

# DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN KRAS COMO SCREENING RUTINARIO PARA LA ELECCIÓN DEL TRATAMIENTO ÓPTIMO EN EL CÁNCER COLORRECTAL

## TRABAJO FIN DE MÁSTER

AUTOR: EZTIZEN GARZÓN OTERO

DIRECTORES: Dr. Guillermo López Vivanco

Dra. Begoña Calvo Martínez

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>pág. 3-10</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>pág. 10</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>pág. 11-25</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>pág. 25-33</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>pág. 33-34</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>pág. 35</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>pág. 36-38</b>

# DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN KRAS COMO SCREENING RUTINARIO PARA LA ELECCIÓN DEL TRATAMIENTO ÓPTIMO EN EL CÁNCER COLORRECTAL

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que se desarrolla debido a alteraciones genéticas producidas en una célula inicial, que son transmitidas a las células hijas y que terminan desencadenando que alguna de estas células pierda el control de la proliferación y posteriormente adquiera la capacidad de escapar e invadir otros tejidos, colonizarlos y crecer en ellos. Este grupo de células cancerosas ocasionan lesiones en tejidos y órganos que alteran el funcionamiento normal del organismo.

El cáncer colorrectal (CCR) corresponde a todos aquellos tumores ubicados en el intestino grueso, pudiendo localizarse desde la valva ileocecal hasta el recto. En el mundo, cada año se registran aproximadamente un millón de nuevos casos de CCR y medio millón de muertes, con una tasa de mortalidad del 8,1 por cada 100.000 habitantes siendo una de las neoplasias más frecuentes en nuestro medio.

Las regiones principalmente afectadas son las más desarrolladas (25,1/100.000 hab.) mientras que en las de menor desarrollo la tasa es significativamente inferior (3,9/100.000 hab.)<sup>3</sup>.

En la actualidad, el CCR constituye la segunda neoplasia más frecuente tanto en varones como en mujeres, tras el cáncer de pulmón y el de mama, respectivamente. Cuando se consideran ambos sexos de forma conjunta, ya que afecta a ambos por igual (aunque la localización rectal es más frecuente en varones), ocupa el primer lugar en incidencia y representa la segunda causa de muerte por cáncer<sup>1</sup>. Por lo tanto el CCR supone un problema sanitario de primera magnitud.

La edad de presentación más frecuente ronda los 62 años, aunque puede presentarse a cualquier edad. Según diferentes investigaciones, la tendencia es que su incidencia siga aumentando y se estima que en 2015 se detectarán 30.230 nuevos casos (17.444 en hombres y 12.786 en mujeres), lo que supone casi 600 diagnósticos cada semana<sup>2</sup>.

Nueve de cada 10 casos se curan si se detectan de manera temprana por lo que los programas de detección precoz resultan fundamentales para diagnosticar a tiempo un cáncer del que fallecen, cada semana, 250 personas (cuatro veces más que los accidentes de tráfico).

Este tipo de cáncer se puede diagnosticar de manera precoz antes de notar sintomatología alguna. Por ello en España se ha implantado un programa de cribado de cáncer de colon gracias al cual solo en el País Vasco se han detectado 431 adenomas de alto riesgo y 61 cáncer

invasivos, en 2009 de 16.063 participantes y 1913 adenomas de alto riesgo y 285 cáncer invasivos, en 2010 de 72.217 participantes<sup>4</sup>.

Para el desarrollo de ese cribado se realizan básicamente dos pruebas diagnósticas, estas son: el test de sangre oculta en heces (TSOH) y la colonoscopia.

El TSOH, como su propio nombre indica, consiste en detectar sangre oculta en las heces. Esta es una prueba no invasiva que en muchos casos es el único indicio de que una persona pueda tener una enfermedad colorrectal, incluyendo el cáncer. Esta prueba se realiza tanto a hombres como mujeres entre 50 y 69 años. En caso de que el resultado del TSOH sea positivo, se debe realizar una colonoscopia para poder descubrir la procedencia del sangrado.

Por otro lado, la colonoscopia es una exploración que permite visualizar todo el intestino grueso y la parte final del intestino delgado utilizando una cámara (colonoscopio) la cual se introduce a través del ano. Esta prueba está indicada tras un TSOH positivo o en personas con factores de riesgo como: mayores de 50 años, antecedentes personales y/o familiares de CCR o pólipos (en las cuales se aconseja realizar esta prueba cada dos años) y en pacientes diagnosticados de enfermedad inflamatoria intestinal o poliposis colónica familiar.

La mayoría de los carcinomas aparecen a partir de los adenomas. Aproximadamente el 50% de la población general tiene pólipos adenomatosos a la edad de 70 años. El 90% de los casos de CCR suele ser de tipo esporádico y solo un 10% se corresponde con síndromes familiares. Dentro de las neoplasias hereditarias destacan dos tipos de síndromes diferentes: el asociado a poliposis múltiple familiar (*Familial Adenomatous Polyposis*) y el no asociado a poliposis familiar (*Hereditary Non polyposis Colorectal Cancer*).

En el CCR se observan dos vías moleculares de oncogénesis: la supresora y la mutadora. Por un lado, la vía supresora está caracterizada por el balance cromosómico, en la que se produce activación de los oncogenes, como los genes RAS y la inactivación de los genes supresores de tumores, como el TP53 o el APC. Esta vía es muy común de las formas esporádicas.

Por otro lado, la vía mutadora está caracterizada por la presencia de mutaciones en los genes reparadores de ADN, lo cual se manifiesta por la acumulación de errores de replicación en microsatélites del genoma. Esta forma, está asociada a los tumores hereditarios no polipoides.

El pronóstico de los pacientes con CCR se correlaciona principalmente con el estadio evolutivo del tumor. Además se han descrito otros factores adicionales asociados a un peor pronóstico como: edad (diagnóstico antes de los 40 años o después de los 70 años), presentación como perforación u obstrucción intestinal, tamaño del tumor, grado de diferenciación, invasión vascular, linfática o perineural, elevación de la concentración sérica de antígeno

carcinoembrionario (CEA) basal, aneuploidía, sobreexpresión de p53 y ausencia de inestabilidad de microsátélites.

<b>Estadio</b>	
A	Tumor limitado en su extensión a la mucosa
B1	Tumor que no se extiende más allá de la muscular propia
B2	Tumor que penetra e invade la muscular propia y alcanza la serosa
C1	Tumor limitado a la muscular que tiene también invasión ganglionar
C2	Tumor que atraviesa todas las capas intestinales y con invasión ganglionar
D	Tumor con metástasis a distancia

**Figura 1. Escala de determinación de estadios tumorales de MAC.**

La estadificación describe la extensión o gravedad del cáncer y para ello se utilizan diversas escalas como la que se muestra en la figura 1. Además de esta, existen otras escalas como la TNM (T: extensión del tumor, N: invasión de nódulos linfáticos y M: metástasis), la de Dukes o la de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*).

A pesar de los avances producidos en el tratamiento del CCR, en la actualidad la mortalidad de este cáncer es cercana al 50% y el único tratamiento curativo es la cirugía. Existen tres principales estrategias de tratamiento: el quirúrgico, la radioterapia y la quimioterapia. La elección entre ellos o sus combinaciones se hace teniendo en cuenta los siguientes factores: estado general del paciente, localización del tumor y estadio de la enfermedad.

La cirugía se suele emplear cuando el tumor se encuentra en estadios tempranos como el A. Cuando el tumor se encuentra en estadio B, la cirugía podría ser el único tratamiento aunque suelen tratarse además con quimioterapia adyuvante. Cuando el tumor se encuentra en estadios C y D, el tratamiento con quimioterapia adquiere gran importancia ya que en estadio C la cirugía como único tratamiento no es suficiente y en estadio D la quimioterapia consigue prolongar la supervivencia de forma significativa.

La **cirugía** suele ser el principal tratamiento local para el CCR. La técnica consiste en la extirpación del segmento del colon en el que se asienta el tumor, así como un tramo de tejido normal, a cada lado de la lesión, y los ganglios linfáticos correspondientes. Posteriormente, se unen los extremos del colon para restablecer la continuidad del tubo digestivo y mantener su función.

La **radioterapia** es una forma de tratamiento basada en el empleo de radiaciones ionizantes para impedir el desarrollo y crecimiento del tumor. Esta se puede usar antes de la cirugía, después de esta o para tumores muy avanzados.

Cuando se utiliza antes de la cirugía, su función es reducir el tamaño del tumor para facilitar su resección y reducir las probabilidades de sufrir una recidiva. Cuando se utiliza después de la cirugía su función es eliminar cualquier célula maligna que pudiese quedar y también reducir las probabilidades de sufrir una recidiva. En tumores muy avanzados se suele utilizar para aliviar la sintomatología.

La **quimioterapia** sistémica tiene como objetivo retrasar la aparición de los síntomas en el paciente asintomático, aumentar el periodo de tiempo libre de enfermedad y aumentar la supervivencia global. Además, también se puede utilizar antes de la cirugía para reducir el tamaño y facilitar la resección o preservar el ano cuando el tumor se encuentra localizado en el recto. Los principales fármacos antineoplásicos utilizados son los siguientes: 5-Fluorouracilo, Leucovorina, Irinotecán y Oxaliplatino.

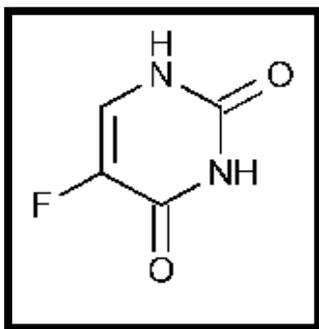


Figura 2. Estructura del 5-Fu.

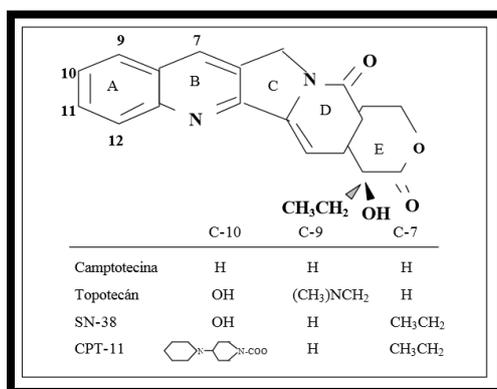
El 5-Fluorouracilo, también conocido como 5-Fu, es una fluoropirimidina que pertenece al grupo de los antimetabolitos (Fig.2).

El 5-Fu entra en la célula por los mecanismos de transporte facilitados para el uracilo y se metaboliza mayoritariamente en su forma activa 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (fdUMP), utilizando para ello las enzimas de la ruta de síntesis de los precursores de ácidos nucleicos. El fdUMP compite con el sustrato natural desoxiuridina monofosfato (dUMP) y forma un complejo ternario covalente estable que mantiene inhibida a la enzima “*timidilato sintasa*”. Esto conlleva la disminución de los niveles de desoxitimidina monofosfato (dTMP) y por consiguiente de desoxitimidina-5'-trifosfato (dTTP) y a la acumulación indirecta de dUMP. Como resultado se produce la incorporación de desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) en el ADN debido a la ausencia del sustrato natural, conduciendo a una inhibición de la síntesis de ADN y la subsiguiente inducción de muerte celular.

En algunas ocasiones el 5-Fu puede metabolizarse a otras dos formas: la 5'-fluorodesoxiuridina trifosfato (5-FdUTP) y la 5'-fluorouridina trifosfato (5-FUTP), que actúan como falsas bases incorporándose en el ADN y ARN de la célula respectivamente, alterando su metabolismo y conduciéndola finalmente a la muerte. Dependiendo de la forma de administración puede actuar con un mecanismo u otro. Si se administra en perfusión continua ejerce su actividad inhibiendo la  *timidilato sintasa*, en cambio si se administra en “*bolus*” resultaría en una toxicidad mediada mayoritariamente por su incorporación en el ARN.

La Leucovorina es una forma reducida del ácido fólico. Pese a no ser un fármaco de quimioterapia propiamente dicho se utiliza en combinación con otros fármacos de quimioterapia para aumentar la eficacia del tratamiento, o bien como "quimio protector". En caso del CCR se utiliza en combinación con el 5-Fu para incrementar el efecto por medio de la inhibición de la  *timidilato sintasa*.

El Irinotecán (CPT-11) es un derivado semisintético de la “camptotecina”, un alcaloide citotóxico aislado del árbol chino  *Camptotheca acuminata* (Fig. 3). Está indicado en CCR recurrente y CCR metastásico ya que ha demostrado actividad antitumoral tanto  *in vitro* como en modelos  *in vivo* de carcinoma colorrectal<sup>15</sup> mediante la unión y posterior inhibición de la ADN  *topoisomerasa* I.



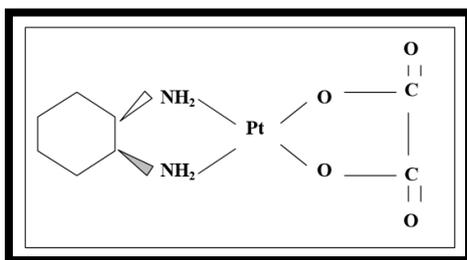
**Figura 3. Estructura del Irinotecan**

La  *topoisomerasa* I cataliza reacciones de vital importancia en los procesos de replicación y transcripción del ADN, esenciales para la división celular<sup>13,14</sup> ya que mantiene la estructura topográfica del ADN durante la traducción, la transcripción y la mitosis y además, alivia la tensión de torsión de la doble hélice de ADN durante la replicación y la transcripción rompiendo de forma transitoria una de las cadenas de la doble hélice (formándose un complejo ADN- *topoisomerasa*) y volviéndola a soldar.

Los derivados de la “camptotecina” se fijan al complejo ADN-*topoisomerasa* e impiden que se produzca esta soldadura. Sin embargo, para que estos compuestos muestren una potente citotoxicidad (los complejos ADN-*topoisomerasa* son bastante lábiles y se deshacen cuando el fármaco es eliminado), se requiere el inicio de la síntesis de ADN. En este momento, cuando la horquilla formada por las dos hebras de ADN se encuentran con los complejos *topoisomerasa*-Irinotecan, se obtiene una doble ruptura de las cadenas, en este caso, irreversible<sup>16</sup>. Por consiguiente el Irinotecán es muy específico en la fase S del ciclo celular y ocasiona una parada del ciclo celular en la fase G2<sup>15</sup>.

El Oxaliplatino (L-OHP) es un potente inhibidor de la síntesis de ADN que utiliza como ligando portador el 1,2-diaminociclohexano, que le confiere una mayor actividad y un espectro de actividad diferente al del Cisplatino o el Carboplatino<sup>18, 19</sup> (Fig. 4).

En monoterapia es un fármaco que ha demostrado una actividad similar al 5-FU y se emplea en el tratamiento del CCR metastásico y como tratamiento adyuvante del CCR estadio III o C de Dukes tras la resección completa del tumor primario. Su mecanismo de acción consiste en que los derivados hidratados resultantes de la biotransformación del Oxaliplatino interaccionan con el ADN formando puentes intra e intercatenarios que entrañan una interrupción de la síntesis de ADN, causante de la actividad citotóxica y antitumoral.



**Figura 4. Estructura del Oxaliplatino.**

Uno de los principales obstáculos en el tratamiento del CCR es el fenotipo de resistencia a los diferentes fármacos antineoplásicos que conduce a la pérdida de eficacia de los mismos. La mayoría de los tumores de colon son intrínsecamente resistentes a la quimioterapia, lo cual limita su tratamiento. Esta resistencia puede ser debida a factores farmacocinéticos (mala absorción, insuficiente distribución...etc.) o a propiedades de la célula tumoral. Esta resistencia puede adquirirse durante el propio tratamiento, cuando las células adquieren nuevas características que las hacen resistentes al mismo.

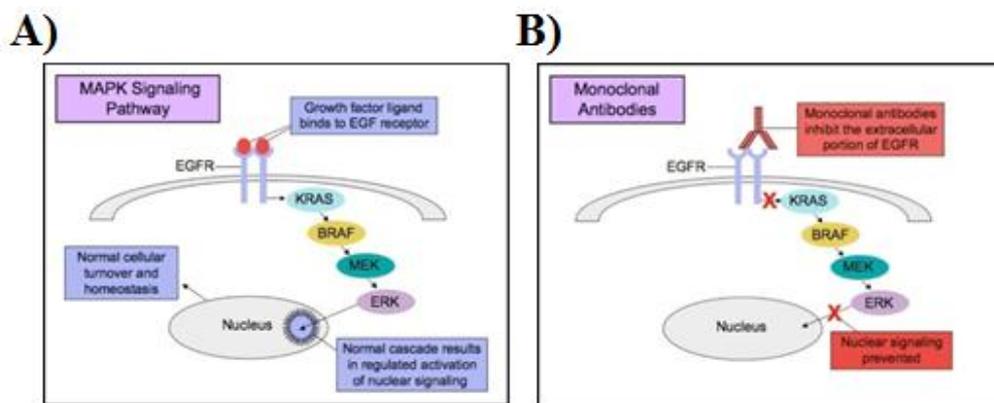
En el tratamiento del CCR, lo más habitual es que se combinen los fármacos anteriormente citados ya que numerosos estudios han demostrado que la combinación mejora la efectividad<sup>20-</sup>

Las combinaciones más típicas son: la denominada Folfox (Oxaliplatino, Leucovorina y 5-Fu) y la denominada Folfiri (Irinotecán, Leucovorina y 5-Fu).

En la actualidad están surgiendo nuevos tratamientos adyuvantes a la quimioterapia que mejoran, según numerosos estudios<sup>11,12</sup>, los resultados frente a los tratamientos que la utilizan de manera exclusiva. Estos son los “anticuerpos monoclonales”.

Las bases del funcionamiento de estos anticuerpos son que las células neoplásicas de muchos tumores actúan como antígenos de dichos anticuerpos, por lo que estos las reconocen como objetivos.

En el CCR los principales anticuerpos monoclonales utilizados son el Cetuximab (Erbitux®), Panitumumab (Vectibix®) y Bevacizumab (Avastin®). Los dos primeros tienen como diana el receptor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), un receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa de la familia de los receptores HER, cuya activación conduce a la síntesis de ADN y a la proliferación celular. El Bevacizumab tiene como diana al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), cuya activación por una de las proteínas segregadas por las células tumorales y otras células en el microentorno del tumor promueve la formación de vasos sanguíneos al tumor.



**Figura 5. A) Ruta de señalización de las MAPK. B) Mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales.**

Como se observa en la figura 5 cuando un ligando se une al EGFR se activa la cascada de señalización de las MAPQuinasas (*mitogen-activated protein*) que desemboca en la síntesis de ADN y la proliferación celular como se ha mencionado anteriormente. Esto ocurre ya que estos receptores tienen acoplada una familia de proteínas denominadas Ras.

La familia Ras son proteínas G (GTPasas) pequeñas de gran importancia en las rutas de señalización que tienen que ver con la proliferación celular y otros procesos. Su nombre deriva de *Rat Sarcoma* donde se descubrieron. Estas proteínas están codificadas por una familia de

genes del mismo nombre: los genes RAS que se consideran oncogenes. Codifican proteínas clave en las señales mitogénicas y en la regulación de la proliferación celular y están mutados en un porcentaje alto de tumores humanos (aproximadamente 25-30% de los cánceres). Esas mutaciones bloquean a Ras en su forma activa, contribuyendo a un flujo continuo de señalización mitogénica.

En su conformación inactiva Ras se encuentra unido a GDP, sin embargo en su forma activa se une a GTP. El paso de conformación inactiva a activa se realiza por la acción de las GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) que inducen cambios conformacionales en Ras favoreciendo la liberación del GDP y la incorporación del GTP, activándolo. Las proteínas GAPs (*GTPase Activating Proteins*), son las encargadas de que Ras GTP vuelva a su forma inactiva como Ras GDP.

La activación de Ras, provoca la activación de BRAF que a su vez activa a MEK 1/2. Son MEK 1/2 los encargados de las fosforilaciones activantes de ERK 1/2. ERK 1/2 son factores de transcripción que se fosforilan en el citoplasma, se translocan al núcleo y se unen al ADN desencadenando la transcripción de decenas de genes importantes para la proliferación celular.

Cuando existen mutaciones en alguno de los genes RAS, la actividad GTPasa queda bloqueada y la proteína Ras queda constitutivamente activada y unida a GTP. Estas mutaciones suelen ocurrir en los codones 12, 13 (exón 2) y con menor frecuencia en los codones 59, 61 (exón 3) y en los 117 y 146 (exón 4).

### **OBJETIVOS**

Los objetivos de este proyecto son valorar la posible eficacia de realizar como *screening* rutinario el análisis de las mutaciones en el gen KRAS, ya que cuando este gen se encuentra mutado disminuye notablemente la eficacia de los tratamientos con anticuerpos monoclonales y puesto que es una prueba sencilla y barata, mejoraría las tasas de supervivencia en los pacientes afectados de CCR ya que permitiría que estos pacientes recibiesen un tratamiento más particular y personalizado adaptado a sus circunstancias.

## METODOLOGÍA

### **1. Sujetos de estudio**

Las muestras tumorales fueron obtenidas de 83 pacientes afectados de CCR que recibieron tratamiento quirúrgico en el Hospital Universitario Cruces entre los años 2004 y 2007. En el total de sujetos había 57 varones y 24 mujeres con una media de edad de 66,26 años, teniendo el más joven 46 años y el más mayor 88 cuando se reseccionó quirúrgicamente el tumor.

Todos los pacientes se encontraban en un estadio de la enfermedad comprendido entre el B y el D de la escala de Dukes y tan solo 21 de ellos presentaban metástasis en otros órganos (aunque 9 de ellos desarrollaron metástasis tiempo después de realizarse la cirugía). De los 83 pacientes, 48 recibieron otro tipo de tratamiento complementario a la cirugía: 3 recibieron radioterapia, 37 quimioterapia adyuvante (con mayor frecuencia 5-Fu combinado con Leucovorina) y 8 quimioterapia y radioterapia.

La supervivencia de los pacientes a los 10 años después de la cirugía fue del 40,5% (N=34).

### **2. Extracción de ADN**

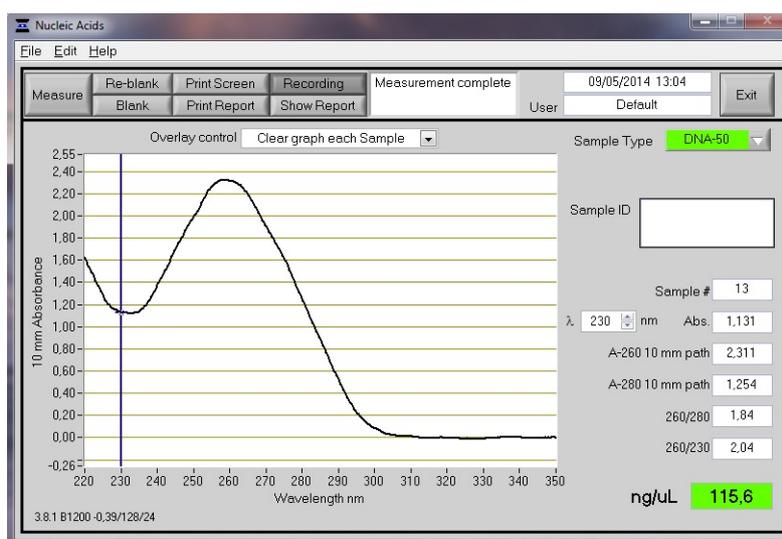
Para comenzar el análisis del gen KRAS era necesario extraer el ADN de las muestras de tejido obtenidas tras la resección quirúrgica. Para realizar dicha extracción se utilizó el “QIAmp DNA mini kit” (Qiagen; Madrid, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante, que se resumen a continuación:

1. Se cortó una muestra de tejido original de 25 mg de cada paciente en partes más pequeñas para facilitar su lisis y se colocaron las muestras en tubos “Eppendorf” de 1,5 ml correctamente etiquetados.
2. Se añadieron 180 µl de “*Buffer ATL*” por cada tubo, una solución de lisis de tejido, y 20 µl de “proteínasa K”, una enzima capaz de digerir las proteínas. Se homogeneizó la mezcla utilizando un agitador.
3. Esta mezcla se incubó en un bloque térmico a 56°C hasta que el tejido estuvo completamente lisado (aproximadamente entre 1 y 3 horas).
4. Tras la incubación se añadieron 200 µl de “*Buffer AL*”, una solución de lisis basada en la guanidina que contiene un detergente capaz de destruir las membranas nucleares y el epitelio celular exponiendo a los ácidos nucleicos. Se incubó a 70°C durante 10 minutos

- en un bloque térmico. Se homogeneizó la muestra durante 15 segundos utilizando un agitador.
5. Se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 95% y se homogeneizó de nuevo durante 15 segundos.
  6. La solución obtenida fue extraída de los tubos y colocada en columnas “QIAquick columns” que se centrifugaron durante 1 minuto a 8.000 rpm y se desechó el líquido recogido.
  7. Se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de “Buffer AW1”, una solución de limpieza basada en el etanol que rompe cualquier unión inespecífica a las membranas de las columnas, y se centrifugó durante otro minuto a 8.000 rpm desechando el líquido recogido.
  8. Se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de “Buffer AW2”, una solución de limpieza que contiene etanol para eliminar cualquier sal presente, y se centrifugó durante 3 minutos a 8.000 rpm desechando el líquido recogido.
  9. Se centrifugó durante un minuto a 13.000 rpm para eliminar los posibles restos de “Buffer AW2”.
  10. Se colocaron las columnas en tubos “Eppendorf” de 1,5 ml y se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de “Buffer AE”, una solución de Tris-EDTA que es capaz de separar el ADN adherido a la membrana y sirve como medio estable de almacenamiento. Se dejó incubando a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó a 8.000 rpm durante un minuto.

Para valorar la efectividad de este proceso se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop ND-100 spectrophotometer) y el programa “Nanodrop 1000 3.8.1”. Como blanco se utilizó “Buffer AE” procedente del kit usado para eluir el ADN.

Cada muestra se midió por duplicado (2  $\mu\text{l}$  de muestra en cada caso), fig. 6.



**Figura 6. Medición del ADN usando el programa Nanodrop 1000 3.8.1.**

Concluida la extracción del ADN las muestras fueron alicuotadas en tubos “Eppendorf” con rosca y conservadas en nevera a 4°C hasta la realización de los procedimientos posteriores.

### 3. Reacción en cadena de la polimerasa 1.

La reacción en cadena de la polimerasa de sus siglas en inglés PCR (*polymerase chain reaction*) es una técnica que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN de interés, partiendo de una pequeña cantidad de muestra.

La reacción es posible gracias a la capacidad que tienen las enzimas ADN polimerasas para replicar las hebras de ADN. Se lleva a cabo en termocicladores y se utilizan diferentes ciclos de temperatura. La desnaturalización de los ácidos nucleicos se puede conseguir a temperaturas elevadas, por lo que las enzimas que se emplean han de ser termoestables, como las que se obtienen de microorganismos adaptados a estas temperaturas. La que se emplea en la reacción de PCR es la “Taq polimerasa”, una ADN polimerasa extraída del microorganismo *Thermus aquaticus*. En este caso se empleó el “KAPPA Taq Hot Start PCR kit” (Kappa Biosystems, Cat. N°KK1510; Madrid, España) para la realización de la PCR.

Con el objetivo de acotar la zona del ADN que se quería amplificar para una posterior secuenciación se utilizaron dos cebadores o *primers* en inglés, que se unen, aproximadamente, en el principio del exón 2 (*Primer* codón 12 *forward* A: 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT-3') y al final de este (*Primer* codón 12-13 *Reverse* B: 5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC-3') del gen KRAS. Esta zona que se amplificó incluía los codones 12 y 13 del gen, que es donde se producen las mutaciones con mayor frecuencia.

Los *primers* fueron diseñados con bases diferentes a las de la secuencia original para permitir la formación de un lugar de restricción para la enzima “*Mva* I” que se utilizó en el procedimiento posterior.

La PCR se realizó utilizando las siguientes condiciones:

1. En primer lugar se realizó la mezcla maestra que contenía “Kappa Buffer” 5x, una solución tampón que mantiene el pH para el correcto funcionamiento de la Taq polimerasa, iones divalentes en forma de “MgCl<sub>2</sub>” 25 mM, que actúan como cofactores de la enzima, desoxinucleótidos trifosfato o dNTPs 25 mM (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Alemania), agua (*RT-PCR Grade Water*, Roche; Madrid, España), los *primers* anteriormente citados (IDT; Leuven, Bélgica) y la enzima ADN polimerasa “Kappa Taq” 20 ng/ml, crucial para la replicación de las hebras de ADN (Fig. 7).

2. Posteriormente se añadieron en cada tubo de PCR 20  $\mu\text{l}$  de la mezcla maestra.
3. Por último se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de ADN extraído en el paso anterior obteniéndose un volumen total de 25  $\mu\text{l}$  en cada tubo.

### PCR 1 KRAS CODÓN 12

ddH <sub>2</sub> O	Buffer	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	FOR.A	REV.B	DNA	Taq	V. Total
	5x	25 mM	25 mM	10 pmol/ml	10 pmol/ml	20 ng/ml	5 U/ml	
8,6 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$

Figura 7. Volúmenes y reactivos añadidos a la PCR 1 por cada muestra.

Por último se programó el termociclador *Gene Amp® PCR system 9700* (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones:

1. Un paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C para la desnaturalización del ADN.
2. Un total de 35 ciclos de 3 pasos cada uno:
  - a. Desnaturalización de 60 segundos a 96°C, en la que la doble hebra de ADN se separa.
  - b. Hibridación de 60 segundos a 55°C para la unión de los cebadores a la secuencia de ADN complementaria.
  - c. Elongación de 30 segundos a 73°C, donde la Taq polimerasa agrega nucleótidos complementarios formando así una copia complementaria de la hebra original de ADN.
3. Un paso de extensión final de 5 minutos a 73°C para asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado (Fig. 8).

<b>PCR-1</b>	<i>Temperatura</i>	<i>Duración</i>	<i>Nº de repeticiones</i>
	95°C	3'	1 paso
	96°C	60"	35 ciclos
	55°C	60"	
	73°C	30"	
	73°C	5'	1 paso

Figura 8. Condiciones en las que se realizó la PCR 1.

El producto PCR fue testado mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### 4. Electroforesis en gel de agarosa.

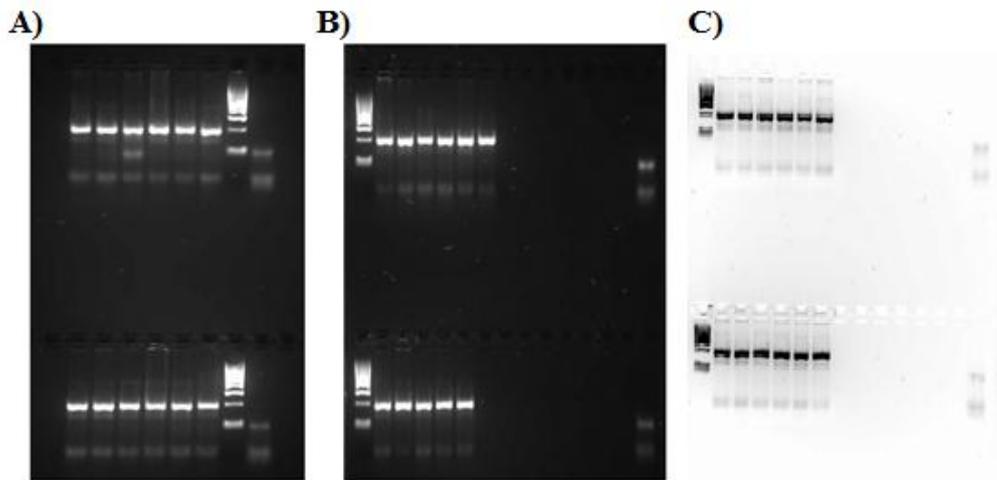
Esta técnica procede de “electro”, electricidad y “foresis” del griego *phoros* trasladar, consiste en la migración de partículas bajo la influencia de un campo eléctrico. Es una técnica que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN.

La concentración de los geles de agarosa se elige en función del tamaño del ADN estudiado y puesto que el fragmento resultante de la PCR 1 contenía menos de 200 pares de bases (pb) la concentración recomendada para los geles era al 3%.

Para la realización de los geles se utilizó agarosa en polvo *Agarose D-1 low EEO* (Lab. Conda, CAT. Nº 8016; Madrid, España) en un tampón Tris-acetato-EDTA (TAE) 1x:

1. Se preparó un molde para verter después la mezcla de agarosa con dos peines de púas pequeñas para formar los pocillos donde más tarde se cargó el producto PCR.
2. Se mezclaron 10 g de agarosa en polvo con 400 ml de TAE 1x.
3. Se hirvió la mezcla hasta que la agarosa se diluyó completamente en el tampón y se formó una solución transparente.
4. Se añadieron 5 µl de “Gel red” (Bioline; Alemania) por cada 50 ml de agarosa líquida, un agente intercalante fluorescente que se utiliza para la localización del ADN, se vertió esta solución en el molde y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que solidificó.
5. Puesto que la movilidad electroforética del ADN depende de la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis (en ausencia de iones la conductancia eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente o ni siquiera se desplaza) se sumergió en cubetas de electroforesis con la solución tampón de electroforesis TAE 1x.
6. En cada pocillo de estos geles se cargaron las muestras con tampón de carga en la siguiente proporción:
  - a. 5 µl del producto final procedente de la PCR 1
  - b. 2 µl del tampón de carga 5x (*DNA loading buffer blue*; Bioline)
7. En uno de los pocillos de cada fila se cargó el marcador de talla (*HyperLadder™ 100 bp*; Bioline) ya que dependiendo de las características del gel y la solución tampón la migración es diferente, y por ello es necesario añadir un marcador de tamaño conocido.
8. Se sometió el gel a una corriente eléctrica de 120 voltios utilizando una fuente de alimentación de electroforesis (BioRad).

Puesto que el ADN posee grupos fosfatos cargados negativamente al ser sometido a la acción de la corriente eléctrica, se provoca su migración desde el cátodo hacia el ánodo. Estos geles se dejaron correr durante 30 minutos y después se observaron con luz ultravioleta y fotografiaron mediante un equipo de captación y análisis de imagen G: BOX (Syngene, Cambridge, UK), fig. 9.



**Figura 9.** Imágenes de los geles de agarosa al 3% donde se testó la PCR 1. En la imagen A se observan las muestras de la 64 a la 75. En la B se observan las muestras de la 76 a la 86. En la imagen C se observan las muestras de la 40 a la 51.

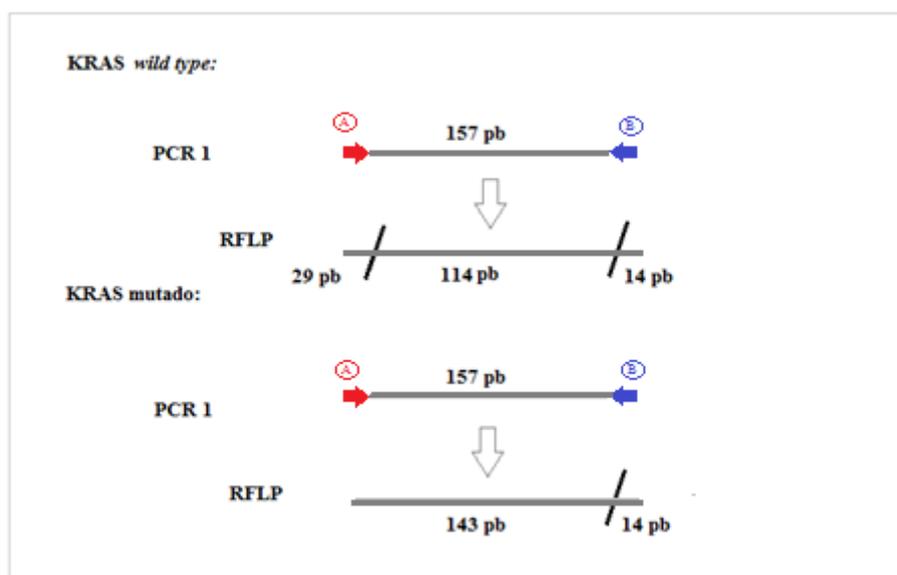
Tras valorar que el proceso de PCR había sucedido correctamente, el producto PCR se almacenó a 4°C hasta el siguiente paso.

### **5. Técnica RFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.**

El proceso de RFLP consiste en cortar el ADN en un punto concreto de su secuencia empleando enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una determinada secuencia de ADN denominada sitio de restricción. La enzima se sitúa en dicho sitio y rompe un enlace fosfodiéster en una de las hebras y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria en un proceso denominado digestión.

En este caso la enzima utilizada para realizar el proceso de RFLP ha sido la enzima de restricción *Mva* I (Roche; Mannheim, Alemania). Esta enzima reconoce las secuencias: CC(A/T) GG y GG(T/A)CC.

El *primer* codón 12 *forward A* está diseñado para ser complementario a una determinada secuencia del gen KRAS, excepto en una base, para crear el sitio de restricción para la enzima de restricción *Mva* I. Mientras que la secuencia original es GGAGC, la del *primer* es GGACC (secuencia reconocida por la enzima de restricción). Lo mismo ocurre con el *primer* codón 12-13 *reverse B*, mientras que la secuencia original es GCACC el *primer* es GGACC (secuencia que también es reconocida por la enzima de restricción). Por tanto en caso de que el gen no estuviese mutado en el proceso de RFLP la enzima se une en estos dos sitios y corta, dando lugar a tres fragmentos: uno de 29 pb, otro de 114 pb y un tercero de 14 pb (Fig. 10).



**Figura 10.** Fragmentos resultantes del proceso de RFLP con la enzima de restricción *Mva* I.

Sin embargo, cuando el gen KRAS está mutado solo existe un único sitio de restricción para esta enzima, el creado por el *primer* codón 12-13 *Reverse B* puesto que el sitio de restricción creado por el *primer* codón 12 *forward A* no existe ya que la presencia de una mutación altera la secuencia y la enzima de restricción no se une. Por consiguiente, tras la RFLP los fragmentos se romperán en 2 únicos fragmentos: uno de 143 pb y otro de 14 pb (Fig. 10).

El proceso de RFLP se realizó en tres pasos:

1. Se realizó la mezcla maestra con: 2 µl de la enzima de restricción *Mva* I, 2,5 µl del “*Sure/Cut Buffer H*” para enzimas de restricción (Roche; Mannheim, Alemania) y 19,5 µl de agua (RT-PCR *Grade Water*, Roche; Madrid, España) por cada muestra.
2. Se añadieron 24 µl de la mezcla maestra en cada tubo.
3. Se añadió 1 µl del producto del PCR obtenido en la PCR 1 en cada tubo.

El producto resultante se tuvo 8 horas incubando en un baño de agua termostatzado (OVAN; Badalona, España) a 37°C.

## 6. Reacción en cadena de la polimerasa 2 (PCR 2).

Con el objetivo de enriquecer la muestra en fragmentos mutados, se realizó una segunda PCR. Para ello, se utilizó nuevamente el “Kappa Taq *Hot Start PCR kit*” usado para realizar la PCR 1.

En este caso se utilizó además del *Primer* codón 12 *forward A* usado en la PCR anterior, un *primer* diferente, el *primer* codón 12-13 *reverse C*: (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC TAA TAT GTC GAC TAA AAC AAG ATT TAC CTC-3'). Este *primer* se une a la secuencia de ADN justo anterior a la del *primer* codón 12-13 *reverse B*, es decir justo antes del corte producido por la enzima de restricción.

Los pasos seguidos para la realización de esta PCR fueron los siguientes:

1. Se realizó la mezcla maestra con “Kappa *Buffer*” 5x, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, “Kappa Taq” 5U/μl, agua “RT-PCR *Grade Water*” (Roche; Madrid, España), “dNTPs” 25 mM del *Deoxynucleotide Triphosphate SET* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y los *primers* mencionados anteriormente.
2. Se añadieron 24 μl de la mezcla maestra en cada tubo de PCR.
3. Se añadió 1 μl de ADN procedente del producto de la RFLP.

Finalmente se obtuvo un volumen total de 25 μl en cada tubo de PCR (fig. 11).

### PCR 2 KRAS CODÓN 12

ddH <sub>2</sub> O	Buffer	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	FOR.A	REV.B	DNA	Taq	V. Total
	5x	25 mM	25 mM	10 pmol/ml	10 pmol/ml	20 ng/ml	5 U/ml	
12,6 μl	5 μl	2 μl	0,2 μl	2 μl	2 μl	1 μl	0,2 μl	25 μl

Figura 11. Volúmenes y reactivos añadidos a la PCR 2.

Para finalizar la PCR se programó el termociclador *Gene Amp® PCR system 9700* (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones (Fig. 12):

1. Un paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C.
2. Un total de 25 ciclos con 3 pasos cada uno:
  - a. Desnaturalización de 30 segundos a 96°C.
  - b. Hibridación de 30 segundos a 55°C.
  - c. Elongación de 30 segundos a 73°C.

- Un paso de extensión final de 5 minutos a 73°C.

El producto PCR fue testado mediante electroforesis en gel de agarosa.

	<i>Temperatura</i>	<i>Duración</i>	<i>Nº de repeticiones</i>
<b>PCR-2</b>	95°C	3'	1 paso
	96°C	30''	25 ciclos
	55°C	30''	
	73°C	30''	
	73°C	5'	1 paso

Figura 12. Condiciones en las que se realizó la PCR-2

### 7. Electroforesis en gel de agarosa.

Al igual que en la primera PCR esta también se analizó mediante electroforesis en gel. Sin embargo, a diferencia de la anterior, los gels se realizaron con peines de púas más grandes quedando de esta manera unos pocillos de mayor capacidad.

En cada pocillo de estos gels se cargó el volumen total del producto final procedente de la PCR 2 con 2 µl del tampón de carga 5x (*DNA loading buffer blue*; Biorline) bien mezclados antes de cargarlos. Al igual que en la anterior electroforesis en gel, en uno de los pocillos de cada fila se cargaron 5 µl del marcador de talla (*HyperLadder™ 100bp*; Biorline).

Estos gels se sumergieron en cubetas de electroforesis con solución TAE 1x y se dejaron correr durante 30 minutos sometidos a una corriente eléctrica de 120 voltios utilizando una fuente de alimentación de electroforesis (Biorad). Después fueron observados con luz ultravioleta y fotografiados mediante un quipo de captación y análisis de imagen G: BOX (Syngene, Cambridge, UK), fig. 13.

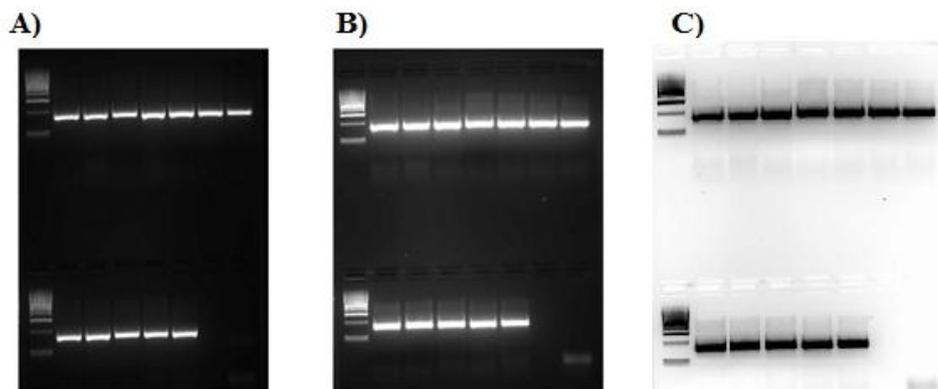


Figura 13. Imágenes de los gels de agarosa al 3% donde se analizó la PCR 2. En la imagen A se observan las muestras de la 40 a la 61. En la B se observan las muestras de la 52 a la 63. En la imagen C se observan las muestras de la 64 a la 75.

Tras valorar que el proceso de PCR había sucedido correctamente, las bandas de los geles correspondientes a cada una de las muestras fueron cortadas utilizando un bisturí y alicuotadas en tubos “Eppendorf” de 1,5 ml a -20°C de temperatura hasta el siguiente paso.

## 8. Purificación de las muestras

Para proceder a la secuenciación del ADN este debía ser extraído de los geles de agarosa ya que el volumen total obtenido de la PCR 2 se cargó en ellos. Esto se llevó a cabo mediante un proceso denominado purificación. Para realizar dicho proceso se utilizó el “QIAquick *Gel extraction Kit*” (Qiagen; Madrid, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante, que se resumen a continuación:

1. Se añadieron 450 µl de la solución de unión “*Buffer QG*” que facilita la unión del ADN a la membrana de la columna y se incubaron a 50°C durante 10 minutos en un bloque térmico. Se homogeneizaron unos segundos con un agitador tras comprobar que el gel se había disuelto completamente.
2. Se añadieron 150 µl de alcohol isopropílico al 100% para ayudar a precipitar el ADN y se homogeneizaron durante varios segundos.
3. Se colocó la mezcla obtenida en columnas “QIAquick *columns*” y se centrifugaron durante un minuto a 13.000 rpm en una centrifuga (“*Centrifuge 5415 R*”) de la marca “Eppendorf”. Tras la centrifugación se desechó el líquido recogido.
4. Se añadieron 500 µl de “*Buffer QG*” y se centrifugó durante un minuto desechándose el líquido recogido.
5. Se añadieron 750 µl de la solución de limpieza “*Buffer PE*” y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugó a 13.000 rpm durante un minuto desechándose el líquido recogido.
6. Se volvió a centrifugar durante un minuto a 13.000 rpm. para retirar el *buffer* residual.
7. Las columnas se colocaron dentro de tubos “Eppendorf” de 1,5 ml y se añadieron 30 µl de la solución de elución “*Buffer EB*” al centro de la membrana de la columna. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 4 minutos y se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm.

Al terminar la centrifugación se comprobó que en todos los tubos “Eppendorf” hubiese la misma cantidad de solución y se descartaron las columnas. La solución resultante se almacenó en tubos “Eppendorf” con rosca en la nevera a 4°C hasta la realización del siguiente paso.

### 9. Visualización de las muestras purificadas.

Para comprobar que el ADN se había purificado correctamente se realizó nuevamente una electroforesis en gel de agarosa al 3%, esta vez en geles con pocillos pequeños.

En cada pocillo del gel se cargaron: 5 µl de la solución final procedente de la purificación junto con 2 µl del tampón de carga 5x (*DNA loading buffer blue*; Bioline) bien mezclados. Además, como en los anteriores geles, uno de los pocillos de cada fila se cargó con el marcador de talla (*HyperLadder<sup>TM</sup> 100 bp*; Bioline).

Estos geles se sumergieron en cubetas de electroforesis con solución TAE 1x y se dejaron correr durante 30 minutos sometidos a una corriente eléctrica de 120 voltios utilizando una fuente de alimentación de electroforesis (Biorad). Después fueron observados con luz ultravioleta y fotografiados mediante un quipo de captación y análisis de imagen G: BOX (Syngene, Cambridge, UK), fig. 14.

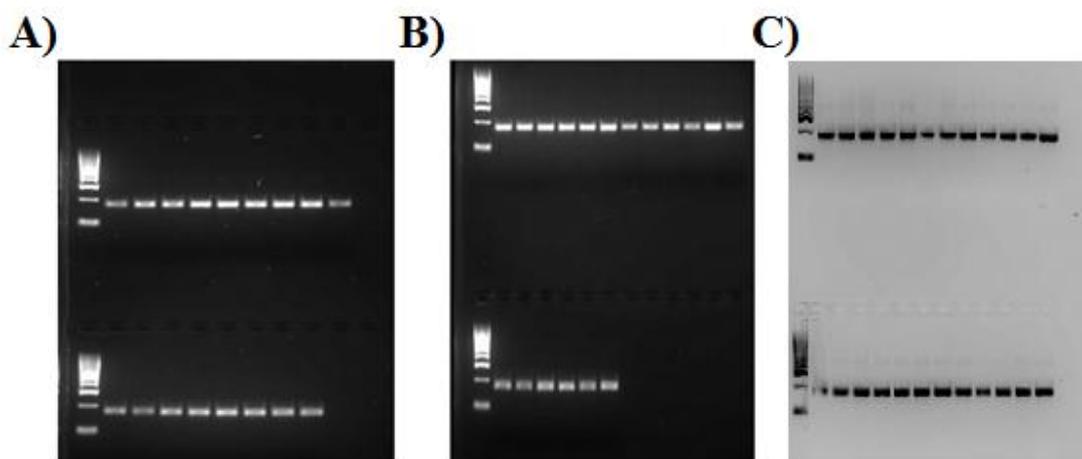


Figura 14. Geles de agarosa donde se comprobó el éxito de la purificación. En la imagen A se observan las muestras de la 52 a la 68. En la B se observan las muestras de la 69 a la 83. En la imagen C se observan las muestras de la 28 a la 51.

### 10. Secuenciación automática.

Para la identificación de las mutaciones se empleó el procedimiento de secuenciación automática. Este se basa en el método enzimático de terminación de cadena de Sanger o método del didesoxinucleótido. Se denomina así porque se utilizan didesoxinucleótidos

(desoxinucleótidos que carecen de un grupo hidroxilo en el carbono 3'). Debido a que la polimerasa necesita un grupo hidroxilo en esa posición para formar un enlace fosfodiéster y poder agregar el siguiente desoxinucleótido, la ausencia de este grupo conlleva el fin de la síntesis de la hebra.

En la reacción de secuenciación están presentes tanto los desoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) como los didesoxinucleótidos (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP), pero estos últimos en menor proporción puesto que, como se ha mencionado, son los encargados de detener la reacción de polimerización de nuevos nucleótidos. Por lo tanto tras la reacción de secuenciación se generan una serie de cadenas sencillas de ADN cuyos tamaños difieren en una única base.

Finalmente se separan las hebras de ADN, basándose en el tamaño/carga mediante electroforesis capilar y se detectan las diferentes longitudes de onda emitidas por los fluorocromos (una característica de la secuenciación automática es que se ha sustituido el marcaje con radiactividad de los didesoxinucleótidos por fluorocromos, uno diferente para cada uno de los didesoxinucleótidos).

Otra característica relevante de los secuenciadores automáticos es que se ha sustituido el sistema basado en geles de acrilamida por el uso de polímero que se inyecta de forma automática en los capilares del secuenciador antes de cargar la muestra de secuenciación.

Esta técnica se realizó en cuatro pasos: Reacción de secuenciación, purificación de la secuenciación, electroforesis capilar en el secuenciador y el análisis de los resultados obtenidos.

## **1º. Reacción de secuenciación**

Para realizar la reacción de secuenciación se utilizó el sistema *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Cat. N°4337456; California, EEUU).

Esta reacción se realizó en tres pasos:

1. Se realizó la mezcla maestra de reacción de secuenciación que contenía: 2 µl de solución de reacción (solución que contenía los desoxinucleótidos, los didesoxinucleótidos marcados y la enzima polimerasa), 2 µl de tampón de reacción "*Big Dye Terminator v3.1 Sequencing Buffer*" 5x y 0,7 µl de Dimetil-sulfóxido o DMSO (Sigma-Aldrich, Cat. n°D-9170; Steinheim, Alemania) por cada reacción de secuenciación.

2. Se añadieron 4  $\mu\text{l}$  del producto PCR purificado a la mezcla maestra de reacción de secuenciación.
3. Se añadieron 1,3  $\mu\text{l}$  del *primer* correspondiente y se homogeneizó la mezcla con ayuda de un agitador-vibrador.

Los productos amplificados fueron secuenciados por ambos lados (*forward* y *reverse*) en tubos independientes.

Por último se programó el termociclador *96-Well Gene Amp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, Cat. N° N-8050200R; California, EEUU) con el siguiente ciclo de amplificación:

1. Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.
2. Un total de 25 repeticiones de tres pasos:
  - Desnaturalización a 96°C durante 10 segundos.
  - Hibridación a 50°C durante 5 segundos.
  - Elongación a 60°C durante 4 minutos.

El producto de secuenciación se almacenó a 4°C hasta su purificación.

## **2°. Purificación de la reacción de secuenciación**

Para eliminar los didesoxinucleótidos no incorporados y evitar que su fluorescencia interfiriese en la posterior lectura de la secuencia, el producto resultante de la secuenciación se purificó mediante el protocolo Etanol/ EDTA/ NaAc.

Para comenzar la purificación se prepararon los reactivos necesarios para llevar a cabo la purificación. Esto es:

- Solución de etanol al 70%: se añadieron 30 ml de agua bidestilada ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) a 70 ml de etanol absoluto (Merck, Cat. N°. 100983; Darmstadt, Alemania).
- Solución de EDTA 125 mM: se diluyeron 5 ml de EDTA 0,5 M y pH 8 (Sigma-aldrich, Cat. N°03690; Steinheim, Alemania) en 15 ml de  $\text{ddH}_2\text{O}$ .
- Acetato sódico (NaAc) 3M: se disolvieron 123 g de NaAc (Sigma-aldrich, Cat. N° S-8750; Steinheim, Alemania) en un volumen final de 500 ml de  $\text{ddH}_2\text{O}$ .

Tras la preparación de las disoluciones se procedió a la purificación:

1. Se preparó la mezcla maestra de purificación que contenía 1  $\mu\text{l}$  de EDTA 125 mM y 1  $\mu\text{l}$  de NaAc 3M por muestra.

2. Se colocaron todas las muestras en una placa de 96 pocillos *Micro amp<sup>TM</sup> reaction plate* (Applied Biosystems, Cat. N° 8010560; California, EE.UU).
3. Se añadieron 2 µl de la mezcla maestra de purificación.
4. Se añadieron 25 µl de etanol absoluto a cada pocillo.
5. Se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga *Beckham Spinchron R* (Beckham Coulter, Cat. N° 358723; California, EE.UU)
6. Se invirtió la placa sobre papel absorbente *Scottfold* (Kimberly-Clark, Cat. N°MRT-116; Barcelona, España) y se centrifugó durante varios segundos a 1.900 rpm.
7. Se añadieron a la muestra 35 µl de etanol al 70% y se centrifugó durante 15 minutos a 4°C.
8. Nuevamente se invirtió la placa sobre papel absorbente y se centrifugó 1 minuto a 1.900 rpm.
9. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos en oscuridad para eliminar cualquier residuo de etanol.
10. Se añadieron 20 µl de ddH<sub>2</sub>O y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
11. Se añadieron 15 µl de formamida (Applied Biosystems, Cat. N°0812773; Warrington, UK), amida derivada del ácido fórmico que se emplea como agente desnaturalizante, y se llevaron al secuenciador.

### **3°. Electroforesis capilar en el secuenciador**

Se realizó una electroforesis capilar de los productos obtenidos en el secuenciador *ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems; California, EE.UU).

El principio de esta máquina consiste en lo siguiente: uno de los extremos del capilar posee un electrodo positivo y el otro uno negativo y ambos son introducidos en cubetas con soluciones tampón de electroforesis encargadas de generar una corriente eléctrica produciéndose de esta manera una fuerte diferencia de potencial. Gracias a esta diferencia de potencial al depositar el producto de reacción de secuenciación en la cubeta con el electrodo negativo migra hasta el electrodo positivo a través del capilar separándose en función del tamaño. A lo largo del capilar se encuentra un emisor láser y un detector de fluorescencia cuya función es detectar el paso de las bases fluorescentes y enviar dicha información al ordenador en forma de cromatogramas.

#### 4º. Análisis de los resultados

Los cromatogramas fueron analizados mediante el programa *Sequencing analysis v5.2* (Applied Biosystems) como se puede observar en las figuras 15 y 16 mostradas a continuación:

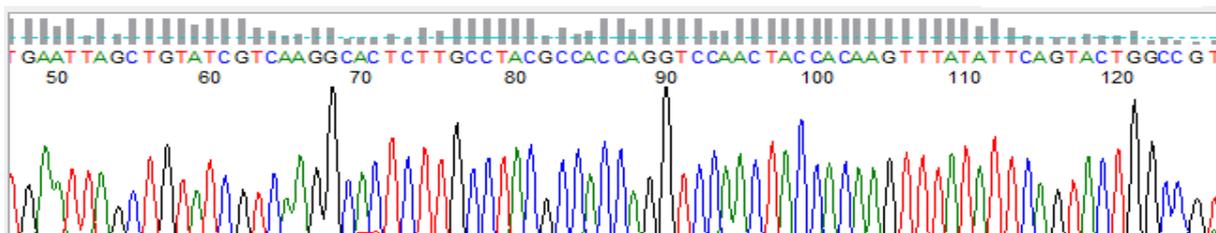


Figura 15. Cromatograma del paciente n° 73 con el gen K-RAS *wild type* (cromatograma en sentido *reverse*).

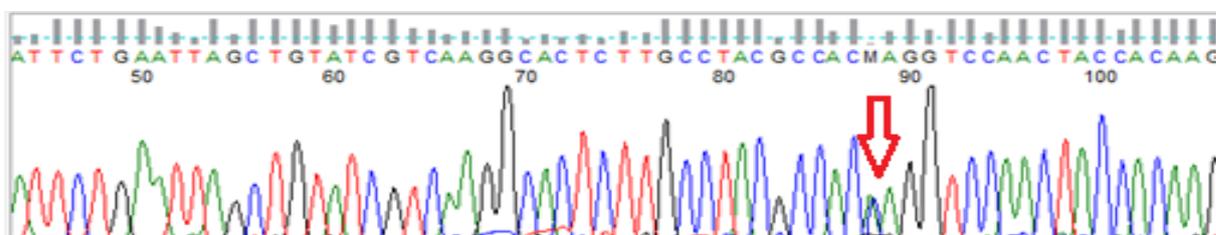


Figura 16. Cromatograma del paciente n° 50 con el gen K-RAS mutado GGT>GTT (cromatograma en sentido *reverse*).

### RESULTADOS

Del total de 83 pacientes estudiados se encontró que el 59% (n=49) de ellos no poseía ningún tipo de mutación en el gen KRAS, mientras que el 41% (n=34) de ellos sí, fig.17.

### RESULTADOS

	SECUENCIA	N			%		
Wild type	GGT-GGC	49			59%		
Mutados		34			41%		
<b>Codón 13</b>	GGT-GAC		7			8,5%	
<b>Codón 12</b>			27			32,5%	
<b>Tipo 1</b>	TGT-GGC			6			7,2%
<b>Tipo 2</b>	AGT-GGC			1			1,2%
<b>Tipo 3</b>	GAT-GGC			11			13,2%
<b>Tipo 4</b>	GCT-GGC			1			1,2%
<b>Tipo 5</b>	GTT-GGC			7			8,4%
<b>Tipo 6</b>	Múltiple			1			1,2%
<b>TOTAL</b>		<b>83</b>	<b>34</b>	<b>27</b>	<b>100%</b>	<b>41%</b>	<b>32,5%</b>

Figura 17. Tabla en la que se representan 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, figs. 18-20.

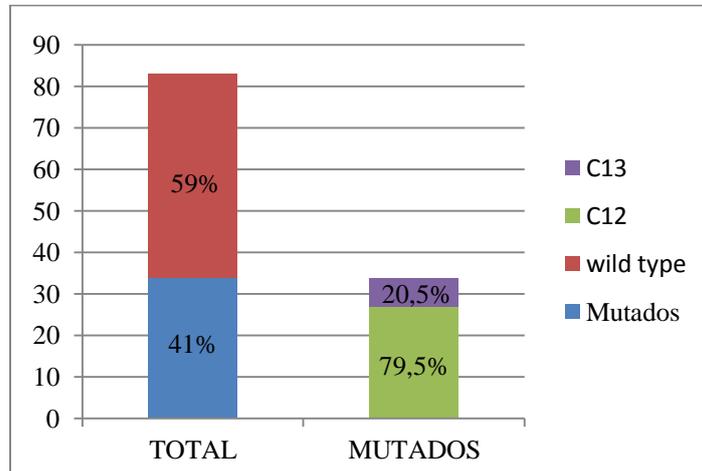


Figura 18. Gráfico representativo del porcentaje de pacientes con mutaciones en el gen KRAS y del porcentaje de mutados en el codón 12 (verde) y codón 13 (morado).

### MUTACIONES CODÓN 13

Las mutaciones en el codón 13 se correspondieron con el 20,5% de las mutaciones halladas y el 8,5% de los pacientes totales, con un total de 7 pacientes afectados. Estos pacientes presentaron un único tipo de mutación: un cambio en la segunda base del codón (G) por la base mutada (A). Así el triplete GGC se convirtió en GAC y el aminoácido glicina en ácido aspártico.

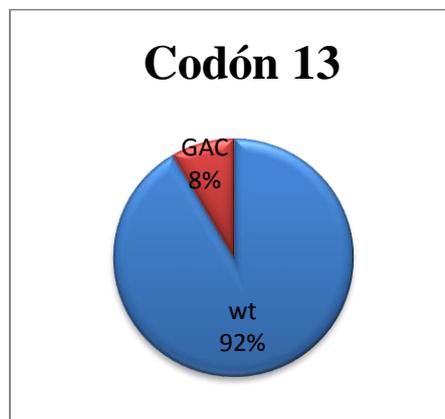
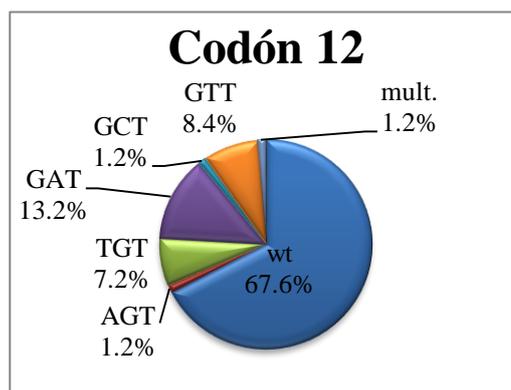


Figura 19. Gráfico representativo de los tipos de mutaciones en el codón 13.

## MUTACIONES CODÓN 12

Las variaciones en el codón 12 se correspondieron con el restante 79,5% de las mutaciones halladas y con un 32,5% de los pacientes con un total de 27 personas afectadas. A diferencia de las mutaciones en el codón 13, estas eran muy variadas y se encontraron hasta 6 tipos de mutaciones diferentes. Estas mutaciones se clasificaron en tres grupos:



**Figura 20. Distribución en tanto por ciento de las diferentes secuencias del codón 12 y 13 encontradas.**

Por un lado el grupo que mostró la primera base mutada, compuesto por el 20,5% de las mutaciones halladas, el 8,4% de los pacientes totales y un total de 7 personas afectadas. Por otro lado el grupo que mostró la segunda base mutada, que se correspondería con el 55,8% de las mutaciones halladas y el 22,8% del total de los pacientes con un total de 19 personas afectadas. Por último un tercer grupo en el que aparecieron tanto la primera como la segunda base mutadas que se correspondería con el 2,9% de las mutaciones halladas y el 1,2% del total de los pacientes con un único paciente afectado.

En ninguno de los pacientes se encontraron mutaciones en la tercera base del codón 12.

### **1. MUTACIONES EN LA PRIMERA BASE**

En el primer grupo se encontraron dos tipos de mutaciones:

Uno en el que se produjo el cambio en la primera base del codón (G) por la base mutada (T), convirtiéndose el triplete GGT en TGT y el aminoácido glicina en cisteína, lo que se correspondió con un 17,6% de las mutaciones halladas y un 7,2% de los pacientes estudiados (n=6).

Otro en el que se produjo un cambio en la primera base del codón (G) por la base mutada (A), convirtiéndose el triplete GGT en AGT y el aminoácido glicina en serina, lo que se correspondió con un 2,9% de las mutaciones halladas y un 1,2% del total de pacientes estudiados (n=1).

## 2. MUTACIONES EN LA SEGUNDA BASE

En el segundo grupo se encontraron tres tipos de mutaciones:

Un primer tipo en el que se produjo el cambio de secuencia de GGT a GAT, que supuso el cambio de aminoácido glicina a ácido aspártico, lo cual se correspondió con un 17,6% de las mutaciones halladas y un 7,2% de los pacientes estudiados con un total de 11 casos encontrados.

En el segundo tipo se produjo el cambio de secuencia de GGT a GTT. Así el aminoácido glicina se convirtió en valina lo que se correspondió con un 20,6% de las mutaciones halladas y un 8,3% de los pacientes estudiados con un total de 7 casos encontrados.

En el tercer tipo se produjo el cambio de secuencia de GGT a GCT. Así el aminoácido glicina se convirtió en alanina lo que se correspondió con un 2,9% de las mutaciones halladas y un 1,2% de los pacientes estudiados con un único caso encontrado.

## 3. MUTACIONES EN LA PRIMERA Y SEGUNDA BASE

En uno de los casos se encontraron mutaciones tanto en la primera como en la segunda base.

## MUTACIONES Y SEXO

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

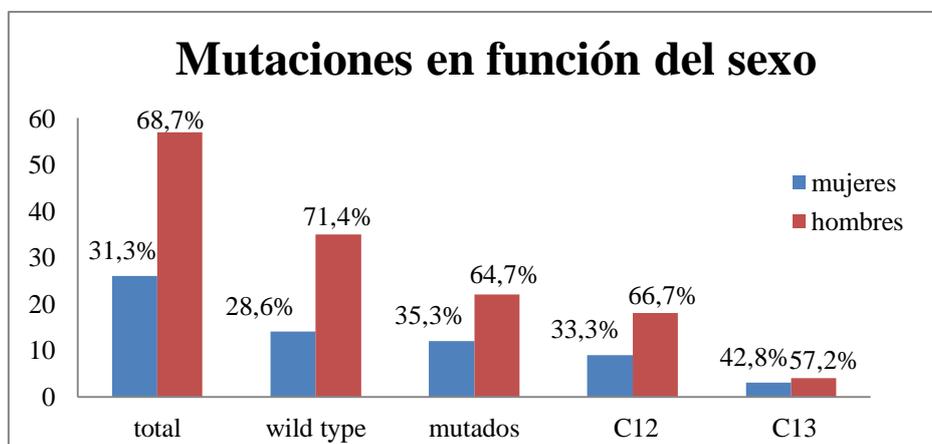


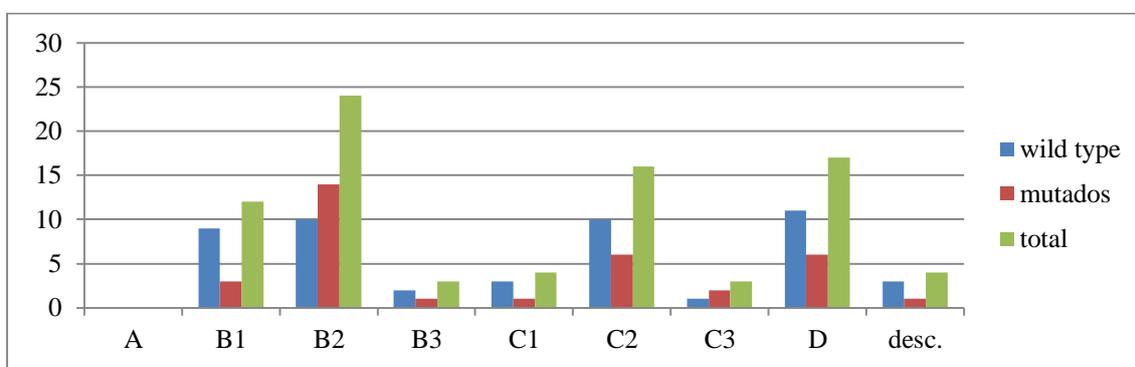
Figura 21. Gráfico que muestra la relación existente entre las mutaciones tanto del codón 12 como del 13 con el sexo.

De los 57 varones presentes en el estudio el 61,4% (n=35) ninguno presentó mutación, sin embargo el 38,6% (n=22) restantes sí. Entre estos, el 81,8% (n=18) presentaron mutaciones en el codón 12 y el 18,2% (n= 4) en el codón 13.

Las 26 mujeres presentes en el estudio el 53,8% (n=14) no presentaron ningún tipo de mutación, sin embargo el 46,2% (n=12) restante sí. Por un lado, el 75% (n=9) en el codón 12 y el 25% (n=3) en el codón 13.

## MUTACIONES Y ESTADIO

La distribución de los pacientes con mutaciones y los pacientes *wild type* en función del estadio de la enfermedad resultó la siguiente:



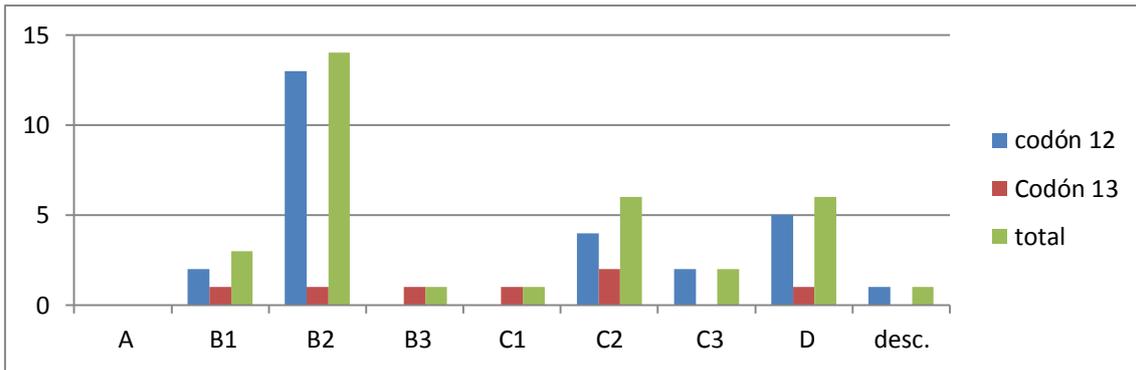
**Figura 22.** Gráfico que muestra la relación entre los estadios de la enfermedad y el gen KRAS mutado o *wild type*.

Del total de 49 pacientes *wild type* estudiados un 18,4% (n=9) estaba en estadio B1, un 20,4% (n=10) estaba en estadio B2, un 4,1% (n=2) estaba en estadio B3, un 6,2% (n=3) estaba en estadio C1, un 20,4% (n=10) estaba en estadio C2, un 2% (n=1) estaba en estadio C3 y un 22,4% (n=11) en estadio D.

Del total de 34 pacientes con mutaciones en el gen KRAS estudiados un 8,8% (n=3) estaba en B1, un 41,2% (n=14) estaba en estadio B2, un 3% (n=1) estaba en estadio B3, un 3% (n=1) estaba en estadio C1, un 17,6% (n=6) estaba en estadio C2, un 6% (n=2) estaba en estadio C3 y un 17,6% (n=6) en estadio D.

No se disponen de datos de estadio de 4 pacientes (3 *wild type* y 1 mutado).

La distribución de las mutaciones del codón 12 y del codón 13 en función del estadio de la enfermedad resultó la siguiente:



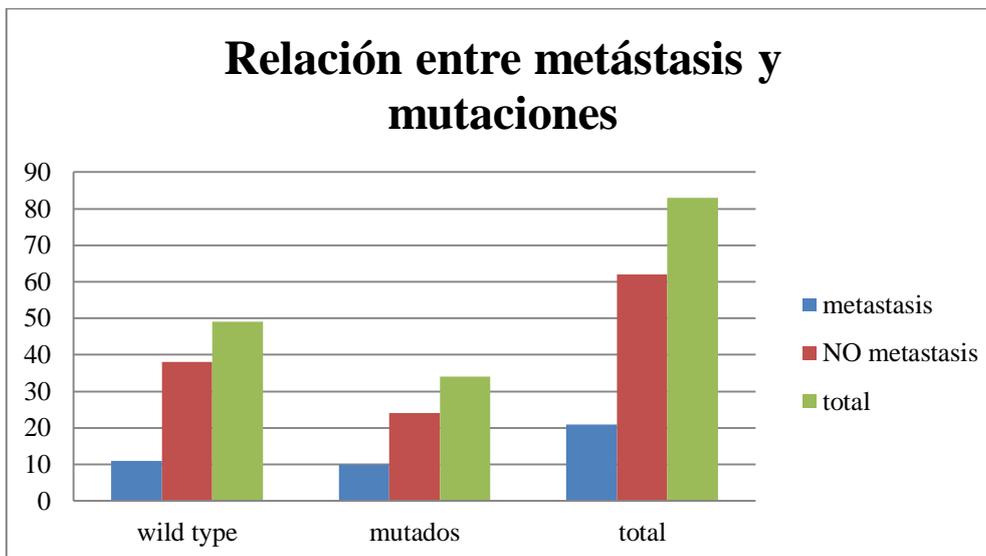
**Figura 23. Gráfico que muestra la relación entre los estadios de la enfermedad y las mutaciones en los codones 12 y 13.**

Del total de 27 pacientes con mutaciones en el codón 12 estudiados un 7,4% (n=2) estaba en B1, un 48,1% (n=13) estaba en estadio B2, un 14,8% (n=4) estaba en estadio C2, un 7,4% (n=2) estaba en estadio C3 y un 18,5% (n=5) estaba en estadio D.

Del total de 7 pacientes con mutaciones en el codón 13 estudiados un 14,3% (n=1) estaba en B1, un 14,3% (n=1) estaba en estadio B2, un 14,3% (n=1) estaba en estadio B3, un 14,3% (n=1) estaba en estadio C1, un 28,6% (n=2) estaba en estadio C2 y un 14,3% (n=1) estaba en estadio D.

### MUTACIONES Y METÁSTASIS

La distribución de las mutaciones en función de la presencia o no de metástasis resultó la siguiente:



**Figura 24. Distribución en tanto por ciento de las diferentes secuencias de los codones 12 y 13 encontradas en el momento de la cirugía.**

Del total de 49 pacientes *wild type* un 22,5% (n=11) de ellos presentaban metástasis. Por el contrario un 77,5% (n=38) no presentaba metástasis en ningún otro órgano.

Del total de 34 pacientes con mutaciones tanto en el codón 12 como en el 13, un 29,4% (n=10) presentaban metástasis. Por el contrario un 70,6% (n=24) no presentaba metástasis en ningún otro órgano.

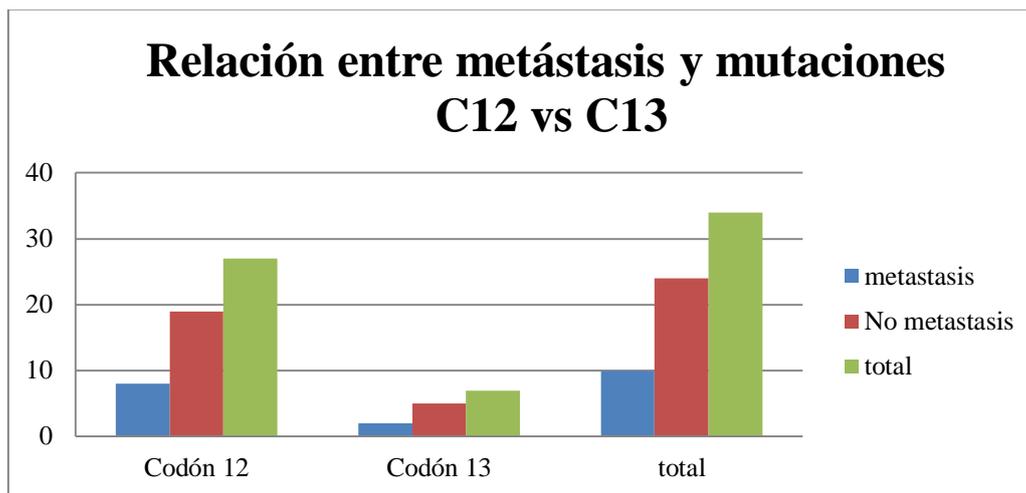


Figura 25. Gráfico que representa del tanto por ciento de pacientes con mutaciones en los codones 12 y 13 con metástasis y libres de metástasis en el momento de la cirugía.

Del total de 27 pacientes con mutaciones en el codón 12 un 29,6% (n=8) de ellos presentaban metástasis en otros órganos. Por el contrario un 70,4% (n=19) no.

Del total de 7 pacientes con mutaciones en el codón 13 un 28,6% (n=2) de ellos presentaban metástasis en otros órganos. Por el contrario un 71,4% (n=5) no.

### MUTACIONES Y SUPERVIVENCIA

La supervivencia de pacientes *wild type* a los 10 años resultó del 41,5 %. En cambio la supervivencia de los pacientes mutados resultó del 37% (fig.25).

La supervivencia de pacientes con mutaciones en el codón 12 a los 10 años resultó del 35%. En cambio la supervivencia de los pacientes mutados en el codón 13 resultó del 39% (fig.26).

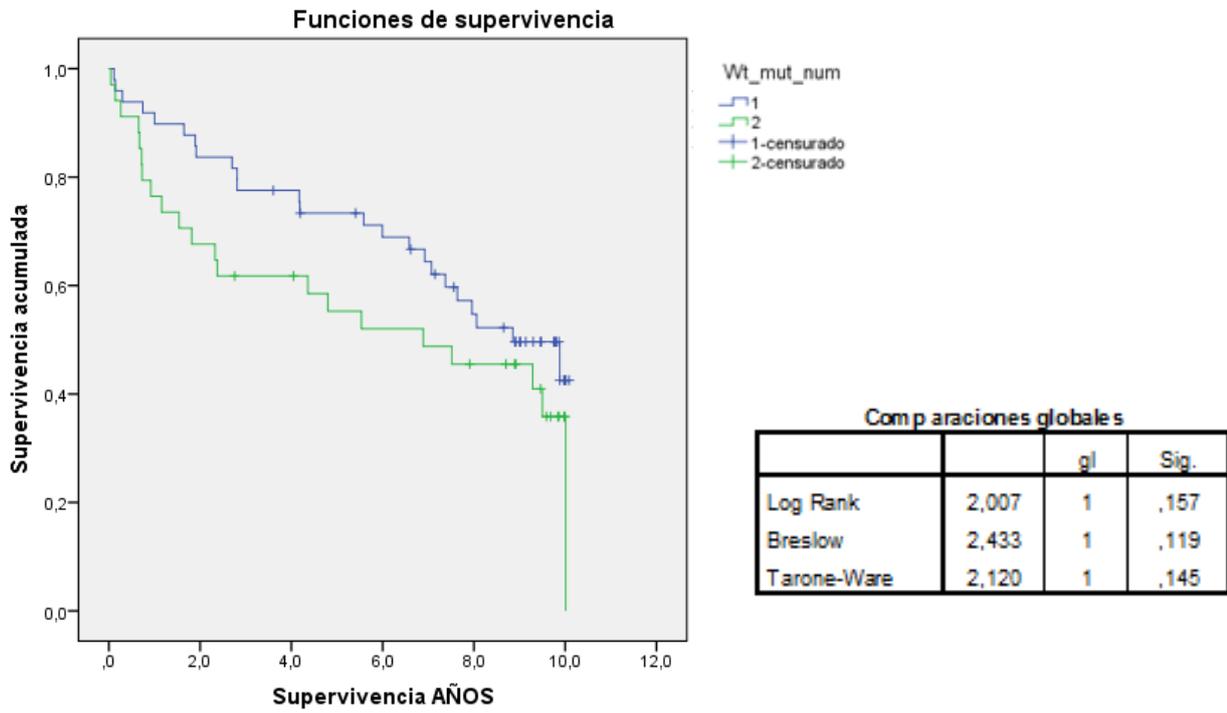


Figura 25. Gráfica de supervivencia de pacientes *wild type* (azul) y mutados (verde).

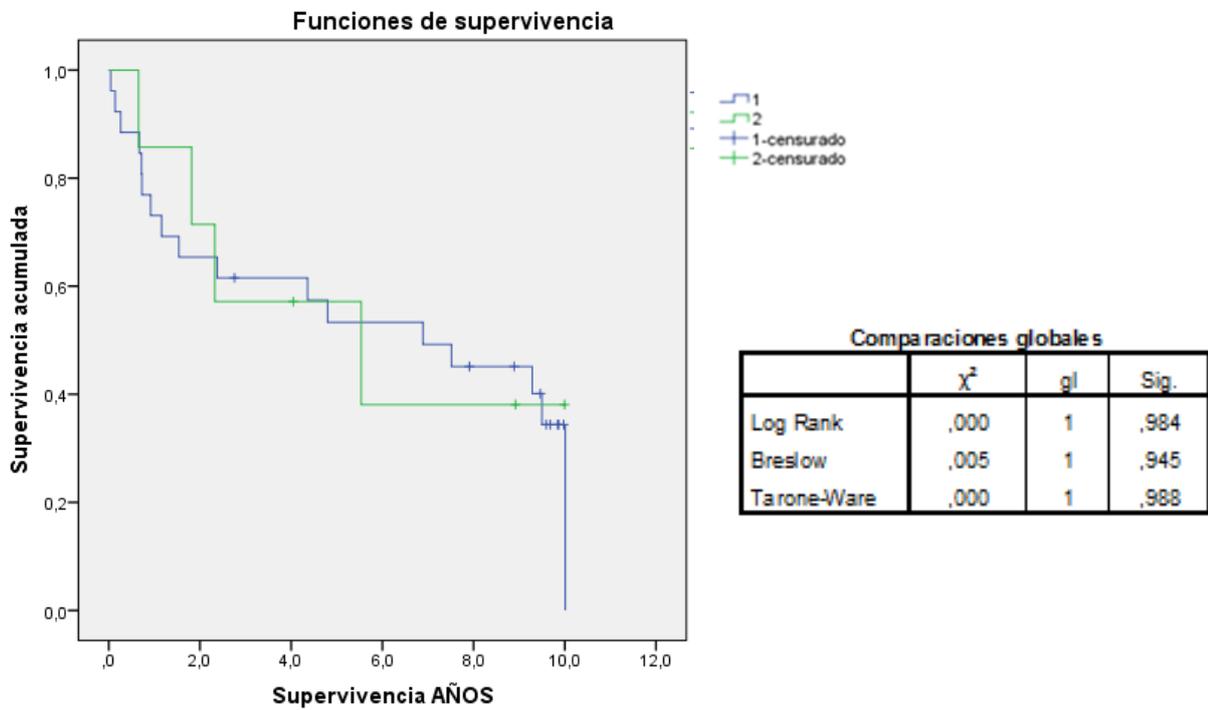


Figura 26. Gráfica de supervivencia de pacientes mutados en el codón 12 (azul) y en el 13 (verde).

## DISCUSIÓN

Es conocido que el EGFR realiza un rol importantísimo tanto en el inicio como en el desarrollo y progresión del CCR. Por ello este receptor tirosina quinasa se ha convertido en una diana clave de los nuevos tratamientos contra el CCR metastásico y otros tipos de cáncer como son los anticuerpos monoclonales.

El EGFR se encuentra en la superficie celular y se activa mediante la unión de sus ligandos específicos: el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ). Tras la activación sufre un cambio conformacional pasando de una forma monomérica inactiva a una forma homodimérica activa. La dimerización del EGFR estimula la actividad intrínseca de la proteína intracelular tirosina quinasa lo cual lleva a la auto-fosforilación de varios residuos de tirosina. Esta auto-fosforilación provoca la activación en cascada y la señalización gracias a proteínas que se asocian con las tirosinas fosforiladas mediante la unión en los dominios SH2 de la fosfotirosina.

Estas proteínas de señalización inician cascadas de transducción de varias señales, principalmente la MAPK, AKT y las vías de JNK, que conducen a la síntesis de ADN y a la proliferación celular. Estas proteínas modulan fenotipos tales como la migración celular, la adhesión y la proliferación.

La proteína KRas actúa como mediadora entre la unión extracelular del ligando al EGFR y la transmisión de señales intracelulares al núcleo. En este estudio un 41% de los 83 pacientes estudiados mostraron una mutación en el gen que codifica esta proteína, el gen KRAS. Esta mutación estaba presente en un 20,5% de los casos en el codón 13 y en un 79,5% de los casos en el codón 12.

Las mutaciones más frecuentes fueron, en primer lugar el cambio de GGT a GAT en el codón 12, que se corresponde con un cambio en el aminoácido glicina a ácido aspártico. En segundo lugar el cambio de GGT por GTT, también en el codón 12, lo cual se corresponde con el cambio del aminoácido glicina a valina y en tercer lugar, el cambio de GGC por GAC en el codón 13, que se corresponde con el cambio del aminoácido glicina a ácido aspártico.

Las mutaciones en el gen KRAS provocan que la proteína KRas esté activada de manera continua, tanto en presencia de ligando para el receptor como en su ausencia. Por tanto, pese a que los anticuerpos monoclonales se unan al receptor inhibiendo la señal desencadenante de la proliferación celular, esta sigue transmitiéndose y no aportan el beneficio esperado al paciente.

Otros estudios, como el realizado por *Di Fiore et al.*<sup>30</sup>, demuestran cómo estas mutaciones afectan a la respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales. *Di Fiore et al.* estudiaron 59 pacientes de los cuales un 37% presentaban mutaciones en el KRAS. Sin embargo, no se encontró ninguna mutación en 12 pacientes que tuvieron buena respuesta al tratamiento con Cetuximab. Además, asociaron estas mutaciones con un tiempo de progresión tumoral significativamente más corto (3 meses vs 5,5 meses  $p=0,015$ ).

Mientras que algunos estudios indican que las mutaciones en el gen KRAS producen un impacto negativo en la supervivencia<sup>24, 25</sup>, como el mencionado anteriormente de *Di Fiore et al.*, otros indican que no<sup>26-29</sup>. En el primer estudio RASCAL se estudiaron 2.721 casos de CCR procedentes de 22 centros diferentes. Dicho estudio demostró que el estado del KRAS era importante para la progresión y la supervivencia del CCR. En concreto la presencia de mutaciones en KRAS aumentaba el riesgo de recurrencia y muerte, especialmente el cambio de guanina a timina.

En este estudio, también se apreció una menor supervivencia a los 10 años en los pacientes con mutaciones comparados con aquellos que presentaron un KRAS *wild type* (37% vs 41,5%), aunque estos resultados no fueron significativos ( $p=0,157$ ).

Otros autores sugieren que este tipo de mutaciones inducen que las células tumorales tengan una actitud más invasiva y además asocian las mutaciones en el codón 12 con el fenotipo mucinoso de CCR y por el contrario, las mutaciones en el codón 13 con fenotipo no mucinoso pero más agresivo y con mayor poder metastásico.

A pesar de que en este estudio se observó mayor poder metastásico y estadios tumorales más altos en aquellos pacientes con mutaciones en el codón 13 en comparación con aquellos que las presentaron en el codón 12 y a su vez mayor poder metastásico en aquellos con mutaciones en el codón 12 en comparación con aquellos con KRAS *wild type* ( $p=0,609$ ), en este estudio, a diferencia con otros, aquellos con mutaciones en el codón 13 tuvieron una supervivencia mayor que aquellos con mutaciones en el codón 12 (35% vs 39%) pero nuevamente estos resultados no fueron significativos ( $p=0,984$ ).

## **CONCLUSIONES**

En conclusión, el análisis rutinario de las mutaciones de KRAS está recomendado en todos los pacientes con CCR metastásico ya que predice la resistencia del paciente a los anticuerpos monoclonales dirigidos a inhibir el EGFR como el Cetuximab o el Panitumumab. Por tanto, aquellos con el gen KRAS mutado no serán candidatos para recibir este tipo de tratamiento. Estas medidas mejorarían la supervivencia y minimizarían los costes de dichos tratamientos además de evitar la exposición de los pacientes a una toxicidad innecesaria producida por los fármacos empleados y el aumento de tiempo sin el tratamiento adecuado.

Además de la importancia del estado del KRAS, empieza a ser aparente que otros elementos críticos en las complejas vías de señalización relacionadas con el EGFR puedan también ser importantes para la toma de decisiones sobre el tratamiento a elegir para aumentar el beneficio que de él obtengan los pacientes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. A. Castells, M. Marzo, B. Bellas, *et al.* Guía de práctica clínica sobre la prevención del cáncer colorrectal. *Gastroenterol Hepatol.* 2004. 27(10): 573-634.
2. <http://informaria.com/15032014/cancer-colorrectal-tumor-prevenible>
3. O. Tapia, J.C. Roa, C. Manterola, *et al.* Cáncer de Colon y Recto: Descripción Morfológica y Clínica de 322 Casos. *Int. J. Morphol.* 2010, 28(2): 393-398,
4. Isabel Portillo Villares. Barreras de implantación del cribado de cáncer de colon en España. 2011.13-16.
5. E. Kapiteijn, C.A.M. Marijnen, I.D Nagtegaal, *et al.* Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Eng J Med.* 2001; 345-638.
6. C.H. Köhne, D. Cunningham, F. Di Costanzo, *et al.* Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil- based treatment for metastatic colorectal cancer: results of amultivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol.* 2002; 13-308.
7. D.A. Lieberman, W.V. Harford, D.J. Ahnen, *et al.* One-Time Screening for Colorectal Cancer with Combined Fecal Occult-Blood testing and Examination of the Distal Colon. *N Engl J Med.* 2001; 345-555
8. A.G. Reneham, M. Egger, M.P. Saunders, *et al.* Impact on survival of intensive follow-up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Br Med J.* 2002; 324-813.
9. T. Watanabe, T.T. Wu, P.J. Catalano, *et al.* Molecular Predictors of Survival after Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *N Engl J Med.* 2001; 344-1996.
10. [http://www.seap.es/documents/10157/287128/k-ras\\_cancer\\_colon.pdf](http://www.seap.es/documents/10157/287128/k-ras_cancer_colon.pdf)
11. D. Cunningham, Y. Humblet, S. Siena, *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351: 337-45.
12. L.B. Saltz, N.J. Meropol, M.N. Needle *et al.* Phase II trial of cetuximab in patients with refractor y colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol.* 2004 (22); 120-81.

13. B.K. Sinha. Topoisomerase inhibitors: a review of their therapeutic potential in cancer. *Drugs* 1995; 49:11-9.
14. M. Gupta, A. Fujimori, Y. Pommier. Eucaryotic DNA topoisomerases I. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expr.* 1995; 126:1-14.
15. Y. Shimada, M. Rothenburg, SG. Hilsenbeck, *et al.* Activity of CPT 11 (irinotecan hydrochloride), a topoisomerase I inhibitor, against human tumor colony-forming units. *Anticancer Drugs* 1994; 86:836-42.
16. W.J. Slichenmeyer, *et al.* The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. *J Nat Cancer Inst* 1993; 85(4): 271-91.
17. Y.H. Hsiang, *et al.* Arrest of replication forks by drugs-stabilized topoisomerase I-DNA clavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Can Resp* 1989; 49:5077-82.
18. D. Elias, M. Bonnay, J.M. Puizillou, *et al.* Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics and tissue distribution. *Ann Oncol* 2002 Feb 13:2 267-72
19. D. Elias, A. El Otmany, M. Bonnay, *et al.* Human pharmacokinetic study of heated intraperitoneal oxaliplatin in increasingly hypotonic solutions after complete resection of peritoneal carcinomatosis. *Oncology* 2002 63:4 346-52
20. L.B. Saltz, J.V. Cox, C. Blanke, *et al.* Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000. 343 (13); 905-14
21. A. de Gramont, A. Figer, M. Seymour, *et al.*: Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000. 18(16): 2938-47
22. J.Y. Douillard, D. Cunningham, A.D. Roth, *et al.*: Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355, 2000 (9209): 1041-7,
23. R. Westermeier, (1997). *Electroforesis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*, VCH, Weinheim.
24. B.R. Dix, P. Robbins, R. Soong, *et al.* The common molecular genetic alterations in Dukes' B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer* 1994; 59:747-51

- 25.** S. Tortola, H. Marcuello, G. Aiza, *et al.* P53 and KRAS gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:1375–81
- 26.** M. Esteller, S. Gonzalez, R.A. Risques, *et al.* KRAS and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:286–8
- 27.** D.J. Ahnen, P. Feigl, G. Quan, *et al.* KRAS mutations and p53 overexpression predict the clinical behaviour of colorectal cancer: a southwest oncology group study. *Cancer Res* 1998; 58:1149–58.
- 28.** H. Bouzourene, P. Gervaz, J.P Cerottini, *et al.* P53 and KRAS as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36:1008–15.
- 29.** H. Petrowsky, I. Sturm, O. Graubitz, *et al.* Relevance of K-67 antigen expression and KRAS mutation in colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27:80–7
- 30.** F.Di Fiore, F. Blanchard, F. Charbonnier, *et al.* Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Brit J Cancer* 2007; 96:1166–9