

UNIVERSIDAD DE PANAMA  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGIA

***IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DEL GEN KRAS ASOCIADAS A CÁNCER  
COLORRECTAL EN LA POBLACIÓN PANAMEÑA***

LICDA. ASTRID R. ADAMES C.  
CÉDULA 8-786-142

COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TITULO DE MAESTRIA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS CON ESPECIALIZACION EN GENETICA Y B1OLOGIA  
MOLECULAR

DICIEMBRE 2017

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, que por su amor infinito y su misericordia hoy me permite concluir tan anhelada meta.

A mi hijo maravilloso Damián A. Domínguez A., mi motor, mi mayor motivación, mis ganas de seguir adelante, demostrándole siempre mi amor incondicional y poder ser un buen ejemplo para Él.

A mi querida madre, Emilia Crespo, por apoyarme en todo momento y por ser una madre ejemplar, digna de admirar.

A mi esposo Augusto C. Domínguez C., por mostrarme que con coraje y determinación se pueden lograr muchos sueños.

A mis hermanos por siempre querer lo mejor para mí, y por brindarme su apoyo cuando lo he necesitado.

Agradecida con mi asesora la Mgtr. Yaribeth Olmedo, por brindarme su amistad, guía y apoyo incondicional en cada paso de éste trabajo y por permitirme trabajar en el Laboratorio de Criopreservación y Hemato-Oncología Molecular, Servicio de Hematología del Instituto Oncológico Nacional.

A mi amiga, casi hermana; Fedora Lanzas por brindarme su apoyo incondicional, en sacar de su valioso tiempo para apoyarme cuando ya el cansancio y los compromisos estaban por vencerme; mil gracias.

A mi Directora de tesis Dra. Magally de Chial, por haber depositado su confianza en mí, para la elaboración de éste trabajo; siempre brindándome su apoyo durante cada etapa.

Y a cada persona que de una u otra forma dieron su granito de arena para que pudiese concluir éste trabajo.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>1. Cáncer colorrectal (CCR)</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Anatomía y fisiología del colon o intestino grueso y recto</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1 Colon o intestino grueso y recto</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2 Funciones del tubo digestivo</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Epidemiología del CCR</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Genética y cáncer</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Alteraciones genéticas y moleculares en CCR</b>	<b>12</b>
<b>1.4.1 Mecanismos mutacionales asociados al desarrollo de CCR</b>	<b>13</b>
<b>1.4.1.1 Mecanismos epigenéticos</b>	<b>13</b>
<b>1.4.1.2 Inestabilidad cromosómica</b>	<b>14</b>
<b>1.4.1.3 Inestabilidad de microsatélites</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Modelo genético del CCR</b>	<b>14</b>
<b>1.6 CCR hereditario y síndromes poliposos</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Genes implicados en la carcinogénesis colorrectal</b>	<b>18</b>
<b>1.7.1 Gen APC</b>	<b>18</b>
<b>1.7.1.1 Vía de señalización Wnt/<math>\beta</math>-catenina</b>	<b>19</b>
<b>1.7.1.2 Regulación de las proteínas del citoesqueleto</b>	<b>20</b>
<b>1.7.1.3 Mutación I1307K en el gen APC</b>	<b>21</b>

1.7.2 Gen TP53	22
1.7.2.1 Detención del ciclo celular en G1/S y en los límites de G2/M	23
1.7.2.2 Activación de la apoptosis	23
1.7.2.3 Senescencia	24
1.7.3 Gen DCC	24
1.7.4 BRAF	24
1.7.5 KRAS y otros protooncogenes	26
1.7.6 Otros genes relacionados con la patogénesis del CCR	27
<b>2. Gen Ras</b>	<b>29</b>
2.1 Familia de RAS	31
2.2 Proteínas RAS	31
2.3 Bioquímica del Ras	31
2.4 Regulación de la activación/desactivación de RAS GEFs y GAPs	32
2.4.1 GEFs	32
2.4.2 GAPs	33
2.5 Mecanismo de señalización de RAS mediada por receptores tirosina-quinasa (EGFR)	34
2.6 RAS y Cáncer	36
2.7 KRAS	37
2.7.1 Mutaciones en KRAS en cánceres humanos	37
2.7.2 Cáncer Colorrectal y KRAS	38
2.7.3 Técnicas de detección de KRAS	40

2.7.3.1	Secuenciación directa	40
2.7.3.2	Cribado de mutantes por PCR	42
2.7.4	Recomendaciones para la detección de KRAS	42
	<b>OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>47</b>
1	Tipo de estudio	47
2	Universo	47
3	Muestras	47
4	Criterio de Inclusión	47
5	Criterio de Exclusión	47
6	Método	47
6.1	Extracción de ADN	47
6.2	Detección de mutaciones en el oncogen K-RAS utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real	48
	<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
	<b>DISCUSION</b>	<b>60</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
	<b>CITAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>68</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Resumen de los tipos de CCR hereditarios y los síndromes poliposos relacionados	<b>17</b>
<b>Tabla 2</b>	Mutaciones en el gen K-RAS detectadas mediante el KRAS RGQ PCR kit de qiagen	<b>48</b>
<b>Tabla 3</b>	Diseño de ejecución en el bloque de carga para la evaluación de muestras de ADN	<b>50</b>
<b>Tabla 4</b>	Preparación de la mezcla maestra del ensayo control	<b>50</b>
<b>Tabla 5</b>	Disposición de la placa del Kit de KRAS	<b>51</b>
<b>Tabla 6</b>	Condiciones de los ciclos en el Rotor Gen Q	<b>51</b>
<b>Tabla 7</b>	Datos de todas las muestras analizadas	<b>54</b>
<b>Tabla 8</b>	Características demográficas del grupo de pacientes de estudio	<b>55</b>
<b>Tabla 9</b>	Representación de los resultados obtenidos	<b>55</b>
<b>Tabla 10</b>	Frecuencias de mutaciones en el gen KRAS según sexo	<b>57</b>
<b>Tabla 11</b>	Cantidad de mutaciones según rango de edad y sexo	<b>58</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Tejido intestinal normal (Sección transversal del tracto digestivo)	<b>3</b>
<b>Figura 2</b>	Etapas del Cáncer de colon	<b>5</b>
<b>Figura 3</b>	Estructura del intestino grueso	<b>7</b>
<b>Figura 4</b>	Incidencia y mortalidad de cánceres más frecuentes a nivel mundial	<b>8</b>
<b>Figura 5</b>	Modelo genético del CCR (adaptado de Fearon y Vogelstein)	<b>16</b>
<b>Figura 6</b>	Vía de señalización Wnt/B catenina y su implicación en la carcinogénesis colorrectal	<b>20</b>
<b>Figura 7</b>	Descubrimiento cronológico de Ras	<b>29</b>
<b>Figura 8</b>	Isoformas de RAS y el porcentaje de homología en la secuencia	<b>30</b>
<b>Figura 9</b>	Proceso de regulación de las proteínas Ras	<b>32</b>
<b>Figura 10</b>	Activación e inactivación de RAS catalizado por GEFs	<b>33</b>
<b>Figura 11</b>	Activación de RAS por el receptor de tirosin quinasa	<b>36</b>
<b>Figura 12</b>	Pirograma de codon 12 del gen KRAS	<b>41</b>
<b>Figura 13</b>	Gráfica de una corrida control para la evaluación del ADN de cada muestra	<b>58</b>
<b>Figura 14</b>	Gráfica de una corrida de las muestras a evaluar	<b>59</b>



## ABREVIATURAS

<b>CCR</b>	Cáncer colorrectal
<b>CCRm</b>	Cáncer colorrectal metastásico
<b>ION</b>	Instituto Oncológico Nacional
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor - Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>Anti-EGFR</b>	Anti- Epidermal growth factor receptor
<b>KRAS</b>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
<b>HRAS</b>	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog KRAS
<b>NRAS</b>	Neuroblastome RAS viral
<b>GEFs</b>	Guanine-nucleotide Exchange Factor o GEFs
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinases
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GTP</b>	Guanosin trifosfato
<b>GTPasa</b>	Guanosín trifosfatasa
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>NSAID</b>	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
<b>APC</b>	Adenomatous polyposis coli
<b>BAX</b>	Bcl-2 associated X <i>protein</i>
<b>NOX</b>	NADPH oxidase
<b>FAP</b>	Poliposis adenomatosa familiar
<b>PUMA</b>	p53 upregulated modulator of apoptosis

<b>HNPCC</b>	Síndrome de Lynch
<b>CpG</b>	Citocina-fosfato-guanina
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>WHO</b>	World Health for Organization
<b>MINSA</b>	El Ministerio de salud
<b>Genes MMR</b>	Genes Mismatch
<b>MSH2</b>	Gen Homólogo humano mutS
<b>MLH1</b>	Gen Homólogo 1 humano mutL
<b>PMS2</b>	Gen de segregación posmeiótica aumentada de tipo 2
<b>HNPCC</b>	Cáncer colorrectal hereditario no poliposo
<b>JPS</b>	Síndrome poliposo juvenil
<b>AD</b>	Autosómica dominante
<b>CHRPE</b>	Hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina
<b>PJS</b>	Síndrome de PeutzJeghers
<b>Fzd</b>	Receptores Frizzled
<b>LRP5/6</b>	Receptores de las lipoproteínas de baja densidad
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Proteína glucógeno sintasa cinasa- 3 $\beta$
<b>TCF</b>	Factor de transcripción de células T
<b>MCR</b>	Mutation cluster region
<b>PI3K</b>	Cinasa fosfatidilinositol 3
<b>BRAF</b>	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

<b>WT</b>	Wyld Type
<b>C12</b>	Codón 12
<b>C13</b>	Codón 13

## RESUMEN

El Cáncer colorrectal (CCR) es la 3ra neoplasia más común en el mundo. En Panamá, el CCR ocupa el 4to lugar de incidencia atendido en el Instituto Oncológico Nacional (ION). La tasa de cáncer por cada 100 mil habitantes en Panamá se incrementó de 8.3 a 8.8 en los últimos tres años. La vía de señalización del Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) ha sido el centro del desarrollo de nuevas dianas moleculares, ya que se sobreexpresa en el 80% de los casos de CCR. Cetuximab, es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al EGFR bloqueando su fosforilación con una actividad efectiva como terapia de primera y segunda línea para el Cáncer colorrectal metastásico (CCRM), solo o en combinación con terapia tradicional. El gen KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene) codifica una proteína implicada en la transducción de señales activada por EGFR. KRAS pierde la actividad GTPasa (Guanosin trifosfatasa) al estar mutado el gen (principalmente en codones 12 y 13 del exón 2), que conlleva a una pérdida de la regulación de la proliferación celular y a la transformación tumoral del tejido. Se realizó un estudio para detectar las mutaciones más frecuentes en el gen KRAS, en una población total de 118 pacientes, provenientes del ION, con diagnóstico de CCRM, y un promedio de edad de 63 años. Se evaluaron 7 mutaciones, en los codones 12 y 13 del exón 2 del gen KRAS, en ADN extraído de muestras de tejido de resección tumoral embebidos en parafina. La detección de mutaciones se realizó mediante PCR en tiempo real usando el KRAS RGQ PCR Kit. Se detectaron mutaciones en el gen KRAS en 43 pacientes (36.75%), siendo la mutación más frecuentes Gly12Asp (7.69%). El 16.95% de los pacientes estudiados eran menores de 50 años. La frecuencia de mutaciones encontradas en este trabajo es similar a algunas de las reportadas a nivel mundial y su detección utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real es una herramienta valiosa como parámetro pronóstico en el CCRM y para el direccionamiento del tratamiento.

Colorectal cancer (CRC) is the 3rd most common neoplasm in the world. In Panama, the CCR ranks 4th in incidence at the National Cancer Institute (ION). The cancer rate per 100 thousand inhabitants in Panama increased from 8.3 to 8.8 in the last three years. The signaling pathway of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) has been the center of the development of new molecular targets, since it is overexpressed in 80% of cases of CRC. Cetuximab is a monoclonal antibody that binds specifically to EGFR. It blocks its phosphorylation with an activity as the first and second line for metastatic colorectal cancer (mCRC), alone or in combination with traditional therapy. The KRAS gene (viral oncogene of Kirsten rat sarcoma) encodes a protein involved in signal transduction activated by EGFR. KRAS loses GTPase activity (Guanosin triphosphatase) when the gene is mutated (mainly in codons 12 and 13 of report 2), which leads to a loss of the production of cell proliferation and tumor tissue transformation. A study was conducted to detect the most frequent mutations in the KRAS gene, in a total population of 118 patients, origins of ION, diagnosis of mCRC, and an average age of 63 years. Seven mutations were evaluated, in codons 12 and 13 of exercise 2 of the KRAS gene, in DNA extracted from tumor resection tissue samples embedded in paraffin. Mutation detection was performed by real-time PCR using the KRAS RGQ PCR kit. Mutations in the KRAS gene were detected in 43 patients (36.75%), with the most frequent mutation being Gly12Asp (7.69%). 16.95% of the patients studied were under 50 years of age. The frequency of mutations in this work is similar to some of the reports worldwide and in turn the use of the real-time PCR technique is a valuable tool as a prognosis in the CCRM and for the treatment's direction.

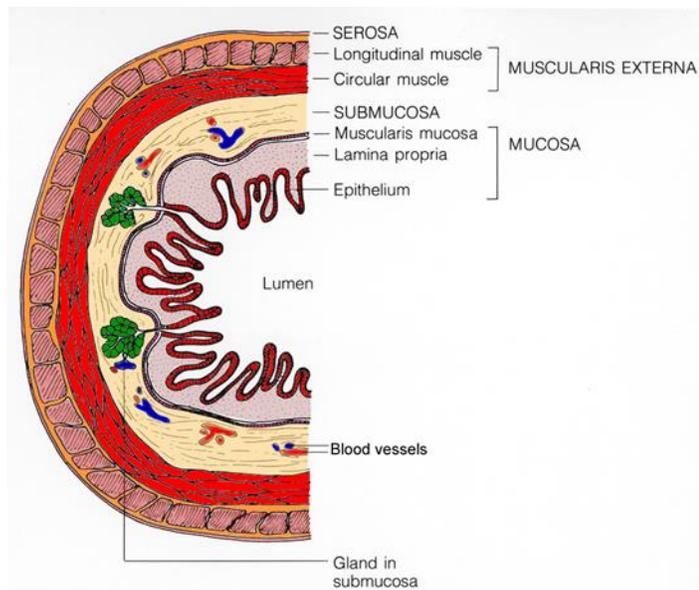
## **INTRODUCCIÓN**

## FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 1. Cáncer colorrectal (CCR)

El cáncer de colon y recto, conocido colectivamente como cáncer colorrectal (CCR), se origina cuando células normales de las paredes del colon o del recto cambian y crecen sin control, y forman una masa llamada tumor. Un tumor puede ser benigno (no canceroso) o maligno (canceroso, lo que significa que puede diseminarse a otras partes del cuerpo).

Un 95% de los cánceres colorrectales se desarrollan en las células glandulares que revisten las paredes del interior del colon y recto, (American Cancer Society, 2010). La Figura 1, muestra las capas normales del tejido intestinal.



**Figura 1.** Tejido intestinal normal (Sección transversal del tracto digestivo)

A un cáncer que comienza en una célula glandular se le conoce como un **adenocarcinoma**. El cáncer normalmente comienza en la capa más profunda del revestimiento interior y progresa lentamente a través de las otras capas. (EMORY WINSHIP CANCER INSTITUTE, 2018).

El estadio del tumor no cambia con el paso del tiempo aunque el tumor progrese. Cuando existe progresión, lo que hace el médico es añadir información que explica la situación actual del tumor, pero el estadio sigue siendo el mismo del diagnóstico.

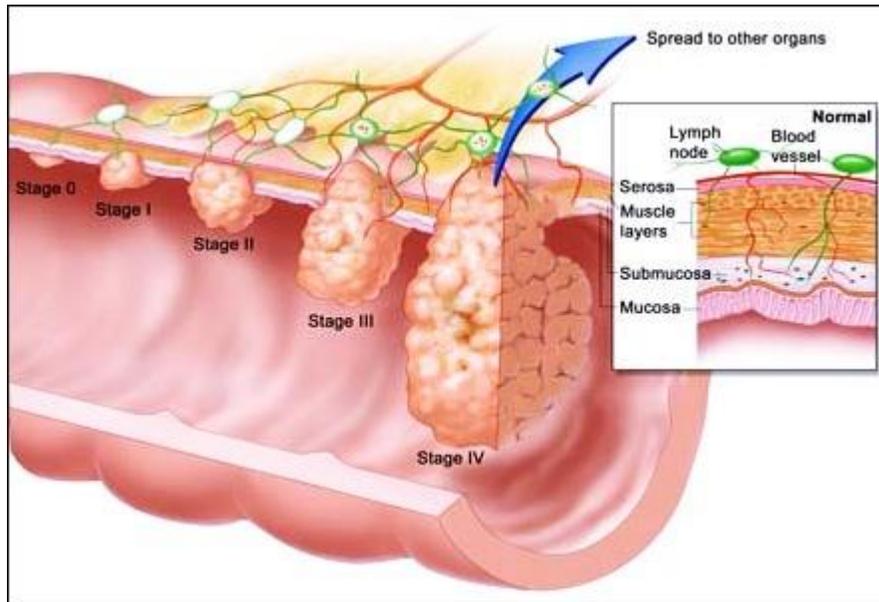
El cáncer colorrectal puede extenderse en el cuerpo de tres formas:

- **A través del tejido:** el tumor crece en profundidad e invade todas las capas del tubo digestivo. Cuando ha invadido todas las capas, puede llegar a cualquier órgano próximo o a distancia.
- **A través del sistema linfático:** afectando primero a los ganglios linfáticos más próximos y luego a los más lejanos.
- **A través de la sangre:** las células tumorales pasan a la circulación y se extienden preferentemente hacia el hígado, pulmón, hueso y cerebro.

Dependiendo del estadio en el que se encuentre el cáncer colorrectal al diagnóstico, variarán el tratamiento y el pronóstico del paciente.

<b>ESTADIO 0</b>	También conocido como <b>carcinoma in situ</b> es el más inicial y, por tanto, el de mejor pronóstico. Las células tumorales solo están presentes en las paredes internas del colon o del recto.
<b>ESTADIO 1</b>	El tumor ha atravesado la mucosa y llega hasta la capa muscular, pero no ha llegado ni a los ganglios linfáticos ni a los tejidos cercanos. Después del estadio 0, es el que tiene mejor pronóstico.
<b>ESTADIO 2</b>	El tumor ha atravesado la pared muscular del colon y puede llegar a los órganos cercanos.
<b>ESTADIO 3</b>	El tumor se ha extendido hasta alcanzar los ganglios linfáticos. Éste tiene peor pronóstico que el anterior.
<b>ESTADIO 4</b>	Es el más avanzado. En este estadio, el tumor, a través de la sangre y los ganglios linfáticos alcanza otras partes del cuerpo, como el pulmón, el hígado, la pared del abdomen o el ovario.

La supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal se relaciona con los estadios, siendo superior al 95% en el estadio 0. La supervivencia disminuye a medida que aumenta el estadio. El estadio IV es el que presenta una supervivencia menor. (ROCHE, 2018) En la figura 2 se muestra las distintas etapas del CCR.



**Figura 2.** Etapas del Cáncer de colon. Fuente: 2005 Terese Winslow

### **1.1 Anatomía y fisiología del colon o intestino grueso y recto**

El colon y el recto forman parte del sistema digestivo de nuestro cuerpo cuya función es extraer la energía que necesita nuestro organismo y formar la materia fecal a partir de los alimentos ingeridos.

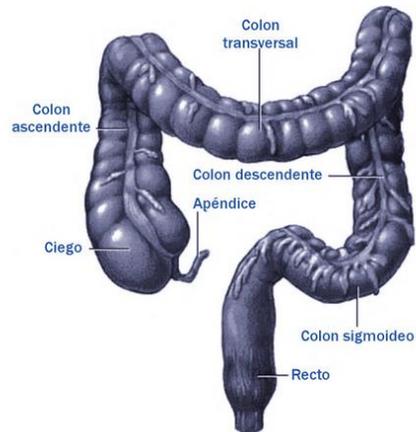
#### **1.1.1 Colon o intestino grueso y recto**

El colon es un tubo muscular que mide aproximadamente 120 centímetros y que absorbe nutrientes y agua de los alimentos ingeridos. Una vez se forma la materia fecal, ésta se dirige al recto, que está constituido por los últimos 16 centímetros de intestino grueso, y pasará al ano.

El canal anal es un tramo ubicado entre el recto y el orificio del ano que mide aproximadamente 4 centímetros. El cáncer del canal anal es una entidad diferente en cuanto a las causas y tratamiento del CCR.

El colon se divide en cuatro partes: (figura 3).

- **Colon ascendente:** Se inicia en la parte donde termina el intestino delgado y se extiende hasta el ángulo del colon que está en contacto con el hígado.
- **Colon transverso:** Es la parte del colon que comunica el ángulo hepático con el ángulo esplénico del colon.
- **Colon descendente:** Es la parte del colon localizada en el hemiabdomen izquierdo.
- **Colon sigmoide:** Constituye la última parte del colon, y la que lo unirá con el recto. Una vez termina el colon sigmoide, el intestino se introduce en la cavidad pélvica. El colon sigmoide es la parte donde con más frecuencia se desarrollan los tumores del colon.



**Figura 3.** El intestino grueso está formado por las siguientes partes: ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, colon sigmoideo y recto.

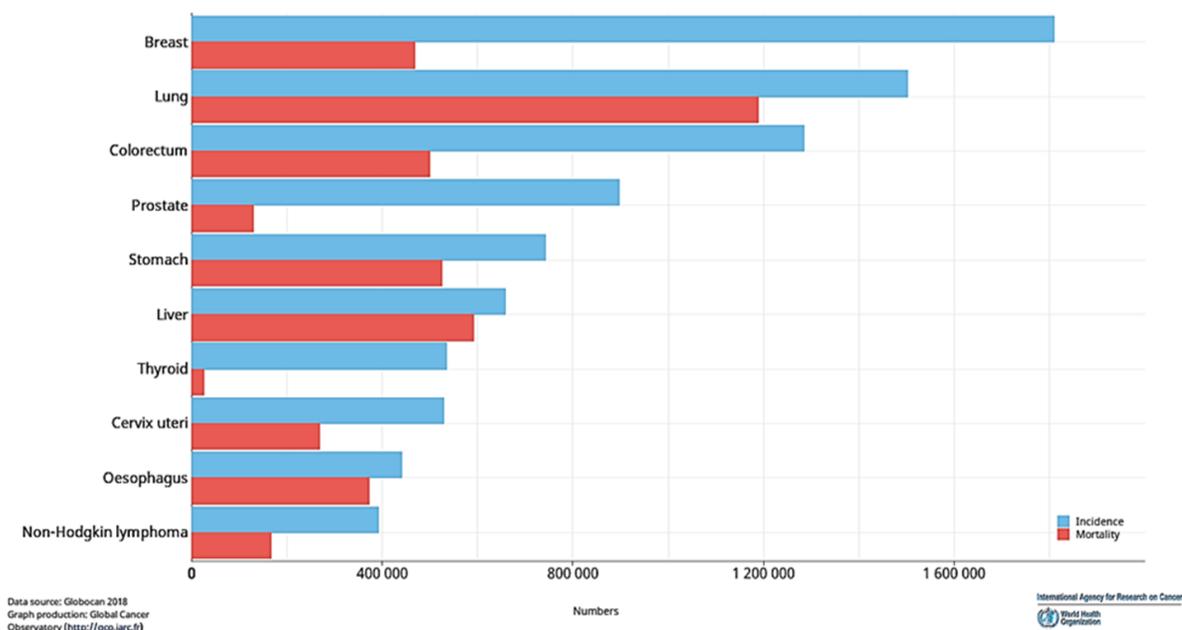
### 1.1.2 Funciones del tubo digestivo

Las funciones digestivas del colon, recto y canal anal son las siguientes:

- Absorber el 80% del agua contenida en las heces.
- Lubricar y propulsar las heces por el tubo digestivo hasta su orificio final, que es el ano.
- Almacenar las heces.
- Finalmente, evacuar las heces del cuerpo en el momento oportuno.

## 1.2 Epidemiología del CCR

El CCR es el tercer cáncer más común en hombre (743,697 casos a nivel mundial) y el segundo en las mujeres (540,510 casos a nivel mundial). Es el tercero en incidencia para ambos sexos de acuerdo al informe de la Agencia internacional para la Investigación en cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) de la Organización mundial de la salud (OMS / World Health for Organization, WHO), en su reporte global cancer statistics, 2018 (Globocan). ( Figura 4)



**Figura 4.** Incidencia y mortalidad de cánceres más frecuentes a nivel mundial.

Fuente: GLOBOCAN 2018, IARC de la Organización Mundial de la Salud.

Según la OMS, en el mundo se diagnosticarán casi 22 millones de casos de cáncer en el 2030, frente a 14 millones en 2012, debido a un fuerte incremento de la enfermedad en los países en desarrollo. En ese mismo lapso, las muertes por esta patología pasarán de 8.2

millones a 13 millones por año. Aproximadamente, el 55% de los casos se diagnóstica en regiones más desarrolladas. Las tendencias van de la mano con el aumento y el envejecimiento de la población y con la adopción creciente de hábitos riesgosos como fumar, según informe de la Agencia internacional para la Investigación en cáncer (IARC) de la OMS (Bray, y otros, 2018). El mayor impacto afectará a los países de menores recursos, muchos de los cuales están mal equipados para afrontar este incremento en los casos de cáncer según este informe, el cáncer sustituyó a las enfermedades cardiovasculares como causa principal de muerte a partir de 2011 y el número anual de diagnósticos pasó de 12,7 millones en 2008 a 14,1 millones en 2012.

También existen diferencias regionales, ya que más del 60% de los casos de cáncer y 70 % de las muertes ocurren en África, Asia, América Central y del Sur. El informe recuerda que la población global pasará de 7,000 millones de seres humanos en 2012 a unos 8,300 millones en 2025. Por lo general, el cáncer se diagnóstica a una edad más tardía en los países menos desarrollados.

En España, de la IARC de la OMS, muestran que en el 2012 se diagnosticaron 215,534 tumores y según el informe de la OMS, Globocan 2012, se calcula que en 2015 esta cifra alcanzará los 227,076 diagnósticos. El CCR sigue siendo el de mayor incidencia en España. (Bray, y otros, 2018)

En Panamá el cáncer en los hombres, el mayor número de casos se encuentra entre los 55 y 79 años de edad y en las mujeres entre los 35 y 79 años de edad.

En Panamá, el CCR ocupa el cuarto lugar de incidencia atendido en el ION.

En Panamá la frecuencia de CCR según sexo nos indica que en las mujeres ocupa el cuarto lugar con un 6.3% del total de tumores detectados en el sexo femenino y en el hombre

ocupa el tercer lugar con un 8.8% del total de tumores detectados en el sexo masculino. (Instituto Oncológico Nacional, 2016)

La tasa de cáncer por cada 100 mil habitantes en Panamá se incrementó de 8.3 a 8.8 en los últimos tres años.

Las cifras del ION indican que el 62% total de los casos está en la población entre los 50 y 70 años.

En el año 2003, cuando se empezó a detectar esta enfermedad en Panamá, solo se encontraron 79 casos. Antes de este año, esta patología no era detectada sino hasta que el paciente había fallecido.

El Ministerio de salud (MINSA) y el Instituto Oncológico Nacional (ION) reportaron en el 2009, 259 casos nuevos de CCR de un total de 5,432 pacientes. En el 2011, se registraron 235 defunciones de un total de 2,626 casos de pacientes con cáncer. En el 2012, 197 nuevos casos registrados.

El ION reportó en el 2016, 257 nuevos casos de CCR de un total de 3541 pacientes. (Instituto Oncológico Nacional, 2016)

En Panamá, 372 personas son diagnosticadas con este tumor anualmente, de los cuales fallecen 256. Ésta es una cifra asombrosa si se considera que la enfermedad es potencialmente curable cuando se diagnóstica en sus primeras etapas.

De acuerdo con cifras de la OMS, se estiman alrededor de 608,000 muertes por este padecimiento en el mundo, convirtiéndolo en la cuarta causa de fallecimientos más común por cáncer. Se calcula también que globalmente, más de 1,200,000 nuevos casos son diagnosticados por año.

El CCR puede presentarse a cualquier edad, más del 90% de los pacientes tienen más de 40 años, a partir de esa edad, el riesgo se duplica cada diez años; Además de la edad, existen otros factores de alto riesgo, entre ellos, antecedentes familiares de CCR y pólipos o de colitis ulcerosa, pólipos en el colon o cáncer en otros órganos, especialmente cáncer de mama o de útero.

Si el cáncer se detecta y trata en sus primeras etapas, entre el 80 y 90% de los pacientes recuperan una salud normal. La tasa de curación disminuye al 50% o menos cuando se diagnóstica en etapas posteriores. (Olmedo, Y., 2015)

### **1.3 Genética y cáncer**

El cáncer es la consecuencia de una serie de alteraciones genéticas que progresivamente interrumpen el mecanismo normal que controla la proliferación celular.

El cáncer colorrectal (CCR) evoluciona a través de una serie de formas histopatológicas, comenzando con áreas displásicas del epitelio del Colon, pasando a través de un estado de pólipos adematosos y finalmente progresando a un carcinoma.

Las técnicas de donación de genes han permitido a los investigadores identificar, aislar y estudiar en detalle una serie de protooncogenes, que en su forma mutante (oncogenes) imparten un carácter maligno a las células. Los protooncogenes son genes que codifican para proteínas del genoma humano, están compuestos de una región reguladora y una estructural. La primera modula la transcripción de la segunda en respuesta a un estímulo, mientras que la segunda codifica la secuencia aminoacídica para la proteína en cuestión. Estos genes están implicados en el control de la proliferación, cambios en su región promotora y estructural pueden activar el protooncogén convirtiéndolo en oncogén.

Los diversos cambios genéticos que activan a los oncogenes, incluyendo las mutaciones puntuales y los rearrreglos cromosómicos a gran escala, son detectables en los genomas de las células tumorales, pero no en el genoma de las células de tejido normal adyacentes.

Estas lesiones genéticas se derivan de una célula dentro del tejido blanco, la cual se convierte en el ancestro de la población total del tumor completo, dichas mutaciones somáticas no tienen efecto en las células germinales y no son transmitidas genéticamente a la progenie del organismo afectado. (Weinberg RA, 1994)

Trabajos más recientes han identificado la existencia de otros tipos de genes supresores de tumor, inicialmente conocidos como antioncogenes, los cuales juegan una función igualmente importante en la patogénesis del cáncer humano.

A los genes supresores de tumores se les llamaba genes guardianes del organismo, pues su función es mantener el ciclo y crecimiento celular de una forma adecuada, función que se pierde al mutarse ambos alelos.

#### **1.4 Alteraciones genéticas y moleculares en CCR**

El CCR es una enfermedad heterogénea, especialmente con respecto a la localización anatómica del tumor, las diferencias genéticas y raciales y, por último, las interacciones del estilo de vida que influyen en su desarrollo. Así pues, el CCR se considera una enfermedad compleja en donde participan factores de riesgo genéticos y ambientales. Son factores de riesgo el hecho de tener una historia familiar de neoplasias colorrectales, el desarrollo de pólipos, las enfermedades intestinales inflamatorias (colitis ulcerativa), la obesidad, el abuso del consumo de tabaco y/o alcohol y el estrés. Se ha descrito que pacientes que realizan ejercicio y consumen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID)

presentan un riesgo disminuido de desarrollar CCR. Aproximadamente el ~ 75% de todos los casos de CCR son de origen esporádicos, y los restantes se relacionan con la historia familiar y/o enfermedades intestinales inflamatorias; de los casos familiares, aproximadamente el 5% tienen un patrón de herencia bien definido.

#### **1.4.1 Mecanismos mutacionales asociados al desarrollo de CCR**

Como mecanismos mutacionales asociados al CCR se hallan los epigenéticos (metilación del ADN) y la inestabilidad genómica, la cual se divide en: inestabilidad cromosómica e inestabilidad de microsátelites.

##### **1.4.1.1 Mecanismos epigenéticos**

Se trata de cambios epigenéticos en el ADN que inactivan la expresión génica incluyendo la metilación de las islas CpG en secuencias promotoras y modificaciones en proteínas como las histonas e hipometilación global; se ha reportado que ocurren en estadios tempranos de la carcinogénesis colorrectal. La hipermetilación de secuencias promotoras conlleva el silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumor y genes involucrados en el control del ciclo celular, la reparación de ADN y la apoptosis. La metilación de las islas CpG en promotores es un mecanismo que afecta a la expresión de los genes de reparación del ADN o genes Mismatch. La metilación del ADN es el segundo mecanismo genético más común relacionado con el CCR esporádico (15%).

### **1.4.1.2 Inestabilidad cromosómica**

La inestabilidad cromosómica es el mecanismo que más comúnmente ocurre en el CCR esporádico (70-85%); también conocido como la vía supresora, es el mecanismo más acorde con el modelo genético propuesto por Fearon y Vogelstein en 1988. La inestabilidad cromosómica conlleva diversos cambios en el número de copias y la estructura cromosómica, ocasionando pérdida de la heterocigosidad en genes supresores de tumor y mutaciones en protooncogenes.

### **1.4.1.3 Inestabilidad de microsatélites**

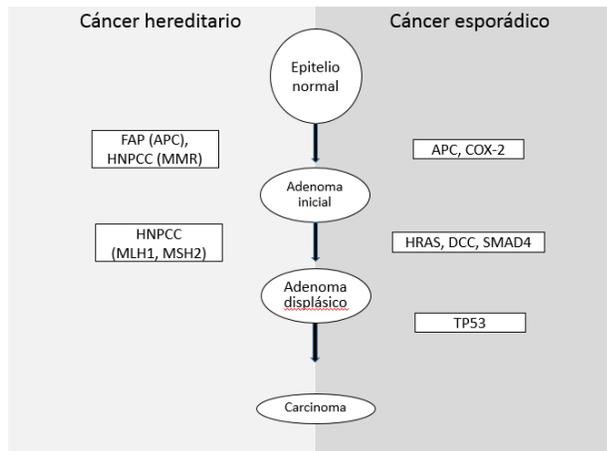
Conocida como la vía mutadora, es causada por errores en el sistema de reparación por daño al ADN (MMR)-Genes Mismatch, principalmente por fallo en la complementariedad de bases, lo que genera la expansión de secuencias cortas en tándem y un aumento en el número de mutaciones. El sistema MMR está conformado por siete genes: hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 y hPMS2; hasta la fecha (2014) se han descrito más de 500 mutaciones diferentes en estos genes MMR. (Rosales-Reynoso, 2014)

## **1.5 Modelo genético del CCR**

En 1990, Fearon y Vogelstein propusieron un modelo genético de tumorigénesis como proceso secuencial, llamado secuencia adenoma-carcinoma, que propone que la acumulación de mutaciones germinales y somáticas condiciona las características del tumor. Este modelo establece que el CCR es el resultado de mutaciones en genes con importantes funciones como la regulación de la proliferación celular o en la reparación del daño al ADN; que se requiere mutaciones en más de un gen, y que la secuencia de las

mutaciones es importante para determinar la progresión del CCR (Figura 5). Los genes que participan en este modelo genético se dividen en dos clases: genes supresores de tumor (APC, DCC y TP53) y oncogenes, como KRAS y CTNNB1. Los genes supresores de tumor codifican para proteínas que inhiben la proliferación celular o promueven la apoptosis. Estos genes a menudo son inactivados durante la carcinogénesis colorrectal. Por el contrario, los oncogenes son versiones activadas de protooncogenes, los cuales inducen la proliferación celular. Una vez activados, los oncogenes pueden acelerar el crecimiento celular y contribuir a la formación del tumor. Existen dos mecanismos independientes que pueden conducir al desarrollo del CCR (Figura 5). El primero es iniciado por la inactivación mutacional del gen supresor de tumor APC (Adenomatous polyposis coli), el cual es responsable de la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y de aproximadamente el 85% de los CCR esporádicos. Algunos de estos carcinomas se desarrollan tras la activación mutacional de  $\beta$ -catenina (CTNNB1) (actividad normalmente regulada por APC).

El segundo mecanismo es iniciado a través de la inactivación de una familia de genes supresores de tumor involucrados en la reparación del daño al ADN, conocidos como genes MMR o Mismatch, en donde se incluyen el homólogo humano mutS (MSH2), el homólogo 1 humano mutL (MLH1) y el gen de segregación posmeiótica aumentada de tipo 2 (PMS2). Se han encontrado mutaciones en estos genes tanto en individuos con CCR esporádico como hereditario (cáncer colorrectal hereditario no poliposo [HNPCC]), y mutaciones en aproximadamente el 15% de los CCR esporádicos. Se ha descrito además inactivación mutacional de otros genes supresores de tumor como DPC4/SMAD4 y activación mutacional de oncogenes como COX-2, los cuales están presentes en etapas tardías de la formación del CCR (Figura 5).



**Figura 5.** Modelo genético del CCR (adaptado de Fearon y Vogelstein)

### 1.6 CCR hereditario y síndromes poliposos

Aproximadamente una tercera parte de todos los casos familiares de CCR tienen una etiología genética bien definida. Esta predisposición genética para desarrollar CCR usualmente se caracteriza por la formación de lesiones precursoras en forma de adenomas o hamartomas. Un adenoma y un hamartoma difieren por el origen celular: el adenoma deriva de células del epitelio colónico y el hamartoma, de células del estroma. Hasta la fecha se conocen dos tipos de síndromes con predisposición familiar a desarrollar adenomas: la FAP (poliposis adematosa familiar) y el HNPCC (síndrome de Lynch), con mutaciones encontradas en el gen APC y en los genes de reparación del ADN, respectivamente, y un síndrome con predisposición familiar a desarrollar hamartomas, el conocido como síndrome poliposo juvenil (JPS). La tabla 1 muestra un resumen de los tipos de CCR hereditarios y los síndromes poliposos con adenomas o hamartomas. En los síndromes colorrectales hereditarios se han identificado mutaciones en el gen APC, el cual forma parte de los genes denominados gatekeeper o porteros, término relacionado con su

implicación en la formación de numerosos pólipos cuando el gen está mutado. Los genes de reparación del ADN, denominados también caretaker o guardianes, están relacionados con el incremento significativo de mutaciones encontradas por la alteración de estos genes. Por último, los genes responsables del JPS se denominan también landscaper porque las mutaciones ocasionadas en estos genes producen un ambiente anormal del estroma. En la tabla 1 se describe el tipo de herencia y los genes relacionados con algunos de los síndromes hereditarios de CCR. (Rosales-Reynoso, 2014)

Síndromes	Genes	Herencia	Riesgo de CCR	Número de pólipos	Histología de los pólipos
<b>Síndromes poliposos con adenomas</b>					
FAP	<i>APC</i>	<i>AD</i>	1%	100-1,000	Adenoma
FAP atenuada	<i>APC</i>	<i>AD</i>	> 90%	< 100	Adenoma
Presencia de la mutación I1307k	<i>APC</i>	<i>AD</i>	-10%	Pocos	Adenoma
Síndrome de Gardner	<i>APC</i>	<i>AD</i>	100%		
HNPPC	<i>hMLH1</i> <i>hMSH2</i> <i>hMSH6</i> <i>hPMS1</i> <i>hPMS2</i>				
Muir-Torre	<i>hMLH1</i> <i>HMSH2</i>	<i>AD</i>	0.8%	Pocos	Adenoma
Poliposis asociada a MYH	<i>MYH</i>	<i>AR</i>	1%	< 100	Adenoma
Síndrome de Bloom	<i>BLM</i>	<i>AR</i>	0.1%	Pocos	Adenoma
<b>JPS con hamartomas</b>					
PJS	<i>LKB1/STK11</i>	<i>AD</i>	0.4%	Pocos	Hamartoma
Poliposos coli juvenil	<i>SMAD4</i> <i>BMPRIA</i> <i>PTEN</i>	<i>AD</i>	10-40%	Pocos	Hamartoma
Síndrome de Cowden	<i>PTEN</i>	<i>AD</i>		Pocos	Hamartoma
Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba	<i>PTEN</i>	<i>AD</i>	10-40%	Pocos	Hamartoma
<b>Otros Síndromes</b>					
Síndrome de Turcot (variante atípica de FAP)	<i>APC</i>	<i>AD</i>	1%	100-1,000	Adenoma
Síndrome poliposo hereditario mixto	No identificados	<i>AD</i>	0.3%	Pocos	Mixta
<b>AR: autosómico recesivo; AD: aotosómico dominante; MYH: Gen homólogo a Mut Y.</b>					

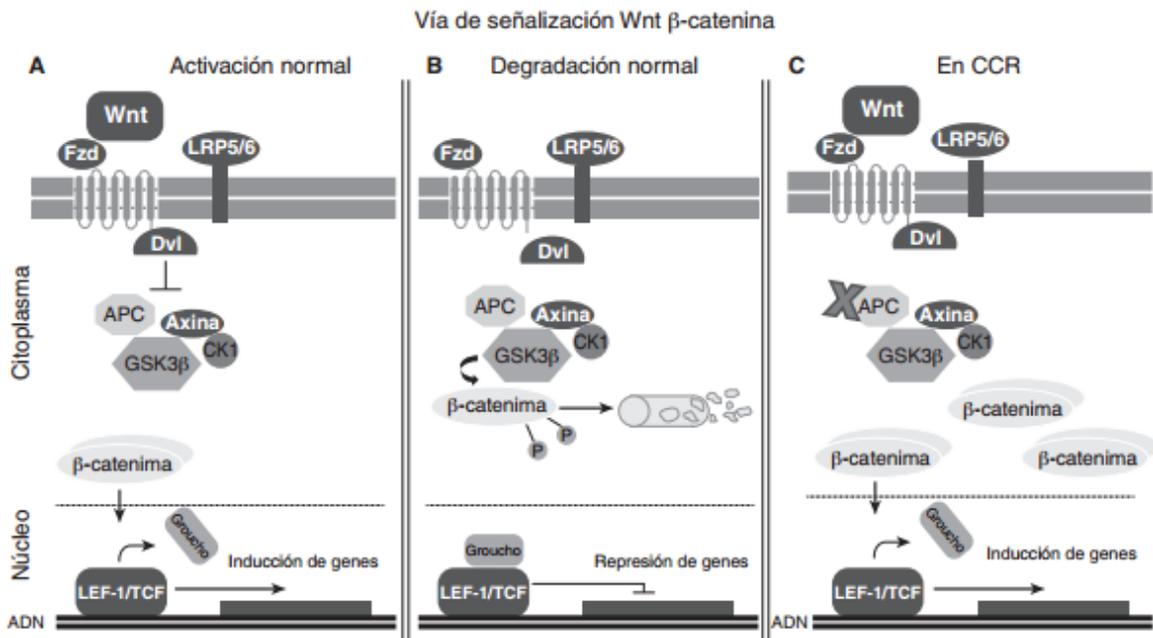
## **1.7 Genes implicados en la carcinogénesis colorrectal**

### **1.7.1 Gen APC (Adenomatous polyposis coli)**

Es el primer gen involucrado en la carcinogénesis colorrectal. Denominado gen de la poliposis adenomatosa coli, se ubica en el cromosoma 5q21-q22 y está constituido por 15 exones que producen un polipéptido de 2,843 aminoácidos con un peso molecular de más de 300,000 kDa. Se expresa en una variedad de tejidos epiteliales, sobre todo en células posmitóticas. Este gen codifica para la proteína APC, la cual posee sitios de unión a las proteínas:  $\beta$ -catenina, proteína dinámica reguladora de microtúbulos EB1 y axina. Este gen forma parte de la vía de señalización Wnt, cuya función primordial es mantener la homeostasis del epitelio intestinal. Dentro de las principales funciones de este gen se encuentran las siguientes: es un miembro crucial de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, que participa en múltiples procesos como regular la proliferación y la diferenciación celular, así como la apoptosis; la otra función depende de la capacidad de regular las proteínas del citoesqueleto, como la proteína F-actina y los microtúbulos, lo que le permite regular la adhesión y migración celular, así como la segregación cromosómica. . (Rosales-Reynoso, 2014)

### 1.7.1.1 Vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina

También llamada vía Wnt canónica, es esencial para el control de la proliferación de las células del epitelio intestinal. En la activación de la vía de señalización Wnt, los ligandos Wnt son glucoproteínas secretadas que interactúan con dos receptores de superficie celular, los receptores Frizzled (Fzd) y los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LRP5/6). En ausencia de ligando Wnt, la proteína  $\beta$ -catenina es secuestrada en el citoplasma para formar un «complejo multiproteico de destrucción» que incluye a los genes APC, Axina y GSK3B, axina y la proteína glucógeno sintasa cinasa- 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), conllevando la degradación de la vía proteosoma (Fig. 6 B). Tras la unión a sus receptores de superficie celular, la activación de la vía Wnt libera a la proteína  $\beta$ -catenina del complejo, que también puede ser liberada como resultado de mutaciones en el gen APC (Fig. 6 C). La proteína  $\beta$ -catenina que se encuentra libre ingresa en el núcleo, donde libera al factor de transcripción de células T (TCF) de los represores transcripcionales CtBP y Groucho. Entre los genes diana estimulados por  $\beta$ -catenina/TCF se encuentran MYC y CCND1, esenciales para la progresión del ciclo celular durante la proliferación. La unión entre APC y  $\beta$ -catenina es crucial. Entre las principales mutaciones en APC se encuentran aquellas que suprimen la capacidad de regular la expresión de  $\beta$ -catenina (Fig. 6 C). La importancia de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en la patogénesis del CCR se demuestra al observar que, en ausencia de mutaciones en el gen APC, pacientes con CCR presentan mutaciones que inactivan a otros genes de esta vía de señalización, como axina (1 o 2) y CTNNB1, entre otros.



**Figura 6.** Vía de señalización Wnt/ $\beta$  catenina y su implicación en la carcinogénesis colorrectal.

### 1.7.1.2 Regulación de las proteínas del citoesqueleto

Los estudios indican que el extremo carboxilo terminal de la proteína APC se une a las proteínas del citoesqueleto y a los microtúbulos. La proteína de unión a microtúbulos (EB1) y las proteínas que contienen dominios PDZ son intermediarias a través de las cuales APC se une a la proteína F-actina. Como proteína asociada a los microtúbulos, APC contribuye a la formación y funcionamiento del huso mitótico. En mitosis tempranas, APC se localiza en el exterior del cinetócoro, los centrosomas y los husos mitóticos. Es importante resaltar que mutaciones en APC se han correlacionado con anomalías cromosómicas en adenomas colorrectales de inicio temprano, de manera que se puede concluir que la pérdida de APC en tejido de colon normal puede conducir a la inestabilidad cromosómica, lo cual es un mecanismo que contribuye a la tumorigénesis colorrectal. Hasta la fecha se han

descrito más de 800 mutaciones en este gen; la mayoría (95%) son sin sentido o causan corrimiento del marco de lectura por inserciones o deleciones que originan codones de paro prematuro. El exón 15 representa cerca del 75% de toda la región codificante, por lo que en este exón se encuentra la gran mayoría de las mutaciones descritas que conducen a la inactivación del gen, principalmente en la región denominada mutation cluster region (MCR). La mayoría de las mutaciones puntuales en APC afectan a la unión a estas proteínas, llevando a la estabilidad citoplasmática de  $\beta$ -catenina y la subsecuente translocación al núcleo, donde es acumulada e induce la transcripción de oncogenes como MYC y CCND. Hasta la fecha se han reportado mutaciones en la línea germinal que producen pérdida de heterocigosidad, y se asocian al desarrollo de poliposis adenomatosa colónica.

### **1.7.1.3 Mutación I1307K en el gen APC**

La mayoría de las mutaciones encontradas en los CCR hereditarios y esporádicos son mutaciones sin sentido que producen una proteína truncada. En cambio, en el caso de la mutación I1307K del gen APC, nos hallamos ante una mutación que aunque el cambio de aminoácido por sí solo no altera la función de la proteína, el cambio del nucleótido predispone a una región corta hipermutable del gen APC. Esto aumenta la probabilidad de mutación somática en el gen y confiere el doble de riesgo para desarrollar CCR en los portadores de la mutación I1307K, la cual es relativamente frecuente en los judíos ashkenazi.

### 1.7.2 Gen TP53 (Proteína del tumor p53)

Es un gen supresor de tumor que se encuentra mutado en aproximadamente el 50% de todos los cánceres, como el de ovario, el colorrectal, el de pulmón, el de hígado, el de mama, el de tiroides y el de estómago. Se conoce como proteína del tumor p53, se localiza en 17p13 y está constituido por 11 exones. TP53 es un factor de transcripción que normalmente inhibe el crecimiento celular y estimula la muerte celular inducida por estrés celular. Dentro de las principales funciones del gen se encuentran las siguientes: regulación del ciclo celular, apoptosis, desarrollo, diferenciación, recombinación homóloga y mecanismos de reparación del ADN como la escisión de bases, la senescencia y la segregación cromosómica. Este gen es el encargado de mantener la estabilidad del genoma al controlar el ciclo celular, por medio de la transcripción de múltiples genes, por ejemplo p21, que detiene el ciclo celular para permitir la reparación del ADN.

Se ha descrito una mutación que altera la función de TP53 en el 73% de los casos, e inactiva su capacidad para unirse específicamente a su secuencia de reconocimiento cognato. Sin embargo, existen otros mecanismos para lograr este mismo efecto, como la amplificación del gen MDM2, el cual codifica para una proteína ligasa de ubiquitina que se une y degrada al gen TP53, la inactivación del gen p14/p19ARF, que se une e inactiva al gen MDM2, y la infección con virus cuyos productos, como la proteína del virus del papiloma humano E6, inactivan a TP53. Se ha establecido que la cantidad y la actividad de TP53 se incrementan en respuesta a una variedad de señales, como daño en el ADN, disminución de nucleósidos, hipoxia y actividad oncogénica. Además, existen otras formas de modificaciones, como la acetilación, la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación y la sumoilación, que modulan la actividad de TP53. Una vez activada, TP53 inicia un

programa transcripcional en donde los genes implicados en la red activan algunos de los mecanismos en los que participa TP53: detención del ciclo celular en G1/S y en los límites de G2/M, activación de la apoptosis y senescencia, entre otros.

#### **1.7.2.1 Detención del ciclo celular en G1/S y en los límites de G2/M**

Un importante miembro de la detención en G1 mediada por TP53 es el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p21WAF1/CIP166. La detención en G2 se logra por la capacidad de TP53 para inhibir la expresión de la ciclina B y CDC267, las cuales son esenciales para la transición de la fase G2/M, y para estimular la expresión de 14-3-3δ68, el cual secuestra a CDC25 en el citoplasma, de manera que evita la activación de la ciclina B/CDC2.

#### **1.7.2.2 Activación de la apoptosis**

TP53 activa un gran número de genes que participan en la apoptosis. Entre los genes regulados por TP53 se encuentran BAX (Bcl-2 associated X *protein*), NOX (NADPH oxidase) y PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), los cuales aumentan la secreción del citocromo C en el citoplasma de la mitocondria, permitiendo la activación de caspasas y la subsecuente apoptosis. TP53 activa la apoptosis por vía intrínseca y extrínseca.

### **1.7.2.3 Senescencia**

Existe poca información sobre los mecanismos de participación de TP53 en la senescencia celular. Sin embargo, el primer estímulo de senescencia conocido es el acortamiento de telómeros, debido a la ausencia de telomerasa en la mayor parte de las células somáticas. Durante la fase S de la replicación celular se pierde una sección del extremo de un cromosoma debido a la unidireccionalidad de las enzimas ADN polimerasas. Por otra parte, se ha demostrado que la disfunción telomérica inicia la senescencia celular al activar una señal de daño genético persistente. Esta señal puede producirse en varios sitios no teloméricos del ADN de la célula, ya sea por el rompimiento de la doble hélice, ya sea por la presencia de compuestos como los inhibidores de la enzima histona desacetilasa, cuya función es relajar la cromatina sin producir daño en el ADN, o por la acción de TP53, que activa a la proteína ATM, en respuesta al daño genético.

### **1.7.3 Gen DCC (Carcinoma colorectal deleted)**

Se localiza en 18q21.1, está constituido por 29 exones y codifica para un receptor transmembrana que participa en la apoptosis, adherencia, diferenciación y crecimiento celular. A través de la vía de la caspasa 3 induce la apoptosis y evita la metástasis por el aumento de los niveles del gen DCC. La pérdida de la región 18q21 ocurre en el 70% de los casos de CCR; esta región además contiene los genes DPC4 y MADR2, que también están clasificados como genes supresores de tumor. La pérdida de la heterocigosidad ocurre en el 70% de los casos de CCR; también se han reportado mutaciones puntuales en el 6% e inserciones. Se han encontrado mutaciones en este gen en el cáncer esofágico, el gástrico,

el pancreático, el prostático, el ovárico, el endometrial, el de mama y el testicular. (Rosales-Reynoso, 2014)

#### **1.7.4 BRAF**

Se localiza en el cromosoma 7q34, y está constituido por 18 exones; es un protooncogén con actividad de serina treonina cinasa que forma parte de la vía de señalización RAS-RAF-MAPK. Se han encontrado mutaciones en BRAF en el melanoma, el carcinoma de tiroides y el CCR. Estas mutaciones permiten un aumento en la transcripción de genes que intervienen en la proliferación y supervivencia celular por activación de las proteínas MEK y ERK. Hasta en el 20% de los casos de CCR con KRAS sin alteraciones hay mutaciones en BRAF, principalmente ubicadas en el exón 15. Aproximadamente el 91% de los casos de CCR esporádicos con MSI alta (MSI-H) tienen esta mutación. La presencia de mutaciones en KRAS y BRAF implica un papel central de la vía de señalización RAS-RAF-MAPK en la patogénesis del CCR. Pacientes con mutaciones en BRAF presentan una mala respuesta al tratamiento anti- EGFR y mal pronóstico, por lo que este gen se utiliza como biomarcador predictivo y de pronóstico. Otros dos protooncogenes que han sido relacionados con el CCR son SRC y MYC. Este último es un protooncogén que ha sido identificado como gen diana de la vía de señalización Wnt en líneas celulares de CCR y en criptas epiteliales intestinales después de la delección del gen APC. La función primaria de MYC es la regulación transcripcional de aproximadamente el 15% de todos los genes del genoma. Por medio de análisis genómicos y funcionales de los genes diana de MYC se ha demostrado que participa en la apoptosis, la regulación del ciclo celular, la proliferación, la reparación del ADN, el metabolismo, la biogénesis ribosomal, la síntesis proteica, la

angiogénesis y la mitocondria. También se ha demostrado que MYC actúa como un represor transcripcional de genes implicados en la adhesión celular y la detención del crecimiento, como p21Cip1 y p15INK4B. Por otra parte, datos recientes sugieren que MYC puede desempeñar un papel directo en la replicación del ADN. Bettess, et al. Demostraron que MYC es esencial para la formación de las criptas intestinales. Sin embargo, Muncan, et al. mostraron que los enterocitos intestinales deficientes de MYC habían reducido los niveles de proliferación y eran más pequeños en comparación con los enterocitos intestinales normales. Finalmente, se han descrito mutaciones en el gen SRC en aproximadamente el 12% de los casos con CCR, en donde se ha observado aumento del potencial metastásico de las células colorrectales. (Rosales-Reynoso, 2014)

### **1.7.5 KRAS y otros protooncogenes**

Se localiza en 12p12; el gen está constituido por seis exones. Las proteínas Ras son reguladoras centrales de los procesos de transducción de señales relacionadas con el crecimiento celular y la diferenciación. La familia RAS comprende tres isoformas (H-RAS, K-RAS y N-RAS) con alta similitud en su secuencia. Ras pertenece a una familia de proteínas G con propiedad de GTPasa (guanosín trifosfatasa). KRAS es una proteína G que presenta forma activa al unirse a GTP; funciona como interruptor molecular y transductor de señales extracelulares. La cascada de señalización RAS constituye una de las principales vías de control de la regulación del ciclo celular, apoptosis, migración, crecimiento, quimiotaxis, diferenciación y proliferación celular. Estas proteínas son capaces de integrar señales extracelulares de diversos tipos de receptores. La señalización a través de Ras se

acompaña de varios efectores, es decir, la vía clásica se origina por la activación secuencial de tres cinasas: RAF, MAPKK o MEK y MAPK. Otro efector de Ras es la cinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K), que regula la vía de Akt/PKB, la cual participa en la supervivencia celular. Las mutaciones puntuales más frecuentes en *KRAS* (98%) ocurren en los codones 12 y 13, produciendo pérdida de su actividad GTPasa y expresándose constitutivamente; estas mutaciones se relacionan con resistencia a la terapia anti-EGFR (factores de crecimiento epidermal) y con mal pronóstico. Mutaciones activadoras en *KRAS* se encuentran en aproximadamente el 33% de todos los cánceres, entre ellos el CCR (más del 50% de los pólipos y carcinomas colorrectales). En el epitelio normal adyacente al tumor se han encontrado mutaciones en *KRAS*, lo que sugiere que es un evento temprano en la tumorigénesis. Esta conclusión fue demostrada en un modelo Murino en donde se observó transformación tumorigénica por mutaciones dirigidas en el oncogen *KRAS* del epitelio intestinal. Se observó transformación tumorigénica. Las mutaciones en este gen se presentan hasta en el 42% de casos de CCR, y más frecuentemente en adenomas avanzados. En pacientes con CCR metastásico con mutaciones en este gen se relacionan con resistencia a la acción del fármaco cetuximab. (Rosales-Reynoso, 2014)

### **1.7.6 Otros genes relacionados con la patogénesis del CCR**

Durante varios años se ha observado que el uso de NSAID (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) se asocia con disminución del riesgo de desarrollar CCR. Gracias a éste y otros estudios epidemiológicos se ha demostrado que el gen *PTGS2*, mejor conocido como ciclooxigenasa 2 (COX-2), juega un papel importante en la patogénesis molecular del

carcinoma colorrectal. Las ciclooxigenasas regulan la producción de los metabolitos del ácido araquidónico, los cuales son mediadores de procesos inflamatorios. En líneas celulares de cáncer de colon que sobreexpresan PTGS2 se ha demostrado que producen factores que promueven la angiogénesis. Otro mecanismo que ha presentado recientemente importancia es la dieta rica en grasas, que es asociada con un riesgo incrementado de CCR, por lo que se ha investigado la relación de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR). Los PPAR son activados en respuesta a compuestos de derivados lipídicos y ácidos grasos; algunos de estos genes relacionados son el PPARD y PPARG, han sido encontrados sobreexpresados en células de cáncer de colon. Otro gen que ha mostrado un papel en la progresión del CCR es el NOS3, el cual es sobreexpresado en los modelos murinos inducidos a CCR. Otras proteínas relacionadas son las metaloproteinasas (MMp), las cuales degradan la matriz extracelular facilitando la migración celular y la subsecuente metástasis. En pacientes con CCR la presencia de MMP1 ha sido asociada con peor pronóstico, independientemente de la clasificación Dukes. Por último, en el gen PPP2R1B, el cual codifica para una subunidad de la fosfatasa de serina/treonina, han sido observadas deleciones en más del 15% de los pacientes con adenocarcinoma colorrectal. (Rosales-Reynoso, 2014)

## 2. Gen RAS

Ras fue el primer oncogén identificado (Figura 7). Los oncogenes son, en realidad, formas mutadas de genes normales (llamados **proto-oncogenes**) que originan proteínas con función alterada, estimulando el crecimiento o la invasividad celular.

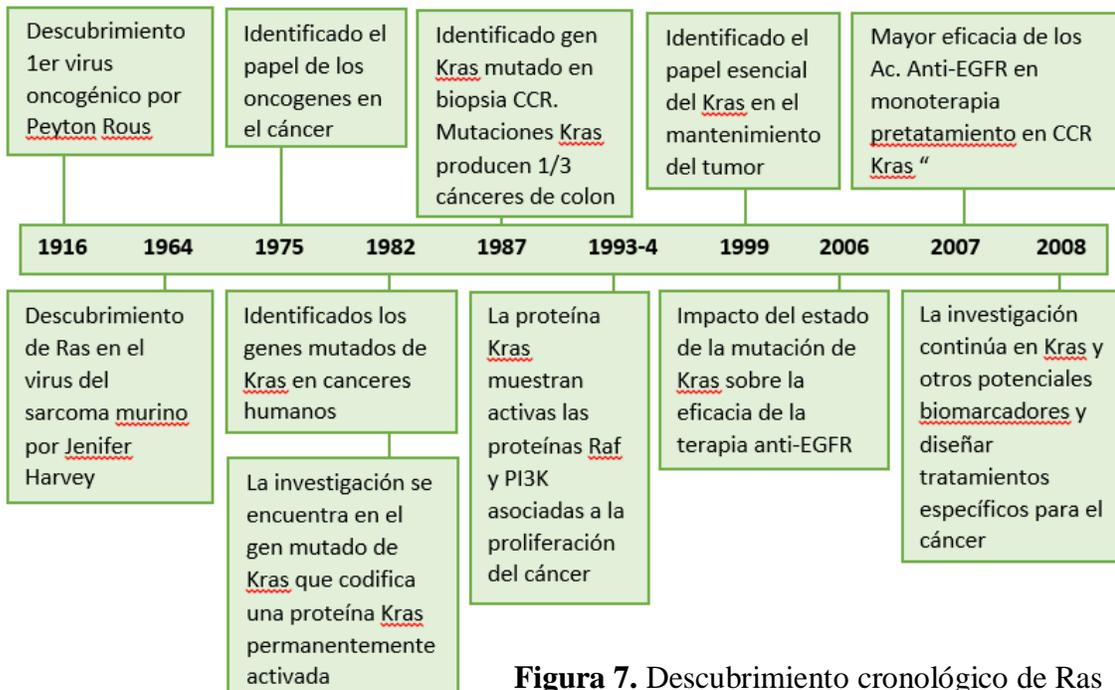
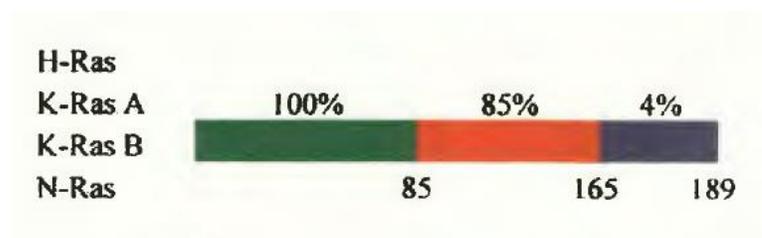


Figura 7. Descubrimiento cronológico de Ras

Estos genes fueron los primeros oncogenes implicados en cáncer humano. Se identificaron como elementos genéticos transformantes de dos retrovirus que inducían la formación de tumores en los animales infectados: las cepas Harvey y Kirsten del virus del sarcoma de rata (Harvey, 1964) (Kirsten & Mayer, 1969). En 1981, se describe que estos virus en realidad contenían versiones transformadas (oncogenes *RAS*) de unos genes propios de la célula huésped protooncogenes *RAS* (Ellis *et al.*, 1981). Poco después estos oncogenes, *HRAS* y *KRAS*, fueron realizados también en tumores humanos (Parada *et al.*, 1982) (Santos *et al.*, 1982). El último en descubrirse en 1983, fue el gen *N-RAS*, aislado de una

línea celular de neuroblastoma. Estos tres genes *RAS*: *H-RAS*, *K-RAS* y *N-RAS*. El gen *KRAS* da lugar a dos proteínas: *KRAS-A* y *KRAS-B*, mediante mecanismos de “splicing” alternativo del cuarto exón codificante. Al hablar de la proteína *KRAS*, normalmente se están refiriendo a la proteína *KRAS-B*, puesto que es ésta la que es diferente de las otras isoformas y presenta unas propiedades distintivas. *KRAS-A* presenta características similares a las de *H-RAS* y *N-RAS*, además de representar tan solo un 10% del ARNm total que transcribe el gen *KRAS*.

Varios trabajos han demostrado que estas proteínas (*H-RAS*, *K-RAS A* y *B* y la *HRAS*) presentan secuencias, estructuras y funciones similares pero difieren en algunos aspectos. Aunque el patrón de expresión de estas proteínas puede variar según el tipo celular, estas diferencias genéticas, estructurales y funcionales, justificarían el porqué de tener estas tres isoformas. Entre las diferencias de las isoformas están: no comparten la secuencia en el extremo C.-terminal, diferencias en cuanto a la especificidad por algunos efectores: GAPS, GEFs. También difieren en la localización subcelular. En la fig. 8, se observa el porcentaje de homología en la secuencias de las isoformas de *RAS*.



**Figura 8.** Isoformas de *RAS* y el porcentaje (%) de homología en la secuencia.

## **2.1 Familia de RAS**

Está formada por cuatro proteínas RAS: H-RAS, N-RAS, K-RAS A y K-RAS B. La familia de genes *RAS* (*H-RAS*, *N-RAS* y *K-RAS A* y *B*) es uno de los grupos de oncogenes más frecuentemente alterados en las neoplasias humanas. (Hruban RH., *et al* 2001 y Aunoble B., *et al* 2000). Las proteínas codificadas por estos genes se ensamblan entre sí, conformando una estructura proteica con un peso de 21Kd que le otorga el nombre (p21). Poseen actividad GTP-asa, participan en la vía de transducción de señales de crecimiento y diferenciación celular. (Aunoble B., *et al* 2000 y Ellis CA., *et al* 1981).

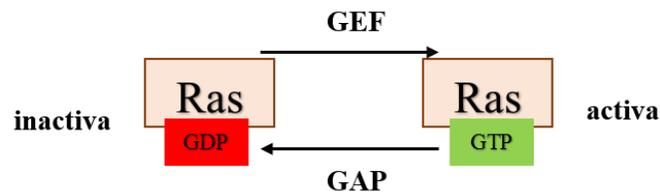
## **2.2 Proteínas RAS**

Constan de 189 aminoácidos y 188 en el caso del K-RAS B. Los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido N°1 y N°165 constituyen el llamado dominio catalítico, siendo este muy conservado entre las diferentes isoformas, el dominio hipervariable se encuentra entre los aminoácidos 166 y 189, en el cual las isoformas se diferencian considerablemente. Existen dos regiones en la estructura de RAS que cambian conformacionalmente cuando RAS se encuentra unido a GTP: Switch I y Switch II. La región Switch I incluye el dominio efector (aminoácido 32-40) esencial para la interacción con los efectores. La región Switch II (aminoácido 60-76) también participa en la interacción con algunos efectores y para la unión de las proteínas GAPs.(Olmedo, Y., 2015)

## **2.3 Bioquímica del Ras**

La GTPasa RAS (H, N y K-RAS) posee una actividad bioquímica básica: la unión de GTP y la hidrólisis de este nucleótido GDP. Cuando RAS está unido a GTP adopta una

conformación que le permite interactuar con los efectores, se trata de la conformación activa, pero cuando RAS está unido a GDP, esta interacción con los efectores no es posible y hablamos de una conformación inactiva. (Fig. 9). Este ciclo GTP/GDP depende de las propiedades bioquímicas intrínsecas de RAS y de la modulación de estas propiedades por unas proteínas reguladoras; las proteínas GEFs (favorecen el intercambio de GDP a GTP) y de las proteínas GAPs (que aceleran la capacidad intrínseca de hidrolizar GTP).

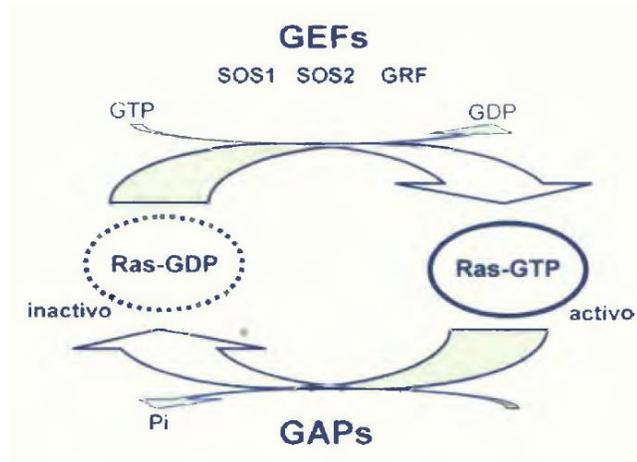


**Figura 9.** Proceso de regulación de las proteínas Ras. Ras se activa al intercambiar el GDP por el GTP gracias a moléculas GEF y se inactiva por la hidrólisis del GTP, que ocurre gracias a la actividad GTPasa de la propia proteína y a moléculas que aceleran esta reacción (del inglés, GTPase Activating Protein o GAP).

## 2.4 Regulación de la activación/desactivación de RAS GEFs y GAPs

### 2.4.1 GEFs (factores de intercambio de nucleótidos de guanina)

El cambio de GDP a GTP y la consiguiente activación de las proteínas RAS esta mediado por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs). Estas proteínas comparten un mecanismo general de acción. El primer paso consiste en formar un complejo muy estable con la GTPasa unida a GDP. Tras la unión del GEFs a la GTPasa, el nucleótido difosfato se disocia del complejo y el complejo restante, GEF y GTPasa libre de nucleótido es muy inestable. La elevada proporción GTP GDP (10 1) que existe en la célula, hace que la GTPasa una rápidamente el nucleótido trifosfato. Al formarse Ras-GTP, el GEFs se disocia del complejo. Observado en el esquema de la Fig. 10.



**Figura 10.** Activación e inactivación de RAS catalizado por GEFs

Los GEFs tienen una doble función:

1. Desestabilizan la fuerte unión entre la GTPasa y el GDP.
2. Estabilizan la GTPasa cuando está libre de nucleótido.

#### 2.4.2 GAPs (GTPase activating proteins)

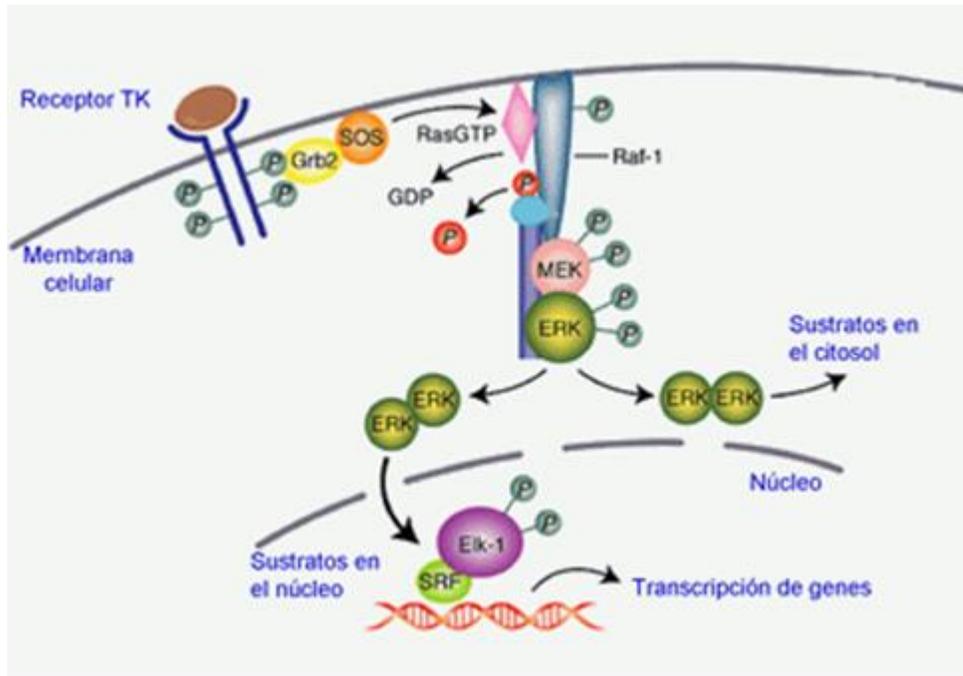
Las GAPs (GTPase activating proteins) son las proteínas encargadas de potenciar la actividad intrínseca GTPasa de Ras, y por tanto de desactivarlo. El genoma humano predice alrededor de 170 proteínas relacionadas estructuralmente con GAPs de la superfamilia Ras (Bernards & Settleman, 2004), lo cual implica que un 0.5% de los genes humanos codifican para estas proteínas, lo que indica la importancia de estos reguladores.

## **2.5 Mecanismo de señalización de RAS mediada por receptores tirosina-quinasa (EGFR)**

Vía de las proteínas cinasas activada por mitógenos. El sistema de MAP cinasas es especialmente importante en la señalización de los factores de crecimiento. La unión del ligando a la tirosina cinasa del receptor (EGFR) da lugar a la autofosforilación del receptor y a la unión con proteínas adaptadoras, como GRB2 y SOS. Cuando el ligando se une al dominio extracelular del receptor, se produce la dimerización de éste, y se produce un cambio conformacional del dominio intracelular, activándose la tirosina quinasa del dominio quinasa que se encuentra en esta región. Esta actividad quinasa resulta en la fosforilación de muchos residuos tirosina del fragmento citoplasmático del receptor. Las tirosinas fosforiladas del receptor, sirven como lugares de unión para proteínas con dominios SH2 o dominios PTB (PhosphoTyrosine-binding). Los aminoácidos más cercanos a cada fosfotirosina confieren el microambiente que permite la especificidad de unión a diferentes proteínas. Entre las proteínas que se unen a las fosfotirosina se encuentra Grb2, normalmente ubicada en el citosol unida por su dominio SH3 a la región rica en prolina Sos. La fosforilación de los receptores es la señal que induce la traslocación del complejo Grb2/Sos a la membrana plasmática, donde Sos cataliza el intercambio de nucleótidos de RAS induciendo su activación. La unión del complejo GRB2/Sos al receptor, no se produce directamente, sino que lo hace a través de la proteína adaptadora Shc, es decir, el dominio SH2 de GRB2 se une a la fosfotirosina de Shc, que a su vez se une a las fosfotirosinas del receptor por su dominio PTB. Esta proteína adaptadora Shc puede ser fosforilada por los receptores y por tirosinas quinasas citoplasmáticas de la

familia Src. Luego, se produce la activación de RAS, quien pertenece a la superfamilia de proteínas de la guanosina trifosfatasa (GTPasa), que pasa de la forma activa a la inactiva y viceversa. El Ras inactivo se encuentra en forma unida al difosfato de guanosina (GDP), que se convierte en GTP: su forma activa; y esto pone en marcha una cascada de reacciones en las cinasas distales que acaba provocando cambios en la expresión de los genes. La activación del RAS es contrarrestada por otra proteína activadora de la GTPasa llamada GAP, que desvía al RAS hacia la forma inactiva de GDP. Las formas mutantes del RAS, que se fijan pero no hidrolizan al GTP, están constantemente en estado activo y se asocian a la elevada proliferación celular que se observa en muchas clases de cánceres humanos. El RAS activado se une a Raf, que se une y fosforila a la MEK, un miembro de la familia de las cinasas llamadas en conjunto cinasas del MAP. La última cinasa del MAP (ERK) penetra en el núcleo y allí fosforila ciertos factores de transcripción, como c-jun y c-fos, que, a su vez, activan la expresión de los genes. El resultado final es la activación de una cascada de fosforilación de las proteínas, que aumenta la potencia de la señal y estimula a las células quiescentes a incorporarse al ciclo del crecimiento.

DENTRO DE LA CELULA:  
La mutación de *K-RAS* resulta en una ganancia de función que favorece la proliferación, el remodelamiento del citoesqueleto, la inhibición de apoptosis y la supervivencia celular, afectando los procesos de transcripción de genes, proliferación del ciclo celular, proliferación celular, inhibición de la apoptosis, angiogenesis, migración y adhesión e invasión celular. En la fig. 11, se muestra el esquema de activación de RAS por el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR).



**Figura 11.** Activación de RAS por el receptor de tirosin quinasa. (<https://www.monografias.com/trabajos29/via-de-ras/via-de-ras.shtml>)

## 2.6 RAS y Cáncer

RAS participa en el control de la proliferación y supervivencia celular, por lo que podemos encontrar aproximadamente en un 30% de los tumores humanos mutaciones activadoras de los genes *RAS*. Estas mutaciones tiene lugar en sitios críticos en la regulación de *RAS*: en el codón 12 y 13 del exón 2 y con menos frecuencia en el codón 61 del exón 3. Estas mutaciones impiden la hidrólisis del GTP, quedando así RAS en un estado activo permanente. En humanos, las mutaciones en *RAS* ocurren en una elevada frecuencia. En tumores de páncreas (~ 80), colon (~ 35), pulmón (~ 20), tiroides (~ 50) y en varios tumores de origen hematológicos. En humanos la isoforma mutada es *K-RAS*, en un 85% del total

de tumores que presentan mutaciones en *RAS*, seguido en frecuencia por *N-RAS* con 1%. La proteína *RAS* se ha convertido en una diana terapéutica clave en la lucha contra el cáncer; debido a la importante contribución de la vía *RAS* al crecimiento y progresión de tumores y a la elevada prevalencia de mutaciones en *RAS* encontrada en tumores de humanos. Existen diversas estrategias para diseñar inhibidores de *RAS*: inhibir la expresión de *RAS*, inhibir el procesamiento de la proteína, inhibir la proteína mutada e inhibir los principales efectores de *RAS* (Friday & Adjei, 2005).

## **2.7 KRAS**

El gen *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene) está localizado en el brazo pequeño del cromosoma 12 (locus12p12.1), está constituido por seis exones (Rosales-Reynoso, 2014) y codifica la proteína K-Ras, de 189 aminoácidos y de 21656 Da. Mutaciones puntuales en este gen se han encontrado en un 30-50% de los CCR y parecen estar implicadas en la evolución de los adenomas de pequeños a grandes, ya que se presenta con mayor porcentaje en aquellos adenomas mayores a 1cm, por lo que supone mayor riesgo de malignización.

### **2.7.1 Mutaciones en KRAS en cánceres humanos**

Una mutación puntual en el gen *KRAS*, que provoca la sustitución de glicina por valina en la posición 12 de la proteína, fue la primera en identificarse en un oncogen humano. Hoy se sabe que las mutaciones puntuales que provocan activación de las proteínas Ras se agrupan en las regiones que codifican los aminoácidos. Un simple cambio en un nucleótido

produce un aminoácido diferente y como consecuencia una proteína transformada y sin actividad GTPasa, por lo que la vía de señalización estaría en este caso constitutivamente activada. (Rodríguez, 2014)

Las mutaciones de KRAS más comunes se encuentran en los codones 12, 13 y 61, que corresponden al dominio de unión GTP/GDP de la proteína. Estas mutaciones alteran la actividad GTPasa de KRAS, permitiendo que se mantenga constantemente en un estado activado. La consecuencia de estas mutaciones es que aumenta el porcentaje de activación KRAS en la célula, estimulando la ruta de señalización RAS/RAF/MAPK de manera permanente, promoviendo la proliferación celular e incrementado la supervivencia, así como otros efectos pre-tumorigénicos.

Las mutaciones del KRAS ocurren comúnmente en los codones 12 o 13 (exón 2) y en casos raros en el codón 61 (exon3).

Estas mutaciones del gen *KRAS* son: Gly12Asp (GGT>GAT), Gly12Val (GGT>GTT), Gly12Cys (GGT>TGT), Gly12Ser (GGT>AGT), Gly12Ala (GGT>GCT), Gly12Arg (GGT>CGT), Gly13Arg (GGC>GAC) y Gln61Leu (CAA>CTA).

### **2.7.2 Cáncer Colorrectal y KRAS**

La cirugía es el único tratamiento curativo del CCR localizado. Sin embargo, la mayoría de los enfermos no son inicialmente candidatos a la resección de la enfermedad metastásica, y el tratamiento de elección es el sistémico con quimioterapia. En la actualidad los agentes terapéuticos que han demostrado actividad clínica son tres fármacos quimioterápicos (5-fluorouracilo, oxaliplatino e irinotecán) y tres fármacos “biológicos”, anticuerpos monoclonales que actúan por una vía diferente a la interferencia con la replicación del

ADN: bevacizumab (inhibidor de la actividad del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)) y cetuximab y panitumumab (inhibidores de la actividad del EGFR).

Se han confirmado que la tasa de mutaciones de KRAS en CCR es aproximadamente del 40%, localizándose casi exclusivamente en el codon 12 y 13. La identificación de mutaciones de KRAS es de gran importancia clínica para el tratamiento del CCR. Existen numerosos estudios y ensayos clínicos que comprueban la distinta efectividad de combinaciones quimioterápicas en función del estado de KRAS. Los más importantes son: el ensayo clínico de fase II denominado **CRYSTAL** (Cetuximab e Irinotecan como primera línea de tratamiento en el CCR metastásico) y el **ensayo OPUS** (Oxaliplatino y Cetuximab como primera línea de tratamiento en el CCR metastásico). Estos ensayos evalúan la eficacia del Cetuximab junto con el Irinotecan o con el Oxaliplatino respectivamente basándose en el estado de KRAS. En ambos, en los pacientes con el genotipo salvaje (wild-type, wt) la adición de Cetuximab al tratamiento quimioterápico aumentaba significativamente la mediana de la supervivencia libre de progresión así como la tasa de respuesta. Sin embargo, en los pacientes con KRAS mutado no se obtenía ningún beneficio al añadir cetuximab al tratamiento. Por tanto, la identificación de mutaciones de KRAS en pacientes con CCR metastásico puede utilizarse como marcador de ausencia de respuesta a los inhibidores del EGFR. En estos pacientes la determinación del estado de KRAS antes de iniciar el tratamiento resulta muy útil para decidir el régimen de quimioterapia ya que si presentan el genotipo mutado no se aconseja administrar los inhibidores de EGFR.

### **2.7.3 Técnicas de detección de KRAS**

Como se ha dicho anteriormente, el 98.4% de las mutaciones del gen KRAS están comprendidas en los codones 12 y 13 (del exón 1). Esta localización tan conservada facilita en gran medida su estudio, ya que no es necesario estudiar toda la extensión del gen.

Las técnicas de detección de mutaciones en KRAS se pueden dividir principalmente en dos grupos según la estrategia utilizada:

- Técnicas de secuenciación directa
- Técnicas de cribado por PCR (convencional o cuantitativa)

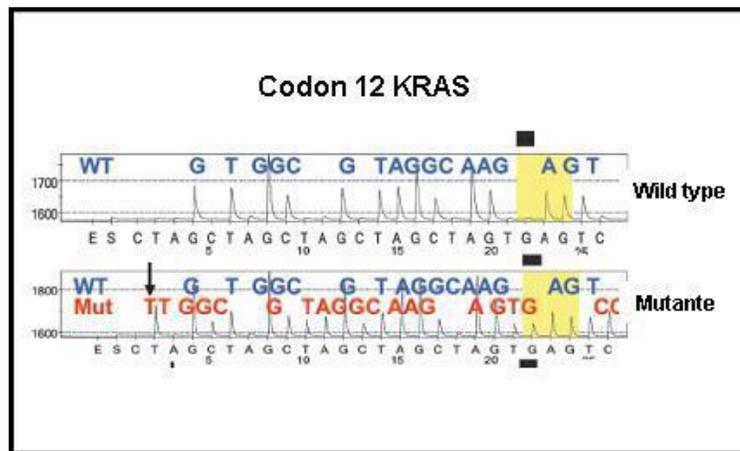
#### **2.7.3.1 Secuenciación directa**

La secuenciación directa consiste en determinar cada uno de los nucleótidos que componen un determinado fragmento de DNA. Por comparación de la secuencia obtenida con la secuencia real, se pueden identificar todas las mutaciones contenidas en el fragmento secuenciado.

Existen dos técnicas mayoritarias de secuenciación: el método dideoxi y la pirosecuenciación.

La **secuenciación** por el método de los **nucleótidos “dideoxi”**, fue ideada por Sanger en el año 1977. Es la técnica de secuenciación más extendida, pero también tiene un alto coste y requiere bastante tiempo de trabajo.

La **pirosecuenciación**, es algo más rápida que el método anterior ya que se utiliza para secuencias cortas de nucleótidos (40-50 pb). Consiste en seguir la reacción de la secuenciación a tiempo real. Esto se consigue añadiendo a la mezcla de amplificación enzimas (sulfurilasa, apirasa, luciferasa) que convertirán el pirofosfato liberando en la unión de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) a la cadena en crecimiento, en señales luminosas. Estas señales se captarán con un detector que generará una serie de picos de intensidad de luz (**pirograma**), que podremos identificar con cada una de las bases (figura 12). La pirosecuenciación es favorable para el análisis de muestras en parafina, ya que el DNA que se obtiene está muy fragmentado. Existen diversos estudios que utilizan la secuenciación para la detección de mutaciones en KRAS.



**Figura 12.** Pirograma de codon 12 del gen KRAS. El primero representa la secuencia original y el segundo una mutación G>T. Modificado de Ogino et al.

### 2.7.3.2 Cribado de mutantes por PCR

Existen numerosas variantes para analizar los posibles polimorfismos de KRAS mediante amplificación del DNA por PCR. A continuación, se incluyen algunos de los más utilizados.

### 2.7.4 Recomendaciones para la detección de KRAS

Existen unas recomendaciones clínicas provisionales de la ASCO (American Society of Clinical Oncology) en las que se indica a qué pacientes debe dirigirse el test de mutación en KRAS, el tipo de muestra y la técnica recomendada a utilizar:

- **Objetivo del test:** Se debería realizar un estudio del estado mutacional de KRAS en un laboratorio acreditado (CLIA) de los tumores de todos los pacientes con carcinoma colorrectal metastático que sean susceptibles de ser tratados con anticuerpos monoclonal anti-EGFR.
- **Resultado del test:** Si se encuentran mutaciones en el codon 12 o 13, se debería descartar la terapia con anti-EGFR.

- **Muestras a estudiar:**

o Las muestras tumorales deben ser seleccionadas por un patólogo, para incluir mayoritariamente células tumorales, sin necrosis ni inflamación.

o Se pueden enviar muestras frescas congeladas o muestras fijadas en parafina.

- **Tipos de ensayos recomendados:**

o El DNA se extraerá por protocolos estandarizados y específicos de cada laboratorio

o **RT-PCR.** Se deben usar sondas específicas para las mutaciones más frecuentes en los codones 12 y13.

o **Secuenciación directa** del exon 1.

o En EEUU, no hay kits aprobados por la FDA. En Europa, **TheraScreen** tiene marcado CE para uso de diagnóstico clínico.

- **Informe de resultados:**

o **KRAS normal:** No se han encontrado mutaciones. (Especificar el tipo de ensayo y los controles utilizados)

o **KRAS anormal:** Se ha encontrado mutaciones. El tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-EGFR no está recomendado según las recomendaciones provisionales de la ASCO. (Especificar el tipo de ensayo y los controles utilizados). (Ainoha García Claver, 2010)

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las mutaciones puntuales presentes o no en los codones 12 y 13 en el exón 2 del gen KRAS en tejidos tumorales embebidos en parafina de pacientes con CCR en el Instituto Oncológico Nacional (ION) para un diagnóstico individualizado que facilite el tratamiento y seguimiento de cada paciente.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la frecuencia de las mutaciones encontradas en nuestro País y compararlas con las reportadas en otras poblaciones.

Mostrar la prevalencia de factores de riesgo, edad y sexo en los pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal en la población panameña, así como la presencia de las mutaciones presentes en el gen KRAS de estos pacientes.

Implementar la técnica de PCR en tiempo real para identificar las mutaciones presentes o no en el exón 2 en los pacientes con CCR en nuestro País.

## METODOLOGÍA

1. **Tipo de estudio:** descriptivo, retrospectivo.
2. **Universo:** Muestras de tejidos frescos embebidos en parafina con diagnóstico patológico de cáncer colorrectal archivados en el Departamento de patología del Instituto Oncológico Nacional.
3. **Muestras:** Se seleccionaron un total de 118 muestras de tejidos frescos embebidos en parafina con diagnóstico patológico de cáncer colorrectal, de las cuales 62 eran del sexo femenino y 56 masculino, todos mayores de 26 años.
4. **Criterio de Inclusión:** Muestras de tejidos frescos embebidos en parafina con diagnóstico patológico de cáncer colorrectal cuyo porcentaje de tumor fuera mayor del 30%.
5. **Criterio de Exclusión:**
  - Muestras de tejidos frescos embebidos en parafina con diagnóstico patológico de cáncer colorrectal cuyo porcentaje de tumor fuera menor del 30%.
  - Muestras de tejidos frescos embebidos en parafina con diagnóstico patológico de cáncer colorrectal cuyo tejido se viese necrotizado.
6. **Método:**

### 6.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el Kit QIAamp DNA FFPE tissue de la marca Qiagen (qiagen, 2012), del cual realizamos cada paso según lo establecido en dicho Kit.

La extracción del ADN de los tejidos tumorales se realizó en 2 fases que comprendían dos días. El primer día se realizó el corte minucioso del bloque de parafina a trabajar, seleccionando el tejido tumoral no necrótico y realizando la lisis correspondiente. El segundo día se procedió a la extracción de ADN del tejido lisado y finalmente los ácidos nucleicos se valoraron en el espectrofotómetro Epoch de BioTek obteniéndose una medida de la concentración del ácido nucleico (ng/ $\mu$ L) así como de la pureza, a través de la relación de absorbancias 260/280 (con respecto a las proteínas) y finalmente se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 6.2 Detección de mutaciones en el oncogen K-RAS utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real

El objetivo de este proyecto fue la detección de siete mutaciones del gen K-RAS en los codones 12 y 13 mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando el Kit comercial KRAS RGQ PCR.

Mutación	Cambio de base	ID de Cosmic
Gly12Ala	(GGT>GCT)	522
Gly12Asp	(GGT>GAT)	521
Gly12Arg	(GGT>CGT)	518
Gly12Cys	(GGT>TGT)	516
Gly12Ser	(GGT>AGT)	517
Gly12Val	(GGT>GTT)	520
Gly13Asp	(GGC>GAC)	532

COSMIC IDs are taken from the *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

**Tabla 2.** Mutaciones en el gen K-RAS detectadas mediante el KRAS RGQ PCR kit de qiagen.

### **Principio:**

Es un PCR en tiempo real el cual proporciona una evaluación cualitativa del estado de mutación. El Kit combina dos tecnologías: *ARMS* y *Scorpions*.

*ARMS (Allele Refractory Mutations System)* permite la amplificación del alelo específico utilizando la Taq ADN polimerasa para distinguir entre la unión complementaria del cebador en la base 3' terminal de aquellas uniones no complementarias. Los cebadores ARMS amplifican selectivamente el ADN mutado.

*Scorpions* la amplificación del ADN mutado es detectada utilizando *Scorpions*. *Scorpions* son moléculas bifuncionales que contienen cebadores unidos covalentemente a una sonda. La sonda incorpora el fluoróforo FAM (Fluorescein amidite) y el silenciador o quencher.

### Protocolo de detección de mutaciones con el Kit KRAS RGQ PCR

1. Antes de cada corrida para conocer los resultados de las muestras, se realizó una reacción de control (CTRL) para evaluar el ADN amplificable total en cada muestra. El ensayo de control amplifica una región del exón 4 del gen KRAS. Se pueden evaluar hasta 24 muestras usando la mezcla de reacción de control disponible (Tabla 3). Es importante usar la mezcla de reacción de control (CTRL) como se describe (Tabla 4) porque el ADN muy degradado puede no amplificarse a pesar de que los cebadores generan fragmentos cortos de ADN.

Assay									
Control	1[PC]	9	17	25	-	-	-	-	-
Control	2[NTC]	10	18	26	-	-	-	-	-
Control	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Control	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Control	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Control	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Control	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Control	8	16	24	-	-	-	-	-	-

**Tabla 3.** Diseño de ejecución en el bloque de carga para la evaluación de muestras de ADN

Component of control assay master mix	Volume required for master mix
Control Reaction Mix (tube CTRL)	19.76 $\mu$ l x (n + 1)*
Taq DNA Polymerase (tube Taq)	0.24 $\mu$ l x (n + 1)
<b>Total volume</b>	<b>20 <math>\mu</math>l per reaction</b>

n = número de reacciones (muestras más controles).

**Tabla 4.** Preparación de la mezcla maestra del ensayo control

2. Luego de la corrida control se procedió a la corrida para las muestras. Se añadió 20ul del master mix de cada mutación como muestra la tabla 5 a todos los pocillos de reacción.
3. Inmediatamente se añadió 5ul de agua libre de nucleasa en los tubos NTC (controles negativos) cuyas posiciones en la placa eran de 9-16 (ver tabla 8).
4. Luego se añadió 5ul de ADN de cada muestra a los tubos en las posiciones 17-72 (ver tabla 5).

5. Se añadió 5ul de Control Positivo KRAS a los tubos PC como lo indica la tabla 8 en las posiciones 1-8.

Assay	Controls		Sample number						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Control	1*	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
12ASP	8	16	24	32	40	48	56	64	72

\* Numbers denote positions in the loading block and indicate final rotor position.

**Tabla 5.** Disposición de la placa del Kit de KRAS

6. Luego se introducía los tubos inmediatamente en el equipo Rotor Gen Q bajo las condiciones de amplificación que se muestran en la siguiente tabla.

Cycles	Temperatures	Time	Time
1	95°C	15 minutes	None
40	95°C	30 seconds	None
	60°C	60 seconds	Green and yellow

**Tabla 6.** Condiciones de los ciclos en el Rotor Gen Q

7. Una vez terminado el ciclo de amplificación se procedió al análisis de los resultados siguiendo éstos parámetros:

### Valores de Ct esperados para los controles:

Antes de analizar las muestras se confirmó que los Ct de los controles mostraran los valores indicados en el kit. Si alguno de estos valores no eran los indicados la corrida era eliminada.

- Ct del control negativo (NTC): para garantizar que no haya contaminación de la mezcla de reacción, el control no debe generar un valor Ct en el canal verde por debajo de 40. Para asegurarse de que la placa se configuró correctamente, el NTC debe mostrar la amplificación de 31.91-35.16 en el canal amarillo.
- Ct para el control positivo (PC): debe dar un Ct de ensayo de control (canal FAM) de 23.5-29.5. Un valor fuera de este rango indicaba un problema de configuración del ensayo.

Nota: Los datos de muestra no se deben usar si alguno de estos dos controles de ejecución ha fallado.

### Valores de Ct esperados para las muestras:

- Cada muestra debía mostrar un valor de Ct entre 21.92-32.00 en el canal verde.

Si las muestras mostraban valores fuera de rango por ejemplo por debajo de 21.92 la muestra debía ser diluida y si los valores estaban por encima de 32.00 sugería que había un bajo nivel de mutaciones y por consiguiente podrían no ser detectadas.

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

En la tabla 7, se muestra la base datos de las 118 muestras analizadas.

CÓDIGO	SEXO	EDAD	RESULTADO	CÓDIGO	SEXO	EDAD	RESULTADO
M12	M	69	WT	M73	F	61	WT
M15	M	86	WT	M76	F	77	WT
M20	M	71	WT	M79	F	81	WT
M29	M	86	WT	M81	F	76	WT
M33	M	86	WT	M83	F	64	WT
M34	M	80	WT	M101	F	88	WT
M35	M	50	WT	M104	F	66	WT
M36	M	59	WT	M109	F	57	WT
M37	M	63	WT	M110	F	76	WT
M38	M	48	WT	M114	F	67	WT
M42	M	52	WT	M117	F	60	WT
M49	M	69	WT	M120	F	77	WT
M53	M	71	WT	M124	F	62	WT
M55	M	67	WT	M126	F	61	WT
M56	M	64	WT	M127	F	83	WT
M57	M	65	WT	M51K	M	69	Gly12Asp
M66	M	63	WT	M69	M	63	Gly12Asp
M72	M	77	WT	M79K	M	77	Gly12Asp
M74	M	63	WT	M107	M	67	Gly12Asp
M75	M	50	WT	M113	M	50	Gly12Asp
M77	M	49	WT	M130	M	48	Gly12Asp
M78	M	59	WT	M6	F	67	Gly12Asp
M82	M	63	WT	M56K	F	72	Gly12Asp
M94	M	70	WT	M71K	F	43	Gly12Asp
M105	M	78	WT	M32	M	71	Gly12Cys
M115	M	66	WT	M40K	M	71	Gly12Cys
M116	M	46	WT	M119	M	67	Gly12Cys
M118	M	63	WT	M123	M	84	Gly12Cys
M121	M	69	WT	M125	M	60	Gly12Cys
M129	M	64	WT	M38K	F	37	Gly12Cys
M131	M	67	WT	M68	F	26	Gly12Cys
M132	M	44	WT	M102	M	45	Gly12Ser
M134	M	53	WT	M28K	F	43	Gly12Ser
M1	F	67	WT	M30K	F	64	Gly12Ser
M4	F	69	WT	M46	F	53	Gly12Ser
M8	F	52	WT	M47	F	59	Gly12Ser
M9	F	78	WT	M103	F	45	Gly12Ser
M14	F	78	WT	M34K	M	67	Gly12Val
M16	F	43	WT	M82K	M	72	Gly12Val
M17	F	78	WT	M85	M	81	Gly12Val
M19	F	72	WT	M112	M	67	Gly12Val
M24	F	59	WT	M63K	F	78	Gly12Val
M26	F	79	WT	M74K	F	79	Gly12Val
M27	F	46	WT	M106	F	58	Gly12Val
M28	F	61	WT	M13	M	71	Gly12Ala
M30	F	78	WT	M60	M	77	Gly12Ala
M39	F	52	WT	M65	M	70	Gly12Ala
M41	F	53	WT	M54K	F	47	Gly12Ala
M43	F	43	WT	M108	M	67	Gly13Asp
M45	F	44	WT	M122	M	70	Gly13Asp
M48	F	48	WT	M44	F	64	Gly13Asp
M50	F	62	WT	M47K	F	68	Gly13Asp
M51	F	77	WT	M58K	F	61	Gly13Asp
M54	F	70	WT	M61K	F	63	Gly13Asp
M58	F	57	WT	M133	F	51	Gly13Asp
M59	F	46	WT	M52	M	63	Gly12Arg
M67	F	79	WT	M80	F	62	Gly12Arg
M70	F	37	WT	M84	F	53	Gly12Arg
M71	F	46	WT	M128	M	54	ADN DEGRADADO

**Tabla 7.** Datos de todas las muestras analizadas

Se recogieron los datos de sexo y edad de 118 muestras con diagnóstico de CCR en el ION, las cuales se le extrajeron el ADN y a su vez fueron procesadas por la metodología de PCR en Tiempo Real para obtener sus resultados.

De los 118 casos recogidos, 56 fueron masculinos (47.46%) y 62 femeninos (52.54%). La mediana de edad resultó ser de 63.42 años, con una edad mínima de 26 años y máxima de 88 años (Tabla 8).

<b>Número de Pacientes</b>	N=118
<b>Mediana de edad e IC (años)</b>	63.42 (26-88)
<b>Sexo</b>	(%)
Masculino	47.46
Femenino	52.54

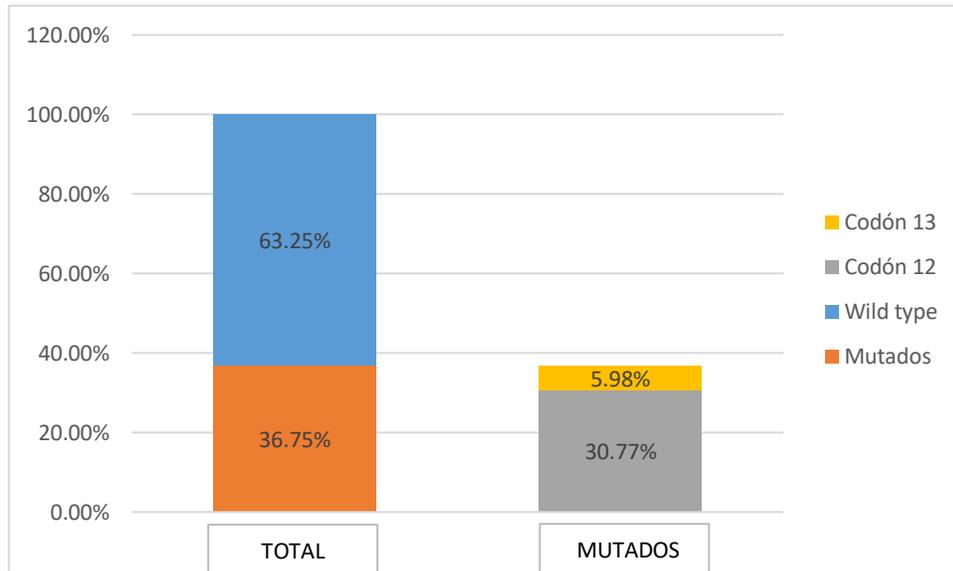
**Tabla 8.** Características demográficas del grupo de pacientes de estudio

Del total de 118 pacientes estudiados se encontró que el 63.25% (n=74) de ellos no poseía ningún tipo de mutación en el gen KRAS, mientras que el 36.75% (n=43) de ellos sí; y una de las muestras presentó el ADN degradado por lo cual no se pudo obtener resultado de la misma. Ver tabla 9.

	SECUENCIA Codón 12 - Codón13	N				%			
				Codón12	Codón13			Codón12	Codón13
<b>Wild type</b>	GGT-GGC	74				63.25%			
<b>Mutados</b>		43				36.75%			
<b>Codón 12</b>			36				30.77%		
Gly12Ala	GCT-GGC			4				3.42%	
Gly12Asp	GAT-GGC			9				7.69%	
Gly12Arg	CGT-GGC			3				2.56%	
Gly12Cys	TGT-GGC			7				5.98%	
Gly12Ser	AGT-GGC			6				5.13%	
Gly12Val	GTT-GGC			7				5.98%	
<b>Codón 13</b>			7				5.98%		
Gly13Asp	GGT-GAC				7				5.98%
<b>TOTAL</b>		117	43	36	7	100%	36.75%	30.77%	5.98%

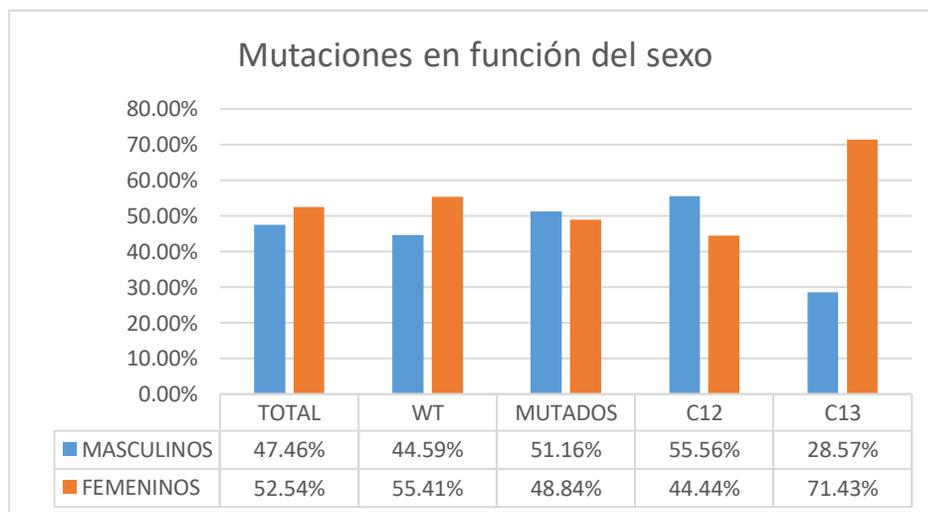
**Tabla 9.** Representación de los resultados obtenidos.

Dentro de las mutaciones halladas se pueden distinguir dos tipos. Por un lado las situadas en el codón 12 y por otro las que se sitúan en el codón 13. Gráfica 1.



**Gráfica 1.** Porcentaje de pacientes sin y con mutaciones en el gen KRAS y el porcentaje de mutados en el codón 12 (Gris) y codón 13 (Amarillo).

Mutaciones y sexo: La distribución de estas mutaciones en función del sexo resultó la siguiente:



**Gráfica 2.** Muestra la relación existente entre las mutaciones tanto del codón 12 como del 13 con el sexo.

De las mutaciones encontradas en los codones 12 y 13 según el sexo, se analizaron su frecuencia según la mutación presente en cada codón, como se muestra en la siguiente tabla:

MUTACIONES C12 Y C13	MASCULINO	FEMENINO
	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)
Gly12Ala	3 (13.64%)	1 (4.76%)
Gly12Asp	6 (27.27%)	3 (14.29%)
Gly12Arg	1 (4.55%)	2 (9.52%)
Gly12Cys	5 (22.73%)	2 (9.52%)
Gly12Ser	1 (4.55%)	5 (23.81%)
Gly12Val	4 (18.18%)	3 (14.29%)
Gly13Asp	2 (9.09%)	5 (23.81%)

**Tabla 10.** Frecuencias de mutaciones en el gen KRAS según sexo

Tanto en el grupo de las mujeres como en el grupo de los hombres, se identificaron las siguientes mutaciones: Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Arg, Gly12Cys, Gly12Ser, Gly12Val y Gly13Asp, de las cuales la de mayor frecuencia en el grupo de las mujeres fueron la Gly12Ser y Gly13Asp; y en grupo de los hombres se identificó la mutación Gly12Asp como la más frecuente, esto lo podemos observar en la tabla 10.

Se encontró mayor presencia de mutaciones en el rango de 61 a 70 años tanto para el sexo masculino como en el sexo femenino, tal como se muestra en la tabla 11.

RANGO DE EDAD	SEXO		TOTAL
	MASCULINO	FEMENINO	
<40	0	2	2
41-50	3	4	7
51-60	1	5	6
61-70	10	7	17
71-80	6	3	9
81-90	2	0	2
<b>TOTAL</b>	22	21	43

**Tabla 11.** Cantidad de mutaciones según rango de edad y sexo.

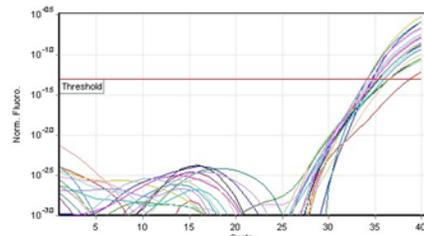
A continuación mostramos un ejemplo de una corrida control (CTRL) para evaluar el ADN amplificable total en cada muestra (Figura 13) y una corrida de una serie de muestras para evaluar la presencia o no de mutaciones (Figura 14).

### Quantitation Report

#### Experiment Information

Run Name	DNA KRAS 2017-12-20
Run Start	12/20/2017 1:47:30 PM
Run Finish	12/20/2017 3:41:13 PM
Operator	YQP
Notes	KRAS RUO 201217 SAMPLE
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.1.46
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	5.33
Gain Yellow	5.33
Machine Serial No.	0712186

#### Quantitation data for Cycling A.Yellow



No	Col or	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)
1	■	PC	Positive Control	33.7	2		
2	■	NTC	NTC	34.1	1		
3	■	M25	Unknown	34.6	4		

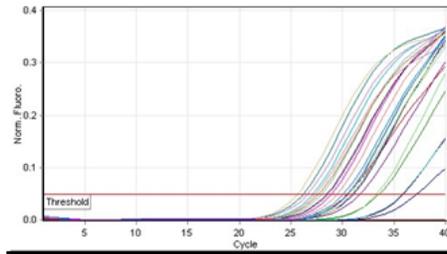
**Figura 13.** Gráfica de una corrida control para la evaluación del ADN de cada muestra.

## Quantitation Report

### Experiment Information

Run Name	DNA KRAS 191217
Run Start	12/19/2017 7:58:32 AM
Run Finish	12/19/2017 9:51:30 AM
Operator	YOP
Notes	KRAS RUC 191217 SAMPLE
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	5.33
Gain Yellow	5.33
Machine Serial No.	0712186

### Quantitation data for Cycling A.Green



No	Col	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)
1	Red	PC	Positive Control	30.5			
2	Yellow	NTC	NTC		NEG (NTC)		
3	Blue	M1	Unknown	31.0			

**Figura 14.** Gráfica de una corrida de las muestras.

## **DISCUSSION**

## DISCUSION

Nuestro trabajo logra optimizar la técnica de PCR en tiempo real que detecta mutaciones en el exón 2, en el codón 12 y 13, del gen KRAS utilizando el kit “KRAS RGQ PCR” (Qiagen) en un termociclador a tiempo real (Rotor Gene Q). Ésta metodología combina dos tecnologías, sondas Scorpion® y ARMS® (Amplification Refractory Mutation System), siendo capaz de detectar las 7 mutaciones más frecuentes encontradas en KRAS, seis en el codón 12 y una del 13, teniendo una sensibilidad analítica para dichos cambios el 1%.

Las mutaciones halladas en nuestro trabajo en el gen KRAS fueron Gly12Ala (G12A), Gly12Asp (G12D), Gly12Arg (G12R), Gly12Cys (G12C), Gly12Ser (G12S), Gly12Val (G12V) y Gly13Asp (G13D); que son las 7 mutaciones somáticas más frecuentes reportadas en la literatura y las estudiadas en nuestro trabajo.

Nuestros hallazgos muestran la presencia de mutación del gen KRAS en 36.75% de los cánceres de colon y recto analizados, cifra muy similar a la reportada en los múltiples trabajos publicados en la literatura como son los casos de los trabajos de Neumann J, y col. (2009) que reportaron un 39.3% de mutaciones presentes en su estudio; Knijn N, y col. (2011) detectaron un 35.4% de mutaciones en los tumores analizados; y Winder T, y col. (2009) su estudio les arrojó una cifra un poco más baja con un 28% de casos con mutación en el gen KRAS. Un hecho similar se observa en relación a la distribución porcentual de

los distintos tipos de mutaciones, con sobre 30.77% de mutaciones del codón 12 y aproximadamente 5.98% en el codón 13.

Sin embargo, no es posible descartar la presencia otras mutaciones infrecuentes o hasta ahora no descritas, como en el caso del estudio de Egoavil y col. (2011) donde se reportó una nueva mutación Gly13Arg (G13R) (la glicina es remplazada por una arginina) en pacientes Peruanos. Se requieren estudios de secuenciación del ADN tumoral en aquellos pacientes sin mutación detectada para abordar esta posibilidad.

El grupo de edad más afectado se ubicó entre los 61 a 70 años, lo cual concuerda con los resultados reportados por Cotran R, y col. (1995), que lo ubicaron entre los 60 y 69 años y la distribución de estas mutaciones en función del sexo resultó la siguiente:

De los 56 (47.46%) masculinos presentes en el estudio el 44.59% (n=33) no presentaron mutación (WT), sin embargo el 51.16% (n=22) restantes sí, y dentro de los masculinos uno tenía su ADN degradado. Entre estos, el 55.56% (n=20) presentaron mutaciones en el codón 12 y el 28.57% (n=2) en el codón 13.

De las 62 (52.54%) femeninas presentes en el estudio el 55.41% (n=41) no presentaron ningún tipo de mutación (WT), sin embargo el 48.84% (n=21) restante sí. Por un lado, el 44.44% (n=16) en el codón 12 y el 71.43% (n=5) en el codón 13.

No se observaron diferencias en la frecuencia de mutación de KRAS en género y edad de los pacientes, lo cual coincide con lo observado por Senagore AJ, y col. (1997), pero no

coincide con lo reportado por Pajkos G, y col. (2000), donde encontraron que se observan más las mutaciones en hombres que en mujeres.

El tratamiento anti-EGFR, basado en anticuerpos monoclonales, se utiliza en la práctica clínica desde el año 2004 siendo su primera aplicación en CCRm. Estos fármacos tienen como diana el EGFR, bloqueándolo e inhibiendo el crecimiento tumoral así como otras funciones invasivas de la célula cancerosa que se activan a través de las vías de señalización que desencadena.

En el año 2009 se descubrió la asociación entre las mutaciones del gen KRAS y la resistencia al tratamiento del CCRm a dichos fármacos, considerándolo al estado mutacional de dicho gen como factor predictivo de respuesta al tratamiento. Este hallazgo fue un hito histórico y cambió la historia de la oncología. A partir de ese momento, la Sociedad Americana de Oncología Clínica indicó que se debería determinar el estatus del gen KRAS en todos los pacientes con CCRm a los que se les pautara el tratamiento con anticuerpos anti-EGFR. Posteriormente tanto la FDA como la EMEA consideraron obligatorio el estudio del estado mutacional del gen KRAS para el tratamiento con anticuerpos anti-EGFR. (Rodríguez, 2014).

Por lo tanto, la utilización de la determinación del status del gen KRAS para predecir la respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales contra EGFR, en alrededor de 36.75% de nuestros pacientes no tendría indicación terapéutica; por lo cual es necesario conocer el status del gen KRAS en cada paciente para en el caso de resultar mutado buscar

otra alternativa de tratamiento y seguimiento, ahorrándole tiempo valioso al paciente ya que recibiría otra alternativa personalizada.

Vogelstein y colaboradores demostraron que la presencia de mutaciones en el gen KRAS está directamente asociada al tamaño del tumor, especialmente cuando el diámetro es mayor de 1 cm. Es posible asociar que entre más tardíamente es detectado el tumor, su probabilidad de tener mutaciones en el gen KRAS es mayor; lo que nos indica la importancia de la detección temprana de ésta enfermedad ya que el oncogén K-RAS constituye uno de los eventos que suceden en la secuencia adenoma carcinoma y su identificación permite tener un indicador temprano de malignidad. Esto ha llevado a los investigadores a nivel mundial a emplear técnicas que permiten la identificación temprana de esta mutación en muestras biológicas que son más accesibles para su análisis (Rennert y Col., 2007)

En nuestro estudio las frecuencias de mutación en el gen KRAS fueron inferiores a las frecuencias reportadas en el primer estudio de KRAS realizado en Panamá en el año 2015 por la Mgter. Yaribeth Olmedo, en el cual su estudio con una cohorte de 60 pacientes analizados por secuenciación arrojaron un 63% de mutaciones, de las cuales solo se encontraron 6 de las siete mutaciones analizadas en nuestro estudio, a pesar de que fue utilizada la técnica de secuenciación para su análisis no se encontraron nuevas mutaciones en las muestras analizadas; sin embargo nuestro estudio con una cohorte de 118 muestras arrojaron 36.75% de casos mutados, encontrándose 7 de las 7 mutaciones más frecuentes según la literatura lo que nos indica que la técnica de PCR en tiempo real que utilizamos en nuestro trabajo es altamente sensible y validada para estudios de mutaciones somáticas;

Lo que nos indica que a pesar de que la técnica de secuenciación es recomendada para detectar posibles nuevas mutaciones, también se puede implementar una nueva alternativa validada ( PCR en tiempo Real ) para los pacientes con CCRm, brindándole una respuesta rápida y un tratamiento dirigido, sin dejar de tomar en cuenta que a pesar de que nuestra metodología detecta las mutaciones más frecuentes, los pacientes que no presentan mutación y que el tratamiento con anticuerpos monoclonales no les es efectivo se le recomienda realizar estudios más profundos buscando nuevas mutaciones que impiden que el tratamiento les haga el efecto deseado.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- Optimización de la Técnica de PCR en tiempo real para la detección de las 7 mutaciones más frecuentes presentes en el exón 2 del gen KRAS.
- La técnica de PCR en tiempo real para la detección de las mutaciones presentes en KRAS no tiene como objetivo servir de prueba diagnóstica del cáncer colorrectal; está concebida como complemento de otros factores pronósticos importantes utilizados para la selección de los pacientes aptos para el tratamiento mediante terapias por inhibición del EGFR, según el estado de la mutación en el paciente. El médico valorará el estado de la mutación en el paciente, además de otros factores relativos a la enfermedad, para tomar una decisión sobre la terapia.
- La frecuencia de las mutaciones presentes en los codones 12 y 13 en el exón 2 del gen KRAS en los tejidos tumorales embebidos en parafina de pacientes con CCR en el Instituto Oncológico Nacional (ION), arrojaron un porcentaje similar en comparación con múltiples estudios en otros países, sin embargo los resultados resultaron ser un poco más bajos a el primer estudio realizado de KRAS en Panamá.
- No existió una diferencia de edad y sexo en los resultados arrojados en nuestro estudio.

## **CITAS BIBLIOGRÁFICAS**

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

Ainoha García Claver, R. R.-R.-Q. (2010). Significación clínica y métodos de detección de KRAS en neoplasias. *Asociación Española de Biopatología Médica*, 3-20.

Allegra C. J. y otros, 2009. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*, Volumen 27(12), pp. 2091–2096.

Amado R. G. y otros, 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, Volumen 26(10), pp. 1626–1634.

American Cancer Society. (Accessed October 2010) What is Colorectal Cancer? [<http://www.cancer.org/Cancer/ColonandRectumCancer/DetailedGuide/colorectal-cancer-what-is-colorectal-cancer>]

Applied Biosystems, 2009. *Development of an Interlaboratory-Verified Sequencing Workflow for KRAS Variant Identification*, United State of America: s.n.

Aunoble B, Sanches R, Didier E, Bignon YJ. Major oncogenes and tumor suppressor genes involved cancer (review). *Int J Oncol* 2000; 16: 567-76.

Bos, J.L., 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* Volumen 49(17), pp. 4682–4689.

Bray, Freddie, Ferlay, Jacques, Soerjomataram, Isabelle y otros. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, (2018).

Buhrman G. y otros, 2007. Transformation efficiency of RasQ61 mutants linked to structural features of the switch regions in the presence of Raf. *Structure*, Volumen 15(12), pp. 1618– 1629.

Conlin A. y otros, 2005. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*, Volumen 54(9), pp.1283–1286.

Cotran R, Kwnar y, Robbins S Patología Estructural y Funcional Ed Mc Graw Hill 1995, pp 289-305.

Edkins S. y otros, 2006. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*, Volumen 5(8), pp. 928–932.

Ellis,R.W., Defeo, D., Shih, T.Y., Gonda, M.A., Young, H.A., Tsuchida, N., Lowry, D.R. and Scolnick,E.M. The p21 src gene of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature*. 1981- 292:506-511.

Emory Winship Cancer Institute. (21 de 02 de 2018). Obtenido de Cancer Quest: [https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/cancer-por-tipo/cancer-colorectal?gclid=CjwKCAjwyOreBRAYEiwAR2mSkksMfvd474koV9KptNn6BhJnGonTdvqnCYXqtXugmMBu9B5pj2\\_pchoCjVIQAvD\\_BwE](https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/cancer-por-tipo/cancer-colorectal?gclid=CjwKCAjwyOreBRAYEiwAR2mSkksMfvd474koV9KptNn6BhJnGonTdvqnCYXqtXugmMBu9B5pj2_pchoCjVIQAvD_BwE)

Esteve, A. A. (2009). *Lo que hay que saber sobre el cáncer de colon y recto*. Barcelona: Marge medica books.

Friday, B.B. and Adjei, A.A. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1756:127-144.

GLOBOCAN 2018, Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018 v1.0, (2018). <http://gco.iarc.fr/today/home>

Guedes, J. G. y otros, 2013. High resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, Volumen 13, pp. 1-10.

Harvey, J.J. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. 1964. *Nature*. 204: 1104-1105.

Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Wilentz RE, Goggins M, Kern SE. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7: 251-8.

Instituto Oncológico Nacional. (2016). *Registro Hospitalario de Cáncer*. Panamá: RHC-ION.

Karapetis C. S. y otros, 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, Volumen 359(17), pp. 1757–1765.

Kirsten, W H, and Mayer, L A Malignant lymphomas of extrathymic origin induced in mice by murine erythroblastosis virus *J Natl Cancer Inst* 1969 43 735-746

Krijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Borger ME, Tol J, Teerenstra S, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2011; 104 (6): 1020-6.

Lambert, J M, Lambert, Q T, Reuter, G W, Malliri, A, Siderovski, D P, Sondek, J, Collard, J G, and Der, C J Tiam 1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-dependent mechanism *Nat Cell Biol* 4 621-625

Martinez-Garza S O, Nuftez-Salazar A, Calderon AL, Bosques Fi, Niderhauser A, Barrera-Saldaña II Frequency and clinicopathology associations of K-ras mutations in colorectal cancer in a northeast Mexican population *Dig Dis* 1999, 17(4) 225-9

Ministerio de salud, 2013. *Boletín estadístico*. [En línea] Available at: <http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicacion-general/boletin2013.pdf> [Último acceso: 2 agosto 2018].

National Cancer Institute. (Febrero de 2008). Obtenido de National Cancer Institute Web site: <http://www.cancer.gov/espanol>.

Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2009; 205 (12): 858-62.

Neuhausen SL Ethnic differences in cancer risk resulting from genetic variation *Cancer* 1999, 86(11 Suppl) 2575-2582

OLMEDO, Y. 2015. Mutaciones en el gen KRAS en muestras de tejidos tumorales. Tesis. Universidad de Panamá, Panamá, Panamá. 106 págs.

Pajkos G, Kiss I, Sandor J, Ember I, Kishazu P Prognostic value of the presence of the mutation of the codons 12, 13 and 61 in *K-ras* oncogene in colorectal cancer *Anticancer Res* 2000, 20 1695-1701

Parada, L-F., Tabin, C.J., Shih, C., and Weinberg, R.A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*. 1982.297:474-478.

QIAamp® DNA FFPE Tissue, (2012). [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

Rennert G, Kislitsin D, Brenner D, Rennert HS, Lev Z Detecting K-ras mutation in stool from fecal occult blood test card in multiphase screening for colorectal cancer *Cancer Lett* 2007, 253 258-264

ROCHE. (Noviembre de 2018). *Estadios del cáncer de colon*. Obtenido de <https://rochepacientes.es/estadios-del-cancer-de-colon/>

Rodríguez, P. L. (2014). Estudio de biomarcadores predictivos de respuesta a la terapia antireceptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR) en el cáncer colorrectal metastásico. *UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID*, 5-6.

Rosales-Reynoso, C. I.-V. (2014). Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares. *Gaceta Médica de México*, 11.

Senagore AJ, Biener T A newly identified pattern of *K-ras* mutations at codons 12 and 13 is associated with long-term survival in colorectal cancer *Surgery* 1997, 122 765-770

Schubert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 295-308.

Teresa Macarulla, E. É. (2011). *Comprender el cáncer de colon y de recto*. Barcelona: Amat.

Van Krieken, J. H. J. M. y otros, 2008. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Archv*, Volumen 453, pp. 417–431.

Vogelstein BI, Fearon ER, Hamilton SR., Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL Genetic alterations during colorectal tumor development N Engl J Med 1988 Sep 1,319(9) 525-532.

Wickenden J. A. y otros, 2008. Colorectal cancer cells with the BRAF(V600E) mutation are addicted to the ERK1/2 pathway for growth factor-independent survival and repression of BIM. *Oncogene*, Volumen 27(57), pp. 7150–7156.

Winder T, Mundlein A, Rhomberg S, Dirschmid K, Hartmann BL, Knauer M, et al. Different types of K-Ras mutations are conversely associated with overall survival in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep* 2009; 21 (5): 1283-7.

World Health Organization, 2008. *International Agency for Research on Cancer*. [En línea] Available at: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/> [Último acceso: 2 agosto 2014].

Wu CM, Tang R, Wang JY, Changchien CR, Hsieh LL Frequency and spectrum of K-RAS codons 12 and 13 mutations in colorectal adenocarcinomas from Taiwan *Cancer Genet Cytogenet* 2005, 158 55-60

Egoavil CM, Montenegro P, Soto JL, Casanova L, Sánchez-Lihon J, Castillejo MI, et al. Clinically important molecular features of Peruvian colorectal tumours: high prevalence of DNA mismatch repair deficiency and low incidence of KRAS mutations. *Pathol* 2011; 43: 228-33.