

DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN NRAS EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

TRABAJO FIN DE MÁSTER

AUTOR: MIKEL PARDO LLAMA

DIRECTORES

Dr. Guillermo López Vivanco

Dra. Begoña Calvo Martínez

INDICE

1. Introducción.....	3-12
2. Objetivos.....	12
3. Material y métodos.....	12-23
4. Resultados.....	23-26
5. Discusión.....	26-28
6. Bibliografía.....	29-31

Antecedentes del tema:

El cáncer es una enfermedad extendida a nivel mundial que causa millones de muertes al año. Tan solo en 2010, un total de 7,98 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad. En 2014 la estimación de muertes que producirá es de 585.721 en Estados Unidos, de las cuales un 10% se deberán al cáncer colorrectal (1).

El cáncer incluye a un amplio grupo de patologías que se caracterizan por un crecimiento anormal de las células. Éstas se dividen y crecen incontrolablemente invadiendo el tejido normal y comprometiendo su función. Las células cancerosas se caracterizan por carecer del control reproductivo que requiere su función original. Otra característica de estas células es su capacidad para extenderse a través del sistema linfático o de la sangre a otras partes del cuerpo, fenómeno conocido como metástasis. El cáncer por lo tanto, podríamos definirlo como un grupo de células que crece incontrolablemente y que forma masas difusas que pueden distribuirse e invadir otros órganos del cuerpo.

La morbi-mortalidad del cáncer ha ido aumentando ampliamente desde 1990 en gran parte debido a los cambios en los estilos de vida de la población.

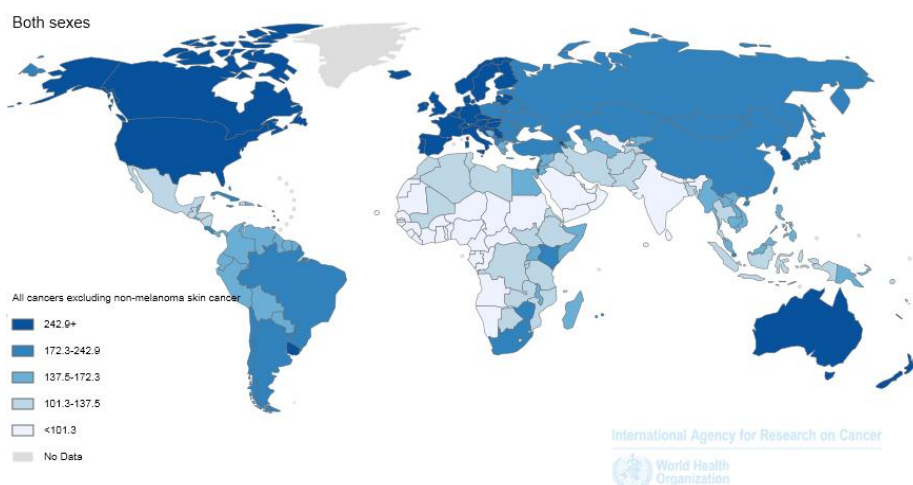


Figura 1. Incidencia del cáncer mundial

A pesar de todos los avances en la investigación aún hoy en día es casi imposible conocer la etiología concreta del cáncer ya que la mayoría de los cánceres tienen su origen en causas múltiples.

Aunque el cáncer se define como una enfermedad primariamente relacionada con el ambiente, ya que el 90-95% de los casos se asocia a factores que nos rodean y solamente un 5-10% se asocia a factores genéticos, el mayor factor de riesgo en el desarrollo del cáncer es la edad, ya que la mayoría de población diagnosticada de cáncer es mayor de 65 años. “Si viviéramos lo

suficiente todos acabaríamos teniendo cáncer” (2). Esto es debido a que con los años se van acumulando errores en el ADN que finalmente desencadenan el crecimiento incontrolado de las células.

Se entiende como factores medioambientales todo lo que no es heredado como el estilo de vida, factores económicos, de comportamiento, etc. De estos factores los más destacados y relacionados con el cáncer son: el tabaco, la obesidad, la radiación, el sedentarismo y los contaminantes medioambientales.

Como se ha comentado, la mayoría de los cánceres son esporádicos. Se considera que solo un 0,3% de la población general es portadora de alguna mutación genética asociada a un elevado riesgo de padecer cáncer y estas mutaciones son responsables de un 3-10% del total de los casos de cáncer. Un ejemplo de ello son las familias que presentan mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. Estas familias tienen una alta probabilidad (más del 75%) de desarrollar cáncer de mama y de ovario (3).

Además, algunas hormonas desempeñan un papel importante en el cáncer ya que estimulan el crecimiento celular. Los factores de crecimiento similares a la insulina y sus proteínas de unión son claves en la proliferación de las células cancerosas, su diferenciación y apoptosis, por ejemplo los mayores niveles de estrógenos y progesterona se asocian a mayor riesgo de cáncer de mama (4).

Por consiguiente el cáncer está causado por un gran número de alteraciones y mutaciones sistémicas.

Las células cancerosas pueden ser muy diferentes pero cumplen 6 características comunes: autosuficiencia en el crecimiento, falta de respuesta a señales en contra del crecimiento, evasión de la muerte celular o apoptosis, potencial de replicación ilimitado, inducción y mantenimiento de la angiogénesis y capacidad de invasión de tejido o metástasis.

La metástasis es la propagación del cáncer a otros lugares del cuerpo lejos del tumor original. El nuevo tumor se denomina tumor metastásico mientras que el original es el primario. Los pasos que sigue el proceso de metástasis son: Primero, la entrada al torrente sanguíneo o al sistema linfático, a continuación la circulación por el cuerpo y la salida en el tejido diana y por último la proliferación y la angiogénesis. La mayoría de muertes originadas por el cáncer son debidas a la metastatización del tumor primario a otras partes del organismo siendo las más comunes los pulmones, el hígado, el cerebro y los huesos por ser las zonas más irrigadas del organismo.

Los signos y síntomas que produce el cáncer dependen en gran medida de la localización del tumor. Estos se producen por el crecimiento de la masa y la invasión de los tejidos propios del

cuerpo. El comienzo de esta enfermedad no crea ningún síntoma ni signo de alarma ya que síntomas como el dolor que es más apreciable no suelen aparecer hasta estadios muy avanzados. Pocos de los síntomas son específicos para el cáncer ya que pueden ser asociados a múltiples patologías más leves. Por un lado, pueden aparecer síntomas locales que se producen por el crecimiento de la masa o por la ocupación de zonas importantes para la vida pero la mayoría de ellos son leves y pueden pasar desapercibidos.

Respecto a los signos y síntomas sistémicos, el cáncer crea signos inespecíficos ya que produce pérdida de peso, fiebre, cansancio y cambios tróficos en la piel. Además ciertos cánceres pueden crear síntomas específicos llamados síndromes paraneoplásicos. Estos son un conjunto de síntomas creados por sustancias proteicas procedentes del tumor que activan diversas vías alternativas. Un ejemplo es la policitemia que se puede observar en los cánceres hepáticos.

Gen afectado	Función
ATP5B (5)	Produce ATP desde ADP en la presencia de un gradiente de protones a través de la membrana
S100A6 (6)	Secreción de insulina Ca^{2+} dependiente
UBB y UBC (7)	Degradación de proteínas
TP53 (8)	Supresor de tumores
APC (9)	Supresor de tumores
RAS (10)	Codifica para una proteína que interviene en diversos procesos que promueven la división celular
BRAF (11)	Interviene en las vías que regulan el crecimiento celular

Tabla 1. Diversas mutaciones que suceden en el cáncer.

El cáncer es fundamentalmente una patología debida al fallo de la regulación del crecimiento de las células. Este crecimiento está controlado por diversos genes que tras una mutación pueden promover el crecimiento celular y la carcinogénesis. Estos genes se denominan oncogenes. Para luchar contra las alteraciones que se producen en los oncogenes existen los genes supresores de tumores que inhiben la división celular y la supervivencia de las células que crecen sin control. Normalmente para que una célula normal pase a ser célula tumoral hacen falta cambios en varios genes.

Los cambios genéticos que se producen en la carcinogénesis pueden ocurrir en niveles diferentes. Pueden ser errores en la mitosis que hagan que la célula sume o pierda un cromosoma entero, aunque el cambio más común es la mutación en las secuencias de nucleótidos del ADN genómico. Los cambios de estos nucleótidos pueden suceder en las regiones codificadoras de proteínas (exones), y pueden afectar a la expresión del ADN y a los productos creados posteriormente. Además, existe la amplificación genómica con la cual la célula puede ganar más de 20 copias de pequeños lugares cromosómicos que normalmente contienen uno o más oncogenes.

Otro método sería la translocación que ocurre cuando dos lugares cromosómicos sin relación se fusionan (por ejemplo, la translocación del cromosoma Philadelphia, entre los cromosomas 9 y 22, en la leucemia mieloide crónica) (12). Por otro lado, varios factores medioambientales hacen que las células sean propensas a esta clase de alteraciones. Algunos de estos factores pueden ser sustancias denominadas carcinógenas, heridas repetidas en lugares concretos, radiaciones ionizantes o la hipoxia.

La transformación de las células normales en tumorales es un proceso de reacción en cadena que tarda un tiempo en suceder. Primero, se producen cambios o pequeños errores en la mitosis, después pasan a ser más severos por el aumento de copias con ese error. Esto hace que la célula vaya progresivamente escapando al control del crecimiento celular normal. Cuando el cáncer ha empezado a desarrollarse este proceso pasa a denominarse evolución clonal y da lugar a estadios más invasivos.

Por otro lado en la carcinogénesis influyen los factores epigenéticos que afectan a la capacidad de reparación de los genes. Estas alteraciones se refieren a modificaciones importantes en el genoma que no tengan que ver con cambios en la secuencia de nucleótidos. Ejemplo de esto son las metilaciones del ADN (adición o pérdida de un grupo metilo $-CH_3$), las modificaciones de las histonas (proteínas que forman la cromatina junto al ADN) o los cambios en la estructura de los cromosomas (como las causadas por expresiones inapropiadas de proteínas como el HMGA2 y el HMGA1) (13). Esto sucede debido a que estos factores pueden alterar la expresión génica sin alterar la secuencia del ADN. Por ejemplo, en los cánceres colorrectales hay una gran parte de ellos que presentan ciertas series de genes hipermetilados (14).

La mayoría de los cánceres son reconocidos por sus signos y síntomas o mediante el *screening* específico de cada tipo de cáncer. Ninguna de las pruebas lleva a un diagnóstico definitivo pero sirven de aproximación para confirmarlo después mediante el análisis de tejido (biopsia).

Para el diagnóstico del cáncer colorrectal (CCR) se utilizan una serie de pruebas ya que es común a medida que progresa la edad. La primera y más sencilla de ellas es el análisis de las

heces en busca de sangre oculta. Si el resultado de la prueba es positivo, se completa el estudio con una colonoscopia para determinar el origen del sangrado (pólipos, tumores, hemorroides, etc). Esta prueba se utiliza para el cribado del cáncer colorrectal.

En los últimos años se ha creado el TEP (tomografía por emisión de positrones) que es una técnica de diagnóstico que permite visualizar el metabolismo del cuerpo humano. La imagen se obtiene gracias a los tomógrafos que son capaces de captar los fotones gamma emitidos por el paciente. Estos fotones se producen por la aniquilación entre un positrón emitido por el radiofármaco que se inyecta y un electrón cortical del cuerpo del paciente. Este método es muy eficaz para la localización de tumores porque se basa en la detección de fluorodesoxiglucosa radiactiva (18FDG) ya que el radiofármaco emisor de positrones de utilidad médica más utilizado es el Flúor-18. Así se muestran las áreas con metabolismo glucémico elevado, que es una característica de los tejidos neoplásicos.

También se realizan análisis de sangre en busca de anemias por la pérdida de sangre o para monitorizar los niveles de los marcadores tumorales (CEA y CA19-9). El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína sintetizada por el cromosoma 19 que aparece elevado en gran parte de los pacientes con cáncer colorrectal. El antígeno carbohidrato 19-9 o antígeno sializado de Lewis (CA 19.9) también es una glicoproteína que es más específica ya que solo aparece elevada en procesos gastrointestinales.

Para la visualización directa se realiza la colonoscopia o la sigmoidoscopia. En ambas pruebas se utiliza un endoscopio para la visualización y localización del tumor. Mediante esta técnica además se puede realizar una biopsia, es decir, tomar una pequeña muestra del tejido para estudiarlo en detalle. Esta muestra sirve también para realizar estudios para aproximar la etiología o la estrategia de tratamiento del cáncer. Entre ellos destacan las pruebas genéticas en las que se podrían detectar cambios en genes que afectarían al tratamiento. En el caso del cáncer colorrectal destaca el análisis de la familia de los genes RAS que aparecen mutados en 4 de cada 10 pacientes con esta patología.

También se puede efectuar una prueba para determinar la inestabilidad de los microsatélites. Esta prueba se realiza también para la elección de tratamientos y para la detección de los pacientes con cáncer de colon hereditario sin poliposis ya que su análisis ayuda a plantear las pruebas de detección adicionales y las posibilidades de tratamiento. Además, en el cáncer colorrectal la inestabilidad puede aparecer en estadios tempranos, lo que modificaría la estrategia de tratamiento.

Antes de empezar el tratamiento, es de vital importancia la clasificación del tumor según estadios predeterminados. Los utilizados en este trabajo son los estadios TMN que miden la

extensión del tumor, su diseminación y la presencia de metástasis y los de DUKES modificados, que utilizan las letras que van desde la A hasta la D y corresponden a las siguientes fases de la enfermedad: estadio A: lesión limitada a la mucosa, sin afectación ganglionar, estadio B1: el tumor afecta a parte de la pared del colon o el recto, sin atravesarla ni afectar a los ganglios, estadio B2: afecta a toda la pared sin invasión ganglionar, estadio C: la enfermedad puede afectar a parte o a toda la pared, con afectación ganglionar, estadio D: existe afectación de otros órganos alejados (metástasis).

Respecto al tratamiento existen varias opciones pero las más extendidas son la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía.

La radioterapia utiliza las radiaciones ionizantes con el fin de destruir las células cancerosas y reducir el tamaño del tumor. El efecto derivado de la radioterapia se basa en el daño producido a su material genético que hace que se conviertan en células que no pueden dividirse. Por otro lado, la radioterapia daña tanto a las células normales como a las cancerosas pero un porcentaje de las normales pueden recuperarse después. Existen varios tipos de radioterapia: la braquiterapia que consiste en la colocación de fuentes radiactivas encapsuladas dentro o en la proximidad de un tumor para evitar la difusión de la exposición a otras partes del cuerpo y la radiación externa en la que hace falta un acelerador lineal y el paciente debe acudir de manera ambulatoria a recibir el tratamiento.

Respecto a la quimioterapia, existen dos tipos de combinaciones de fármacos muy utilizadas. La primera es la denominada FOLFOX, formada por ácido folínico, 5-Fluorouracilo y oxaliplatino. La segunda es la combinación FOLFIRI en la que se sustituye el oxaliplatino por irinotecán.

El ácido folínico es un adyuvante y muestra una actividad vitamínica similar a la del ácido fólico pero no se ve afectada por la inhibición del ácido fólico. Por esto, el ácido folínico permite que siga llevándose a cabo algo de síntesis de purinas y pirimidinas permitiendo así un grado de replicación normal del ADN y transcripción del ARN. En el caso de esta combinación el ácido folínico no se emplea como protector sino que aumenta el efecto del fluorouracilo por medio de la inhibición de la enzima timidilato sintasa que es una enzima que cataliza la creación de timidilato, esencial para la creación de timina.

El 5-Fluorouracilo es un antimetabolito, es decir inhibe o compite con un metabolito específico. Este fármaco bloquea la metilación del ácido desoxiuridílico a ácido timidílico mediante la inhibición de la enzima timidilato sintasa. Esto hace que la replicación del ADN sea imposible deteniendo así el crecimiento celular. En las células produce un desequilibrio metabólico que resulta en la muerte de la célula. Este fármaco afecta en mayor medida a las células tumorales

porque su nivel de replicación es más alto y porque utilizan preferentemente el uracilo para la síntesis de timina. Además, tiene gran eficacia porque se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina necesarios para la síntesis del nuevo ADN.

El oxaliplatino es un fármaco que pertenece a la tercera generación de los derivados de platino y se diferencia en su espectro de actividad comparado con el resto de su familia. El oxaliplatino es un inhibidor de la síntesis de ADN que utiliza un ligando portador diferente al resto lo que le confiere mayor actividad y espectro. Por otro lado, se considera un tratamiento de elección porque su nefrotoxicidad y su mielotoxicidad son menores. Este fármaco muestra un amplio espectro de actividad citotóxica *in vitro* y de actividad antitumoral *in vivo*. Su mecanismo de acción se basa en que los derivados hidratados resultantes de la transformación del oxaliplatino interactúan con el ADN formando puentes intra e intercatenarios que entrañan una interrupción de la síntesis de ADN.

Como se ha mencionado, en la combinación FOLFIRI se sustituye el oxaliplatino por irinotecán. El irinotecán es un derivado semisintético de la camptotecina; este compuesto ha demostrado tener una actividad antitumoral por la inhibición de la topoisomerasa-1, enzima importante para la replicación y la transcripción. El mecanismo de acción se basa en que la topoisomerasa relaja las torsiones del ADN para su replicación. Esto tiene lugar en la inhibición de la tercera fase de acción de la enzima en la que se reconstituye la cadena de ADN después de la relajación de sus torsiones para su replicación. Por lo tanto, la inhibición de esta fase impediría la reconstitución del ADN que ya no sería válido para la siguiente replicación. Además, debido a la acción de la topoisomerasa, que rompe la cadena para relajar estas torsiones, se puede dar una ruptura irreversible del ADN que llevaría a la muerte celular. Por último, se ha demostrado que los niveles de topoisomerasa-1 son más elevados en cánceres colorrectales, lo que afectaría en mayor medida a estas células.

Como tratamiento del cáncer colorrectal también existe la cirugía. Para la cirugía es primordial realizar un buen diagnóstico y estadio del cáncer ya que la estrategia sería completamente diferente dependiendo del estadio. Si se confirma que el cáncer es local y que no hay posibilidad de que se haya diseminado puede ser extraído mediante una escisión local que se puede realizar al mismo tiempo que la colonoscopia. Otros tipos de cáncer conllevan cirugías mayores. En estos se realizarían colectomías, es decir, la resección del fragmento completo de colon y la unión de los extremos.

Otra de las alternativas para el tratamiento del cáncer colorrectal serían los anticuerpos monoclonales que son anticuerpos mono-específicos porque se generan a partir de células del sistema inmune idénticas y por lo tanto poseen una afinidad por un solo epítipo.

Gracias a los avances científicos se pueden crear anticuerpos monoclonales que se unen a cualquier sustancia. Por esta razón, en los últimos años se han diseñado algunos que se unen específicamente a antígenos de las células cancerígenas y originan la activación de una respuesta inmune en ellas. Entre ellos los más importantes para el tratamiento del cáncer colorrectal son Bevacizumab, Cetuximab y Panitumumab.

El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a una proteína denominada factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG). Esta proteína es necesaria para el crecimiento de los vasos sanguíneos dentro del tumor que hacen que las células de este puedan ser suplidas de nutrientes y oxígeno. Cuando el Bevacizumab se une a la proteína inhibe su actividad biológica privando así a las células tumorales de nutrientes e impidiendo su crecimiento.

El Cetuximab y el Panitumumab se unen al antígeno conocido como factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y lo bloquean. De este modo, la célula no recibe los mensajes químicos necesarios para su crecimiento y replicación. El Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Por lo tanto, en los tumores que expresan HER2 el Trastuzumab inhibe su proliferación bloqueando el receptor. Además, este anticuerpo monoclonal es un potente mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en las células que sobreexpresan el HER2 (15).

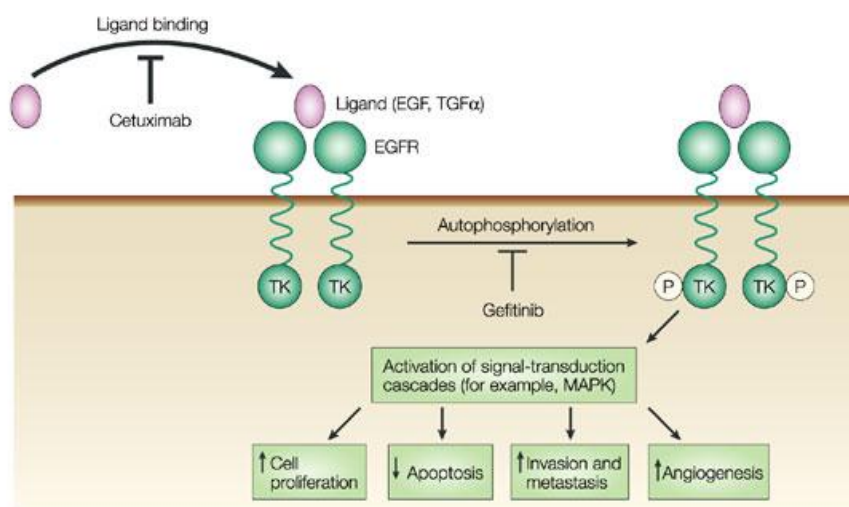


Figura 2. Acción de los anticuerpos monoclonales en la vía de las MAPK

La vía de las MAPK es una importante ruta de transducción de señales relacionadas con el cáncer que llevan las señales desde un receptor en la membrana celular hasta el ADN. Esta vía también es conocida como la vía **Ras-Raf-MEK-ERK**.

En primer lugar el factor de crecimiento epidérmico (EGF) se une a su receptor (EFGR) en la membrana celular y activa la tirosina quinasa del receptor citoplasmático. A este receptor se le une la proteína GRB2 que contiene un dominio SH₂. Posteriormente la proteína GRB2 se une al factor de intercambio de guanina SOS gracias a los dominios SH₃. Cuando este complejo se une al receptor fosforilado activa SOS lo que promueve la pérdida de un GDP y la ganancia del GTP en una proteína de la familia RAS (generalmente K-Ras o H-Ras) que queda activada. Esta proteína Ras activa a la proteína quinasa de RAF. Después la RAF quinasa activa MEK (MEK 1 y MEK2) se fosforila y activa la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Una de las actividades de MAPK es que altera la traducción de los mRNA.

Además, la MAPK regula la acción de muchos factores de transcripción lo que le confiere actividad para la proliferación celular, aumenta la supervivencia de las células y favorece la angiogénesis. Por esta razón, la presencia de mutaciones en una de estas proteínas intermediarias, como Ras, puede llevar a la creación de células tumorales con gran capacidad de proliferación, menor tasa de apoptosis, capacidad de angiogénesis y capacidad de invasión.

En este trabajo se estudia la función de uno de los genes específicos de la familia RAS, el NRAS (*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*). El NRAS como todos los genes de la familia RAS codifican unas proteínas G monoméricas con actividad GTP hidrolasa. Este gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 1 en la posición 13.2 (figura 3). La proteína que codifica puede presentar dos conformaciones: la activa cuando aparece unida al GTP y la inactiva cuando aparece unida al GDP.

El gen NRAS contiene 7 exones que dan lugar a diferentes transcritos. La proteína NRas se activa por factores de intercambio de nucleótidos de guanina como SOS. Además, las mutaciones en el gen están relacionadas con diversos tipos de cánceres puesto que la proteína está relacionada con el crecimiento celular. Estas mutaciones suelen producirse en los codones 12, 13 y 61 y se traducen en una activación de la proteína sin necesidad de ninguna señal externa a la célula que da lugar a un crecimiento celular desproporcionado. El gen NRAS aparece mutado en el 3% de los pacientes con cáncer colorrectal pero aun así su estudio resulta de vital importancia para la terapia con anticuerpos monoclonales

La importancia de este gen en el tratamiento del cáncer colorrectal reside en que la presencia de mutaciones produce alteraciones en la proteína que codifica, que como consecuencia se activa

sin seguir las vías de señalización normales. Los anticuerpos monoclonales Cetuximab y Panitumumab que se utilizan en el tratamiento del CCR metastásico, se unen al antígeno EGFR y lo bloquean. Pero si alguno de los genes de la familia RAS (situados más abajo en la ruta metabólica) está mutado, la cascada de reacciones permanece continuamente activada y no se produce el bloqueo de la misma con el anticuerpo utilizado. Ciertos estudios demuestran la relación que existe entre la familia de genes RAS y la respuesta a estos fármacos (16, 17,18) pero el porcentaje de NRAS mutados es menor que en el KRAS. Esto hace que para indicar el tratamiento con alguno de los dos anticuerpos monoclonales se ha de realizar en primer lugar el estudio molecular del gen KRAS y en caso de no encontrar mutación, se realizará el del gen NRAS.

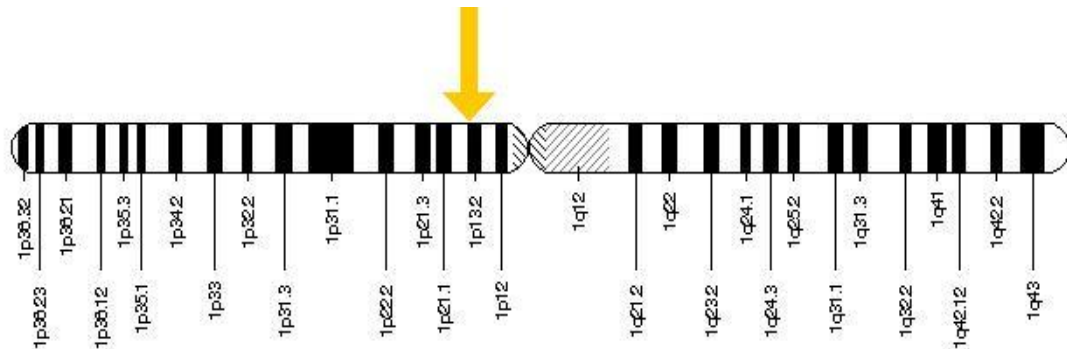


Figura 3. Localización del gen NRAS

Objetivos

Identificar las mutaciones del gen NRAS en el ADN procedente de muestras de tejido de pacientes con cáncer colorrectal para verificar su relación con el mismo y con la respuesta a los tratamientos para esta patología.

Material y métodos

1. Selección de la muestra.

La muestra fue extraída de 84 diferentes pacientes con cáncer colorrectal en diferentes estadios para analizar las mutaciones producidas en el gen NRAS. La edad de los pacientes estaba entre 46 y 88 años siendo la media de 69,08 años de edad. El grupo estaba formado por 57 varones y 24 mujeres. Todos los integrantes del grupo se sometieron a cirugía de la cual fue extraída la

muestra de tejido. Los pacientes se registraron en una base de datos teniendo en cuenta el estadio, la presencia o ausencia de metástasis, el tratamiento y la supervivencia a diez años. De los 84 pacientes 10 recibieron radioterapia y 44 fueron tratados con diferentes quimioterápicos y adyuvantes. Además, el 46% de los pacientes presentó metástasis en diferentes localizaciones.

Los pacientes fueron estadificados por la escala TNM (T-tumor (extensión tumoral), N-diseminación a los ganglios linfáticos cercanos y M-metástasis). Los pacientes incluidos en este estudio se agruparon en los siguientes estadios: T2-4, N0-2, M 0-1.

2. Extracción del ADN.

Para la extracción del ADN se utilizó el kit *QIAmp DNA mini Kit* (de Quiagen, Izasa, Madrid). Para la utilización del kit se siguieron los siguientes pasos:

1. Se tomó una muestra de tejido tumoral inferior a 25 mg que luego se distribuyó en partes más pequeñas que se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml. A ese tubo se le añadieron 180 µl de *Buffer ATL*, una solución para la lisis de tejido y 20 µl de *proteinasa K*, una enzima cuya función es la digestión general de proteínas.
2. Se homogeneizó la muestra con un agitador y se dejó incubar en una placa térmica a 56°C para conseguir la lisis del tejido. (De 1-3 horas).
3. Se añadieron 200 µl de *Buffer AL*, una solución capaz de destruir las membranas celulares dejando el ADN expuesto, a la muestra y se realizó una incubación durante 10 minutos. Luego se le realizó una homogenización de 15 seg. con el agitador y se centrifugó un par de segundos para recoger las posibles gotas que se hubieran podido quedar por el tubo.
4. Se añadieron 200 µl de etanol y se agitó para homogenizar la muestra. La mezcla obtenida de estos tubos se depositó en las columnas de micro-centrifugación procedentes del kit y se centrifugó durante un minuto a 8.000 revoluciones por minuto (rpm).
5. Tras la centrifugación se retiró el tubo de recogida de la columna y se puso uno nuevo. A continuación, se añadieron 500 µl de *Buffer AW1* procedente del kit (solución que rompe cualquier enlace inespecífico de la muestra a la columna), y se realizó otra centrifugación de un minuto a 8.000 rpm. Una vez finalizada se desechó el tubo colector o de recolección de la columna y se colocó uno nuevo.
6. Se añadieron 500 µl de *Buffer AW2*, solución para eliminar cualquier sal presente en la alícuota, y se realizó otra centrifugación de 3 minutos a 8.000 rpm. Después se retiró el líquido sobrante del tubo de recogida se volvió a poner y se centrifugó un minuto a 13.000 rpm para retirar los restos del *Buffer AW2* de la columna.

7. Se colocó la columna en un tubo de eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 200 µl de *Buffer AE*, una solución que se compone de Tris-EDTA que suelta el ADN de la membrana y sirve como medio de almacenamiento, dejando reposar durante un minuto la solución. Tras esto se realizó una centrifugación de 1 minuto a 8.000 rpm. La mezcla obtenida en este paso sería el ADN resultante que posteriormente se utilizó para el análisis.

Por último, se cuantificó la cantidad de ADN obtenido utilizando un espectrofotómetro (*Nanodrop ND-100 spectrophotometer*) y el programa asociado *Nanodrop 1000 3.8.1*. Para minimizar los posibles ruidos de fondo se utilizó el *Buffer AE* procedente del mismo kit de extracción del ADN como blanco. Por cada muestra de ADN se realizó dos veces la medida para verificar la calidad del ADN extraído.

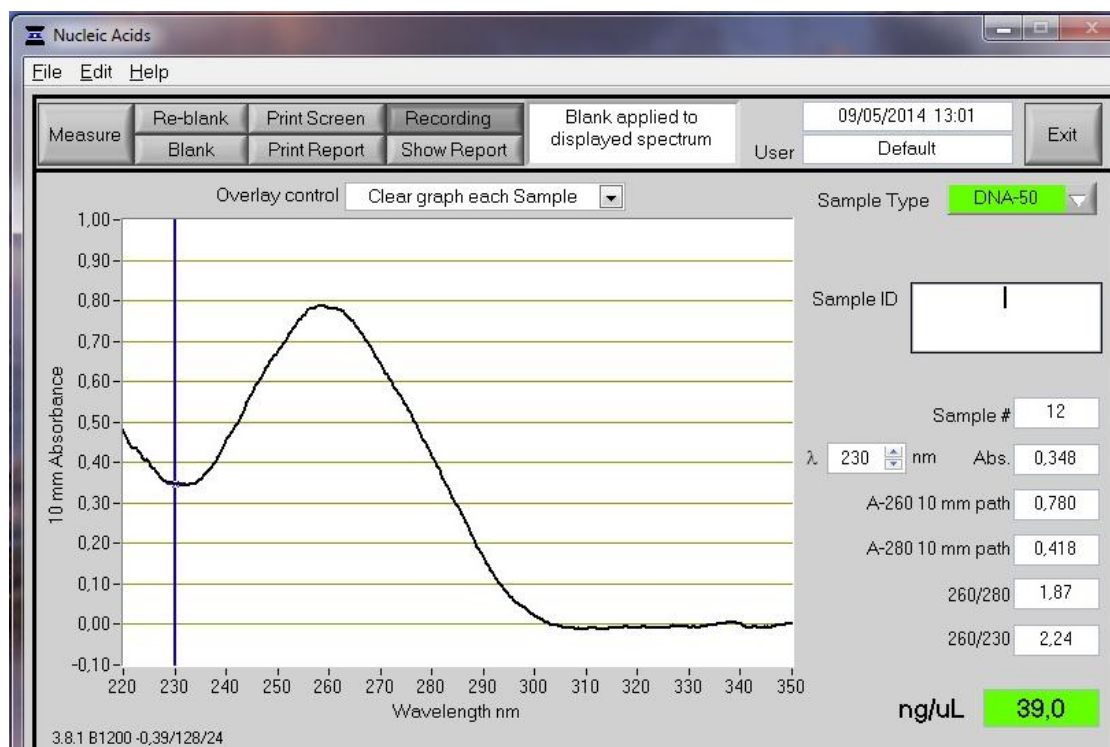


Figura 4. Resultado del espectrofotómetro

3. Reacción en cadena de la polimerasa. (PCR)

La PCR es una técnica utilizada en biología molecular que permite amplificar el ADN desde pocas copias a millones mediante unos *primers* que delimitan la zona a amplificar. Esta reacción se produce gracias a la tecnología de los termocicladores que se programan para alternar temperaturas elevadas y frías para desnaturalizar el ADN y activar la acción de la enzima. Por

esta razón en las reacciones de PCR utilizan una ADN polimerasa llamada Taq polimerasa que es una enzima termoestable que resiste los cambios de temperatura.

El ciclo que siguen las reacciones en los termocicladores es el siguiente: La muestra se calienta a 95°C lo que produce la separación de las hebras de ADN para su posterior replicación. Después, la muestra se enfría hasta 55°C para que los *primers* se unan a las cadenas de ADN que están separadas. Por último la temperatura se eleva a 72°C y la Taq polimerasa comienza a sintetizar el nuevo ADN donde los *primers* se unieron al ADN. Por último, se deja una fase de 72°C para asegurar que la enzima amplifica cualquier resto de ADN. Estas fases se denominan desnaturalización, *annealing*, extensión y elongación final.

Esta reacción se utilizó para conseguir multitud de copias de los exones de interés que después se analizaron. Para esto se utilizaron *primers* específicos para los exones 2 y 3 por ser los lugares más frecuentes de mutaciones en el gen NRAS. Posteriormente tras la reacción se obtuvieron fragmentos amplificados con un tamaño de 121 y 143 pares de bases respectivamente.

Para la realización de la PCR se utilizó el *KAPA Taq HotStart PCR kit* que contenía el Cloruro magnésico (MgCl₂) la Kapa Taq polimerasa y el *buffer* de la enzima. Además, se utilizaron *PCR-Grade water* (de laboratorios Roche, Madrid), los dNTPs (*Deoxynucleotide Triphosphate SET*, Manhain, Alemania) y los *primers* (IDT, Leuven, Belgium).

Los *primers* utilizados se diseñaron específicamente para la amplificación de los exones 2 y 3 del gen NRAS con la siguiente secuencia: NRAS exón 2 Forward: 5' – CTG GTG TGA AAT GAC TGA GTA CAA ACT GGT GGT- 3', NRAS exón 2 Reverso: 5' – ACC TCT ATG GTG GGA TCA TAT TC – 3', NRAS exón 3 Forward: 5'- CAG GAT TCT TAC AGA AAA CAA GT- 3' NRAS exón 3 Reverso: 5'- TTG ATG GCA AAY ACA CAG AGG AAG C- 3'. (La Y es C o t).

La puesta a punto se realizó con diferentes concentraciones de DMSO y temperaturas que oscilaron entre los 50 y los 60 grados. Para la elección de las condiciones de la reacción se analizaron 3 muestras con concentraciones diferentes y se realizó un gradiente de temperaturas en el termociclador. El resultado de esta prueba fue que la temperatura de *annealing* óptima era de 55° C, y que con 10% de DMSO se eliminaban las posibles inespecificidades de la reacción.

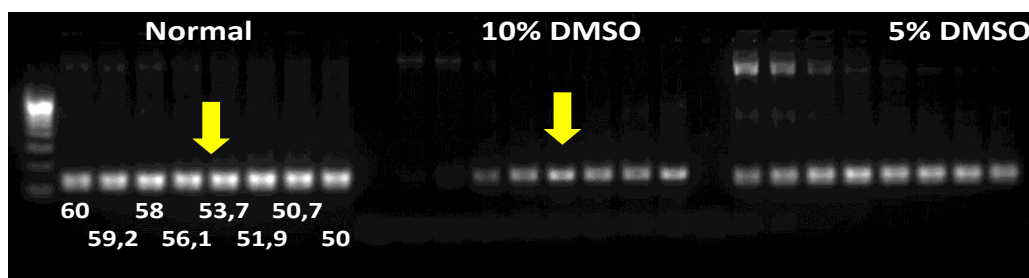


Figura 5. Electroforesis en gel de PCR de gradiente

La PCR se realizó en una campana de flujo laminar Telstar Mini-V/PCR, que es un equipo que fuerza el aire del recinto a pasar por un filtro que crea una zona de trabajo libre de partículas de hasta 0,1 micras. Antes de empezar la reacción todo el material se dejó bajo rayos ultravioleta durante 20 minutos.

Para la PCR se utilizaron los componentes antes descritos de esta forma: 6,3 µl de *PCR Grade water*, 5 µl de *KAPA Taq HotStart buffer 5x*, 1,5 µl de $MgCl_2$ a una concentración de 25 mM, 0,2 µl de dNTPs a una concentración de 25 mM cada uno, y los 4 *primers* E2For, E2Rev, E3For, E3Rev 1 µl de cada uno a una concentración de 5 µM cada uno y por último 0,5 µl de *KAPA Taq HotStart* a una concentración de 5 U/ µl.

Además, para aumentar la especificidad de la reacción se utilizó DMSO. Se utilizaron 2,5 µl de DMSO para que su concentración final en el tubo de reacción fuera del 10%. Posteriormente se añadieron 5 µl del ADN correspondiente de las muestras a analizar a una concentración de 20 ng/ µl. Los fragmentos obtenidos fueron de 121 pares de bases para el exón 2 y de 143 pares de bases para el exón 3.

Cuando se procedió al análisis de las mutaciones con la técnica *SNaPshot* a partir de esos fragmentos se comprobó que había una amplificación prioritaria del exón 3 y que el exón 2 se amplificaba mucho menos por lo que se decidió amplificar el exón 2 por separado.

Para la PCR del exón 2 se aumentó la concentración de ADN a 15 µl a 20 ng/µl y se volvió a ensayar un gradiente de temperatura y diferentes concentraciones de DMSO. Por lo tanto se utilizaron los reactivos en las siguientes concentraciones: 0,8 µl de *PCR Grade water*, 5 µl de *KAPA Taq Hot Start buffer 5x*, 1,5 µl de $MgCl_2$ a una concentración de 25 mM, 0,2 µl de dNTPs a una concentración de 25 mM, y los 2 *primers* del exón 2 E2For, E2Rev, 1 µl de cada uno a una concentración de 0.2 µM y por ultimo 0,5 µl de *KAPA Taq Hot Start*. Además, las condiciones utilizadas en el termociclador se revisaron mediante una PCR de gradiente y se mantuvo todo igual menos la temperatura de *annealing* que se bajó a 50°C.

Las condiciones de PCR empleadas para esta PCR fueron: desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, *annealing* 60 segundos a 55°C y extensión 60 segundos a 72°C, una fase final de extensión de 7 minutos a 72°C. Por último se programó una fase en el termociclador de 4°C hasta la colocación de la reacción en la nevera para su posterior análisis. Para estas condiciones se usó un termociclador *GeneAmp® PCR system 9700* de *Applied Biosystems*.

4. Electroforesis en gel y purificación.

La electroforesis permite separar especies químicas (ácidos nucleicos o proteínas) a lo largo de un campo eléctrico en función de su tamaño y de su carga eléctrica. Los ácidos nucleicos, ADN y ARN, tienen por naturaleza carga negativa. Si se colocan los fragmentos de ADN extraído de una muestra biológica sobre un soporte poroso, un gel de agarosa en este caso, y se aplica un campo eléctrico en presencia de una solución con sales, se producirá la migración diferencial de los fragmentos a través de los poros de la matriz. La solución que se utilizó fue TAE 1x, una solución amortiguadora que contienen Tris base, ácido acético y EDTA. El Tris y el ácido acético contribuyen a mantener el pH. El EDTA es un quelante de cationes divalentes, cuya función es secuestrar Mg^{++} y evitar que las posibles nucleasas presentes degraden los ácidos nucleicos de la muestra. La tinción del gel con GelRed *nucleic acid gel stain* (una variante más segura del bromuro de etidio), que es una sustancia fluorescente que se intercala en la molécula de ADN, y la exposición con luz ultravioleta, permite observar el resultado de la migración. El tamaño de los fragmentos de ADN se puede estimar comparándolos con el patrón de bandas obtenido del *Hyperladder*, un marcador de talla comercial con diferentes bandas de pesos moleculares ya conocidos. La electroforesis en este experimento se utilizó para comprobar el resultado de las PCRs y sus purificaciones y para aislar el fragmento de ADN a estudio.

Para testar los productos obtenidos en las reacciones y su validez se cargó todo el producto obtenido en geles de agarosa al 2,5% y se corrió durante 30 minutos a 120 V con una fuente Power pac 3000 de Bio-Rad. Además, para comprobar el tamaño aproximado de la banda se utilizó el *Hyperladder IV 100 lanes* (*Bioline*). Después de esto se visualizaron y analizaron las bandas de ADN con el equipo de captura y análisis de imagen G:BOX (*Syngene*, Cambridge, UK).

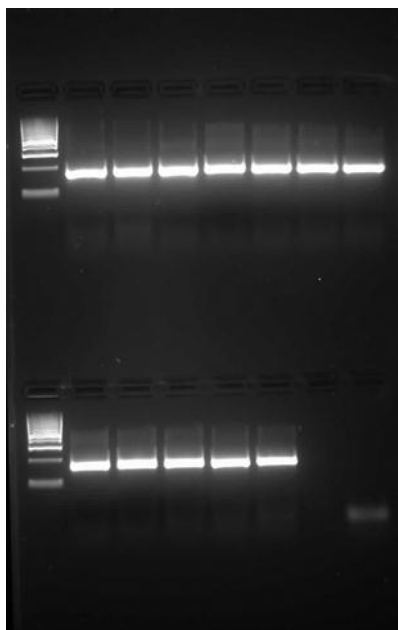


Figura 6. Electroforesis del PCR

Después de comprobar que las bandas de la PCR eran las correctas y que no había contaminación en el blanco, se cortaron las bandas y se pasaron a tubos eppendorf de 1,5 ml debidamente etiquetados. Para la purificación de estas muestras se utilizó el *QIAquick gel extraction kit* (Quiagen, Madrid, España).

1. Se añadieron 450 µl de *Buffer QG* del kit a los tubos de eppendorf y se incubaron durante 10 minutos a 50°C para disolver el gel.
2. Pasados los 10 minutos se sacaron los eppendorf de la placa térmica y se comprobó que el gel se había disuelto por completo tras lo cual se homogeneizaron por agitación. Después se añadieron 150 µl de isopropanol y se agitaron los tubos durante varios segundos para mezclar la solución.
3. Una vez mezclada toda la solución las muestras se depositó en las columnas de microcentrifugación procedentes del kit, *QIAquick columns*, con sus correspondientes tubos de recogida y se centrifugaron durante un minuto a 13.000 rpm (*BECKMAN microfuge E*).
4. Se descartó el líquido sobrante de los tubos de recogida y se añadieron de nuevo 500 µl de *Buffer QG* del kit. Se centrifugó durante un minuto a 13.000 rpm y se descartó de nuevo el líquido sobrante.
5. Se añadieron 750 µl de *Buffer PE* procedentes del kit y se dejaron durante 5 minutos en la columna (esta incubación es una recomendación del fabricante cuando la muestra purificada se va a utilizar para aplicaciones sensibles a sales como la secuenciación directa). Se centrifugaron durante 1 minuto dos veces, la

segunda para descartar posibles restos de la solución que hubieran quedado en la columna.

6. Las columnas se colocaron en tubos eppendorf debidamente etiquetados y se añadieron 30 µl de Buffer de elución (*Buffer EB*). Se dejó incubar el buffer en las columnas durante 4 minutos para aumentar la cantidad de ADN conseguido en este proceso. Posteriormente, se centrifugó durante un minuto a 13.000 rpm, se extrajeron las columnas de los tubos eppendorf y se descartaron.

El producto resultante de este proceso se pasó de los tubos eppendorf de 1,5 ml a eppendorf con rosca para su almacenamiento en la nevera a 4°C hasta la realización del siguiente paso.

5. Electroforesis de la purificación.

Una vez purificados los productos PCR se testaron en un gel de agarosa. Para ello se utilizaron geles de agarosa al 2,5% y 5 µl de cada producto purificado. Como se ha comentado, se utilizó *Hipperladder IV 100 lines* (Bioline) para determinar el tamaño de las bandas y *buffer* de carga para depositar las muestras en los pocillos del gel.

El gel se sometió a una corriente eléctrica de 120 V durante 30 minutos. Después, se utilizó un equipo de captura y análisis de imagen G:BOX (*Syngene*, Cambridge, UK).

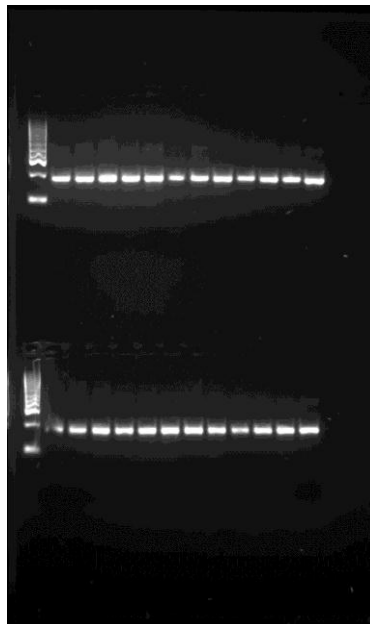


Figura 7. Electroforesis en gel del producto de la purificación

6. SNaPshot.

Para analizar las mutaciones de estas muestras se utilizó la técnica de *SNaPshot* con el *ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit*. Este método consiste en una PCR múltiple, seguido de una reacción de extensión de una sola base, en la cual se utilizan sondas específicas para cada uno de los codones en los que presumiblemente se puede encontrar una mutación. Los nucleótidos que se utilizan en el proceso de extensión de una base son didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia. Cada uno de los picos resultantes se corresponde con una de las bases de los codones que se pretende analizar. Estas sondas se diseñan con tamaños diferentes que después se separan por electroforesis y se analizan con un secuenciador automático (19).

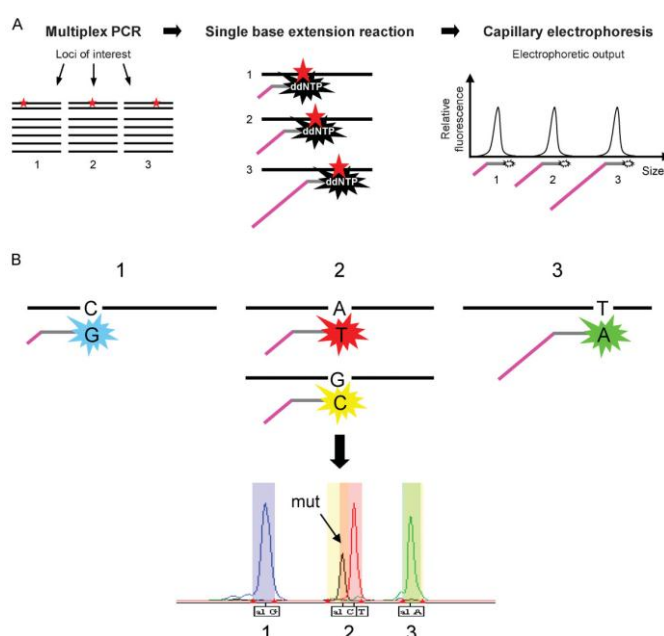


Figura 8. Bases del *SNaPshot*

En los resultados obtenidos la identidad de los nucleótidos que aparecieron en los lugares específicos de posibles mutaciones se determinó por dos parámetros: el peso molecular debido a las diferentes colas de las sondas introducidas que solo se unirán al lugar específico para el cual fueron diseñadas y la fluorescencia del didesoxinucleótido marcado que se ha añadido a la reacción durante el paso de extensión.

Para este método una de las partes más importantes es la elección de las sondas utilizadas. Estas se seleccionaron para los lugares específicos de posibles mutaciones en el gen NRAS. En concreto, 7 sondas diferentes para las dos primeras bases del codón 12, las dos primeras bases del codón 13 y las 3 bases del codón 61 (IDT, *Integrated DNA technologies*, Leuven, Belgium). Las secuencias se describen en la tabla 2.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>
NRAS c-12-1° F	5` AAC TGG TGGTGGTGG GAG CA 3`
NRAS c-12-2° F	5`TTT TTT TTA ACT GGT GGTGGTGGTTGG AGC AG-3`
NRAS c-13-1° F	5`TTT TTT TTT TTT TTT TTT CAG TGC GCT TTT CCC AAC AC 3`
NRAS c-13-2° F	5` TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GTG GTG GTT GGA GCA GGT G 3`
NRAS c-61-1° R	5` TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTC ATG GCA CTG TAC TCT TCT T 3`
NRAS c-61-2° R	5` TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTC ATG GCA CTG TAC TCT TCT 3`
NRAS c-61-3° R	5` TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TCT CTC ATG GCA CTG TAC TCT TC 3`

Tabla 2. Diseño de las sondas utilizadas en el *SNaPshot*.

La puesta a punto de este experimento se llevó a cabo utilizando diferentes concentraciones de las sondas requeridas para la obtención de unos resultados equivalentes en los que aparecieran todos los picos a la misma intensidad aproximadamente. Así, la concentración que se utilizó de las sondas fue la siguiente:

Codón-base	Concentración de trabajo (µM)
12-1	0,40
12-2	0,40
13-1	0,80
13-2	0,60
61-1	2,00
61-2	6,02
61-3	12,02

Tabla 3. Concentraciones de las sondas

Además, de las concentraciones de las sondas se probaron diferentes cantidades de la muestra cargada en el secuenciador para que los picos resultantes mostraran un tamaño adecuado respecto al marcador de talla (*GeneScan™ 120 LIZ*) y no se saturasen y quedaran fuera de escala.

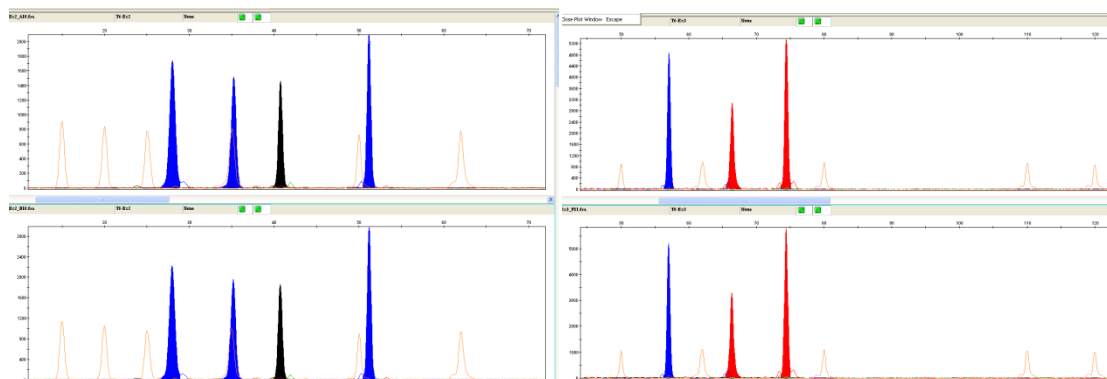


Figura 9. Resultados *SNaPshot*

Esta reacción se llevó a cabo utilizando 2,5 µl del ADN obtenido en los experimentos anteriores, 4 µl del *SNaPshot mix* procedente del kit de *SNaPshot* en los que se incluyen los didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia, la enzima para la extensión de una base en el ADN (*AmpliTaqaDNA Polymerase*) y el *buffer* necesario para la reacción. Además, se incluyeron las 7 sondas en un volumen total de 2 µl (exón 2) ó 1,5 µl (exón 3). Por último, se añadió 1,5 µl ó 2 µl de *PCR grade water* respectivamente.

Se introdujo la reacción en un termociclador que se programó en dos fases. La *primera* de desnaturalización del ADN de 10 segundos a 96°C y la segunda de *annealing* y extensión a 56°C durante 55 segundos. Ambas se repitieron durante 25 ciclos. Posteriormente, la reacción se sacó del termociclador y se añadió a cada tubo 1 unidad de *Shrimp Fosfatase Alkaline*, una enzima termolábil que sirve para detener la reacción de amplificación de modo que no se unan más nucleótidos a partir del didesoxinucleótido marcado con fluorescencia. Además, la adición de esta enzima cumple la función de eliminar los didesoxinucleótidos restantes en la reacción para evitar la posibilidad de que migren y originen picos erróneos.

Después de añadir la enzima, la reacción se introdujo de nuevo en un termociclador y se dejó durante una hora a 37°C y 15 minutos a 75°C. Por último, la reacción se cargó en el secuenciador: 1 µl de la reacción, 14 µl de formamida (una solución desnaturizante utilizada para la secuenciación) y 0,28 µl de *GeneScan™ 120LIZ* (un marcador de talla para determinar el tamaño de los fragmentos). El marcador de talla elegido consta de nueve fragmentos de 15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110 y 120 nucleótidos. Los fragmentos resultantes de la reacción

SNaPshot se encuentran en esos rangos, por lo que el *software* del equipo es capaz de determinar sus tamaños.

Resultados

Para analizar los datos obtenidos los 84 pacientes se dividieron en diferentes grupos según la edad, el sexo, el tratamiento y el estadio. En el grupo de estudio se observó una incidencia del 69% en hombres (n= 58) y del 31% en mujeres (n=26). Además, el rango de edad osciló entre los 46 y 88 años siendo su media de 69,08 años. Por otro lado, la mayoría de casos se produjeron a partir de los 65 años 73,8% (n= 62).

Por otro lado se estudió la relación entre la supervivencia de los pacientes con metástasis y los que no tenían metástasis. Un 21,4% de los pacientes mostraron metástasis (n=18) y su media de supervivencia a diez años fue de 2,3 años.

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	40,308	1	,000
Breslow (GeneralizedWilcoxon)	39,734	1	,000
Tarone-Ware	40,527	1	,000

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de metástasis.

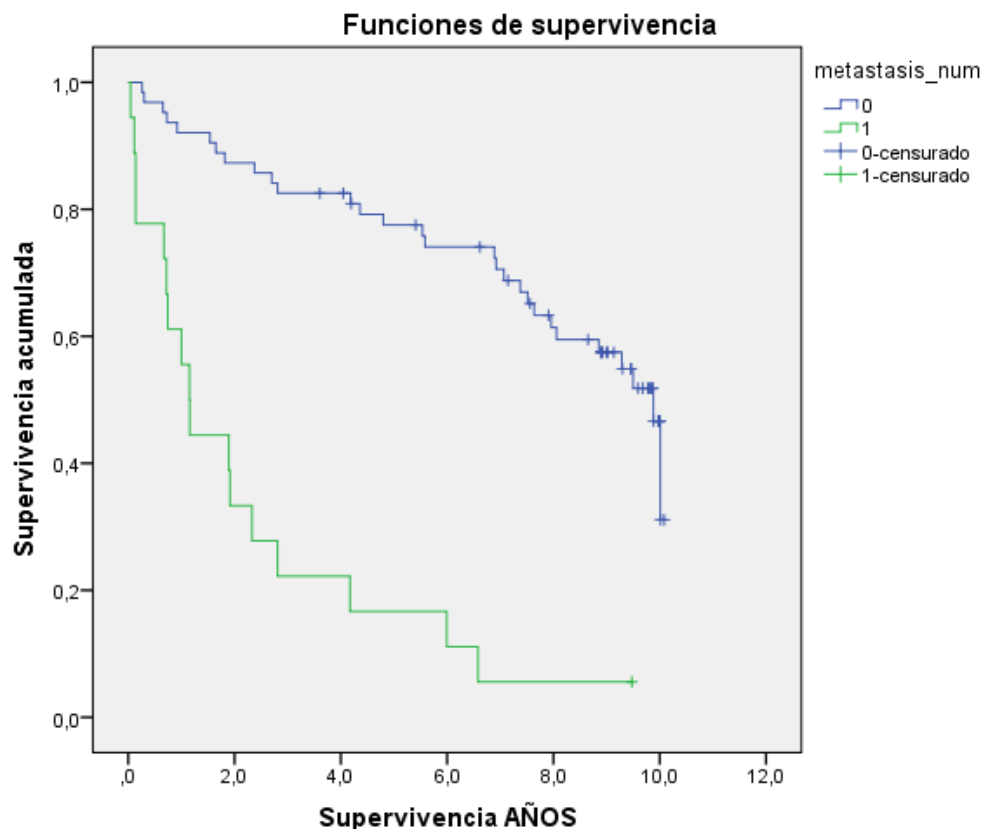


Figura 10. Supervivencia media vs metástasis

También se relacionó el estadio con la supervivencia teniendo en cuenta el estadio de Dukes modificado. Según la escala de Dukes los pacientes se dividieron así: el 14,2% B1, 28,6% B2, 8,4% B3, 4,8% C1, 19% C2, 3,6% C3 y 21,4% D. Los datos mostraron que la supervivencia es mayor en estadios más tempranos de la enfermedad colocándose en la zona superior de la gráfica todos los estadios B, mientras que estadios más avanzados de la enfermedad aparecen en la zona inferior de la grafica mostrando menor supervivencia a los diez años.

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	44,944	7	,000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	46,915	7	,000
Tarone-Ware	46,607	7	,000

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de DUKES modificado.

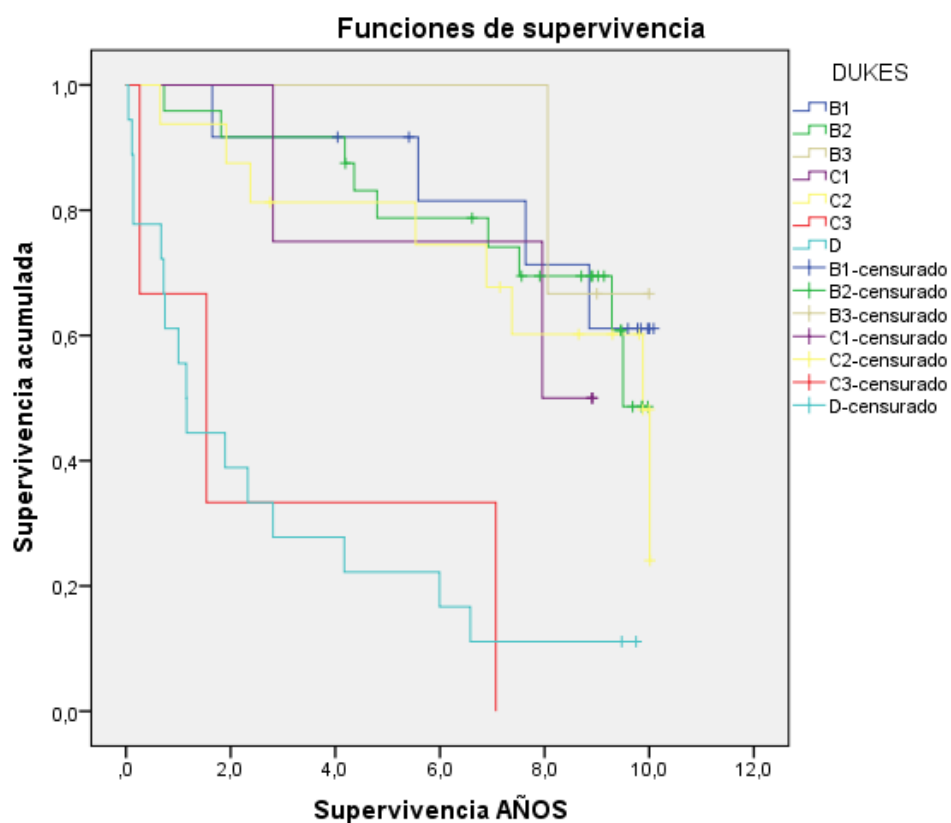


Figura 11. Supervivencia media vs estadio

Se analizó la supervivencia a 10 años con el sexo (69% hombres y 31% mujeres). La supervivencia media fue de 6,6 en el grupo de hombres y de 4,3 en el de las mujeres con una mortalidad de 48,27% de los hombres y un 80,08%,respectivamente.

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	9,619	1	,002
Breslow (Generalized Wilcoxon)	9,436	1	,002
Tarone-Ware	9,440	1	,002

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de sexo.

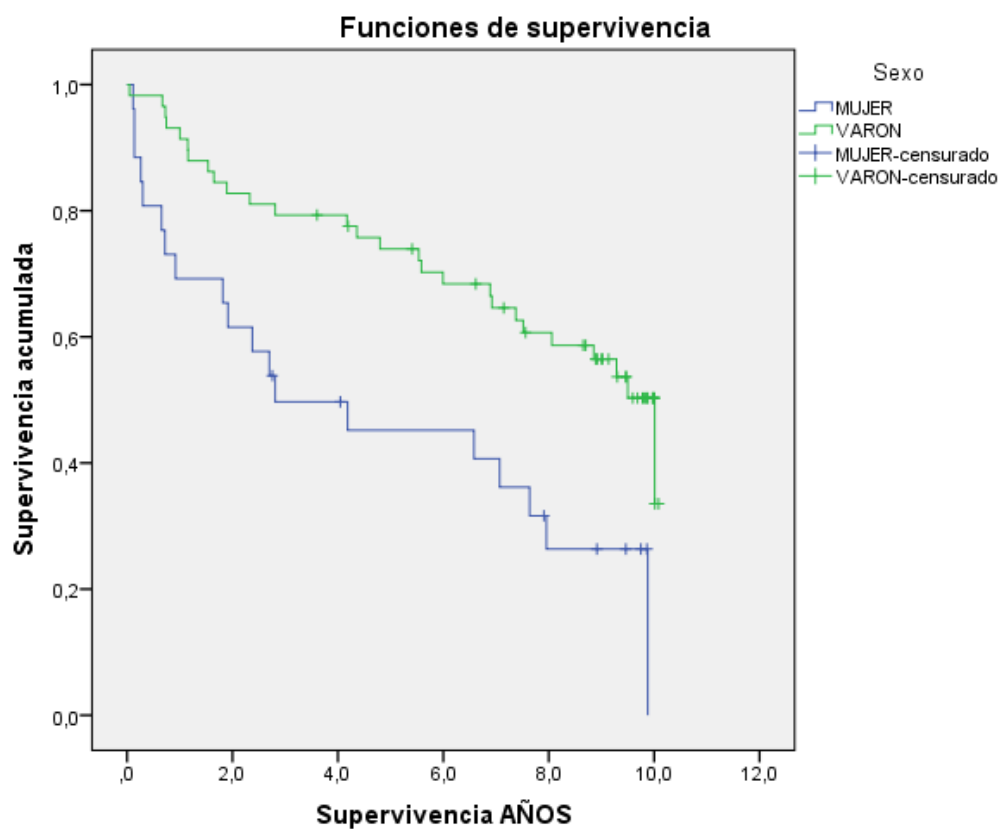


Figura 12. Supervivencia media vs sexo

Tras el análisis de las mutaciones el 1,19% (n=1) de los pacientes mostró mutaciones en el gen NRAS mientras que el restante 98,81% no poseían mutación alguna siendo considerados *wild type*. El paciente con mutación tenía una edad de 77 años y poseía un estadio de Dukes D. Además, presentaba diversas metástasis y su estadio TNM fue T3N2M1. El paciente recibió tratamiento con quimioterapia en 2003 por otra neoplasia. La supervivencia a 10 años que presentó fue de 0,7 años.

El paciente presentó una mutación en el codón 12 del exón 2. Esta mutación produjo un cambio de la base normal G a A trasformando el codón GGT en GAT. Por esta razón también se produjo un cambio en el aminoácido normal que codifica este codón glicina (Gly) a ácido aspártico (Asp).

TIPO	CODÓN	SECUENCIA	AMINOÁCIDOS
WT	61	CAA	Gln
WT	13	GGT	Gly
WT	12	GGT	Gly
MUT	12	GAT	Asp

Tabla 4. Secuencias de los resultados obtenidos

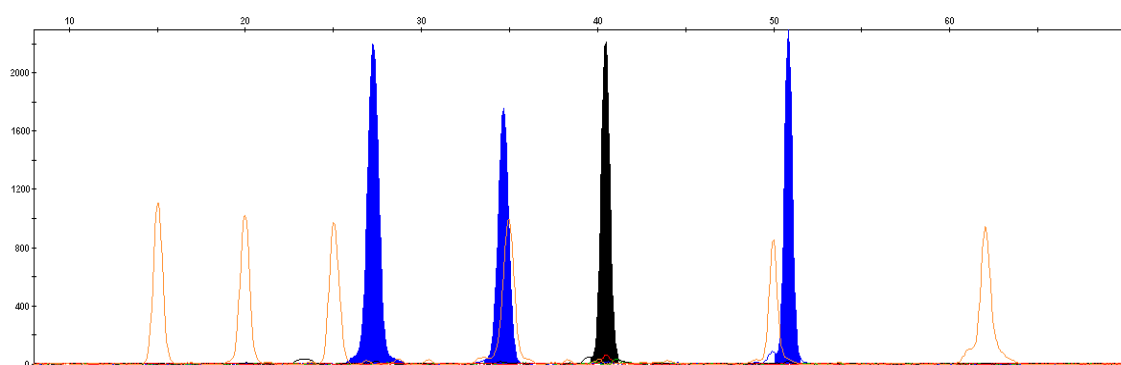


Figura 13. Paciente codón 12-13 wt

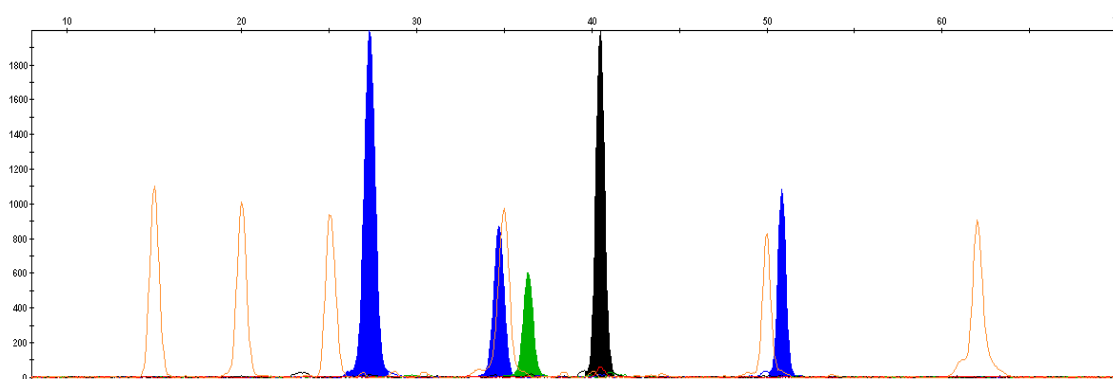


Figura 14. Paciente codón 12 mutado 13 wt

Discusión

Este estudio fue realizado para determinar la frecuencia de las mutaciones en el gen NRAS y su relación con el cáncer colorrectal y su respuesta al tratamiento. La vía de señalización del RAS desempeña un papel muy importante en el desarrollo de una serie de cánceres, como se

demuestra por el gran porcentaje de pacientes con cáncer colorrectal portadores de mutaciones en el KRAS (20). Además, la relación entre NRAS y cáncer colorrectal es clara ya que la mutación de este gen afecta en gran medida al tratamiento con anticuerpos monoclonales.

En este estudio la técnica de análisis de las mutaciones del gen NRAS llevada a cabo fue el *SNaPshot*, basada en la extensión de una sola base en el lugar de la mutación que gracias al diseño de sondas con diferentes tamaños después se pueden separar en un secuenciador automático.

Los hallazgos de este estudio demuestran que las mutaciones en el gen NRAS (1,19%) son poco frecuentes. Pero aun así su estudio es fundamental por la respuesta negativa que crean a la hora de elegir el tratamiento con anticuerpos monoclonales. Como se ha comentado, los anticuerpos monoclonales se unen al receptor EFGR. Las proteínas Ras actúan como intermediarios moleculares en diversas vías que estimulan la proliferación celular. Las proteínas Ras, que actúan en un punto posterior de la ruta, mutadas permanecen constantemente activadas por lo que el tratamiento con anticuerpos monoclonales no tendría efecto. Así lo han demostrado diversos estudios que han estudiado estas mutaciones y se recoge en las bases de datos genéticas (21, 22, 23).

El número de muestras utilizadas de pacientes con cáncer colorrectal nos permitió agruparlos en diferentes grupos con diferentes estadios y características de tratamiento para su posterior análisis de las mutaciones. Sin embargo, debido a la detección de un solo paciente mutado la relación clínica real que se podría establecer entre las mutaciones y estas variables no resultó estadísticamente significativa.

La activación de las proteínas Ras debido a mutaciones (codón 12, 13 y 61) está caracterizada extensamente como marcador de la progresión de células normales a tumorales. Las ‘oncoproteínas’ mutantes Ras tienen una actividad GTPasa reducida y se bloquean en un estado activado. Esta activación termina en una cascada de señales que altera las funciones celulares normales. A pesar de esto, la expresión de mutaciones específicas de la familia de genes RAS parece seguir una especificidad en células diferentes o que cumplen diferentes funciones. Sin embargo, las mutaciones en el gen KRAS son más frecuentes en el cáncer colorrectal mientras que las mutaciones del NRAS son más comunes en melanomas y leucemias donde aparecen en el 30% de los casos (24).

Las evidencias de ciertos estudios parecen demostrar que las mutaciones del NRAS en el cáncer colorrectal aparecen en estadios más avanzados que las del KRAS que aparecen en estadios tempranos. Además, un estudio reciente demuestra claras diferencias genotípicas entre modelos animales portadores de tumores con el NRAS o el KRAS alterados. El KRAS muestra una

habilidad para promover el crecimiento tumoral mientras que el NRAS es eficaz para suprimir la apoptosis en un tumor en crecimiento. Por esta razón, la actividad de las dos mutaciones podría ser sinérgica. Los últimos estudios han demostrado que las mutaciones en el KRAS pueden suceder en condiciones de poca disponibilidad de glucosa, como el exceso de glucosa requerido para el crecimiento de muchas células al mismo tiempo. Esto, hace sospechar que las mutaciones en el NRAS podrían ser fruto de un estado de estrés apoptótico crónico (25).

En conclusión, el estudio de las mutaciones realizado con el método de PCR múltiple y el análisis por *SNaPshot* demuestra que la frecuencia en las mutaciones del NRAS en los pacientes con cáncer colorrectal es baja. No obstante, se ha de mencionar que la mayoría de los pacientes incluidos en el estudio no presentaron metástasis, y la indicación del estudio molecular de los genes de la familia RAS para decidir la administración de un tratamiento con anticuerpos monoclonales es para los pacientes con cáncer colorrectal avanzado.

Para la clara dilucidación de los mecanismos que influyen en la expansión del tumor y en su mantenimiento debido a la función del oncogén NRAS y del resto de oncogenes de la familia RAS harían falta estudios complementarios.

Bibliografía.

1. ©2014, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research
2. Johnson, George "Unearthing Prehistoric Tumors, and Debate". The New York Times.
3. Hanne Meijers-Heijboer, M.D., Bert van Geel, M.D., Ph.D. et al. Breast Cancer after Prophylactic Bilateral Mastectomy in Women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation N Engl J Med 2001; 345:159-164 July 19, 2001
4. Roberto Jaramillo, Luis E. Bravo, Edwin Carrascal, et al. Expresión de receptores hormonales frente a indicadores pronósticos en carcinoma de mama.
5. Geyik, Igci, Pala, Suner, Borazan, Bozgeyik, et al. Investigation of the association between ATP2B4 and ATP5B genes with colorectal cancer. Gene. 2014 May 1;540(2):178-82
6. Stulík, Osterreicher J, Koupilová K, et al. Differential expression of the Ca²⁺ binding S100A6 protein in normal, preneoplastic and neoplastic colon mucosa. Eur J Cancer. 2000 May;36(8):1050-9
7. G F Barnard, M Mori, R J Staniunas, et al. Ubiquitin fusion proteins are overexpressed in colon cancer but not in gastric cancer. Division of Cellular and Molecular Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.
8. Lacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. Hum Mutat. 2003 Mar;21(3):271-6.
9. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. Eur J Cancer. 2002 May;38(7):867-71.
10. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N Engl J Med. 2013 Sep 12;369(11):1023-34.
11. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. J Natl Cancer Inst. 2013 Aug 7;105(15):1151-6.
12. Avalos Manuel R, Lanari Zubiaur Emilio, Servin Roxana E, et al. Leucemias con cromosoma philadelphia (ph+): el monitoreo citogenético a largo plazo y la aparición de resistencia al tratamiento.
13. Guoying Mu, MD, Han Liub, , Fang Zhou, MDc, et al. Correlation of overexpression of HMGA1 and HMGA2 with poor tumor differentiation, invasion, and proliferation associated with let-7 down-regulation in retinoblastomas. Human Pathology Volume 41, Issue 4, April 2010, Pages 493–502.
14. Viviana Matilde Mesa Cornejo, Patricio Barros Núñez, y Claudina Medina Lozano. Methylation of DNA: a marker for the diagnosis and prognosis in cancer. Gac. Méd. Méx v.142 n.1 México ene./feb. 2006

15. Edward H. Romond, M.D., Edith A. Perez, M.D., John Bryant, Ph.D, et all. Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1673-1684 October 20, 2005.
16. De Mattos-Arruda, Dienstmann R, Tabernero J. Development of molecular biomarkers in individualized treatment of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2011 Dec;10(4):279-89.
17. De Roock, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, et all. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010 Aug;11(8):753-62.
18. Davies BR, Logie A, McKay JS, Martin P, et all. AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol Cancer Ther*. 2007 Aug;6(8):2209-19.
19. Ya-Sian Chang, Kun-Tu Yeh, Nicholas C. Hsu, et all. Detection of N-, H-, and KRAS codons 12, 13, and 61 mutations with universal RAS *primer* multiplex PCR and N-, H-, and KRAS-specific *primer* extension. *Clinical Biochemistry* 43 (2010) 296–301.
20. J. Perea, M. Lomás y M. Hidalgo Bases moleculares del cáncer colorrectal: ¿Hacia un manejo individualizado? *REV ESP ENFERM DIG (Madrid)* Vol. 103. N.º 1, pp. 29-35, 2011
21. Cecily P. Vaughn, Scott D. ZoBell, Larissa V. Furtado, et all. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* Volume 50, Issue 5, pages 307–312, May 2011
22. Natsumi Irahara, PhD, Yoshifumi Baba, MD, PhD, Katsuhiko Nosho, MD, et all. NRAS Mutations Are Rare in Colorectal Cancer. *Diagn Mol Pathol*. Sep 2010; 19(3): 157–163.
23. D. Lambrechts, W. De Roock, H. Prenen, J. De Schutter, B. et all. The role of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations as markers of resistance to cetuximab in chemorefractory metastatic colorectal cancer *Journal of Clinical Oncology*, 2009 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 27, No 15S (May 20 Supplement), 2009: 4020.
24. Katarina Omholt, Anton Platz, Lena Kanter, Ulrik Ringborg, and Johan Hansson NRAS and BRAF Mutations Arise Early during Melanoma Pathogenesis and Are Preserved throughout Tumor Progression. *Clin Cancer Res* December 15, 2003 9; 6483.

25. Kevin M Haigis, Krystle R Kendall, Yufang Wang, et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature Genetics* 40, 600 - 608 (2008)