secuencia objetivo/blanco es reconocida por una sonda con un fluoróforo específico. En las reacciones de punto final, las gotas se puntúan por la presencia (positiva) o ausencia (negativa) de señales de fluorescencia y luego se analiza la proporción de gotas positivas o

negativas sobre el total para calcular la concentración objetivo en la muestra, según la distribución de Poisson. Por lo tanto, la estrategia de dilución limitante del ADN moldea a una molécula por gota y la distribución de Poisson permiten determinar el recuento absoluto de copias de ADN diana por muestra (Colozza-Gama *et al.*, 2021).

Por otro lado, para la detección de las mutaciones puntuales por PCR cuantitativa se pueden utilizar sondas específicas con el sistema fluoróforo/extintor. El sistema se basa en un fluoróforo en el extremo 5', el oligonucleótido específico y un atenuador de la fluorescencia en el extremo 3' ó extintor para absorber, es decir apagar, la señal del fluoróforo que se encuentra en el otro extremo de la sonda. Entonces, cuando la ADN polimerasa extiende la cadena de ADN objetivo desplaza e hidroliza la sonda, que se encuentra hibridada, a través de su actividad 5' a 3' exonucleasa. Al separarse el extintor del fluoróforo ocurre la emisión de fluorescencia. En consecuencia, la intensidad de fluorescencia detectada es directamente proporcional a la del fluoróforo liberado, y a la cantidad de ADN alelo-específica presente en la muestra.

La diferencia clave entre la PCR digital y cuantitativa radica en su estrategia para medir la cantidad de secuencia objetivo (**Figura 60**). En qPCR, la reacción se controla durante todo el proceso de amplificación y la cuantificación se basa en el análisis de la señal fluorescente en la fase exponencial de amplificación. La cantidad 'absoluta' de la secuencia objetivo en una reacción de qPCR se mide en relación con una curva estándar generada a partir de una muestra de cantidad o número de copias conocida. Este método implica que las eficiencias de amplificación de la muestra y los estándares son equivalentes. Las diferencias en las eficiencias pueden afectar significativamente la precisión de la cuantificación (Quan *et al.*, 2018). Por el contrario, ddPCR recopila señales a través de la medición de la señal de fluorescencia en el punto final de la PCR y utiliza el número de particiones positivas sobre el total de particiones para calcular la concentración objetivo. La ddPCR reduce la cuantificación a la enumeración de una serie de resultados positivos y negativos, convirtiendo así una señal continua o analógica en una serie de señales binarias o digitales. A diferencia de qPCR, ddPCR no se basa en curvas de calibración para la cuantificación de muestras. Por lo tanto, evita los errores asociados con las variaciones en las eficiencias de reacción. La cuantificación por ddPCR se basa en estadísticas binomiales que definen matemáticamente su precisión inherente y métricas de rendimiento (Quan *et al.*, 2018).

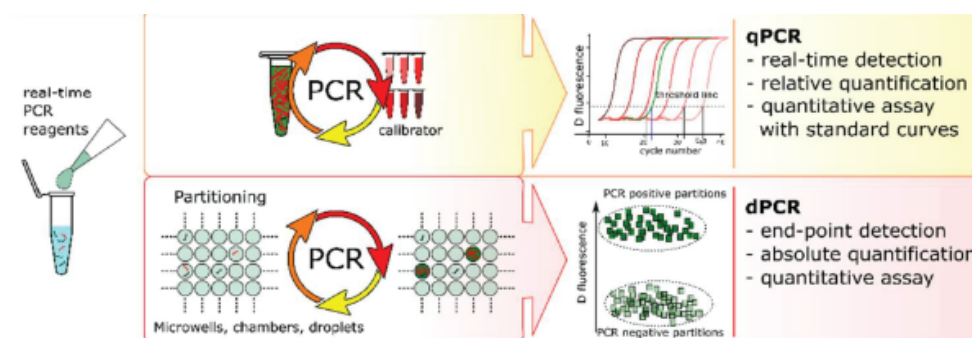


Figura 60: Comparación de técnicas basadas en PCR (Quan *et al.*, 2018).

La partición de la muestra concentra eficazmente las secuencias objetivo dentro de las reacciones de PCR independientes. Este efecto de concentración reduce la competencia del ADN objetivo y, por tanto, permite la detección de mutaciones raras en un contexto de secuencias de

tipo salvaje. Además, también puede permitir una mayor tolerancia a los inhibidores presentes en una muestra (Quan *et al.*, 2018).

Para establecer la solidez en ddPCR se deben determinar el límite de blanco del ensayo (LoB) y el límite de detección (LoD), donde LoB se define como la concentración objetivo aparente más alta que probablemente se encuentre cuando se analizan réplicas de una muestra en blanco que no contiene secuencias diana, es decir, los falsos positivos, y LoD es la concentración objetivo más baja que se espera que se distinga de la LoB o ruido y en la cual la detección es factible. Estos parámetros definen la calidad de una prueba ddPCR, y se debe determinar para cada juego de *primers*/sondas diseñados (Coccaro *et al.*, 2020).

ANEXO DE CÁLCULOS

1-NRAS

A continuación, se encuentran los valores obtenidos de los 7 pocillos con control WT que se utilizaron para el cálculo del LoB y el LoD. Al número de copias de ADN/20 uL de reacción se les contempló un 10% de error de volumen para obtener el promedio de falsos positivos, siendo un valor de 2,2 (ecuación 1). Los límites fueron calculados con las ecuaciones de la Tabla 29.

Tabla 31: Valores obtenidos para el cálculo del LoB y el LoD.

| REACCIÓN | CANAL | Copias ADN /20µl | +10% vol error |
|---|-------|------------------|----------------|
| 1 | FAM | 6,6 | 7,3 |
| | HEX | 8410,4 | 9251,4 |
| 2 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 8408,2 | 9249,0 |
| 3 | FAM | 1,9 | 2,0 |
| | HEX | 9172,2 | 10089,4 |
| 4 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 8876,6 | 9764,2 |
| 5 | FAM | 1,7 | 1,9 |
| | HEX | 8762,9 | 9639,2 |
| 6 | FAM | 1,7 | 1,9 |
| | HEX | 9080,0 | 9988,0 |
| 7 | FAM | 2,2 | 2,4 |
| | HEX | 8464,1 | 9310,5 |
| Promedio Falsos Positivos (FP) = 2,2 | | | |
| LoB = 5,47 | | | |
| LoD = 10,90 | | | |

En las siguientes tablas se encuentra la concentración en copias/µl para todas las muestras de pacientes en los canales correspondientes, FAM y HEX, en la detección de las variantes NRAS^{Q61R}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61}. A partir de este valor se pudieron calcular las copias de ADN por pocillo (ADNc-CPP) y en consecuencia las copias de ADNc por ml de plasma (ADNc-CPMP) (Ecuación 2). A través de la ecuación 3 se obtuvo el porcentaje de FAM.

También se presenta el número de gotas o eventos totales para cada reacción con los respectivos números de eventos positivos y negativos.

Por otro lado, si bien se analizó más de 10.000 gotas la muestra 7 a tiempo t1 se definió muestra no determinada ya que su número de eventos positivos totales (Eventos positivos mutados + eventos positivos *wylde tipe*) es menor a 100 (Parámetro definido como límite para considerar la determinación o no de una muestra).

Tabla 32: Valores utilizados para realizar los cálculos correspondientes (Ecuación 2 y 3) y obtener los resultados mostrados en la Tabla 30 para las variantes NRAS^{Q61R}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61}.

| Paciente | Target | Nº Gotas | Eventos Positivos | Eventos Negativos | Ejes | Conc(copias/ μ L) | ADNc-CPP | ADNc-CPMP | % FAM |
|----------|--------|----------|-------------------|-------------------|-------|-----------------------|----------|-----------|-------|
| 10 t0 | FAM | 30.393 | 0 | 30.393 | 3.900 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 10 t0 | HEX | 30.393 | 933 | 29.460 | 1.900 | 36,68 | 806,98 | 1.613,97 | - |
| 10 t2 | FAM | 27.303 | 0 | 27.303 | 3.900 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 10 t2 | HEX | 27.303 | 1.444 | 25.859 | 1.900 | 63,93 | 1.406,39 | 2.812,78 | - |
| 15 t0 | FAM | 30.254 | 6 | 30.248 | 3.900 | 0,23 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 15 t0 | HEX | 30.254 | 265 | 29.989 | 1.900 | 10,35 | 227,71 | 455,41 | - |
| 15 t1 | FAM | 31.839 | 0 | 31.839 | 3.900 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 15 t1 | HEX | 31.839 | 1.192 | 30.647 | 1.900 | 44,89 | 987,60 | 1.975,20 | - |
| 15 t2 | FAM | 24.298 | 0 | 24.298 | 3.900 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 15 t2 | HEX | 24.298 | 2.500 | 21.798 | 1.900 | 127,74 | 2.810,20 | 5.620,40 | - |
| 7 t0 | FAM | 24.114 | 6 | 24.108 | 3.900 | 0,29 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 7 t0 | HEX | 24.114 | 787 | 23.327 | 1.900 | 39,04 | 858,80 | 1.717,61 | - |
| 7 t1 | FAM | 25.128 | 9 | 25.119 | 3.900 | 0,42 | 0,00 | - | ND |
| 7 t1 | HEX | 25.128 | 44 | 25.084 | 1.900 | 2,06 | 45,36 | - | ND |
| 7 t2 | FAM | 22.656 | 2 | 22.654 | 3.900 | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 7 t2 | HEX | 22.656 | 759 | 21.897 | 1.900 | 40,09 | 881,94 | 1.763,89 | - |
| 14 t0 | FAM | 25.826 | 0 | 25.826 | 3.900 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 14 t0 | HEX | 25.826 | 568 | 25.258 | 1.900 | 26,16 | 575,59 | 1.151,18 | - |
| 14 t1 | FAM | 24.247 | 1 | 24.246 | 3.900 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 14 t1 | HEX | 24.247 | 696 | 23.551 | 1.900 | 34,26 | 753,81 | 1.507,63 | - |
| 14 t2 | FAM | 29.019 | 1 | 29.018 | 3.900 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 14 t2 | HEX | 29.019 | 1.121 | 27.898 | 1.900 | 46,35 | 1.019,66 | 2.039,31 | - |
| 16 t0 | FAM | 27.606 | 4 | 27.602 | 3.900 | 0,17 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 16 t0 | HEX | 27.606 | 2.973 | 24.633 | 1.900 | 134,05 | 2.949,19 | 5.898,39 | - |
| 16 t1 | FAM | 26.341 | 2 | 26.339 | 3.900 | 0,09 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 16 t1 | HEX | 26.341 | 1.626 | 24.715 | 1.900 | 74,96 | 1.649,13 | 3.298,26 | - |
| 16 t2 | FAM | 31.393 | 2 | 31.391 | 3.900 | 0,07 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 16 t2 | HEX | 31.393 | 2.971 | 28.422 | 1.900 | 116,97 | 2.573,26 | 5.146,52 | - |
| 3 t0 | FAM | 25.201 | 33 | 25.168 | 3.900 | 1,54 | 23,01 | 46,03 | 4,38 |
| 3 t0 | HEX | 25.201 | 484 | 24.717 | 1.900 | 22,81 | 501,92 | 1.003,84 | - |
| 3 t1 | FAM | 29.409 | 9 | 29.400 | 3.900 | 0,36 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 3 t1 | HEX | 29.409 | 2.622 | 26.787 | 1.900 | 109,86 | 2.417,00 | 4.834,00 | - |
| 3 t2 | FAM | 28.652 | 7 | 28.645 | 3.900 | 0,29 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 3 t2 | HEX | 28.652 | 1.038 | 27.614 | 1.900 | 43,41 | 955,07 | 1.910,14 | - |
| 12 t0 | FAM | 32.358 | 1 | 32.357 | 3.900 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 12 t0 | HEX | 32.358 | 702 | 31.656 | 1.900 | 25,80 | 567,69 | 1.135,39 | - |
| 12 t2 | FAM | 31.902 | 7 | 31.895 | 3.900 | 0,26 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 12 t2 | HEX | 31.902 | 1.234 | 30.668 | 1.900 | 46,41 | 1.021,03 | 2.042,06 | - |
| 2 t0 | FAM | 24.310 | 171 | 24.139 | 3.900 | 8,30 | 171,80 | 343,61 | 13,00 |
| 2 t0 | HEX | 24.310 | 1.056 | 23.254 | 1.900 | 52,25 | 1.149,45 | 2.298,90 | - |
| 2 t1 | FAM | 24.001 | 2 | 23.999 | 3.900 | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2 t1 | HEX | 24.001 | 754 | 23.247 | 1.900 | 37,55 | 826,15 | 1.652,30 | - |
| 2 t2 | FAM | 24.550 | 2 | 24.548 | 3.900 | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2 t2 | HEX | 24.550 | 743 | 23.807 | 1.900 | 36,16 | 795,42 | 1.590,84 | - |

ADNc CPP: Copias de ADNc por pocillo de reacción

ADNc CPMP: Copias de ADNc por ml de plasma

FAM (%): Fracción alélica mutacional

Tabla 33: Valores utilizados para realizar los cálculos correspondientes (Ecuación 2 y 3) y obtener los resultados mostrados en la Tabla 30 para las variantes NRAS^{Q61R}, NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61}.

| Paciente | Target | Nº Gotas | Eventos Positivos | Eventos Negativos | Ejes | Conc(copias/ μ L) | ADNc-CPP* | ADNc-CPMP | % FAM |
|----------|--------|----------|-------------------|-------------------|-------|-----------------------|-----------|-----------|-------|
| 4 t0 | FAM | 26.508 | 421 | 28.489 | 3.900 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 4 t0 | HEX | 26.508 | 412 | 28.498 | 1.900 | 46,58 | 1.024,73 | 2.049,47 | - |
| 4 t1 | FAM | 26.866 | 1 | 31.182 | 3.800 | 0,74 | 5,48 | 10,97 | 0,39 |
| 4 t1 | HEX | 26.866 | 451 | 30.732 | 1.900 | 63,79 | 1.403,45 | 2.806,91 | - |
| 8 t0 | FAM | 23.664 | 2 | 23.662 | 3.900 | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 8 t0 | HEX | 23.664 | 490 | 23.174 | 1.900 | 24,62 | 541,56 | 1.083,12 | - |
| 8 t1 | FAM | 22.546 | 1 | 22.545 | 3.900 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 8 t1 | HEX | 22.546 | 881 | 21.665 | 1.900 | 46,89 | 1.031,66 | 2.063,32 | - |
| 8 t2 | FAM | 29.591 | 10 | 29.581 | 3.900 | 0,40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 8 t2 | HEX | 29.591 | 1.078 | 28.513 | 1.900 | 43,66 | 960,50 | 1.921,00 | - |
| 17 t0 | FAM | 25.721 | 1 | 25.720 | 3.900 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 17 t0 | HEX | 25.721 | 833 | 24.888 | 1.900 | 38,73 | 852,10 | 1.704,20 | - |
| 17 t1 | FAM | 30.401 | 139 | 30.262 | 3.900 | 5,39 | 107,71 | 215,42 | 12,20 |
| 17 t1 | HEX | 30.401 | 897 | 29.504 | 1.900 | 35,23 | 775,17 | 1.550,34 | - |
| 17 t2 | FAM | 29.495 | 1 | 29.494 | 4.000 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 17 t2 | HEX | 29.495 | 376 | 29.119 | 1.350 | 15,09 | 332,07 | 664,13 | - |
| 1 t0 | FAM | 31.333 | 36 | 29.823 | 3.900 | 0,45 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 1 t0 | HEX | 31.333 | 1.143 | 28.716 | 1.900 | 687,28 | 15.120,13 | 30.240,25 | - |
| 5 t0 | FAM | 29.859 | 454 | 34.410 | 3.900 | 1,42 | 20,32 | 40,65 | 1,97 |
| 5 t0 | HEX | 29.859 | 2.027 | 32.837 | 1.900 | 45,92 | 1.010,24 | 2.020,47 | - |
| 5 t1 | FAM | 24.218 | 558 | 28.366 | 3.800 | 0,87 | 8,34 | 16,69 | 0,10 |
| 5 t1 | HEX | 24.218 | 2.670 | 26.254 | 1.900 | 365,61 | 8.043,38 | 16.086,76 | - |
| 11 t0 | FAM | 17.326 | 0 | 17.326 | 3.900 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 11 t0 | HEX | 17.326 | 681 | 16.645 | 1.900 | 47,17 | 1.037,84 | 2.075,68 | - |
| 11 t2 | FAM | 27.752 | 0 | 27.752 | 3.900 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 11 t2 | HEX | 27.752 | 1.058 | 26.694 | 1.900 | 45,73 | 1.006,02 | 2.012,05 | - |
| 6 t0 | FAM | 34.864 | 0 | 26.508 | 3.900 | 15,42 | 328,35 | 656,71 | 17,48 |
| 6 t0 | HEX | 34.864 | 1.029 | 25.479 | 1.900 | 70,47 | 1.550,32 | 3.100,65 | - |
| 6 t1 | FAM | 28.924 | 17 | 26.849 | 3.900 | 22,92 | 493,30 | 986,60 | 16,44 |
| 6 t1 | HEX | 28.924 | 1.418 | 25.448 | 1.900 | 113,95 | 2.506,79 | 5.013,59 | - |
| 19 t0 | FAM | 28.498 | 4 | 28.494 | 3.900 | 0,17 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 19 t0 | HEX | 28.498 | 730 | 27.768 | 1.900 | 30,53 | 671,64 | 1.343,27 | - |
| NTC | FAM | 24.154 | 1 | 24.153 | 3.900 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| NTC | HEX | 24.154 | 0 | 24.154 | 1.900 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| + | FAM | 28.910 | 18 | 24.200 | 3.900 | 17,26 | 368,78 | 737,56 | 49,82 |
| + | HEX | 28.910 | 6.469 | 17.749 | 1.900 | 16,89 | 371,51 | 743,01 | - |
| - | FAM | 31.183 | 12 | 31.321 | 3.900 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| - | HEX | 31.183 | 13.863 | 17.470 | 1.900 | 17,14 | 377,07 | 754,14 | - |

2-BRAF

Tabla 34. Valores del LoB y el LoD de BRAF^{V600E} utilizados para BRAF^{V600K}.

| REACCIÓN | CANAL | Copias ADN /20µl | +10% vol error |
|---|-------|------------------|----------------|
| 1 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 6.483,3 | 7131,6 |
| 2 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 7.061,9 | 7768,1 |
| 3 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 6.089,3 | 6698,2 |
| 4 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 6.518,0 | 7169,8 |
| 5 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 6.811,8 | 7493,0 |
| 6 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 7.380,4 | 8118,4 |
| 7 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 7.239,4 | 7963,4 |
| 8 | FAM | 0,0 | 0,0 |
| | HEX | 6.951,8 | 7647,0 |
| Promedio Falsos Positivos (FP) = 0 | | | |
| LoB = 1 | | | |
| LoD = 5 | | | |

En la siguiente tabla se encuentra la concentración en copias/µl para todas las muestras de pacientes en los canales correspondientes, FAM y HEX, en la detección de la variante BRAF^{V600K} y BRAF^{V600}. A partir de este valor se pudieron calcular las copias de ADN por pocillo (ADNc-CPP) y en consecuencia las copias de ADNc por ml de plasma (ADNc-CPMP) (**Ecuación 2**). A través de la ecuación 3 se obtuvo el porcentaje de FAM.

También se presenta el número de gotas o eventos totales para cada reacción con los respectivos números de eventos positivos y negativos.

Tabla 35: Valores utilizados para realizar los cálculos correspondientes (Ecuación 2 y 3) y obtener los resultados mostrados en la Tabla 30 para las variantes BRAF^{V600K} y BRAF^{V600}.

| Paciente | Target | Nº Gotas | Eventos Positivos | Eventos Negativos | Ejes | Conc(copias/ μ L) | ADNc-CPP | ADNc-CPMP | % FAM |
|----------|--------|----------|-------------------|-------------------|-------|-----------------------|----------|-----------|-------|
| 7 t0 | FAM | 19.812 | 1 | 19.811 | 5.100 | 0,06 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 7 t0 | HEX | 19.812 | 570 | 19.242 | 2.200 | 34,30 | 754,60 | 1.509,20 | - |
| 7 t1 | FAM | 21.277 | 2 | 21.275 | 5.100 | 0,11 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 7 t1 | HEX | 21.277 | 51 | 21.226 | 2.200 | 2,82 | 62,04 | 124,08 | - |
| 7 t2 | FAM | 19.359 | 3 | 19.356 | 5.100 | 0,18 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 7 t2 | HEX | 19.359 | 756 | 18.603 | 2.200 | 46,90 | 1.031,80 | 2.063,60 | - |
| 14 t0 | FAM | 18.886 | 2 | 18.884 | 6.000 | 0,12 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 14 t0 | HEX | 18.886 | 568 | 18.318 | 2.330 | 35,93 | 790,36 | 1.580,72 | - |
| 14 t1 | FAM | 20.317 | 3 | 20.314 | 5.700 | 0,17 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 14 t1 | HEX | 20.317 | 911 | 19.406 | 2.560 | 53,97 | 1.187,37 | 2.374,74 | - |
| 14 t2 | FAM | 7.779 | 1 | 7.778 | 5.380 | 0,15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 14 t2 | HEX | 7.779 | 343 | 7.436 | 2.348 | 53,05 | 1.167,16 | 2.334,32 | - |
| 16 t0 | FAM | 18.193 | 0 | 18.193 | 5.500 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 16 t0 | HEX | 18.193 | 2.623 | 15.570 | 2.004 | 183,00 | 4.026,00 | 8.052,00 | - |
| 16 t1 | FAM | 16.294 | 4 | 16.290 | 5.500 | 0,29 | 1,36 | 2,72 | 0,06 |
| 16 t1 | HEX | 16.294 | 1.391 | 14.903 | 2.004 | 105,00 | 2.310,00 | 4.620,00 | - |
| 16 t2 | FAM | 14.887 | 2 | 14.885 | 5.500 | 0,16 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 16 t2 | HEX | 14.887 | 1.723 | 13.164 | 2.004 | 145,00 | 3.190,00 | 6.380,00 | - |
| 2 t0 | FAM | 18.627 | 2 | 18.625 | 5.100 | 0,13 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2 t0 | HEX | 18.627 | 872 | 17.755 | 2.239 | 56,40 | 1.240,80 | 2.481,60 | - |
| 2 t1 | FAM | 19.266 | 5 | 19.261 | 5.100 | 0,31 | 1,71 | 3,42 | 0,20 |
| 2 t1 | HEX | 19.266 | 639 | 18.627 | 2.239 | 39,70 | 873,40 | 1.746,80 | - |
| 2 t2 | FAM | 19.146 | 1 | 19.145 | 5.100 | 0,06 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2 t2 | HEX | 19.146 | 1.033 | 18.113 | 2.239 | 65,30 | 1.436,60 | 2.873,20 | - |
| 4 t0 | FAM | 21.299 | 1 | 21.298 | 5.100 | 0,06 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 4 t0 | HEX | 21.299 | 622 | 20.677 | 2.000 | 34,90 | 767,80 | 1.535,60 | - |
| 4 t1 | FAM | 20.242 | 0 | 20.242 | 5.100 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 4 t1 | HEX | 20.242 | 1.318 | 18.924 | 2.000 | 79,20 | 1.742,40 | 3.484,80 | - |
| 17 t0 | FAM | 17.964 | 3 | 17.961 | 5.100 | 0,20 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 17 t0 | HEX | 17.964 | 492 | 17.472 | 2.000 | 32,70 | 719,40 | 1.438,80 | - |
| 6 t0 | FAM | 22.710 | 4 | 22.706 | 5.100 | 0,21 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 6 t0 | HEX | 22.710 | 1.654 | 21.056 | 2.000 | 89,00 | 1.958,00 | 3.916,00 | - |
| 6 t1 | FAM | 19.537 | 2 | 19.535 | 5.100 | 0,12 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 6 t1 | HEX | 19.537 | 2.175 | 17.362 | 2.000 | 139,00 | 3.058,00 | 6.116,00 | - |

El presente manuscrito corresponde a la última versión de la tesis con las correcciones correspondientes.

Autora: Lucía Correa

Directora: Mariana Aris