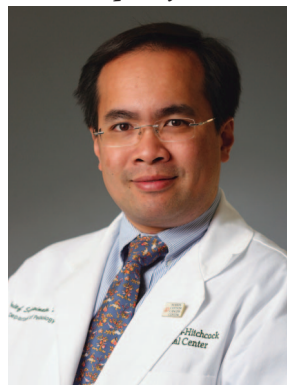


Detección de Mutaciones del Gen KRAS: Una Nueva Mirada a un Antiguo Gen

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 oncogén (también conocido como HER2) ERBB2³ [v-erb-B2 homólogo 2 del oncogén de leucemia viral eritroblástica, homólogo (aviar) del oncogén derivado del neuro/glioblastoma], un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se amplifica en el cáncer de mama humano. Los intereses diagnósticos en este gen nunca llegaron al máximo hasta que este receptor se convirtió en el objetivo de Herceptin, la primera terapia de anticuerpos monoclonales contra un receptor celular. Del mismo modo, el EGFR se ha convertido en el objetivo de ambas terapias de anticuerpos monoclonales dirigidas al dominio de unión y a fármacos de pequeñas moléculas que inhiben su actividad de tirosina quinasa. El gen KRAS (v-Ki-RAS2 homólogo del oncogén viral del sarcoma de la rata Kirsten) es un oncogén conocido que por lo general funciona en la vía del EGFR. Aunque las mutaciones en este oncogén son conocidas por estar asociadas con varios tipos de cáncer humano, sólo 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. 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. 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.

¿Se está realizando rutinariamente en su institución la prueba de mutación del gen KRAS? Si es así, ¿para qué indicaciones clínicas? Si no es así, ¿Cuáles son las barreras que afectan la aplicación?



Arief A. Suriawinata⁴: En nuestra institución, la prueba del gen KRAS para cáncer colorrectal se realiza rutinariamente en los pacientes que están siendo atendidos con terapia anti-EGFR como cetuximab y panitumumab. 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 colorrectal 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 de pulmón.



William K. Funkhouser⁵: Llevamos a cabo la detección de mutaciones del gen KRAS en un subconjunto de casos con cáncer colorrectal y cáncer de pulmón de células menos pequeñas, por lo general en los pacientes que están siendo considerados para terapia con anticuerpos anti-EGFR (colorrectal) o inhibidores de tirosina quinasa anti-EGFR (pulmón).

¹ Joel A. Lifiers, Postdoctoral Fellow, Molecular Pathology and Translational Research Program, Department of Pathology, Dartmouth Medical School, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, NH.

² Gregory J. Tsongalis, Director of Molecular Pathology and Translational Research Program, Department of Pathology, Dartmouth Medical School, Dartmouth-Hitchcock Medical Center and Norris Cotton Cancer Center, Lebanon, NH.

³ Genes humanos: ERBB2, homólogo 2 del oncogén de la leucemia viral eritroblástica v-erb-b2, homólogo del oncogén (aviar) derivado del neuro/glioblas-

toma; KRAS, homólogo del oncogén del sarcoma viral de la rata Kirsten v-Ki-ras2; BRAF, homólogo B1 del oncogén del sarcoma viral mudo v-raf.

⁴ Arief Suriawinata, Section Chief of Anatomic Pathology, Associate Professor of Pathology, Department of Pathology, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, NH.

⁵ William K. Funkhouser, Professor, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Director of Anatomic and Surgical Pathology, UNC Hospitals, University of North Carolina, Chapel Hill, NC.



Marc Ladanyi⁶: Sí, llevamos a cabo la prueba de mutación del gen KRAS habitualmente en dos situaciones clínicas: adenocarcinoma de pulmón y carcinoma colorrectal metastásico. En el primer caso, todos los casos se someten a la prueba de mutaciones del EGFR primero y, si es negativa, pasan a la prueba del gen KRAS. Las mutaciones del EGFR y del gen KRAS se excluyen mutuamente en el adenocarcinoma de

pulmón. Probamos todos los adenocarcinomas de pulmón resecaados dado que una gran proporción se resecaará. Probamos solamente el carcinoma colorrectal metastásico, ya que, en general, la mayoría de los carcinomas colorrectales son curables mediante cirugía.



Jan A. Nowak⁷: En la actualidad, las muestras están siendo enviadas a un laboratorio de referencia para las pruebas del gen KRAS. Las solicitudes para las pruebas del gen KRAS provienen de los oncólogos quienes determinan las opciones de tratamiento para los pacientes con carcinoma colorrectal. Nuestro laboratorio está en proceso de validación de un ensayo para la

prueba del gen KRAS para poder aplicarla lo más pronto posible.

J. Marc Pipas⁸: En nuestra institución, el Grupo de Oncología GI está realizando con regularidad pruebas de mutación del gen KRAS a todos los pacientes con cáncer colorrectal metastásico en los que se está considerando la terapia anti-EGFR. Esto está en consonancia con la Opinión Clínica Provisional de la Sociedad Americana de Oncología Clínica publicada en 2009.

Ante la falta de respuesta hacia los inhibidores del EGFR en pacientes con mutaciones del gen KRAS, la terapia anti-EGFR no es apropiada en este grupo.

¿Qué tipos de decisiones de tratamiento se basan en el estado del gen KRAS, y son análisis retrospectivos de los tumores de los pacientes estudiados?

Arief A. Suriawinata: La decisión de tratar a los pacientes con la terapia anti-EGFR depende en gran medida del estado de mutación del gen KRAS, es decir, la terapia anti-EGFR se administra sólo en pacientes con KRAS no mutado. Estudios retrospectivos sobre las características del tumor podrían ser útiles para predecir el estado de la mutación del gen KRAS y la comprensión de las características histológicas específicas asociadas con la mutación del gen KRAS, por ejemplo, nuestro reciente estudio en cáncer colorrectal mostró que la mayoría de los cánceres colorrectales con adenoma vellosos preexistentes persistentes fueron positivos para la mutación del gen KRAS.

William K. Funkhouser: Datos de los ensayos mostraron que ninguno de los pacientes con carcinoma colorrectal con una mutación activadora del gen KRAS ha respondido al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR. Los carcinomas de los pacientes que no responden a la terapia de primera línea pueden ser examinados retrospectivamente en busca de la presencia de mutaciones puntuales activadoras del gen KRAS en los codones 12, 13 y 61 mediante el uso de la plantilla de ADN extraído de los bloques de parafina.

Marc Ladanyi: Las mutaciones del gen KRAS son un predictor negativo muy fuerte de la respuesta a las terapias dirigidas al EGFR en el adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma colorrectal. Si no está disponible una muestra para las pruebas, el análisis retrospectivo de la muestra quirúrgica inicial de un paciente es útil, ya que las mutaciones del gen KRAS están presentes normalmente en el diagnóstico y se mantienen durante todo el curso de la enfermedad. Por supuesto, se debe tener en cuenta la posibilidad de cánceres primarios múltiples o de un segundo cáncer.

Jan A. Nowak: Gran cantidad de estudios han demostrado que los pacientes con metástasis de tumores colorrectales que albergan mutaciones en los codones 12 y 13 del gen KRAS no se benefician del tratamiento

⁶ Marc Ladanyi, Attending Pathologist and Chief of Molecular Diagnostics Service, Department of Pathology, Member, Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY.

⁷ Jan A. Nowak, Director of Molecular Diagnostics Laboratory, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Evanston Hospital NorthShore University

HealthSystem, Evanston, IL.

⁸ J. Marc Pipas, Associate Professor, Department of Medicine, Director GI Oncology Program, Dartmouth Medical School and Norris Cotton Cancer Center, Lebanon, NH.

con cetuximab o panitumumab. Los pacientes cuyos tumores tienen secuencias en los codones 12 y 13 no mutados muestran una respuesta parcial a esos agentes. Para los pacientes que habían iniciado este tipo de tratamiento, las pruebas del gen KRAS serían de utilidad para determinar el potencial del uso continuo de esos agentes.



J. Marc Pipas: El KRAS no mutado es necesario pero no suficiente para responder a los inhibidores del EGFR en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Además, se ha demostrado que el gen KRAS mutado [y BRAF (homólogo B1 del oncogén del sarcoma murino viral v-raf)] se asocia con una peor supervivencia en general. Dado que aproximadamente el 40% de las muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal presentan mutaciones del gen KRAS, el análisis de la mutación del gen KRAS es fundamental cuando se está considerando la terapia anti-EGFR. Los pacientes con tumores que presentan mutaciones del gen KRAS deberán ser considerados para otros tratamientos. Desafortunadamente, esto limita las opciones terapéuticas, pero los ensayos clínicos están abiertos para atender específicamente a los pacientes con tumores mutados del gen KRAS.

madamente el 40% de las muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal presentan mutaciones del gen KRAS, el análisis de la mutación del gen KRAS es fundamental cuando se está considerando la terapia anti-EGFR. Los pacientes con tumores que presentan mutaciones del gen KRAS deberán ser considerados para otros tratamientos. Desafortunadamente, esto limita las opciones terapéuticas, pero los ensayos clínicos están abiertos para atender específicamente a los pacientes con tumores mutados del gen KRAS.

La detección de mutaciones somáticas en tumores potencialmente heterogéneos puede ser problemática. ¿Cómo afecta esto la interpretación de estos resultados?

Arief A. Suriawinata: Aunque hacemos el mejor esfuerzo para seleccionar una sección que sea la más representativa del tumor para las pruebas del gen KRAS, nos damos cuenta de que, si bien es poco frecuente, la heterogeneidad del tumor puede ser un problema en los grandes casos de cáncer colorrectal con algunas líneas de diferenciación. Por otra parte, las pruebas del gen KRAS se pueden realizar en una metástasis que presumiblemente representa el clon más agresivo si se sospecha de heterogeneidad tumoral. Nuestro laboratorio utiliza los controles del 5% para cada una de las siete mutaciones que se componen de oligonucleótidos sintéticos de tipo no mutante y mutante mezclado en una proporción de 95:5, respectivamente. Mi preocupación con los laboratorios que informan de la detección de múltiples mutaciones del gen KRAS en el mismo tumor, es que esto puede reflejar algunos problemas técnicos en la realización de los ensayos debido a la proximidad de las bases que normalmente han mutado (codones 12 y 13) vs heterogeneidad tumoral real.

idad de las bases que normalmente han mutado (codones 12 y 13) vs heterogeneidad tumoral real.

William K. Funkhouser: La mezcla rutinaria de ADN del gen KRAS de tipo silvestre y mutante implica la necesidad de una alta sensibilidad para la detección de las mutaciones puntuales en los codones 12, 13 y 61. Nosotros usamos los controles positivos enriquecidos al 5% y utilizamos la piro secuenciación para la detección de las mutaciones puntuales. La secuenciación de Sanger sería menos sensible, y el análisis de la curva de fusión requeriría la secuencia de confirmación.

Marc Ladanyi: En nuestra experiencia, los controles de las principales alteraciones genéticas tempranas y las mutaciones del gen KRAS (o mutaciones del EGFR) rara vez muestran heterogeneidad intratumoral genuina. Es probable que la mayoría de los casos con aparente heterogeneidad intratumoral para las mutaciones del gen KRAS en realidad representen una prueba de las áreas con diferente contenido de tumor, algunas de las cuales podrían estar debajo del nivel de sensibilidad del método de prueba (normalmente secuenciación de Sanger). Otros casos de la heterogeneidad de las mutaciones del gen KRAS pueden representar separaciones básicas. Hemos visto varios pacientes con múltiples adenocarcinomas pulmonares primarios, cada uno con una mutación diferente (EGFR o KRAS).

Jan A. Nowak: No estoy consciente de que alguien haya abordado sistemáticamente la cuestión de la heterogeneidad potencial del tumor con respecto a la mutación del gen KRAS en los tumores colorrectales. Hasta que haya datos de buena calidad, esto seguirá siendo un problema hipotético. Lo que sí sabemos, sin embargo, es que cerca del 30% al 40% de los tumores de colon presentan mutaciones del gen KRAS, y que estos tumores no son propensos a responder a los agentes anti-EGFR señalados anteriormente. Los ensayos que son similares en diseño y metodología deberían ser tan predictivos como los utilizados para establecer la observación KRAS-EGFR. Estos son los ensayos que los laboratorios están realizando actualmente. En caso de que la micro heterogeneidad tumoral demuestre que es un factor, entonces la interpretación de los resultados de la prueba del gen KRAS tendrán que tomar eso en cuenta. Tampoco se sabe si los tumores que muestran una heterogeneidad significativa del gen KRAS responderán de manera diferente a las terapias anti-EGFR.

J. Marc Pipas: En nuestra institución, tenemos experiencia con las pruebas internas para las mutaciones somáticas del gen KRAS mediante el uso de PCR en tiempo real y la química de la sonda Toman. Hemos demostrado que este es un método confiable, fácil de

usar y vigoroso que puede ser utilizado para una prueba de bajo volumen utilizando las muestras de tejido mojado en parafina, así como material de las muestras de aspiración con aguja fina conservadas en fijadores a base de alcohol. Creemos que este enfoque es razonable para pruebas clínicas generalizadas.

¿Usted cree que las pruebas de mutaciones del gen KRAS se extenderán a otro tipo de tumores?

Arief A. Suriawinata: Las pruebas de otros tipos de tumores sólo ocurrirían si la terapéutica puede dirigirse a esta vía de transducción de señales en estos otros tumores. Debido a que el EGFR también juega un papel importante en otros tumores, este escenario es muy probable.

William K. Funkhouser: La detección de la mutación del gen KRAS se debe considerar para cualquier malignidad en la que se está tomando en cuenta el tratamiento de quinasas ascendentes con anticuerpos o inhibidores de la tirosina quinasa. La detección de la mutación BRAF también debe considerarse, ya que la activación de las mutaciones BRAF también podría impedir la respuesta a la terapia anti-EGFR.

Marc Ladanyi: En la actualidad, las mutaciones del gen KRAS se utilizan como predictores negativos de la respuesta a las terapias dirigidas al EGFR, por lo que los tipos de tumores probados son aquellos en los que las terapias dirigidas al EGFR son ya de uso generalizado, es decir, el adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma colorrectal. Sin embargo, los enfoques dirigidos a los cánceres de KRAS mutado se encuentran en distintas fases de desarrollo clínico y tienden a impulsar la expansión de las pruebas del gen KRAS a través de una gama más amplia de tipos histológicos de tumores.

Jan A. Nowak: Es muy probable. Las mutaciones del gen KRAS son activadores intermedios de la vía de señalización del EGFR, probablemente el mecanismo por el cual esas mutaciones eluden la eficacia de los antagonistas del EGFR. En el cáncer de pulmón de células no pequeñas, según se reporta, las mutaciones del gen KRAS y las del EGFR se excluyen mutuamente. Es probable que las pruebas de mutación del gen KRAS sean parte del algoritmo para la evaluación de la vía del EGFR en el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

J. Marc Pipas: La prueba del gen KRAS, así como las pruebas de otros componentes de la vía de transducción de señales (como BRAF) del EGFR-MAPK, continuará siendo evaluada en otros tipos de tumores y escenarios clínicos. Además, ya que se descubrieron otros componentes de las vías metabólicas del tumor, estos sin duda se perseguirán como posibles factores pronósticos y predictivos en una variedad de otros cánceres.

Contribuciones de los autores: Todos los autores confirmaron que contribuyeron al contenido intelectual de este documento y alcanzaron los siguientes requerimientos: a) contribuciones significativas en la concepción y diseño, adquisición, análisis e interpretación de los datos; b) elaboración y revisión del contenido intelectual del artículo y c) aprobación final del artículo publicado.

Declaración de potenciales conflictos de interés de los autores: Ningún autor declaró algún conflicto de interés.

Papel del patrocinador: Las organizaciones de financiamiento no desempeñaron ningún papel en el diseño del estudio, la elección de los pacientes reclutados, revisión e interpretación de datos, la preparación o aprobación del manuscrito.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2009.138735
