

REVISIÓN

Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon

Javier Hernández-Losa^a, Julián Sanz^b, Stefania Landolfi^a, Fernando López-Ríos^c, José Palacios^d, María Dolores Bautista^e, Eduardo Díaz-Rubio^b, Josep Taberner^a, Jesús García Foncillas^f y Santiago Ramón y Cajal^{a,*}

^a Departamento de Anatomía Patológica y Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

^b Departamento de Anatomía Patológica y Servicio de Oncología Médica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

^c Laboratorio de Dianas Terapéuticas, Hospital Universitario Madrid Sanchinarro, Madrid, España

^d Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, España

^e Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga, España

^f Servicio de Oncología Médica, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, España

Recibido el 27 de octubre de 2011; aceptado el 27 de noviembre de 2011

Disponible en Internet el 22 de febrero de 2012

PALABRAS CLAVE

Cáncer colorrectal;
Gen KRAS;
Determinación de
mutaciones

Resumen Las determinaciones de mutaciones en el gen KRAS en el cáncer colorrectal en España se han venido realizando de manera sistemática en relativamente pocos centros, o bien se han realizado en un contexto de ensayo clínico. No obstante, gracias a la implementación de nuevas herramientas terapéuticas basadas en anticuerpos monoclonales frente al EGFR, el conocimiento del estado mutacional de KRAS es hoy en día un factor clave para la toma de decisiones terapéuticas debido a su valor predictivo negativo de respuesta al uso de dichos tratamientos.

Este hecho ha potenciado la necesidad de la implementación de dichas determinaciones en la mayoría de los servicios de Anatomía Patológica de una manera estandarizada dentro de la práctica asistencial.

Esta revisión propone una serie de recomendaciones generales con el fin de estandarizar la determinación de las mutaciones de KRAS, exponiendo los diferentes métodos técnicos disponibles, sus características y los aspectos clínicos relacionados, que serán de interés a la hora de incorporar dichas determinaciones en la rutina asistencial.

© 2011 SEAP y SEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Colorrectal cancer;
KRAS gene;
Determination of
mutations

Guidelines for kras gene mutations testing in colorectal cancer

Abstract Various centres in Spain systematically perform mutational status analyses of KRAS in colorectal cancer, some of which are related to various clinical trials. However, in the light of the use of anti-EGFR monoclonal antibodies in the treatment of colorectal cancer, the predictive value of KRAS has become a key factor in therapeutic decision making.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sramon@vhebron.net (S. Ramón y Cajal).

Thus there is a growing necessity for the implantation of a standardized method of KRAS mutation analysis in the majority of pathology laboratories.

The characteristics and associated clinical aspects of the different techniques available are reviewed and general recommendations for the standardization of KRAS mutation analysis are proposed.

© 2011 SEAP y SEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es la patología tumoral con mayor incidencia en los países occidentales; junto con los tumores de mama y de pulmón, son los que conllevan mayor mortalidad mundial. Alrededor del 25-30% de los pacientes se presentan de inicio con tumores metastásicos (estadio IV) y del resto, principalmente los diagnosticados en estadios II o III, más del 20-50% van a progresar a estadios más avanzados y metástasis. La supervivencia global a 5 años es de aproximadamente el 50%, llegando a ser del 10% en los pacientes con enfermedad en estadio IV¹.

Dada la gran incidencia y las altas tasas de mortalidad, se han ido aplicando diversos protocolos terapéuticos basados en agentes quimioterapéuticos generales, y más recientemente se han implementado nuevos protocolos que prevén el uso combinado de dichos quimioterapéuticos con anticuerpos monoclonales frente a dianas oncogénicas específicas. El abordaje con protocolos quimioterapéuticos clásicos sigue siendo fundamental en el tratamiento, y se aplican de manera combinada diferentes agentes, como platinos, irinotecan, 5 Fu, capecitabine, etc., siguiendo los esquemas propuestos en diversos protocolos clínicos. No obstante, en los dos últimos años, y gracias a tratamientos basados en anticuerpos monoclonales contra el *epidermal growth factor receptor* (EGFR) y frente al *vascular endothelial growth factor* (VEGF)^{2,3}, los abordajes terapéuticos del cáncer de colon han sido modificados sustancialmente, siendo hoy por hoy la combinación de anticuerpos monoclonales frente al EGFR (cetuximab, panitumumab) y frente al VEGF (bevacizumab) con quimioterapéuticos clásicos como el irinotecan los protocolos más efectivos para pacientes con enfermedad metastásica.

Patología molecular del cáncer de colon

En el cáncer de colon, como en la mayoría de los tumores, la acumulación de alteraciones oncogénicas se produce de manera progresiva, desde lesiones iniciales hiperplásicas, con displasia, hasta la formación de adenomas, de carcinomas intraepiteliales, de carcinomas infiltrantes y finalmente de metástasis ganglionares y/o a distancia. Todo este proceso de cambios histopatológicos requiere la acumulación de numerosas alteraciones moleculares que puede conllevar más de 10 años.

Molecularmente, se pueden distinguir 2 grandes tipos de mutaciones, y más frecuente (85%), se encuentra asociado a inestabilidad cromosómica, mientras que el otro grupo está asociado a la presencia de inestabilidad de microsatélites o a alteración de genes específicos de reparación del ADN

(alrededor del 8-12%)⁴. Las alteraciones más frecuentes son la pérdida de función de gen APC y las alteraciones en la ruta de WNT, incluso previas a las alteraciones morfológicas. Posteriormente, y en fases de adenomas de pequeño tamaño, es frecuente detectar mutaciones del oncogén KRAS o B-RAF, y en adenomas grandes se pueden observar mutaciones de SMAD4 o DCC. En los carcinomas pueden coexistir mutaciones de p53 con otras alteraciones genéticas⁵. En el complejo bosque de alteraciones moleculares, de hasta varias decenas por tumor, se pueden distinguir dos tipos fundamentales: a) las alteraciones genéticas centrales para el desarrollo del tumor, es decir que promueven la proliferación celular y que se denominan desencadenantes o *drivers*, y b) las alteraciones genéticas acompañantes, que se cree juegan un papel muy secundario en el desarrollo del tumor y que se denominan pasajeras o *passengers*. Gracias a los trabajos realizados por Weinberg⁶ en relación a la biología tumoral, hoy en día se conocen con más detalle los mecanismos implicados en la transformación y la progresión tumoral. Brevemente, las células tumorales presentan alteraciones en las grandes rutas metabólicas celulares, como son la vía de señalización celular, el ciclo celular, la apoptosis, la invasividad y la angiogénesis. En ese sentido, en la mayoría de los tumores epiteliales la activación de las vías de señalización, independiente de las alteraciones oncogénicas presentes, da lugar a una activación constitutiva de las mismas. En el cáncer de colon, se piensa que la señalización mediada por el EGFR —ya sea por activación, por incremento de los ligandos o bien por alteraciones de los factores que transmiten la señal de la membrana al núcleo— desencadenan un aumento de la proliferación tumoral (fig. 1).

EGFR y KRAS en el cáncer de colon

Subyacente al EGFR (fig. 1) y tras la activación del mismo, la señal puede dirigirse por tres grandes vías de señalización hacia el interior de la célula: a través de la activación de RAS-BRAF-MAPK, tras la activación de PI3K-AKT-PTEN-mTOR y mediante la vía de STAT3. Por tanto, como *drivers* de la señal proliferativa se podrían encontrar tanto el EGFR como KRAS, B-RAF, PIK3CA, PTEN, etc.

Dentro de la familia de genes RAS se conocen los 3 miembros H-RAS, N-RAS y KRAS, y es el último el que presenta mayor frecuencia mutación en los carcinomas de colon. Estos genes codifican en condiciones normales una serie de proteínas ras, las cuales transmiten la señalización produciendo mediante la activación de receptores de membrana. La proteína ras inactiva está unida a GDP y, al estimarse, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) favorece la formación de GTP-ras, que es la forma activa. De forma rápida, dicho GTP es hidrolizado a GDP por la

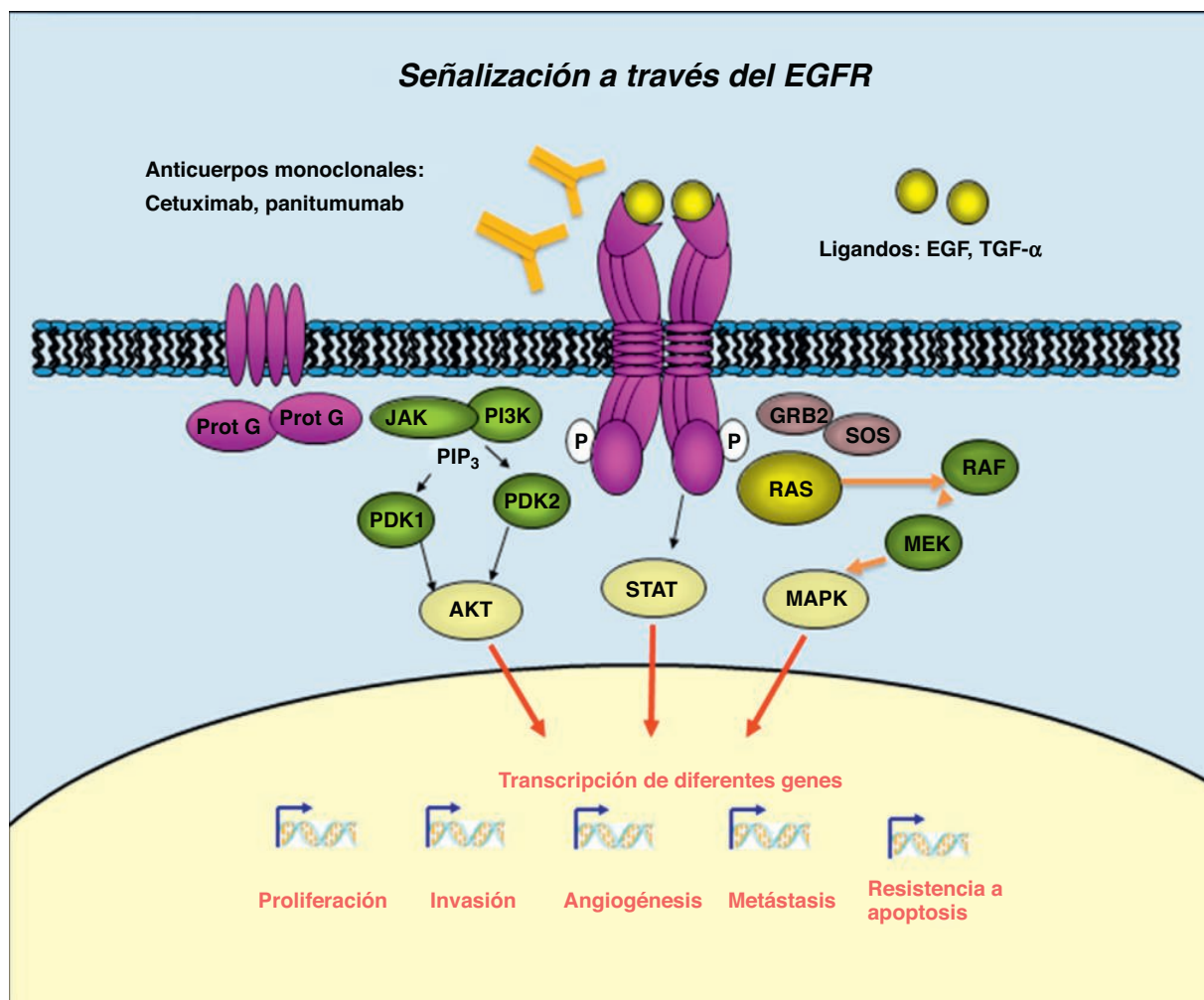


Figura 1 Esquema de señalización mediada por *epidermal growth factor receptor* (EGFR).

actividad GTPasa intrínseca de las proteínas ras, inactivándose. Cuando hay mutaciones de KRAS, la actividad GTPasa queda bloqueada y la proteína ras permanece constitutivamente activada y unida a GTP. Dichas mutaciones suelen ocurrir en los codones 12 y 13, y en mucho menor frecuencia en el codón 61⁷.

B-RAF codifica para una quinasa serintreonina que es un sustrato de la actividad de KRAS. Las mutaciones del B-RAF son generalmente excluyentes con las mutaciones del KRAS y se detectan en aproximadamente el 8-10% de los carcinomas colorrectales. En algunos trabajos se han asociado mutaciones de B-RAF con una falta de respuesta a tratamientos con anticuerpos monoclonales anti-EGFR, pero el carácter de factor pronóstico y predictivo del gen aun no está corroborado y quedaría aún por confirmar. No obstante, hoy los resultados publicados no han sido validados, y hoy por hoy las mutaciones de B-RAF tienden a asociarse con un período libre de enfermedad más corto y una disminución de la supervivencia global, independientemente del estatus del KRAS y de los tratamientos⁸.

Otros genes subyacentes al receptor de EGFR pueden estar activados por mutaciones hasta en el 9-10% de los casos, como el PIK3CA, o por pérdida de función, como PTEN, hasta en el 40% de los casos.

Datos clínicos de la terapia anti-EGFR en el cáncer de colon

El cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que reconoce el dominio extracelular del EGFR, un receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa de la familia de los receptores HER. La actividad de cetuximab fue inicialmente ensayada en monoterapia en pacientes no seleccionados con CCR avanzado refractario a quimioterapia convencional (fig. 2). En este contexto el cetuximab inducía una tasa de respuestas modesta (8-11%) en pacientes previamente tratados con irinotecan^{9,10}, tasa que se incrementaba cuando se combinaba con irinotecan en esta misma población de pacientes. El estudio BOND fue un estudio aleatorizado en el que se observó que la combinación de cetuximab + irinotecan inducía el doble de respuestas (22,9 vs 10,8%; $p=0,007$) que el cetuximab en monoterapia (4,1 meses vs 1,5 meses; $p < 0,001$)⁹⁻¹¹, demostrando que la adición de dicho fármaco era capaz de revertir la resistencia al irinotecan en un número significativo de pacientes. En el mismo subgrupo de pacientes refractarios al irinotecan el estudio BOND-2³ demostró que el uso de irinotecan en combinación con bevacizumab y cetuximab inducía una

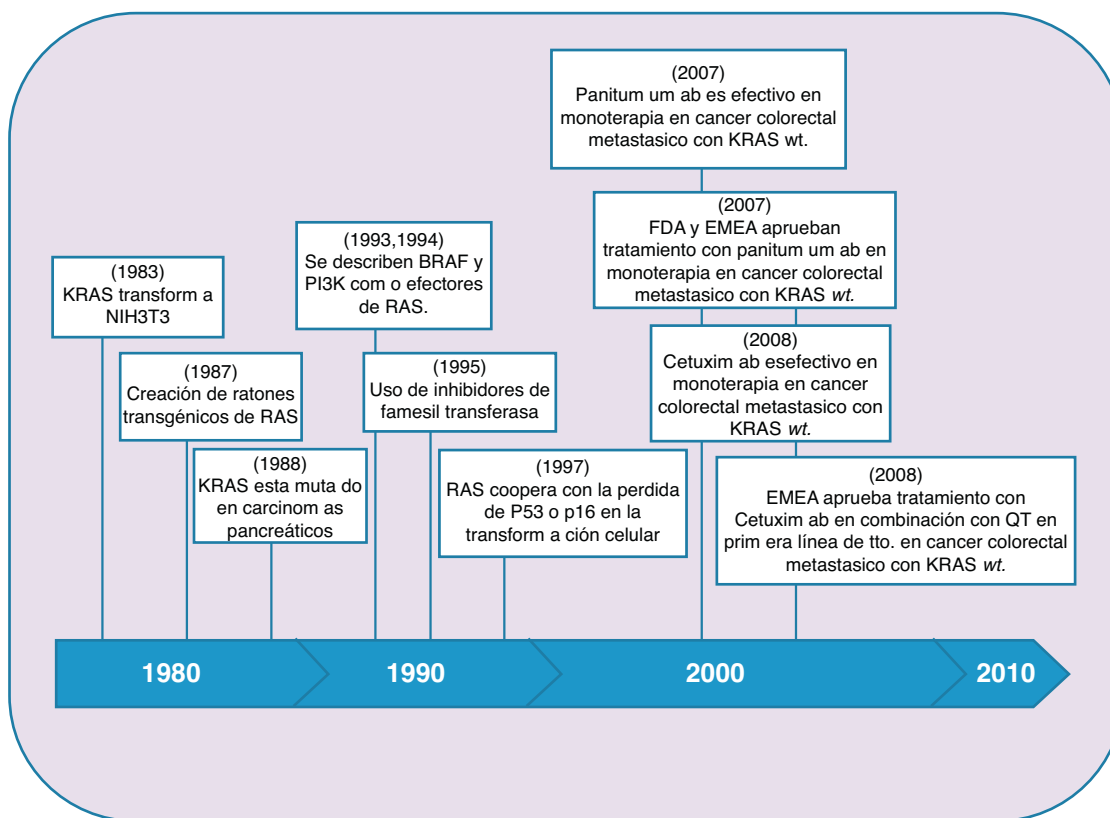


Figura 2 Cuadro cronológico de la evolución de KRAS como biomarcador.

mejoría en cuanto a la tasa de respuesta (38%) y al tiempo hasta la progresión (8,5 meses) en esta población de pacientes pretratados. En 2008 se demostró que la presencia de mutaciones en el gen KRAS era un factor predictivo negativo relevante, ya que seleccionaba aproximadamente al 40% de pacientes que no se benefician de los tratamientos dirigidos frente al EGFR. Así, se ha observado que en pacientes con KRAS nativo, el empleo de cetuximab en monoterapia, comparado con el mejor tratamiento de soporte, prolongaba significativamente la supervivencia libre de progresión (3,7 meses vs 1,9 meses; HR, 0,40; $p < 0,001$) y la supervivencia global (9,5 meses vs 4,8 meses; HR, 0,55; $p < 0,001$) con tasas de respuesta del 12,8 frente al 1,2%¹². El panitumumab, por su parte, es un anticuerpo monoclonal totalmente humanizado que reconoce el dominio extracelular del EGFR. Este mismo año 2008 se pudo observar que, en pacientes con un KRAS nativo, el empleo de panitumumab en monoterapia, comparado con el mejor tratamiento de soporte, prolongaba significativamente la supervivencia libre de progresión (12,3 semanas vs 7,3 semanas; HR, 0,45; $p < 0,001$) y la supervivencia global (8,1 meses vs 7,6 meses; HR, 0,67; $p < 0,001$), con tasas de respuesta del 17 frente al 0%¹³.

En segunda línea de tratamiento los resultados del estudio EPIC, comparando irinotecan en monoterapia vs irinotecan con cetuximab, tras mostrarse a una primera línea basada en oxaliplatino, han demostrado un beneficio en la tasa de repuestas (16,4 vs 4,2%; $p < 0,0001$) y supervivencia libre de progresión (4,0 meses vs 2,6 meses; HR, 0,69; $p < 0,0001$), aunque el estudio no consiguió demostrar el objetivo primario de incremento de supervivencia global (10,7 meses vs

10 meses; HR, 0,975; $p = 0,71$). No obstante, este estudio se llevó a cabo en una población no seleccionada en función de KRAS.

El panitumumab, por su lado, ha sido comparado en segunda línea en combinación con FOLFIRI, pudiendo determinarse en esta población el estado mutacional de KRAS donde se han mostrado un beneficio en la tasa de repuestas en los pacientes con KRAS nativo (35 vs 10%; $p < 0,0001$) y supervivencia libre de progresión (5,9 meses vs 3,9 meses; HR, 0,73; $p = 0,004$), aunque el estudio no consiguió demostrar un incremento de supervivencia global (14,5 meses vs 12,5 meses; HR, 0,85; $p = 0,12$)¹⁴.

En el estudio Prime se ha podido evaluar el papel del panitumumab en primera línea en combinación con FOLFOX, evaluándose el estado mutacional de KRAS de la población, mostrando en la población con KRAS nativo un aumento significativo de supervivencia libre de progresión (9,6 meses vs 8 meses; HR, 0,80; $p = 0,02$), no mostrando un aumento significativo en la supervivencia total (23,9 meses vs 19,7 meses; HR, 0,83; $p = 0,072$)¹⁵.

El cetuximab también se ha ensayado en primera línea tanto en combinación con esquemas basados en oxaliplatino como en combinación con FOLFIRI. De nuevo estos estudios se llevaron a cabo antes de que se implantara el uso de la determinación de estado mutacional de KRAS, si bien retrospectivamente se ha logrado analizarlo en la mayoría de la población incluida. El estudio OPUS es un estudio fase II aleatorizado que comparaba FOLFOX4 + cetuximab frente a FOLFOX4⁵. La subpoblación con KRAS nativo se benefició claramente del tratamiento con cetuximab, con tasas

Tabla 1 Importancia del KRAS en el tratamiento del cáncer de colon

- Para optimizar la selección de candidatos a recibir terapias basadas en inhibidores específicos se debe tener en cuenta que dentro de las vías de señalización existen otros factores que pueden estar también alterados e inducir proliferación celular.
- Las mutaciones de KRAS, que se asocian a una activación constitutiva, confieren resistencia a los tratamientos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR.
- Hoy en día el estudio mutacional de KRAS en cáncer colorrectal está aprobado por la FDA y por la EMEA como paso previo a la aplicación clínica de anticuerpos monoclonales contra el EGFR.

EGFR: *epidermal growth factor receptor*; EMEA: Agencia Europea de Medicamentos; FDA: Food and Drug Administration.

de respuesta (57 vs 34%; $p=0,003$) y supervivencia libre de progresión (8,3 meses vs 7,2 meses; HR, 0,567; $p=0,006$) significativamente superiores que las de los pacientes que solo recibieron FOLFOX, y tasas de resección R0 de metástasis también mayores (9,8% frente al 4,1%)^{16,17}. De manera similar, los resultados globales del estudio CRYSTAL⁸, que comparaba FOLFIRI con FOLFIRI más cetuximab en pacientes con CCR avanzado en primera línea de tratamiento, mostraron un beneficio a favor de la rama con cetuximab en cuanto a tasa de respuestas (46,9 vs 38,7%; $p=0,0038$) y supervivencia libre de progresión (8,9 meses vs 8 meses; HR, 0,85;

Tabla 2 Indicaciones para la determinación de KRAS

- El momento de decidir la determinación puede depender del *oncólogo*, o se puede decidir en *grupos multidisciplinares* que establezcan algoritmos en los que el *patólogo* la solicita de entrada en estadios avanzados o incluso en el momento del diagnóstico histopatológico inicial de cualquier tumor.
- En el momento actual, en pacientes en estadios avanzados hay que seguir las indicaciones de las sociedades nacionales e internacionales.

Tabla 3 Fase pre-analítica de la determinación de la prueba

Fase pre-analítica

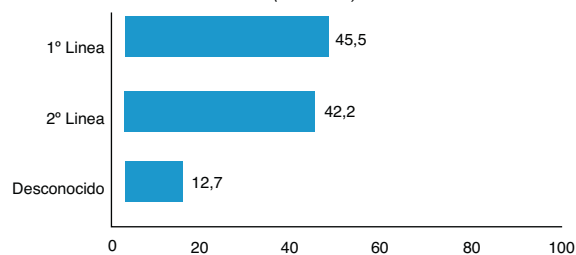
Fijación de la muestra

- Rápida: en la primera hora tras la obtención de la muestra
- Utilizar formol neutro tamponado al 10% durante un tiempo inferior a 24 h: 6-12 h en biopsias endoscópica y 8-24 h en piezas quirúrgicas.
- Evitar fijadores en alcohol (B5, PEN-FIX) que contengan mercurio (BOUIN, ZENKER) o métodos de fijación rápida basados en el uso de microondas.

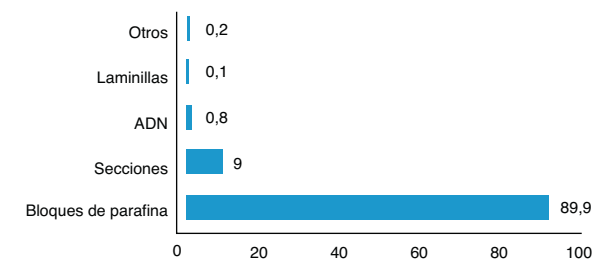
Procesamiento de la muestra

- El procesamiento de la muestra se realizará siguiendo el protocolo estándar.

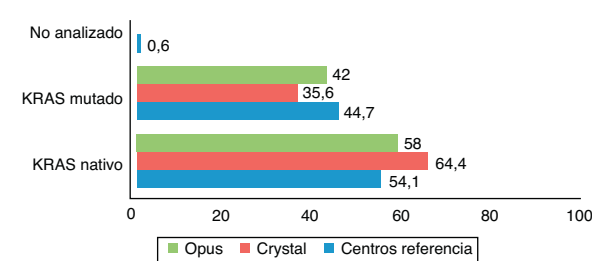
A % de pacientes tratados acorde a la línea de tratamiento recibido (n=12262)



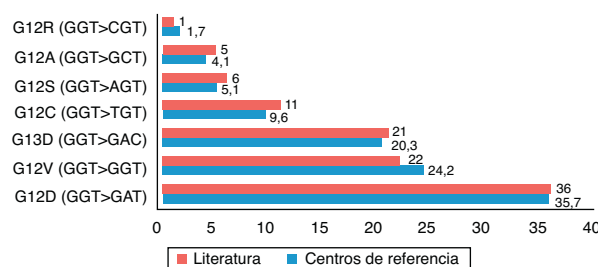
Distribución basada en el tipo de muestra analizada (n=12262)



Detección de mutaciones de KRAS en tumores humanos (n=12262)



B Frecuencia de mutaciones de KRAS (n=12262)



Problemas metodológicos en la determinación de KRAS (n=12262)

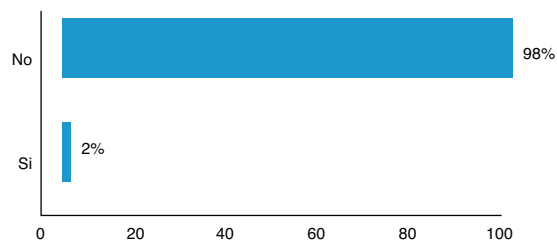


Figura 3 Datos obtenidos del proyecto Determina KRAS.

$p=0,04$). No obstante, tras reanalizar de manera retrospectiva la eficacia del estado del estadios asociados a la adición de cetuximab a FOLFIRI se observaban en la población con KRAS nativo, siendo la magnitud de estos beneficios mucho mayor que los comunicados inicialmente en término de la

Tabla 4 Fase analítica de la determinación de la prueba

Fase analítica

Selección de la muestra:

- La alta concordancia de mutaciones de KRAS en CCR entre tumores primarios y metastásicos permite elegir la muestra que sea más representativa del tumor.
- Elegir bloque con representación de carcinoma invasivo no inferior al 20% para técnicas de PCR a tiempo real y técnicas con alta sensibilidad o no inferior al 60% si se utilizan técnicas de secuenciación directa.

Piezas quirúrgicas

- En la preparación con hematoxilina-eosina (HE) marcar con rotulador la zona con mayor proporción tumor/estroma-inflamación, evitando zonas con necrosis amplia, áreas adenomatosas o de mucosa normal adyacentes.
- Realizar 6-10 cortes a 10 μm del bloque tumoral elegido.
- Separar la zona de interés (macrodissección con cuchilla, aguja 25G u otros métodos).
- Microdissección (si es necesario): marcar con rotulador grupos tumorales y luego marcar con lápiz de diamante esos grupos en el porta obteniendo células con aguja de 25G bajo control microscópico o microdissección láser. Celularidad recomendada: mínimo 2.000 células^a.

Biopsias endoscópicas o biopsias tru-cut

- Realizar secciones de 5 μm de bloque completo si la proporción tumoral es superior a la referida en el punto anterior. Número de cortes del bloque: 15-25.
- Seleccionar fragmentos neoplásicos (macrodissección) si la proporción de células tumorales es <20% (para técnicas de PCR a tiempo real) o <60% (si es para técnicas de secuenciación directa). Cantidad mínima recomendada: 25-50 cortes.
- Microdissección: si en el bloque de parafina la muestra tumoral está agotada o es insuficiente, se puede quitar el cubre de la H-E o de técnicas IHC (acetona 10' e hidratar hasta alcohol de 96° o xilol 24-48 h e hidratar).

Citologías (PAAF de metástasis)

- Si la proporción tumoral es >20% (PCR a tiempo real) o >60% (secuenciación directa): quitar el cubre de la extensión teñida con cualquier técnica citológica cubre (acetona 10' e hidratar hasta alcohol de 96° o xilol 24-48 h) y raspar con cuchilla toda la preparación.
 - Macrodissección (método descrito previamente).
 - Celularidad recomendada: mínimo 2.000 células^a.
 - El estudio molecular a partir de citologías funciona aproximadamente con la mitad de células que su equivalente en bloque de parafina.
 - Líquido ascítico: macrodissección (método descrito previamente).

^a En condiciones excepcionales se puede realizar la determinación con una proporción de células tumorales entre el 5-20% para técnicas muy sensibles o del 30-60% para técnicas de secuenciación. Asimismo la técnica es realizable en las muestras en las que solo podemos conseguir 100-150 células de citología o 300-500 de parafina, resuspendidas en un pequeño volumen de tampón de extracción de ADN adecuado (10-15 μl) y evitando el paso de purificación en kit comerciales o usando kits específicos para baja celularidad. En todos estos casos debe hacerse constar la situación excepcional, y que el resultado negativo de la determinación tiene menor valor que el positivo y que por tanto puede cuestionarse o rechazarse.

tasa de respuesta (57,3% vs 39,7%; $p < 0,0001$), supervivencia libre de progresión (9,9 meses vs 8,4 meses; $p = 0,0012$) y supervivencia global (23,5 meses vs 20 meses; $p = 0,009$)¹⁸.

En base a estos estudios, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha concedido su aprobación el empleo del cetuximab en el tratamiento de primera línea del CCR metastásico, en pacientes con KRAS nativo.

De estos dos estudios (CRYSTAL y OPUS) se ha realizado un metaanálisis, cuyos resultados muestran una reducción del riesgo de progresión del 34% (HR, 0,66; $p < 0,0001$), un aumento de la supervivencia global (HR, 0,81; $p = 0,0062$) y de tasa de respuestas (OR, 2,16; $p < 0,0001$) en pacientes con CCR metastásico con KRAS nativos en primera línea con cetuximab más cetuximab⁸.

En el estudio CELIM se ha analizado la tasa de respuestas y de resección de metástasis hepáticas en pacientes tratados con cetuximab más FOLFOX6 o FOLFIRI, confirmando los resultados de los estudios anteriores; en los pacientes con KRAS nativo la tasa de respuestas fue del 70%, y en los pacientes con KRAS mutado, del 41% (OR, 3,42; $p = 0,080$),

aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas en función del esquema de quimioterapia utilizado, con una tasa de resección R0 del 34%^{19,20}.

Finalmente cabe destacar que, basándose en varios de los estudios anteriores BOND, MABEL, EVEREST, etc., se ha podido comprobar que los pacientes que muestran una mutación en el codón 13 de KRAS (G13D) presentan una mejor tasa de respuesta al cetuximab en comparación con los pacientes que presentan cualquier otra mutación de KRAS en el codón 12²¹ (tabla 1).

Necesidad de una guía de consenso

Dada la necesidad de realizar técnicas moleculares —que no son rutinarias en muchos hospitales del Estado Español—, así como la necesidad de que la metodología y los resultados sean validados, reproducibles y orienten el tratamiento terapéutico, es fundamental homogeneizar los criterios para el estudio, la interpretación de los datos y el informe de

Tabla 5 Fase post-analítica de la determinación de la prueba

Fase post-analítica

Se basa en la emisión de un informe de diagnóstico molecular e interpretación de los resultados.

- Asociar el resultado del estudio de KRAS al informe anatomopatológico normal.
- Datos que se deben incluir en dicho informe:
 - Identificación del paciente.
 - Identificación del médico solicitante.
 - Fecha de la petición y fecha de la determinación.
 - Identificación de la muestra (número de biopsia y número de bloque).
 - Tipo de muestra.
 - Procedencia anatómica.
 - Tipo de fijador, tiempo hasta la fijación (recomendado) y tiempo de fijación (recomendado).
 - Idoneidad de la muestra (adecuada/no adecuada para diagnóstico) y porcentaje de celularidad tumoral y de necrosis.
 - Método utilizado para la determinación.
 - Especificar qué mutaciones identifica (porcentaje total de las descritas en relación a la literatura).
 - Interpretación de los resultados.
 - Presencia de mutaciones (tipo de mutación).
 - Ausencia de mutaciones.
 - No valorable.
 - Persona que realiza la técnica.
 - Persona responsable del estudio.
 - Especificar si se participa en algún programa de control de calidad externo (en caso afirmativo, indicar cuál) o sistema de acreditación o certificación.

los resultados obtenidos. Durante estos dos años los centros de referencia impulsados por la compañía farmacéutica MERCK SERONO, gracias al Proyecto Determina KRAS, han ayudado asimismo a la formación de patólogos, biólogos y técnicos de otras unidades asistenciales tanto a nivel de formación directa como a nivel de validación de centros. El abordaje metodológico empleado, semejante en los centros de referencia gracias al uso de kits aprobados por la FDA o por la EMEA, facilita enormemente la homogenización de los resultados obtenidos. De forma periódica los centros de referencia se han reunido, han analizado y compartido los resultados obtenidos (fig. 3). Se contrastaban los problemas metodológicos, así como los resultados en sus grandes series especificando los tipos de mutaciones observadas. El hecho de que los porcentajes de mutaciones fueran semejantes en los grupos de referencia apoya y avala claramente la homogeneidad de calidad en la realización de las pruebas del KRAS, y de la elección del kit empleado.

Con el objetivo de que dicha determinación del KRAS sea extensible a cada vez más centros en España que cumplan un mínimo de requisitos técnicos y de casuística, tanto la Sociedad Española de Anatomía Patológica como la Sociedad Española de Oncología Médica creen que es importante hacer esta guía de consenso tanto metodológica como de interpretación de los resultados para todos los usuarios. Un tema importante a considerar es en qué momento se realiza la determinación del KRAS. Dada la evolución clínica de un porcentaje elevado de pacientes con estadios II y III, es muy probable que la extensión del estudio molecular del KRAS tenga que realizarse ya desde el momento del diagnóstico en todos los pacientes independientemente del estadio y no solamente en pacientes en estadio IV o refractarios al tratamiento convencional. Por tanto, es de esperar que el número de determinaciones del KRAS se multiplique en los

próximos años y que el número de laboratorios que puedan disponer técnicamente de su capacidad de realizarlo se incremente (tabla 2).

Condiciones recomendadas para la determinación del estado de KRAS

Lo primero y más importante para el estudio mutacional del KRAS, así como de cualquier otra alteración genética o molecular, es la implicación del patólogo, tanto si la determinación se realiza en su centro como si se envía a un laboratorio de referencia.

Hay que considerar integralmente el proceso de realización de la prueba desde que la muestra es recibida en los servicios de anatomía patológica en sus tres fases: pre-analítica (fijación, procesamiento y presencia de indicación para el estudio mutacional) (tabla 3), analítica (selección de la muestra y selección y realización de la técnica molecular más adecuada con sus pertinentes controles) (tabla 4) y post-analítica (interpretación de los resultados y emisión de un informe de diagnóstico molecular) (tabla 5).

Todas estas etapas son fundamentales, y en cualquiera de ellas se pueden producir problemas que interfieren con la calidad de la determinación. El laboratorio que realice la determinación debe tener control sobre todos esos procesos y, si es posible, hacerlo de manera integrada.

A la hora de realizar las determinaciones de KRAS se debe elegir la metodología que cumpla los mayores criterios disponibles (tabla 6) y que a su vez se adecue a la infraestructura de cada uno de los centros donde se van a implantar dichas determinaciones. Dichas técnicas pueden a su vez ser combinadas, adecuando la metodología empleada a las

Tabla 6 Selección y realización de la técnica molecular más adecuada

Técnicas disponibles	Sensibilidad (%DNA mutado)	Características
<i>Secuenciación directa</i>		
Método de Sanger	25	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere mayor cantidad de DNA mutado para su detección. • Detecta cualquier mutación. • Barato. • Requiere equipamiento especial (pirosecuenciador).
Pirosecuenciación	5-10	
<i>PCR cuantitativa en tiempo real</i>		
TaqMan PCR	10	<ul style="list-style-type: none"> • No hay kit comercial. • Requiere termociclador de tiempo real. • Solo detecta mutaciones específicas. • Kit comercial disponible con las sondas. • Requiere termociclador de tiempo real. • Solo detecta mutaciones específicas.
Scorpions ARMS	1	
<i>Técnicas de enriquecimiento del alelo mutado</i>		
PNA-LNA PCR clamp	1-0.1	<ul style="list-style-type: none"> • Se precisan sondas LNA para hacer clamp que no son comerciales. • Requiere amplia experiencia en biología molecular. • Solo detecta mutaciones específicas • Requiere amplia experiencia en biología molecular. • Se puede asociar con técnicas de secuenciación y pirosecuenciación.
COLD-PCR (CO-amplification at Lower Denaturation temperature)	1-0.1	
<i>PCR-RFLP (análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción)</i>	5	<ul style="list-style-type: none"> • Solo detecta mutaciones que generan lugar de restricción. • Requiere equipamiento especial. • Precisa experiencia en HPLC. • Detecta cualquier mutación. • Detecta cualquier mutación.
<i>dHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography)</i>		
<i>HRM (High Resolution Melting)</i>	1	<ul style="list-style-type: none"> • Precisa equipamiento específico. • Requiere experiencia en biología molecular.
	1	

Tabla 7 Diferentes causas de rechazo de la determinación de las mutaciones de *KRAS*

Causas de rechazo de la determinación del *KRAS* en el cáncer de colon

- Ausencia de confirmación histológica de carcinoma infiltrante por un patólogo.
- Cuando no se alcancen los requerimientos de calidad de la muestra recomendados (prefijación, fijación, escasa representación tumoral en la muestra, baja calidad del ADN...).
- Cuando no se alcancen los requerimientos de calidad recomendados en las fases analíticas y post-analíticas (p.ej., resultados insatisfactorios en los controles internos).
- Resultados negativos con muestras insuficientes/inadecuadas (por debajo del umbral de sensibilidad de la técnica empleada).

características particulares de cada muestra (cantidad y calidad del ADN extraído, porcentaje de mutación presente, etc.).

Finalmente, existen una serie de condiciones que hacen que las determinaciones de *KRAS* no se puedan llevar a cabo y que se exponen en la [tabla 7](#).

Apectos de control de calidad en la determinación de *KRAS*

Teniendo en cuenta la importancia clínica de la determinación de *KRAS*, es fundamental que la sensibilidad y la especificidad de la prueba se aproximen al 100%, esto es, que haya una búsqueda de la calidad total. Para conseguir este objetivo existen varias aproximaciones, todas ellas necesarias y complementarias:

Control de calidad interno

Esta es una precaución que es rara vez seguida de forma constante en el estudio de dianas terapéuticas en las neoplasias sólidas. Consiste en el establecimiento de un verdadero control de calidad, pero exclusivamente interno. El jefe de servicio, *product manager* o director del laboratorio deberá reunirse con el supervisor del laboratorio y/o persona responsable de las determinaciones moleculares para diseñar este programa. De forma resumida, esta herramienta consiste en la repetición de un determinado número de casos para confirmar los resultados. Todo el procedimiento deberá ser completamente desconocido para las personas implicadas en él, excepto sus diseñadores, que tendrán la obligación de informar periódicamente a todos los miembros del equipo de sus resultados. Es conveniente incluir en los informes de resultados de rutina una frase que recoja la idea que la prueba en cuestión está sometida a controles de calidad internos. Si la concordancia no es perfecta hay que hacer un análisis en detalle del proceso, con el fin de corregir las desviaciones.

Control de calidad externo

La participación en un control de calidad externo es un requisito imprescindible para garantizar la calidad de una determinación. Su principal inconveniente es que no es desconocido para los profesionales que realizan la determinación y puede llevar a la paradoja de que se consiga solo calidad cuando esta se controla. Su principal ventaja es que su diseño, implementación y evaluación son completamente independientes, lo que garantiza la transparencia del proceso. En España existe desde el año 2010 un Programa de Control de Calidad en Patología Molecular, coordinado por el Laboratorio de Dianas Terapéuticas, integrado en el Programa de Garantía de Calidad de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP). En resumen, los participantes se inscriben y reciben una serie de portaobjetos sin teñir, correspondientes a una serie de casos mutados y no mutados para *KRAS*. En el plazo convenido se ha de realizar la determinación conforme a la prueba que habitualmente se utilice. Es importante resaltar que uno de los portaobjetos se teñirá con hematoxilina-eosina para estimar el porcentaje tumoral y decidir sobre la conveniencia o no de realizar macrodissección. Una vez concluido el plazo, los participantes remitirán por correo electrónico: a) una tabla con los resultados; b) los datos sin interpretar (*raw data*); c) un informe exactamente igual al que se emite, y d) un cuestionario con datos sobre el laboral que se emite y su metodología ([figs. 1 y 2](#)). Una vez recopilada por parte de la SEAP toda la información de los participantes, el laboratorio coordinador recibe dichos datos de forma completamente anónima y emite los resultados. Estos son tanto absolutos (comparación frente a uno mismo) como relativos (comparación frente a todos los participantes). Asimismo, se convoca de forma anual a un comité de expertos para garantizar la independencia de las evaluaciones y promover acciones de mejora. Es conveniente incluir en los informes de resultados de rutina una frase que recoja la idea que la prueba en cuestión está sometida a controles de calidad internos. Si la concordancia no es perfecta hay que realizar un análisis en detalle del proceso, con el fin de corregir las desviaciones.

En resumen, solo será posible una alta calidad en las determinaciones de *KRAS* si nos planteamos un auténtico trabajo multidisciplinar que incluya formación a los implicados en la misma y una activa participación en controles de calidad, tanto internos como externos.

Conflicto de intereses

Para la realización de este artículo se ha contado con el apoyo logístico de MERCK SERONO para la celebración de diferentes reuniones, sin que ello haya supuesto ninguna influencia en el desarrollo de los contenidos del mismo.

Agradecimientos

A MERCK SERONO por el apoyo logístico prestado para la organización de las reuniones y para la redacción del artículo.

Bibliografía

- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375:1030-47.
- Cripps C, Gill S, Ahmed S, Colwell B, Dowden S, Kennecke H, et al. Consensus recommendations for the use of anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer. *Curr Oncol*. 2010;17:39-45.
- Ochendusko SL, Krzemieniecki K. Targeted therapy in advanced colorectal cancer: More data, more questions. *Anticancer Drugs*. 2010;21:737-48.
- Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008;135:1079-99.
- Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*. 2011;60:116-29.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
- Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:459-65.
- Van Cutsem E, Lang I, Folprecht G, Nowacki M, Cascinu S, Shchepotin I, et al. Cetuximab plus FOLFIRI in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): The influence of KRAS AND BRAF biomarkers on outcome: Updated data from the CRYSTAL trial. American Society of Clinical Oncology (ASCO) Gastrointestinal Cancer Symposium 2010. Proceedings of ASCO GI 2010. 2010. 22-1-2010. Abstract 281.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:337-45.
- Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer Sr PJ, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*. 2004;22:1201-8.
- Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, et al. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: The BOND-2 study. *J Clin Oncol*. 2007;25:4557-61.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. KRAS mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359:1757-65.
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:1626-34.
- Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:4706-13.
- Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol*. 2010;28:4697-705.
- Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de BF, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:663-71.
- Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, De Braud FG, Schuch G, Zobel A, et al. Biomarkers predictive for outcome in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with first-line FOLFOX4 plus or minus cetuximab: updated data from the OPUS study. American Society of Clinical Oncology (ASCO) Gastrointestinal Cancer Symposium 2010. Proceedings of ASCO GI 2010. 2010. 22-1-2010. Abstract 428.
- Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:1408-17.
- Kohne C, Rougier P, Stroh C, Schlichting M, Bokemeyer C, Van Cutsem E. Cetuximab with chemotherapy (CT) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer (mCRC): a meta-analysis of the CRYSTAL and OPUS studies according to KRAS and BRAF mutation status. American Society of Clinical Oncology (ASCO) Gastrointestinal Cancer Symposium 2010. Proceedings of ASCO GI 2010. 2010. 22-1-2010. Abstract 406.
- Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, Raab HR, Lordick F, Hartmann JT, et al. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:38-47.
- De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA*. 2010;304:1812-20.