

República Dominicana
Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina
Instituto de Oncología Dr. Heriberto Pieter
Residencia de Oncología Clínica

ANALISIS MUTACIONAL DEL ONCOGEN KIRSTEN SARCOMA RAT VIRUS (K-RAS) EN PACIENTES CON CANCER COLORRECTAL EL INSTITUTO DE ONCOLOGÍA DR. HERIBERTO PIETER (IOHP) EN EL PERIODO DE ENERO 2014- DICIEMBRE 2016.



Tesis de pos grado para optar por el título de especialista:

ONCOLOGÍA CLINICA

Sustentantes:

Dra. Jazmín Camacho Vílchez

Asesor de Contenido:

Dr. Luís Homero Matos

Asesora Metodológica:

Dra. Claridania Rodríguez

Los conceptos emitidos en la presente de tesis de pos grado son de la exclusiva responsabilidad de la sustentante dela misma.

Santo Domingo, 2019

CONTENIDO

I. Introducción	1
I.1. Antecedentes	3
I.2. Justificación	6
II. Planteamiento del problema	7
III. Objetivos	9
III.1. General	9
III.2. Específicos	9
IV. MARCO TEÓRICO	
IV.1. Concepto de cáncer	10
IV.2. Desarrollo del Cáncer	10
IV.3. Proto-oncogenes y Genes Supresores de Tumores.	11
IV.4. Oncogenes	11
IV.5. Genes supresores de tumores	12
IV.5.1. Gen tp53 en la Oncogénesis.	12
IV.5.2. P53 y Mutaciones	14
IV.5.3. P53 y Control del Ciclo Celular.	14
IV.5.4. Proteína p53 y reparación.	15
IV.6. Familia Ras	15
IV.7. Gen RAS	17
IV.8. Bioquímica del RAS	17
IV.9. Estructura de RAS	18
IV.10. El EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	19
IV.11. Definición del EGFR	19
IV.12. Ligandos Del EGFR y transducción de señales	20
IV.13. El Biomarcador	20
IV.14. Biomarcadores RAS	21
IV.15. El oncogén K-ras (Kirsten Rat Sarcoma Viral Homologue u oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata)	21
IV.16. Mutaciones Kras en Cánceres humanos	22
IV.17. Cuestiones clave planteadas por la activación mutacional	23

de <i>RAS</i> oncogenes en tumores humanos	
IV.18. Prevalencia de las mutaciones en KRAS.	24
IV.19. Técnicas de detección Kras.	24
IV.20. Secuenciación directa.	25
IV.21. Cribado de mutantes por PCR.	25
IV.22. PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	26
IV.23. Análisis de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	27
IV.24. Hibridación en fase reversa	27
IV.25. PCR cuantitativa	28
IV.26. El análisis de “melting” o HRM (High Resolution Melting)	28
IV.27. Kit de mutaciones del gen KRAS de TheraScreen	28
IV.28. Recomendaciones para la detección de kras	29
IV.29. Detección de Mutaciones del Gen KRAS	30
IV.30. KRAS y el Cáncer Colorrectal	31
IV.31. Cáncer de pulmón y KRAS.	35
IV.32. Cáncer de páncreas y KRAS	36
IV.33. Mutaciones en los genes K-ras cáncer de cuello uterino	37
IV.34. Tratamientos se utilizan tras conocer el tipo de RAS.	38
V. Operacionalización de las variables	39
VI.3. MATERIAL Y MÉTODOS	41
VI.1. Tipo de estudio	41
VI.2. Área del estudio	41
VI.3. Universo.	41
VI.4. Muestra	41
VI.5. Criterios de inclusión	42
VI.6. Criterios de exclusión	42
VI.7. Instrumentos de recolección de los datos	42
VI.8. Procedimiento.	42
VI.9. Tabulación.	42
IV.9. Tabulación.	42
IV.10. Análisis.	43

IV.11. Aspectos éticos.	43
VII. Resultados	44
VIII. Discusión	48
IX. Conclusiones	49
X. Recomendaciones	50
XI. Referencias	51
XII. Anexos.	57
XII.1. Cronograma	57
XII.2. Instrumento de recolección de datos.	58
XII.3. Costos y recursos	59

RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo, para determinar el Análisis Mutacional del Oncogen Kirsten Sarcoma Rat Virus (K-ras) en los pacientes con diagnóstico de cáncer Colorrectal en el Instituto de Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014- diciembre 2016. El 57.3 por ciento de los pacientes eran de sexo masculino, El 30.1 por ciento de los pacientes tenían una edad entre 60 a 69 años, El 51.6 por ciento de los pacientes en los resultados de KRAS fue no mutado WT, El 57.1 por ciento de los pacientes en los resultados de NRAS fue no mutado WT.

Palabras clave: análisis, mutacional, kirsten, sarcoma rat virus (k-ras).

ABSTRACT

A descriptive study was carried out to determine the Mutational Analysis of Kirsten Sarcoma Rat Virus (K-ras) at the Institute of Oncology Dr. Heriberto Pieter (IOHP) in the period of January 2014- December 2016. 57.3 percent of patients were male, 30.1 percent of patients were aged between 60 to 69 years, 51.6 percent of patients in KRAS results were non-mutated WT, 57.1 percent of patients in NRAS results It was not mutated WT.

Key words: analysis, mutational, kirsten, sarcoma rat virus (k-ras).

I. INTRODUCCIÓN

KRAS /KRAS es el oncogén transformador mutado más frecuentemente en los tumores del páncreas, colon y recto y, cósmico de hecho, KRAS mutaciones se producen en el 22 por ciento de todos los tumores analizados (el más alto entre RAS isoformas), mientras que HRAS y NRAS mutaciones son menos frecuentes (3 por ciento y 8 por ciento, respectivamente). KRAS se identificó originalmente en virus del sarcoma de Kirsten (Ki-SV) de ADN.¹

Fue nombrado *kis*, aunque el viral *Kras* (*v-Kras*) fue nombrado primero *Kirsten ras*; su producto se identificó como una proteína de 21 kDa (p21) con actividad de unión a nucleótidos de células transformadas con Ki-SV. La antigenicidad de proteínas compartida con el p21 viral *Hras* oncogén (*v-Hras*), un producto del virus del sarcoma de Harvey (Ha-SV).¹

Virus del sarcoma de Harvey y Kirsten se aislaron como los retrovirus del sarcoma que inducen durante el subcultivo del virus de la leucemia murina (MLV) en ratas. Los genes de transformación se cree que se deriva del genoma de rata, mientras que un sensible a la temperatura (*ts*) Ki-SV se informó para la transformación.²

Las secuencias de ARN viral, se mostró a compartir homología con virus de la leucemia de rata (RaLV) RNA. Posteriormente, se encontró una secuencia de ARN similar a retrovirus genoma de la rata (VL30) a ser incorporados en partículas RaLV. Sin embargo, no hubo evidencia de cualquiera de amplificación de genes o la presencia de secuencias adicionales en VL30 a partir de ADN tumoral de rata.³

Por lo tanto, virales *ras* oncogenes no pudieron ser identificados hasta que estos ADNs genómicos virales, fueron clonados y secuenciados en 1981-1982. Durante el mismo año, el ortólogo de ratón (*bas*) de *v-Hras* fue identificado en BALB-murino virus del sarcoma (MSV) (BALB-MSV), que había sido aislado a partir de un ratón BALB / c hemangioendotelioma-sarcoma.⁴

Mientras tanto, se iniciaron estudios de genes transformadores humanos usando un método completamente diferente: la transfección de ADN.

En 1972, se informó de la actividad de transformación en fragmentos de ADN celulares transferidos a otras células. El ADN se había extraído a partir de células de hámster transformadas por el *ts* mutante del virus del sarcoma de Rous (RSV).⁵

Este método se aplicó con éxito en el laboratorio de Weinberg, seguido de Cooper de, Wigler de, y los laboratorios de Barbacid, para ratón y fragmentos de ADN de células cancerosas humanas que transformó “normal” ratón NIH3T3.⁵

La identificación de Ras surgió durante el amplio estudio de transformar de forma aguda retrovirus aisladas de ratones, ratas, gatos, monos, pollos y pavos. Estos virus oncogénicos causan una rápida formación de sarcomas en animales infectados y se transforman potentemente las células en cultivo.

Los descubrimientos del virus del sarcoma murino de Harvey potencialmente oncogénico en 1964 y el virus del sarcoma murino de Kirsten en 1967 proporcionan las primeras vistas de elementos genéticos oncogénicos que muchos años después se establecieron como el ser humano que comprende *HRAS* y *KRAS* oncogenes, respectivamente.⁶

A pesar del reconocimiento de la potencia altamente oncogénico de los retrovirus de transformación aguda, la constatación de que los cánceres humanos no son iniciadas por dichos agentes infecciosos humedecido entusiasmo por el estudio de ellos como la base del desarrollo del cáncer humano. En lugar de ello, una nueva dirección surgió de la constatación de que el ADN eucariótico biológicamente activo podría ser transferido en células de mamífero por transfección, después de la precipitación del ADN utilizando fosfato de calcio.⁶

Una clave fundamental para el éxito de estos experimentos en la demostración de propiedades si el ADN transfectado había transformación fue el uso de fibroblastos NIH / 3T3 de ratón como las células receptoras.⁶

Aunque inmortalizada, / 3T3 NIH, sin embargo, retienen algunas de las propiedades normales de crecimiento (inhibición del crecimiento dependiente de la densidad, alta dependencia de factores de crecimiento del suero), y fracasaron para propagar cuando se le priva de sustrato (por ejemplo, no formar colonias en agar blando) o para forman tumores cuando se inocularon en ratones inmunocomprometidos.⁷

Sin embargo, estas células hicieron pantalla de alta sensibilidad a la “formación de focos” retrovirus inducida, tales células que morfológicamente alterados que ya no estaban en contacto inhibido crecieron tan fácilmente visualizados focos de células transformadas sobre el fondo monocapa de células “normales” no transfectadas.⁷

La capacidad de las células NIH / 3T3 para ser morfológicamente y el crecimiento transformadas por un único oncogén viral proporciona un ensayo biológico un hit-sensible para los oncogenes activados que fueron especula que estar presente en el ADN obtenido a partir de tumor, pero no de las células normales. Por lo tanto, células NIH / 3T3 (también denominados como NIH 3T3 o NIH3T3) haber sido el modelo de cultivo celular caballo de batalla de largo plazo para estos estudios, y fueron fundamentales en la caracterización de *RAS* y muchos otros oncogenes.⁷

Con los avances en la tecnología de secuenciación, se ha hecho factible adoptar un enfoque imparcial para comenzar a establecer la complejidad genética completa del genoma de las células cancerosas.⁸

Con la secuenciación del genoma de los cánceres de mama y de colon, cáncer pancreático y glioblastoma, una imagen ha surgido mostrando que los cánceres surgen a través de una combinación de la mutación frecuente de un pequeño conjunto común de genes (montañas) y la infrecuente la mutación de muchos otros genes (colinas) específicas para los distintos tipos de cáncer.⁸

Aunque el genoma de la célula de cáncer alberga muchas mutaciones genéticas, la gran mayoría de estos son mutaciones de pasajeros que no sirven un papel causal, mientras que aproximadamente el 15-20 mutaciones del conductor contribuyen a la progresión del cáncer. Un hallazgo clave que ha surgido a partir de estos estudios, en particular para los de colon y el cáncer de páncreas, es que las mutaciones en *KRAS* son las montañas más grandes de oncogenes en estos dos cánceres mortales.⁹

I.1. Antecedentes.

García, Dabeiba, Adriana *et al* (2009)¹⁰, realizaron un estudio en el cual su objetivo se identificó el virus de papiloma humano (VPH) genérico y específico en

el ADN libre de plasma y de cepillado cervical de pacientes con cáncer cervical invasivo y con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) III además de evaluar alteraciones genéticas, como mutaciones en los genes H-ras, K-ras y EGFR y según la metodología, para ello se detectó el VPH genérico mediante PCR con los iniciadores GP5+/GP6+, y específico para VPH 16 y 18 en la región E6/E7.

Para detectar las mutaciones en el codón 12 de H-ras, codones 12 y 13 de K-Ras y el exón 21 de EGFR se realizó mediante secuenciación directa de los productos de PCR de estos fragmentos génicos, obteniendo un resultado de una buena correlación entre las muestras de plasma sanguíneo y los cepillados cervicales, tanto para los hallazgos de VPH $p=0.0374$ como para las mutaciones evaluadas $p=0$. En general, para EGFR en el exón 21 no se encontraron mutaciones, al igual que para los codones 12 y 13 en K-ras y codón 12 en H-ras en conclusión el uso del ADN presente en el plasma puede ser relevante para el análisis de mutaciones y de la presencia de marcadores tumorales cuando no se dispone de otras muestras.

Roa, Iván *et al* (2013)¹¹ incluyeron un estudio de muestras de 109 adenocarcinomas primarios en estadios incipientes, avanzados y metástasis de adenocarcinomas de colon y recto. A las muestras provenientes de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (a las cuales) se les realizó estudio de mutación del gen KRAS en el Servicio de Anatomía Patológica de Clínica Alemana de Santiago entre los años 2008 y 2012 y en el Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas CEMIC, Argentina, en el año 2008. El grupo total estaba constituido por 109 casos, (51,3 por ciento) correspondieron a mujeres con un promedio de edad de 60,1 años ($DS \pm 13,7$ años) y los restantes 53 casos a hombres con un promedio de edad de 61,5 años ($DS \pm 10,7$ años). La totalidad de los casos correspondieron a adenocarcinomas. Los tumores primarios se localizaron en colon en 82 casos (75,2 por ciento) y en recto en 24 casos (22 por ciento). No se logró precisar la localización del tumor en 3 casos (2,8 por ciento). En 46 casos (42,2 por ciento), se demostró mutación del gen KRAS, los 63 casos restantes fueron de tipo silvestre o no mutado. Las mutaciones comprometieron al codón 12 en 37 casos (80,4 por ciento) y al codón 13 en 9 casos (19,6 por ciento).

No se observaron diferencias entre la frecuencia de mutaciones de KRAS y el género e los pacientes. La mayor frecuencia de mutaciones se observó entre los 40 y 49 años (64,2 por ciento de los casos examinados), sin embargo, la diferencia en la frecuencia de mutaciones entre los mayores y menores de 50 años no fue significativa ($p = 0,06$).

Aguirre Anda, J.J. *et al* (2012)¹² realizaron una revisión de la evolución clínica de los pacientes diagnosticados de CCRm en los que se determinó la mutación de KRAS. El ADN se obtuvo tras la macro disección de bloques de parafina del tumor primario previa selección del área tumoral por un patólogo según su resultado se incluyeron en el estudio 53 pacientes (36 hombres y 17 mujeres) diagnosticados de CCRm, con edades comprendidas entre los 24 y los 82 años, el 42 por ciento de esos pacientes presentaron la mutación positiva, 58 por ciento KRAS nativo. De las mutaciones detectadas, 20 correspondían al codón 12 y 2 al codón 13 del exón 2. La mediana de supervivencia de los pacientes tratados con cetuximab fue de 55 semanas (IC95 por ciento 22-88) frente a las 93 semanas (IC95 por ciento 79-107) de los pacientes sometidos a otros tratamientos ($p=0,036$). Estos resultados resultaron consistentes tras repetir la determinación de la mutación del gen KRAS en los pacientes tratados con cetuximab. Uno de estos pacientes presentó mutación para el BRAF. Este estudio, todavía abierto, nos ha permitido tomar conciencia de las implicaciones de nuestros diagnósticos, el método utilizado ha resultado sensible y específico para la determinación de la mutación del KRAS.

Romero, Adriana *et al* (2016)¹³, determinaron un estudio con el objetivo de describir características de la expresión del oncogén K-ras en pacientes con cáncer colorectal (CCR) que acudieron a consulta de Gastroenterología del Hospital Universitario de Caracas en el período enero-julio 2014. Realizaron un estudio de corte transversal, descriptivo y prospectivo.

La población de estudio estuvo conformada por pacientes con diagnóstico de CCR por colonoscopia e histología con evaluación molecular del K-ras. Los Resultados de 35 pacientes 57,14 por ciento fueron del sexo masculino y 42,86 por ciento del femenino con edad media de 57 ± 17 años; el 100 por ciento de la muestra por

histología correspondió a ADC predominando el tipo moderadamente diferenciado 40 por ciento, el 80 por ciento no presentó mutación del K-ras mientras que el 20 por ciento sí, de los cuales el 85,71 por ciento reportó mutación en el codón 12 y 1 en el 13, el 14.28 por ciento; en 57,14 por ciento, la mutación estuvo en el colon izquierdo en conclusión la mutación del K-ras predomina en el sexo masculino con edad media de 57 años estando presente en 20 por ciento de la población; la mutación en el codón 12 es más frecuente asociada al colon izquierdo y el CCR más común es el ADC bien diferenciado.

I.1.2. Justificación.

Los estudios sobre los oncogenes implicados en la carcinogénesis del CCR, durante los últimos 20 años han mostrado resultados en relación a la supervivencia a corto plazo.

La detección de las anomalías genéticas en CCR en pieza tumoral también puede llegar a ser una herramienta útil para determinar su pronóstico y predecir la evolución del mismo. El estudio además presenta una sistematización en el protocolo y en el seguimiento que pretende una pauta de actuación homogénea, intentando mostrar un nivel de calidad óptimo para su análisis final.

Ha sido realizado de manera estricta para cumplir unos criterios de calidad para poder conseguir los máximos datos posibles, y cerrando cada caso con el evento final.

En las últimas tres décadas, los estudios han indicado que el *KRAS* tiene un papel clave en la regulación del crecimiento celular. En el caso del CCR metastásico, el EGFR transmite señales mediante un grupo de proteínas intracelulares; una vez alcanzado el núcleo, las señales instruyen a las células cancerígenas para que se reproduzcan y metastaticen, favoreciendo la progresión del cáncer. El objetivo de las terapias anticuerpos anti-EGFR es inhibir la activación de este factor; sin embargo, en pacientes con un gen *KRAS* mutado, la proteína *KRAS* siempre está activada.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las mutaciones en el gen K-ras son las alteraciones en oncogenes más frecuentes en el conjunto del cáncer humano. Son muy frecuentes en el cáncer de páncreas (una enfermedad sumamente letal cuyas causas son en gran medida desconocidas): las presentan entre un 75 ciento y un 80 ciento de los pacientes.

No se sabe por qué. Sí se sabe que el gen K-ras es una "diana" muy atractiva para algunas sustancias químicas cancerígenas. Pero en los humanos se conoce muy poco sobre los factores ambientales y personales que contribuyen a causar estas mutaciones en el ADN. Las mutaciones en los genes K-ras son adquiridas (no heredadas)

Del 45 por ciento de los tumores colorrectales metastásicos alberga mutaciones en los exones 2, 3 y 4 del oncogén KRAS1, la PCR en tiempo real completamente automatizada ofrece un acceso rápido y sencillo a datos de alta calidad de los biomarcadores

Los últimos estudios han demostrado que, además de las mutaciones en los codones 12, 13 y 61, las mutaciones de KRAS en las posiciones de codón 59, 117 y 146 ("KRAS ampliado") activan la vía MAPK/ERK de forma independiente. Las pruebas de KRAS y NRAS ampliados ("RAS ampliado")

El estado de mutación del tumor suele evaluarse a partir de material de tejido tumoral FFPE. En la actualidad, el proceso que se sigue desde la obtención de la muestra hasta el resultado es muy laborioso y requiere muchos pasos. La mayoría de los laboratorios no realiza estas pruebas en sus instalaciones, sino que las envía a centros especializados, donde las muestras se procesan por lotes para optimizar costes. Esto provoca tiempos de espera muy prolongados desde que se obtienen las muestras FFPE hasta la recepción de los resultados.

A pesar de ello, se ha investigado muy poco la influencia que el medio ambiente tiene en la incidencia y en la persistencia de las mutaciones en los genes ras en los seres humanos.

La realización de pruebas moleculares complementarias en el estudio de la muestra ha cobrado significativa importancia para la toma de decisiones con respecto al tratamiento oncológico en la actualidad. Estas pruebas se utilizan para determinar si el paciente cuenta con las condiciones necesarias para beneficiarse

de un tratamiento dirigido. En tal virtud hacemos los siguientes planteamientos a esta ¿Cual es el análisis Mutacional Del Oncogen Kirsten Sarcoma Rat Virus (K-RAS) en pacientes con diagnostico de cáncer colorrectal en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014- diciembre 2016?

III. OBJETIVOS

III.1. General.

1. Determinar el análisis Mutacional Del Oncogen Klrsten Sarcoma Rat Virus (K-RAS) los pacientes con diagnostico de cáncer Colorrectal en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014-diciembre 2016.

III.2. Específicos.

- 1) Determinar la edad más frecuente con análisis mutacional.
- 2) Determinar el sexo más frecuente con análisis mutacional. (k-ras)
- 3) Clasificar el tipo de mutación de sarcoma rat virus.
- 4) Determinar la frecuencia de mutación.

IV. MARCO TEÓRICO

IV.1. Concepto de cáncer

El cáncer surge por la acumulación gradual de alteraciones genéticas que llevan a la transformación progresiva de células humanas normales en derivados de gran malignidad. Esta transformación resulta en alteraciones esenciales de la fisiología celular que determinan un crecimiento celular descontrolado, que puede ocasionar invasión tisular y metástasis.¹⁴

El cáncer es la consecuencia de una serie de alteraciones genéticas que progresivamente interrumpen el mecanismo normal que controla la proliferación celular.¹⁴

Bajo el nombre genérico de cáncer se engloban un conjunto de patologías que pueden afectar a distintos tipos de células y tejidos y que tienen en común el crecimiento descontrolado y desordenado de las células neoplásicas, las cuales pueden adquirir capacidad de desplazarse desde el tejido de origen hacia otros tejidos y órganos, en el proceso conocido como metástasis.¹⁴

El cáncer es la causa más importante de morbilidad y mortalidad, después de las enfermedades cardiovasculares según la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo que representa un problema sanitario y social muy importante en la actualidad. El cáncer con mayor incidencia a nivel mundial es el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de mama y el cáncer colorrectal (CCR)

IV.2. Desarrollo del Cáncer

A nivel celular, el desarrollo del cáncer es visto como un proceso en el que participan varias mutaciones que aumentan progresivamente la capacidad de proliferación, la supervivencia, la invasión y la metástasis celular.

Se piensa que el primer paso en el proceso de iniciación del tumor, es el resultado de una alteración genética que conduce a la proliferación anormal de una única célula.¹⁵

Algunas de estas mutaciones confieren una ventaja selectiva a la célula, tal como la de tener un crecimiento más rápido por lo que los descendientes de una célula que llevan este tipo de mutación en consecuencia, se convierten en dominantes dentro de la población tumoral.¹⁵

El proceso se llama selección clonal, ya que un nuevo clon de células tumorales se ha desarrollado debido a su mayor tasa de crecimiento u otro tipo de ventajas tales como la supervivencia, la invasión, o metástasis que les confieren una ventaja selectiva. La selección clonal continúa a lo largo del desarrollo del tumor, por lo que su crecimiento es cada vez más rápido y más maligno.¹⁵

IV.3. Proto-oncogenes y Genes Supresores de Tumores.

La transformación maligna de una célula acontece por acumulación de mutaciones en genes específicos, las cuales juegan un papel clave en la inducción de cáncer.¹⁶

Estos genes están agrupados en dos grandes clases:

- Proto-oncogenes, son los que promueven tal crecimiento
- Genes supresores de tumores son aquellos que lo inhiben.

Estas dos clases de genes juegan un papel predominante en el desarrollo del cáncer. En su configuración normal estos genes tienen la función de controlar el ciclo celular, es decir la serie de eventos que permite a la célula crecer y dividirse.¹⁶

Los proto-oncogenes y genes supresores de tumores ejercen diferentes funciones en las células normales. Estos genes controlan la proliferación celular actuando como factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de la señal mitogénica y factores de transcripción, así como reguladores de la apoptosis.¹⁶

IV.4. Oncogenes.

Un oncogén codifica una proteína capaz de transformar a las células normales en cancerígenas. Son muchos los oncogenes conocidos, pero todos ellos son derivados de los genes presentes en células normales (es decir, proto-

oncogenes), cuyos productos participan en el control de las vías de crecimiento celular.¹⁷

La conversión o la activación de un proto-oncogén a oncogén, en general implica la ganancia de función causada por la mutación.¹⁷

IV.5. Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores ó simplemente genes supresores, controlan la proliferación celular en el organismo sano.

Son reguladores negativos del crecimiento y cuando no están presentes en la célula o se encuentran inactivos a causa de mutaciones, las células dejan de crecer normalmente y adquieren las propiedades proliferativas anormales características de las células tumorales.¹⁸

Los oncogenes y genes supresores de tumores que se analizaron en este proyecto de tesis fueron TP53, HRAS, NRAS, KRAS, ABL1 y CDKN2A (Proteína p16).¹⁸

Los cuales se describen a continuación:

- Gen tp53 en la oncogénesis,
- p53 y mutaciones,
- p53 y control del ciclo celular.

IV.5.1. Gen tp53 en la Oncogénesis.

El gen Tp53 o el gen p53, también llamado el "guardián del genoma", se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17, en condiciones de normalidad, codifica a una fosfoproteína nuclear que actúa como un regulador negativo (inhibe) de la proliferación celular mediante una acción compleja, puesto que al mismo tiempo actúa 4 como factor de transcripción, interruptor del ciclo celular e inductor de apoptosis.¹⁹

Desde el descubrimiento de la proteína p53 (codificada por el gen TP53) en 1979, hasta la elucidación de sus funciones celulares, el interés por esta proteína ha aumentado continuamente (Martin et al, 2002) porque se le encontró alterado en más del 50% de los tumores. p53 está constituida por 393 aminoácidos y

consta de tres grandes dominios estructurales, los cuales se describen a continuación:

➤ Dominio N-terminal:

Tiene la función de activación de la transcripción, la cual está ubicada en la región amino-terminal que participa en las interacciones proteína-proteína que regulan su estabilidad y función. Por análisis de muta génesis dirigida se lograron definir los residuos L22 y W23 como esenciales para su actividad transactivadora.

Esta región (específicamente los residuos 18 al 23) es el sitio de unión de la proteína mdm2, de RPA, hsp70, la proteína viral E1b del adenovirus y de los coactivadores transcripcionales TAFII40 y TAFII60, además, se ha informado un polimorfismo R/P en la posición 72, donde, la R72 presenta una estructura más sensible a la degradación inducida por la proteína E6 del papiloma virus humano.¹⁹

➤ Dominio central:

Participa en la interacción proteína-DNA ya que tiene contacto directo con secuencias específicas del DNA. La interacción se da en regiones del DNA con cuatro repeticiones de la secuencia PuPuPuCA/TA/TGPyPyPy a través del contacto con los residuos K120, S241, R248, R273, A276, C277, R283. Para que se lleve a cabo la interacción, es indispensable la presencia de una molécula de zinc unida a los residuos C176, C238, H179 y C242 de la proteína.¹⁹

➤ Dominio C-terminal o dominio de tetramerización:

Interviene en la interacción entre unidades monoméricas de la proteína.

La proteína p53 se encuentra principalmente en forma de tetrámero y los residuos 323 al 353 son esenciales para su ensamblaje. Se le han atribuido otras dos funciones biológicas: señalización de la localización nuclear y reconocimiento del daño en el DNA. Las modificaciones post traduccionales como fosforilaciones y acetilaciones sobre este dominio permiten potenciar la especificidad de la unión al DNA, razón por la cual también se le ha denominado región reguladora de la proteína. A pesar de ser una región

vital para la estabilización del tetrámero, y por tanto, para la función de la proteína, se han detectado pocas mutaciones en la misma, posiblemente por ser una región que requiere mayor estudio.¹⁹

IV.5.2. P53 y Mutaciones

Dada la importancia de p53 en el cáncer humano, esta es sin duda la proteína más estudiada en este tipo de padecimientos y se han realizado muchos estudios para evaluar el impacto de las mutaciones en su función. Las mutaciones en p53 han sido clasificadas de diversas maneras, una clasificación genética de mutaciones basada en la dominancia de su actividad.¹⁹

En otras clasificaciones las sustituciones encontradas en proteínas involucradas con el cáncer han sido clasificadas en dos grandes categorías en función del efecto sobre la estructura y función de la proteína:

- Mutaciones de contacto: Afectan aminoácidos que participan en la interacción entre la proteína y el DNA, estas rompen los contactos que son cruciales entre las proteínas y el DNA, o entre p53 y otras proteínas.
- Mutaciones conformacionales: Mutaciones que afectan el esqueleto de la proteína y que afectan su conformación y por lo tanto su función, en el caso de p53 estas mutaciones pueden afectar su afinidad por el DNA o la interacción con otras moléculas.¹⁹
- Activación de la proteína p53 El supresor tumoral p53 es una fosfoproteína nuclear con propiedades inhibitorias de cáncer. Este factor se mantiene en un estado reprimido en las células normales, pero es activado por modificaciones post-transcripcionales en respuesta a múltiples formas de estrés como los factores genotóxicos y los no genotóxicos.
 - Genotóxico: La irradiación, químicos cancerígenos, o agentes citotóxicos utilizados en el tratamiento del cáncer
 - No genotóxicos: Hipoxia, el agotamiento de los ribos nucleótidos, y activación de cascadas de señalización del crecimiento.

IV.5.3. P53 y Control del Ciclo Celular

La proteína p53 regula negativamente la progresión del ciclo celular debido al efecto inhibitorio que realiza p21 sobre diferentes complejos de cdk/ciclina en presencia de un daño en el DNA, produciendo una detención en la transición G1/S y G2/ M del ciclo celular.²⁰

Esta inhibición genera una acumulación de la proteína pRb unida al factor de transcripción E2F. En condiciones normales, la pRb presenta diferentes estados de fosforilación (por complejos cdk/ciclina) hasta permitir la liberación del factor E2F, el cual es necesario para regular positivamente la transcripción de genes requeridos en el inicio y transcurso de la replicación.²⁰

IV.5.4. Proteína p53 y reparación.

En la reparación resulta importante la actividad activadora en trans de la proteína p53 sobre los genes GADD45 y p21/Waf1. In vitro la proteína Gadd45 se une a PCNA para inducir la reparación de la lesión; por otra parte, la proteína p21 al unirse con PCN impide su interacción con la DNA polimerasa inhibiendo así la replicación.²⁰

En consecuencia, un equilibrio entre estas dos proteínas controlará de manera eficiente dos mecanismos biológicos esenciales: reparación y replicación. Además, se ha propuesto que las proteínas ATM y NBS1 son componentes en la vía de señalización, corriente 9 arriba, de p53. La primera actúa en respuesta al daño del DNA por radiación gamma pero no así por radiación ultravioleta y la segunda en respuesta al daño por radiación ionizante; de manera similar, la polimerasa poli-ADP (PARP), importante en el reconocimiento del daño al DNA y su reparación, induce, in vitro, aumento en la cantidad de la proteína p53 en fibroblastos de ratón.²⁰

IV.6. Familia Ras

Los miembros de la familia RAS son los proto-oncogenes que más frecuentemente se encuentran alterados en tumores sólidos humanos; la frecuencia varia alrededor del 30 por ciento y en algunos casos, como los adenocarcinomas pancreáticos y de pulmón supera el 50 por ciento. En los humanos existen tres genes ras funcional.²¹

En los humanos existen tres genes ras funcionales: Hras isoforma 1, Kras 2 y Nras que codifican proteínas homólogas, con un peso molecular de 21 kDa. Existen además dos pseudogenes: Hras-2 y Kras Iso 1. Debido a que las

proteínas Ras (Hras, Nras y Kras4B) tienen secuencia muy similar (> 90 por ciento), se puede deducir que son funcionalmente redundantes.

Esta opinión se ve reforzada por las observaciones de que todas las isoformas de Ras comparten conjuntos comunes de efectores río abajo y río arriba de GEF.

La única región de las isoformas de Ras que exhibe divergencia significativa en las secuencias, se encuentra en la región hipervariable (HVR), ubicada en los últimos 24 residuos de las proteínas y que presenta aproximadamente el 10-15 por ciento de conservación en comparación con el 90 por ciento de identidad en los 165 residuos de la región N-terminal.

Las proteínas Ras activan numerosas rutas de transducción de señales, pero es especialmente importante la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases), las cuales también a través de la transducción de señales activan a otras cinasas y genes reguladores de proteínas.²¹

Pertenecen a una familia extensa de GTPasas, la familia de proteínas G, que participa en el control de una gran variedad de procesos celulares e incluye, además de la supe familia Ras, algunas proteínas involucradas en síntesis de proteínas (factores de iniciación y alargamiento) y las proteínas G heterotriméricas

Estas proteínas, como todas las GTPasas, son moléculas que unen e hidrolizan GTP y 11 funcionan como interruptores con dos conformaciones: un estado inactivo, unido a GDP, y a su estado activo, unido a GTP.²¹

La activación de Ras por mutaciones somáticas ocurre en 15 a 20 por ciento de todas las células malignas de humano. Se ha detectado en los genes HRAS, NRAS, y KRAS. Sin embargo, la gran mayoría de las mutaciones detectadas en los cánceres humanos se plantean en el gen KRAS. La activación de Kras por mutación se detectan frecuentemente en los tumores derivados de tejidos endodérmicos, tales como los de pulmón (35 por ciento), páncreas (95 por ciento), y colon (30 por ciento).²¹

Esto plantea la posibilidad que el Kras mutado activado ejerza su actividad oncogénica a nivel de las células precursoras endodérmicas o de las células madres.²¹

IV.7. Gen RAS

Los genes RAS fueron los primeros oncogenes implicados en cáncer humano. Se identificaron como elementos genéticos transformantes de dos retrovirus que inducían la formación de tumores en los animales infectados las cepas Harvey y Kirsten del virus del sarcoma de rata, poco después estos oncogenes, HRAS y KRAS, fueron realizados también en tumores humanos.²¹

Estos tres genes RAS: H-RAS K-RAS y N-RAS.

El gen KRAS da lugar a dos proteínas: KRAS-A y KRAS-B, mediante mecanismos de "splicing" alternativo del cuarto exón codificante. Al hablar de la proteína KRAS, normalmente se están refiriendo a la proteína KRAS-B, puesto que es ésta la que es diferente de las otras isoformas y presenta unas propiedades distintivas.²¹

KRAS-A presenta características similares a las de H-RAS y N-RAS, además de representar tan solo un 10 por ciento del ARNm total que transcribe el gen KRAS. Por los motivos antes mencionados, nosotros nos estaremos refiriendo a la proteína KRAS-B, cuando hablemos de KRAS.

Varios trabajos han demostrado que estas proteínas (H-RAS, K-RAS A y B y la HRAS) presentan secuencias, estructuras y funciones similares pero difieren en algunos aspectos. Aunque el patrón de expresión de estas proteínas puede variar según el tipo celular, estas diferencias genéticas, estructurales y funcionales, justificarían el porqué de tener estas tres isoformas.

Entre las diferencias de las isoformas están: no comparten la secuencia en el extremo C-terminal, diferencias en cuanto a la especificidad por algunos efectores: GAPs, GEFs.²¹

También difieren en la localización subcelular

IV.8. Bioquímica del RAS

La GTPasa RAS (H, N y K-RAS) tienen una actividad bioquímica básica la unión de GTP y la hidrólisis de este nucleótido a GDP. Cuando RAS está unido a GTP adopta una conformación que le permite interactuar con los efectores, se trata de la conformación activa, pero cuando RAS está unido a GDP, esta

interacción con los efectores no es posible y hablamos de una conformación inactiva

IV.9. Estructura de RAS

Las proteínas RAS (H, N y K-RAS2A) constan de 189 aminoácidos y 188 en el caso del K-RAS2B. Los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido número 1 y número 165 constituyen el llamado Dominio Catalítico, siendo este muy conservado entre las diferentes isoformas. El Dominio Hipervariable se encuentra entre los aminoácidos 166 y 189, en el cual las isoformas se diferencian considerablemente. Las proteínas de la superfamilia RAS comparten una serie de secuencias conservadas en la Caja G "G Box". El G1 participa en la interacción con los fosfatos α y γ del nucleótido, el G2 en la interacción con efectores, el G3 en la interacción con el Mg^{2+} y el fosfato γ del nucleótido, el G4 en establecer puentes de hidrógeno con el anillo de guanina y en interacciones estabilizadoras con el G5 y el G6 está implicado en interacción con el nucleótido.²²

- Existen dos regiones en la estructura de RAS que cambian conformacionalmente cuando RAS se encuentra unido a GTP. Switch I y Switch II. La región Switch I incluye el dominio efector (aminoácido 32-40) esencial para la interacción con los efectores.
- La región Switch II (aminoácido 60-76) también participa en la interacción con algunos efectores y para la unión de las proteínas GAPs.

Las mutaciones en la secuencia de RAS encontradas en tumores humanos, están en la glicina 12 y 13, en la treonina 59, en la glutamina 61 y en la lisina 117 dando lugar a una forma hiperactiva de RAS.²²

La mutación en la lisina 117 se asocia con un mayor intercambio del nucleótido y el resto, con una reducción de la actividad GTPasa independiente a la unión a las proteínas GAPs. Los aminoácidos cisteína 186 en la secuencia de RAS es el primer aminoácido que se modifica lipídicamente por adición de un grupo farnesil, empezando así el procesamiento posttraduccional de la proteína, proceso esencial para su actividad biológica.²²

La mutación de la Sena 17 da como resultado un dominante negativo de la proteína. Esta mutación afecta a la liberación del GEF del complejo R4S/GEF, una vez ha finalizado el intercambio del nucleótido. Esto hace que los GEFs insuficientes para activar las proteínas RAS endógenas.²²

IV.10. El EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

Entre los receptores de factores de crecimiento mejor caracterizados figuran los receptores de la familia ErbB (también conocidos como receptores tirosina-quinasa de tipo I).²³

Esta familia está compuesta de cuatro receptores:

- El EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor, ErbB1 o HER1)
- ErbB2 o HER2
- ErbB3 o HER3
- ErbB4 o HER4

Por otro lado el EGFR es uno de los receptores más conocidos al haber abundantes pruebas que lo relacionan con la progresión de diversos tumores malignos.²⁴

Todo esto hizo que comenzara el desarrollo clínico de tratamientos anti-ErbB (frente al EGFR y HER2).²³

El gen EGFR (ENSG00000146648) está localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (locus 7p11.2).²⁴

EGFR se expresa en células epiteliales, estromales, gliales y de músculo liso mediando el crecimiento, desarrollo y diferenciación.²⁴

La expresión está elevada en amplio número de tumores estando descrito del 19% en tumores de CCR.²⁵

IV.11. Definición del EGFR

Es una proteína que está localizada en la membrana plasmática y está compuesta por tres dominios, un dominio extracelular, que constituye el sitio de unión al ligando y el sitio que favorece la dimerización, en el cual se encuentra el grupo amino terminal; una región transmembrana, necesaria para el anclaje a la

membrana, y el dominio intracelular, que posee la actividad tirosina quinasa y los sitios de unión a sustratos grupo carboxílico terminal.²⁵

IV.12. Ligandos Del EGFR y transducción de señales

El EGFR en condiciones normales está inactivo necesitando de ligandos para su activación. Entre los ligandos del EGFR se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF, Epidermal growth factor), el factor de crecimiento tumoral alfa (TGF α , Transforming growth factor alfa), la anfirregulina (AREG), la epirregulina (EREG), la epigenina y la heparin-binding EGF. Alguno de estos a su vez puede interactuar con otros receptores de la misma familia de receptores.²⁵

Por la unión del ligando el monómero del EGFR homodimeriza o heterodimeriza, activándose así la actividad tirosina quinasa del dominio citoplasmático de las moléculas, autofosforilándose. La activación de la tirosina quinasa del receptor es el suceso clave que inicia la cascada de transducción de señales intracelulares dando lugar a oncogénesis.²⁶

Las dos vías principales de señalización del EGFR son las que incluyen Ras-Raf-MAPK, relacionada con la proliferación celular y la ruta PI3K-PTEN-AKT que controla la motilidad y la supervivencia celular.²⁶

IV.13. El Biomarcador

Los biomarcadores (abreviatura de marcadores biológicos) son moléculas o genes que se encuentran en el organismo y que ofrecen a los médicos información importante sobre una enfermedad. En los pacientes con cáncer, los biomarcadores pueden ser producidos por el propio tumor y, en algunos casos, por otros tejidos en respuesta a la presencia del tumor.²⁷

Los biomarcadores indican si un tratamiento concreto puede ser efectivo para usted y permiten que el médico personalice el tratamiento basándose en esta información; esto se denomina medicina personalizada. Realizar pruebas de biomarcadores predictivos puede ayudar a su médico a seleccionar el tratamiento más efectivo para usted, y evitar tratamientos innecesarios que no funcionarían.²⁷

Los distintos tipos de biomarcadores funcionan de diferentes formas:

- Biomarcadores de diagnóstico, se utilizan para la detección y el diagnóstico de tipos concretos de cáncer
- Biomarcadores de pronóstico, proporcionan información sobre cómo puede evolucionar la enfermedad del paciente
- Biomarcadores predictivos, evalúan los posibles beneficios, o ausencia de beneficios, de un tratamiento específico para un paciente concreto.²⁷

IV.14. Biomarcadores RAS

Existen muchos biomarcadores predictivos diferentes que se utilizan para ayudar a los médicos a tomar decisiones de tratamiento para los distintos tipos de cáncer.²⁸

En el cáncer, los genes RAS (incluidos los KRAS y los NRAS) son biomarcadores de alto valor predictivo que ayudan a los médicos a determinar el tratamiento adecuado. Ambos están autorizados ahora en la Unión Europea para todos los pacientes con cáncer colorrectal metastásico.²⁸

Existen dos tipos diferentes de genes RAS que los médicos analizan.

- Los genes RAS normales (KRAS y NRAS) se denominan de «tipo salvaje» o natural y aparecen en aproximadamente el 50 por ciento de los tumores colorrectales.
- El 50 % de tumores restantes presentan genes RAS mutados y se denominan RAS mutantes.

Las decisiones de tratamiento se basan en si los tumores albergan genes RAS de tipo salvaje o de tipo mutante.²⁹

IV.15. El oncogén K-ras (Kirsten Rat Sarcoma Viral Homologue u oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata).

El gen KRAS elabora la proteína KRAS que participa en las vías de señalización celular, el crecimiento de las células y la apoptosis (muerte de las células). Las sustancias que impiden la actividad del gen KRAS que mutó o su proteína pueden impedir el crecimiento del cáncer. También se llama gen K-RAS.

El oncogén K-ras (Kirsten Rat Sarcoma Viral Homologue u oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata) codifica para una proteína de unión a GTP (guanidiltrifosfatasa) que puede mutar en estadios muy tempranos del desarrollo tumoral; se ha descrito que del 35 al 42 por ciento de los adenomas poseen una mutación en K-ras, que promueve el crecimiento hiperplásico del epitelio colónico, morfología aberrante en focos de criptas, crecimiento tumoral, progresión, invasión local y formación de metástasis.³⁰

Para la detección de estas mutaciones existen varias técnicas descritas, siendo la secuenciación directa de un producto de PCR la de elección. Como resultado se obtiene la mutación (que se denomina K-ras mutado) y el codón mutado; si no la hay, se denomina K-ras en estado silvestre, término introducido del inglés wild type, aunque en el presente estudio lo llamaremos K-ras nativo.³⁰

El *KRAS* gen proporciona instrucciones para hacer una proteína llamada K-Ras que está implicado principalmente en la regulación de la división celular. Como parte de una vía de señalización conocido como la vía RAS / MAPK, la proteína transmite señales de fuera de la célula al núcleo de la célula. Estas señales de instrucciones a la célula para crecer y dividirse o para madurar y asumir funciones especializadas.³⁰

La proteína K-Ras es una GTPasa, lo que significa que convierte una molécula llamada GTP en otra molécula llamada PIB. Las proteínas K-Ras actúa como un interruptor, y se encienden y se apagan por las moléculas de GTP y GDP. Para transmitir señales, la proteína K-Ras debe estar activada uniéndose (de unión) a una molécula de GTP. La proteína K-Ras está apagado (inactivada) cuando se convierte el GTP a GDP. Cuando la proteína está ligada al PIB, que no retransmite señales al núcleo de la célula.³⁰

IV.16. Mutaciones Kras en Cánceres humanos

Las mutaciones de *KRAS* más comunes se encuentran en los codones 12, 13 y 61, que corresponden al dominio de unión GTP/GDP de la proteína.

Estas mutaciones alteran la actividad GTPasa de *KRAS*, permitiendo que se mantenga constantemente en un estado activado. La consecuencia de estas

mutaciones es que aumenta el porcentaje de activación KRAS en la célula, estimulando la ruta de señalización RAS/RAF/MAPK de manera permanente, promoviendo la proliferación celular e incrementado la supervivencia, así como otros efectos pre-tumorigénicos.³¹

Las mutaciones de KRAS están presentes en aproximadamente el 30 por ciento de los cánceres del ser humano, principalmente en el CCR y cáncer de pulmón, páncreas y endometrio.³²

Las mutaciones del KRAS ocurren comúnmente en los codones 120 13 (exón 2) y en casos raros en el codón 61 (exon3) Las mutaciones del gen KRAS son:

- Gly12asp (ggt'qat)
- Gly12val(ggt>gtt)
- Gly12cys (6qt>tgt)
- Gly12ser (ogt>agt)
- Gly12aia(ggt>gct)
- Gly12arg (ggt5cgt)
- Gly13arg (ggcgac)
- Gln61leu(caa>cta)

IV.17. Cuestiones clave planteadas por la activación mutacional de *RAS* oncogenes en tumores humanos.

El genoma de Kirsten murino sarcoma virus se formó por recombinación entre Kirsten murino secuencias de virus de la leucemia, y secuencias de rata deriva de un (VL30) elemento genético '30S' retrovirus-como que abarca el oncogén Kras.³²

El uso de ADN clonados hemos determinado las secuencias de nucleótidos de las repeticiones terminales largas y regiones adyacentes, extendiéndose a través de los puntos de recombinación en el sarcoma genomas y virus de la leucemia. Nuestros resultados sugieren que las regiones discretas de homología y otras características de secuencia crípticos, pueden haber constituido recombinación puntos calientes que participan en la génesis de la Kirsten murino sarcoma genoma del virus. También hemos comparado la secuencia de la Kirsten murino leucemia env p15 virus y adyacente repetición

terminal larga con las regiones correspondientes de la AKV y Gross A murino de leucemia genomas de virus.³²

IV.18. Prevalencia de las mutaciones en KRAS.

Las proteínas de la familia RAS se expresan de manera diferencial en los distintos tipos celulares, lo que explicaría las variaciones en la frecuencia de las mutaciones en los genes RAS encontradas en los diversos tipos de tumores.

La mayoría de las mutaciones que afectan a los genes de esta familia se producen en el gen KRAS.³³

Son especialmente comunes en tumores de páncreas (70-90% de prevalencia), colon (35-50 por ciento), intestino delgado (35 por ciento), cánceres biliares (20-30 por ciento) y cáncer de pulmón (20-30 por ciento).³³

En contraste las mutaciones de NRAS son menos habituales, y se detectan principalmente en tumores hemato-linfáticos (10 por ciento), y melanomas (20 por ciento), mientras que las mutaciones de HRAS son dominantes en tumores cervicales (9 por ciento), de ovario (23 por ciento) y de glándula salivar (15 por ciento).³⁴

Además, si nos centramos únicamente en KRAS, encontramos diferencias en la incidencia del tipo específico de mutación, dependiendo del tipo de tumor. Por ejemplo las mutaciones de KRASG12D son las más comunes en los cánceres pancreáticos (dos tercios de ellos), mientras que se presentan en casi la mitad de los CCR. Por otro lado, la mutación de KRASG12C es la más común en los tumores de pulmón, presente en casi la mitad de ellos.³⁴

IV.19. Técnicas de detección Kras.

Cómo se ha dicho anteriormente, el 98.4 por ciento de las mutaciones del gen KRAS están comprendidos en los codones 12 y 13 (del exón 1).

Esta localización tan conservada facilita en gran medida su estudio, ya que no es necesario estudiar toda la extensión del gen.³⁵

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

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

IV.20. Secuenciación directa.

La secuenciación directa consiste en determinar cada uno de los nucleótidos que componen un determinado fragmento de DNA. Por comparación de la secuencia obtenida con la secuencia real (que se puede obtener en la base de datos OMIM, se pueden identificar todas las mutaciones contenidas en el fragmento secuenciado.³⁵

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

- La secuenciación por el método de los nucleótidos “dideoxi”,
Es la técnica de secuenciación más extendida, pero también tiene un alto coste y requiere bastante tiempo de trabajo.
- La piro secuenciación.
Es algo más rápida que el método anterior ya que se utiliza para secuencias cortas de nucleótidos (40-50 pb). Consiste en seguir la reacción de la secuenciación a tiempo real.³⁵
Esto se consigue añadiendo a la mezcla de amplificación enzimas (sulfurilasa, apirasa, luciferasa) que convertirán el pirofosfato liberando en la unión de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) a la cadena en crecimiento, en señales luminosas. Estas señales se captarán con un detector que generará una serie de picos de intensidad de luz (pirograma), que podremos identificar con cada una de las bases (Figura 3). Ésta metodología es favorable para el análisis de muestras en parafina, ya que el DNA que se obtiene está muy fragmentado. Existen diversos estudios que utilizan la secuenciación para la detección de mutaciones en KRAS.³⁵

IV.21. Cribado de mutantes por PCR.

Existen numerosas variantes para analizar los posibles polimorfismos de KRAS mediante amplificación del DNA por PCR. A continuación, se incluyen algunos de los más utilizados.³⁶

IV.22. PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

Los polimorfismos genéticos suponen distintas variantes para una determinada secuencia del DNA, que coexisten en la naturaleza. A veces estos polimorfismos tienen efecto sobre el fenotipo, causando la aparición de alelos mutantes pero otras veces no tienen efecto, por lo que pasan desapercibidos.³⁶

Algunos de estos polimorfismos pueden analizarse mediante el análisis de fragmentos de restricción, cuando la zona del polimorfismo coincide con la diana de una enzima de restricción. En este caso, se podrá diferenciar la presencia de alelo mutado o silvestre, según se produzca el corte o no por la enzima, analizando los fragmentos de DNA resultantes de la digestión en un gel de agarosa.³⁶

Este es uno de los métodos propuestos para el análisis de mutaciones de KRAS mediante PCR-RFLP con los siguientes pasos:

- Se realiza una primera PCR con cebadores que introducen sitios de restricción para las enzimas BstXI (corta el codón 12 silvestre) y XcmI (corta en codón 13 silvestre).
- A continuación, se digieren los productos de esta PCR con las enzimas anteriores, que cortan el DNA wt.
- En una segunda PCR se continúa la amplificación sólo de los fragmentos mutados porque están intactos.³⁶

Esta técnica permite hacer un cribado para establecer presencia o ausencia de mutación en codones 12 y 13 de KRAS pero no indica cuál es la mutación, para lo que habría que realizar una secuenciación del amplificación mutante.

Este tipo de análisis se ha llevado a cabo en muestras frescas de tejido obtenido a partir de biopsias de CCR o metástasis hepáticas. La ventaja de esta técnica es que no necesita un equipamiento excesivo, sólo un termociclador y geles de agarosa para analizar los resultados.

Como desventajas encontramos el uso de bromuro de etidio (producto para el revelado del gel que es cancerígeno), la necesidad de hacer dos PCR y que no identifica las mutaciones, como se ha explicado antes.³⁶

IV.23. Análisis de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Esta técnica de PCR está basada en la distinta movilidad electroforética que tienen dos cadenas sencillas de DNA que difieren en un único nucleótido.

El esquema de reacciones en este método es el siguiente:

- Se realiza una PCR convencional de KRAS
- Tras la amplificación, el DNA es desnaturalizado por calor.
- Al disminuir la temperatura bruscamente, el DNA se renaturaliza favoreciendo la formación de estructuras intracatenarias, que vendrán definidas por la propia secuencia de bases.
- Luego, los fragmentos obtenidos se separan en un gel de agarosa o poliacrilamida.
- Los distintos fragmentos tendrán movilidades electroforéticas distintas, que se pueden identificar, por comparación con controles de KRAS salvajes y mutantes. Para la visualización de los fragmentos, se utilizan cebadores con marcadores fluorescentes.³⁶

IV.24. Hibridación en fase reversa

Esta técnica está basada en la amplificación por PCR de las muestras a analizar y la posterior hibridación reversa de los fragmentos obtenidos sobre una tira de nitrocelulosa que tiene fijados oligonucleótidos específicos para las variantes alélicas o mutaciones conocidas del gen. Los cebadores de la PCR están unidos a biotina, que permite el posterior revelado de la tira con un conjugado estreptavidinafosfatasa alcalina.³⁷

Contiene reactivos para 20 tests y el tiempo de obtención de resultados es de 6 horas, una vez que se tiene el DNA extraído. También cuenta con un sistema de escaneado de las tiras y un software analizador de imágenes para evitar subjetividades en la interpretación de las tiras.³⁷

IV.25. PCR cuantitativa

Las técnicas de PCR convencional se están sustituyendo por las técnicas de PCR cuantitativa (RT-PCR), que permite monitorizar todo el proceso de la amplificación, en lugar de medir el producto final como en la PCR original.³⁷

Para ello, los nuevos termocicladores contienen detectores capaces de medir la fluorescencia emitida en cada uno de los ciclos de PCR por las moléculas específicas utilizadas para detectar el DNA de interés. La RT-PCR tiene una mayor sensibilidad que la convencional y es más reproducible y precisa. Los marcadores fluorescentes que se puede utilizar son de dos tipos:

- Específicos: son oligonucleótidos diseñados para hibridar específicamente con una diana de DNA. Éstos llevan dos moléculas señal: el fluoróforo (F) y el quencher (Q).
- No específicos: se utiliza un agente intercalante que se une a las moléculas de DNA de doble cadena que se forman durante la PCR. El más utilizado es el SYBR Green I, que se excita a 497 nm y emite a 520.³⁷

IV.26. El análisis de “melting” o HRM (High Resolution Melting)

Es una RT-PCR que utiliza agentes fluorescentes, como el SYBR GreenI, que se unen de manera inespecífica a la doble hebra de DNA (como el bromuro de etidio en la PCR convencional).

En esta reacción, se mide la emisión de fluorescencia del marcador conforme se desnaturaliza la doble hebra al ir aumentando la temperatura. La temperatura de desnaturalización o de “melting” (T_m) es característica de una determinada secuencia de DNA ya que depende del contenido GC, del número de pares de bases, de la secuencia y la heterocigosidad.³⁷

IV.27. Kit de mutaciones del gen KRAS de TheraScreen

El kit está basado en un ensayo RT-PCR que permite detectar siete mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogén KRAS. Este kit, que es el primero que tiene marcado CE para uso diagnóstico clínico, se realiza sobre muestras de tejido

fijado en formalina e incluido en parafina. Está basado en dos tecnologías ARMS® y Scorpions.³⁸

Este kit está indicado para su uso en dos sistemas de PCR a tiempo real: LightCycler®480 de Roche Diagnostics o el ABI7500 de Applied BioSystems. En el caso del primero, cuenta también con un programa específico para el análisis de mutaciones con este kit, LightCycler Adapt Software v1.1. Este programa permite automatizar el análisis de los resultados evitando subjetividades.³⁸

El kit está compuesto por ocho reacciones distintas:

- Ensayo control: amplifica una región del exón 4 del gen KRAS, para valorar la presencia de DNA en la muestra.
- Siete ensayos de mutación: contiene dos cebadores para cada mutación, uno ARMS® (Amplification Refractory Mutation System) y otro Scorpions.³⁸

IV.28. Recomendaciones para la detección de Kras

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

- Objetivo del test: Se debería realizar un estudio del estado mutacional de KRAS en un laboratorio acreditado (CLIA) de los tumores de todos los pacientes con carcinoma colorrectal metastáticoz que sean susceptibles de ser tratados con anticuerpos monoclonal anti-EGFR.³⁹
- Resultado del test: Si se encuentran mutaciones en el codón 12 o 13, se debería descartar la terapia con anti-EGFR
- Muestras a estudiar: Las muestras tumorales deben ser seleccionadas por un patólogo, para incluir mayoritariamente células tumorales, sin necrosis ni inflamación. Se pueden enviar muestras frescas congeladas o muestras fijadas en parafina.
- Tipos de ensayos recomendados:
 - El DNA se extraerá por protocolos estandarizados y específicos de cada laboratorio

- RT-PCR. Se deben usar sondas específicas para las mutaciones más frecuentes en los codones 12 y 13.
 - Secuenciación directa del exon 1.
 - En EEUU, no hay kits aprobados por la FDA. En Europa, TheraScreen tiene marcado CE para uso de diagnóstico clínico.
- Informe de resultados:
- KRAS normal: No se han encontrado mutaciones. (Especificar el tipo de ensayo y los controles utilizados)
 - KRAS anormal: Se ha encontrado mutaciones. El tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-EGFR no está recomendado según las recomendaciones provisionales de la ASCO. (Especificar el tipo de ensayo y los controles utilizados).³⁹

La importancia de la presencia de mutaciones en KRAS en algunos tipos de cáncer, especialmente en cuanto a tratamientos con inhibidores de EGFR, ha sido probada en numerosos estudios, como se ha mostrado en esta revisión.

Los laboratorios clínicos deberían considerar ampliar sus carteras de servicios incluyendo técnicas de detección de mutaciones de KRAS ya que constituyen una buena herramienta para el diagnóstico y el tratamiento de estos pacientes.⁴⁰

IV.29. Detección de Mutaciones del Gen KRAS.

La introducción de fármacos en pequeñas moléculas y anticuerpos monoclonales humanizados, como las nuevas terapias que se dirigen a los receptores y proteínas específicos en determinadas vías de transducción de señales, han renovado el interés en los genes que habían sido previamente identificados como participantes en el proceso tumoral.

El primero de estos genes fue el oncogen (también conocido como HER2) ERBB2

El gen KRAS (v-Ki-RAS2 homólogo del oncogen viral del sarcoma de la rata Kirsten) es un oncogen conocido que por lo general funciona en la vía del EGFR. Aunque las mutaciones en este oncogen son conocidas por estar asociadas con varios tipos de cáncer humano, solo recientemente se ha convertido en un

atractivo biomarcador para el laboratorio clínico y para el profesional de la salud como un mecanismo para determinar opciones terapéuticas.⁴¹

La detección de la mutación del gen KRAS se ha convertido en parte de la rutina normal de los pacientes con cáncer colorrectal y se ha demostrado que los tumores que albergan una mutación del gen KRAS no responden a las terapias anti-EGFR.⁴¹

La implementación de las pruebas de mutación del gen KRAS en un entorno de laboratorio clínico está siendo estudiada entre cuatro patólogos y un médico oncólogo de las 4 principales instituciones médicas en los EE.UU.⁴²

Los oncólogos son los responsables de ordenar el análisis de la mutación del gen KRAS, cuando están considerando la terapia anti EGFR como tratamiento de segunda línea en pacientes con cáncer avanzado. El patólogo identificará el bloque de tejido adecuado y lo mandará al Laboratorio de Patología Molecular para la prueba. Además, la prueba del gen KRAS se realiza en todos los casos de adenocarcinoma.⁴²

IV.30. KRAS y el Cáncer Colorrectal

El cáncer de colon (CC) es uno de los cánceres del tracto gastrointestinal (TGI) más frecuentes, ocupando el cuarto lugar como causa de muerte por cáncer en adultos; puede presentarse en forma de sangrado rectal, cambios en el hábito intestinal, anemia resultante de pérdida de sangre crónica y dolor abdominal; la obstrucción intestinal es común cuando el tumor está situado en el colon izquierdo y la perforación ocurre en raras ocasiones; por esta razón se han realizado numerosos intentos para detectar los tumores en estadios tempranos.⁴³

Uno de los grandes avances en la genética molecular de los tumores colorectales es la identificación de mutaciones en el oncogen K-ras.

Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo de CC y de recto se encuentran los modificables: obesidad, Diabetes Mellitus (DM) tipo 2, terapia de reemplazo hormonal, sedentarismo, dieta rica en carnes rojas o carne procesada, consumo de alcohol, tabaquismo, bajo consumo de frutas y vegetales, edad mayor de 50 años, antecedentes familiares (cáncer, pólipos, síndrome de Lynch,

adenomatosis polipoidea familiar) y antecedente personal de enfermedad inflamatoria intestinal.⁴³

El K-ras es un gen crítico en el desarrollo de una gran variedad de cánceres; pertenece a la familia de los genes ras (K-ras, N-ras y H-ras) que codifican a las proteínas pequeñas de unión al nucleótido de guanina; es un elemento clave de las vías de señalización celular, como la MAPK, KAK-STAT y PI3K y juega un papel importante en una variedad de procesos celulares, incluyendo la proliferación y la apoptosis.⁴⁴

En los tumores existen diferentes formas del gen K-ras que codifican ya sea una proteína normal no mutada conocida como Kras salvaje (tipo natural) o una proteína anormal mutada conocida como K-ras mutada.⁴⁴

El estatus de este gen (Salvaje o mutado) puede ser indicativo de pronóstico y predictivo de respuesta a ciertos fármacos.

En los tumores con K-ras salvaje, la proteína se activa temporalmente en respuesta a ciertos estímulos, tal como la señalización del RFCE; y con el gen mutado la proteína se encuentra permanentemente activada sin la necesidad de estímulos, teniendo como consecuencia el crecimiento y propagación tumoral sin regulación. En el CCR hasta un 65 por ciento de los pacientes presentan la versión de K-ras salvaje y el resto la versión mutada del gen, por lo que actualmente ha aumentado la relevancia de los biomarcadores, incluyendo el papel del K-ras en este tipo de cáncer y otros asociados al RFCE.⁴⁴

El CCR es la mayor causa de morbilidad y mortalidad asociada a cáncer en América del Norte, Europa y otras regiones donde los estilos de vida y los hábitos alimenticios son similares; es la cuarta causa más común de casos nuevos diagnosticados en EEUU precedido del cáncer de mama, próstata y pulmón.

El CCR constituye 10 por ciento de casos nuevos diagnosticados en hombres y 11 por ciento en mujeres, la segunda causa de mortalidad en la población se debe al cáncer, dentro del cual el CCR ocupa el cuarto lugar según el último reporte anual de mortalidad para el año 2012.⁴⁵

Las células cancerígenas en el colon se caracterizan por cambios fenotípicos heredables que son el resultado de alteraciones cuantitativas y cualitativas en la

expresión del gen. Los cambios genéticos que pueden estar implicados en el desarrollo de CCR están categorizados en tres grandes clases: alteraciones en los proto-oncogenes, pérdida de la actividad genética supresora del tumor y anomalías en los genes implicados en la reparación del ADN incompatible.⁴⁵

Los adenomas y carcinomas nacen en el contexto de inestabilidad del genoma en el cual las células epiteliales adquieren un número de mutaciones necesarias para alcanzar el estado de neoplasia.⁴⁵

La desestabilización del genoma es un prerrequisito para la formación del tumor, lo cual comúnmente corresponde a la inestabilidad del cromosoma con posterior pérdida del alelo, amplificaciones cromosómicas y translocaciones.⁴⁵

Los proto-oncogenes celulares son genes humanos evolucionados conservados que contienen secuencias de ADN homólogas a las de los retrovirus transformados, muchos de ellos juegan un papel en la transducción de señal y en la regulación normal del crecimiento celular, una activación inapropiada de los mismos puede llevar a la transmisión anormal de los mensajes reguladores desde la superficie de la célula hasta el núcleo, lo cual lleva a una proliferación anormal y eventualmente al desarrollo del tumor.⁴⁶

Se han descrito tres genes humanos ras (Kras, N-ras y H-ras) que codifican a la proteína de unión nucleótido guanina que regula las vías de señalización intracelular; aproximadamente el 65 por ciento de los CR esporádicos tienen puntos de activación mutados en un gen ras, más frecuente en el K-ras.⁴⁶

Reportes epidemiológicos, patológicos y genéticos soportan el concepto que más del 95 por ciento de los CCR en países occidentales se desarrollan a partir de adenomas, clasificándose como de bajo y de alto grado; aproximadamente del 5-7 por ciento de los adenomas tienen alto grado de displasia y del 4-7 por ciento tienen carcinoma invasivo al momento de realizar la resección endoscópica.⁴⁶

La probabilidad del desarrollo de displasia de alto grado aumenta con el tamaño del pólipo y el componente veloso. La prevalencia de adenomas implica que la población afectada es de 5-7 años más joven que la que tiene carcinoma. A medida que los adenomas crecen desarrollan signos de malignidad; necesitando de 10-12 años para experimentar estos cambios.

Existen variaciones geográficas en la incidencia de CCR que parecen tener más relación con el ambiente que con los factores genéticos; entre estos, factores dietéticos, tales como consumo excesivo de grasa; baja ingesta de frutas, vegetales, fibra, algunas vitaminas (A, E, C, y folato), minerales (calcio, selenio); medicamentos (aspirina y otros agentes antiinflamatorios no esteroideos, reemplazo hormonal en mujeres con menopausia); consumo de tabaco, ingesta excesiva de alcohol y obesidad.⁴⁷

La colonoscopia es el procedimiento de elección con una sensibilidad de 98% para el diagnóstico de CCR, caracterización y tratamiento de los pólipos adenomatosos.

Los signos y síntomas más tempranos de esta enfermedad son:

- Cambios en el hábito intestinal.
- Dolor abdominal persistente.
- Rectorrágica (macroscópica u oculta en heces)
- Anemia por deficiencia de hierro de origen desconocido.

Los signos y síntomas tardíos son:

- Dolor abdominal severo.
- Obstrucción intestinal.
- Perforación.
- Masa abdominal palpable.
- Pérdida de peso.

Las guías actuales para el diagnóstico temprano del CCR en individuos asintomáticos incluyen que a toda aquella persona >50 años, hombre o mujer, debe ser sometida a estudios de despistaje tales como: sangre oculta en heces (FOBT, por sus siglas en inglés) anualmente; a una prueba de inmunquímica fecal (FIT, siglas en inglés) anualmente; test de ADN en heces; sigmoidoscopia flexible cada 5 años; colon por enema con bario cada 5 años; colonoscopia cada 10 años; o colonografía virtual cada 5 años.⁴⁷

La cirugía es el único tratamiento curativo del CCR localizado. Sin embargo, la mayoría de los enfermos no son inicialmente candidatos a la resección de la

enfermedad metastásica, y el tratamiento de elección es el sistémico con quimioterapia.⁵⁰

En la actualidad los agentes terapéuticos que han demostrado actividad clínica son tres fármacos quimioterápicos (5-fluorouracilo, oxaliplatino e irinotecán) y tres fármacos “biológicos”, anticuerpos monoclonales que actúan por una vía diferente a la interferencia con la replicación del ADN: bevacizumab (inhibidor de la actividad del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)) y cetuximab y panitumumab (inhibidores de la actividad del EGFR).⁵⁰

IV.31. Cáncer de pulmón y KRAS.

La frecuencia de mutaciones en el codón 12 o 13 del gen KRAS en el cáncer de pulmón oscila entre un 90 por ciento en los adenocarcinomas y un 97 por ciento en NSCLC (Non small cell lung cancer).

De igual modo que en el CCR, la presencia de mutaciones KRAS en pacientes con cáncer de pulmón se ha identificado como un factor pronóstico negativo de la respuesta al tratamiento con los inhibidores de EGFR (erlotinib, cetuximab, panitumab).⁵¹

Por tanto, los tumores que muestren la forma wt del gen KRAS tendrán mejor respuesta a este tratamiento que los que tengan el gen mutado

Los investigadores han identificado una debilidad potencialmente crítica en los cánceres de pulmón que tienen mutaciones en el gen KRAS, una alteración genética que promueve el cáncer y que se ha demostrado que es casi imposible de afrontar terapéuticamente, sin embargo, los esfuerzos para desarrollar terapias que se dirijan directamente a las proteínas mutantes Ras en los tumores han sido obstaculizados por varios factores, incluyendo su compleja biología y sus propiedades estructurales y bioquímicas únicas.⁵¹

Las mutaciones en KRAS están presentes en los tumores de aproximadamente el 25 por ciento de pacientes con NSCLC. Los pacientes cuyos tumores tienen estas mutaciones suelen tener un mal pronóstico, e incluso si su cáncer responde al tratamiento inicial con quimioterapia, la enfermedad casi invariablemente vuelve.

Así que la búsqueda de formas seguras y eficaces para tratar KRAS-tumores mutantes en pacientes con NSCLC es una alta prioridad.⁵²

La dependencia de tumores con mutaciones KRAS en estas llamadas proteínas de exportación nuclear llevó al equipo a XPO1. Esto no fue porque la pantalla identificó la XPO1 como más importante que otras proteínas nucleares de exportación, por una afortunada circunstancia una droga dirigida a XPO1, la KPT-330, ya se ha desarrollado y se está probando como un tratamiento para varios tipos de cáncer.

El tratamiento complementario del cáncer nace con la idea de complementar el tratamiento de cualquier enfermedad cancerosa según las técnicas de la Medicina Biológica, potenciando los efectos de la Medicina Convencional y sin efectos secundarios ni contraindicaciones.⁵²

Las técnicas que utilizamos son compatibles con los tratamientos convencionales que el paciente esté siguiendo y lo que se pretende es aunar esfuerzos para tener el máximo de posibilidades de superar la situación

Por eso, siempre estamos al tanto de las nuevas investigaciones sobre el cáncer como ésta, según la cual los inhibidores de la proteína XPO1 son una estrategia terapéutica prometedora para un considerable grupo de pacientes con cáncer de pulmón.⁵²

IV.32. Cáncer de páncreas y KRAS

Más del 85 por ciento de los casos de cáncer de páncreas (CP) ductales presentan una mutación KRAS en un estadio temprano. Por ello, se ha propuesto la detección de mutaciones en el líquido duodenal o en jugo pancreático como una estrategia de diagnóstico temprano de este tipo de neoplasia.⁵³

La mutación puntual de KRAS a nivel del codón 12 es la alteración molecular más habitual en el CP, detectándose en el 75 por ciento al 90 por ciento de los casos.

Esta mutación actúa promoviendo la angiogénesis, y por tanto la diseminación local y metastásica, por sobreexpresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).⁵⁴

A nivel 427 práctico, la detección de KRAS mutado en secreciones pancreáticas obtenidas mediante colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) puede establecer el diagnóstico precoz de un CP, incluso en los casos radiológicamente indetectables, con incremento del número de pacientes subsidiarios de resecciones curativas, y establecer el diagnóstico diferencial con la pancreatitis, ya que en esta última no se han encontrado mutaciones KRAS.⁵⁴

Etiología y factores de riesgo Los factores de riesgo del cáncer de páncreas son múltiples e incluyen desde el aumento de la edad, el hábito tabáquico, la diabetes mellitus de aparición tardía, la pancreatitis crónica y hereditaria y algunos síndromes de cáncer familiar.⁵⁵

Clínica y diagnóstico La mayoría de los ACDP se presentan en estadios avanzados siendo irreseccables al diagnóstico y en numerosas ocasiones con metástasis hepáticas. Los tumores que se desarrollan en la cabeza suelen dar manifestaciones clínicas más precozmente en forma de ictericia obstructiva o pancreatitis aguda. En cambio, aquellos situados en el cuerpo o la cola tienden a ser asintomáticos, detectándose de forma más tardía.⁵⁶

IV.33. Mutaciones en los genes K-ras cáncer de cuello uterino.

El cáncer cervical es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial. En Colombia, la incidencia estimada es de 29.4 casos por cada 100,000 habitantes. El proceso de carcinogénesis cervical comienza por lesiones escamosas no invasivas que progresan a lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado; en algunos casos, las lesiones progresan a un carcinoma invasivo.⁵⁷

Múltiples hallazgos evidencian que pacientes con distintas neoplasias entre ellas el cáncer cervical evidencia cantidades crecientes de ADN humano en plasma, además de ADN viral.⁵⁷

En otro tipo de neoplasias, como cáncer de colon, esófago, estómago, seno, páncreas, cabeza y cuello y hepático en los cuales el ADN que circula en el plasma también posee las mismas características genéticas (amplificación de oncogenes, mutaciones puntuales en genes supresores de tumor, inestabilidad de

micro satélites, otras) y/o epigenéticas (metilación de regiones promotoras de genes supresores tumorales) del tumor analizado⁴, se abre la posibilidad de usar al ADN de plasma como un blanco importante de estudio, pues su fácil obtención y la posibilidad de que a través de los cambios presentes en el ADN plasmático se puedan detectar no sólo recurrencias locales sino también distantes, lo convierten en una muestra ideal.

Los cambios génicos más estudiados en cáncer cervical son mutaciones en los genes EGFR, H-ras y K-ras.⁵⁷

Otro oncogén estudiado en cáncer cervical es el EGFR, involucrado en la proliferación celular; es un receptor de 170kDa que se encuentra anclado a la membrana celular y se localiza en el cromosoma 7, pertenece a la familia de los receptores tirosina quinasa ErbB, compuesta por cuatro miembros EGFR (ErbB1, ErbB2, ErbB3 y ErbB4). Este receptor presenta varios ligandos entre ellos EGF y TGF α .⁵⁸

Debido a que las mutaciones en los dominios GTPasa para K-ras y H-ras y dominio tirosina quinasa para EGFR se han descrito como unos de los más prometedores marcadores moleculares asociados con la progresión y potenciales herramientas en el monitoreo de aparición de recurrencias y metástasis en tumores sólidos, el objetivo del presente estudio fue determinar si las mutaciones detectadas en cepillados cervicales eran las mismas detectadas en plasma sanguíneo de pacientes con NIC III y cáncer cervical invasivo.⁵⁸

IV.34. Tratamientos se utilizan tras conocer el tipo de RAS.

Los pacientes con RAS de tipo salvaje responden mejor al tratamiento con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Los inhibidores de los EGFR se unen a las proteínas en la superficie de las células cancerosas. En presencia de RAS de tipo salvaje, esta interacción bloquea las señales que le dicen a la célula cancerosa que crezca y se divida, y por lo tanto se detiene su crecimiento. Los fármacos actuales para el tratamiento de los tumores con genes RAS de tipo salvaje son: el cetuximab (Erbitux) y el panitumumab (Vectibix).⁵⁸

V. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.

Variables	Definición	Indicador	Escala
Edad	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento	<ul style="list-style-type: none"> • < 20 años • 21-30 años • 31-40 años • 41-50 años • 51-60 años • 61-70 años • 71-80 años • 81-90 años • >91 años 	Ordinal
Sexo	Conjunto de los individuos que comparten esta misma condición orgánica.	<ul style="list-style-type: none"> • Masculino • Femenino 	Nominal
Condicion del Kras	El gen KRAS elabora la proteína KRAS que participa en las vías de señalización celular, el crecimiento de las células y la apoptosis (muerte de las células). Las sustancias que impiden la actividad del gen KRAS que mutó o su proteína pueden impedir el crecimiento del cáncer.	<ul style="list-style-type: none"> • Mutado • No mutado 	Nominal

VI. MATERIAL Y METODOS

VI.1. Tipo de Estudio

Se realizó un estudio retrospectivo para determinar el Análisis Mutacional del oncogen Kirsten Sarcoma Rat Virus (K-ras) en los pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal en el Instituto de Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014- diciembre 2016.

VI.2. Área del estudio

El estudio se realizó en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) un hospital docente de 2 (Dos) niveles y está ubicado en la Av. Dr. Bernardo Correa y Cidrón 1, zona universitaria; Santo Domingo, Distrito Nacional, delimitado al norte con la Av. Paulo III, al sur con la C/ Dr. Piñeyro, al este con C/ Jonás Salk y al oeste con la C/ Amin Abel Hasbún, respectivamente. Figura 1. (Ver mapa cartográfico y vista área).



IV.3. Universo.

El universo estuvo compuesto por todos los pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal atendidos en Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP), en el periodo de enero 2014- diciembre 2016.

IV.4. Muestra

La muestra estuvo compuesta por todos las pacientes con cancer colorrectal que fueron atendido en dicho instituto oncologico en el que presentaron y presentan algun tipo de patologia de Kirsten Sarcoma Rat Virus (K-ras) y que fueron mutados.

IV.5. Criterios de Inclusión.

1. Pacientes registrados en el hospital con cancer colorrectal.
2. Pacientes que asistirán durante el período de estudio.
- 3 Pacientes con expedientes completo.

IV.6. Criterios de exclusión.

1. Pacientes que no cumplan con los criterios de inclusión.
2. Pacientes con otro tipo de cancer.

IV.7. Instrumento de recolección de datos.

La recolección de datos de la información se realizó a través de un formulario integrado por preguntas abiertas y cerradas, este formulario contiene los datos socio demográficos de los pacientes (Ver anexo VI.2 Instrumento de recolección de datos)

IV.8. Procedimiento.

El formulario fue llenado a partir de las informaciones obtenidas de los expedientes clínicos que se encontrarán en los archivos las cuales serán localizadas a través del libro de registro del departamento de estadística y archivo, estos formularios serán llenados por la sustentante durante el periodo de la investigación bajo la supervisión de un asesor.

IV.9. Tabulación.

La información fue tabulada, computarizada e ilustrada en cuadros y gráficos para mejor interpretación y análisis de la misma utilizando medidas estadísticas.

IV.10. Análisis.

Se analizaron por medio de frecuencias simples y las variables que sean susceptibles de comparación.

IV.11. Aspectos éticos.

El presente estudio fue ejecutado con apego a las normativas éticas internacionales, incluyendo los aspectos relevantes de la Declaración de Helsinki⁸⁵ y las pautas del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS).⁸⁶ El protocolo de estudio y los instrumentos diseñados para el mismo serán sometidos a la revisión del Comité de Ética de la universidad, a través de la Escuela de Medicina y de la coordinación de la Unidad de Investigación de la Universidad, así como a la Escuela Nacional de Oncología de la Liga Dominicana Contra el Cáncer, Inc, , cuya aprobación será el requisito para el inicio del proceso de recopilación y verificación de datos.

Todos los datos recopilados en este estudio fueron manejados con el estricto apego a la confidencialidad. A la vez, la identidad de lo contenido en los expedientes clínicos será protegida en todo momento, manejándose los datos que potencialmente puedan identificar a cada persona de manera desvinculada del resto de la información proporcionada contenida en el instrumento.

Finalmente, toda información incluida en el texto del presente anteproyecto, Tomada en otros autores, será justificada por su llamada correspondiente.

VII. RESULTADOS

Tabla 1. 4. Informe mutacional del Gen KRAS homologo humano del oncogen Kirsten Sarcoma rat Virus(K-RAS) en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014 - diciembre 2016. Según sexo

Sexo	Frecuencia	%
Masculino	301	57.3
Femenino	224	42.7
Total	525	100.0

Fuente expediente clínico

El 57.3 por ciento de los pacientes eran de sexo masculino y el 42.7 por ciento femenino.

Grafico 1. 4. Informe mutacional del Gen KRAS homologo humano del oncogen Kirsten Sarcoma rat Virus(K-RAS) en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014 - diciembre 2016. Según sexo.



Fuente cuadro 1.

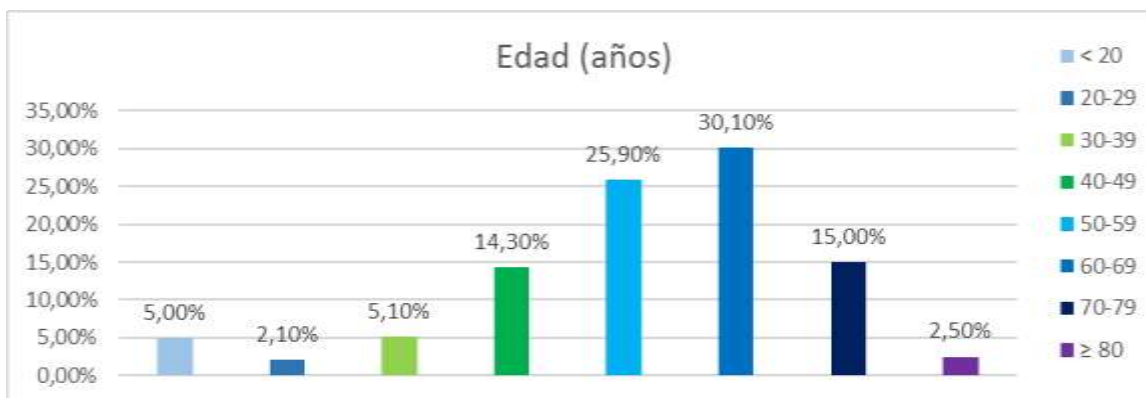
Tabla 2. 4. Informe mutacional del Gen KRAS homologo humano del oncogen Kirsten Sarcoma Rat Virus(K-RAS) en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) (IOHP) en el periodo de enero 2014 - diciembre 2016. Según edad.

Edad (años)	Frecuencia	%
< 20	26	5.0
20-29	11	2.1
30-39	27	5.1
40-49	75	14.3
50-59	136	25.9
60-69	158	30.1
70-79	79	15.0
≥ 80	13	2.5
Total	525	100.0

Fuente expediente clínico

El 30.1 por ciento de los pacientes tenían una edad entre 60 a 69 años, el 25.9 por ciento entre 50 a 59 años, el 15.0 por ciento entre 70 a 79 años, el 14.3 por ciento entre 40 a 49 años, el 5.1 por ciento entre 30 a 39 años, el 5.0 por ciento menor a los 20 años y el 2.5 por ciento mayor e igual a los 80 años.

Grafico 2. 4. Informe mutacional del Gen KRAS homologo humano del oncogén Kirsten Sarcoma Rat Virus(K-RAS) en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014 - diciembre 2016. Según edad.



Fuente cuadro 2.

Cuadro 3. 4. Informe mutacional del Gen KRAS homologo humano del oncogen Kirsten Sarcoma rat Virus(K-RAS) en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP)

Resultado KRAS	Frecuencia	%
ADN degradado	14	2.7
No mutado WT	271	51.6
Mutado K-RAS	139	26.7
En análisis	1	0.2
Falso	3	0.6
Degradado	9	1.7
Mutado	17	3.2
Wild Type WT	16	3.0

Fuente expediente clínico

El 51.6 por ciento de los pacientes en los resultados de KRAS fue no mutado WT, el 26.7 por ciento mutado K-RAS, el 3.2 por ciento mutado, el 3.0 por ciento wild type, el 2.7 por ciento ADN degradado, el 1.7 por ciento degradado, el 0.6 por ciento falso y el 0.2 por ciento en análisis.

Grafico 3. Análisis de la condición del oncogen kirsten sarcoma RAT virus (K-RAS) en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014 - diciembre 2016. Según resultado KRAS.



Fuente cuadro 3

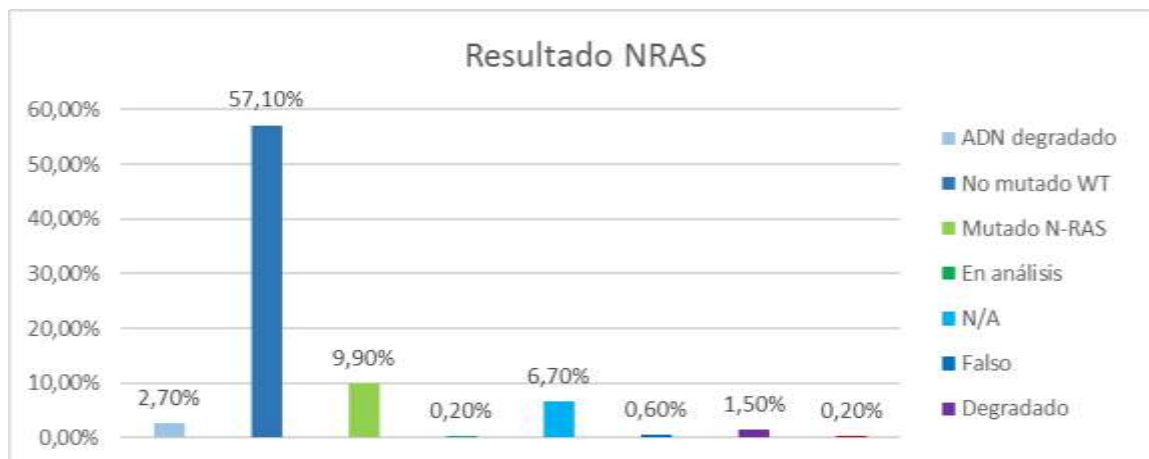
Cuadro 4. Informe mutacional del Gen KRAS homologo humano del oncogen Kirsten Sarcoma rat Virus(K-RAS) en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014 - diciembre 2016. Según resultado NRAS.

Resultado NRAS	Frecuencia	%
ADN degradado	14	2.7
No mutado WT	300	57.1
Mutado N-RAS	52	9.9
En análisis	1	0.2
N/A	35	6.7
Falso	3	0.6
Degradado	8	1.5
Mutado Gly12ser	1	0.2

Fuente expediente clínico

El 57.1 por ciento de los pacientes en los resultados de NRAS fue no mutado WT, el 9.9 por ciento mutado N-RAS, el 6.7 por ciento N/A, el 2.7 por ciento ADN degradado, el 1.5 por ciento degradado el 0.6 por ciento falso y el 0.2 por ciento mutado gly12ser.

Grafico 4. Análisis mutacional del kirsten sarcoma RAT virus (K-RAS) en el Instituto De Oncología Dr. Heriberto Pieter (IOHP) en el periodo de enero 2014 - diciembre 2016. Según resultado NRAS.



Fuente cuadro 4.

VIII. DISCUSIÓN

En un estudio realizado por realizado por Vizcaino Pere Pavón en la Universidad de Bioinformática y Bioestadística en junio del 2018, donde se estudió la implicación de las mutaciones del gen K-RAS siendo el sexo más afectado el masculino con un 52.7 por ciento de los pacientes, siendo muy similar a este estudio que fue de un 57.3 por ciento para los del sexo masculino, lo que muestra que los hombres están más expuestos.

En relación a la edad el 30.1 por ciento de los pacientes tenían una edad entre 60 a 69 años. Asemejándose al estudio realizado por Jeremías Tomás Sierra en el Servicio de Oncología y Hematología. Hospital Privado de Córdoba en 2016. Que fue de un 76.8 por ciento entre las edades de 50 a 65 años.

En esta investigación con relación al resultado de KRAS el 51.6 por ciento de los pacientes presentaron el gen no mutado WT. Resultados similares se obtuvieron de un estudio realizado por Vizcaino Pere Pavón en la Universidad de Bioinformática y Bioestadística en junio del 2018, que es resultado de KRAS presento gen mutado en el 31.9 por ciento de los pacientes.

Con relación al resultado de NRAS presento un 57.1 por ciento el gen no mutado WT, mostrando diferencia en el estudio realizado por Vizcaino Pere Pavón en la Universidad de Bioinformática y Bioestadística en junio del 2018, donde en un 4.8 por ciento de los pacientes en el resultado de NRAS el gen fue mutado.

IX. CONCLUSIONES

1. El 57.3 por ciento de los pacientes eran de sexo masculino.
2. El 30.1 por ciento de los pacientes tenían una edad entre 60 a 69 años.
3. El 51.6 por ciento de los pacientes en los resultados de KRAS fue no mutado WT.
4. El 57.1 por ciento de los pacientes en los resultados de NRAS fue no mutado WT.

X. RECOMENDACIONES

- 1 Los estudios para la evaluación y tratamiento, sobre todo en relación a estudios de biología molecular en cáncer, deberían estar estandarizados y los laboratorios que los procesan, estar certificados con referentes mundiales.
- 2 Debiera establecerse una vigilancia activa a nivel de cada hospital especializado y bajo la responsabilidad de las autoridades regulatorias de salud, para que los exámenes de este tipo, sean confiables.
- 3 Por ser una prueba de rutina para tratar a los pacientes con cáncer colorrectal metastasicos, esta prueba debería ser realizada en el país para minimizar el tiempo de espera de resultado de estas pruebas.
- 4 El manejo del tratamiento del cáncer debería monitorearse continuamente y debería basarse en Guías de Tratamiento con niveles de evidencia suficiente que apoyen las medidas terapéuticas que se ofrezcan.
- 5 Los protocolos de investigación de nuevas moléculas deberían alentarse, pues ayudan a evaluar in situ nuevos tratamientos y biomarcadores que en el futuro ayudarán en la toma de decisiones para actualizar las guías de tratamiento en el país.

XI. REFERENCIAS

1. IA Antes, Lewis PD, Mattos C. Un estudio exhaustivo de Ras mutaciones en el cáncer. *Cancer Res.* 2012; 72: 2457-2467. [PMC libres artículo.
2. Scolnick EM, Stephenson JR, Aaronson SA. Aislamiento de mutantes sensibles a la temperatura del virus del sarcoma murino. *J Virol*; 10: 653-657. [PMC libres artículo. 2011.
3. Andersen GR, Robbins KC. Secuencias de rata de los sarcoma murino de genomas del virus de Kirsten y Harvey: naturaleza, origen, y la expresión en el ARN del tumor de rata. *J Virol.*; 17: 335-351. 2012. [PMC libres artículo]
4. Ellis RW, DeFeo D, Shih TY, Gonda MA, HA Young, Tsuchida N, Lowy DR, Scolnick EM. Los genes p21 src de Harvey y virus del sarcoma de Kirsten se originan de los miembros divergentes de una familia de genes normales de vertebrados. *Naturaleza*; 292 : 506-510. 2010.
5. Krontiris T, Cooper G. Transformación de la actividad de los ADN de tumores humanos. *Proc. Acad.Sci.USA*; 78: 1181-1184. 2011. [PMC libres artículo](#)
6. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R. transferencia bioquímico de una sola copia genes eucariotas utilizando ADN celular total como donante. *Celda.* 14: 725-731. 2011.
7. Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. Sarcoma murino y leucemia virus: ensayo usando líneas clonales de células de ratón de contacto inhibido. *J Virol.* 4: 549-553. 2010.
8. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Un análisis genómico integrado de glioblastoma multiforme humano. *Ciencia.* 321: 1807-1812. 2011.
9. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. Mutaciones IDH1 y IDH2 en gliomas. *N Engl J Med.* 2012; 360 : 765-773.
10. Dabeiba Adriana García, Yazmín Rocío Arias, Fabio Ancízar Aristizábal, Detección de mutaciones en los genes K-ras, H-ras y EGFR en muestras de plasma sanguíneo y cepillado cervical de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) III y cáncer de cuello uterino* Vol. 40 N° 1, 2009 (Enero-Marzo)

11. Iván Roa, Tamara Sánchez, Alejandro Majlis, Kurt Schalper Rev. méd. Chile vol.141 no.9 Santiago set. 2013.
12. JJ Aguirre Anda, V Moreno Nieto, FB Gutierrez Corres, I Felipe Blanco (3), ZS Quintero Niño, ME Jo Velasco, C Gómez González, I Guerra Merino Cursos y Congresos/Reuniones Anuales SEAP-IAP/XXXV Reunión Anual SEAP 2012/ Fecha de Presentacion Viernes 17 16:40 a 17:10 Sesión II Sociedad Española de Anatomía Patológica.División española de la International Academy of Pathology. 2012.
13. Adriana Romero, Walter Orlandi, Juan Carlos González Cáncer Colorectal: características de la expresión del ONCOGEN K-RAS. Revista Gen 2016;70(2)48-53 Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología 48 Volumen 70 N° 2 abril - junio 2016.
14. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. Biol Chem; 386(3): 193-295. 2011.
15. Giuriato S, Felsner DW. How cancers escape their oncogene habit. Cell Cycle;2:329-32. 2011.
16. Lodish HF. Molecular cell biology. 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2011.
17. Croce CM. Oncogenes and cancer. N Engl J Med; 358:502-11. 2010.
18. Kufe DW, Bast RC. Cancer medicine. 6th ed. Hamilton, Ont. ; London: B C Decker, 2012.
19. Martin AC, Facchiano AM, Cuff AL et al. Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. Hum Mutate 2012;19:149-64.
20. Herrera PJC, Vásquez, Palacio. Gonzalo, Ramírez Castro José Luis. Papel del gen TP53 en la oncogénesis. Salud UIS 2014.
21. Abankwa D, Gorfe AA, Inder K, Hancock JF. Ras membrane orientation and nanodomain localization generate isoform diversity. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107:1130-5.
22. Cooper GM. The cell : a molecular approach. 2nd ed. Washington, D.C. Sunderland, Mass.: ASM Press ; Sinauer Associates, 2011.

23. Yamada M, Ichikawa Y, Yamagishi S, Momiyama N, Ota M, Fujii S, et al. Amphireglin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. Apr 15; 14(8): 2351–6. 2011.
24. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jun; 31(6): 637–43.
25. Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, et al. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol*. 2014 Aug; 17(8): 895–904
26. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. New Embo Members' Review. *Embo J*. Jul 3; 19(13): 3159–67. 2010.
27. La Thangue NB & Kerr DJ. Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(10): 587-96.
28. Van Cutsem E et al. Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment. *Ann Oncol* 2010; 21(suppl 5): v93-v97.
29. Sun W. Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2012; 5:63.
30. H. Shen, Y. Yuan, H.G. Hu Clinical significance of K-ras and BRAF mutations in Chinese colorectal cancer patients *World J Gastrointest Oncol*, 17 2011, pp. 808-816.
31. Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper E. Principles and practice of gastrointestinal oncology. 2^a edición. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, Lippincott Wilkins and Williams, 2012.
32. Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, François E, Formento P, Renée N, et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res*; 14: 4830-3. 2012.
33. Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F: Dragging ras back in the ring. *Cancer cell* 2014, 25(3):272-281.
34. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A et al: COSMIC: mining complete cancer genomes in

the Catalogue of BIBLIOGRAFIA 201 Somatic Mutations in Cancer Nucleic Acids Res 2011, 39 (Database issue):D945-950

35. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C et al. Sensitive sequencing method for K-RAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005; 7: 413-421.
36. Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, François E, Formento P, Renée N, et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res*; 14: 4830-35; 2011.
37. Saif MW, Shah M. K-ras mutations in colorectal cancer: a practice changing discovery. *Clin Adv Hematol Oncol*; 7(1):45-53.2012.
38. Simi L, Pratesi N, Vignoli M, Sestini R, Cianchi F, Valanzano R, et al. HighResolution Melting Analysis for Rapid Detection of KRAS, BRAF and PI3KCA Gene Mutations in Colorectal Cancer. *Am J Clin Pathol*; 130: 247-2; 2011.
39. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*; 27: 2091-2096. 2012.
40. Kramer D, Thunnissen FB, Gallegos-Ruiz MI, Smit EF, Postmus PE, Meijer CJLM et al. A fast, sensitive and accurate high resolution melting (HRM) technology- based assay to screen for common K-ras mutations. *Cell Oncol*; 31(3): 161-167; 2012.
41. Genes humanos: ERBB2, homólogo 2 del oncogen de la leucemia viral eritoblastica v-erb-b2, homólogo del oncogen (aviar) derivado del neuro/glioblastoma; KRAS, homólogo del oncogen del sarcoma viral de la rata Kirsten v-Ki-ras2; BRAF, homólogo B1 del oncogen del sarcoma viral muido v-raf revista Q&A *Clinical Chemistry* 56:5 698–701 2010.

42. Arief Suriawinata, Section Chief of Anatomic Pathology, Associate Professor of Pathology, Department of Pathology, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, NH. *Revista Q&A Clinical Chemistry* 56:5. 2010.
43. Estrada, P., Rojas A., Zabala, W., Borjas, L., Soca, L. Frecuencia y asociación clinicopatológico de las mutaciones del oncogen K-ras en pacientes venezolanos con cáncer colorectal. *Invest Clin.* 2009;50(1):55-63.
44. Bresalier, R. Feldman, M., Friedman, L., Sleisenger, M. *Gastrointestinal and Liver disease: Pathophysiology, Diagnosis and Management.* Elsevier (Philadelphia):2215-2261.; 2012.
45. American Cancer Society. *Cancer: Facts & Figures 2013.* Atlanta: American Cancer Society; 2013. p. 12-6.
46. Van Cutsem, E., K-ras Status and efficacy in the first line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The Crystal experience. *J Clin Oncol.* 26(155):1.,2012.
47. DiMarino, A., Benjamin, S. *Gastrointestinal Disease: An Endoscopic Approach.* Philadelphia: Slack Incorporation; 2012:815-834
48. Anderson, S. Laboratory methods for K-ras mutation analysis. *Expert RevMol Diag.* 2011;11(6):635-642. 14. Roa, I., Sánchez, T., Majlis, A., Schalper, K. Mutación del gen K-ras en el cáncer de colon y recto. *Rev med Chil.* 2013;141(9):310-319.
49. Zahrani, A., Kandil, M., Badar, T., Abdelsalam, M., Al-Faiar, A., Ismail, A. Clinical and pathological study of K-ras mutations in colorectal tumors in Saudi Arabia. *Tumori.* 2014;100(1):75-7.
50. Roa, I., Sánchez, T., Majlis, A., Schalper, K. Mutación del gen K-ras en el cáncer de colon y recto. *Rev med Chil.* 2013;141(9):310-319.
51. Tsao D-A, et al. A fast and convenient new technique to detect the therapeutic target, K-ras mutant, from peripheral blood in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2010; 68:51-7.
52. F Ciardiello, HJ Lenz, CH Kohne, *et al.* Effect of KRAS and NRAS mutational status on first-line treatment with FOLFIRI plus cetuximab in patients with

metastatic colorectal cancer (mCRC): New results from the CRYSTAL trial. *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 3; abstrLBA443)

53. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* 2013; 363(9414): 1049-57.
54. Portugal Fernández del Rivero T, Arroyo Yustos M, Navarro Expósito F, Costero Pastor B, Álvarez-Mon Soto M. Cáncer de páncreas. *Medicine* 2001; 8(59): 3165- 317.
55. Partensky C. Toward a better understanding of pancreatic ductal adenocarcinoma: glimmers of hope? *Pancreas*. 2013; 42:729-9.
56. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*;56:1134-52; 2011.
57. Dong SM, Pai PI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013; 11: 3-6.
58. Kim YT, Park SW, Kim JW. Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2012; 87: 84-9.

XII. ANEXOS.

XII.1. Cronograma

Variables	Tiempo: 2016-2019	
Selección del tema	2016	Agosto- Septiembre
Búsqueda de referencias		Octubre- Noviembre
Elaboración del anteproyecto		
Sometimiento y aprobación del anteproyecto		
Ejecución de las encuestas	2017	Enero
Tabulación y análisis de la información	2019	Febrero-Marzo
Redacción del informe		Marzo
Revisión del informe		Abril
Encuadernación		Mayo I
Presentación		Junio

XII.2. Instrumento de recolección de datos.

ANÁLISIS MUTACIONAL DEL KIRSTEN SARCOMA RAT VIRUS (K-RAS) EN EL INSTITUTO DE ONCOLOGÍA DR. HERIBERTO PIETER (IOHP) EN EL PERÍODO DE ENERO 2014- DICIEMBRE 2016.

- 1) Edad: ____ < 20 años ____ 21-30 años ____ 31 – 40 años ____ 41 – 50 años ____ 61-70 años ____ -71-80 años ____ -81-90 años ____ >91 años
- 2) Sexo: Masculino ____ Femenino ____
- 3) Antecedentes clínicos: Hipertensión Arterial (HTA) ____ Diabetes mellitus ____ Dislipemia ____ Sobrepeso/obesidad ____ Enfermedad cerebro vascular ____ Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) ____ Hepatopatía crónica/cirrosis ____ Insuficiencia renal crónica ____ Tumor maligno ____
- 4) Patología encontrada: Si ____ No ____
- 5) Tipo de kras: Mutado ____ No mutado ____
- 6) Frecuencia de mutación: Si ____ No ____
- 7) Grado de diferenciación celular: Grado I ____ Grado II ____ Grado III ____
- 8) Tipo de carcinoma: Adenocarcinoma ____ Mucoide ____ Metatasis ____ Carcinoma ____ Seminoma ____ Colangio carcinoma ____ Epoc ____ Mieloma múltiple ____ Carcinoma endometrial ____ Carcinoma ovárico ____ Pólipos ____ Mucoide ____
- 9) Cirugía previa al tratamiento del cáncer: Si ____ No ____
- 10) Radioterapia: Si ____ No ____

XII.3. Costos y recursos

1. Humanos			
<ul style="list-style-type: none"> • 1 sustentante • 1 asesor (metodológico y clínico) • Personas que participaron en el estudio 			
2. Equipos y materiales	Cantidad	Precio	Total
Papel bond 20 (8 1/2 x 11)	1 resmas	80.00	80.00
Papel Mistique	1 resmas	180.00	180.00
Lápices	2 unidades	5.00	10.00
Borras	2 unidades	10.00	20.00
Bolígrafos	3 unidades	10.00	30.00
Sacapuntas	2 unidades	5.00	10.00
Computador Hardware: Pentium III 700 Mhz; 128 MB RAM; 20 GB H.D.;CD-ROM 52x Impresora HP 932c Software: Microsoft Windows XP Microsoft Office XP MSN internet service Presentación: Sony SVGA VPL-SC2 Digital data projector Cartuchos HP 45 A y 78 D	2 unidades	600.00	1,200.00
Calculadoras	2 unidades	75.00	150.00
3. Información			
Adquisición de libros Revistas Otros documentos Referencias bibliográficas (ver listado de referencias)			
4. Económicos*			
Papelería (copias)	1000 copias	1.00	1000.00
Encuadernación	12 informes	80.00	960.00
Alimentación			1,200.00
Transporte			5,000.00
Inscripción al curso			2,000.00
Inscripción del anteproyecto			
Inscripción de la tesis			
Imprevistos			
Total			\$11,840.00

* Los costos totales de la investigación fueron cubiertos por el sustentante.