

ARTICULO ORIGINAL

Detección de mutaciones del Gen *KRAS* en pacientes paraguayos con cáncer colorrectal

Detection of *KRAS* Gene mutations in paraguayan patients with colorectal cancer

Torio, Hugo¹; Rodríguez, Ingrid^{2,6}; Molina, Hugo³; Romero, Blás Antonio⁶; Rojas, Antonieta⁴; Zárte, Ruth^{4,5}; Martínez, María Teresa⁵

¹Laboratorio Curie SRL, Área Biología Molecular. Asunción, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Médicas, Departamento de Patología. San Lorenzo, Paraguay.

³Instituto de Previsión Social, Hospital Central, Servicio de Cirugía General. Asunción, Paraguay.

⁴Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC). Asunción, Paraguay.

⁵Laboratorio Curie SRL. Asunción, Paraguay.

⁶Instituto de Previsión Social, Hospital Central, Servicio de Patología. Asunción, Paraguay.

Como referenciar este artículo | How to reference this article:

Torio H, Rodríguez IM, Molina H, Romero BA, Rojas A, Zárte R. Detección de mutaciones del Gen *KRAS* en pacientes paraguayos con cáncer colorrectal. *An. Fac. Cienc. Méd. (Asunción)*, 2021; 54(3): 33-40

RESUMEN

El estado mutacional del *KRAS* ha sido considerado como biomarcador para tratamientos biológicos tras varios ensayos clínicos realizados en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Reportes recientes indican que las frecuencias de mutación del gen *KRAS* en pacientes con CCR de Asia, Europa y Latinoamérica están entre el 24%, 36% y 40%, respectivamente. Paraguay no cuenta con este tipo de informes, a pesar de registrar anualmente en promedio 75 nuevos casos de pacientes diagnosticados con CCR sólo en el Servicio de Cirugía General del Hospital Central del Instituto de Previsión Social (IPS). El presente trabajo ha implementado este análisis de rutina, prerequisite obligatorio para la administración de fármacos basados en anticuerpos terapéuticos, y revelado una frecuencia de mutación del gen *KRAS* del 34% en pacientes paraguayos con CCR que acuden a los Servicios del Hospital Central del IPS.

Palabras Clave: gen *KRAS*. Frecuencia de Mutaciones. Cáncer colorrectal (CCR). Paraguay.

Autor correspondiente: Dr. Hugo Torio. Laboratorio Curie SRL, Área Biología Molecular. Asunción, Paraguay. E-mail: hftorio@yahoo.com

Fecha de recepción el 01 de Noviembre del 2021; aceptado el 29 de Noviembre del 2021.

ABSTRACT

The mutational status of the KRAS has been considered as a biomarker for biological treatments after several clinical trials carried out in patients with metastatic colorectal cancer. Recent reports indicate that the KRAS gene mutation frequencies in CRC patients from Asia, Europe, and Latin America are between 24%, 36%, and 40%, respectively. Paraguay does not have this kind of reports, despite registering an average of 75 new cases of patients diagnosed with CRC per year only in the General Surgery Service of the "Central Hospital - Instituto de Previsión Social (IPS)". The present work has implemented this routine analysis, a mandatory prerequisite for the administration of drugs based on therapeutic antibodies and revealed a KRAS gene mutation frequency of 34% in Paraguayan patients with CRC who attend the IPS Central Hospital Services.

Keywords: KRAS gene. Mutation frequencies. Colorectal Cancer (CRC). Paraguay.

INTRODUCCION

El cáncer colorrectal (CCR) constituye la tercera patología tumoral más común en hombres y la segunda en mujeres en los países occidentales. Junto con los tumores de mama y de pulmón son los que conllevan una mayor mortalidad en todo el mundo. En el Paraguay se tiene un registro de más de 4000 muertes de cáncer por año, de estos 350 corresponden a CCR, siendo la segunda causa de muerte en el país (1).

Actualmente los estudios por Secuenciación de próxima generación (NGS, *Next Generation Sequencing*) ha permitido conocer el panorama genómico del CCR. El programa de *Cancer Genome Atlas* (TCGA) para la investigación genómica del cáncer ha permitido la caracterización molecular del cáncer colorrectal. Las mutaciones más comunes del CCR son las mutaciones en APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) que constituyen el 30 a 70 % de los adenomas y del CCR esporádico. Fueron identificados además mutaciones en BRAF y TP-53. Cerca del 40 - 52 % de los casos de CCR están caracterizados por mutaciones en KRAS (2).

El gen KRAS localizado en el cromosoma 12, es un miembro de genes de la familia RAS asociado con tumores humanos. Es conocido también como el gen p-21 porque codifica para proteínas RAS de 21 kD (kilo Dalton). Juega un papel regulador importante en las vías de señalización de la traducción celular tales como

las vías: PI3K-AKT y RAS-RAF-MAPK, que participan en la proliferación celular (3).

La activación del KRAS se inicia después de la unión del ligando extracelular al EGFR (*epidermal growth factor receptor*) que a su vez activa a la proteína de unión al receptor del factor de crecimiento (*growth factor receptor-binding protein*, Grb-2) y al factor de conversión de nucleótidos de guanidina (*guanine nucleotide conversion factor*, GEFs) que inducen señales a la proteína KRAS activándose la cascada RAS-RAF-MAPK. Seguidamente el RAS-GTP en su estado activo es hidrolizado hacia RAS-GDP inactivo en las células sanas por acción de las proteínas activadoras de GTPasa (*GTPase-activating protein*, GAPs). En el caso de presentarse mutaciones en KRAS, la actividad GTPasa queda bloqueada y la proteína RAS permanece constitutivamente activada y unida al GTP. Dichas mutaciones suelen ocurrir con frecuencia en los codones 12 y 13 y, en mucho menor frecuencia en el codón 61 (4). Las mutaciones en el gen KRAS inducen proliferación y transformación celular descontrolada que promueven la metástasis, la angiogénesis, así como la resistencia a la quimioterapia y a las terapias por anticuerpos monoclonales (MoAb) (5,6) que reconocen el dominio extracelular del EGFR como el Cetuximab y el Panitumumab. La comprobación de que los pacientes que presentan estas mutaciones no responden a tales MoAb. ha

cambiado el enfoque de los oncólogos hacia el tratamiento de estos pacientes (7-9). Las directrices establecidas desde el año 2008 tanto por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO), como por la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) establecen la "obligatoriedad" de realizar el estado mutacional del proto-oncogén *KRAS* a todos los pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal antes de iniciar el tratamiento con terapias dirigidas. De este modo se evita también terapias costosas, prolongadas e ineficaces.

Con el presente trabajo, nuestro principal objetivo ha sido determinar la prevalencia de mutaciones en *KRAS* en una población de pacientes paraguayos diagnosticados con cáncer colorrectal. Además, implementar la técnica molecular de PCR en tiempo real como una técnica de rutina para la detección de mutaciones en *KRAS* y que estén disponibles tanto para pacientes provenientes del servicio público como privado, con el fin de ofrecer un tratamiento personalizado basado en la identificación de un biomarcador de respuesta a tratamientos con MoAb.

MATERIALES Y METODOS

El estudio realizado es de tipo observacional, descriptivo, de corte transversal. Los casos estudiados corresponden a pacientes operados en el Servicio de Cirugía y, diagnosticados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central del IPS, seleccionándose sólo los casos correspondientes a especímenes quirúrgicos, revisando los expedientes del sistema del archivo de los pacientes bajo autorización de la Dirección del Hospital Central del IPS, así como con el visto bueno del Comité de Bioética del Hospital. No se requirió consentimiento informado firmado ya que no hubo intervención de los pacientes, y la elaboración de las tablas con los datos clínicos fue realizada con claves numéricas para salvaguardar la identidad de cada paciente. El periodo de estudio fue de 5 años, desde enero de 2013 a diciembre 2018. Fueron excluidos los casos de los pacientes, cuyo material estaba mal fijado o hubiera mucha necrosis tumoral.

Los datos clínicos extraídos del sistema y del informe de patología de cada caso fueron: edad, sexo y localización del tumor.

Las muestras seleccionadas correspondieron a tejido tumoral fijadas en formol neutro-tamponado o bien fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina. En total se analizaron 100 especímenes de pacientes de ambos sexos con diagnóstico de CCR.

Las láminas histológicas de cada caso fueron revisadas por dos patólogos quienes escogieron las que presentaban mayor material tumoral. Otra característica tomada en cuenta fue la del estado de fijación y la celularidad tumoral. De cada bloque seleccionado, se realizó una disección de 5 µm de espesor, que fue teñida con hematoxilina y eosina para verificación del tejido tumoral, el cual fue marcado con rotulador para distinguirlo del tejido normal a la hora de cortar los bloques para la extracción del ADN.

Extracción de ADN

Para el aislamiento de ADN fueron disecados 2 secciones de tejido (c/u de 50 µm de espesor) y colocados en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Luego de ser desparafinados usando aceite mineral se extrajo el ADN utilizando el *kit ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System* (PROMEGA, Madison, WI, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. En todos los casos el ADN fue eluido con 30 µl del buffer de elución. La cuantificación del mismo se realizó por fluorometría, utilizando el fluorómetro *Quantus™* (PROMEGA, Madison, WI, USA) utilizando el *kit QuantiFluor® ONE dsDNA*.

PCR. Para el análisis de mutaciones somáticas en el gen *KRAS*, fragmentos del exón 2 (codones 12 y 13), exón 3 (codones 59 y 61) y exón 4 (codones 117 y 146) fueron amplificados en una PCR múltiple con cebadores biotinilados específicos, utilizando para ello el *kit KRAS RDB 2296X* (GenID® GmbH, Straßberg, Germany) de acuerdo con el protocolo del fabricante, con excepción del termociclador, el Rotor- *Gene® Q 5plex HRM* (QIAGEN, Hilden, Germany). Para alcanzar los requerimientos óptimos recomendados por el fabricante del kit, el

programa de termociclado fue modificado y validado como sigue: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 10 ciclos de pre-amplificación con 2 temperaturas (95°C por 32 seg y 60°C por 33 seg), más 26-30 ciclos de amplificación (dependiendo de la concentración inicial de ADN molde) con 3 temperaturas (95°C por 27 seg, 55°C por 32 seg y 72°C por 27 seg) y una extensión final de 72°C por 8 min.

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

RESULTADOS

La selección de los especímenes tumorales en base al estado de fijación del tejido, el área de la selección tumoral, los números de cortes a ser procesados han contribuido a una óptima concentración del ADN extraído para el estudio molecular. Las concentraciones variaron

entre 1.7 ng/ul a 38 ng/ul, siendo necesario únicamente 10 ng totales para realizar la PCR (dato no mostrado).

La técnica empleada tanto en la extracción como en el análisis de las mutaciones son de fácil implementación en los laboratorios de Biología Molecular siempre y cuando se sigan las pautas marcadas para todo el proceso.

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

Algunas de las variables clínicas recogidas en esta población como: edad, sexo y localización del tumor en relación tanto a la presencia como ausencia de mutación KRAS (silvestre), se representan en la Figura 1. La mayoría de los casos mutados fueron en pacientes masculinos > 40 años (90%). La distribución según el género: 58,82% de sexo masculino y el 41,18% femenino.

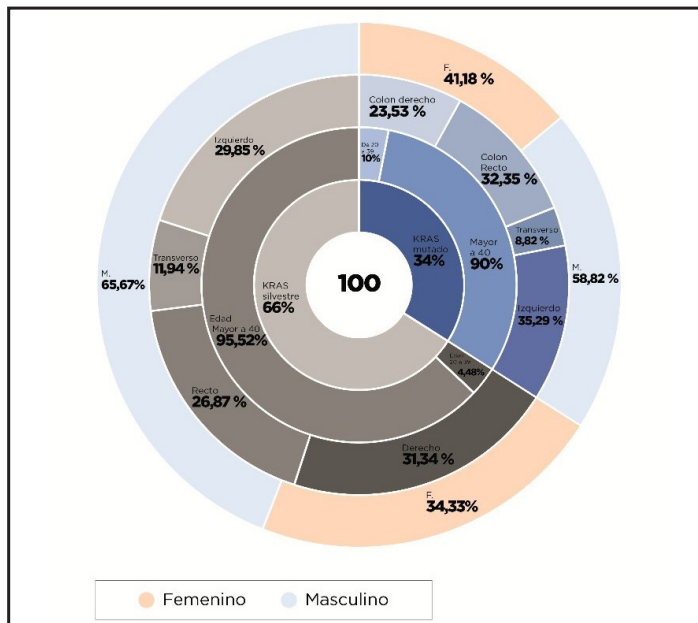


Figura 1. Distribución de pacientes con KRAS mutado y KRAS silvestre según género y rango etario.

Según la localización anatómica del tumor, en nuestra serie obtuvimos 29 casos correspondientes al colon derecho, 10 al colon transverso, 32 al colon izquierdo y 29 casos al colon sigmoides y recto. Por otro lado, considerando el estado mutacional del gen KRAS, el mayor porcentaje de mutados (61%)

se observó en la suma de casos de colon izquierdo, sigmoides y recto. En contraste, las localizaciones en el colon transverso (70%) y en el colon derecho (72,4%) presentaron mayoritariamente el gen silvestre (*KRAS no-mutado*). Figura 2.

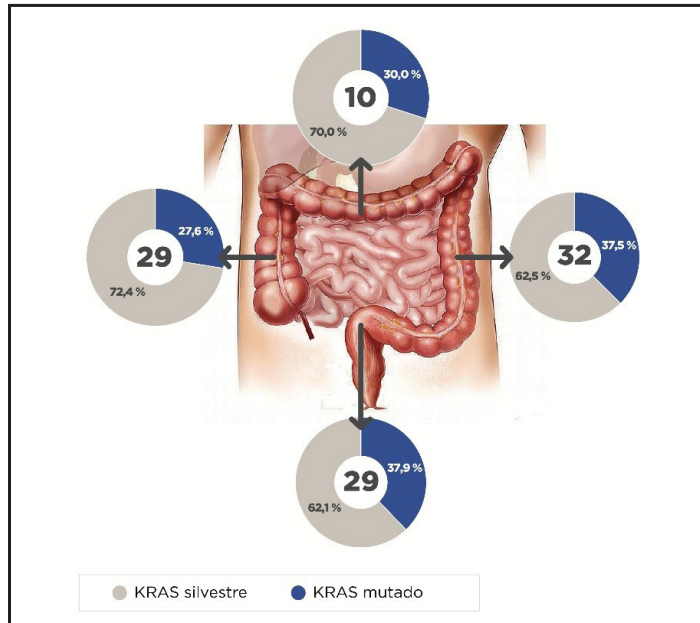


Figura 2. Distribución de pacientes con *KRAS* mutado y *KRAS* silvestre según la localización del tumor.

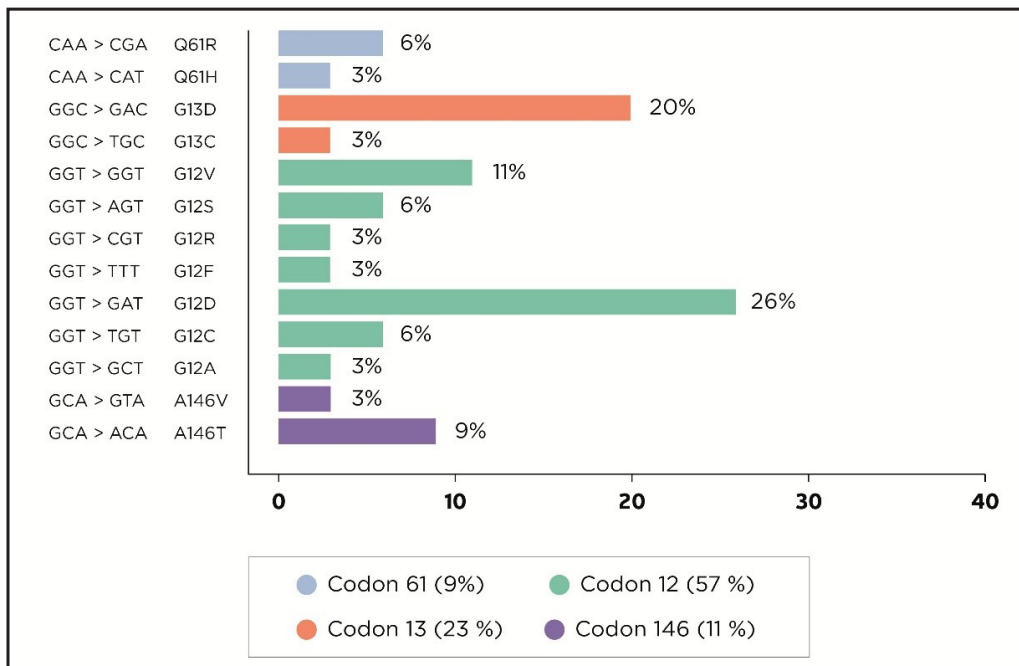


Figura 3. Frecuencia de mutaciones específicas de los codones analizados de *KRAS* en la población de estudio.

DISCUSION

En el presente estudio se analizan 100 muestras de pacientes con CCR del Servicio de Patología del Hospital Central de IPS, de Asunción-Paraguay, con un promedio anual considerable de nuevos casos.

El análisis del estudio en relación con los datos clínicos como edad, sexo y localización del tumor primario, fueron muy similares a los datos actuales presentes en la literatura (9). Así, en nuestro estudio la mayoría de los casos con mutación del gen *KRAS* fue observado en pacientes con más de 40 años, más frecuentemente en los de sexo masculino y con mayor prevalencia en los tumores primarios de localización en el colon izquierdo, sigmoides o recto.

A pesar de que no se ha realizado un análisis de supervivencia en los casos analizados y el estatus del *KRAS*, es importante recalcar que los pacientes que presentan alguna mutación del gen *KRAS* tienen una menor supervivencia en comparación con aquellos que no poseen mutación alguna (4). Además, se ha reportado que las mutaciones localizadas en el codón 12 se comportan de manera más agresiva (10). En nuestro estudio pudimos determinar no sólo el codón mutado sino la mutación específica que se da en cada codón por lo que datos como este son determinantes a la hora no sólo de escoger tratamiento sino de anticiparse a la agresividad del tumor.

Inicialmente era mandatorio analizar los codones 12 y 13 en los tumores de pacientes con CCRm candidatos a recibir terapias biológicas (Cetuximab o Panitumumab). Posteriormente se sumaron otros codones (61, 117 y 146) ya que se vio que los mismos podrían ser los responsables de la falta de respuesta a los MoAb (sobre todo Panitumumab) (11).

Si bien ha sido publicado previamente otro trabajo similar, con pacientes paraguayos pero realizado en el extranjero (1), el presente estudio abarca un considerable número de casos y se ha llevado a cabo en su totalidad

en nuestro país, con la colaboración de profesionales exclusivamente nacionales. Este hecho constituye un hito en el tema.

La necesidad imperiosa de determinar el estado mutacional del gen *KRAS* en pacientes con CCR, radica en el direccionamiento del tratamiento más adecuado, evitando así además gastos innecesarios y pérdida de tiempo.

CONCLUSION

Teniendo en cuenta que sólo el Servicio de Cirugía General del Hospital Central del IPS registra anualmente en promedio 75 nuevos casos de pacientes diagnosticados con CCR, cifra que va en aumento ya que en el 2017 el mismo Servicio ha registrado 113 nuevos casos, es importante contar con este tipo de análisis para mejorar el manejo terapéutico y la expectativa de vida de los pacientes.

El presente trabajo ha revelado, por primera vez en el país, una frecuencia de una mutación en un gen considerado biomarcador de alto impacto para habilitar o no el tratamiento personalizado a un paciente CCR metastásico. La frecuencia obtenida en nuestra población está en concordancia a lo esperado según reportes recientes.

Además, hemos podido establecer el análisis del estado mutacional del *KRAS* como rutina siendo pioneros en ello, poniendo a disposición para todos los pacientes diagnosticados con CCRm provenientes de instituciones sanitarias públicas o privadas del país.

Otro aporte importante ha sido la conformación de un equipo de trabajo multidisciplinario e interinstitucional que permite la continuidad del estudio para otros genes implicados en la vía de señalización del *EGFR* como *NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*.

Contribución de los autores:

- Dr. Hugo Torio: Extracción, purificación y cuantificación del ADN proveniente de las áreas neoplásicas de muestras de tejidos parafinados. Detección de mutaciones del gen KRAS. Interpretación de resultados. Contribución en la elaboración del artículo.
- Dr. Hugo Molina: Selección de pacientes, recolección de muestras obtenidas quirúrgicamente.
- Dra. Teresa Filártiga: Coordinación y Organización de todas las etapas del proyecto. Contribución en la elaboración del artículo.
- Dra. Ingrid Rodríguez: búsqueda y selección de los casos. Selección de las áreas neoplásicas para la extracción del ADN. Elaboración de las tablas para los datos clínicos. Contribución en la elaboración del artículo.
- Dra. Antonieta Rojas de Arias: Asesoría y supervisión científica en la fase inicial del proyecto.
- Dr. Blás Romero: contribución para la selección de las áreas neoplásicas para la extracción del ADN. Contribución en la elaboración de las tablas para los datos clínicos.
- Dra. Ruth Zárate: Contribución en la elaboración, revisión y edición del artículo.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés, en relación a este artículo.

Fuente de Financiación: El proyecto fue financiado por el CONACYT a través del programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia e Investigación – FEEI del FONACIDE.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Fleitas-Kanonnikoff T, Martínez-Ciarpaglini C, Ayala J, Gauna C, Denis R, Yoffe I, Sforza S, Martínez MT, Pomata A, Cervantes A. Molecular profile in Paraguayan colorectal cancer patients, towards to a precision medicine strategy. *Cancer Med.* 2019 Jun;8(6):3120-3130. doi: 10.1002/cam4.2191. Epub 2019 May 6. PMID: 31059199; PMCID: PMC6558499.
2. Meng M, Zhong K, Jiang T, Liu Z, Kwan HY, Su T. The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2021. Aug;140:111717. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111717.
3. Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J. EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Adv Clin Chem.* 2010;51:71-119. doi: 10.1016/s0065-2423(10)51004-7. PMID: 20857619.
4. Di Fiore F, Sesbouë R, Michel P, Sabourin JC, Frebourg T. Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2010;103(12):1765– 1772.
5. Kruser TJ, Wheeler DL. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res* 2010;316:1083–100.
6. Sullivan KM, Kozuch PS. Impact of KRAS Mutations on Management of Colorectal Carcinoma. *Patholog Res Int.* 2011 Mar 15;2011:219309. doi: 10.4061/2011/219309. PMID: 21437184; PMCID: PMC3062096.
7. Baynes RD1, Gansert J. KRAS mutational status as a predictor of epidermal growth factor receptor inhibitor efficacy in colorectal cancer. *Am J Ther.* 2009 Nov-Dec; 16 (6):554-61.
8. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Oct 7;101(19):1308-24.
9. Serebriiskii IG, Connelly C., Frampton, G. et al. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nat Commun* 10, 3722 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11530-0>.
10. He K, Wang Y, Zhong Y, Pan X, Si L, Lu J. KRAS Codon 12 Mutation is Associated with More Aggressive Invasiveness in Synchronous Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): Retrospective Research. *Onco Targets Ther.* 2020; 13: 12601-12613 <https://doi.org/10.2147/OTT.S279312>.
11. T. André, H. Blons, M. Mabro, B. Chibaudel, J-B. Bachet, C. Tournigand, M. Bennamoun, P. Artru,

S. Nguyen, C. Ebenezer, N. Aissat, A. Cayre, F. Penault-Llorca, P. Laurent-Puig, A. de Gramont. Panitumumab combined with irinotecan for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy: a GERCOR efficacy, tolerance, and translational molecular study. *Annals of oncology*. Volumen 24, Número 24. 2013, páginas 412-419.