



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Identificación de biomarcadores tempranos de progresión tumoral en un  
modelo *in vivo* de cáncer de colon”**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Q.F.B. Héctor Martínez Gregorio**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Felipe Vaca Paniagua**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

**COMITÉ TUTOR: Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM  
**Dr. Abraham Landa Piedra**  
Facultad de Medicina, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

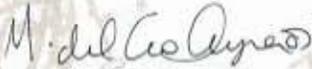
Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de noviembre de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MARTÍNEZ GREGORIO HÉCTOR**, con número de cuenta 515015342, con la tesis titulada "Identificación de biomarcadores tempranos de progresión tumoral en un modelo *in vivo* de cáncer de colon", realizada bajo la dirección del **DR. FELIPE VACA PANIAGUA**:

Presidenta: DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ  
Vocal: DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR  
Secretario: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
Suplente: DRA. SONIA ANDREA LEÓN CABRERA  
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de enero de 2017.

  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica recibida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología al otorgarme la beca para cursar mis estudios de maestría (CVU:630737).

Al Dr. Felipe Vaca Paniagua, por la dirección del presente trabajo.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés y el Dr. Abraham Landa Piedra, por la asesoría brindada durante el transcurso de mis estudios de maestría.

## **Agradecimiento a título personal**

A la UNAM, por abrirme las puertas al conocimiento y permitirme formar en la máxima casa de estudios de los mexicanos.

Al Dr. Felipe Vaca Paniagua, por aceptarme en su equipo de trabajo y guiarme en la realización de este proyecto.

A la Dra. Clara Estela Díaz Velásquez, por su amistad y enseñanza durante mi estancia en el posgrado.

A la Dra. Yesennia Sánchez Pérez, Dra. Claudia María García Cuellar, Dr. Luis Ignacio Terrazas Váldez, Dra. Sonia Andrea León Cabrera y Dra. Marcela Lizano Soberón, por su revisión, corrección y crítica a la tesis.

A mis compañeros de laboratorio Zamira, Erendira, Marco, Steph, Marco Mancera, Toño, Sandy, Rossy, David, Karla, Maciel, Fernanda y Ernesto, por su amistad y consejos que fueron importantes en mi estancia en el laboratorio.

A mis padres Héctor y Catalina que siempre han confiado en mi y me han apoyado en cada etapa de mi vida y por su amor incondicional.

A mis hermanos Rocio Celeste y Helmer Dominitilo, por su cariño y consejos.

A Carolina, por su compañía y cariño.

## **Dedicatoria**

A mis padres Héctor y Catalina, por ser el pilar fundamental en mi vida y en mi formación académica, por su amor y apoyo incondicional en todo momento.

# Índice

<b>Índice de figuras</b> .....	VIII
<b>Índice de tablas</b> .....	IX
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	X
<b>Resumen</b> .....	XII
<b>Abstract</b> .....	XIII
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1    Cáncer colorrectal .....	1
1.2    Alteraciones moleculares del CCR.....	2
1.3    Epidemiología .....	6
1.4    Factores de riesgo en el desarrollo de CCR.....	7
1.5    Diagnóstico del CCR .....	8
1.6    DNA circulante libre .....	10
1.7    Modelo murino de CCR.....	13
<b>2. Objetivos</b> .....	16
2.1    Objetivo general .....	16
2.2    Objetivos particulares .....	16
<b>3. Antecedentes</b> .....	17
<b>4. Metodología</b> .....	19
4.1    Inducción de CCR .....	19
4.2    Toma de muestra de sangre .....	20
4.3    Seguimiento del tumor por microPET/CT.....	20
4.4    Extracción y cuantificación de DNA tumoral y cfDNA .....	21
4.5    Diseño de oligonucleótidos.....	21
4.6    PCR de punto final .....	22
4.7    E-ice-COLD-PCR .....	23
4.8    Secuenciación tipo Sanger .....	25
4.9    Secuenciación Masiva.....	26
4.10   Análisis estadístico.....	27

<b>5. Resultados</b> .....	28
5.1 Signos clínicos en el modelo de AOM/DSS.....	28
5.2 Desarrollo de tumores con AOM/DSS .....	28
5.3 Detección de tumores con microPET/CT .....	29
5.4 Concentración de cfDNA.....	31
5.5 Análisis de mutaciones en DNA tumoral por PCR de punto final y por secuenciación tipo Sanger.....	31
5.6 Análisis de mutaciones de DNA tumoral por PCR de punto final y por secuenciación masiva. ....	33
5.7 E-ice-COLD-PCR .....	34
5.7.1 Determinación de la Tc .....	34
5.7.2 Detección de mutaciones de DNA tumoral mediante E-ice-COLD-PCR y por secuenciación masiva.....	35
5.7.3 Detección de mutaciones de cfDNA mediante PCR de punto final, E-ice- COLD-PCR y secuenciación masiva .....	36
<b>6. Discusión</b> .....	39
<b>7. Conclusiones</b> .....	46
<b>8. Anexos</b> .....	47
Anexo 1. Análisis de mutaciones en <i>CTNNB1</i> y <i>KRAS</i> en muestras de tumor por PCR de punto final y secuenciación tipo Sanger .....	47
Anexo 2. Análisis de mutaciones en <i>CTNNB1</i> y <i>KRAS</i> en muestras de tumor por PCR de punto final, E-ice-COLD-PCR y secuenciación masiva .....	48
Anexo 3. Análisis de mutaciones en <i>CTNNB1</i> y <i>KRAS</i> en muestras de cfDNA por PCR de punto final, E-ice-COLD-PCR y secuenciación masiva .....	49
<b>9. Referencias</b> .....	51

## Índice de figuras

Figura 1. Vía de señalización Wnt.....	3
Figura 2. Modelo de carcinogénesis de CCR .....	5
Figura 3. Incidencia y mortalidad de cáncer .....	6
Figura 4. Mecanismos de liberación y utilización de ctDNA en la clínica como biopsia líquida .....	12
Figura 5. Activación metabólica del azoximetano .....	14
Figura 6. Comparación de CCR en humanos y en modelo de AOM/DSS. ....	15
Figura 7. Modelo de estudio para el CCR .....	19
Figura 8. Flujo general para el enriquecimiento de mutaciones por E-ice-COLD- PCR.....	23
Figura 9. Secuenciación masiva por illumina.....	26
Figura 10. Peso de los ratones durante el proceso carcinogénico con AOM/DSS. .....	28
Figura 11. Desarrollo de tumores en el modelo AOM/DSS .....	29
Figura 12. Detección de tumores con microPET/CT .....	30
Figura 13. Concentración plasmática del cfDNA durante el tratamiento .....	31
Figura 14. Determinación de la Tc para CTNNB1 y KRAS.....	34
Figura 15. Enriquecimiento de alelos mutantes en CTNNB1 y KRAS con E-ice- COLD-PCR.....	35
Figura 16. Frecuencia alélica mutante durante la progresión del tumor .....	38

## Índice de tablas

Tabla 1. Estadaje de CCR en base al sistema TNM (American Joint Committee on Cancer, AJCC) .....	1
Tabla 2. Métodos de detección para el CCR .....	9
Tabla 3. Primers para la amplificación de CTNNB1 y KRAS .....	21
Tabla 4. Sonda bloqueadora para E-ice-COLD-PCR .....	22
Tabla 5. Componentes de la reacción para PCR de punto final .....	22
Tabla 6. Componentes de la reacción para la determinación de la Tc por HRM ..	24
Tabla 7. Componentes de la reacción para E-ice-COLD-PCR .....	25
Tabla 8. Análisis de mutaciones en CTNNB1 y KRAS en muestras de tumor por PCR de punto final y secuenciación tipo Sanger .....	32
Tabla 9. Análisis de mutaciones en CTNNB1 y KRAS en muestras de tumor por PCR de punto final y secuenciación tipo Sanger y masiva .....	33
Tabla 10. Análisis de mutaciones en CTNNB1 y KRAS en cfDNA por PCR de punto final, E-ice-COLD-PCR y secuenciación masiva. ....	37

## Lista de abreviaturas

AOM	azoximetano
APC	del inglés Adenomatous Poliposis Coli
CCR	cáncer colorrectal
CCT	células circulantes tumorales
cfDNA	del inglés cell-free DNA
cfRNA	del inglés cell-free RNA
CK1	del inglés Casein Kinase 1
Cm	centímetro
COX-2	ciclooxigenasa-2
CT	del inglés computed tomography
CTC	colonografía por tomografía tomputarizada
ctDNA	del inglés circulating tumor DNA
CTNNB1	del inglés Catenin Beta 1
CYP2E1	del inglés Cytochrome P450 2E1
DNA	del inglés deoxyribonucleic acid
dsDNA	del inglés double stranded DNA
DSS	dextrán sulfato de sodio
EDTA	del inglés ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	del inglés Epidermal Growth Factor Receptor
E-ice-COLD-PCR	del inglés Enhanced-Improved and Complete Enrichment CO-amplification at Lower Denaturation temperature- Polymerase Chain Reaction
FA	frecuencia alélica
FCA	focos de criptas aberrantes
FDG	2-[ <sup>18</sup> F]-fluoro-2-deoxi-D-glucosa
FIT	del inglés fecal immunochemical test
GDP	guanosina difosfato
gFOBT	del inglés guaiac-based fecal occult blood test
GLOBOCAN	del inglés Global Cancer Observatory
GSK-3 $\beta$	del inglés Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
GTP	guanosina trifosfato
HNPCC	del inglés hereditary nonpolyposis colorectal cáncer
HRMA	del inglés high resolution melting analysis
iNOS	del inglés inducible nitric oxide synthase
i.v.	Intravenosa
kDa	Kilodalton
KRAS	del inglés kirsten rat sarcoma viral
MAM	Metilazoximetanol

MAM-GlcUA	metilazoximetanol-β-D-glucopiranosidurónico
MAPK	del inglés mitogen-activated protein kinase
microPET/CT	del inglés micro positron emission tomography / computed tomography
MLH2	del inglés MutL homolog 1
MSH2	del inglés Mismatch repair protein 2
MSH6	del inglés Mismatch repair protein 6
Ng	Nanogramo
Nm	Nmolar
N <sup>7</sup> -Mg	N-7-metilguanina
O <sup>6</sup> -Mg	O-6-metilguanina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	del inglés polymerase chain reaction
PET	del inglés positron emission tomography
PMS2	del inglés Postmeiotic Segregation Increased 2
qPCR	del inglés quantitative polymerase chain reaction
SB	sonda bloqueadora
ssDNA	del inglés single stranded DNA
T <sub>c</sub>	temperatura crítica
T <sub>cf</sub>	del inglés T-cell factor
TLG	del inglés total lesion glycolysis
T <sub>m</sub>	del inglés melting temperature
TP53	del inglés tumor protein p53
%	por ciento
°C	grado centigrade
μCi	Microcurie
μL	Microlitro
ΔT <sub>m</sub>	del inglés melting temperature difference

## Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las cinco primeras neoplasias con mayor tasa de incidencia y mortalidad a nivel mundial. La detección temprana de esta neoplasia a través del análisis del DNA circulante libre (cfDNA) portador de alteraciones genéticas tumorales, a manera de biopsia líquida, podría tener un impacto importante en la disminución de la tasa de mortalidad, además de que haría posible la detección de biomarcadores genéticos tumorales de progresión y predictivos para el tratamiento dirigido. En este estudio se estableció un modelo murino de carcinogénesis inducida con azoximetano y sulfato de sodio dextran para evaluar la detección de mutaciones somáticas oncogénicas conductoras en *CTNNB1* y *KRAS* durante la progresión del tumor, usando cfDNA como biopsia líquida. Para aumentar la sensibilidad en la detección de dichos biomarcadores, se usó una variante de PCR conocida como E-ice-COLD-PCR para enriquecer de manera selectiva a los alelos mutantes de estos dos genes, seguida de secuenciación masiva en paralelo. En el cfDNA analizado en el plasma se detectaron mutaciones somáticas en *CTNNB1* y *KRAS* en etapas iniciales del desarrollo tumoral, que corresponden a la formación de focos de criptas aberrantes, las primeras lesiones histológicas identificables en la formación de CCR. Al comparar la eficacia de metodologías no invasivas en la detección temprana de los tumores, se obtuvo que la estrategia de biopsia líquida mencionada supera y complementa la detección realizada con la técnica de imagenología microPET/CT. En conclusión, en este estudio se demostró el gran potencial que presenta el E-ice-COLD-PCR para la detección de alelos patogénicos en cfDNA y para su utilización como una prueba de detección temprana no invasiva de CCR.

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the top five cancers, with higher incidence and mortality worldwide. The early detection of this neoplasm through analysis of circulating free DNA (cfDNA), which carries tumor genetic alterations, as a liquid biopsy, could have a major impact in reducing the mortality rate and enhancing early detection. Furthermore, this strategy enables the detection of tumor genetic biomarkers of progression and prediction for targeted therapy. In this study a murine model of carcinogenesis induced was established with azoxymethane and dextran sodium sulfate, to evaluate the oncogenic somatic mutations detection in *CTNNB1* and *KRAS* during tumor progression using cfDNA as liquid biopsy. To enhance the sensitivity in the detection of such biomarkers, a variant of PCR known as E-ice-COLD-PCR was used for enriching selectively the mutant, tumor alleles, followed by massively parallel sequencing. In the cfDNA analyzed in plasma the somatic mutations were detected in *CTNNB1* and *KRAS* in early stages of tumor development, corresponding to the formation of aberrant crypt focus, the first histological lesions that can be identified throughout the formation of colorectal cancer. The comparison of non-invasive methodologies resulted in a superior early detection for the liquid biopsy strategy used here, in comparison with the imaging technique microPET/CT. In this study it was demonstrated the great potential of E-ice-COLD-PCR for the detection of pathogenic alleles present in cfDNA samples, as a test for early non-invasive detection of CRC.

# 1. Introducción

## 1.1 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es un proceso de múltiples pasos que resulta de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, en oncogenes y genes supresores de tumores, así como en regiones reguladoras de la expresión génica, provocando la desregulación de la homeostasis celular y llevando a la transformación de las células del epitelio normal a adenocarcinoma colorrectal, el cual progresa a través de cambios histológicos y moleculares paralelos y definidos (Grady and Markowitz, 2002).

Las primeras lesiones identificables histológicamente en la formación de CCR son los focos de criptas aberrantes (FCA), los cuales progresan a adenoma y posteriormente a adenocarcinoma (Fearon, 2011). Con base en estos daños histológicos, el CCR se ha clasificado en estadios, mediante el sistema TNM, donde T describe la profundidad de la invasión del tumor en las diferentes capas del colon y recto, N indica si el tumor se ha propagado a los ganglios linfáticos y M si el tumor ha invadido otros órganos, Tabla 1 (Edge and Compton, 2010).

Tabla 1. Estadaje de CCR en base al sistema TNM (American Joint Committee on Cancer, AJCC)		
Tumor primario (T)	Región de ganglios linfáticos (N)	Metástasis distante (M)
N0: ninguna evidencia de tumor primario	N0: ninguna evidencia de metástasis en ganglios linfáticos	N0: ninguna metástasis
Tis: carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial o invasión a mucosa	N1: metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales	M1: metástasis distante
T1: tumor invade submucosa	N1a: metástasis en 1 ganglio linfático regional	M1a: metástasis confinado a un órgano o sitio
T2: Tumor invade muscular propia	N1b: metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales	M1b: metástasis en más de un órgano/sitio o en el peritoneo
T3: Tumor invade a través de la muscular propia en los tejidos pericólicas	N1c: depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o tejido perirectal o pericólico sin metástasis en ganglios regionales	
T4a: Tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral	N2: metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales	
T4b: tumor invade directamente o es adherente a otros órganos o estructuras	N2a: metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales	
	N2b: metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales	

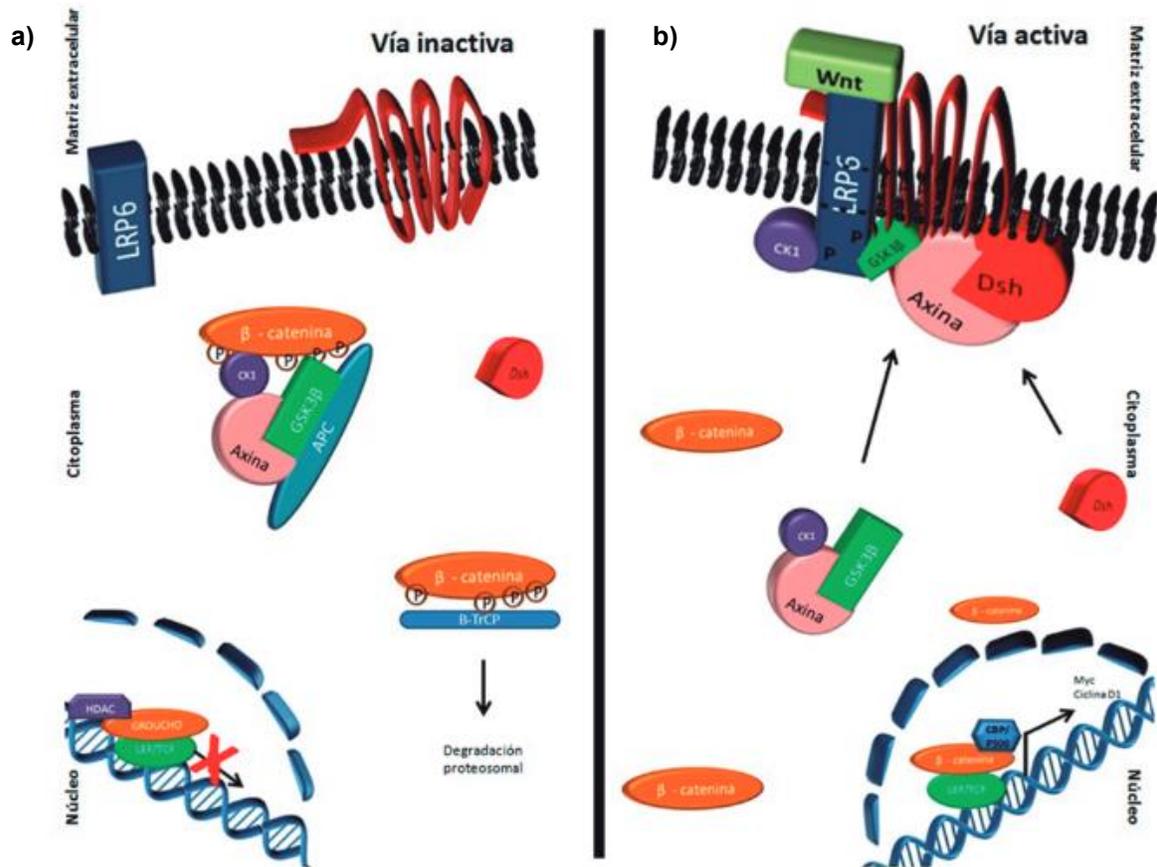
Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2 T1	N1 N2a	M0
IIIB	T3-T4a T2-T3 T1-t2	N1 N2a N2b	M0
IIIC	T4a T3-T4a T4b	N2a N2b N1-N2	M0
IVA	Algún T	Algún N	M1a
IVB	Algún T	Algún N	M2a

## 1.2 Alteraciones moleculares del CCR

Las primeras alteraciones identificadas en la formación de CCR son las mutaciones a lo largo de toda la región codificante del gen supresor de tumores *poliposis adenoatosa coli (APC)* con una frecuencia del 80%. Las mutaciones generadas en *APC* producen su terminación prematura a nivel de proteína (Network, 2012; Powell et al., 1992). Seguida de la mutación en *APC* ocurre la pérdida de la heterocigocidad en las células tumorales, la cual conduce a la inactivación funcional de ambos alelos. El producto de este gen tiene múltiples dominios funcionales que regulan la adhesión celular, migración celular, segregación cromosomal y apoptosis en las criptas del colon a través de la vía de señalización Wnt (Fearon, 2011). Todos estos procesos están alterados en el CCR.

Una función importante de *APC* es la capacidad de regular los niveles intracelulares de  $\beta$ -catenina (CTNNB1). En ausencia del ligando Wnt, *APC* interactúa con el andamiaje de la proteína Axina para promover la fosforilación secuencial por caseína cinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) de  $\beta$ -catenina para su ubiquitinación y su degradación proteosomal (Fearon, 2011; Mantilla et al., 2015). La deficiencia de *APC* interrumpe la fosforilación coordinada y la destrucción de  $\beta$ -catenina, este proceso esencialmente simula la activación

constitutiva de la señalización mediada por el ligando Wnt. Como resultado,  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde dirige la transcripción de múltiples genes implicados en el crecimiento tumoral e invasión celular, a través de su interacción con el factor celular T (Tcf) (Fearon, 2011; Pino and Chung, 2010), Figura 1.



**Figura 1. Vía de señalización Wnt.** a) En ausencia del ligando Wnt, APC junto con Axina, CK1 y GSK-3 $\beta$  forman el complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina para su ubiquitinación y degradación en el proteosoma, impidiendo de esta manera su acumulación citoplasmática y translocación al núcleo. b) La vía Wnt se activa tras la unión del ligando Wnt a Fz y LRP5/6 causando la fosforilación de CK1 y GSK3 $\beta$ , de esta manera se genera un sitio de unión para Axina y el reclutamiento a la membrana celular las proteínas del complejo de destrucción, de esta manera  $\beta$ -catenina se acumula en citoplasma para luego ser translocado al núcleo, donde actúa como factor de transcripción de genes de proliferación celular y diferenciación celular (tomado de Mantilla et al., 2015).

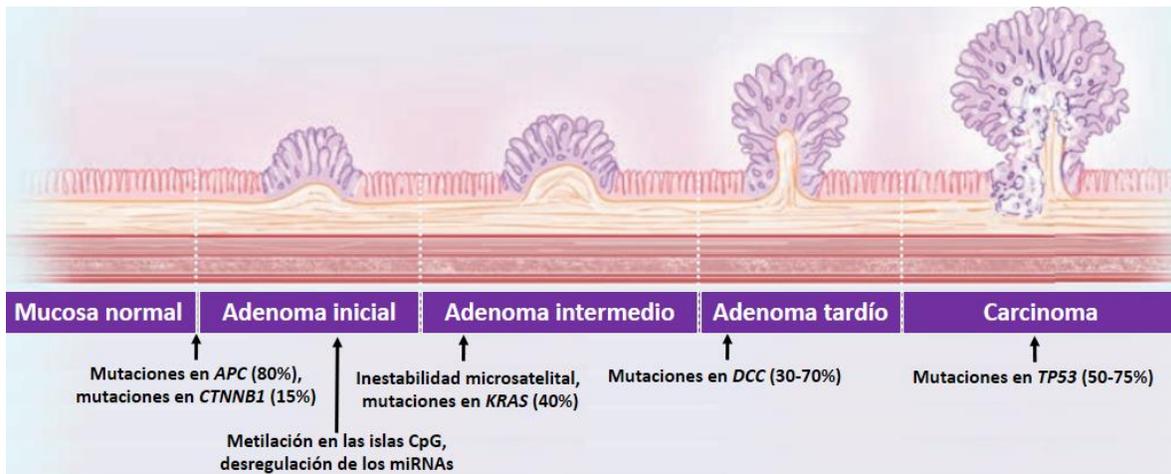
En ausencia de mutaciones en *APC* en CCR, *CTNNB1* sufre mutaciones con una frecuencia del 15%, en los codones 32, 41 y 45 que codifican para la región consenso de la fosforilación por GSK-3 $\beta$ , impidiéndose la regulación de los niveles intracelulares de *CTNNB1* en el citoplasma (Grady and Markowitz, 2002).

Después de la mutación en *APC* o *CTNNB1*, ocurren otras mutaciones que promueven la progresión clonal de FCA a adenomas. La segunda alteración genética más común ocurre en *sarcoma viral de rata de Kirsten (KRAS)*, gen que codifica para una proteína del mismo nombre, que funciona como un interruptor molecular corriente abajo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual participa en la vía de transducción de señales de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (Leslie et al., 2002). En su estado inactivo KRAS se une a la guanosina difosfato (GDP). Una vez activado se hace el recambio con guanosina trifosfato (GTP) para interactuar con moléculas de señalización corriente abajo que promueven la proliferación celular. El GTP es desactivado inmediatamente por la actividad intrínseca de la misma GTPasa de KRAS. Las mutaciones somáticas en *KRAS* son encontradas aproximadamente en 40% de los pacientes con CCR; la mayoría de las mutaciones en *KRAS* afecta principalmente los codones 12 y 13, estas mutaciones alteran el dominios esenciales para unión de GTP, lo cual decrece su actividad GTPasa, resultando en una activación constitutiva de la proteína (Fearon, 2011; Leslie et al., 2002; Pino and Chung, 2010).

Las mutaciones en *KRAS* contribuyen al desarrollo de adenomas colorrectales, pero no son ciertamente necesarias para la iniciación de adenomas. Estas mutaciones, también son frecuentemente observadas en FCA y pólipos adenomatosos. La frecuencia de mutaciones en *KRAS* claramente depende del tamaño y el grado de displasia. Sólo un 10% de adenomas menores a 1 cm muestran mutaciones en *KRAS*, mientras que mutaciones en este gen son observadas aproximadamente en 40 a 50% en los adenomas más grandes de 1 cm (Vogelstein et al., 1988).

El gen *proteína de tumor 53 (TP53)* es un regulador maestro que controla la transcripción de cientos de genes involucrados en el metabolismo y reparación del DNA, la apoptosis, la regulación del ciclo celular, la senescencia, la respuesta inmune, la diferenciación celular, la motilidad y la migración (Pino and Chung, 2010). La disfunción de *TP53* es casi un fenómeno universal de los tumores

humanos y su pérdida de función ha sido reportada en 50-75% de los pacientes de CCR, definiendo su papel en la transición de adenoma a carcinoma (Leslie et al., 2002). La mayoría de las mutaciones de *TP53* en CCR son cambios sin sentido que ocurren principalmente en 5 codones 175, 245, 248, 273 y 282 (Baker et al., 1990). En la Figura 2, se muestra el modelo clásico de CCR y cómo las diferentes mutaciones en los oncogenes y genes supresores de tumores contribuyen en los diferentes estadios de esta neoplasia.



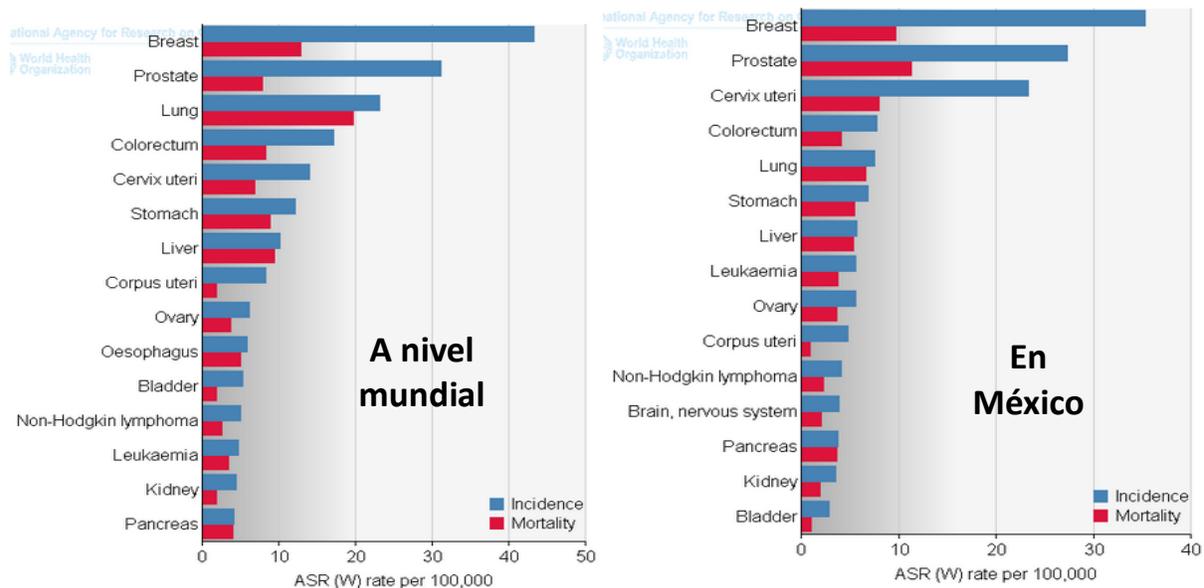
**Figura 2. Modelo de carcinogénesis de CCR.** El CCR inicia con una mutación en *APC* o *CTNNB1* con frecuencias diferentes, seguida de una serie de alteraciones epigenéticas y mutaciones en los diferentes oncogenes y genes supresores de tumores que contribuyen en los diferentes estadios de la progresión tumoral hasta la formación del carcinoma *in situ* (tomado y modificado de Beaugerie and Itzkowitz, 2015).

Además de las mutaciones descritas en el modelo clásico de CCR como son *APC*, *CTNNB1*, *KRAS* y *TP53*, se han detectado otras implicadas en la formación de CCR como alteraciones en *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase), *SMAD4* (del inglés, SMAD family member 4), *TGFBR2* (del inglés, transforming growth factor- $\beta$  2), *PIK3CA* (del inglés, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit- $\alpha$ ), *ARID1A* (del inglés, AT-rich interactive domain 1A), *SRY* (del inglés, sex-determining región Y), *FAM123B* (del inglés, family with sequence similarity 123B) y *ERBB2* (del inglés, erb-b2 receptor tyrosine kinase 2), así como alteraciones en otras vías de señalización PI3K (del inglés, phosphatidylinositol-3-kinase) y TGF $\beta$  (del inglés, transforming growth factor- $\beta$ ) (Network, 2012). En conjunto, todas estas alteraciones genéticas hacen del CCR una enfermedad con una alta heterogeneidad molecular.

### 1.3 Epidemiología

El CCR es una de las neoplasias con mayor frecuencia en la población mundial y mexicana. El último reporte realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2012, describe que el CCR a nivel mundial fue la segunda y la tercera neoplasia más común en mujeres y hombres, respectivamente (Figura 3). Esto significa en cifras que 614,304 mujeres (9.2% de todos los casos de cáncer) y 746,298 hombres (10% de todos los casos de cáncer) fueron diagnosticados con CCR en todo el mundo en el 2012 (Ferlay et al., 2015).

En México, se estima que 3,995 mujeres (4.8 % de todos los casos de cáncer) y 4656 hombres (7.1% de todos los casos de cáncer) fueron diagnosticados con CCR, siendo en ambos casos el tercer cáncer más común en la población mexicana (Ferlay et al., 2015). En 2013, 771,000 personas murieron a causa del CCR, haciendo esta enfermedad la cuarta causa más común de muerte relacionada a cáncer en todo el mundo después de pulmón, hígado y estómago (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015).



**Figura 3. Incidencia y mortalidad de cáncer.** El CCR es una de las neoplasias con mayor tasa de incidencia y mortalidad a nivel mundial y en México ubicándose dentro de las cinco neoplasias más comunes (tomado de GLOBOCAN).

## 1.4 Factores de riesgo en el desarrollo de CCR

El CCR es una enfermedad heterogénea y compleja, asociada a diferentes factores ambientales y genéticos. Se ha encontrado que el consumo de tabaco y alcohol, así como la ingesta diaria de carnes rojas y alimentos procesados, son los principales factores de riesgo para desarrollar CCR (Fedirko et al., 2011; Kuipers et al., 2015; Song et al., 2015). En contraste, el consumo de leche, granos totales, frutas frescas y vegetales, al igual que la ingesta de calcio, fibras y vitamina D, decrecen el riesgo (Song et al., 2015).

La enfermedad inflamatoria intestinal como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn induce el desarrollo de CCR, a través de mecanismos moleculares que implican distintos tipos de estrés oxidativo, los cuales causan daño al DNA, activan oncogenes y silencian o inactivan genes supresores de tumores (Beaugerie and Itzkowitz, 2015).

El 15% de los casos de CCR tienen componentes genéticos hereditarios. Los desordenes Mendelianos que predisponen al desarrollo de esta neoplasia son la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y cáncer colorrectal no polipósico hereditario (HNPCC), llamado también síndrome de Lynch (Rowley, 2005).

FAP es un síndrome autosómico dominante causado por mutaciones germinales en *APC*. Los pacientes con FAP desarrollan manifestaciones extracolónicas, incluyendo lesiones en la retina, osteomas, desmoides de la piel y tumores cerebrales (Kinzler and Vogelstein, 1996). Este síndrome afecta aproximadamente 1 en 12,000 individuos y constituye aproximadamente el 0.5% de todos los casos de CCR (Lynch and de la Chapelle, 2003).

HNPCC también es un desorden autosómico dominante que causa el 3-5 % de todos los casos de CCR, los individuos con HNPCC tienen 70-80% de riesgo en desarrollar CCR. Las causas conocidas de HNPCC son mutaciones en los genes de reparación de bases mal apareadas del DNA: *MLH1* (32%), *MSH2* (39%), *MSH6* (14%) y *PMS2* (15%) (Hewish et al., 2010; Rowley, 2005; Vilar and Gruber,

2010). Colectivamente, las alteraciones genéticas presentes en el CCR representan una oportunidad importante para la detección a nivel molecular, especialmente para la detección de tumores en etapas tempranas, ya que muchas mutaciones se encuentran presentes durante décadas en el paciente (Vogelstein et al., 1988).

### **1.5 Diagnóstico del CCR**

Debido a la alta incidencia y mortalidad de CCR, se han establecido diferentes directrices para su detección y diagnóstico oportuno, a fin de establecer terapias que ayuden a salvar y mejorar la vida de los pacientes. Actualmente, las pruebas de detección para CCR son agrupadas en dos categorías (Levin et al., 2008):

- a) Pruebas de detección primaria: pruebas de sangre oculta en heces con guayacol (gFOBT) y pruebas de sangre oculta en heces basadas en inmunoquímica (FIT) y
- b) Pruebas de detección de cáncer y lesiones avanzadas, mediante la examinación estructural o parcial del colon: colonografía por tomografía computarizada (CTC), sigmoidoscopia y colonoscopia (Tabla 2).

Las pruebas de detección primaria emplean muestras fecales para el diagnóstico de CCR. Estos métodos no son invasivos, y son de fácil acceso y bajo costo. gFOBT es una prueba colorimétrica que detecta la actividad peroxidasa del grupo hemo y no es específica para la hemoglobina humana, además, tiene sensibilidad limitada para la detección de CCR (Allison et al., 2007; Levin et al., 2008; Whitlock et al., 2008). FIT es una prueba que utiliza anticuerpos que son específicos para la hemoglobina humana, sin embargo, tiene sensibilidad intermedia como prueba de detección primaria (Levin et al., 2008; Whitlock et al., 2008). gFOBT y FIT, comúnmente son usadas para el tamizaje de CCR.

Por otro lado, la examinación estructural del colon es eficiente para la detección inicial y lesiones precursoras de cáncer. La CTC permite la visualización completa del colon y el recto. Una de las principales ventajas de este técnica es la detección

de lesiones extracolónicas (por ejemplo metástasis) que no pueden ser detectadas por otros métodos empleados (Lieberman, 2009).

La sigmoidoscopia es una técnica que permite la visualización parcial del colon, específicamente en el tercio inferior donde se presentan la mayor parte de los casos de CCR. El inconveniente de este método es la incapacidad de detectar tumores colorrectales que van más allá de este sitio anatómico (Lieberman, 2009; Strum, 2016).

La colonoscopia tiene una alta precisión diagnóstica. Aparte de la detección de CCR, puede tomar biopsias del tumor y remover pólipos presentes en el tejido colorrectal (Lieberman, 2009; Strum, 2016). Con esta estrategia la detección de cáncer y lesiones avanzadas son altamente sensibles, sin embargo sus ventajas incluyen que es altamente invasiva y que su implementación es compleja, ya que requiere de hospitalización, equipo y personal especializado. Igualmente, otra desventaja es la presentación de efectos secundarios en algunos pacientes.

Tabla 2. Métodos de detección para el CCR				
Pruebas	Ventajas	Limitaciones	Sensibilidad	Intervalo de examinación
<b>Pruebas de detección primaria</b>				
<b>gFOBT</b>	Simple, requiere pocas fuentes especializadas	No específica para hemoglobina humana, varias tomas de muestra	Cáncer 50 – 75 % *A.A. 20 – 25 %	Anual
<b>FIT</b>	Específica para hemoglobina humana	Requiere de más análisis que la gFOBT	Cáncer 60 – 85 % *A.A. 20 – 50 %	Anual
<b>Pruebas de detección de cáncer o lesiones avanzadas</b>				
<b>CTC</b>	Examinación completa del colon, puede detectar anomalías extracolónicas	Preparación total del intestino, exposición a radiación	Cáncer > 90% *A.A. 90%	Cada 5 años
<b>Sigmoidoscopia</b>	Requiere menos preparación que la colonoscopia, tiene pocas complicaciones	Visualización limitada para el tercio inferior del colon	Cáncer 95% (en el colon distal) *A.A. 70%	Cada 5 años
<b>Colonoscopia</b>	Examinación completa del colon, permite tomar biopsias y remover pólipos	Preparación completa del intestino y efectos secundarios	Cáncer > 95% *A.A. 88-98%	Cada 10 años
<b>*A.A. = Adenoma avanzado (tomado y modificado de Lieberman, 2009; Strum, 2016)</b>				

## 1.6 DNA circulante libre

El descubrimiento de las bases genéticas del cáncer, y en especial las del CCR, ha permitido emplear nuevos enfoques para la detección de tumores de una manera no invasiva, usando fluidos corporales con la finalidad de identificar alteraciones genéticas específicas de la células malignas (Network, 2012; Vogelstein et al., 2013).

La sangre humana es una fuente rica de información genética que se ha usado durante años para el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades, empleando DNA derivado de leucocitos. No obstante, hay formas adicionales de material genético en concentraciones bajas presentes en la sangre, como las células circulantes tumorales (CCT), DNA circulante libre (cfDNA), mRNA circulante libre (cfRNA), microRNA circulantes y exosomas, que pueden ser aprovechados a manera de una “biopsia líquida” para realizar la detección de alteraciones moleculares específicas del cáncer (Cai et al., 2015; Diaz and Bardelli, 2014).

Entre estas fuentes de ácidos nucleicos presentes en la sangre, el cfDNA es el mejor estudiado y ha demostrado ser de relevancia clínica en la oncología. El cfDNA es una colección de DNA de doble cadena, altamente fragmentado (generalmente menor a 200 pb), el cual es liberado a la sangre a partir de células apoptóticas, necróticas o mediante secreción activa de tejidos sanos, tejidos fetales, o a partir de células de tumores primarios o focos metastásicos (Cai et al., 2015; Diaz and Bardelli, 2014; Snyder et al., 2016).

La concentración del cfDNA es influenciada por las condiciones fisiológicas del individuo. En numerosos estudios se ha identificado un incremento en la concentración de cfDNA en individuos con lesiones tumorales benignas y malignas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infarto agudo al miocardio, trauma, estrés y ejercicio físico (Heitzer et al., 2013; Schwarzenbach et al., 2011). El cfDNA es depurado por vía renal y hepática, y tiene un tiempo de vida media de 16 minutos (intervalo de 4-30 minutos), basado en los datos

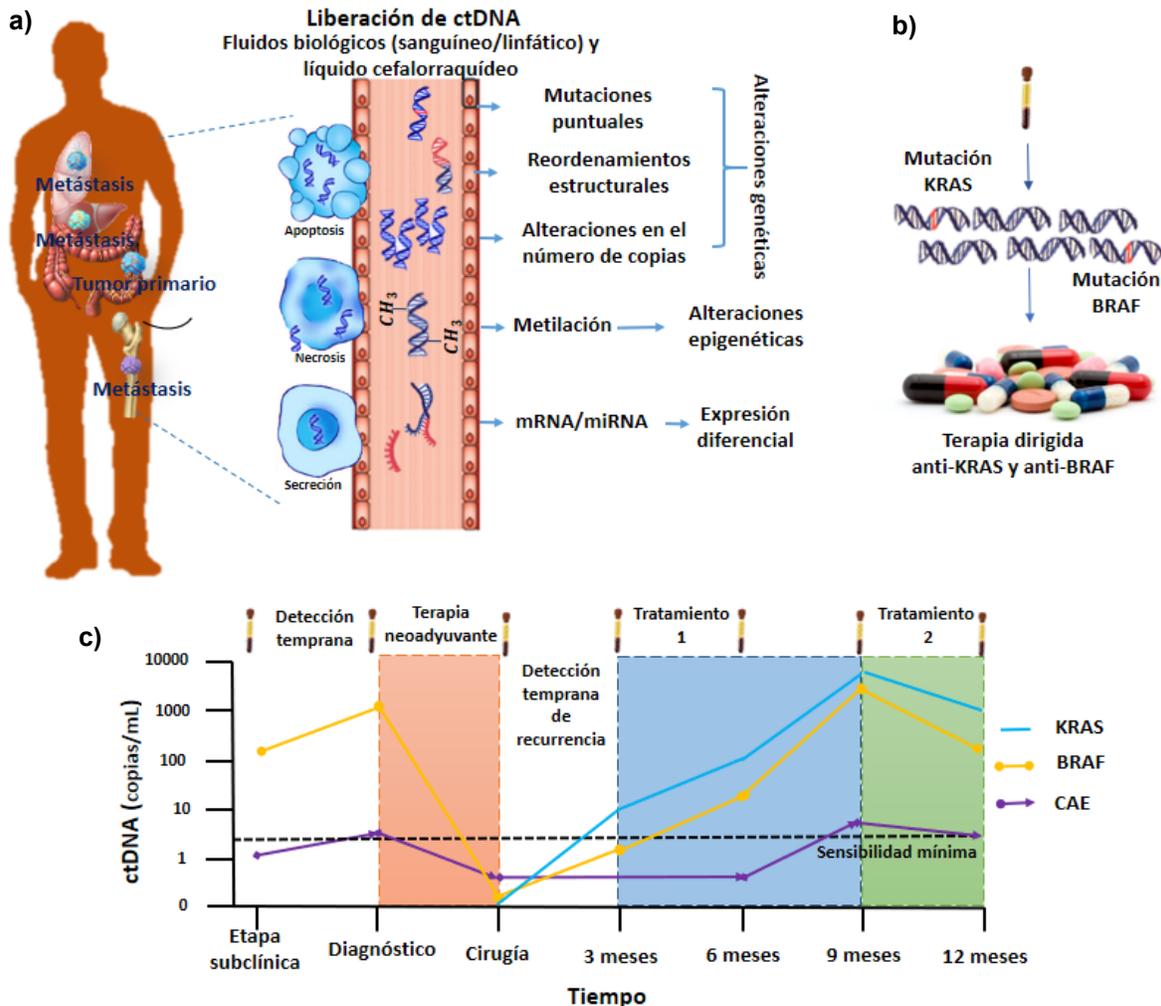
obtenidos a partir de la depuración del DNA fetal en plasma materno (Lo et al., 1999).

La fracción de cfDNA que es liberada por el tumor primario o focos metastásicos es denominada DNA circulante tumoral (ctDNA) y, por provenir de todas las células malignas, contiene la totalidad de las alteraciones genéticas y epigenéticas de la carga tumoral global (Cai et al., 2015; Figura 4). Los niveles del ctDNA son altamente variables y se asocian al estadio de la enfermedad, las alteraciones hepáticas y renales en los pacientes y a la tasa de crecimiento del tumor (Heitzer et al., 2013; Schwarzenbach et al., 2011). En relación al cfDNA que no es tumoral, las proporciones del ctDNA tiene un amplio intervalo, el cual abarca desde 0.001 a 50% del total de cfDNA en los estadios iniciales y cáncer metastásico, respectivamente (Diehl et al., 2005). Por otro lado, en individuos saludables la concentración de cfDNA abarca de 1-20 ng/ $\mu$ L y en pacientes con cáncer puede superar los 100 ng/ $\mu$ L (Schwarzenbach et al., 2008)

El gran desafío para el empleo de cfDNA como biopsia líquida tumoral es la baja frecuencia alélica (FA) de los alelos mutantes presentes en ella. En algunos casos la FA mutante es menor al 0.001%, valor que representa un reto tecnológico y bioinformático para la detección de mutaciones tumorales. Sin embargo, mediante el empleo de tecnologías innovadoras como la ddPCR (Siravegna et al., 2015; Thress et al., 2015), BEAMing (Bettegowda et al., 2014; Diehl et al., 2005, 2008; Siravegna et al., 2015), E-ice-COLD-PCR (How Kit et al., 2013; How-Kit et al., 2014) y la secuenciación masiva en paralelo (Bettegowda et al., 2014; Murtaza et al., 2013; Siravegna et al., 2015; Thress et al., 2015) las mutaciones en el cfDNA son detectables en pacientes con cáncer.

La biopsia líquida de ctDNA representa una gran oportunidad para su utilización clínica, debido a su diversidad de aplicaciones, particularmente en la oncología. En el CCR existe evidencia científica sólida que ha demostrado la utilidad clínica del cfDNA para detección temprana (Bettegowda et al., 2014; Diehl et al., 2005), detección de determinantes genéticas para la terapia dirigida (Bettegowda et al., 2014; Siravegna et al., 2015), monitoreo de la carga tumoral (Diehl et al., 2008;

Siravegna et al., 2015), resistencia adquirida durante el tratamiento (Bettegowda et al., 2014; Murtaza et al., 2013; Siravegna et al., 2015; Thress et al., 2015) así como el monitoreo de la enfermedad mínima residual (Diehl et al., 2008; Siravegna et al., 2015).



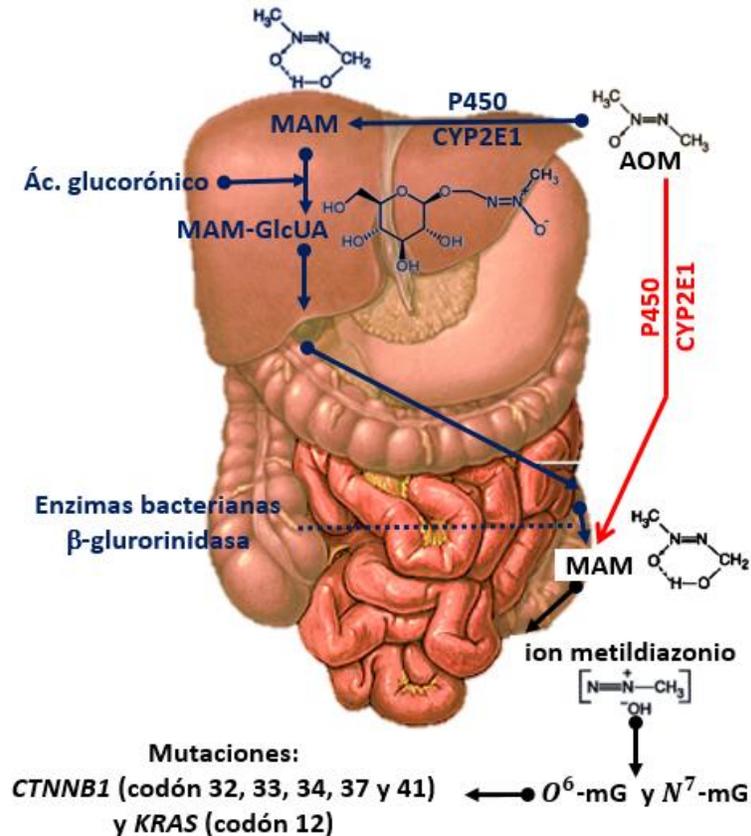
**Figura 4. Mecanismos de liberación y utilización de ctDNA en la clínica como biopsia líquida.** a) Origen, liberación y marcadores moleculares en el ctDNA. El ctDNA son moléculas de DNA de doble cadena que se originan de tumores primarios o focos metastásicos, los cuales son liberados en los fluidos biológicos mediante procesos de apoptosis, necrosis o secreción activa de las células tumorales. Los marcadores detectados en los fluidos biológicos incluyen alteraciones genéticas, epigenéticas y expresión diferencial de mRNA/microRNA. b) Detección de marcadores predictivos para la terapia. Los análisis genéticos del ctDNA son usados como marcadores predictivos para establecer terapias personalizadas de acuerdo al perfil genético de la carga tumoral de cada paciente. c) Seguimiento de la terapia y monitoreo de la enfermedad mínima residual. El análisis de ctDNA permite detectar CCR en etapas tempranas, frecuentemente subclínicas, así como dar seguimiento a los pacientes después de la resección quirúrgica para evaluar la presencia de enfermedad mínima residual y la respuesta a la terapia en tiempo real.

## 1.7 Modelo murino de CCR

El CCR es un proceso a largo plazo, el cual puede durar décadas para su desarrollo. Para su estudio, existen diferentes modelos *in vivo* que son usados para analizar aspectos de la biología del tumor, de manera análoga al CCR humano. Estos modelos animales permiten orientar ensayos terapéuticos y de diagnóstico que pueden llegar a ser aplicados en pacientes con CCR (De Robertis et al., 2011; Rosenberg et al., 2009).

El modelo murino de carcinogénesis inducida con azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS) es comúnmente usado en el estudio de CCR debido a su alta reproducibilidad, desarrollo de adenocarcinoma dentro de un periodo corto, además, exhibe características histopatológicas y moleculares similares al CCR humano (Tanaka et al., 2003).

El AOM es un procarcinógeno que requiere activación metabólica para generar el compuesto activo e inducir CCR. El AOM se metaboliza principalmente en el hígado, y en un menor porcentaje en el colon. Este carcinógeno llega al hígado a través de la circulación sistémica donde sufre el proceso de hidroxilación por el citocromo P-450 a través su isoforma CYP2E1 para generar metilazoximetanol (MAM), subsecuentemente, sufre conjugación con el ácido glucorónico para formar metilazoximetanol- $\beta$ -D-glucopiranosidurónico (MAM-GlcUA), que es almacenado en la vesícula biliar y liberado posteriormente a la luz del intestino, donde las bacterias de la flora intestinal con actividad enzimática  $\beta$ -glucoronidasa rompen el enlace glucosídico para la liberación de MAM (Megaraj et al., 2014; Sohn et al., 2001). MAM es un compuesto inestable con un tiempo de vida media de 12 horas que se descompone espontáneamente en el colon para generar formaldehído y ion metildiazonio, un agente altamente reactivo que produce alquilación en las bases del DNA para la formación de CCR (Figura 5) (Megaraj et al., 2014; Sohn et al., 1991). El AOM también se metaboliza directamente en el colon para generar el ion metildiazonio (Megaraj et al., 2014).

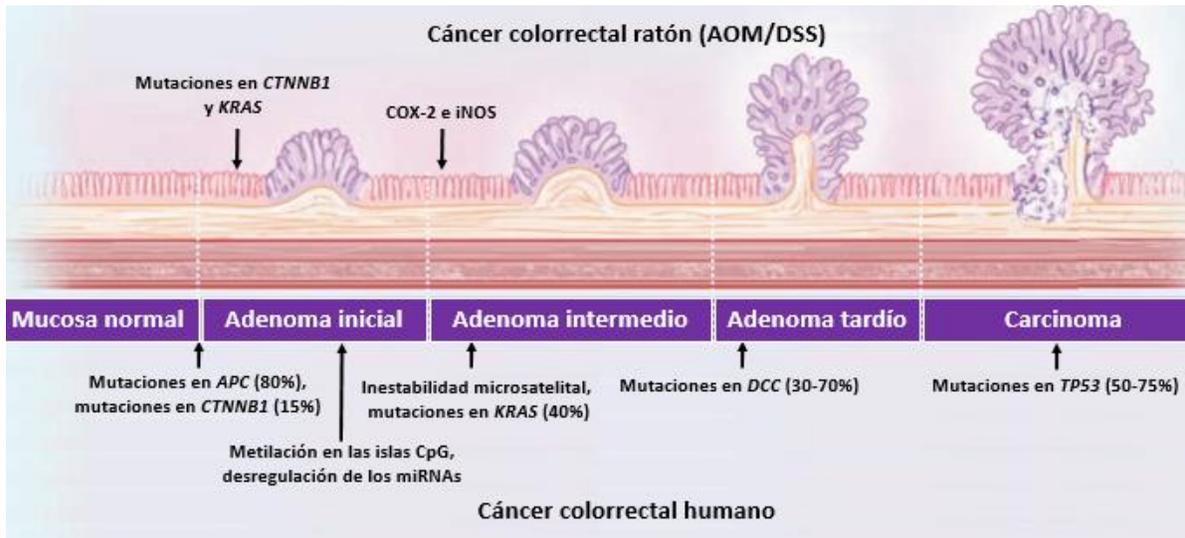


**Figura 5. Activación metabólica del azoximetano.** El AOM es metabolizado en el hígado y en la luz del colon. Una vez que el AOM llega al hígado es metabolizado por CYP2E1 para producir MAM, el cual se conjuga con el ácido glucurónico para generar MAM-GlcUA que es almacenado en la vesícula biliar. Posteriormente es liberado hacia la luz del intestino donde ciertas enzimas bacterianas  $\beta$ -glucorinidasas rompen la unión de MAM-GlcUA generando MAM, este compuesto es inestable en condiciones fisiológicas produciendo formaldehído y ion metildiazonio, el agente carcinógeno que promueve la formación del CCR. En el colon se puede metabolizar el AOM debido a la presencia de la enzima P450 aunque a una concentración más baja que en el hígado.

El dextrán es un polisacárido lineal y ramificado de glucosa sintetizado por diferentes bacterias con peso molecular variable. El DSS es un derivado polianiónico de dextrán producido por esterificación con el ácido clorosulfónico (Solomon et al., 2010). El DSS disuelto en agua es tóxico para el revestimiento del colon y produce colitis severa, debido al aumento de la permeabilidad de la mucosa del colon causando daños en las células epiteliales (Clapper et al., 2007; Perše and Cerar, 2012).

Las alteraciones genéticas que se han observado en este modelo son mutaciones en *CTNNB1* y *KRAS* (Kohno et al., 2005; Takahashi et al., 1998, 2000b, 2000a), así como la sobreexpresión de las enzimas proinflamatorias: ciclooxigenasa-2

(COX-2) y del óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Kohno et al., 2005; Takahashi et al., 2000b; Tanaka et al., 2003). Figura 6.



**Figura 6. Comparación de CCR en humanos y en modelo de AOM/DSS.** En el modelo de AOM/DSS se observa alteraciones genéticas muy similares a las que se observa en CCR humano, como las mutaciones en los oncogenes CTNNB1 y KRAS, así como la sobreexpresión de enzimas inflamatorias.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Implementar un método mínimamente invasivo para detectar mutaciones somáticas en los oncogenes *CTNNB1* y *KRAS* para la detección de CCR utilizando cfDNA en el modelo *in vivo* de AOM/DSS.

### 2.2 Objetivos particulares

1. Reproducir el modelo murino de carcinogénesis inducida con AOM/DSS.
2. Evaluar los cambios clínicos en los ratones inducidos con AOM/DSS.
3. Hacer el seguimiento del tumor mediante la prueba de imagenología molecular microPET/CT usando 2-[18F]-fluoro-2-deoxi-D-glucosa (FDG).
4. Diseñar los oligonucleótidos para la amplificación de las regiones mutadas en CCR, *CTNNB1* (codones 32, 33, 34, 37 y 42) y *KRAS* (codón 12), compatibles con el método de PCR de punto final y E-ice-COLD-PCR.
5. Estandarizar el método de E-ice-COLD-PCR para el enriquecimiento de los alelos mutantes de *CTNNB1* y *KRAS* en cfDNA.
6. Amplificar las regiones hipermutables específicas de *CTNNB1* y *KRAS* a partir de cfDNA extraído de plasma de los ratones con tumores inducidos.
7. Analizar cuantitativamente las mutaciones en *CTNNB1* y *KRAS* a partir del cfDNA por medio de secuenciación masiva en paralelo.

### 3. Antecedentes

La evolución de CCR de FCA hasta carcinoma *in situ* puede tomar décadas y es asintomática, lo cual dificulta su detección temprana y el éxito terapéutico. La mayoría de los pacientes con sintomatología que son diagnosticados, presentan tumores en etapas avanzadas, los cuales tienen un pronóstico pobre. Los métodos actuales de detección primaria de lesiones tempranas de CCR, como por ejemplo, la detección de sangre oculta en heces, tienen baja sensibilidad y especificidad. Asimismo, las pruebas de detección de cáncer y lesiones avanzadas, como la sigmoidoscopia, la colonoscopia o la CTC, tienen una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, sin embargo no son muy accesibles, ya que requieren hospitalización, preparación antes y después de la intervención y están asociadas a efectos secundarios (Levin et al., 2008; Lieberman, 2009; Strum, 2016).

Con el descubrimiento de las bases genéticas del cáncer ha permitido emplear nuevos enfoques para la detección de tumores de una manera no invasiva, empleando fluidos corporales con la finalidad de identificar alteraciones genéticas específicas de la células malignas presentes en los oncogenes y genes supresores de tumores que son los responsables de la iniciación y progresión del cáncer (Network, 2012; Vogelstein et al., 2013)

La sangre humana es una fuente rica de información genética que se ha usado durante años para el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades empleando DNA derivado de leucocitos. Sin embargo, hay formas adicionales de material genético presentes en la sangre, como el cfDNA que puede ser aprovechado a manera de una “biopsia líquida” para la detección de alteraciones moleculares específicas del cáncer (Cai et al., 2015; Diaz and Bardelli, 2014).

La principal ventaja del uso del cfDNA es que se puede obtener de una manera no invasiva durante visitas ambulatorias, además de que representa la totalidad de las alteraciones genéticas presentes en el tejido tumoral. Estudios recientes han demostrado la utilización de cfDNA para la identificación de alteraciones genéticas

relevantes durante el desarrollo, progresión y el tratamiento del CCR sirviendo como un biomarcador molecular (Bettegowda et al., 2014; Diehl et al., 2005, 2008; Murtaza et al., 2013; Siravegna et al., 2015; Thress et al., 2015).

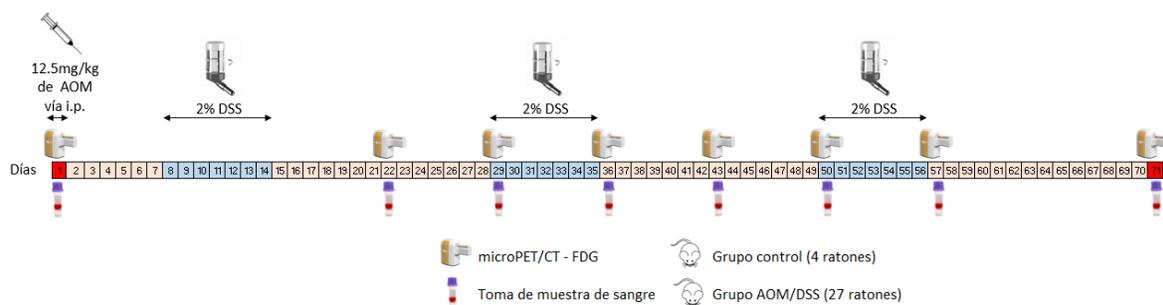
En este proyecto se propone implementar una metodología molecular para la detección de mutaciones somáticas en genes asociados a las etapas iniciales del desarrollo del CCR por medio de secuenciación masiva del cfDNA. Esta estrategia busca la implementación de un método mínimamente invasivo de detección temprana de esta neoplasia en biopsias líquidas, utilizando el modelo *in vivo* de AOM/DSS. Los resultados de este trabajo generarán evidencia científica en dirección a establecer bases metodológicas que permitan la detección temprana de alteraciones somáticas en plasma asociadas al CCR en humanos.

## 4. Metodología

### 4.1 Inducción de CCR

En este estudio se usaron 31 ratones machos BALB/c de 5-6 semanas de nacido que fueron adquiridos de Laboratorios Harlan (México). Antes del tratamiento todos los ratones fueron hospedados en jaulas de plástico con comida y agua *ad libitum*, y puestos en cuarentena durante 7 días. Posteriormente los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en 2 grupos: grupo control (4 ratones) y grupo AOM/DSS (27 ratones).

Al inicio de la fase experimental, los ratones del grupo AOM/DSS recibieron una inyección intraperitoneal (i.p) de AOM (Sigma-Aldrich Cat. A5486) a una dosis de 12.5 mg/kg de peso corporal en un volumen de 0.5 mL. Los ratones del grupo control recibieron una inyección i.p. de solución salina. Una semana después los ratones del grupo AOM/DSS recibieron agua para beber con DSS (MP Biomedicals Cat. 160110) al 2% durante 7 días *ad libitum* y posteriormente solo agua durante los siguientes 14 días, para volver a repetir dos veces más este ciclo (León-Cabrera et al., 2014; Neufert et al., 2007). Al finalizar el experimento todos los ratones fueron sacrificados, Figura 7.



**Figura 7. Modelo de estudio para el CCR.** En este experimento se usó un grupo control y un grupo AOM/DSS. Durante el tratamiento se tomaron muestras de sangre para evaluar las alteraciones genéticas descritas en este modelo, además, el crecimiento tumoral se evaluó mediante microPET/CT

## 4.2 Toma de muestra de sangre

Para la detección de alteraciones genéticas en este modelo *in vivo*. Se colectaron muestras de sangre durante la fase del tratamiento en los días 1, 22, 29, 36, 43, 50, 57 y 70 para los ratones del grupo control y grupo AOM/DSS (Figura 7). Las tomas de muestra de sangre se realizaron mediante una incisión en la cola de los ratones y se colectaron por medio de goteo en un tubo microtainer con EDTA (BD Microtainer Cat. 365974).

## 4.3 Seguimiento del tumor por microPET/CT

La evaluación del crecimiento del tumor se realizó a través de microPET/CT usando como sonda molecular 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxi-D-glucosa (FDG) para evaluar la actividad glucolítica de las células tumorales, las cuales son más elevadas que en las células normales (Chowdhury et al., 2010; Gambhir, 2002), en los mismo días de la toma de muestra de sangre (Figura 7).

Un día antes de la toma de microPET/CT, los ratones recibieron croquetas bañadas con medio de contraste Iodixanol 270 (Visipaque) y 6 horas antes de la toma fueron puesto en ayuno con agua *ad libitum*. Para la toma de microPET/CT se administró vía intravenosa 200-250 microcuries ( $\mu$ Ci) de FDG a los ratones, en un volumen de 100  $\mu$ L en solución salina y fueron colocados en la cámara de microPET/CT bajo anestesia inhalada (oxígeno a 800 mmHg e isoflurano al 1.5%). Se realizó la microPET/CT usando un protocolo de emisión de cuerpo completo con single PET 10 min y CT Best HD-HD en el equipo de Albira ARS (Oncovision). Posteriormente, se determinó la lesión glucolítica total (TLG, por sus siglas en inglés), un valor cuantitativo de la microPET/CT que mide la concentración de FDG presente en un tejido metabólicamente activo.

El análisis de microPET/CT se realizó en el laboratorio 11 de microPET/CT a cargo del Dr. Luis Alberto Medina Velásquez del Instituto de Cancerología (INCan).

#### 4.4 Extracción y cuantificación de DNA tumoral y cfDNA

La extracción del cfDNA se realizó con 63 – 200 µL de plasma con el kit Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini (Norgen Biotek Corp Cat. 55100) y el DNA del tumor se extrajo con el kit de DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Cat. 69506) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y cuantificados por fluorometría (Qubit - Life Technologies). Posteriormente el DNA extraído de plasma y tumor fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

#### 4.5 Diseño de oligonucleótidos

Para este experimento se diseñaron dos juegos de primers compatibles con PCR de punto final y E-ice-COLD-PCR (Enhanced-Improved and Complete Enrichment CO-amplification at Lower Denaturation temperature Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) para amplificar las regiones mutadas en *CTNNB1* exón 3, codón 32, 33, 34, 37 y 41, y *KRAS* exón 2, codón 12 (Tabla 3) usando los programas de primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), primer blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y PridimerCheck ([http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/primer\\_dimer.html](http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/primer_dimer.html)).

Primer	Oligo	Nombre	Longitud	Tm	Secuencia	Producto
1	Forward	<i>CTNNB1</i>	20	60.35	CACTGGCAGCAGCAGTCTTA	111
2	Reverse	<i>CTNNB1</i>	22	59.98	GGAGGTGTCAACATCTTCTCC	
3	Forward	<i>KRAS</i>	20	58.46	AGGCCTGCTGAAAATGACTG	135
4	Reverse	<i>KRAS</i>	23	61.61	AGCAGCGTTACCTCTATCGTAGG	

También se diseñaron dos sondas boqueadoras (SB) para *CTNNB1* y *KRAS* que fueron usadas en la E-ice-COLD-PCR para el enriquecimiento de los alelos mutantes de estos genes (Tabla 4). La SB son oligos sintéticos de 41 y 42 nucleótidos para *CTNNB1* y *KRAS*, respectivamente. Esta SB están dirigidos hacia al alelos silvestre, se sobrelapa con 5 nucleótidos al primer forward de *CTNNB1* y *KRAS*, está fosforilado en el extremo 3' de tal manera que no puede

ser amplificado por la polimerasa y contiene bloqueadores de ácidos nucleicos (LNA, por sus siglas en inglés) en el sitio donde esperamos encontrar las mutaciones (*CTNNB1*: 32,33,34,37 y 41; *KRAS*: codón 12). Los LNAs en la SB permiten maximizar la diferencia de la temperatura de fusión entre el alelo silvestre y el alelo mutante (ver 4.7) (How Kit et al., 2013; You et al., 2006). La SB fue diseñada usando el instrumento de diseño y predicción de Exiqon (<https://www.exiqon.com/oligo-tools>).

Sonda bloqueadora	Secuencia
<b>CTNNB1_SB_41</b>	TCTTACTTGG+A+T+TCT+G+G+AATCCATTCTGGTGCCACCACCAC/3Phos
<b>KRAS_SB_42</b>	GACTGAGTATAAACTTGTGGTGGTTGGAGCTG+G+TGGCGTAGG/3Phos
<b>Bloqueadores de ácidos nucleicos (LNA): +A, +G, +C y +T.</b>	

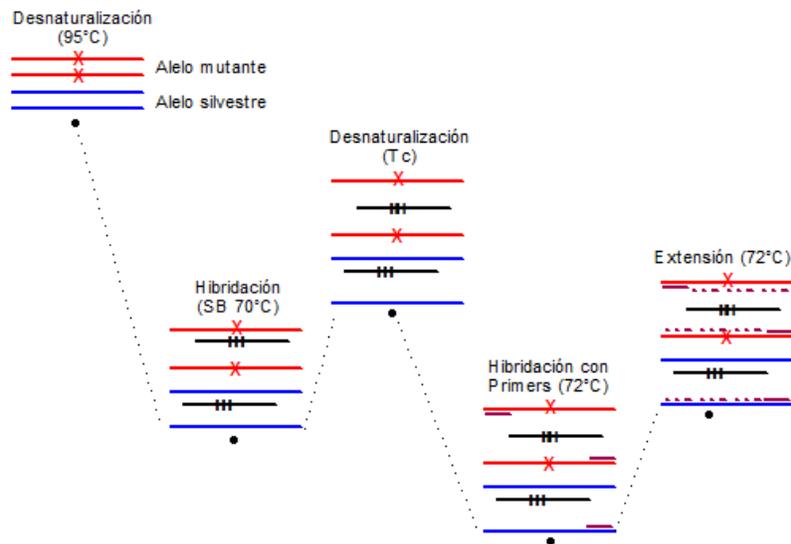
#### 4.6 PCR de punto final

Para la detección de mutaciones en *CTNNB1* y *KRAS* se amplificaron las muestras de cfDNA y DNA tumoral de los ratones que fueron tratados con AOM/DSS. La reacción se realizó usando 20 ng de DNA tumoral y > 1 ng de cfDNA en un volumen de 30 µL usando el Kit de Taq Ready Mix PCR (KAPA cat. 1024; Tabla 5), en un equipo de PCR de punto final T100 Thermal Cycler (BIO-RAD), usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos seguido de 34 ciclos de PCR con desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación con los primers a 60°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Reactivos	Concentración final
Agua	-
2x Ready Mix con Mg <sup>2+</sup>	1X
Primer Forward (10 µM)	0.4 µM
Primer Reverse (10 µM)	0.4 µM
DNA	>1 ng para ctDNA y 20 ng para DNA tumoral

## 4.7 E-ice-COLD-PCR

E-ice-COLD-PCR es una variante de PCR que permite el enriquecimiento selectivo de alelos mutantes a través de la incorporación de etapas adicionales en la PCR y la utilización de una SB que contiene LNAs (ver 4.5). La SB es complementaria al alelo silvestre e hibrida de manera imperfecta con el alelo mutante. Esta técnica inicia con la desnaturalización de las moléculas de DNA, seguida de un paso de hibridación intermedia, donde el alelo silvestre y mutante hibridan con la SB, formando híbridos de alelo mutante-SB y de alelo silvestre-SB. Posteriormente, se emplea una temperatura crítica ( $T_c$ ), definida como la temperatura en la cual se desnaturaliza preferencialmente el alelo mutante que esta unido a la SB, debido a que dicha hibridación es imperfecta y su temperatura de fusión ( $T_m$ , por sus siglas en inglés) es menor que la del alelo silvestre. Este paso es la base del enriquecimiento selectivo. En el siguiente paso de la PCR, se realiza el alineamiento con los primers, el cual ocurre mayoritariamente con el alelo mutante, debido a que el alelo silvestre se encuentra bloqueado por la SB. Esto permite la amplificación selectiva de los alelos mutantes (Figura 8).



**Figura 8. Flujo general para el enriquecimiento de mutaciones por E-ice-COLD-PCR.** Esta PCR inicia con una desnaturalización a 95°C seguido de un paso de hibridación intermedia donde la SB hibrida con el alelo silvestre y mutante a 70°C, posteriormente hay un paso de desnaturalización a una  $T_c$  donde se desnaturaliza preferencialmente el alelo mutante debido a que la SB hibrida imperfectamente con él y tiene una  $T_m$  menor que el alelo silvestre, esto para que se amplifique preferencialmente

Para esta estrategia experimental, la Tc fue definida mediante un análisis de fusión de alta resolución (HRMA, por sus siglas en inglés), cuyo principio se basa en la disociación de DNA de doble cadena (dsDNA, por sus siglas en inglés) cuando se expone a un incremento gradual de la temperatura. La disminución de la señal se genera a través de la transición de dsDNA a DNA de cadena sencilla (ssDNA, por sus siglas en inglés) en la presencia de un colorante fluorescente. Así, la fluorescencia se reduce a medida que se va desnaturalizando el dsDNA (Montgomery et al., 2007; Simi et al., 2008).

Para la determinación de la Tc del alelo mutante y silvestre de *CTNNB1* y *KRAS*, se utilizaron 3 templados diferentes: silvestre, mutante y la combinación equimolar de ambos, los cuales fueron amplificados por PCR de punto final usando 1 ng de estas moléculas en un volumen de 20 µL, con el kit de HRM Fast PCR (KAPA cat. KK4201; Tabla 6). La amplificación se realizó usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos de PCR con desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación con los primers a 60°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

**Tabla 6. Componentes de la reacción para la determinación de la Tc por HRM**

Reactivos	Concentración final
Agua	-
2X KAPA HRM FAST master mix	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 Mm
Primer Forward 10 µM	0.2 µM
Primer Reverse 10 µM	0.2 µM
DNA	1 ng

Los productos obtenidos de la reacción fueron cuantificados y mezclados con la SB a una molaridad de 1:2, productos de PCR y SB, respectivamente, y analizados mediante un análisis de fusión de alta resolución (HRMA) en un equipo de qPCR (Rotor Gene Q, Qiagen). Para el HRMA se hizo un incremento gradual de la temperatura de 75 – 90 °C, 0.03 °C/s por cada adquisición.

Una vez determinada la Tc para *CTNNB1* y *KRAS*, se realizó una E-ice-COLD-PCR para evaluar el enriquecimiento de los alelos mutantes en las muestras de

DNA tumoral, obtenidas de las neoplasias disectadas del colon, usando 20 ng de DNA en un volumen final de 30  $\mu$ L con el kit de Taq HotStart PCR (KAPA cat. 1510; tabla 7). La amplificación se realizó usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 6 ciclos de PCR con desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, hibridación con los primers a 60°C por 20 segundos, extensión a 72°C a 15 segundos, posteriormente 44 ciclos de E-ice-COLD-PCR con desnaturalización a 95°C por 20 segundos, hibridación con la SB a 70°C por 30 segundos, desnaturalización a 83.3°C y 80.8°C por 20 segundos para *CTNNB1* y *KRAS*, respectivamente, hibridación con los primers a 60°C por 20 segundos, extensión a 72°C por 15 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos. El valor del enriquecimiento, expresado en veces, se obtuvo dividiendo las frecuencias alélicas de los productos obtenidos por E-ice-COLD-PCR sobre aquellas obtenidas PCR de punto final (Enriquecimiento = E-ice-COLD-PCR/PCR de punto final). Una vez evaluada el enriquecimiento con DNA tumoral se realizó E-ice-COLD-PCR con cfDNA.

Reactivos	Concentración final
Agua	-
KAPA Taq Hotstart buffer 5X	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 Mm	1.5 Mm
Mezcla de dNTPs 10 Mm	0.2 Mm
Primer Forward 10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Primer Reverse 10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
SB de <i>CTNNB1</i> y <i>KRAS</i> (250 nM)	50 Nm
KAPA Taq HotStart DNA polimerasa 5 U/ $\mu$ L	1U
DNA	>1 ng para ctDNA y 20 ng para DNA tumoral

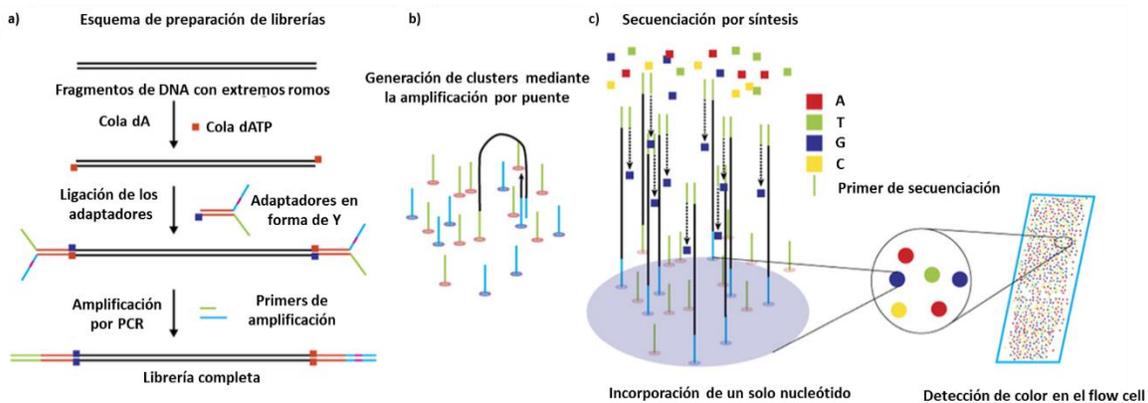
#### 4.8 Secuenciación tipo Sanger

Los productos obtenidos por PCR de punto final y E-ice-COLD-PCR se mandaron a secuenciar al Laboratorio de Secuenciación de Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología de la UNAM, en donde se llevó a cabo una secuenciación de tipo Sanger usando 50 ng de los productos purificados de PCR con los oligonucleótidos *CTNNB1* y *KRAS* (sentido y antisentido), en el

secuenciador Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer (24 capilares). El alineamiento de las secuencias se realizó usando el programa A plasma editor.

## 4.9 Secuenciación Masiva

También se evaluaron las mutaciones presentes en el DNA tumoral y cfDNA por medio de secuenciación masiva en paralelo, usando la plataforma de Illumina, cuyo principio se basa en la secuenciación por síntesis con terminadores reversibles (Meyerson et al., 2010), Figura 9.



**Figura 9. Secuenciación masiva por illumina.** a) La librería está compuesta de fragmentos de dsDNA que son reconocidos por el secuenciador. El DNA que va ser secuenciado es flanqueado por secuencias adaptadores. Los productos obtenidos por PCR son embotados en el extremo 3', posteriormente una cola de dA es adicionada en el extremo 3' usando DNA polimerasa sin actividad exonucleasa 3'-5'. La cola de dA previene la concatemerización de los fragmentos de DNA y permite el uso de adaptadores de cola dT, el cual minimiza la formación de dímeros de adaptadores. b) las librerías son hibridadas covalentemente en una superficie sólida que contiene oligos complementarios a los adaptadores específicos que son ligados en los fragmentos de las librerías, de esta manera se hace la amplificación por puente para la generación de clusters. c) Cada cluster es suministrado con polimerasa y cuatro nucleótidos fluorescentes marcados diferencialmente que tienen su 3'-OH inactivado químicamente para asegurar que una sola base sea incorporada en cada ciclo. Cada ciclo de incorporación de base es seguido por un paso de toma de imagen para identificar el nucleótido incorporado en cada cluster y por un paso químico que remueve el grupo fluorescente y el desbloqueo al final del 3' para la incorporación de la base en el siguiente ciclo. (tomado y modificado de Shin et al., 2014).

Las librerías fueron construidas utilizando el kit de GeneRead Library Prep for Illumina de Qiagen (Cat. 180432, 180455 y 180912) y secuenciadas en un Miseq (Illumina). Los datos crudos obtenidos de la secuenciación masiva (fastq) fueron procesados en la plataforma bioinformática Galaxy Project (<https://galaxyproject.org/>), usando el genoma de referencia de ratón (mm10). Las secuencias fueron alineadas con BWA-MEM y visualizadas en IGV (Broad Institute).

#### **4.10 Análisis estadístico**

La evaluación de las diferencias significativas se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguida de la pruebas de comparación múltiple de Tukey, utilizando el programa GraphPad Prism®Prism 5 (Graph Pad Software).

## 5. Resultados

### 5.1 Signos clínicos en el modelo de AOM/DSS

Durante el proceso carcinogénico en el modelo *in vivo* de CCR los ratones del grupo AOM/DSS presentaron piloerección, diarrea, sangrado y protrusión anal, así como la pérdida del peso corporal después de cada ciclo de DSS en comparación con el grupo control sin tratamiento (Figura 10).

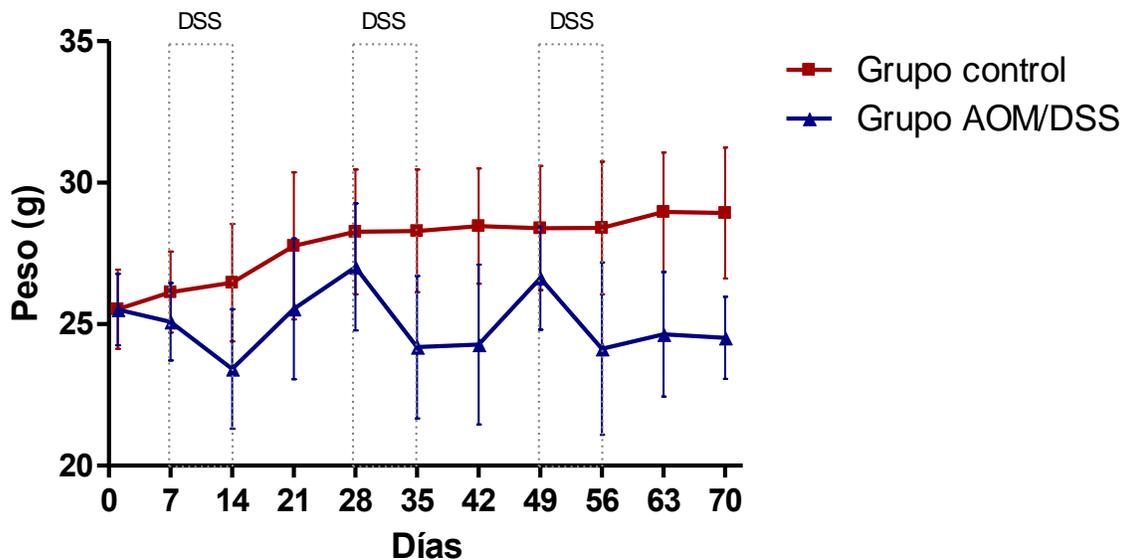
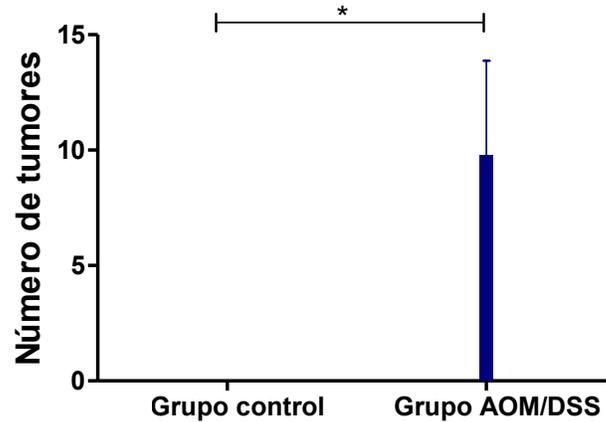


Figura 10. Peso de los ratones durante el proceso carcinogénico con AOM/DSS. Los ratones del grupo AOM/DSS experimentaron una disminución de peso corporal durante el tratamiento.

### 5.2 Desarrollo de tumores con AOM/DSS

Al término del experimento se realizó el sacrificio de los ratones para la evaluación macroscópica del colon. Todos los ratones tratados con AOM/DSS desarrollaron tumores en la parte media y distal, con un promedio de  $9.78 \pm 4.08$  tumores por cada ratón (Figura 11).

a)



b)

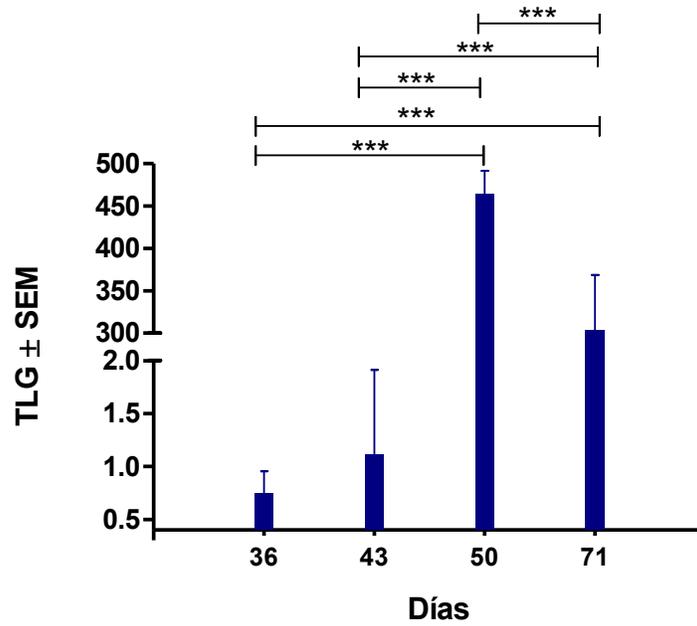


**Figura 11. Desarrollo de tumores en el modelo AOM/DSS.** a) Número de tumores desarrollados en el grupo AOM/DSS. b) Desarrollo de tumores en la parte media y distal del colon.

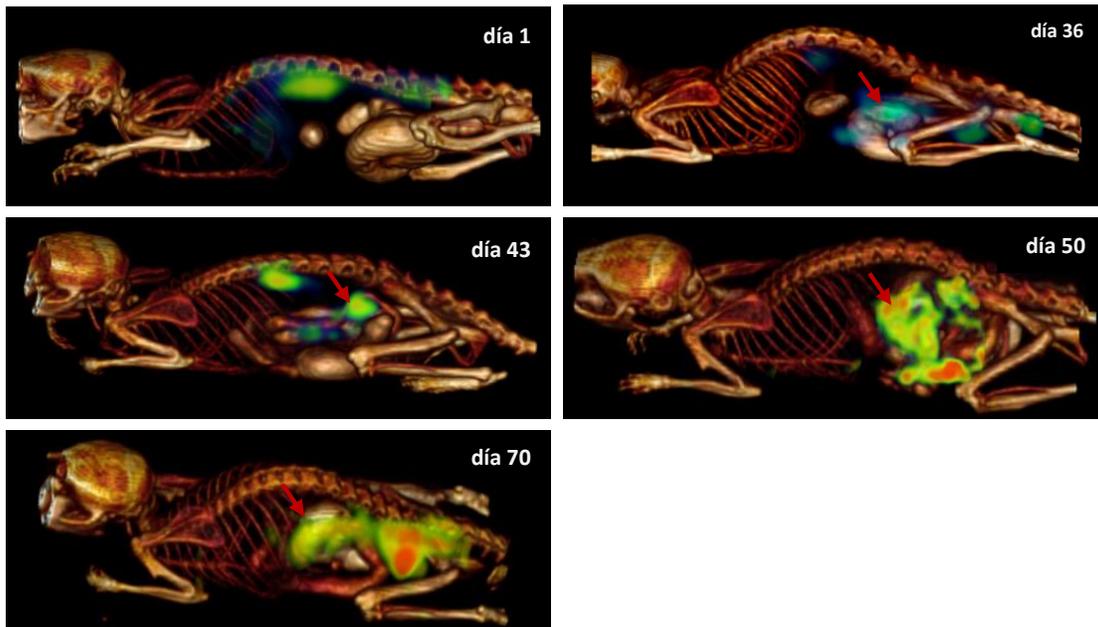
### 5.3 Detección de tumores con microPET/CT

S monitoreó el desarrollo del tumor durante el tratamiento con AOM/DSS mediante la prueba de imageneología molecular microPET/CT. Para aprovechar el aumentado metabolismo glucolítico tumoral, se utilizó FDG como sonda molecular. Mediante la acumulación local de la FDG en el tejido del colon, se detectó la presencia de los tumores a partir del día 36 del inicio del tratamiento, etapa que corresponde a la formación de microadenomas previos al desarrollo tumoral en este modelo (Figura 12).

a)



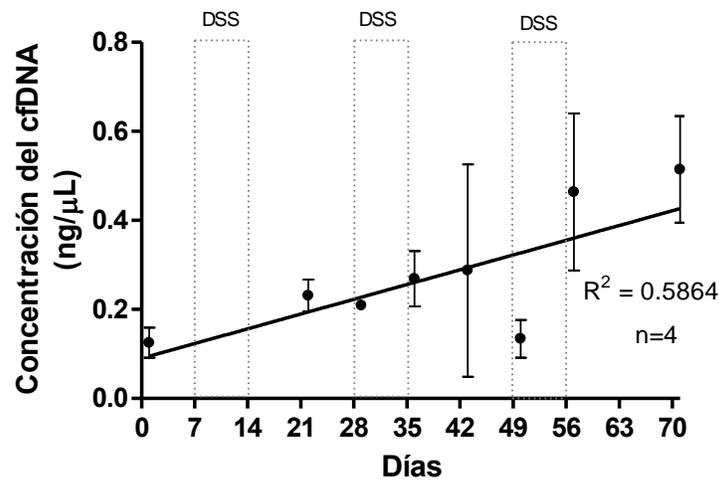
b)



**Figura 12. Detección de tumores con microPET/CT.** a) Medición de la TLG a partir del día en donde se detectó el tumor con microPET/CT. b) Imágenes reconstruidas de la microPET/CT. Las flechas rojas indican la captación de FDG en el colon. Los datos son presentados como la media  $\pm$  SEM y analizados por ANOVA de una vía, seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. \*\*\*  $p < 0.001$ . TLG = Lesión glucolítica total.

## 5.4 Concentración de cfDNA

Para evaluar la presencia de alteraciones genéticas tumorales, se tomaron muestras de sangre de los ratones tratados con AOM/DSS durante el transcurso del experimento y se extrajo cfDNA de 4 ratones en cada toma de muestra. También se aisló cfDNA de los controles sin tratamiento. En los ratones tratados con AOM/DSS se observó un aumento en la concentración plasmática de cfDNA durante el desarrollo del tumor (Figura 13).



**Figura 13.** Concentración plasmática del cfDNA durante el tratamiento. Se observa un aumento en la concentración del cfDNA durante el desarrollo del tumor

## 5.5 Análisis de mutaciones en DNA tumoral por PCR de punto final y por secuenciación tipo Sanger

Para analizar el genotipo tumoral en las regiones hipermutables de *CTNNB1* y *KRAS*, se extrajo DNA de las muestras de CCR de 20 ratones tratados con AOM/DSS. Se realizó la amplificación por PCR de punto final y la secuenciación tipo Sanger para la detección de dichas alteraciones. Se detectaron mutaciones en *CTNNB1* con una frecuencia del 100% en los codones 32, 33, 34, 37 y 41. Además, se observaron más de 2 mutaciones distintas en *CTNNB1* en el 70% de las muestras (14/20). En *KRAS* no se detectó ninguna mutación con esta estrategia experimental (Tabla 8 y Anexo 1).

**Tabla 8. Análisis de mutaciones en *CTNNB1* y *KRAS* en muestras de tumor por PCR de punto final y secuenciación tipo Sanger**

<b>Ratón AOM/DSS</b>	<i>CTNNB1</i>	<i>KRAS</i>
<b>Ratón 1</b>	c.94G>A (p.D32N) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 2</b>	c.94G>A (p.D32N)	Tipo silvestre
<b>Ratón 3</b>	c.94G>A (p.D32N) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 4</b>	c.94G>A (p.D32N) c.101G>A (p.G34E) c.110C>T (p.S37F) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 5</b>	c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 6</b>	c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 7</b>	c.98C>T (p.S33F) c.101G>A (p.G34E) c.110C>T (p.S37F)	Tipo silvestre
<b>Ratón 8</b>	c.94G>A (p.D32N) c.101G>A (p.G34E) c.110C>T (p.S37F) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 9</b>	c.94G>A (p.D32N) c.110C>T (p.S37F)	Tipo silvestre
<b>Ratón 10</b>	c.94G>A (p.D32N) c.101G>A (p.G34E)	Tipo silvestre
<b>Ratón 11</b>	c.110C>T (p.S37F)	Tipo silvestre
<b>Ratón 12</b>	c.94G>A (p.D32N) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 13</b>	c.94G>A (p.D32N) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 14</b>	c.101G>A (p.G34E)	Tipo silvestre
<b>Ratón 15</b>	c.94G>A (p.D32N) c.98C>T (p.S33F) c.101G>A (p.G34E) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 16</b>	c.101G>A (p.G34E) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 17</b>	c.101G>A (p.G34E) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 18</b>	c.94G>A (p.D32N)	Tipo silvestre
<b>Ratón 19</b>	c.94G>A (p.D32N) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre
<b>Ratón 20</b>	c.94G>A (p.D32N) c.122C>T (p.T41I)	Tipo silvestre

## 5.6 Análisis de mutaciones de DNA tumoral por PCR de punto final y por secuenciación masiva.

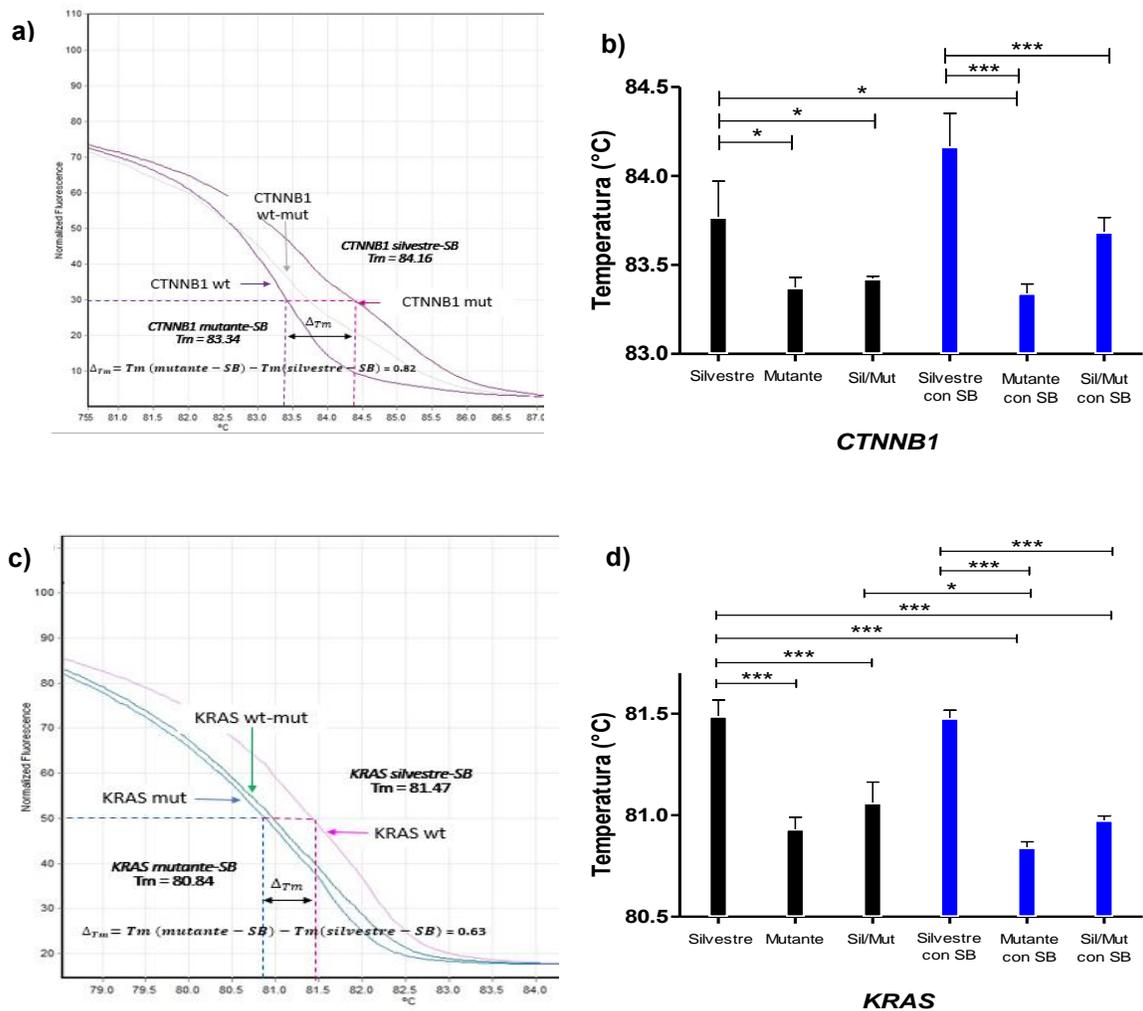
Para identificar con mayor sensibilidad las alteraciones en *CTNNB1* y *KRAS* en los tumores, se tomaron 5 muestras de los productos obtenidos por PCR de punto final previamente secuenciados por Sanger y se secuenciaron en la plataforma de secuenciación masiva Illumina. Para este análisis se emplearon las muestras 1, 3, 8, 10 y 16 a una profundidad de secuenciación de 30,000X. Con esta estrategia se detectaron mutaciones adicionales en *CTNNB1* en el ratón 1 (codón 34), ratón 3 (codones 33 y 34) y ratón 16 (codones 33 y 37), que no habían sido detectadas con la secuenciación tipo Sanger (Tabla 9 y Anexo 2). En *KRAS* no se detectó ninguna mutación.

Tabla 9. Análisis de mutaciones en <i>CTNNB1</i> y <i>KRAS</i> en muestras de tumor por PCR de punto final y secuenciación tipo Sanger y masiva		
Ratón AOM/DSS	Secuenciación tipo Sanger	Secuenciación masiva
<b>Ratón 1</b>	<i>CTNNB1</i> c.94G>A (p.D32N) - c.122C>T (p.T41I)	<i>CTNNB1</i> c.94G>A (p.D32N) <b>c.101G&gt;A (p.G34E)</b> c.122C>T (p.T41I)
<b>Ratón 3</b>	<i>CTNNB1</i> c.94G>A (p.D32N) - - c.122C>T (p.T41I)	<i>CTNNB1</i> c.94G>A (p.D32N) <b>c.98C&gt;T (p.S33F)</b> <b>c.101G&gt;A (p.G34E)</b> c.122C>T (p.T41I)
<b>Ratón 8</b>	<i>CTNNB1</i> c.94G>A (p.D32N) c.101G>A (p.G34E) c.110C>T (p.S37F) c.122C>T (p.T41I)	<i>CTNNB1</i> c.94G>A (p.D32N) c.101G>A (p.G34E) c.110C>T (p.S37F) c.122C>T (p.T41I)
<b>Ratón 10</b>	<i>CTNNB1</i> c.94G>A (p.D32N) c.101G>A (p.G34E)	<i>CTNNB1</i> c.94G>A (p.D32N) c.101G>A (p.G34E)
<b>Ratón 16</b>	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) - c.122C>T (p.T41I)	<i>CTNNB1</i> <b>c.98C&gt;T (p.S33F)</b> c.101G>A (p.G34E) <b>c.110C&gt;T (p.S37F)</b> c.122C>T (p.T41I)

## 5.7 E-ice-COLD-PCR

### 5.7.1 Determinación de la Tc

Para definir la temperatura óptima de desnaturalización del alelo mutante (Tc), necesaria para el enriquecimiento selectivo de los productos tumorales, se realizó un análisis de fusión a alta resolución (HRMA). Con esta estrategia experimental es posible diferenciar las temperaturas de desnaturalización de los alelos silvestre y mutante.



**Figura 14. Determinación de la Tc para CTNNB1 y KRAS.** a) HRMA de CTNNB1 usando alelo silvestre, mutante y la combinación equimolar de ambos con la SB. b) Análisis estadístico de HRMA para CTNNB1. c) HRMA de KRAS usando alelo silvestre, mutante y la combinación equimolar de ambos con la SB. d) Análisis estadístico de HRMA para KRAS. Los datos son presentados como la media  $\pm$  SD y analizados por ANOVA de una vía, seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. \*  $p < 0.05$  \*\*\*  $p < 0.001$

La  $T_c$  de *CTNNB1*, usando HRMA fue de  $84.16^\circ\text{C}$  para el alelo silvestre-SB y  $83.34$  para el alelo mutante-SB, existiendo una diferencia en la temperatura de fusión ( $\Delta T_m$ ) de  $0.82^\circ\text{C}$ . Para *KRAS* la  $T_c$  del alelo silvestre-SB fue de  $81.47^\circ\text{C}$  y para *KRAS* alelo mutante-SB de  $80.84^\circ\text{C}$ , existiendo una  $\Delta T_m$  de  $0.63^\circ\text{C}$  (Figura 14). Con estos resultados se estableció la  $T_c$  para *CTNNB1* de  $83.3^\circ\text{C}$  y para *KRAS* de  $80.8^\circ\text{C}$ .

### 5.7.2 Detección de mutaciones de DNA tumoral mediante E-ice-COLD-PCR y por secuenciación masiva

Para evaluar el enriquecimiento de los alelos mutantes en *CTNNB1* y *KRAS*, y comparar la metodología de E-ice-PCR con la PCR de punto final, se usaron 5 muestras tumorales, previamente caracterizadas por secuenciación tipo Sanger y por la plataforma Illumina mediante PCR de punto final. Se realizó la amplificación de estas muestras por E-ice-COLD-PCR, empleando la  $T_c$  obtenida por HRMA (ver 5.7.1) usando una concentración final de  $50\text{ nM}$  de la SB para ambos genes y con una profundidad de  $50,000\text{X}$  para la secuenciación masiva.

Se observó un enriquecimiento cercano a las 2 veces en los alelos mutantes de *CTNNB1* en los codones 32, 33, 34 y 41 (figura 15 y anexo 3). También en *KRAS* se obtuvo un enriquecimiento de 2 veces para los alelos mutantes en el codón 12.

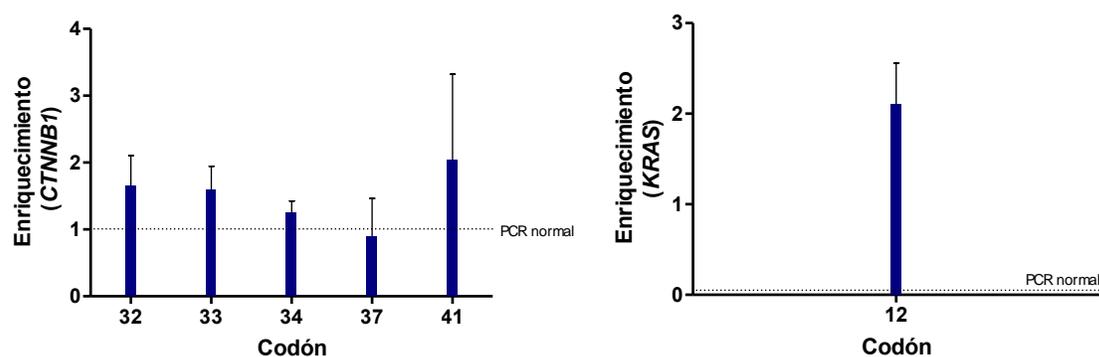


Figura 15. Enriquecimiento de alelos mutantes en *CTNNB1* y *KRAS* con E-ice-COLD-PCR. En la figura se observa un nivel de enriquecimiento en los codones 32, 33, 34 y 41 de *CTNNB1* y codón 12 para *KRAS*.

### 5.7.3 Detección de mutaciones de cfDNA mediante PCR de punto final, E-ice-COLD-PCR y secuenciación masiva

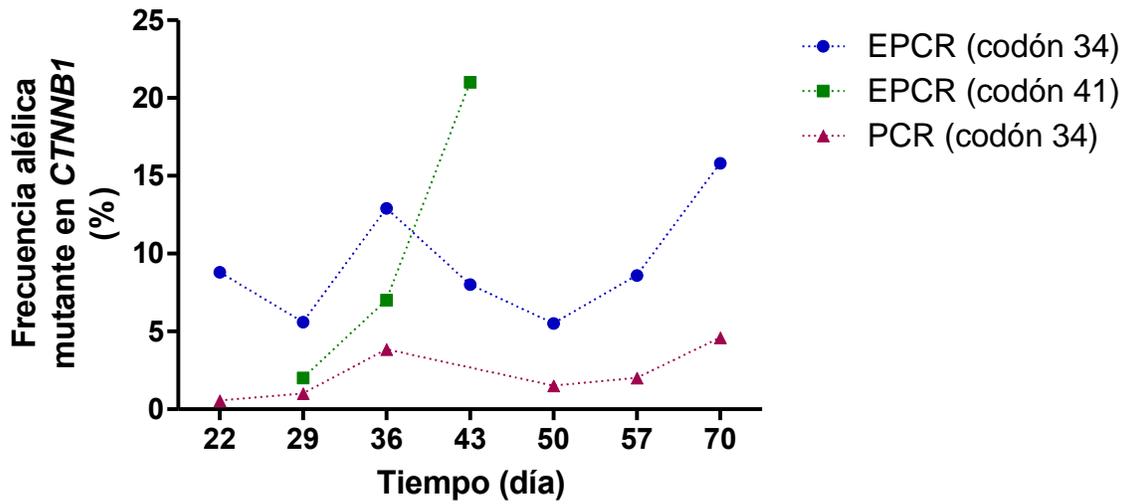
Una vez que se determinó el enriquecimiento de los alelos mutantes en *CTNNB1* y *KRAS* en el DNA tumoral mediante E-ice-COLD-PCR, se hizo la amplificación de dichos *loci* a partir del cfDNA obtenido de las muestras de plasma de ratones tratados con AOM/DSS. Se amplificaron tres muestras de cfDNA de cada tiempo por (i) PCR de punto final y por (ii) E-ice-COLD-PCR. Los productos de ambas metodologías se secuenciaron en la plataforma Illumina con una profundidad promedio de 150,000X.

El método de E-ice-COLD-PCR permitió detectar 41 mutaciones en ambos genes, mientras que con la PCR de punto final sólo se detectaron 24 mutaciones. Se detectaron mutaciones en *CTNNB1* en los codones 32, 33, 34, 37 y 41 en los diferentes estadios de la progresión del tumor, aún en el día 22 que corresponde a la formación de criptas aberrantes en este modelo, también se detectaron mutaciones en *KRAS* en las etapas tempranas de la formación del tumor (Tabla 10 y Anexo 3). En el análisis, se mostró que la mayoría de los ratones tienen una mutación en *CTNNB1*, excepto para el ratón 1 del día 29 y 36 donde tienen 3 y 2 mutaciones en *CTNNB1* respectivamente, así como el ratón 2 del día 57 que tiene 3 mutaciones en este mismo gen.

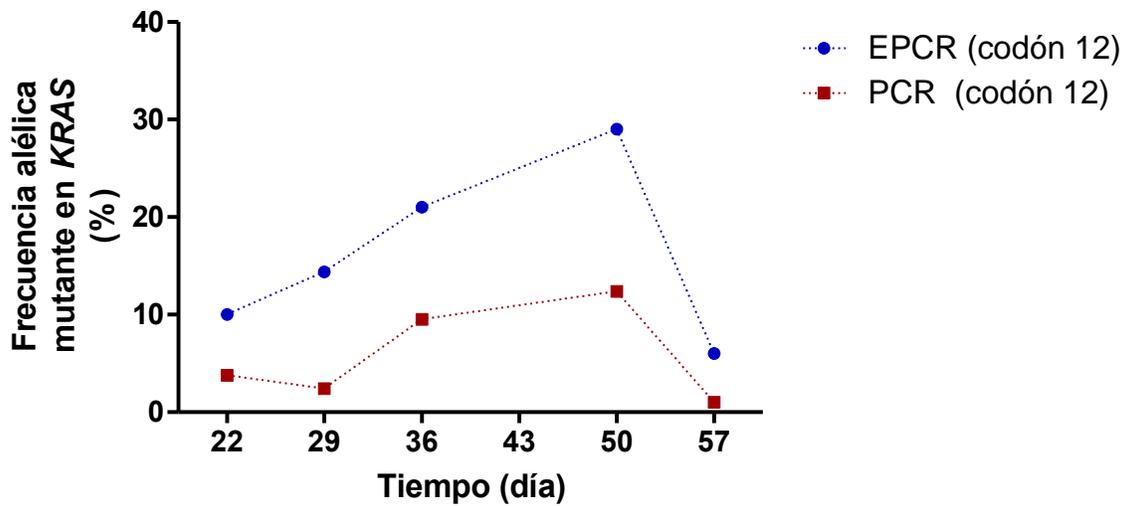
Para evaluar el grado de enriquecimiento obtenido por E-ice-COLD-PCR, se analizaron las frecuencias alélicas mutantes de *CTNNB1* (codón 34 y 41) y *KRAS* obtenidas por PCR de punto final y E-ice-COLD-PCR (Figura 16). En todas las muestras se observó un enriquecimiento mayor de la frecuencia alélica mutante mediante E-ice-COLD-PCR para ambos genes. En conjunto, estos resultados muestran que con la técnica de E-ice-COLD-PCR es posible detectar más alelos mutantes y obtener frecuencias alélicas más altas que con la PCR de punto final.

Tabla 10. Análisis de mutaciones en <i>CTNNB1</i> y <i>KRAS</i> en cfDNA por PCR de punto final, E-ice-COLD-PCR y secuenciación masiva.			
	Ratón	PCR de punto final	E-ice-COLD-PCR
Día 1	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
Día 22	1	- -	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	2	- -	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	3	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
Día 29	1	- - - -	<i>CTNNB1</i> - c.94G>A (p.D32N) <i>CTNNB1</i> - c.110C>T (p.S37F) <i>CTNNB1</i> - c.122C>T (p.T411) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	2	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	3	<i>CTNNB1</i> - c.98C>T (p.S33F) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.98C>T (p.S33F) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
Día 36	1	- - -	<i>CTNNB1</i> - c.94G>A (p.D32N) <i>CTNNB1</i> - c.122C>T (p.T411) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	2	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	3	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
Día 43	1	-	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E)
	2	-	<i>CTNNB1</i> - c.122C>T (p.T411)
	3	-	<i>CTNNB1</i> - c.122C>T (p.T411)
Día 50	1	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) -	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	2	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	3	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
Día 57	1	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	2	- - <i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.94G>A (p.D32N) <i>CTNNB1</i> - c.98C>T (p.S33F) <i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
	3	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E) <i>KRAS</i> - c.35G>A(p.G12D)
Día 70	1	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E)
	2	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E)
	3	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E)	<i>CTNNB1</i> - c.101G>A (p.G34E)

a)



b)



**Figura 16. Frecuencia alélica mutante durante la progresión del tumor.** a) Comparación de frecuencia alélica mutante obtenida por PCR de punto final y E-ice-COLD-PCR para *CTNNB1*. b) Comparación de frecuencia alélica mutante obtenida por PCR de punto final y E-ice-COLD-PCR para *KRAS*.

## 6. Discusión

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. La OMS en el 2014 reportó 1.3 millones nuevos casos de CCR en todo el mundo (Ferlay et al., 2015). En el año 2013, se estimó que 771,000 personas murieron por CCR, haciendo esta enfermedad la cuarta causa más común de muerte relacionada a cáncer en todo el mundo, después de las neoplasias de pulmón, hígado y estómago (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015).

La alta tasa de mortalidad del CCR se debe principalmente a su detección tardía, ya que es una neoplasia asintomática en sus etapas iniciales, hecho que dificulta su detección temprana y tratamiento oportuno. Actualmente se dispone de pruebas de tamizaje basadas en la detección de sangre oculta en heces, dichos métodos tienen baja sensibilidad y especificidad en comparación con las pruebas de detección de cáncer y lesiones avanzadas por imagenología como el PET/CT y la colonoscopia, que son altamente sensibles y específicas. Aunque las pruebas de imagenología son de gran valor diagnóstico, éstas tienen las desventajas como la hospitalización obligatoria y la presentación de efectos secundarios (Lieberman, 2009; Strum, 2016). Cabe mencionar que estas pruebas de tamizaje y de detección de lesiones avanzadas sólo permiten identificar los efectos patogénicos en el colon producidos por el crecimiento tumoral y el daño a nivel histológico, respectivamente.

Con el descubrimiento de las bases etiopatogénicas del desarrollo de CCR se han propuesto métodos de detección molecular alternativos, basados en la detección de alteraciones genéticas en los oncogenes y genes supresores de tumor que son los responsables de la iniciación y desarrollo de esta neoplasia (Network, 2012; Vogelstein et al., 2013).

En este trabajo se usó un modelo bien establecido de carcinogénesis química inducida en ratones para recapitular todo el proceso etiopatogénico, desde su inicio hasta la etapa localmente avanzada, tal y como se observa en humanos. De esta forma nos fue posible evaluar las alteraciones moleculares presentes desde

los estadios iniciales en la formación del tumor, la formación del carcinoma *in situ* y las etapas localmente avanzadas (De Robertis et al., 2011; Tanaka et al., 2003). El AOM es un agente carcinógeno que se metaboliza para producir el compuesto activo ión metildiazonio e inducir alquilación en las bases del DNA en el epitelio del colon. Este proceso genera las mutaciones en *CTNNB1* y *KRAS*. El DSS es un agente inflamatorio que causa daño en las células del epitelio del colon e inflamación (Marrero et al., 2000; Ni et al., 1996; Perše and Cerar, 2012). Ambos eventos: la exposición a mutágenos y la inflamación crónica son los principales factores de riesgo en el CCR humano (Kuipers et al., 2015). En varios estudios se ha reportado que la administración continua de DSS durante el tratamiento en ratones causa diarrea, inflamación, sangrado anal, protusión anal y pérdida de peso (Ledesma-Soto et al., 2015; Tanaka et al., 2003; Urrutia-Ortega et al., 2016). Estos mismos signos clínicos fueron observados en nuestro experimento al finalizar cada ciclo de tratamiento con DSS.

Todos los ratones que fueron tratados con AOM/DSS desarrollaron tumores como previamente se ha descrito (Ledesma-Soto et al., 2015; Tanaka et al., 2003; Urrutia-Ortega et al., 2016). La mayor parte de los tumores fueron localizados en la parte distal del colon, como comúnmente se observa en CCR humano (Vogelstein., et al 1988).

Las pruebas de imagenología molecular son usadas en la clínica para el diagnóstico y la estadificación precisa de CCR, a fin de tomar decisiones terapéuticas óptimas para los pacientes. En este estudio usamos por primera vez en este modelo la prueba microPET/CT para seguir el crecimiento del tumor. Con esta estrategia se detectó la presencia del tumor a partir del día 36 del inicio del tratamiento. En el modelo AOM/DSS estos días corresponden a la transición de microadenomas a adenoma, eventos tempranos en el desarrollo de la neoplasia colorrectal (Tanaka et al., 2003). La resolución espacial de la microPET/CT es de 1.5 mm, es decir, lesiones o alteraciones histomorfológicas por debajo de este tamaño no son detectables con este método. Los FCA son las primeras lesiones de la mucosa colónica en el inicio de la carcinogénesis del CCR, cuya medida es

menor de 1 mm de tamaño, por lo que no fue posible la detección del CCR en los estadios más iniciales mediante microPET/CT en este trabajo. Este hecho resalta la necesidad de desarrollar e implementar métodos más sensibles de detección, como los métodos moleculares basados en la determinación de alteraciones genética en ácidos nucleicos tumorales como el ctDNA presente en el plasma.

Se ha demostrado en varios estudios que existe una correlación entre los niveles del cfDNA con la carga tumoral (Bettegowda et al., 2014; Diehl et al., 2005, 2008) y la inflamación crónica (Heitzer et al., 2013; Schwarzenbach et al., 2011). En este trabajo se observó un aumento constante de la concentración plasmática del cfDNA a lo largo del desarrollo tumoral. Así, el tamaño del tumor y la inflamación crónica en este modelo, influenciaron los niveles del cfDNA en el plasma, tal y como se observa en pacientes.

En el presente estudio de carcinogénesis inducida en ratones, las mutaciones en *CTNNB1* fueron encontradas en todas las muestras de DNA tumoral empleando secuenciación tipo Sanger, como previamente se ha reportado (Takahashi et al., 2000b, 2000a). Las mutaciones estuvieron presentes en los codones 32, 33, 34, 37 y 41. Todas las mutaciones fueron transiciones G:C → A:T, lo cual es consistente con el patrón de mutaciones descrito para los agentes alquilantes, que generan las transiciones G>A y C>T (Petljak and Alexandrov, 2016). En los tumores, los análisis genéticos mostraron que en *CTNNB1* se presentan más de dos mutaciones en el 70% de las muestras (14/20 ratones). Lo anterior sugiere que en este modelo ocurre el fenómeno de heterogeneidad intratumoral, en el cual múltiples subclonas que contienen distintos alelos mutantes coexisten en la masa tumoral (Sadanandam et al., 2013; Uchi et al., 2016). Así mismo, se encontraron tumores con hasta cuatro alelos distintos de *CTNNB1*. Este es el primer estudio que demuestra la policlonalidad tumoral de este modelo, fenómeno que también ha sido identificado en los pacientes humanos con CCR, y que representa una ventaja experimental importante del modelo AOM, ya que la policlonalidad es una de las determinantes patogénicas asociadas a la resistencia al tratamiento y al mal pronóstico en esta enfermedad (Sadanandam et al., 2013; Uchi et al., 2016).

Para evaluar las mutaciones por secuenciación masiva en *CTNNB1* y *KRAS* en las muestras de DNA tumoral se seleccionaron 5 muestras: ratón 1, 3, 8, 10 y 16. En comparación con la secuenciación tipo Sanger, la estrategia de secuenciación masiva mejoró la determinación de alelos mutantes, ya que se detectaron 3 mutaciones adicionales en las muestras de tejido tumoral.

El uso de cfDNA para detección de alteraciones moleculares de manera no invasiva es un campo que ha tenido un aumento sustancial en el número de publicaciones y de nuevos métodos con aplicación potencial en la oncología clínica. Sin embargo, las alteraciones moleculares presentes en el cfDNA en los estadios iniciales son marginales, con frecuencias alélicas tumorales menores del 0.1%. La baja proporción de moléculas tumorales mutantes presentes en el plasma representa un reto para la detección mediante métodos convencionales.

Para atender esta problemática, en este trabajo, se implementó un método denominado E-ice-COLD-PCR, el cual permite el enriquecimiento selectivo de mutaciones presentes en las muestras de cfDNA con frecuencias alélicas mutantes <0.1%. Para aumentar la eficiencia en la detección el enriquecimiento por E-ice-COLD-PCR se integró a la detección cuantitativa por secuenciación masiva. La característica principal del E-ice-COLD-PCR es el uso de una temperatura crítica donde se desnaturalizan preferencialmente los alelos mutantes y la incorporación de una sonda bloqueadora que contiene LNAs. Los LNAs permiten maximizar la diferencia de  $T_m$  del alelo mutante y silvestre, haciendo que se desnaturalicen preferencialmente los alelos mutantes a temperaturas más bajas y se amplifiquen exponencialmente (How Kit et al., 2013; How-Kit et al., 2014; You et al., 2006). Para llevar a cabo la metodología de E-ice-COLD-PCR se definió experimentalmente la  $T_c$  del alelo silvestre y mutante mediante HRMA. Se observó que la incorporación de la SB maximiza la diferencia de la  $T_m$  entre el alelo silvestre y mutante cuando se compara con la desnaturalización simple de estas moléculas sin emplear SB. De esta manera la sonda bloqueadora mejora la  $T_m$  del alelo mutante contra el alelo silvestre, hecho indispensable para el enriquecimiento selectivo.

En nuestros análisis evaluamos el nivel de enriquecimiento en *CTNNB1* y *KRAS* usando E-ice-COLD-PCR y PCR de punto final. La E-ice-COLD-PCR mostró un mayor enriquecimiento de los alelos mutantes, principalmente los codones 32, 33, 34 y 41 de *CTNNB1*. En el caso de *KRAS* se observó un enriquecimiento selectivo en el codón 12, superior también con el E-ice-COLD-PCR. Importantemente, mutaciones en *KRAS* que no se habían detectado por PCR de punto final y secuenciación Sanger, fueron detectadas mediante el empleo de E-ice-COLD-PCR y secuenciación masiva. Dichas mutaciones presentaron frecuencias alélicas <3%, valor que inferior al límite de detección de la secuenciación tipo Sanger (20%; Tsiatis et al., 2010). Lo anterior demuestra la limitación para la detección de mutaciones en *KRAS* mediante este método, a diferencia de la secuenciación masiva que puede detectar frecuencias alélicas menores del 2% (Bidard et al., 2013; Couraud et al., 2014). Para ambos genes se obtuvo un enriquecimiento de hasta 2 veces empleando E-ice-COLD-PCR, en comparación con la PCR de punto final.

Para aprovechar el fenómeno de la liberación de los ácidos nucleicos tumorales a la circulación sanguínea en la detección temprana de la enfermedad, se evaluaron las mutaciones presentes en *CTNNB1* y *KRAS* en el cfDNA –a manera de biopsia líquida-, empleando el método de E-ice-COLD-PCR y PCR de punto final, ambos acoplados con secuenciación masiva. Se detectaron mutaciones desde el día 22 en *CTNNB1* y *KRAS*. En estos días las alteraciones histopatológicas en este modelo corresponden a la formación de FCA, los eventos más tempranos del CCR detectables a nivel histológico. En comparación con el microPET/CT, el uso de biopsias líquidas permitió una detección más temprana, de hasta 15 días antes de la detección por microPET/CT. Este periodo corresponde a cerca de 5-10 años en pacientes humanos, lo cual representa una ventaja verdadera en la detección de esta enfermedad (Jones et al., 2008).

Anteriormente, se ha demostrado la detección de *CTNNB1* y *KRAS* a partir de FCA usando ratas F344 tratadas con AOM en muestras de DNA extraído de tejido tumoral (Takahashi et al., 2000b; Vivona et al., 1993). Sin embargo, en ningún

modelo murino se habían determinado mutaciones usando biopsias líquidas de cfDNA. Este trabajo reafirma la posibilidad de detectar mutaciones en estadios iniciales mediante el uso de metodologías de enriquecimiento selectivo y secuenciación masiva de biopsias líquidas para el diagnóstico temprano de alteraciones presentes en CCR de una manera no invasiva. La estrategia de caracterización de biopsias líquidas por enriquecimiento selectivo de alelos mutantes y secuenciación masiva tiene un potencial importante para complementar los análisis de tamizaje e imagenología que ya se emplean actualmente en la clínica.

En la práctica clínica el uso de DNA tumoral obtenido a partir de biopsias de tejido es considerado el estándar dorado para la genotipificación y diagnóstico dirigido, sin embargo, estas prácticas están siempre asociadas a complicaciones debidas a los procedimientos quirúrgicos y en algunos pacientes con cáncer la toma de tejido tumoral es inaccesible. Otro problema del empleo de biopsias es que, al ser muestras pequeñas de tejido, la heterogeneidad subclonal tumoral puede no estar representada en los análisis moleculares, teniendo como consecuencia la selección de terapias no efectivas (Gerlinger et al., 2012). Sin embargo, la potencialidad del cfDNA para capturar la heterogeneidad subclonal y proporcionar la misma información molecular que el tejido tumoral, así como su fácil acceso, ha hecho que el desarrollo de metodologías de análisis de biopsias líquidas sea una de las áreas con mayor interés en la oncología clínica (Bettegowda et al., 2014; Siravegna et al., 2015).

Existe evidencia experimental que apoya el uso del cfDNA para la detección temprana de cáncer, así como para monitoreo de la enfermedad y para la evaluación de la enfermedad mínima residual (Bettegowda et al., 2014; Murtaza et al., 2013). Estas ventajas hacen del uso de biopsias líquidas un marcador molecular altamente específico y con un amplio rango dinámico que se correlaciona con la carga tumoral, a diferencia de los marcadores convencionales como las proteínas. Por ejemplo, los antígenos CAE y CA-153, empleados en el seguimiento del CCR, son más estables que el cfDNA y tienen

menor intervalo dinámico, por lo que no permiten detectar cambios en tiempo real a la velocidad del crecimiento del tumor (García-Murillas et al., 2015). Además las mutaciones presentes en el cfDNA están presentes en individuos con cáncer con un amplio rango dinámico que van desde 1% hasta arriba del 50% del total del cfDNA libre en los estadios iniciales y avanzados, respectivamente (Bettegowda et al., 2014; Diehl et al., 2008; Garcia-Murillas et al., 2015; Murtaza et al., 2013).

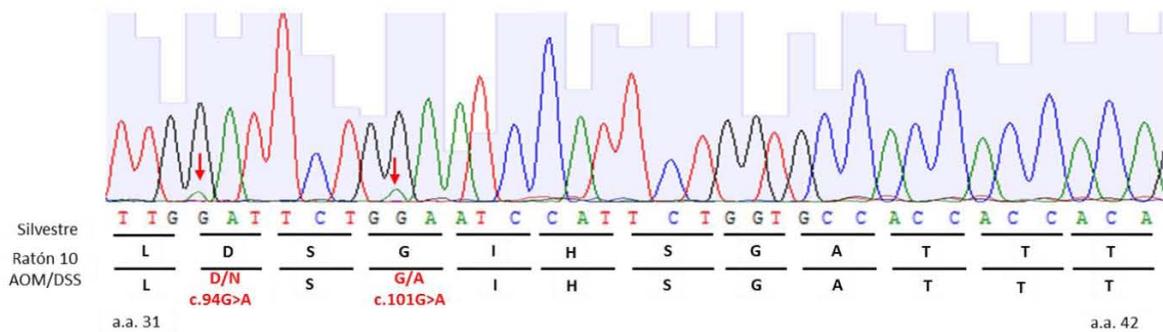
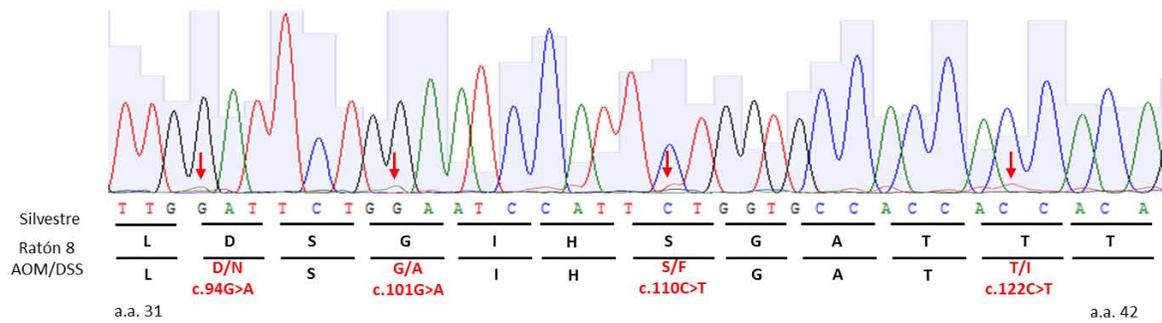
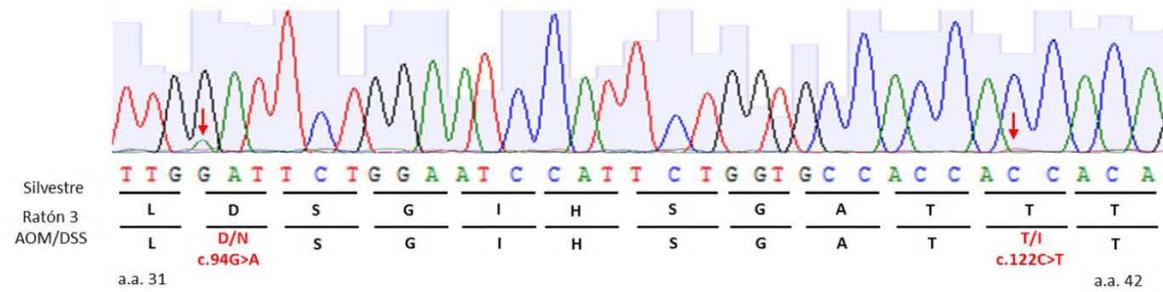
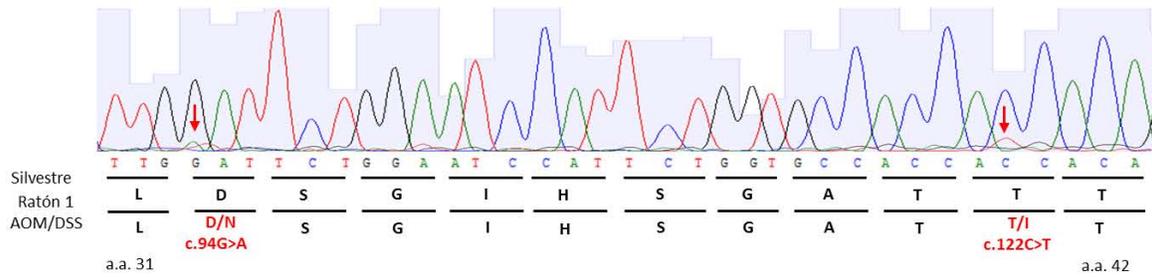
Con este trabajo se demuestra que la estrategia de enriquecimiento selectivo por E-ice-COLD-PCR acoplado a la secuenciación masiva puede ser usada para mejorar la detección del CCR empleando biopsias líquidas, aún en los estadios más tempranos de la neoplasia, donde los métodos convencionales como la imagenología avanzada no permiten realizar la detección de la enfermedad.

## 7. Conclusiones

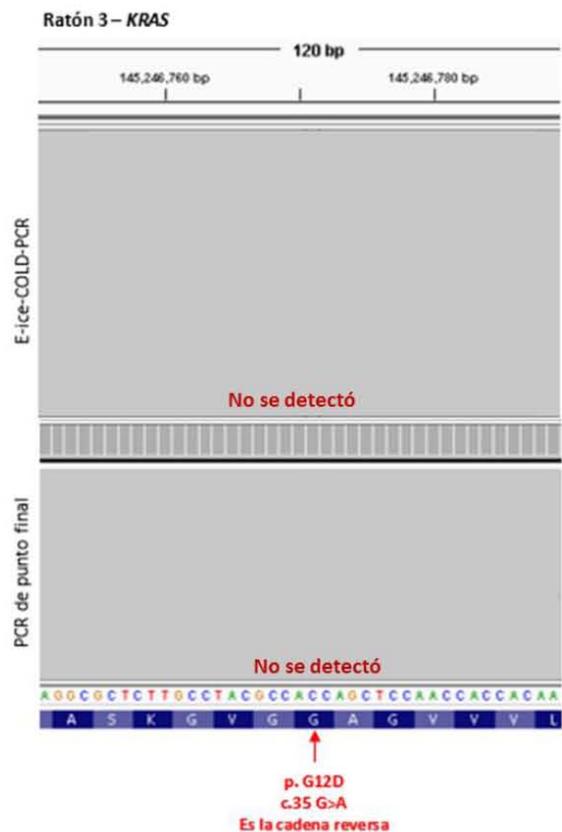
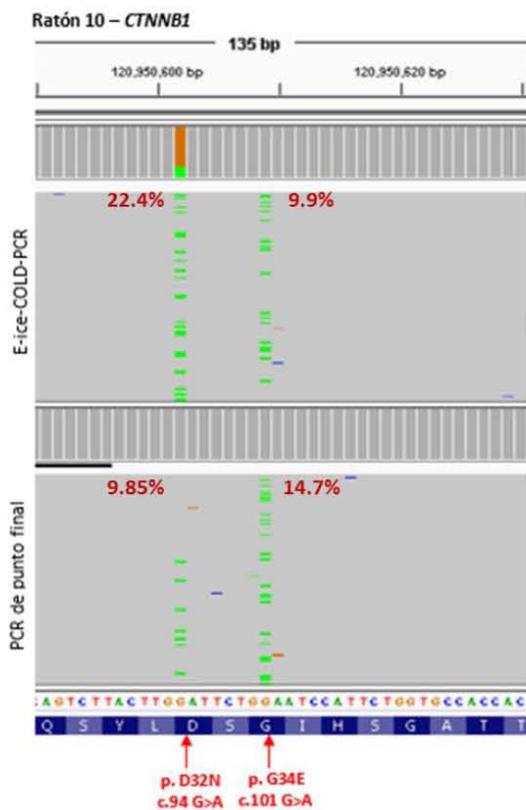
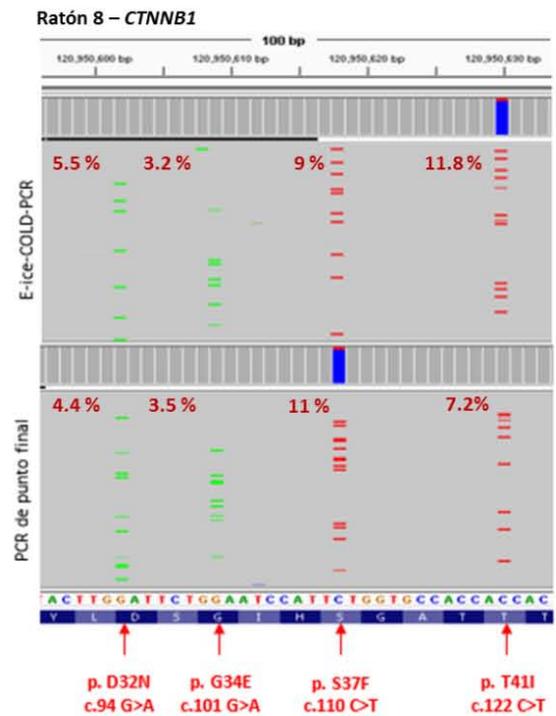
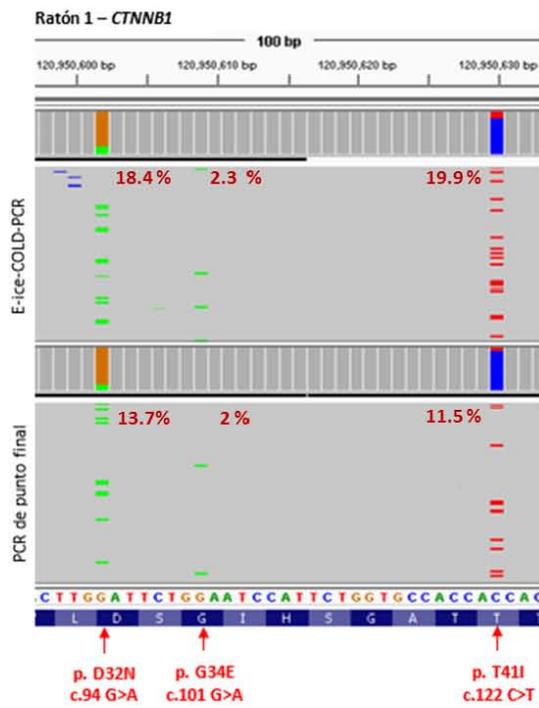
1. Se implementó el modelo de carcinogénesis inducida con AOM/DSS en ratones BALB/c en nuestro laboratorio.
2. Todos los ratones tratados con AOM/DSS desarrollaron tumores con una media de  $9.78 \pm 4.08$  tumores por cada ratón.
3. Se detectaron tumores en los ratones tratados con AOM/DSS desde el día 36 del inicio del tratamiento con pruebas de imageneología molecular usando FDG. Estos días corresponden a la transición de microadenomas a adenomas en este modelo *in vivo*.
4. Se observó un aumento en la concentración plasmática de cfDNA durante la progresión del tumor.
5. Se detectaron mutaciones en el DNA tumoral con una frecuencia del 100% en *CTNNB1* en diferentes codones 32, 33, 34, 37 y 41 y 0% en *KRAS*, usando PCR de punto final, secuenciación tipo Sanger y secuenciación masiva.
6. Todas las mutaciones encontradas fueron transiciones G:C → A:T.
7. Se estandarizó la técnica de E-ice-COLD-PCR y se determinó la Tc para *CTNNB1* de 83.3°C y *KRAS* de 80.8°C. Se observó un enriquecimiento de los alelos mutantes en *CTNNB1* en los codones 32, 33, 34 y 41, y para *KRAS* en el codón 12.
8. Usando cfDNA extraído de los ratones inducidos con AOM/DSS, se detectaron las mutaciones en *CTNNB1* y *KRAS* desde el día 21 a partir del inicio del tratamiento, tiempo que corresponde a la formación de focos de criptas aberrantes.
9. El enriquecimiento selectivo por E-ice-COLD-PCR acoplado a la secuenciación masiva puede ser usado para mejorar la detección del CCR empleando biopsias líquidas, aún en los estadios más tempranos de la enfermedad.

## 8. Anexos

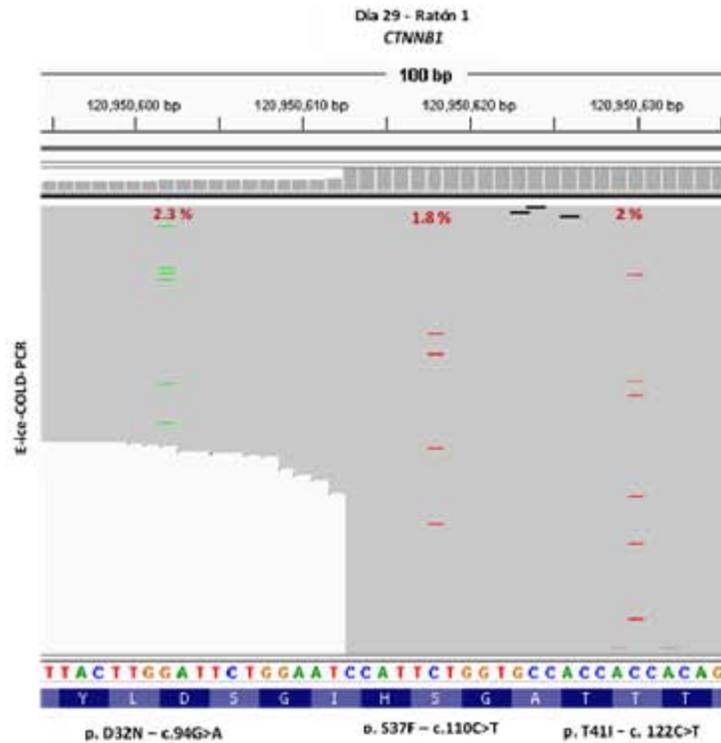
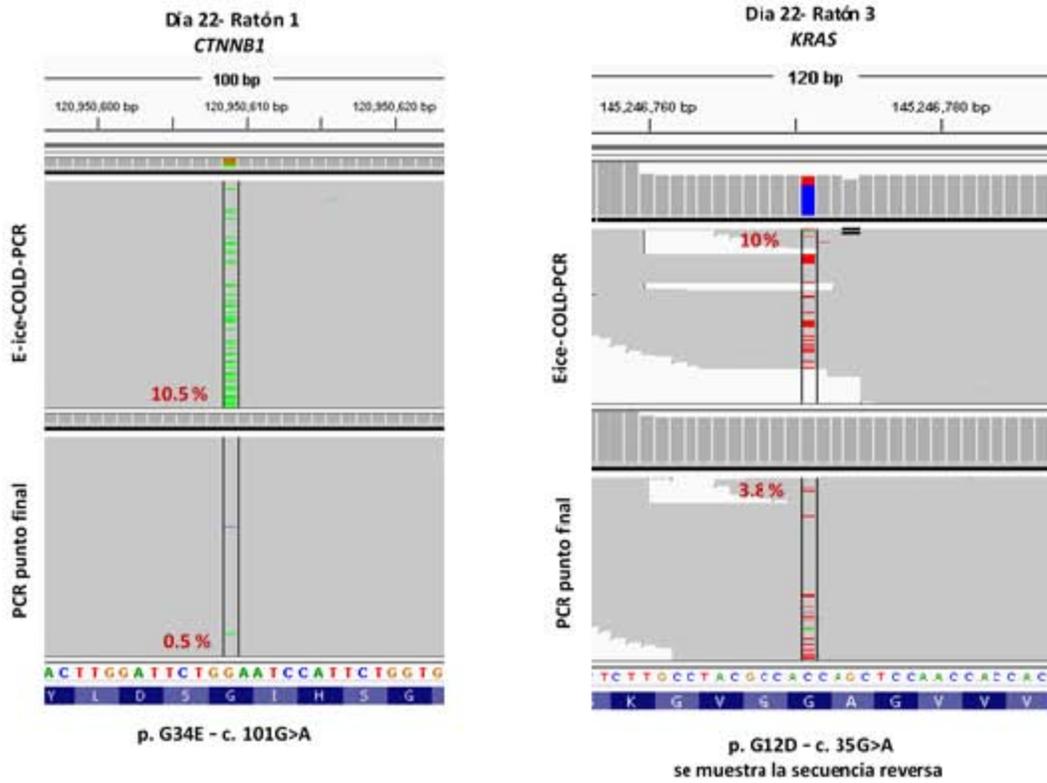
### Anexo 1. Análisis de mutaciones en *CTNNB1* y *KRAS* en muestras de tumor por PCR de punto final y secuenciación tipo Sanger

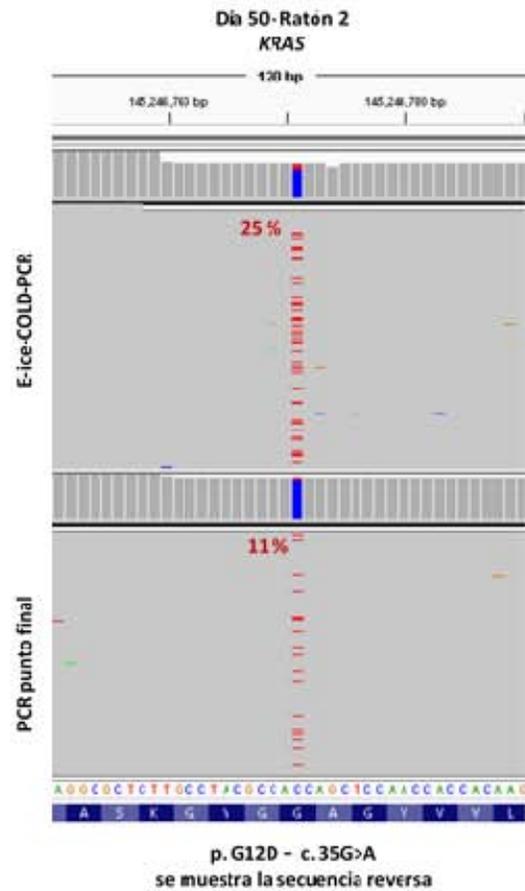
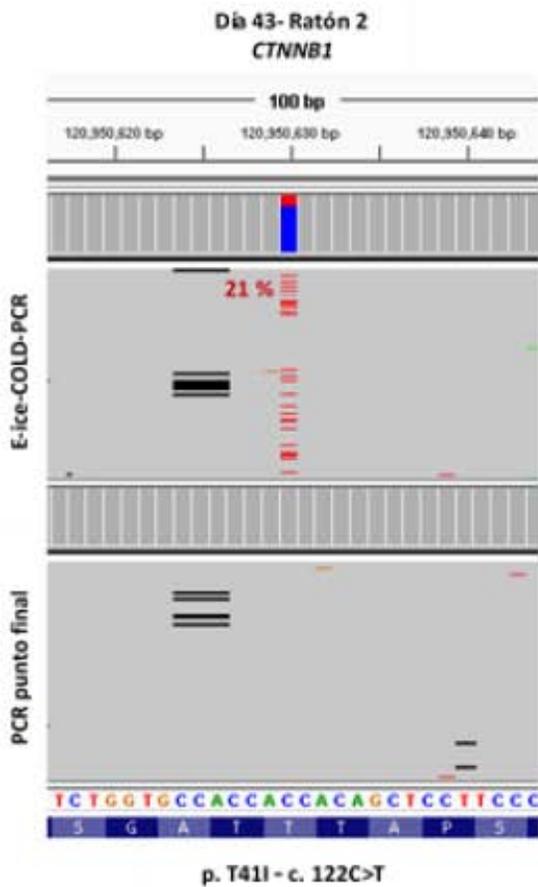
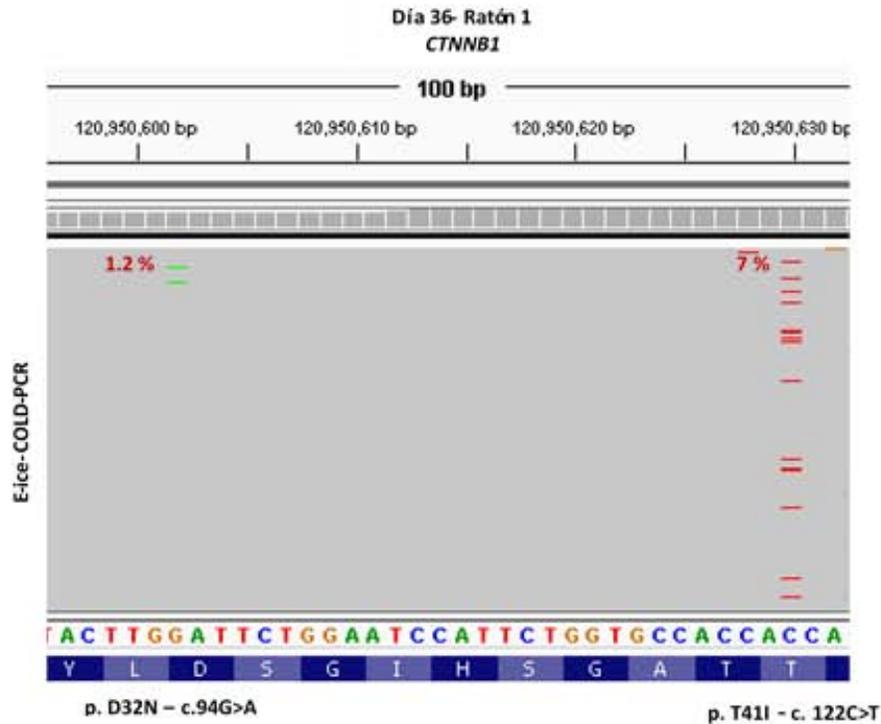


## Anexo 2. Análisis de mutaciones en *CTNNB1* y *KRAS* en muestras de tumor por PCR de punto final, E-ice-COLD-PCR y secuenciación masiva



**Anexo 3. Análisis de mutaciones en *CTNNB1* y *KRAS* en muestras de cfDNA por PCR de punto final, E-ice-COLD-PCR y secuenciación masiva**





## 9. Referencias

Allison, J.E., Sakoda, L.C., Levin, T.R., Tucker, J.P., Tekawa, I.S., Cuff, T., Pauly, M.P., Shlager, L., Palitz, A.M., Zhao, W.K., et al. (2007). Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *J. Natl. Cancer Inst.* *99*, 1462–1470.

Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S., and Vogelstein, B. (1990). p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* *50*, 7717–7722.

Beaugerie, L., and Itzkowitz, S.H. (2015). Cancers complicating inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* *372*, 1441–1452.

Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B.R., Wang, H., Luber, B., Alani, R.M., et al. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* *6*, 224ra24.

Bidard, F.-C., Weigelt, B., and Reis-Filho, J.S. (2013). Going with the flow: from circulating tumor cells to DNA. *Sci. Transl. Med.* *5*, 207ps14.

Cai, X., Janku, F., Zhan, Q., and Fan, J.-B. (2015). Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies. *Trends Genet.* *TIG 31*, 564–575.

Chowdhury, F.U., Shah, N., Scarsbrook, A.F., and Bradley, K.M. (2010). [18F]FDG PET/CT imaging of colorectal cancer: a pictorial review. *Postgrad. Med. J.* *86*, 174–182.

Clapper, M.L., Cooper, H.S., and Chang, W.-C.L. (2007). Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol. Sin.* *28*, 1450–1459.

Couraud, S., Vaca-Paniagua, F., Villar, S., Oliver, J., Schuster, T., Blanché, H., Girard, N., Trédaniel, J., Guillemainault, L., Gervais, R., et al. (2014). Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 4613–4624.

De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V.M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J. Carcinog.* *10*, 9.

Diaz, L.A., and Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *32*, 579–586.

Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L.A., Goodman, S.N., David, K.A., Juhl, H., et al. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16368–16373.

Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M.A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S.A., et al. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* *14*, 985–990.

Edge, S.B., and Compton, C.C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* *17*, 1471–1474.

Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *6*, 479–507.

Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., et al. (2011). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *22*, 1958–1972.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* *136*, E359–E386.

Gambhir, S.S. (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 683–693.

Garcia-Murillas, I., Schiavon, G., Weigelt, B., Ng, C., Hrebien, S., Cutts, R.J., Cheang, M., Osin, P., Nerurkar, A., Kozarewa, I., et al. (2015). Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci. Transl. Med.* *7*, 302ra133.

GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond. Engl.* *385*, 117–171.

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* *366*, 883–892.

Grady, W.M., and Markowitz, S.D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *3*, 101–128.

Heitzer, E., Auer, M., Ulz, P., Geigl, J.B., and Speicher, M.R. (2013). Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med.* *5*, 73.

Hewish, M., Lord, C.J., Martin, S.A., Cunningham, D., and Ashworth, A. (2010). Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *7*, 197–208.

How Kit, A., Mazaleyrat, N., Daunay, A., Nielsen, H.M., Terris, B., and Tost, J. (2013). Sensitive detection of KRAS mutations using enhanced-ice-COLD-PCR mutation enrichment and direct sequence identification. *Hum. Mutat.* *34*, 1568–1580.

How-Kit, A., Lebbé, C., Bousard, A., Daunay, A., Mazaleyrat, N., Daviaud, C., Mourah, S., and Tost, J. (2014). Ultrasensitive detection and identification of BRAF V600 mutations in fresh frozen, FFPE, and plasma samples of melanoma patients by E-ice-COLD-PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* *406*, 5513–5520.

Jones, S., Chen, W.-D., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerenwinkel, N., Antal, T., Traulsen, A., Nowak, M.A., Siegel, C., Velculescu, V.E., et al. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 4283–4288.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* *87*, 159–170.

Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., and Tanaka, T. (2005). Beta-Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* *96*, 69–76.

Kuipers, E.J., Grady, W.M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J.J., Boelens, P.G., Velde, C.J.H. van de, and Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* *1*, 15065.

Ledesma-Soto, Y., Callejas, B.E., Terrazas, C.A., Reyes, J.L., Espinoza-Jiménez, A., González, M.I., León-Cabrera, S., Morales, R., Olguín, J.E., Saavedra, R., et al. (2015). Extraintestinal Helminth Infection Limits Pathology and Proinflammatory Cytokine Expression during DSS-Induced Ulcerative Colitis: A Role for Alternatively Activated Macrophages and Prostaglandins. *BioMed Res. Int.* *2015*, 563425.

León-Cabrera, S., Callejas, B.E., Ledesma-Soto, Y., Coronel, J., Pérez-Plasencia, C., Gutiérrez-Cirlos, E.B., Ávila-Moreno, F., Rodríguez-Sosa, M., Hernández-Pando, R., Marquina-Castillo, B., et al. (2014). Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis. *Int. J. Biol. Sci.* *10*, 948–956.

Leslie, A., Carey, F.A., Pratt, N.R., and Steele, R.J.C. (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br. J. Surg.* *89*, 845–860.

Levin, B., Lieberman, D.A., McFarland, B., Andrews, K.S., Brooks, D., Bond, J., Dash, C., Giardiello, F.M., Glick, S., Johnson, D., et al. (2008). Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* *134*, 1570–1595.

Lieberman, D.A. (2009). Clinical practice. Screening for colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1179–1187.

- Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K., Chang, A.M., and Hjelm, N.M. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* *64*, 218–224.
- Lynch, H.T., and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *348*, 919–932.
- Mantilla, C., Mellado, I.S., Jaramillo, A.D., and Navas, M.-C.N. (2015). Mecanismos de señalización por  $\beta$ -catenina y su papel en la carcinogénesis. *CES Med.* *29*, 128.
- Marrero, J.A., Matkowskyj, K.A., Yung, K., Hecht, G., and Benya, R.V. (2000). Dextran sulfate sodium-induced murine colitis activates NF-kappaB and increases galanin-1 receptor expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *278*, G797-804.
- Megaraj, V., Ding, X., Fang, C., Kovalchuk, N., Zhu, Y., and Zhang, Q.-Y. (2014). Role of hepatic and intestinal p450 enzymes in the metabolic activation of the colon carcinogen azoxymethane in mice. *Chem. Res. Toxicol.* *27*, 656–662.
- Meyerson, M., Gabriel, S., and Getz, G. (2010). Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 685–696.
- Montgomery, J., Wittwer, C.T., Palais, R., and Zhou, L. (2007). Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nat. Protoc.* *2*, 59–66.
- Murtaza, M., Dawson, S.-J., Tsui, D.W.Y., Gale, D., Forshew, T., Piskorz, A.M., Parkinson, C., Chin, S.-F., Kingsbury, Z., Wong, A.S.C., et al. (2013). Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* *497*, 108–112.
- Network, T.C.G.A. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* *487*, 330–337.
- Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat. Protoc.* *2*, 1998–2004.
- Ni, J., Chen, S.F., and Hollander, D. (1996). Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* *39*, 234–241.
- Perše, M., and Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J. Biomed. Biotechnol.* *2012*, 718617.
- Petljak, M., and Alexandrov, L.B. (2016). Understanding mutagenesis through delineation of mutational signatures in human cancer. *Carcinogenesis* *37*, 531–540.
- Pino, M.S., and Chung, D.C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* *138*, 2059–2072.

Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* *359*, 235–237.

Rosenberg, D.W., Giardina, C., and Tanaka, T. (2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* *30*, 183–196.

Rowley, P.T. (2005). Inherited susceptibility to colorectal cancer. *Annu. Rev. Med.* *56*, 539–554.

Sadanandam, A., Lyssiotis, C.A., Homicsko, K., Collisson, E.A., Gibb, W.J., Wullschlegel, S., Ostos, L.C.G., Lannon, W.A., Grotzinger, C., Del Rio, M., et al. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat. Med.* *19*, 619–625.

Schwarzenbach, H., Stoehlmacher, J., Pantel, K., and Goekkurt, E. (2008). Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1137*, 190–196.

Schwarzenbach, H., Hoon, D.S.B., and Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 426–437.

Simi, L., Pratesi, N., Vignoli, M., Sestini, R., Cianchi, F., Valanzano, R., Nobili, S., Mini, E., Pazzagli, M., and Orlando, C. (2008). High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* *130*, 247–253.

Siravegna, G., Mussolin, B., Buscarino, M., Corti, G., Cassingena, A., Crisafulli, G., Ponzetti, A., Cremolini, C., Amatu, A., Lauricella, C., et al. (2015). Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat. Med.* *21*, 827.

Snyder, M.W., Kircher, M., Hill, A.J., Daza, R.M., and Shendure, J. (2016). Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* *164*, 57–68.

Sohn, O.S., Ishizaki, H., Yang, C.S., and Fiala, E.S. (1991). Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis* *12*, 127–131.

Sohn, O.S., Fiala, E.S., Requeijo, S.P., Weisburger, J.H., and Gonzalez, F.J. (2001). Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Res.* *61*, 8435–8440.

Solomon, L., Mansor, S., Mallon, P., Donnelly, E., Hoper, M., Loughrey, M., Kirk, S., and Gardiner, K. (2010). The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comp. Clin. Pathol.* *19*, 235–239.

Song, M., Garrett, W.S., and Chan, A.T. (2015). Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology* 148, 1244–1260.e16.

Strum, W.B. (2016). Colorectal Adenomas. *N. Engl. J. Med.* 374, 1065–1075.

Takahashi, M., Fukuda, K., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (1998). Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer Res.* 58, 42–46.

Takahashi, M., Mutoh, M., Kawamori, T., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2000b). Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 1319–1327.

Takahashi, M., Nakatsugi, S., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2000a). Frequent mutations of the beta-catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis* 21, 1117–1120.

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., and Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 94, 965–973.

Thress, K.S., Paweletz, C.P., Felip, E., Cho, B.C., Stetson, D., Dougherty, B., Lai, Z., Markovets, A., Vivancos, A., Kuang, Y., et al. (2015). Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat. Med.* 21, 560–562.

Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., Rich, R.G., Hafez, M.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., and Murphy, K.M. (2010). Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn. JMD* 12, 425–432.

Uchi, R., Takahashi, Y., Niida, A., Shimamura, T., Hirata, H., Sugimachi, K., Sawada, G., Iwaya, T., Kurashige, J., Shinden, Y., et al. (2016). Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. *PLoS Genet.* 12, e1005778.

Urrutia-Ortega, I.M., Garduño-Balderas, L.G., Delgado-Buenrostro, N.L., Freyre-Fonseca, V., Flores-Flores, J.O., González-Robles, A., Pedraza-Chaverri, J., Hernández-Pando, R., Rodríguez-Sosa, M., León-Cabrera, S., et al. (2016). Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 93, 20–31.

Vilar, E., and Gruber, S.B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 153–162.

Vivona, A.A., Shpitz, B., Medline, A., Bruce, W.R., Hay, K., Ward, M.A., Stern, H.S., and Gallinger, S. (1993). K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14, 1777–1781.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558.

Whitlock, E.P., Lin, J., Liles, E., Beil, T., Fu, R., O'Connor, E., Thompson, R.N., and Cardenas, T. (2008). Screening for Colorectal Cancer: An Updated Systematic Review (Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US)).

You, Y., Moreira, B.G., Behlke, M.A., and Owczarzy, R. (2006). Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res.* 34, e60.