

## “Detección de Mutaciones del Gen KRAS en Pacientes Paraguayos con Cáncer Colorrectal”

Torio Hugo<sup>1</sup>, Rodríguez Ingrid<sup>2</sup>, Molina Hugo<sup>3</sup>, Rojas de Arias Antonieta<sup>4</sup>, Martínez de Filártiga Ma. Teresa<sup>5</sup>  
hftorio@yahoo.com<sup>1</sup>, ingridmrodriguez@gmail.com<sup>2</sup>, hugomolinainsfran@hotmail.com<sup>3</sup>,

rojasdearias@gmail.com<sup>4</sup>, lcurie@tigo.com.py<sup>5</sup>

Laboratorio Curie S.R.L., Asunción-Paraguay

**PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2013 – PROYECTO 14 INV-469**

### RESUMEN

Varios ensayos clínicos realizados han demostrado que el estado mutacional del biomarcador KRAS indica si un paciente respondería a determinados tratamientos biológicos<sup>(1,2)</sup>. Según un reporte del 2011, las frecuencias de mutación del gen KRAS en pacientes con CCR de Asia, Europa y Latinoamérica fueron del 24%, 36% y 40%, respectivamente ( $P < 0.0001$ )<sup>(3)</sup>. Paraguay no cuenta con este tipo de informes, a pesar de registrar anualmente en promedio 75 nuevos casos de pacientes diagnosticados con CCR sólo en el Servicio de Cirugía General del Hospital Central del Instituto de Previsión Social (IPS). El presente trabajo ha implementado este análisis de rutina, prerequisite obligatorio para la administración de fármacos basados en anticuerpos terapéuticos, y revelado una frecuencia de mutación del gen KRAS del 34% en pacientes paraguayos con CCR que acuden a los servicios del Hospital Central del IPS.

### INTRODUCCIÓN

El Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) fue reconocido como una importante diana para las nuevas terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos. Es el punto de partida de una vía de transducción de señales, el cual, después de unirse al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), reenvía el mensaje de proliferación celular al núcleo a través de varios interruptores intermediarios incluyendo el KRAS. Muchas células epiteliales cancerígenas sobre expresan el EGFR y ganan hiperproliferación. Los Anticuerpos Terapéuticos como Cetuximab o Panitumumab contra el EGFR pueden inhibir exitosamente este proceso y parar la proliferación de células cancerígenas<sup>(4)</sup>. Pero solo una parte de los pacientes con cáncer se beneficia de esta terapia. Para una gran parte de pacientes no se observa ninguna reacción. Las razones para esta resistencia son mutaciones en algunas partes de la vía de señales de las células cancerígenas. La secuenciación del ADN de célula cancerígena mostró mutaciones somáticas puntuales en el mismo EGFR o, especialmente, en el gen KRAS y en otros genes de los elementos de la vía como NRAS, BRAF, PIK3CA. Las mutaciones resultan en un permanente “encendido” de la actividad de señales, independiente del EGFR. De ahí que un bloqueo del EGFR con anticuerpos resulta sin efecto por un atajo en la parte subsecuente de la vía

de señales<sup>(4,5)</sup>. Las nuevas directrices establecidas por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO), y la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) para el empleo de fármacos en la indicación de cáncer colorrectal establecen la “obligatoriedad” de realizar un test del estado mutacional del oncogén KRAS a todos los pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal antes de iniciar el tratamiento. De este modo se evita también terapias costosas, prolongadas e ineficaces.

Los objetivos principales específicos del presente trabajo fueron: determinar la prevalencia del gen KRAS mutado en una población local de 100 pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal, e implementar este tipo de estudio o servicio en Paraguay, previamente inexistente, como de rutina para mejorar el manejo terapéutico de dichos pacientes.

### MATERIALES Y METODOS

*Extracción de ADN.* Las muestras de tejido tumoral fijadas en formol neutro e incluidas en parafina de 100 especímenes colorrectales de pacientes de ambos sexos con diagnóstico de CCR, resecaadas entre 2013 y 2018, fueron obtenidas del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central del IPS. De todos los especímenes, una sección de 5 µm de espesor fue teñida con hematoxilina y eosina para verificación del tejido tumoral, el cual fue marcado para distinguirlo del tejido normal. Para el aislamiento de ADN fueron disecados 2 secciones de tejido (c/u de 50 µm de espesor) y colocados en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Luego de ser desparafinados usando aceite mineral se extrajo el ADN utilizando el kit ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Cat. A2352, PROMEGA, Madison, WI, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante. En todos los casos el ADN fue eluido de la columna con 30 µl del buffer de Elución. La cuantificación del mismo se realizó por fluorometría, utilizando el fluorómetro Quantus™ (Cat. E6150, PROMEGA, Madison, WI, USA) con la tinción del mismo fabricante QuantiFluor® ONE dsDNA (Cat. E489A) y de acuerdo con su correspondiente protocolo.

*PCR.* Para el análisis de mutaciones somáticas en el gen KRAS, fragmentos del exón 2 (codones 12 y 13), exón 3 (codones 59 y 61) y exón 4 (codones 117 y 146) del gen KRAS fueron amplificados en una PCR múltiple

## “Detección de Mutaciones del Gen KRAS en Pacientes Paraguayos con Cáncer Colorrectal”

Torio Hugo<sup>1</sup>, Rodríguez Ingrid<sup>2</sup>, Molina Hugo<sup>3</sup>, Rojas de Arias Antonieta<sup>4</sup>, Martínez de Filártiga Ma. Teresa<sup>5</sup>  
 hftorio@yahoo.com<sup>1</sup>, ingridmrodriguez@gmail.com<sup>2</sup>, hugomolinainsfran@hotmail.com<sup>3</sup>,  
 rojasdearias@gmail.com<sup>4</sup>, lcurie@tigo.com.py<sup>5</sup>  
 Laboratorio Curie S.R.L., Asunción, Paraguay

**PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2013 – PROYECTO 14 INV-469**

con primers específicos biotinilados, utilizando para ello el kit KRAS RDB 2296X (GenID® GmbH, Straßberg,

Germany) de acuerdo con el protocolo del fabricante, con excepción del termociclador, el Rotor-Gene® Q 5plex HRM (QIAGEN, Hilden, Germany). Para alcanzar los requerimientos óptimos recomendados por el fabricante del kit, el programa de termociclado fue modificado y validado como sigue: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 10 ciclos de pre-amplificación con 2 temperaturas (95°C por 32 seg y 60°C por 33 seg), más 26-30 ciclos de amplificación (dependiendo de la concentración inicial de ADN molde) con 3 temperaturas (95°C por 27 seg, 55°C por 32 seg y 72°C por 27 seg) y una extensión final de 72°C por 8 min.

*Hibridación Reversa.* La caracterización de las mutaciones, así como la detección de los controles de amplificación, fue llevada a cabo por hibridación reversa con el kit KRAS RDB 2295X (GenID® GmbH, Straßberg, Germany) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

### RESULTADOS

De las muestras de tejido tumoral, provenientes de 100 especímenes colorrectales de pacientes paraguayos diagnosticados con CCR, analizadas en este trabajo, 33 de ellas presentaron al menos una mutación en el gen KRAS y 1 presentó hasta dos mutaciones simultáneas. Esto corresponde a una frecuencia de mutación del 34% en la población de estudio.

Algunas de las variables medidas en esta población como edad, sexo y localización del tumor en relación tanto a la presencia como ausencia de mutación KRAS, se representan en la Figura. 1

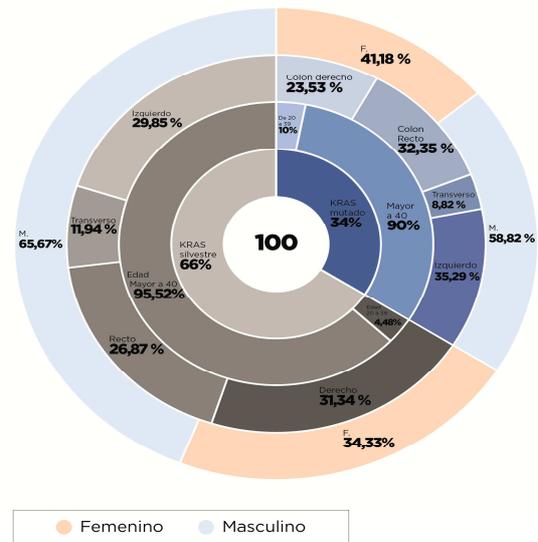
Si relacionamos sólo la localización anatómica del tumor con el estado mutacional del gen KRAS, obtenemos el gráfico de la Figura 2.

Las frecuencias de mutaciones del gen KRAS agrupadas en los codenes 12 (57%), 13 (23%), 61 (9%) y 146 (11%) están representadas en la Figura 3.

Finalmente, las frecuencias de mutaciones KRAS específicas encontradas en los codones mencionados más arriba, se representan en la Figura 4.

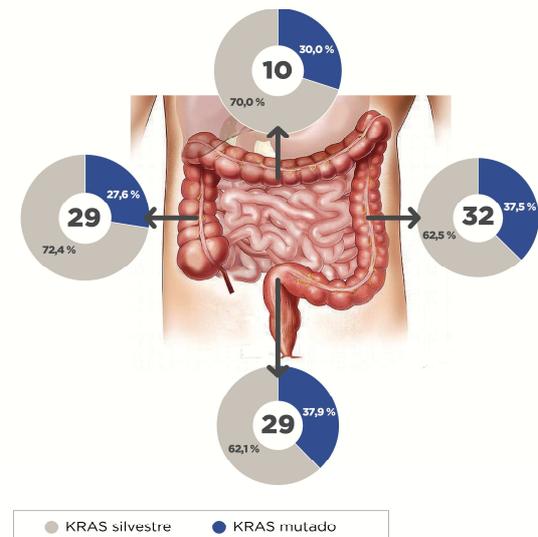
**Figura 1**

Distribución de pacientes con KRAS mutado y KRAS silvestre según género y rango etario en pacientes paraguayos con cáncer CCR.



**Figura 2**

Distribución de pacientes con KRAS mutado y KRAS silvestre según la localización del tumor.

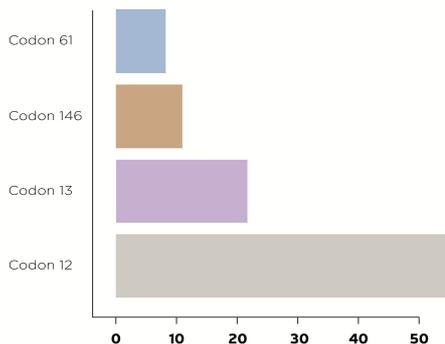


## “Detección de Mutaciones del Gen KRAS en Pacientes Paraguayos con Cáncer Colorrectal”

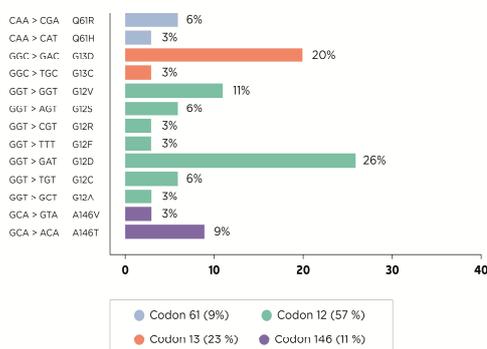
Torio Hugo<sup>1</sup>, Rodríguez Ingrid<sup>2</sup>, Molina Hugo<sup>3</sup>, Rojas de Arias Antonieta<sup>4</sup>, Martínez de Filártiga Ma. Teresa<sup>5</sup>  
 hftorio@yahoo.com<sup>1</sup>, ingridmrodriguez@gmail.com<sup>2</sup>, hugomolinainsfran@hotmail.com<sup>3</sup>,  
 rojasdearias@gmail.com<sup>4</sup>, lcurie@tigo.com.py<sup>5</sup>  
 Laboratorio Curie S.R.L., Asunción, Paraguay

PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2013 – PROYECTO 14 INV-469

**Figura 3**  
Frecuencias de Mutaciones del Gen KRAS de acuerdo a los codones 12-13-61 y 146.



**Figura 4**  
Frecuencias de mutaciones KRAS en la población de estudio.



### CONCLUSIÓN

El presente trabajo ha revelado, por primera vez en el país, una frecuencia de mutación del gen KRAS del 34% en pacientes paraguayos diagnosticados con CCR. Esta frecuencia está en concordancia a lo esperado según un reporte del 2011, donde las frecuencias de mutación del gen KRAS en pacientes con CCR de Asia, Europa y Latinoamérica fueron del 24%, 36% y 40%, respectivamente ( $P < 0.0001$ )<sup>(3)</sup>. De acuerdo también a lo esperado ninguna de las variables medida resulto ser estadísticamente significativa con el estado mutacional del Gen KRAS

Además, ha permitido establecer, como de rutina, el análisis del estado mutacional del gen KRAS, prerequisite obligatorio para la administración de

fármacos basados en anticuerpos terapéuticos. Siendo los pioneros, este servicio está disponible para todos los pacientes diagnosticados con CCR provenientes de todas las instituciones sanitarias del país, sean públicas o privadas. Teniendo en cuenta que sólo el Servicio de Cirugía General del Hospital Central del IPS registra anualmente en promedio 75 nuevos casos de pacientes diagnosticados con CCR, cifra que va en aumento ya que en el 2017 el mismo Servicio ha registrado 113 nuevos casos, es importante contar con este tipo de análisis para mejorar el manejo terapéutico y la expectativa de vida de los pacientes.

Otro aporte importante ha sido la conformación de un equipo de trabajo multidisciplinario e interinstitucional que permite la continuidad del estudio de los otros genes de los elementos de la vía de señales del EGFR como NRAS, BRAF, PIK3CA.

### REFERENCIAS

1. Van Cutsem E, Köhne CH, et al. **Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer.** N Engl J Med. 2009 Apr 2;360(14):1408-17.
2. Bokemeyer C, Bondarenko I, et al. **Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer.** J Clin Oncol. 2009 Feb 10;27(5):663-71.
3. Ciardiello F, Tejpar S, et al. **Uptake of KRAS mutation testing in patients with metastatic colorectal cancer in Europe, Latin America and Asia.** Target Oncol. 2011 Sep;6(3):133-45.
4. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. **Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer.** J Natl Cancer Inst. 2009 Oct 7;101(19):1308-24.
5. Baynes RD1, Gansert J. **KRAS mutational status as a predictor of epidermal growth factor receptor inhibitor efficacy in colorectal cancer.** Am J Ther. 2009 Nov-Dec; 16 (6):554-61.