



Universitat  
Autònoma  
de Barcelona

# Como Estudiar los diferentes Biomarcadores. Métodos e informes.

Dr. Javier Hernández Losa  
Hospital Universitario Vall d' Hebron

Zaragoza 20 Mayo 2011

# Esquema de la exposición

- 1. Introducción.
- 2. Metodologías empleadas.
- 3. Comparativa Sensibilidades
- 4. Elaboración de informes

# Biomarcadores

**Biomarcador** — una característica medible objetivamente y evaluable como indicador de normalidad biológica, proceso patológico (presencia o pronóstico), o marcador de respuesta a un tratamiento

NIH Definition Working Group. Clin Pharmacol Ther. 2001

# Criterios de un buen Biomarcador

- Estar basado en evidencia científica
  - Reproducible y validado en diferentes modelos
  - Que se comprenda su papel bioquímico
- El estudio de los pacientes pueda ser realizado con alta sensibilidad y especificidad
- Tenga un impacto clínico significativo en el pronóstico y evolución

# Biomarcadores en cancer colorectal

| Biomarcador                            | Evento Molecular  | Frec. | Factor Predictor | Factor Pronóstico | Factor Diagnostico |
|--|---|-------|------------------|-------------------|--------------------|
| <b>KRAS</b>                            | Mutaciones activantes en codón 12 y 13. Raramente en 61,117 y 146               | 40%   | Si               | Posible           | -                  |
| <b>BRAF</b>                            | Mutación activante V600E  | 10%   | Probable         | Probable          | Síndrome de Lynch  |
| <b>PIK3CA</b>                          | Mutaciones en dominio hélice y quinasa.   | 20%   | Posible          | Posible           | -                  |
| <b>PTEN</b>                            | Pérdida de expresión por IHQ; mutaciones inactivantes.                          | 30%   | Posible          | -                 | -                  |
| <b>IMS</b>                             | Alteraciones de 2 o más satélites de 5 analizados (mono o di nucleótidos)       | 15%   | Probable         | Si                | Síndrome de Lynch  |
| <b>CIN</b>                             | Aneuploidia   | 70%   | Probable         | Si                | -                  |
| <b>18q LOH</b>                         | Deleción del brazo largo del cromosoma 18                                       | 50%   | Probable         | Probable          | -                  |
| <b>Fenotipo Metilador de islas CpG</b> | Metilación de al menos 3 loci de una panel de 5 marcadores.                     | 15%   | +/-              | +/-               | -                  |
| <b>Vimentina</b>                       | Metilación del promotor.  | 75%   | -                | -                 | Detección Precoz   |
| <b>TGFBR2</b>                          | Mutaciones inactivantes.  | 30%   | -                | -                 | -                  |
| <b>TP53</b>                            | Mutaciones inactivantes.  | 50%   | -                | -                 | -                  |
| <b>APC</b>                             | Mutaciones inactivantes.  | 70%   | -                | -                 | FAP                |
| <b>β-Catenina</b>                      | Mutaciones activantes.  | 2%    | -                | -                 | -                  |
| <b>MMR</b>                             | Pérdida de expresión por IHQ; metilación del promotor; mutaciones inactivantes. | 1-15% | -                | -                 | Síndrome de Lynch  |

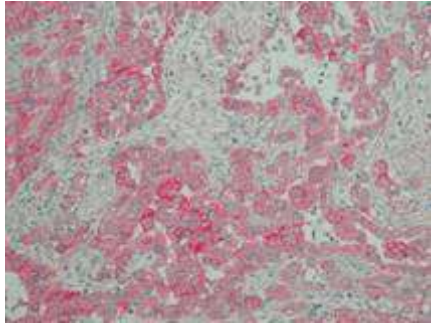
# Esquema de la exposición

- 1. Introducción.
- 2. Metodologías empleadas.
- 3. Comparativa Sensibilidades
- 4. Elaboración de informes

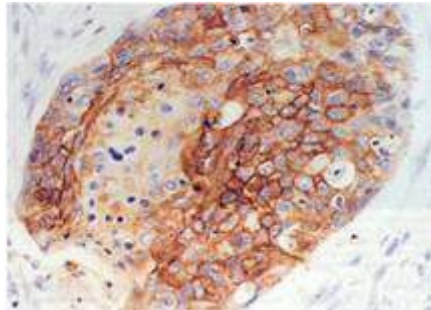
# Metodología Empleada

- 1) Técnicas basadas en Histoquímica
- 2) Técnicas basadas en Inmunohistoquímica
- 3) Técnicas basadas en la Hibridación
  - FISH
  - CISH
  - SISH
- 4) Técnicas basadas en PCR

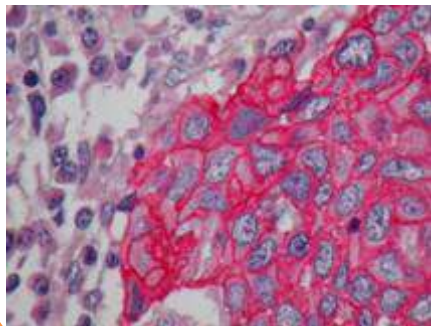
# Técnica Inmunohistoquímica



**Colorectal**



**Pulmón  
(NSCLC)**

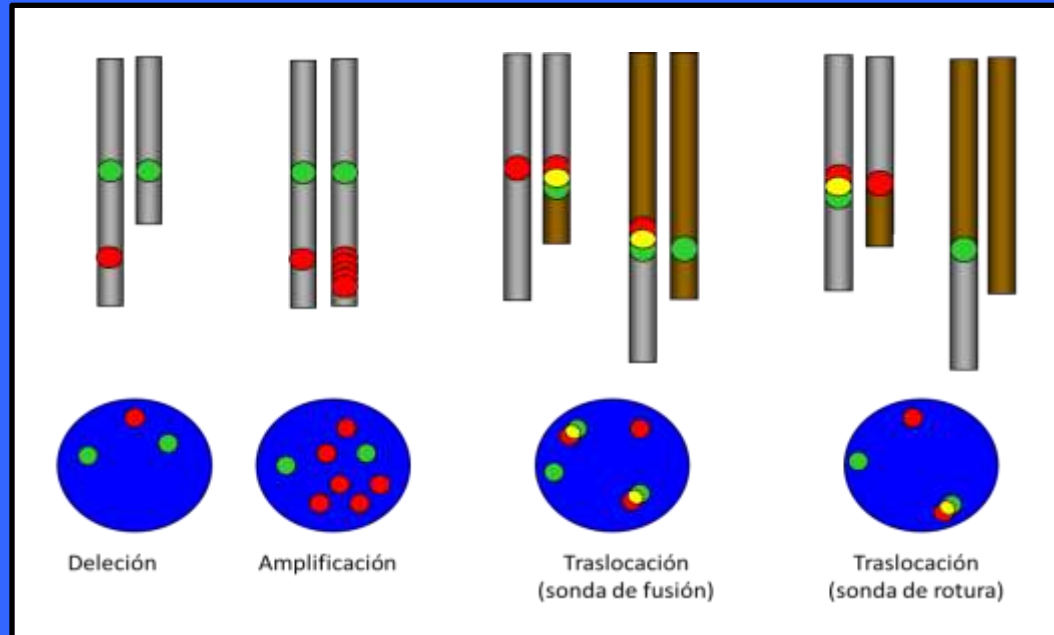


**Cabeza y  
Cuello  
(SCCHN)**

| Tipo de tumor   | (%) Expresión de EGFR |
|-----------------|-----------------------|
| Cabeza y Cuello | 95-100                |
| Colorectal      | 2-90                  |
| Pancreas        | 95                    |
| Mama            | 14-91                 |
| Riñón           | 50-90                 |
| Pulmón (NSCLC)  | 40-80                 |
| Ovario          | 35-77                 |
| Vejiga          | 72                    |
| Glioma          | 63                    |



# Técnica basada en FISH



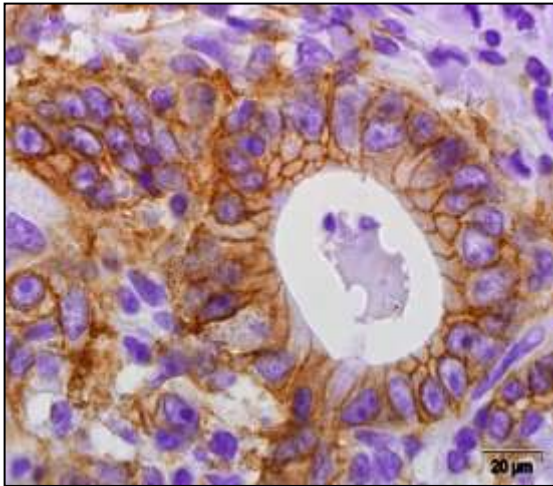
| SONDAS DE FUSIÓN                               | SONDAS DE ROTURA   |
|--|--|
| Alta especificidad (100%) y sensibilidad (95%) | Alta especificidad (95%) y sensibilidad (90%)  |
| Permite demostrar una traslocación concreta    | Permite demostrar reordenamientos de uno de los genes (no una traslocación concreta) |
| Difícil interpretación (superposiciones)       | Fácil interpretación   |

## Sonda

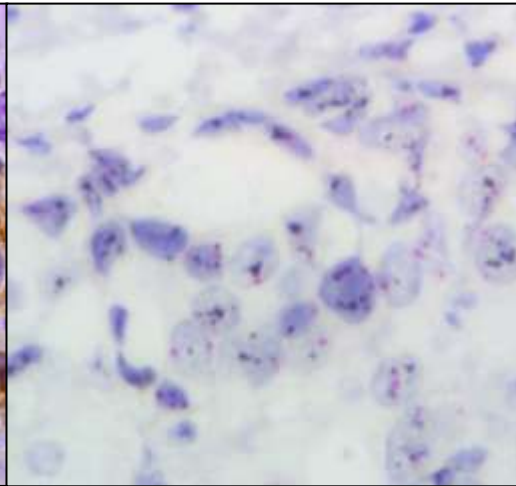
## Aplicación

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>BCL1</b>     | Linfoma del manto                       |
| <b>BCL2</b>     | Linfoma folicular                       |
| <b>BCL6</b>     | Linfoma B difuso de célula grande       |
| <b>MALT1</b>    | Linfomas de tipo MALT                   |
| <b>C-MYC</b>    | Linfomas de Burkitt                     |
| <b>ALK</b>      | Linfomas anaplásicos y cáncer de pulmón |
| <b>CHOP</b>     | Liposarcoma mixoide/células redondas    |
| <b>MDM2</b>     | Liposarcoma bien diferenciado           |
| <b>SYT</b>      | Sarcoma sinovial                        |
| <b>EWS</b>      | Sarcoma de Ewing/PNET                   |
| <b>FOXO1A</b>   | Rabdomiosarcoma alveolar                |
| <b>EGFR</b>     | Gliomas                                 |
| <b>1p y 19q</b> | Oligodendrogliomas                      |
| <b>HER2</b>     | Carcinomas de mama y gástricos          |

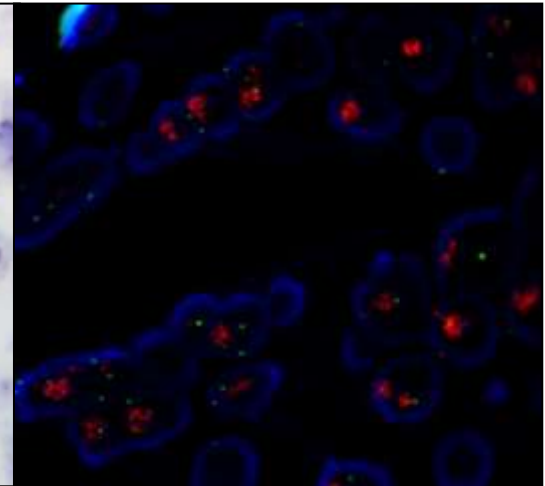
# Determinación de HER2



Herceptest



SISH



FISH

# Diferentes métodos basados en PCR

## 1) Realizados en Laboratorio "Caseros"

### a) Ensayos de electroforesis en geles.

- Electroforesis en geles de gradiente de temperatura.
- Electroforesis en geles de gradiente en presencia de agentes desnaturalizantes (DGGE)
- Electroforesis capilar en condiciones desnaturalizantes.
- Electroforesis capilar en condiciones no desnaturalizantes (SCCE)
- Analisis de polimorfismos de cadena sencilla (SSCP)

### b) Metodos de secuenciación

- Secuenciación por método Sanger o dideoxinucleotidos.
- Pirosecuenciación.

# Diferentes métodos basados en PCR.

## c) Ensayos específicos de alelo basados en PCR

### c.1) Discriminación alelica mediante diseño de primers

- ARMS-PCR
- Ensayo-Flag
- PCR-RFLP.
- Cold-PCR

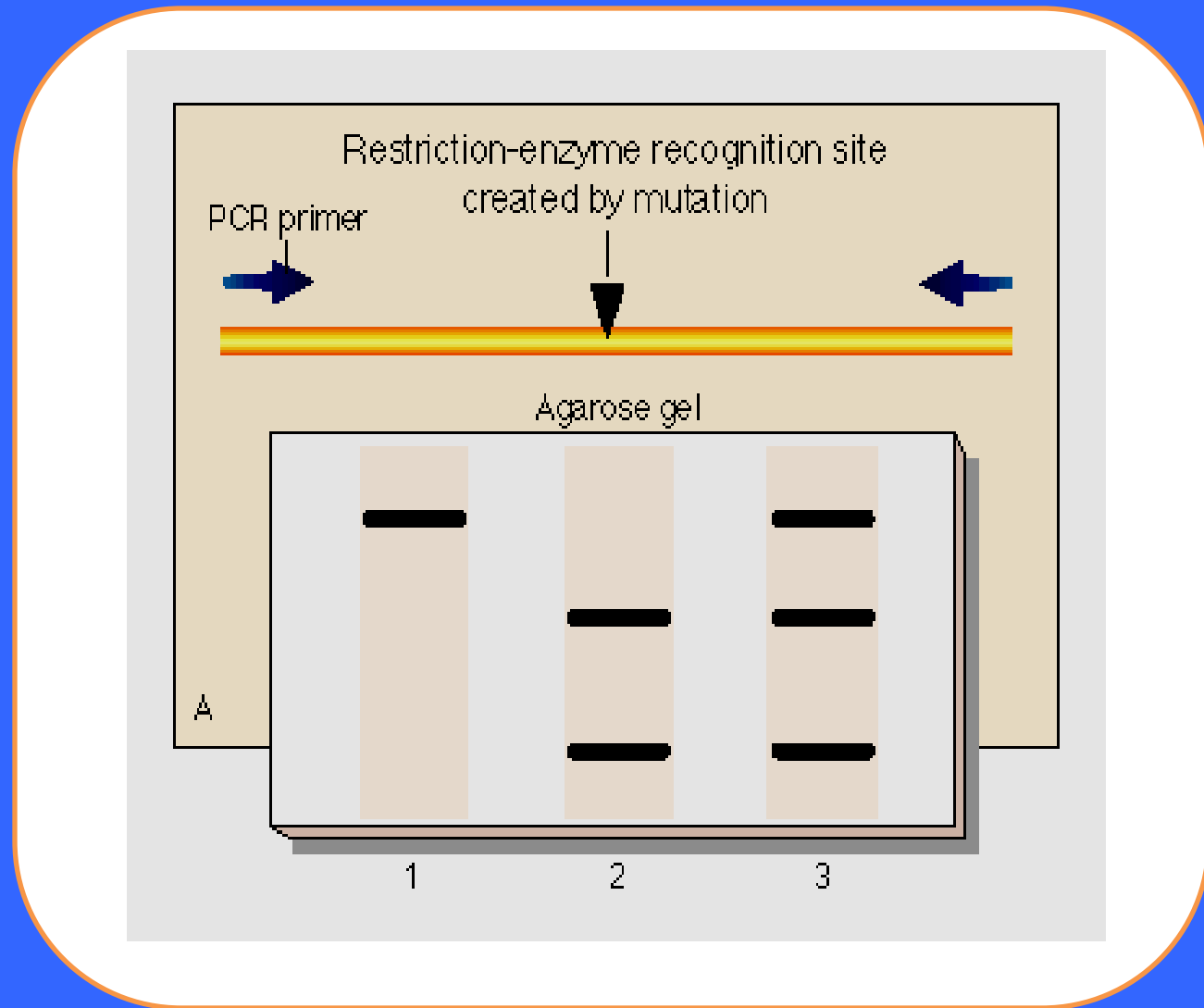
### c.2) Discriminación alelica por ligación específica

- PCR-LDR
- PCR-LDR spFRET

### c.3) PCR-Clamping

### c.4) Ensayos Taqman

# Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)



# PCR-Clamping

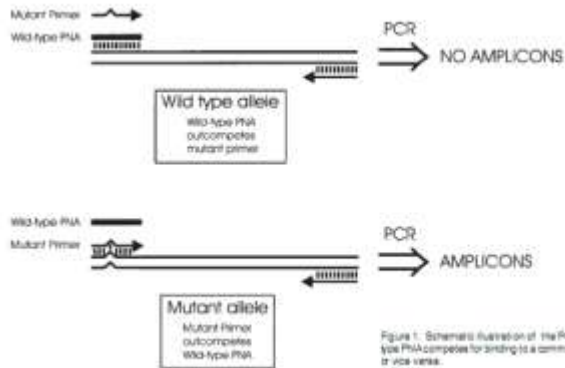


Figure 1. Schematic illustration of the PCR clamping method where wild-type PNA competes for binding to a common target with mutant PCR primer, or vice versa.

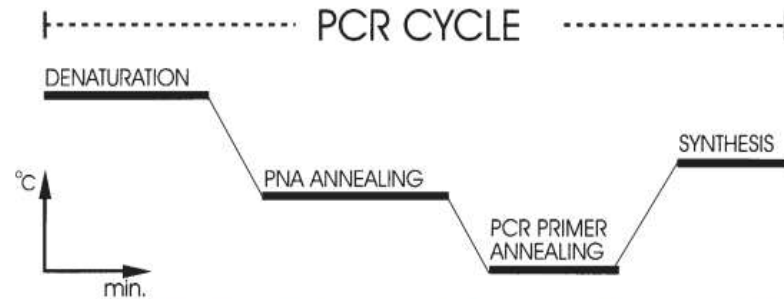
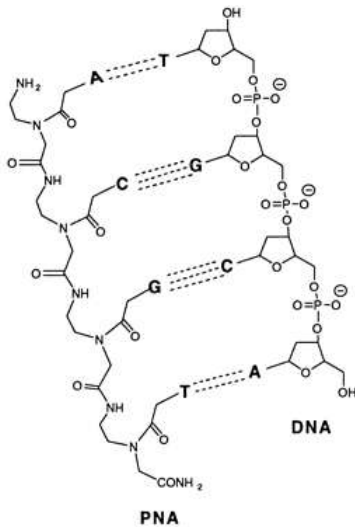


Figure 2. Schematic illustration of the four step PCR cycle profile used in PCR clamping. The PNA annealing step is set at a temperature that allows only the complementary PNA to bind.



Enriquecimiento de la muestra tumoral

Alto nivel de sensibilidad (alrededor del 1%)

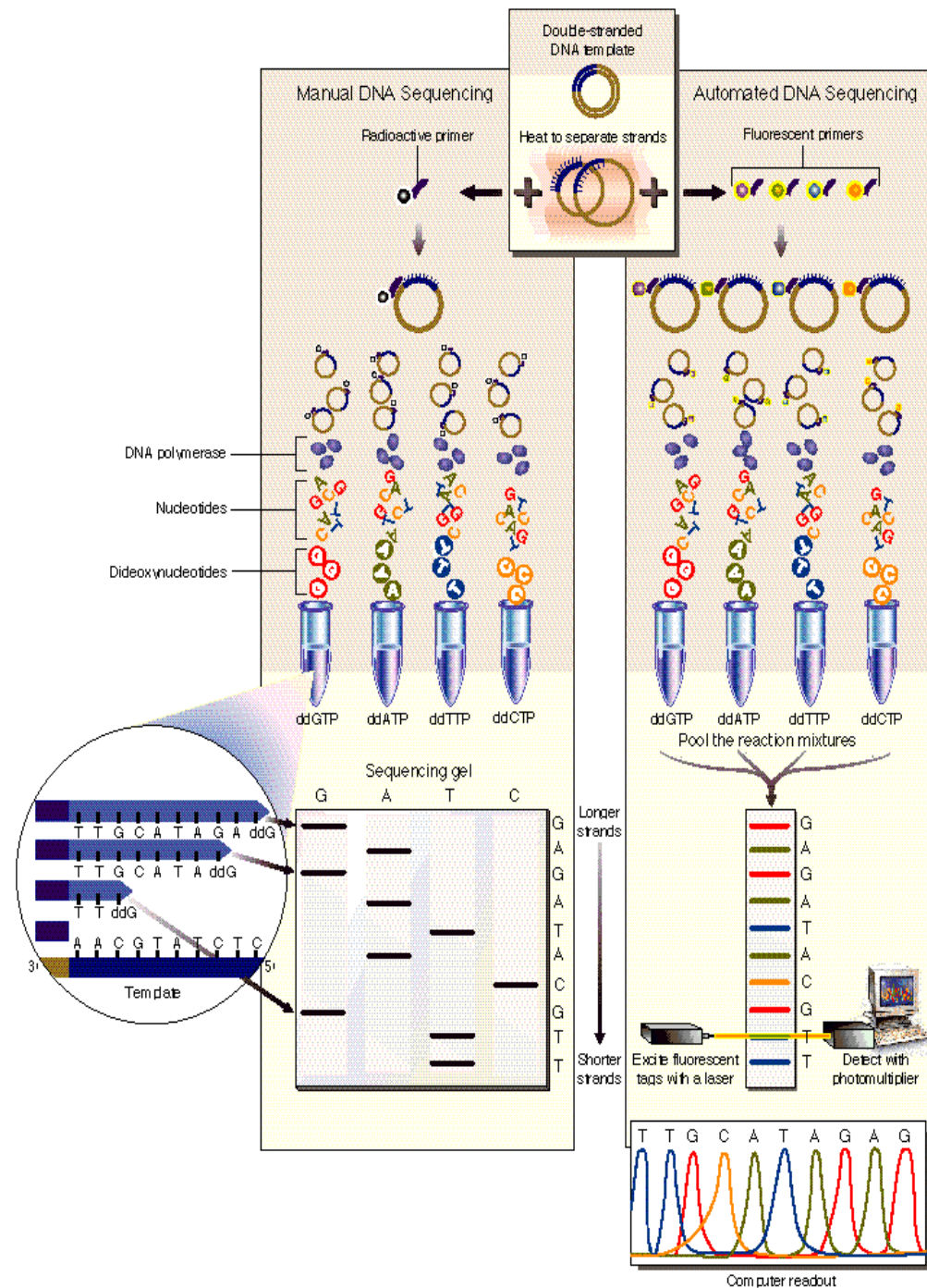
Aplicación a PCR Real Time

Faller et al. British Journal of Cancer 2009

Curr. Issues. Mol 2000

# Secuenciación de ADN

Técnica Gold Standard en análisis de mutaciones

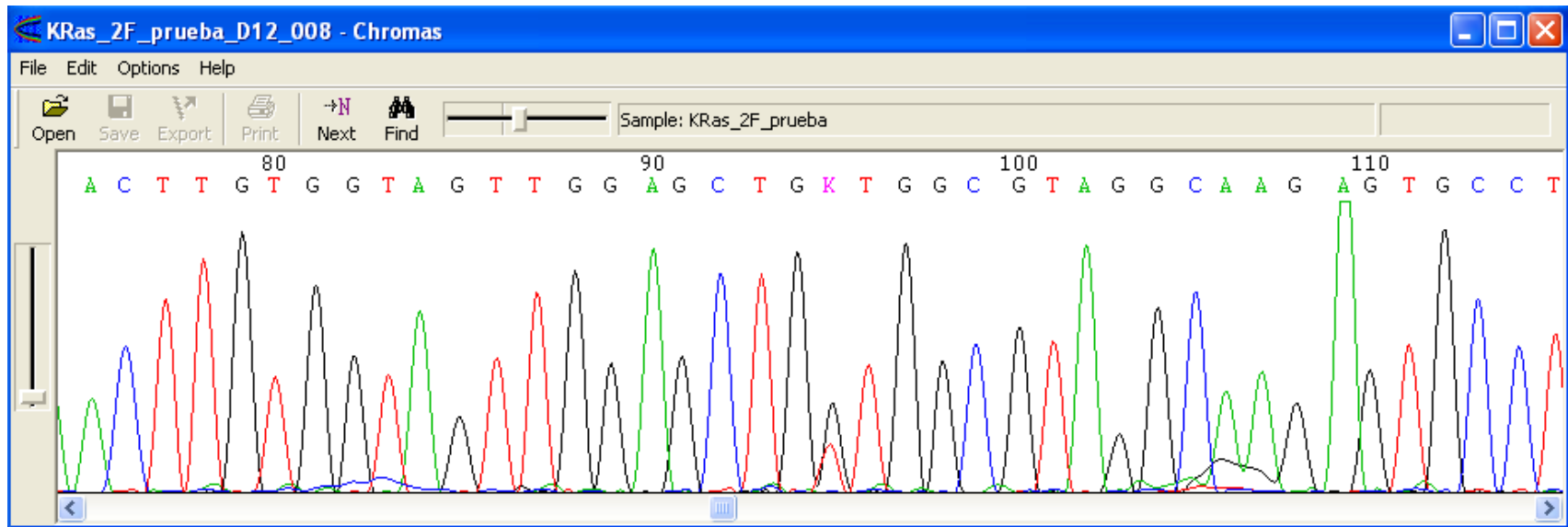




# Secuenciación de KRAS

## Kras → Exon-2

ATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAAT  
TCAGAATCATTGTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAG



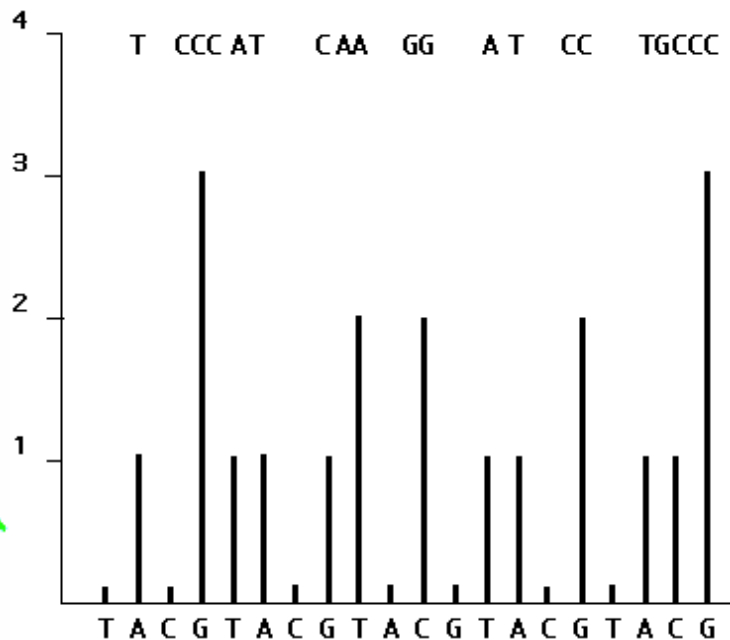
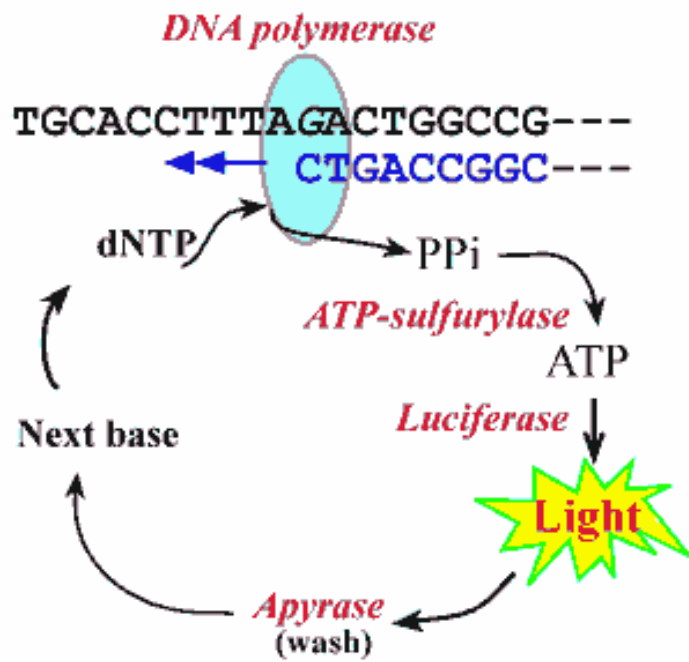
ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCT



GTT → **G12V**

# Pirosecuenciación

Se basa en una reacción lumínica con varias enzimas donde la reacción en cadena de la polimerasa, no se ve interrumpida.



# Diferentes métodos de detección de mutaciones.

## 2) Kits comerciales con usos de Investigación

- ARMS-PCR.
  - "PIK3CA mutation test Kit"
  - "KRAS/BRAF mutation Analysis Kit" - Entrogen
  - "KRAS Amoy Dx"
- Hibridación de oligonucleotidos alelo-especifico-Invitrek
  - "KRAS genotyping kit"
- Primer-Extension
  - "Mutector KRAS Kit"
  - "SNaPshot © Kit SBE -Applied Biosystems"
- HRM (High Resolution Melting)

# Determinación de mutaciones mediante Primer-Extension

"Mutector KRAS Kit"

Capaz de detección de 12 mutaciones en los codones 12 y 13

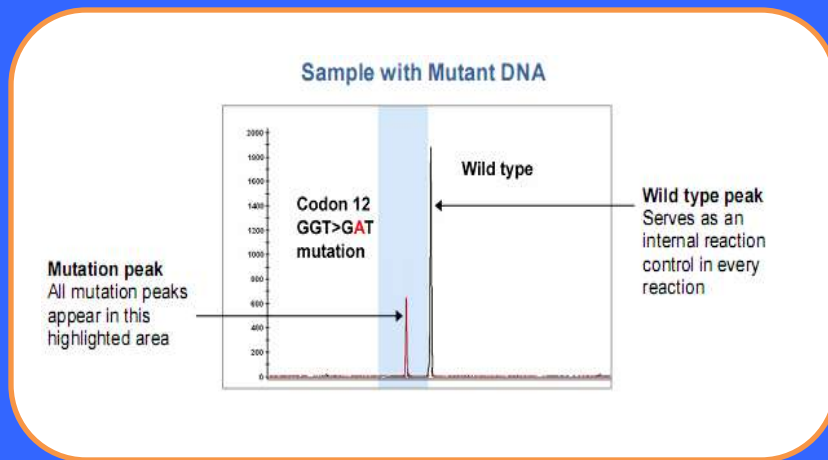
Modo de acción

- 1) Amplificación
- 2) Hibridación
- 3) extensión de hasta 20 bases.

| Codon 12           | Codon 13           |
|--------------------|--------------------|
| Gly12Ser (GGT>AGT) | Gly13Ser (GGC>AGC) |
| Gly12Arg (GGT>CGT) | Gly13Arg (GGC>CGC) |
| Gly12Cys (GGT>TGT) | Gly13Cys (GGC>TGC) |
| Gly12Asp (GGT>GAT) | Gly13Asp (GGC>GAC) |
| Gly12Ala (GGT>GCT) | Gly13Ala (GGC>GCC) |
| Gly12Val (GGT>GTT) | Gly13Val (GGC>GTC) |

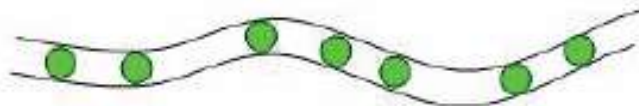
Combinación de sondas y fluorocromos permiten detectar las 12 mutaciones en una sola electroforesis

Posibilidad de acoplarlo a MALDI-TOFF

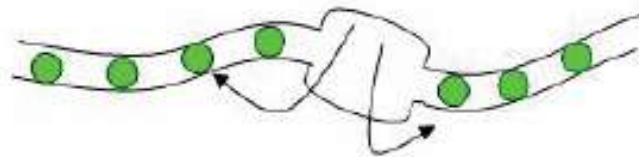


# High Resolution Melt Curve Analysis

Non saturating dsDNA binding dye  
e.g. SYBR™ Green



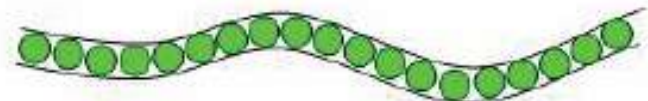
Melting



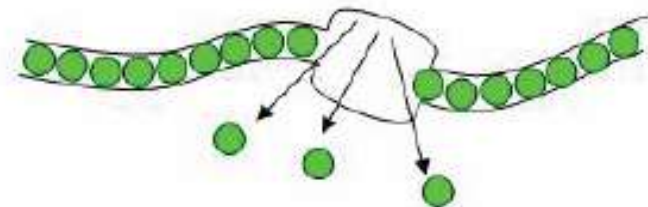
Dye molecules "jump" and redistribute  
into molecule

No change in fluorescent signal

Saturating dsDNA binding dye  
e.g. LCGreen Plus™



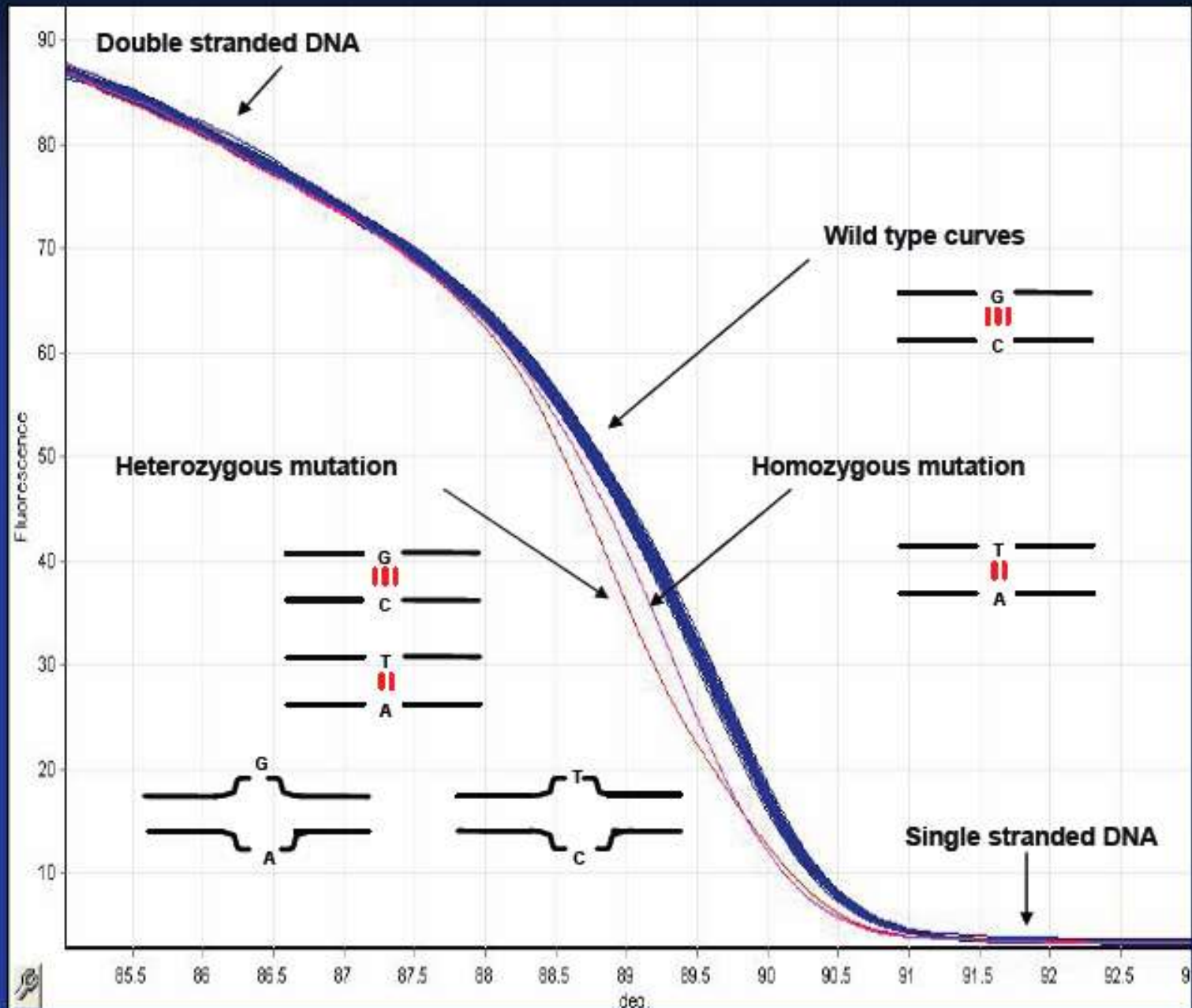
Melting



Dye molecules released

Decrease in fluorescent signal

# High Resolution Melt Curve Analysis



# Diferentes métodos basados en PCR

## 3 ) Kits comerciales con usos clínicos con CE

- Secuenciación por Pirosequencing.  
"Piromark™ KRAS"
- PCR-Hibridación.  
"KRAS, BRAF Strip Assay"
- ARMS-PCR  
"Therascreen (KRAS, EGFR, BRAF) Kit"

*Adaptado Krieken et al. Virchows Arch. (2008)*

# Pirosecuenciación

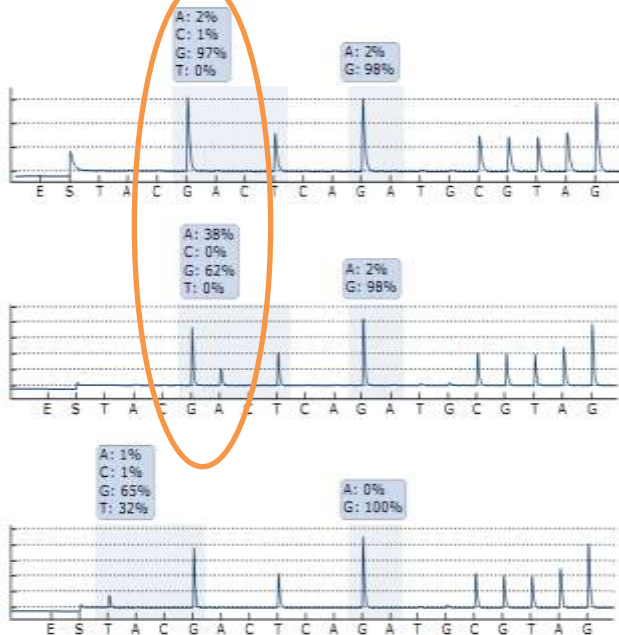
Se usa en MW de 24 pocillos

Tarda 15 minutos en realizar la determinación

Software que permite cuantificación de alelos



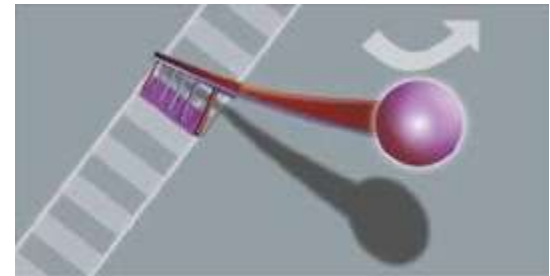
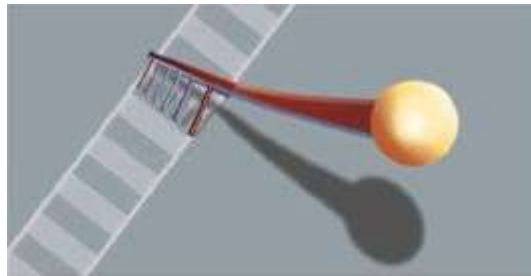
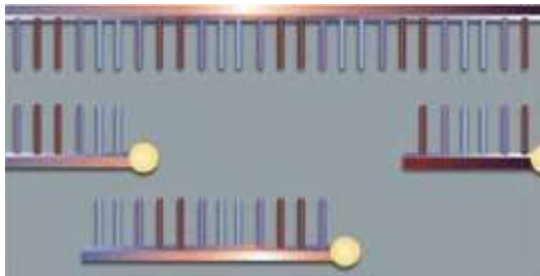
KRAS (codon 12+13 and codon 61)





# KRAS Strip Assay

- Se basa en una PCR con oligos marcados con biotina que amplifica los exones 12 y 13 de KRAS, y V600E de BRAF en presencia de un competidor de secuencias wt
- Hibridación con sondas específicas incluidas en una tira.
- Detección por una reacción colorimétrica



# Especificaciones Strip assay

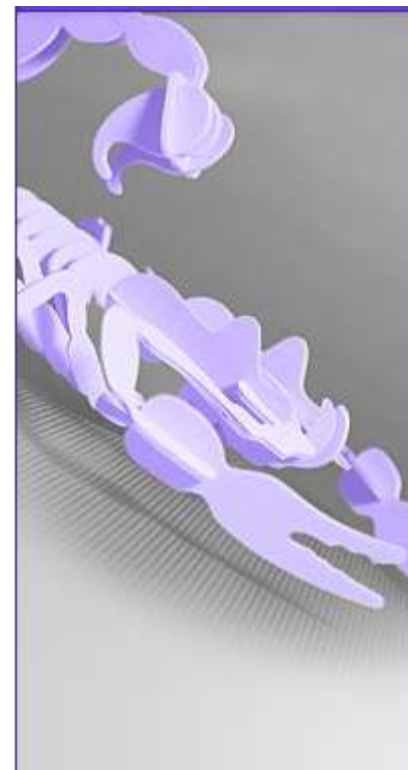
- Determina 10 mutaciones en los codones 12 y 13 de KRAS y codon 600 de BRAF.
- No necesita de PCR a tiempo real
- El tiempo de determinación es de unas 6 Horas
- Relativamente fácil de interpretar los resultados



**AMPLIFICATION  
REFRACTORY MUTATION  
SYSTEM**

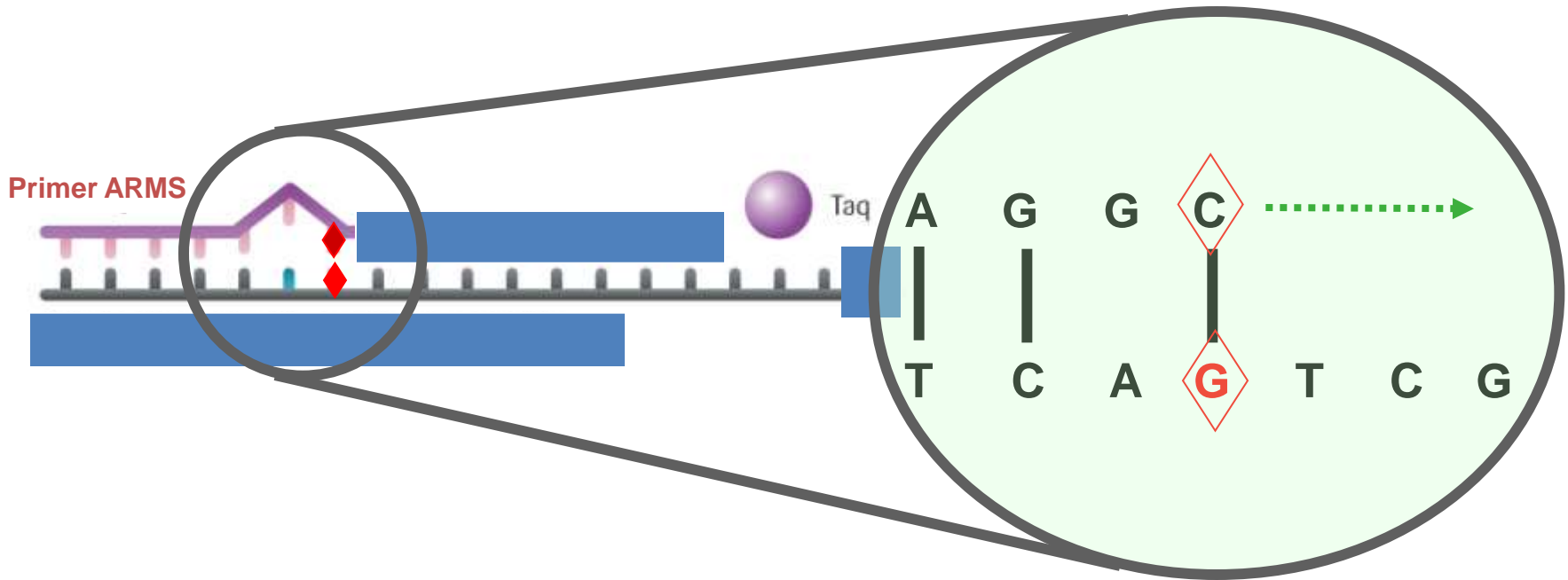


**SCORPIONS**



# *therascreen* PCR: tecnología ARMS-Scorpions

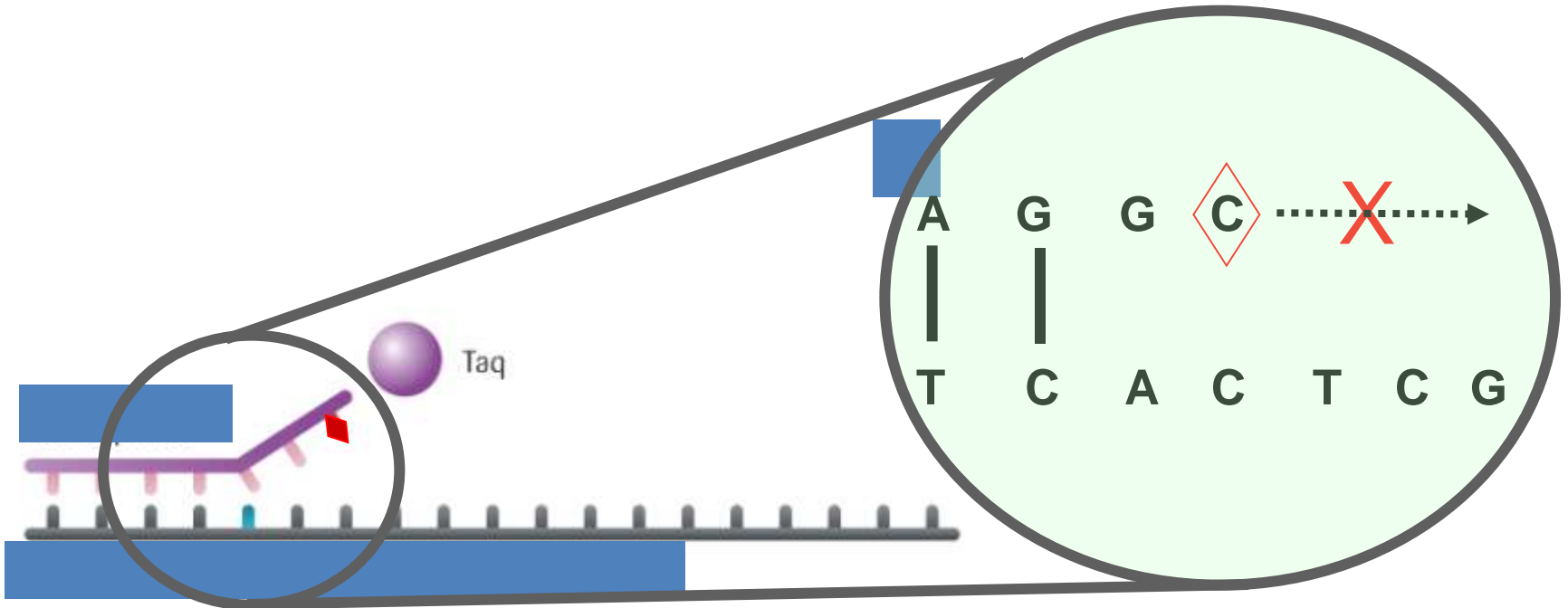
## Primers ARMS



El primer ARMS se extiende en el DNA mutado

# *therascreen* PCR: tecnología ARMS-Scorpions

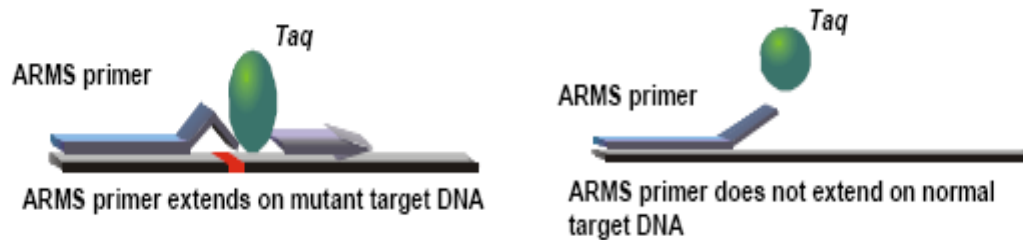
## Primers ARMS



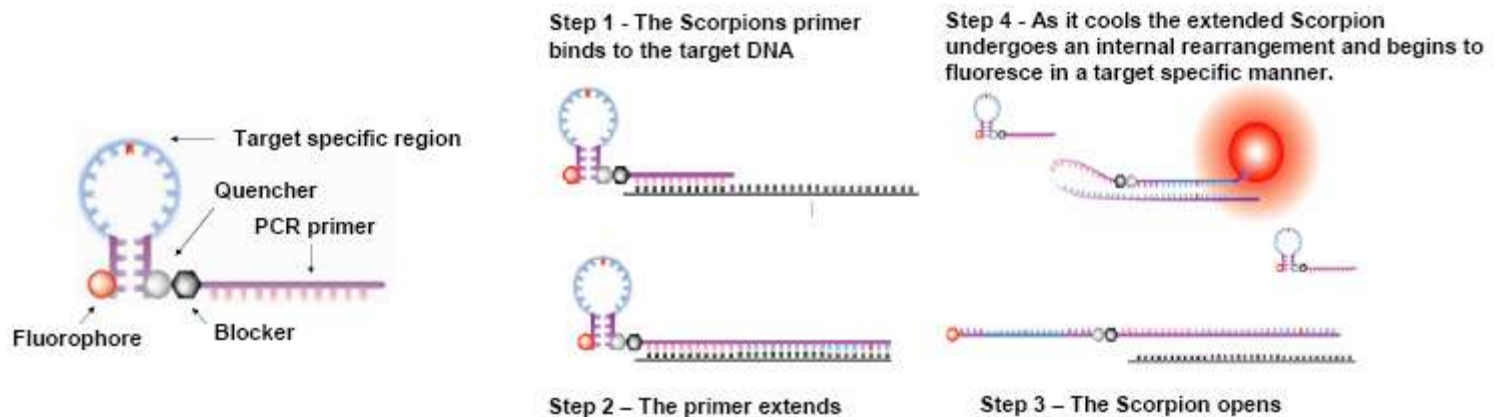
El primer ARMS **no** se extiende en el DNA nativo

# Kit de determinación de mutaciones por "Therascreen"

## 1. Tecnología de ARMS



## 2. Tecnología de Scorpion

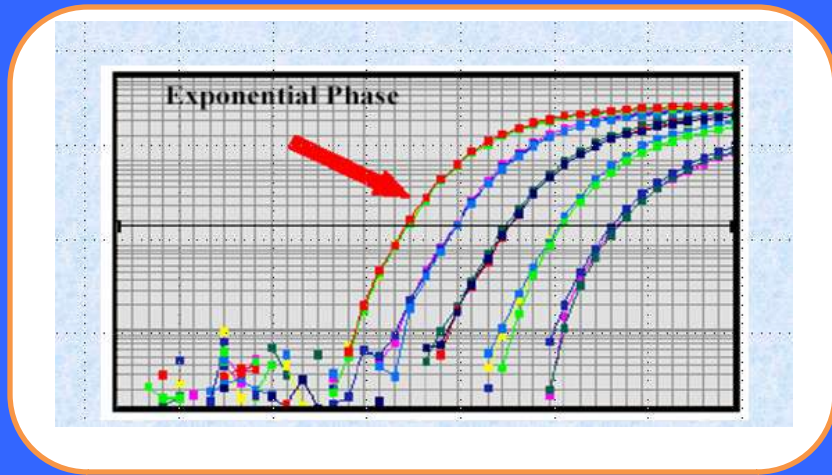


# Determinaciones mediante Therascreen

- EGFR: Determina 29 mutaciones, comprendidas en los exones,19, 20 y 21.
- KRAS: Determina 7 mutaciones comprendidas en el codon 12 y 13 de KRAS
- BRAF: Determina 1 mutación localizada en el codon 600 (V600E).
- PIK3CA: Determina 3 mutaciones en los exones 9 y 20 de PIK3CA
- Necesita de PCR a tiempo real
- El tiempo de determinación es de 3 Horas
- Necesidad de aprendizaje para la interpretación de los resultados



# Determinaciones mediante Therascreen

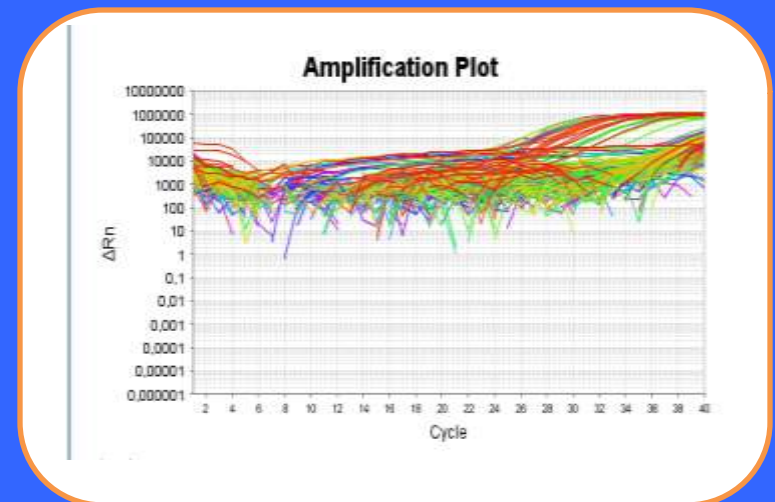


Ct = Ciclo de amplificación significativo

Muestra problema

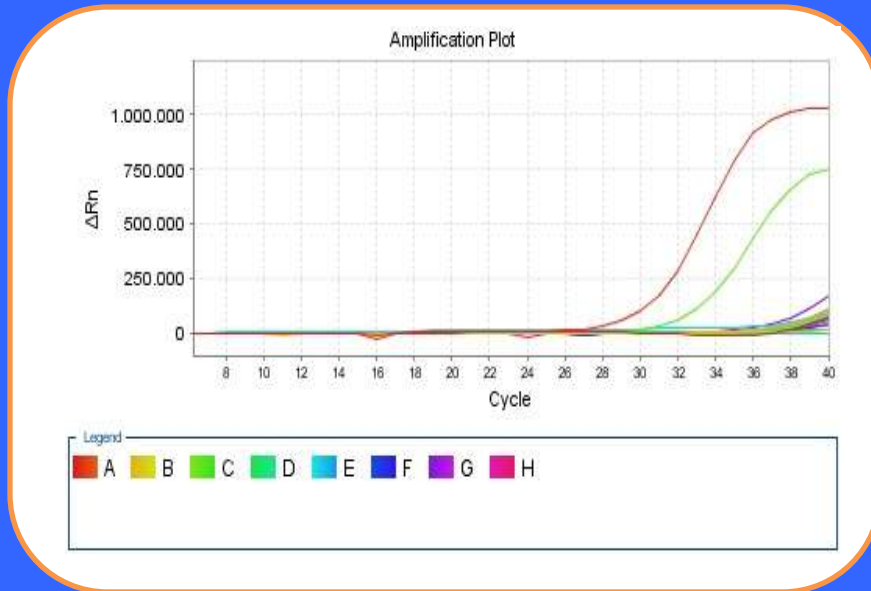
$$[ Ct \text{ mutado } ] - [ Ct \text{ Control } ] = \Delta Ct$$

$\Delta Ct$  debe ser  $< 1\% \Delta Ct$  Standard





# Determinaciones mediante Therascreen



$\Delta Ct$  debe ser  $< 1\%$   $\Delta Ct$  Standard

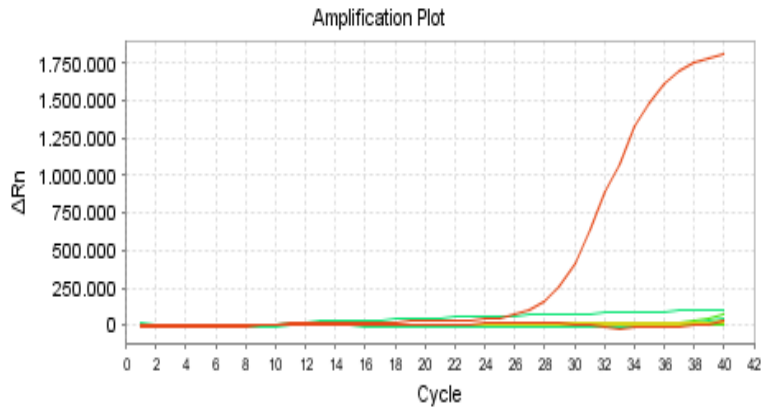
| Ensayos     | $\Delta Ct$ del estándar mezclado | $\Delta Ct$ de corte | Límite de selectividad teórico | Límite de detección (copias) | ng de ADN necesarios para detectar 1% |
|-------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| T790M       | 1                                 | 8                    | 0,78 %                         | 5                            | 1,5                                   |
| Deleciones  | 0                                 | 12                   | 0,02 %                         | 5                            | 1,5                                   |
| L858R       | 3,5                               | 12                   | 0,4 %                          | 5                            | 1,5                                   |
| L861Q       | 2,4                               | 12                   | 0,16 %                         | 5                            | 1,5                                   |
| G719X       | 3,2                               | 12                   | 0,16 %                         | 5                            | 1,5                                   |
| S768I       | 2                                 | 12                   | 0,16 %                         | 5                            | 1,5                                   |
| Inserciones | 1,5                               | 12                   | 0,16 %                         | 10                           | 3                                     |

Requisitos previos: Muestra con un 70% de células tumorales  
Ausencia de inhibidores de PCR (Control exógeno)

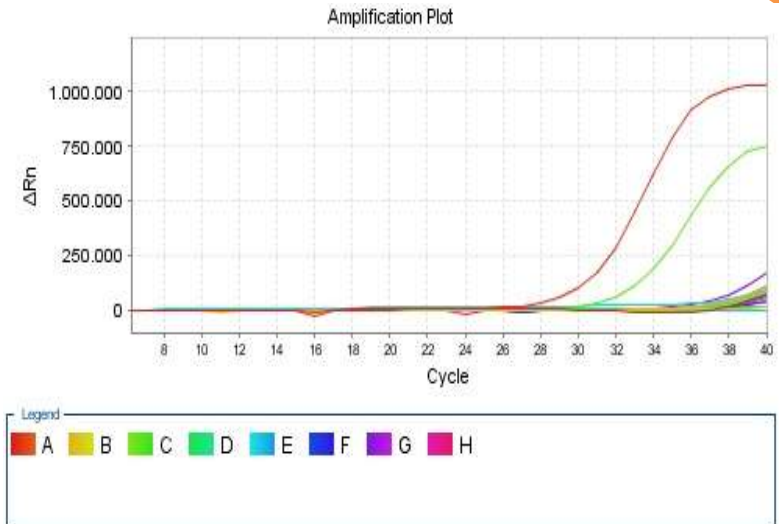
**Ct < 29 detecta 1% de ADN mutados**

**Ct > 29 detecta mutaciones >1%**

# Interpretación de resultados



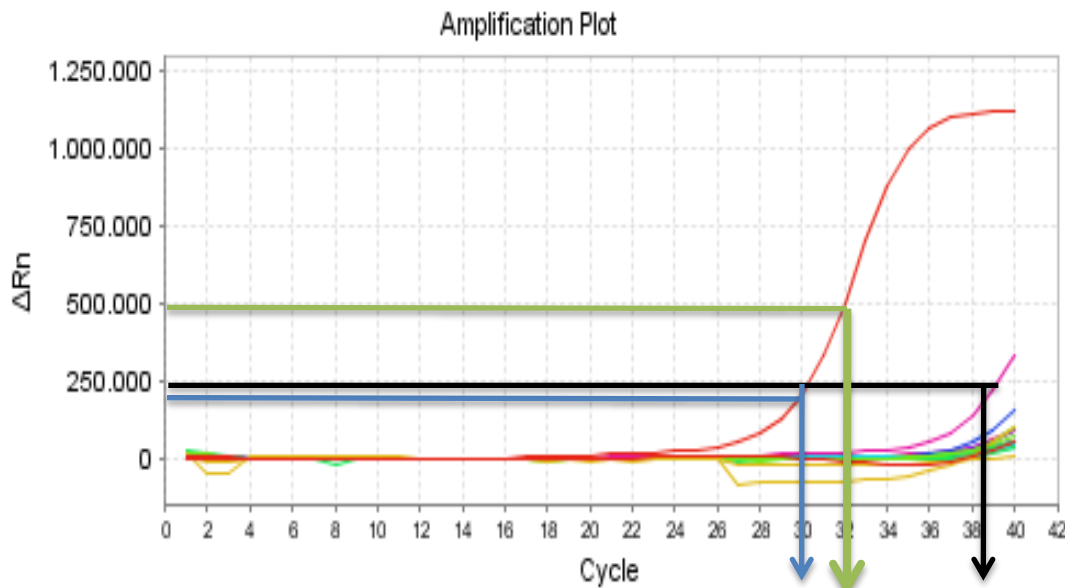
Muestra WT



Muestra L858R

**Sensibilidad de detección de 1% de copias mutadas.**

# Interpretación de resultados



Ct control 31-35 solo detecta mutaciones superiores al 1%

Ct mutación > 38 repetir

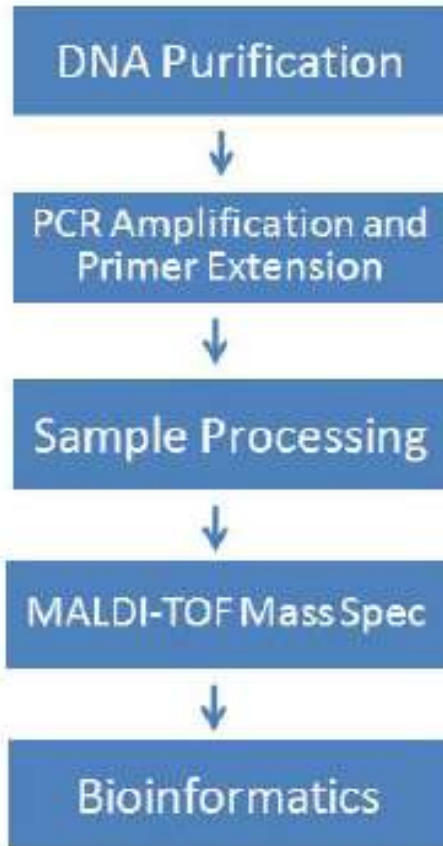
|   | A     | B                       | C           |
|---|-------|-------------------------|-------------|
| 1 | Assay | Mixed Standart Delta Ct | 1% Delta Ct |
| 2 | 12ALA | -0.1                    | 6.5         |
| 3 | 12ASP | -0.65                   | 8           |
| 4 | 12ARG | 0.45                    | 8           |
| 5 | 12CYS | -0.34                   | 7           |
| 6 | 12SER | 0.49                    | 9           |
| 7 | 12VAL | 0.44                    | 6.5         |
| 8 | 13ASP | -1.26                   | 9           |

Rango de Ct +/- 2 ciclos

# Resumen de Técnicas mas empleadas

| Técnicas   | Sensibilidad (porcentaje de ADN mutado) | Características  |
|--|---|--|
| Secuenciación directa  | 25                                      | Requiere mayor cantidad de ADN mutado para su detección  |
| Método de Sanger   |   | <u>Detecta cualquier mutación</u><br>Barato  |
| Pirosecuenciación  | 5-10                                    | <u>Requiere equipamiento especial (pirosecuenciador)</u><br>Kit comercial disponible   |
| PCR cuantitativa en tiempo real<br>TaqMan PCR                          | 10                                      | No hay kit comercial<br><u>Requiere termociclador de tiempo real</u><br><u>Sólo detecta mutaciones específicas</u>   |
| Scorpions ARMS   | 1                                       | Kit comercial disponible con las sondas<br>Requiere termociclador de tiempo real<br><u>Sólo detecta mutaciones específicas</u>                             |
| <b>Técnicas de enriquecimiento del alelo mutado</b>                    |   |  |
| PNA-LNA PCR clamp  | 1-0,1                                   | Se precisan sondas LNA para hacer clamp que no son comerciales<br>Requiere amplia experiencia en biología molecular<br>Sólo detecta mutaciones específicas |
| COLD-PCR ( <i>CO-amplification at Lower Denaturation temperature</i> ) | 1-0,1                                   | Requiere amplia experiencia en biología molecular<br>Se puede asociar con técnicas de secuenciación y pirosecuenciación                                    |
| PCR-RFLP (análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción)      | 5                                       | Sólo detecta mutaciones que generan lugar de restricción   |
| dHPLC ( <i>Denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i> )     | 1                                       | Requiere equipamiento especial<br>Precisa experiencia en HPLC<br>Detecta cualquier mutación  |
| HRM ( <i>High Resolution Melting</i> )                                 | 1                                       | Detecta cualquier mutación<br>Precisa equipamiento específico<br>Requiere experiencia en biología molecular  |

# Análisis de multitud de genes



## Oncogenes Included in the OncoCarta™ Panel:

|               |                                |
|---------------|--------------------------------|
| <i>ABL-1</i>  | <i>JAK-2</i>                   |
| <i>AKT-1</i>  | <i>KIT</i>                     |
| <i>AKT-2</i>  | <i>MET</i>                     |
| <i>BRAF</i>   | <i>H-RAS</i>                   |
| <i>CDK-4</i>  | <i>K-RAS</i>                   |
| <i>EGFR</i>   | <i>N-RAS</i>                   |
| <i>ERBB2</i>  | <i>PDGF<math>\alpha</math></i> |
| <i>FGFR-1</i> | <i>PIK3CA</i>                  |
| <i>FGFR-3</i> | <i>RET</i>                     |
| <i>FLT-3</i>  |                                |

# Esquema de la exposición

- 1. Introducción.
- 2. Metodologías empleadas.
- 3. Comparativa Sensibilidades
- 4. Elaboración de informes

# Determinación de sensibilidad

Necesario a la hora de usar la tecnología elegida.

Puede explicar discordancias en los diferentes estudios  
(ej: *mutaciones en colon 32-57%*).

Uso de líneas celulares con mutaciones ya conocidas  
para determinar el umbral de sensibilidad de cada técnica

Comparativa de 4 métodos en un mismo laboratorio:

- a) Secuenciación Sanger
- b) Strip Assay de Vienna Lab
- c) Therascreen
- d) PyroMax

# Determinación de sensibilidad

Figure 1: Dideoxy Sequencing

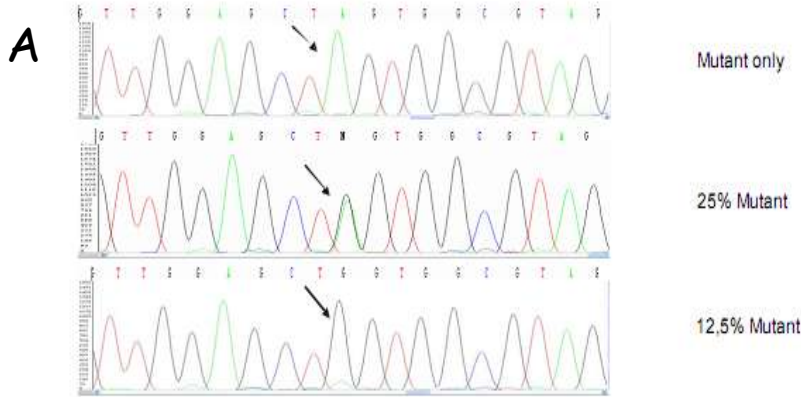


Figure 4: ViennaLab K-Ras StripAssay

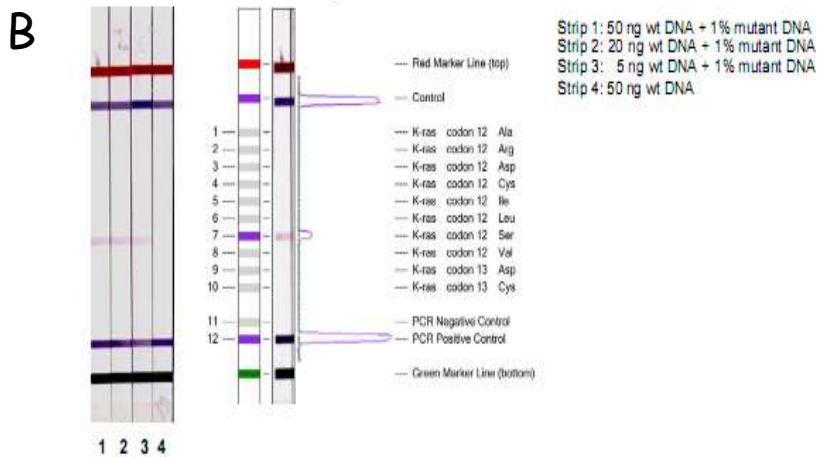


Figure 3: DxS K-RAS mutation test kit

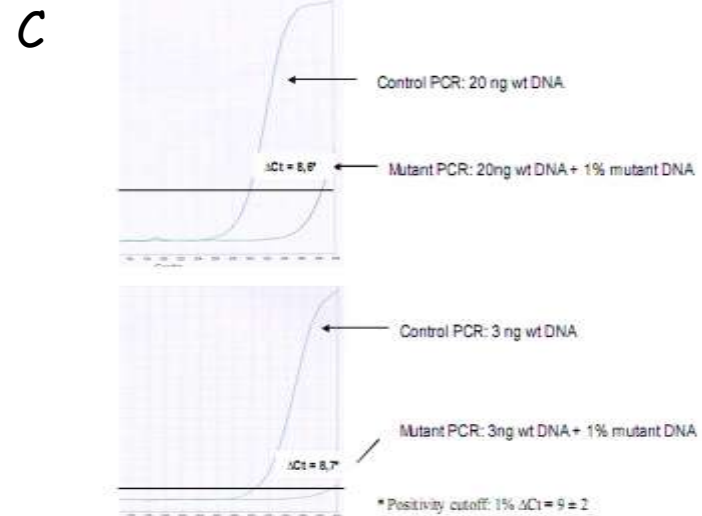
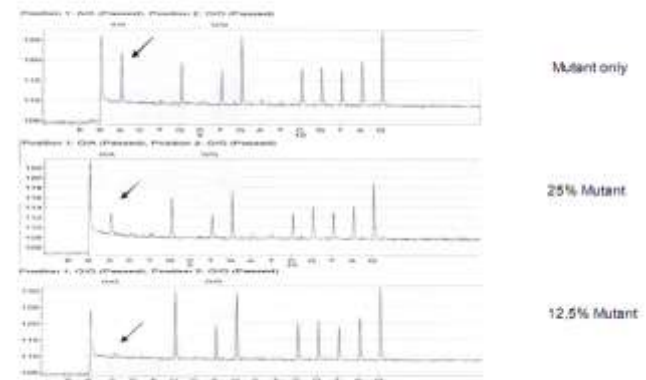


Figure 2: PyroMark KRAS v1.0 test





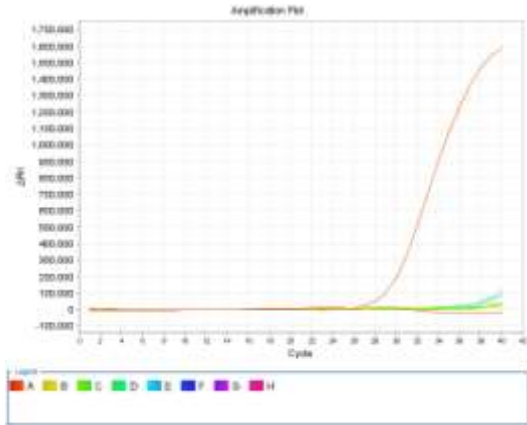
# Determinación de sensibilidad

## Resumen:

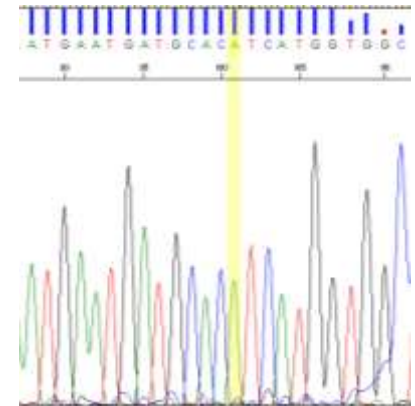
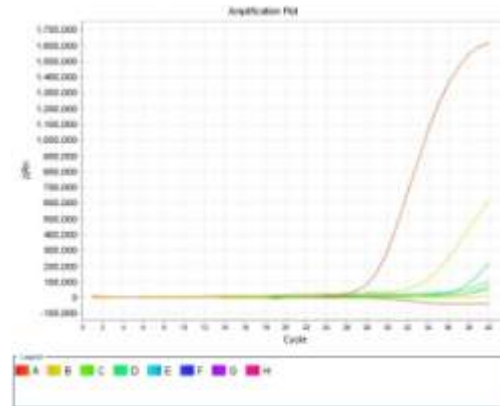
|                             | Mutante solo | (ADN mutante/ADN wild-type DNA) x 100 |       |     |    |    |
|-----------------------------|--------------|---------------------------------------|-------|-----|----|----|
|                             |              | 25%                                   | 12,5% | 10% | 5% | 1% |
| Dideoxy Sequencing          | Si           | Si                                    | No    | No  | No | No |
| PyroMark KRAS v1.0 test     | Si           | Si                                    | No    | No  | No | No |
| DxS K-RAS mutation test kit | Si           | Si                                    | Si    | Si  | Si | Si |
| ViennaLab K-Ras StripAssay  | Si           | Si                                    | Si    | Si  | Si | Si |

Los dos kits comerciales con CE poseen una alta sensibilidad

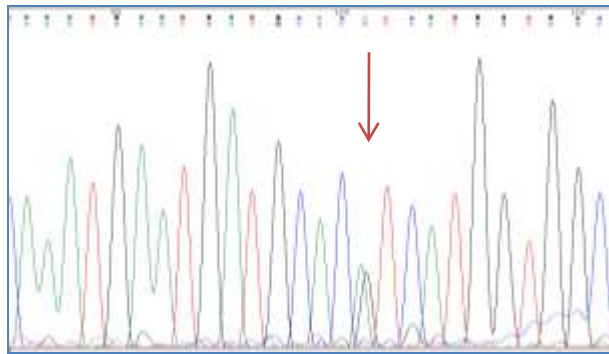
Wt



DNA-1



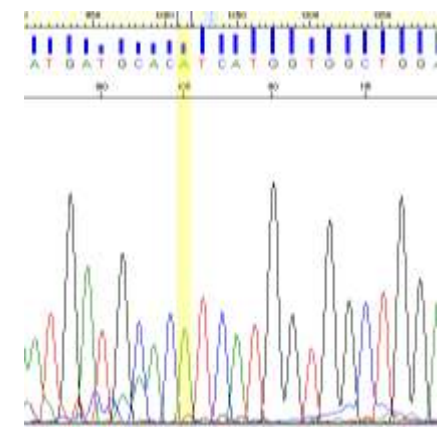
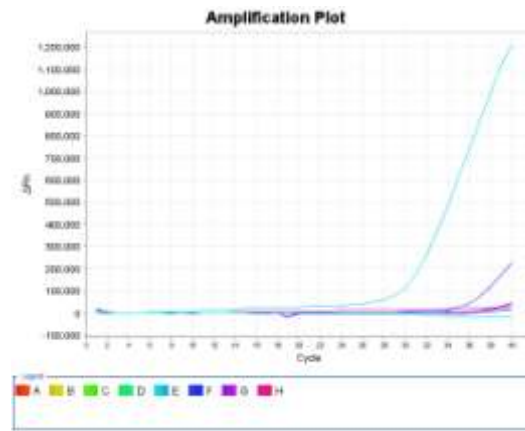
H1047R



H1047R

WT

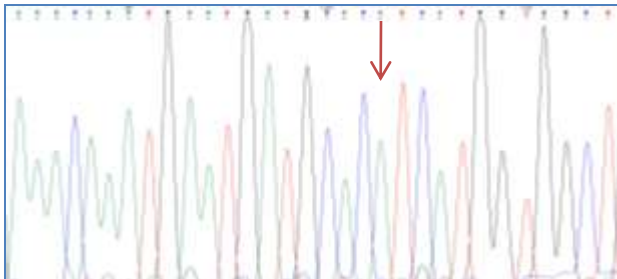
DNA-2



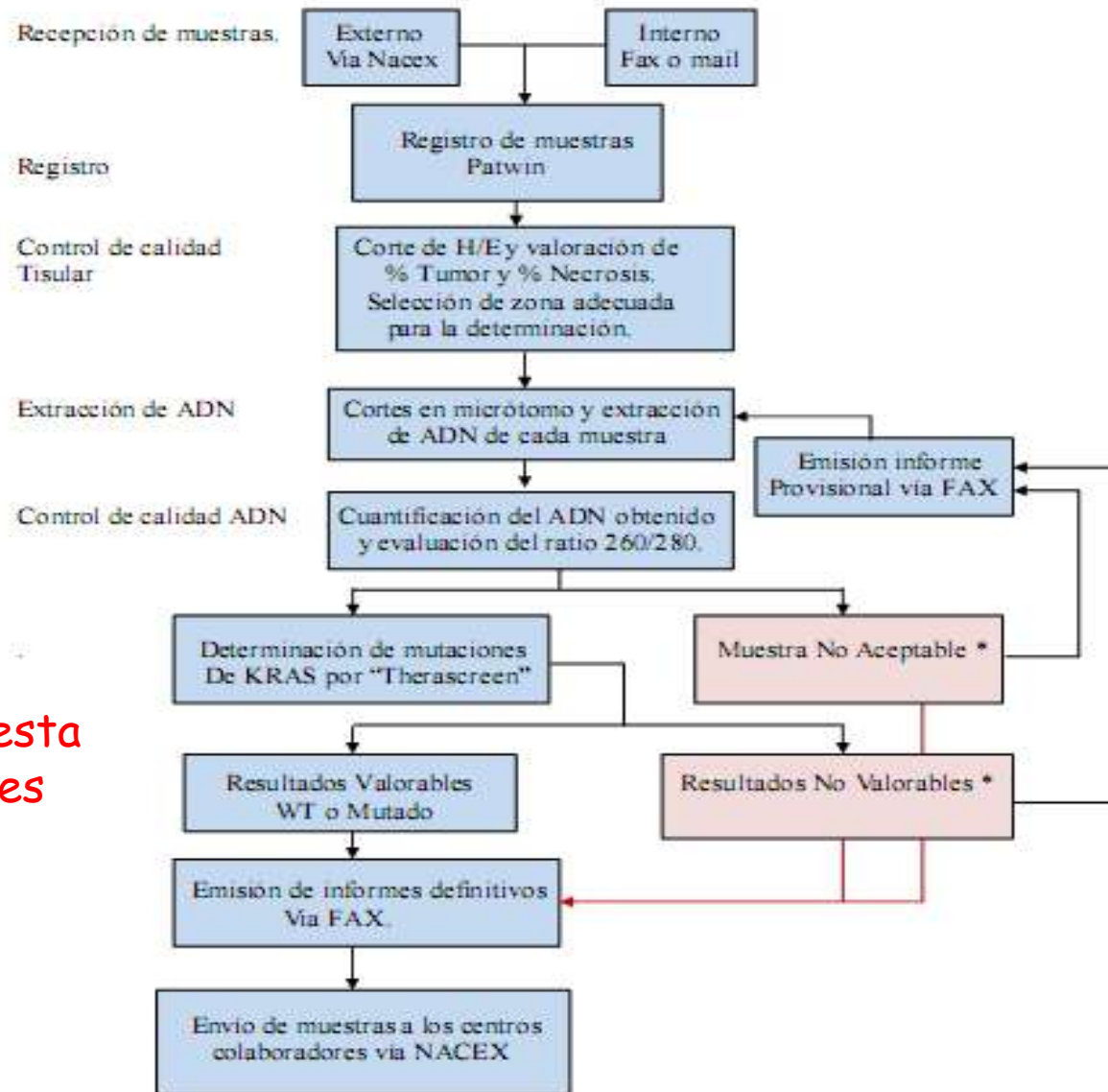
H1047R

WT

WT



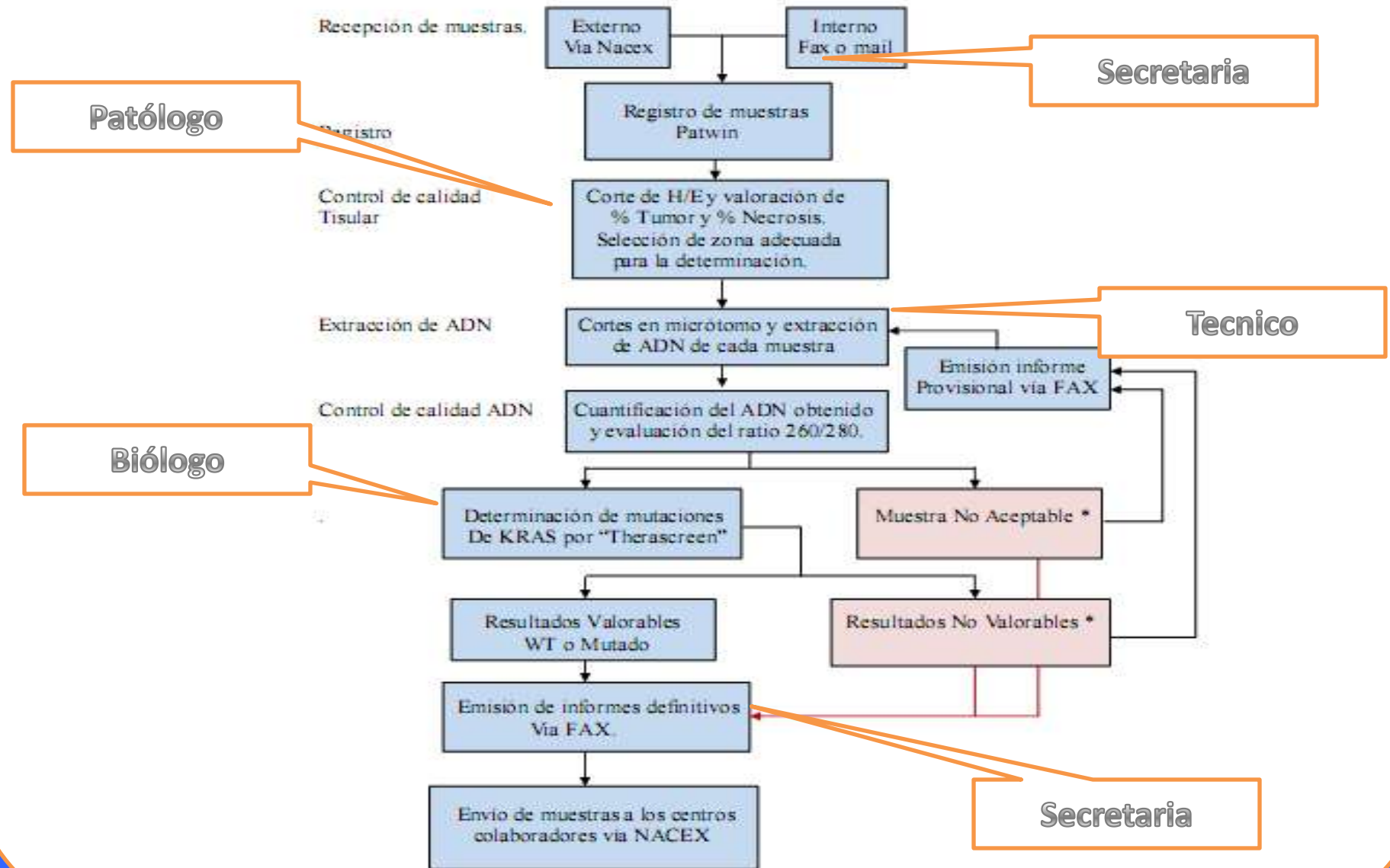
# Flujo de Trabajo



Tiempo de respuesta  
5-9 días hábiles

\*Cualquier repetición en estos procesos conllevara la emisión de un informe definitivo

# Equipo Multidisciplinario



\*Cualquier repetición en estos procesos conllevara la emisión de un informe definitivo

# Cosas a tener en cuenta

- Establecer los límites de sensibilidad de cada técnica (cada uno la que practique)
- Establecer programas de control de calidad y formación continuada de dichas determinaciones
  - Sociedades científicas; SEAP (2010), ESP (2010)
  - Otros consorcios EMQN, UK NEQAS,
  - Agencias reguladoras ENAC ( Certificado ISO; acreditaciones, etc....)

# Esquema de la exposición

- 1. Introducción.
- 2. Metodologías empleadas.
- 3. Comparativa Sensibilidades
- 4. Elaboración de informes

# Elaboración del informe de determinaciones de EGFR

Tabla 6 Informe de resultados de determinación de la mutación del *EGFR*

Identificación del paciente y médico solicitante (o persona autorizada en su defecto)

Diagnóstico anatomopatológico

Muestra que se remite (con fecha de toma de muestra a ser posible), con el debido informe anatomopatológico

Origen de la muestra (origen anatómico)

Fecha de solicitud, recepción de la muestra y emisión de resultados

Identificación de la técnica realizada para la determinación de las mutaciones EGFR

*Especificando mutaciones detectables*

Calidad de la muestra

*Porcentaje de células tumorales*

*Enriquecimiento de la muestra*

Microdissección

Macrodissección

Otros.

*Concentración ADN y pureza*

*Muestra adecuada o inadecuada (especificar en comentarios)*

Resultado

*No mutado/Mutado*

*Localización y tipo de mutación*

Identificación de la persona responsable de la determinación

Información o comentarios adicionales que sean interés para el médico peticionario

Acreditación o participación en programas de calidad

## 1) Anatomía Patológica:

- Dr. Ramón y Cajal.
- Dra. Montero.
- Dra. Tallada.
- Dra. Dinares
- Dra. Iglesias.
- Dra. Alberola.
- Dra. Landolfi.
- Dr. Castellvi
  
- Ana M<sup>a</sup> Solsona
- Loli Saez
- Rosa Somoza
- Roso Mares
- Laura Fernández
- Teresa Moliné
- Cristina Ortiz

## 2) Oncología Medica:

- Dr. Tabernero
- Dra. Felip
- Dra. Cedrés
- Dr. Martínez

## 3) Servicios comunes

- Dra. Carreño
- Teresa Otero



# Agradecimientos



Vall d'Hebron  
Hospital



**Muchas gracias por la atención**

