



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Determinación de mutaciones de *PI3KCA* en pacientes con  
cáncer colorrectal del Centro Médico ABC, Ciudad de  
México, México.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**LAURA GARCÍA ALANÍS**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Diana Elodia Aguilar León**

**2018**

**Ciudad Universitaria, CU.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del Alumno:

Laura

García

Alanís

5695-0451

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

308051768

2. Datos del tutor

Doctora

Diana Elodia

Aguilar

León

3. Datos del Sinodal 1

Doctor

Luis Felipe

Jiménez

García

4. Datos del Sinodal 2

Doctor

César Octavio

Lara

Torres

5. Datos del sinodal 3

Doctora

Laura

Kwasaki

Watanabe

6. Datos del sinodal 4

Doctor

Erasmus

Martinez

Cordero

7. Datos del trabajo escrito.

Determinación de mutaciones de *PI3KCA* en pacientes con adenocarcinoma colorrectal en el Centro Médico ABC, Ciudad de México, México.

63 páginas, 2018

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular del Centro Médico ABC Campus Observatorio bajo la dirección de la Dra. Diana Elodia Aguilar León.

## Agradecimientos académicos:

A la UNAM por permitirme integrarme a la vida académica desde el bachillerato y brindarme la mejor educación.

A la Facultad de Ciencias por darme la preparación académica para ser una bióloga que contribuya al desarrollo de nuestro país.

A la Dra. Diana Aguilar por guiarme en mi trabajo de laboratorio, por su tiempo, esfuerzo y paciencia en el desarrollo de este trabajo y en la jornada laboral. Gracias por guiarme en el comienzo de mi vida académica y darme la oportunidad de iniciarme en el mundo profesional.

Al Dr. César Lara por ser un jefe muy paciente aún en las crisis que yo misma causé. Gracias por enriquecer mi desarrollo profesional y por hacerme parte de su equipo de trabajo. Mi visión de la biología molecular y la patología ha cambiado gracias a usted.

Gracias a mis sinodales: la Dra. Laura Kawasaki, el Dr. Erasmo Martínez y el Dr. Luis Felipe por revisar este trabajo minuciosamente y realizar correcciones para mejorarlo.

A todos lo que conforman el departamento de Patología Quirúrgica y el laboratorio de Biología Molecular del Centro Médico ABC por ayudarme en cualquier duda que tuviera y contribuir en la realización de este trabajo.

## Agradecimientos personales

Fue un camino que hice muy largo por diferentes razones pero al final pude terminarlo con la ayuda de muchas personas.

Un agradecimiento infinito a mis padres Laura y Roberto, ustedes han sido una parte fundamental en todas las etapas de mi vida, porque a pesar de las dificultades su amor es incondicional y lo más importante que tengo. Gracias por su esfuerzo y enseñanzas que son muy valiosas para mí.

A mi hermana Mariana por ser mi primera amiga, mi mejor apoyo, por ser un ejemplo de vida, inteligencia, dedicación y amor.

A mis abuelos, por darme unos padres maravillosos, aunque ya no estén aquí su ejemplo de trabajo honesto y fortaleza quedaron en mí.

A mis tíos María de la Luz, Carlos, Gilberto, Marisela y Oscar: gracias por su cariño, apoyo y los buenos momentos que he tenido con cada uno de ustedes. A mis demás tíos y primos de la familia García y la familia Alanís que han estado pendiente de mí y mi familia.

A mis amigos de la preparatoria: Adriana, Liliana, Karla, Miriam y Chelo. Con ustedes compartí una etapa muy padre y me siento afortunada de que esta amistad perdure a través de los años, agradezco mucho sus consejos y sostén.

A Marcelo y Erika, mi eterno placozoo que a pesar de la distancia aún podemos sentirnos cerca, gracias por hacer mi vida más divertida, por su apoyo incondicional, por aguantarme en los peores momentos y compartir sus alegrías conmigo.

## INDICE:

<b>Resumen</b> .....	10
<b>Introducción</b> .....	11
Cáncer.....	11
Cáncer colorrectal.....	12
Receptor EGFR.....	18
EGFR en CCR.....	19
KRAS.....	20
KRAS en CCR.....	21
NRAS.....	23
PI3K.....	24
PI3K en CCR.....	27
Biomarcadores en cáncer.....	30
Diferentes métodos utilizados para la identificación de mutaciones.....	35
PCR en tiempo real.....	37
<b>Justificación</b> .....	41
<b>Objetivos</b> .....	41
<b>Material y métodos</b> .....	42
Extracción de DNA.....	42
Integridad del DNA.....	42
Mutaciones de PI3KCA.....	43
<b>Resultados</b> .....	46
<b>Discusión</b> .....	53
<b>Conclusiones</b> .....	57
<b>Bibliografía</b> .....	58

## Índice de Figuras:

<b>Figura 1.</b> Secuencia adeno -carcinoma y Vía de pólipos serrados.....	14
<b>Figura 2.</b> Vías de señalización involucradas en el desarrollo de CCR.....	18
<b>Figura 3.</b> Activación de EGFR y vía de señalización MARK y AKT.....	20
<b>Figura 4.</b> Vía de señalización de RAS activada por EGFR.....	21
<b>Figura 5.</b> Estructura de las proteínas PI3K clase I, II y III.....	26
<b>Figura 6.</b> Vía de señalización de proteína PI3K de clase I.....	27
<b>Figura 7.</b> Tasa de respuesta mediante la evaluación de mutaciones en KRAS, BRAF, NRAS y PI3K.....	29
<b>Figura 8.</b> Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
<b>Figura 9.</b> Sondas FRET.....	38
<b>Figura 10.</b> Sonda de hidrólisis.....	39
<b>Figura 11.</b> Molecular Bacons.....	39
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de pacientes mutados para el gen KRAS.....	46
<b>Figura 13.</b> Distribución de mutaciones del gen KRAS en nuestra población.....	47
<b>Figura 14.</b> Prevalencia de mutaciones para KRAS, BRAF y NRAS para CCR en el Centro Médico ABC del 2013-2016.....	47
<b>Figura 15.</b> Gel de agarosa con productos de PCR constitutivos.....	48
<b>Figura 16.</b> Ensayo de mutaciones, muestra identificada como adecuada para ensayo de mutaciones y muestra identificada como indeterminada.....	49
<b>Figura 17.</b> Gráficas con los dos tipos de mutaciones identificados.....	50
<b>Figura 18.</b> Distribución total de mutaciones en nuestra población n=99.....	52

## Índice de tablas:

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de CCR de acuerdo al The Cancer Genome Atlas Network.....	16
<b>Tabla 2.</b> Frecuencia de mutaciones para KRAS de acuerdo a las bases de datos TCGA y COSMIC.....	22
<b>Tabla 3.</b> Subunidades de PI3K clase I.....	24
<b>Tabla 4.</b> Frecuencia de mutaciones para PI3KCA de acuerdo a las bases de datos TCGA y COSMIC.....	29
<b>Tabla 5.</b> Frecuencia de mutaciones en genes de la vía de señalización de EGFR y PI3K.....	26
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de biomarcadores.....	31
<b>Tabla 7.</b> Lista de Primers para ensayo constitutivo con el método BIOMED-2.....	43
<b>Tabla 8.</b> Parámetros de ciclado para ensayo control y determinación de mutaciones de PI3K.....	44
<b>Tabla 9.</b> Volumen de reacción para cada mutación de PI3K.....	44
<b>Tabla 10.</b> Distribución de mutaciones KRAS.....	46



<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de muestras con 1, 2 o 3 bandas.....	48
<b>Tabla 12.</b> Cuantificación de DNA en ng/ul, relación A260/280, número de bandas en PCR de evaluación de la integridad y PI3KCA y Ct de la mutación.....	51
<b>Tabla 13.</b> Porcentaje de muestras con relación menor, mayor o igual a 1.....	52

## Abreviaturas:

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**CCR:** cáncer colorrectal

**APC:** Adenomatous polyposis coli

**TGFBR2:** receptor del factor transformante beta 2

**CTNNB1:** Catenina Beta 1

**BRAF:** *Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1*

**CIN:** Inestabilidad cromosómica

**KRAS:** *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

**PI3K:** Fosfatidilinositol-3 cinasa

**PI3KCA:** PI3K subunidad catalítica

**MSI:** Inestabilidad microsatélite

**CIMP:** Metilación de islas CpG

**MMR:** reparación de apareamiento de bases (*mismatch repair*)

**CMS:** subtipos moleculares consenso

**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico

**SCNA:** alteración somática en el número de copias

**CCRm:** Cáncer colorrectal metastásico

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**GTP:** Guanosina trifosfato

**GDP:** Guanosina difosfato

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**RNA:** ácido ribonucleico

**FFPE:** tejidos fijados en formol y embebidos en parafina

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

## RESUMEN:

El cáncer colorrectal (CCR) se ha convertido en una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. El CCR es resultado de una serie de cambios de la mucosa intestinal que lleva a la formación de adenocarcinoma, para lo cual están involucrados la activación de diferentes vías de señalización que dan como resultado la proliferación y migración celular. Las mutaciones en KRAS al igual que NRAS y BRAF se presentan en CCR, usualmente son mutuamente excluyentes y han mostrado tener un valor predictivo en cuanto a la resistencia a las terapias dirigidas, por lo cual usualmente se determina su estado previo al inicio de tratamiento adyuvante. Por otro lado las mutaciones en la subunidad catalítica de PI3K (PI3CA) se encuentran en diferentes tipos de tumor incluyendo CCR, reportando prevalencias de 10-20%.

Debido a que aproximadamente, entre el 50-60% de los pacientes a los que se les realiza el panel para mutaciones en RAS no presentan mutación, en el presente trabajo se pretende determinar el estado de mutación de *PI3KCA* en pacientes no mutados para biomarcadores como KRAS, BRAF y NRAS. Para ello se utilizó la técnica de PCR en tiempo real para la determinación de mutaciones de PI3K en los exones 9 y 20.

Se obtuvieron la prevalencia de las mutaciones de KRAS presentes en nuestra población en un 41%, de BRAF se encontró que sólo 2% casos presentaban mutación y de NRAS ninguno presentaba mutaciones. Para PI3K de los 20 casos disponibles 3 presentaron mutación en E542K y H1047R; también encontramos que 5 casos no fue posible determinar el estado de PI3K debido a la degradación del DNA obtenido.

Por lo tanto concluimos que la presencia de las mutaciones *PI3KCA* contribuyen al desarrollo de CCR además de que el perfil de mutaciones de KRAS coincide con lo reportado a nivel mundial. También encontramos que la preservación de las muestras es determinante para la extracción de ácidos nucleicos.

## INTRODUCCIÓN

### Cáncer:

El cáncer se define como un grupo de células que crecen y proliferan de forma descontrolada por alteraciones genéticas y/o ambientales. En condiciones normales las células cuentan con señales positivas y negativas que regulan la proliferación, división y apoptosis. Las células cancerosas se vuelven independientes de los controles de apoptosis favoreciendo la proliferación y migración, adquiriendo capacidad de invasión proceso llamado metástasis.

Actualmente, una parte fundamental de la teoría del cáncer interviene en la activación de múltiples genes y diversos procesos de la célula anormal (clona) que tiene una secuencia de DNA modificada (inserción, delección o sustitución). Las sucesivas rondas de proliferación y mutación llevan a la expansión selectiva de estas células resultando en la formación de un tumor. Existen más de 100 tipos diferentes de cáncer y un sólo órgano puede tener tumores de más de un subtipo, por lo tanto es importante entender y estudiar las diferentes vías de señalización regulatorias para poder transformar una célula normal a una célula cancerosa y cuáles de ellas caracterizan a cada tipo de cáncer. Existen seis características que presentan las células tumorales: (Hejmadi, 2010) :

- Inmortalidad: división celular
- Señalización que produce un ciclo celular continuo (factores de crecimiento por oncogenes)
- Inhibición de señales de paro (inhibición de vías de señalización anti-crecimiento por genes supresores de tumores)
- Resistencia a la apoptosis
- Angiogénesis: generación de nuevos vasos sanguíneos
- Metástasis

Los proto-oncogenes son genes que regulan la proliferación y crecimiento de una célula normal, pero cuando ocurre una modificación en el DNA (inserción, delección o sustitución) estos se convierten en oncogenes generando capacidad de proliferación e inhibición de la apoptosis.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) durante las siguientes décadas se espera que la incidencia de cáncer incremente a 22 millones de casos por año a nivel mundial. En México se reportó que la mortalidad por esta causa aumentó en un 12.1%, ocupando el tercer lugar dentro de las causas de muerte después de enfermedades de corazón y diabetes mellitus.(Torres- Sánchez, cols 2014).

El tratamiento del cáncer se ha hecho difícil porque se han descrito diferentes vías de señalización que involucran el desarrollo tumoral, esto es parte crucial en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas.

#### Cáncer colorrectal (CCR):

Es una de las enfermedades más comunes a nivel mundial; en 2012 se estimó 1.2 millones de casos nuevos reportados. Se ha observado que existe una variación geográfica en la incidencia de este tipo de cáncer y se presenta con mayor frecuencia en países desarrollados (Australia, Europa, Nueva Zelanda y Norteamérica) ocupando el tercer lugar en varones después del cáncer de próstata y pulmón, y el segundo lugar en mujeres después del cáncer de mama (Teran, cols 2012). Se observa mayor prevalencia entre la población de 45 a 65 años. En México el CCR representa la tercera causa de muerte con una incidencia aproximada de 5 casos por cada 100,000 habitantes por año.

Se estima que aproximadamente 40,000 nuevos casos de CCR se diagnostican cada año en Europa, los cuales son responsables de unas 20,000 muertes al año. El CCR en términos generales supone un 2% del total de los tumores en el adulto, un tercio de los pacientes se diagnostican ya en etapa avanzada de la enfermedad, con la presencia de metástasis.

Para el CCR los factores como la edad, sexo e historia familiar aumentan la probabilidad de desarrollar CCR, pero también existen otras causas de riesgo que contribuyen como la alimentación (alto consumo de carne roja), el tabaquismo, obesidad, sedentarismo, así como patógenos intestinales e inflamación crónica que precede al desarrollo tumoral (Rabeneck, cols 2004).

Existen tres formas en las cuales se puede presentar el CCR (Kuipers; cols. 2015):

- La mayoría de los casos (70-80%) son esporádicos, es decir no tienen antecedentes familiares y son asociados a factores como el estilo de vida y factores ambientales.

- Del 15-20% de los casos tienen historia familiar positiva para CCR sin asociación a algún síndrome y el riesgo aumenta cuando son familiares de primer grado;
- 5-10% son de tipo hereditario (polipoide o no polipoide) como el síndrome de Lynch o el síndrome de poliposis adenomatosa familiar causado por mutaciones en el gen APC (Adenomatous polyposis coli) que controla generalmente la actividad de la vía de señalización WNT. Existen otras mutaciones que pueden presentarse en genes como SMAD, TGFBR2 (receptor del factor de crecimiento transformante beta 2), CTNNB1 (proteína asociada a cadherina beta 1).

En el modelo clásico de formación de CCR se ha descrito como principal precursor el pólipo adenomatoso, siguiendo la secuencia adenoma-carcinoma. Todo este proceso puede tardar un aproximado de 10 a 15 años pero en ocasiones puede acelerarse en ciertas formas como en el síndrome de Lynch (Kuipers; cols. 2015).

Más del 90% de los casos diagnosticados como CCR son definidos como adenocarcinoma de diferentes subtipos histológicos, como por ejemplo: medular, papilar mucinoso, serrado y células en anillo de sello (Kuipers; cols. 2015; Terzić, cols 2010 ). Sin embargo, se ha descrito una vía alterna a la clásica adenoma-carcinoma, denominada vía serrada la cual se estima que origina el 7.5% de todos los casos de CCR y el 17.5% de localización proximal. Esta vía tiene como característica la presencia de mutaciones en el gen BRAF favoreciendo que las células de las criptas desarrollen un “foco críptico aberrante hiperplásico” que evoluciona a lesiones serradas con mayor atipia y desorden en estructura como la lesión sésil serrada, el adenoma serrado y finalmente el carcinoma serrado.(Martinez, cols. 2012) (Fig 1). En los últimos años se ha tratado de identificar mediante análisis genético el proceso secuencial que implica la acumulación de sucesivas mutaciones en uno o varios genes (oncogenes, supresores y de susceptibilidad) que participan en la activación de vías de señalización.

Parte del proceso de transformación neoplásica incluye el incremento de los niveles de metilación de las islas CpG localizados en los dominios reguladores de la transcripción, con mayor frecuencia en el gen MLH1 presentando inestabilidad genómica y acelerando el proceso de acumulación de mutaciones lo que lleva a la transformación maligna de las células del colon a través de expansión clonal que selecciona aquellas células con un comportamiento más agresivo (Kuipers, et.al 2015).

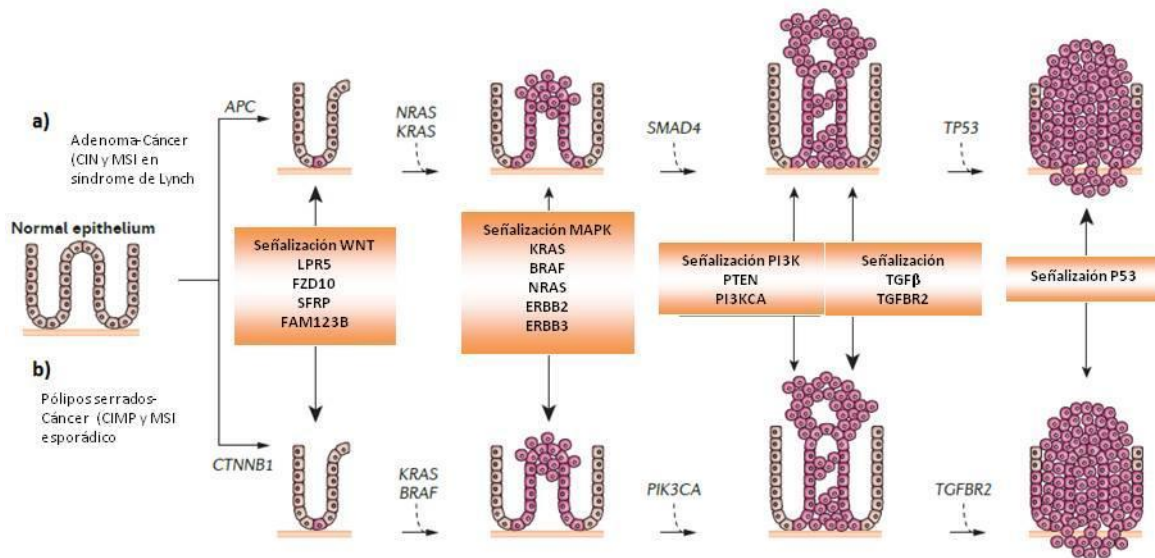


Fig 1. a) Secuencia adenoma-carcinoma. Transformación celular de epitelio normal a desarrollo cancerígeno a través del epitelio intestinal. Marcando las posibles mutaciones genéticas que se pudieran expresar en cada etapa. b) secuencia de pólipo serrado. Tomada de Kuipers, cols. 2015)

Se han descrito varios cambios genéticos y epigenéticos (Sepulveda, A; cols.2016):

- Inestabilidad cromosómica (CIN): Acumulación de mutaciones cromosómicas y epigenéticas; alteración en genes supresores de tumores [por ejemplo APC (Adenomatous polyposis coli), TP53] y oncogenes (KRAS, BRAF, PI3K). Es la más común y hay evidencia que demuestra que promueve la progresión del cáncer al incrementar la diversidad clonal (Pritchard- Grady, 2011).
- Inestabilidad de DNA microsatélite (MSI): El DNA microsatélite corresponde a secuencias repetidas en grupos (tandem) (aprox de 1-5 nucleótidos repetidos de 5-100 veces). Se puede presentar en CCR tanto esporádico como hereditario. En caso de CCR esporádico los tumores presentan pérdida de la expresión del gen MLH1 debido a la metilación de las islas CpG en el promotor de este gen; se ha visto que los tumores esporádicos con MSI están asociados a la vía de pólipos serrados y con mutaciones de BRAF V600E en el 70% de los casos. Cuando es hereditario, por ejemplo el síndrome de Lynch (no-poliposis hereditaria) que representa del 3-6% de los casos, es causado por las mutaciones en los genes que codifican enzimas reparadoras de DNA. En ambos casos la supresión de los genes MMR causan la deficiencia en la reparación de DNA en microsatélites y dan como resultado cambios en el número de nucleótidos.
- Fenotipo de metilación de islas CpG (CIMP): como su nombre lo indica es la

metilación de islas CpG en genes asociados al desarrollo del CCR como el gen supresor de tumores MLH1 o *DKN2A*. También se ha descrito una fuerte asociación entre la mutación de BRAF V600E y CIMP por lo cual podría sugerirse un rol específico de BRAF en la patogénesis del fenotipo metilador.

En 2012 se publicaron datos acerca de la clasificación molecular del CCR por parte de la Red del Atlas del Genoma del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas Network*) en el cual encontraron que 16% de los tumores son hipermutados (es decir tienen una gran densidad de mutaciones) y la mayoría tenían MSI con 24 genes diferentes que se encuentran altamente mutados. A partir de ello Guinney cols. (2015) realizaron un consenso molecular sobre los diferentes subtipos de CCR que pueden presentarse:

- CMS1: Los cuales presentan alta MIS y CIMP, generalmente de colon derecho y poco diferenciados. Histológicamente estos tumores presentan infiltración linfocítica, mutaciones en BRAF (10%), y está asociado a un mal pronóstico, aparte de ser mutuamente excluyentes de mutaciones en RAS.
- CMS2: Estos tumores siguen la secuencia de desarrollo adenoma-carcinoma a partir de la pérdida de la función de APC, mutaciones en p53, resultando en la activación de la vía de señalización WNT. En este grupo se encuentran el síndrome de poliposis adenomatosa familiar causado por la mutación germinal de APC.
- CMS3: 75% de estos tumores presentan mutación en KRAS y PI3K. Estas mutaciones se presentan durante el desarrollo del adenoma, y están asociadas a un mal pronóstico.
- CMS4: que son más conocidos como el sub-grupo mesenquimal, presentan un menor porcentaje de sobrevida con una menor sensibilidad a la terapia anti-EGFR. Se ha reportado que los genes que están activados en este tipo de tumores presentan fibroblastos, linfocitos infiltrados y células endoteliales.



Tabla 1. Clasificación de CCR de acuerdo al The Cancer Genome Atlas Network.

<b>NOMBRE</b>	<b>CMS1 (MSI INMUNE)</b>	<b>CMS2 (CANONICA)</b>	<b>CMS3 (METABOLICA)</b>	<b>CMS4 (MESENQUIMAL)</b>
<b>FRECUENCIA</b>	14%	37%	13%	23%
<b>CARACTERÍSTICAS MOLECULARES</b>	MIS, CIMP alta e hipermutación	SCNA alta	MSI, SCNA baja y CIMP baja	SCNA alta
<b>MUTACIONES PRESENTES</b>	En BRAF	En APC	En KRAS	
<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES</b>	Infiltración y activación de células del sistema inmune	Activación de WNT y de MYC	Desregulación metabólica	Infiltración estromal, activación de TGFb y angiogénesis
<b>SOBREVIDA</b>	Después de la recaída poca sobrevida			Peor sobrevida libre de recaída

MIS= Inestabilidad microsatelital; CIMP= Metilación de islas CpG; SCNA= alteración del número de copias somáticas.

Histológicamente 90-95% de los casos de carcinomas colorrectales se diagnostican como adenocarcinomas entre los que existen diferentes tipos morfológicos: 17% son del tipo mucinoso caracterizado por una gran cantidad de mucina extracelular en el tumor; del 2-4% son clasificados como adenocarcinomas de células en anillo de sello que tiene mucina en el interior de la célula desplazando el núcleo a un extremo. Otras variantes no muy comunes de tumores epiteliales son los carcinomas de células escamosas, carcinomas adenoescamosos, carcinomas indiferenciados que no tienen estructuras glandulares, carcinomas medulares y carcinomas trabeculares (Labianca cols 2010).

La extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico determina la sobrevida después de la cirugía que puede variar de un 50-90% de sobrevida a 5 años en etapa I-III a menos del 10% en la etapa IV (definida por la presencia de metástasis). Aproximadamente 39% de los pacientes con diagnóstico de CCR se encuentran en etapa I

y II, 37% presentan el estado III y 19% el estado IV o cáncer colorrectal metastásico (CCRm). Los tratamientos de quimioterapia más usados son las combinaciones con fluorouracilo 5, leucovorina, capecitabina, oxaliplatino, irinotecán, Por lo tanto se han evaluado los cambios genéticos que al parecer tienen una influencia en el pronóstico (Cuyun, cols 2015).

Desde hace varios años se han realizado pruebas clínicas para el desarrollo de nuevas terapias contra el CCR. La cirugía es el tratamiento principal para el CCR no metastásico y la quimioterapia se aplica a todos aquellos que se encuentren en estadios más avanzados y en caso de metástasis se puede combinar la quimioterapia con anticuerpos monoclonales como cetuximab o panitumumab que tienen como objetivo el bloqueo de receptores en las vías de señalización para la activación de genes que dan como resultado el desarrollo tumoral.

En años recientes se han descrito diferentes sistemas y vías de señalización que están implicadas en la patogénesis de CCR y la comprensión de las bases moleculares de la carcinogénesis colorrectal que tiene importantes implicaciones tanto en el pronóstico como en tratamiento de CCR (Fig.2)

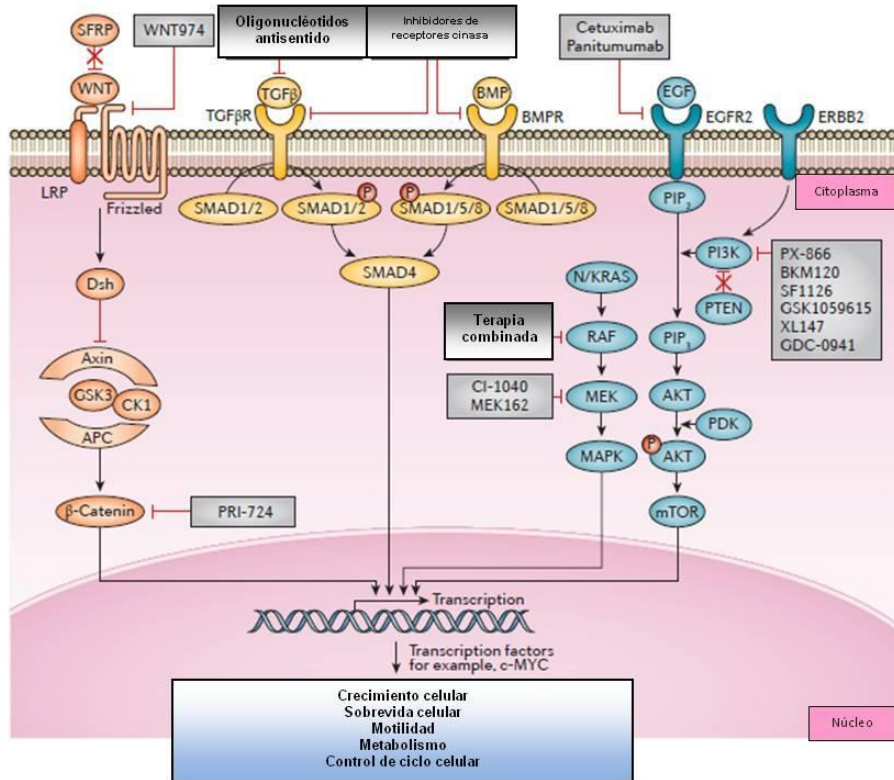


Fig.2 Vías de señalización involucradas en el desarrollo de CCR, entre ellas se incluye la vía de señalización de WNT, la activación de proteínas SMAD y las vías de señalización mejor caracterizadas MAPK y PI3K/mTOR. También se muestran los posibles blancos terapéuticos (cuadros grises). Tomada de Kuipers, cols. 2015

La vía de señalización de las MAP cinasas (MAPK/ERK) así como PI3K (PI3K/AKT) tienen un papel importante en el desarrollo de CCR ya que se han descrito que mutaciones a nivel RAS y del PI3KCA confieren resistencia a medicamentos que inhiben la activación de estas vías a través de EGFR. Se ha observado que los anticuerpos contra EGFR no son efectivos si las mutaciones se encuentran en otros componentes de la vía de señalización como KRAS, BRAF o PI3K afectando la respuesta a la terapia.

**Receptor EGFR:**

EGFR (también conocido como ERBB1 o HER1) pertenece a la familia de receptores con actividad tirosina cinasa HER; es una glicoproteína con tres dominios: 1) extracelular de unión al ligando, 2) transmembranal que es hidrofóbico y 3) el dominio intracelular con un componente juxtamembranal con actividad de tirosina cinasa y una cola carboxilo terminal rica en residuos de tirosina. Cuando el receptor es activado por su ligando estos residuos de tirosina se fosforilan (Herbst, 2004).

EGFR es una proteína constituida por aproximadamente 486 aminoácidos con un peso de 170KDa y el gen que la codifica se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 (7p12) (Appert; cols 2015). Este receptor puede ser activado de dos maneras: a) mediante ligandos los cuales pueden ser: el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), anfiregulina y EGF de unión a heparina y betacelulina (Herbst, 2004); y b) mediante fosforilación constitutiva.

La unión del ligando induce la dimerización lo cual permitirá la fosforilación del receptor, estos dímeros pueden ser homodímeros o heterodímeros (puede formar dímeros con otros receptores tirocina cinasa) . La fosforilación hace posible que la interacción con las proteínas SOS y GRB2, para posteriormente activar a las proteínas como KRAS o NRAS. Otras proteínas involucradas en la vía de señalización son RAF y MEK1 (Siegelin; cols 2014).

Se ha reconocido a EGFR como un elemento importante en el inicio de la activación de la vía de señalización de ERK-MAPK, PI3K y/o STAT y por lo tanto la proliferación, angiogénesis e inhibición de la apoptosis (Campos Parra; cols. 2012). En CCR es importante porque se ha vuelto el objetivo principal de las terapias dirigidas en CCRm con anticuerpos monoclonales (Fig. 3).

### EGFR en CCR

Se han realizado pocos estudios en los cuales se reporta la incidencia de mutaciones de EGFR en CCR. Nagahara y cols (2005) reportaron que las mutaciones en EGFR se presentaron en un 12% (4/33) en los exones 19 y 20. Por su parte, Bo-Young Oh y cols (2011) observaron que las mutaciones se daban solo en el codón 20 en un 22.4% (13/58) de los casos.

La sobreexpresión de EGFR se ha reportado en muchos tumores malignos y en el caso de CCRm se ha encontrado que se presenta de 65-70% de los casos, se encuentra asociado a resistencia a la quimioterapia sin embargo no se tienen datos sobre su papel en el pronóstico de la enfermedad.

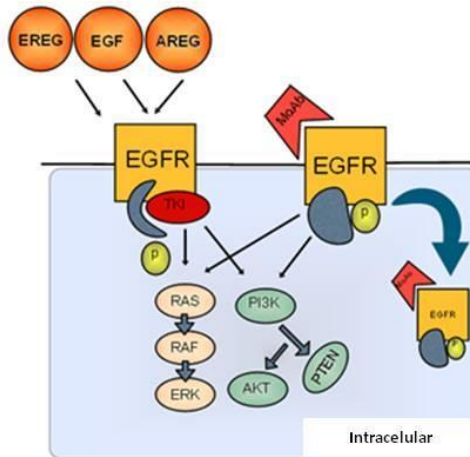


Fig. 3. Activación de EGFR y vía de señalización MARK y AKT. También se indica la inhibición de EGFR por medio de Ac-monoclonales. Tomada de Nirit Yarom, 2015.

### KRAS

La proteína KRAS pertenece a la familia de las proteínas RAS o RAS GTPasas caracterizadas por tener un dominio catalítico G. KRAS se ubica en el gen 12p 12.1, tiene un peso molecular de 21kDa y de 188 aminoácidos. Forma parte de la señalización de EGFR que en condiciones anormales está implicada en la transformación maligna, progresión del ciclo e inhibición de la apoptosis (Jančík, cols. 2010).

La proteína KRAS tiene los siguientes dominios:

1. El dominio N terminal, en el cual se encuentra el sitio de unión a GTP y las regiones Switch 1 y 2 a las cuales se unen a reguladores y efectores de la proteína; abarca de los aminoácidos 1-164.
2. El dominio C- terminal el cual tiene las regiones hipervariables (HVR) que regulará las modificaciones transcripcionales y determina el anclaje a la membrana plasmática y se engloba en los aminoácidos 165-188.

Cuando se activa algún receptor de crecimiento por medio de su respectivo ligando, este se autofosforila y hay una unión de proteínas adaptadoras SHC (proteína transformante SCH) y de proteínas de unión GRB2 (Proteína 2 del Receptor del Factor de Crecimiento). Estas proteínas GRB2 se asocian a las GEF (Factor Intercambiador de Guanina) que es el factor intercambiador de nucleótido para cambiar de GDP a GTP, que actúan sobre KRAS. Una vez realizada su función las proteínas RAS vuelven a su estado basal cuando el GTP es hidrolizado por las enzimas GTPasas (GAP) (Fig. 4) (Wang cols,

2013).

KRAS tiene muchas proteínas efectoras río abajo en la vía de señalización activada por EGFR y tiene efecto en RAF, una proteína cinasa que activa la vía de MAPK/ERK, la cual activa numerosos factores de transcripción incluyendo ELK1 y cMYC que regulan la progresión del ciclo celular. Otra vía que se puede activar por medio de KRAS es PI3K que activa a AKT y tiene como resultado la transcripción de varios genes responsables de la progresión y supervivencia celular, siendo el más notable NF- $\kappa$ B (Wang; cols, 2013).

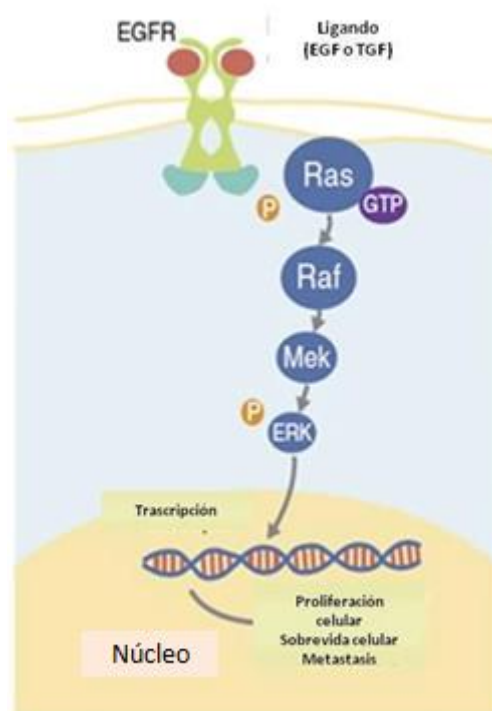


Fig 4. Vía de señalización de RAS activada por EGFR. Tomada de Pillai Raju K (2016)

### KRAS en el CCR

El gen no mutado (wt) de KRAS funciona como supresor de tumores y se ha comprobado que la pérdida de la regulación del gen de KRAS está implicado en el desarrollo y progresión tumoral. Las mutaciones en KRAS previenen la hidrólisis de GTP manteniendo la proteína activa constitutivamente y como consecuencia una activación constante de la vía de señalización de las MAP cinasas. Estas mutaciones se presentan en CCR de un 30-40% de los casos (Jancik, cols. 2010).

Las mutaciones más frecuentes en KRAS ocurren en el codón 12 (82-87%) en el cual ocurre un cambio de base. Otras mutaciones menos frecuentes pueden estar presentes en los codones 13 (13-18%) o 61 (5%) (Ihle; cols. 2012). De acuerdo a las bases de datos COSMIC y TCGA la distribución de mutaciones en CCR para KRAS es la siguiente:

Tabla 2. Frecuencia de mutaciones para KRAS de acuerdo a las bases de datos TCGA y COSMIC

<b>The Cancer Genome Atlas</b>	<b>COSMIC</b>
c.35 G>A (G12D) 12.2% (49/400)	c.35 G>A (G12D) 12.1% (6,351/52,392)
c.35 G>T (G12V) 8.25% (33/400)	c.35 G>T (G12V) 7.6% (4,014/52,392)
c.38 G>A (G13D) 7.8% (31/400)	c.38 G>A (G13D) 6.5% (3,424/52,392)
c.437 C>T (A146V) 3.2% (13/400)	c.34 G>T (G12C) 2.7% (1,429/52,392)
c.34 G>T (G12C) 2.5% (10/400)	c.35 G>C (G12A) 2.1% (1,108/52,392)

Nash y cols. (2010) reportaron que existía una frecuencia de 36% de casos con una o más mutaciones en KRAS siendo la mutación más frecuente c.35 G>A (p.G12D) y con una tasa de sobrevida menor en comparación con aquellos que presentan inestabilidad microsatelital. Maus y cols. (2014) reportan casos de CCR en donde la frecuencia de mutación en KRAS es 39%. También observa que las mutaciones c.35 G>A (p.G12D) y c.35 G>T (p.G12V) son predominantes. El estudio realizado por Phipps y cols. (2013) reporta que en los casos estudiados de CCR solo el 1% tenían mutación en KRAS y BRAF de manera concurrente en el mismo tumor.

Estudios recientes han descrito la asociación entre las mutaciones en KRAS y la respuesta a anticuerpos monoclonales. Se ha visto que para CCR son un marcador predictivo para la resistencia a la terapia monoclonal, ya que se ha reportado que los pacientes con mutaciones en KRAS tienen menor probabilidad a tener una respuesta favorable y presentan una sobrevida menor en comparación de aquellos que reciben solo quimioterapia (Qiu LX; cols. 2010)

La terapia adyuvante anti-EGFR es eficaz en etapas avanzadas de CCR en pacientes KRAS no mutado por lo tanto es fundamental la selección adecuada de pacientes para el tratamiento. Los anticuerpos monoclonales se unen al dominio extracelular de EGFR inhibiendo así su actividad tirosina cinasa. También se ha visto que es necesario que

BRAF sea no mutado para una respuesta favorable de anticuerpos monoclonales. (Labianca; cols 2010).

En base a esto la sociedad Americana de Oncología Clínica recomienda que aquellos pacientes con CCR metastásico candidatos para recibir terapia anti-EGFR deben de tener la prueba de mutación para KRAS. De un estudio realizado en pacientes en fase III se definió que pacientes con CCR metastásico con mutación en KRAS ya sea en el codón 12 o 13 no obtienen ningún beneficio al recibir terapia anti-EGFR y que al parecer la mutación c.35 G>T (p.G12V) confiere una resistencia mayor a la radiación. Ihle y colaboradores hacen referencia a varios estudios en los cuales pacientes que recibieron inhibidores de EGFR y que presentaban mutaciones en KRAS [c.34 G<T (p. G12C) o c.35 G<T (G12V)] están asociadas a una progresión tumoral rápida y una baja sobrevida en comparación con otras mutaciones como c.35 G>A (p.G12D) o en KRAS no mutado (Ihle, 2012).

El objetivo del tratamiento personalizado para el cáncer es seleccionar la terapia para cada tipo de cáncer basado en las características genéticas y moleculares. Aunque los pacientes que presenten KRAS no mutado pueden representar un incremento en la sobrevida libre de progresión, la mitad de ellos no tienen respuesta a los anticuerpos monoclonales y eventualmente desarrollan resistencia al tratamiento. Esto puede deberse a la presencia de mutaciones en otros oncogenes como BRAF con una incidencia de 5-10% o en NRAS con una frecuencia de 2-15%.

#### NRAS:

La proteína NRAS, al igual que KRAS pertenece a la familia de enzimas RAS-GTPasas. El gen se ubica en el cromosoma 1p13.2 y la proteína tiene un peso molecular de 21.2 KDa. Las proteínas RAS son homólogas en un 90% de sus aminoácidos pero varían en el dominio C-terminal donde se encuentra la región hipervariable para las modificaciones post-transcripcionales (Wang, 2013). A semejanza de KRAS, la proteína NRAS puede participar en la vía de señalización de las MAPK-cinasas activando los efectores río abajo de la vía de señalización antes mencionados.

Las mutaciones en NRAS mantiene la actividad GTPasa activa de manera constitutiva y pueden presentarse en los codones 12, 13 o 61 principalmente y son excluyentes de las mutaciones en KRAS. Son pocos los estudios que se han realizado para



saber su incidencia: la base de datos COSMIC reporta que pueden presentarse en un 3%; Natsumi Irahara y cols (2010) reportan 2.2% de casos mutados en los codones 12 y 6; Cox D, cols (2014) reporta un porcentaje de mutaciones de 7.5% .

### PI3K

La proteína fosfatidilinositol-3 (PI3K) cinasa pertenece a la familia de cinasas de lípidos heterodiméricas ya que cuenta con una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. Tiene un tamaño de 1086 aminoácidos y un peso molecular de 110,000 Da, se encuentra localizado en el cromosoma 3q 26.3 .

Las proteínas PI3K son clasificadas en 3 clases dependiendo de su estructura y sustrato lipídico (Fig. 5):

- La clase IA son las más importantes en términos de transducción en la vía de señalización y que se encuentran asociadas al desarrollo del cáncer. Cuenta con dos subunidades y está codificada por los siguientes genes (Tabla 3) (Courtney; cols. 2010) :

Tabla 3. Subunidades de PI3K clase I

Subunidad	Genes	Isoformas
p85	PIK3R1	p85 $\alpha$ ( a su vez tiene dos transcritos alternativos: p55 $\alpha$ y p50 $\alpha$ )
	PIK3R2	p85 $\beta$
	PIK3R3	p55 $\gamma$
p110	PI3KCA	p110 $\alpha$
	PI3KCB	p110 $\beta$
	PI3KCD	p110 $\delta$

Las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  están expresadas en todo tipo de células mientras que p110 $\delta$  está expresado solo en células del sistema inmune. Pueden ser activadas por la interacción con receptores RTK o a través de la activación de proteínas RAS que se unen a la subunidad p110. La subunidad p85 carece de actividad cinasa ya que tiene función reguladora, estabiliza e inhibe a la subunidad p110 catalítica acoplándola a la forma activa. (Polivka, cols 2014).

La subunidad catalítica p110 $\alpha$  codificada por *PI3KCA* está conformada por el dominio de unión a p85 en el extremo amino terminal, seguido del dominio de unión a las proteínas RAS, el dominio C2, el dominio helicoidal codificada por el exón 9 y el dominio cinasa en el carboxilo terminal codificado por el exón 20 (Zang; cols. 2011). Este gen ha sido relacionada con el desarrollo de ciertos tumores como en cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer de mama y cáncer de pulmón.

- Las proteínas de la clase IB tienen como unidad catalítica p110 $\gamma$  y se une a las subunidades reguladoras p101 y p87. Este tipo de proteínas está muy expresada en leucocitos (Vanhaesebroeck; cols 2010).
- Las proteínas de la clase IIA (con las sub-clases PI3K-C $\alpha$ , PI3K- C2 $\beta$  y PI3K- C2 $\gamma$ ) es monomérica ya que no tienen subunidad regulatoria pero cuentan con una extensión en el amino y carboxilo terminal en el núcleo de la unidad catalítica la cual podría mediar las interacciones proteína-proteína.
- La clase IIIA se ha visto que puede estar involucrada en el tráfico de proteínas y vesículas; también está implicado en la optimización de algunas funciones de las células inmunes y en la fagocitosis (Vanhaesebroeck; cols. 2010).

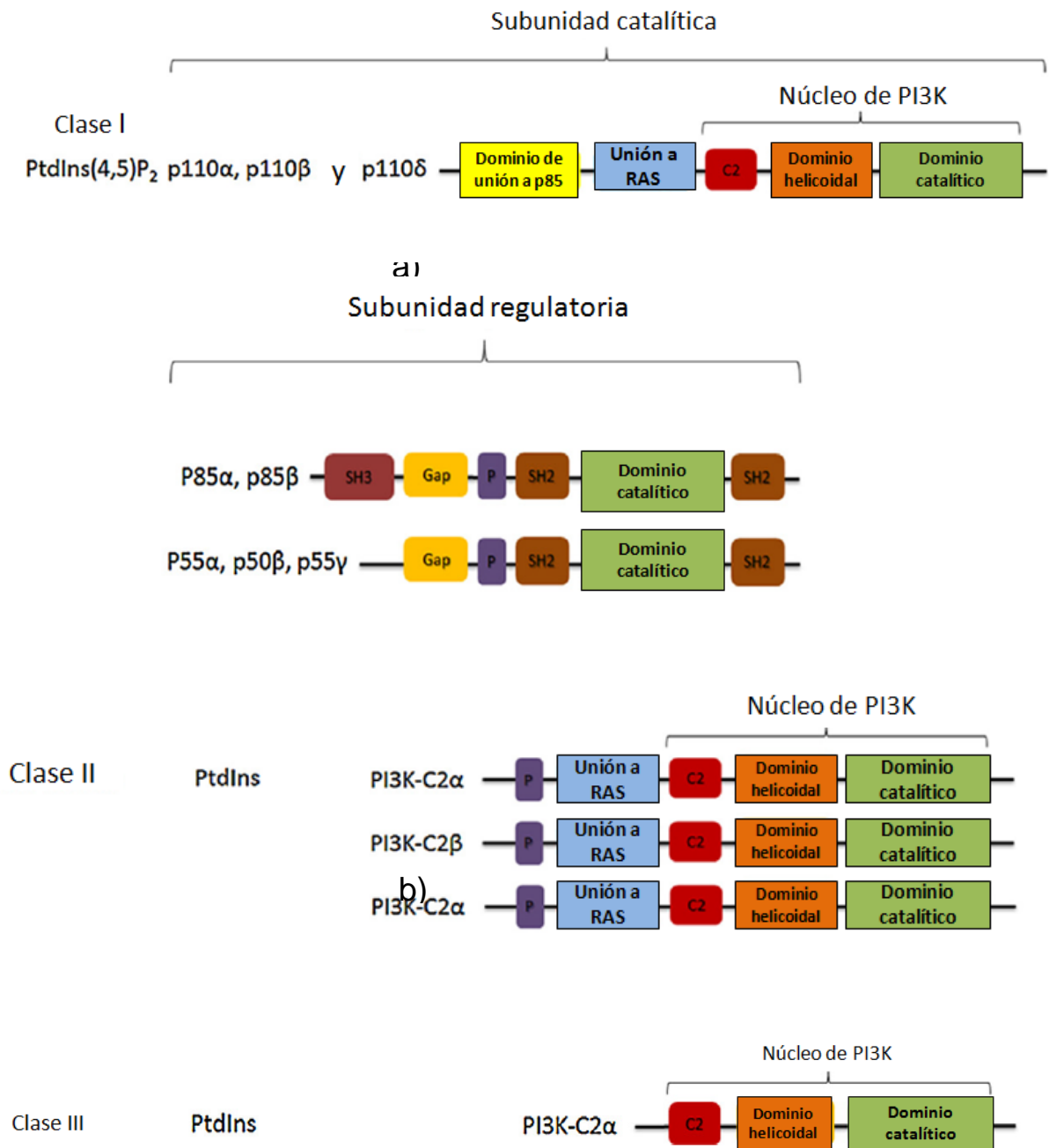


Fig 5. a) Estructura de las proteínas PI3K clase IA y IB. Formadas por las subunidades catalítica (con dominios de unión a proteínas RAS, catalíticos, helicoidales, SH, GAP) y regulatoria que cuenta con dos isoformas. b) Las proteínas IIA pueden ser 3 isoformas: PI3K-C $\alpha$ , PI3K-C $\beta$  y PI3K-C $\gamma$ . c) Proteínas de la clase III son más asociadas células del sistema inmune. Tomada de. Papadatos-Pastos; cols.2015.

PI3K puede ser activada por diferentes tipos de receptores tirosin-cinasa (RTK) como EGFR, HER2, FGFR o PDGFR; y también por medio de las proteínas efectoras RAS que se unen directamente a la subunidad catalítica (Polivka, 2014). Una vez activada esta

será translocada a la membrana plasmática . Su función principal es la fosforilación del grupo OH de los fosfatidilinosoles, por lo tanto llevará a cabo la fosforilación del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4, 5-trifosfato (PIP3) que actúa como segundo mensajero. La función de los lípidos en la membrana como mensajeros es permitir el anclaje a la membrana de enzimas cinasas que traducirán las señales al citoplasma (Fumarola; cols 2014).Una vez activada, PIP3 realizará la unión de la cinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol (PDK1) y la fosforilación de AKT que también se encuentra reclutada en la membrana. Una vez activada inhibe proteínas activadoras de apoptosis como GSK3, FOXO3 y Bcl-2 estimulando a su vez la progresión celular (Fig. 6)

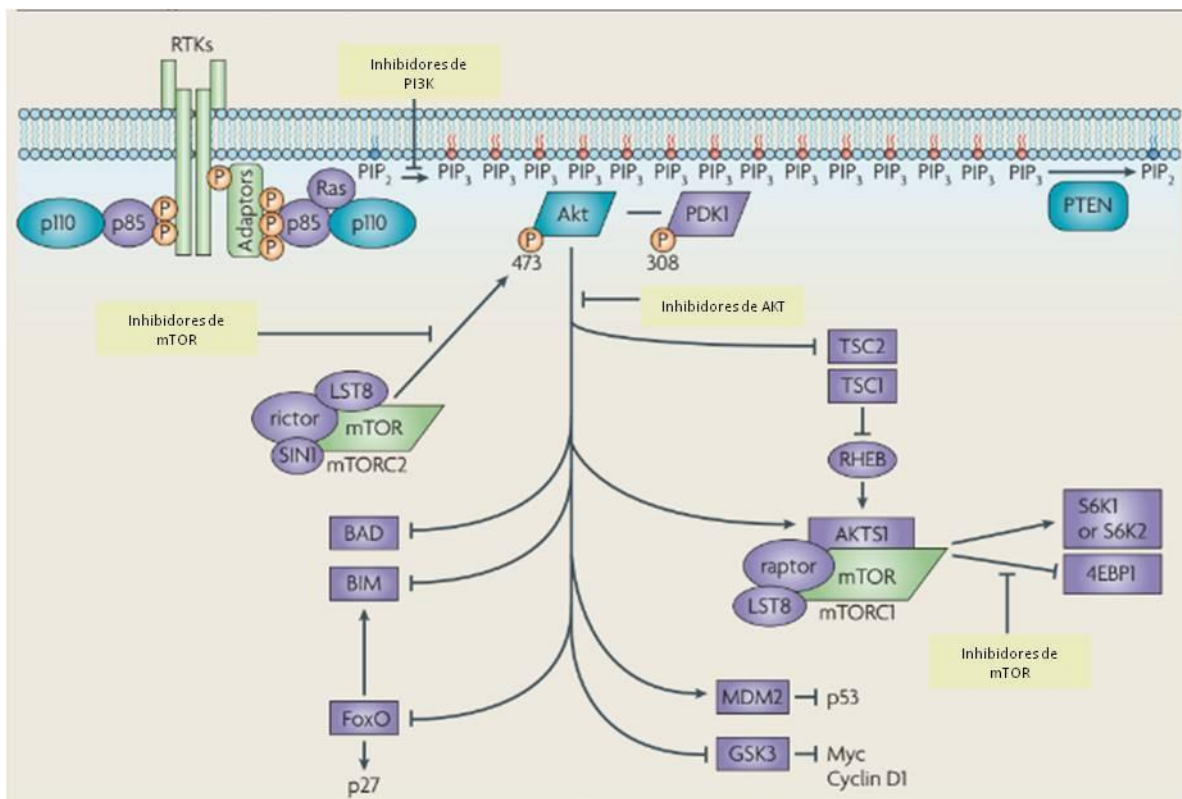


Fig.6 Proteína PI3K de clase I que está constituida por una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora p85. La vía de señalización puede ser activada por un receptor tirosin-cinasa o por una proteína RAS. Al activarse, PIP2 se fosforila creando un segundo mensajero PIP3 que permitirá el anclaje a la membrana de AKT y PDK. Tomada de Engelman, 2009.

### PI3K en CCR

La activación de PI3K en neoplasias puede darse por diferentes mecanismos ya sea por amplificación de los genes codificantes para PI3K o mediante mutaciones en los exones codificantes para las subunidades de PI3K.

Samuels y cols (2004) realizaron un estudio de identificación de mutaciones en tejido normal y tejido con neoplasia. Se analizaron 117 exones, mostrando que el gen PI3KCA tenía mutaciones somáticas y que estas se relacionaban con el desarrollo tumoral. Los exones que se veían afectados son el 9 (en los codones 542 y 545) y por lo tanto al tener mutaciones no regulan la subunidad catalítica y el exón 20 (codón 1047) lo cual lleva a la activación de la proteína.

Los efectores río abajo activados por PI3K, AKT y mTOR (ambas tirosinas cinasas), activan la transcripción de varios genes que van a codificar reguladores del ciclo celular como MYC o ciclina D1 activando la proliferación celular. El gen supresor PTEN es antagonista de PI3K por lo tanto también existen las mutaciones en este gen en CCR y que se relaciona con un peor pronóstico (Cathomas, 2014).

Las mutaciones en la vía de PI3K causan una activación constante en ausencia de factores de crecimiento y por lo tanto se ha sugerido que estas mutaciones confieren una resistencia a las terapias con anticuerpos. En CCR las mutaciones activas de PI3K se encuentran frecuentemente en etapas avanzadas. (Velho; cols. 2005).

La mutación en la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de PI3KCA son las más frecuentes (reportadas en un 32% de los casos) y promueven la transformación de adenoma a carcinoma. Las mutaciones en PI3K se pueden utilizar como marcador predictivo para terapia de anti-EGFR aunque no hay ningún estudio concluyente (Pritchard, 2011).

En los últimos años se ha tratado de mejorar la terapia dirigida para los diferentes tipos de tumores. En CCR 40% de los pacientes pueden presentar mutación en KRAS, 15% en BRAF, 20% en PI3K y 7% en NRAS. Los pacientes cuádruple negativo (es decir KRAS, NRAS, BRAF y PI3K) pueden ser tratados con anticuerpos monoclonales anti-EGFR con una probabilidad mayor de respuesta positiva en comparación con aquellos que tienen una o más mutaciones, además hay evidencia que sugiere un papel crucial de mecanismos no genéticos que pueden conferir resistencia a la terapia anti-EGFR (Fig. 7) (De Roock; cols. 2010).

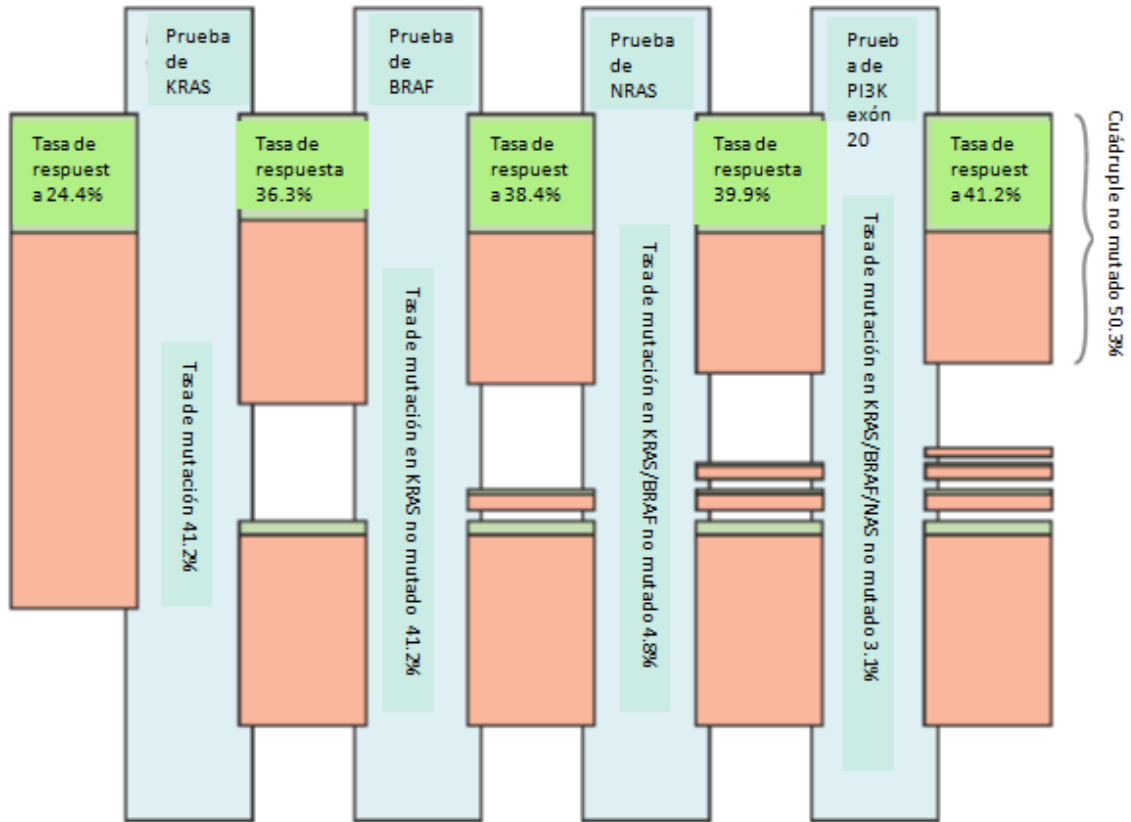


Fig 7. Mejora en la tasa de respuesta mediante la evaluación de mutaciones en cada gen Tomada de De Roock; cols. 2010.

Se ha observado que no hay una exclusividad mutua entre las mutaciones de PI3K y la vía de señalización de EGFR; esta co-existencia de mutaciones ocurren en menos de un tercio de los casos (5-10%) lo cual sugiere que se deben desarrollar terapias simultáneas de inhibición para poder obtener un tratamiento efectivo (Sepulveda, A; cols.2016).

Las mutaciones más frecuentes en CCR de acuerdo a las bases de datos COSMIC y TCGA son (Tabla 4):

Tabla 4. Frecuencia de mutaciones para PI3KCA de acuerdo a las bases de datos TCGA y COSMIC

The Cancer Genome Atlas	COSMIC
c.1633G>A (E545K) 6.53% (35/536)	c.1633G>A (E545K) 3.13% (384/12231)
c.3140A>G (H1047R) 3.54% (19/536)	c.1624G>A (E542K) 2.24% (274/12231)
c.1624G>A (E542K) 2.43% (13/536)	c.3140A>G (H1047R) 2.13% (261/12231)

c.263G>A (R88Q) 2.43% (13/536)	c.1636C>A (Q546k) 0.72% (89/12231)
c.3139C>T (H1047Y) 0.75% (4/536)	c.3129G>T (M1043I) 0.43% (53/12231)
Total de mutados: 13.25%	Total de mutados: 8.65%

En un estudio realizado por Lievre y cols. (2006) en pacientes con CCR encontraron un 43% con mutación en KRAS, y un 7% con mutación en PI3K en el exón 9 y KRAS de manera co-existente; el 37% de pacientes no mutados tenían una respuesta favorable al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR y por lo tanto la respuesta a este medicamento está fuertemente asociado a la presencia de la mutación en el gen de KRAS y PI3K.

Estudios previos también muestran que las sustituciones de aminoácidos E542K, E545K y H1047R representan las más comunes y se han reportado también en cáncer de colon, mama, ovario, pulmón y cerebral. Estas mutaciones se ha demostrado de manera *in vitro* que aumentan la actividad cinasa de lípidos a comparación de aquellos que tienen PI3K no mutado (Li Zhao, cols 2008).

Tabla 5. Frecuencia de mutaciones en genes de la vía de señalización de EGFR y PI3K. Tomada de Sepulveda,A; cols.2016

Señalización	Genes	Frecuencia %
MAPK	KRAS	40-45
	NRAS	2.5
	BRAF	5-10
PI3K	PI3KCA	15
	PTEN	10-20
	AKT	5

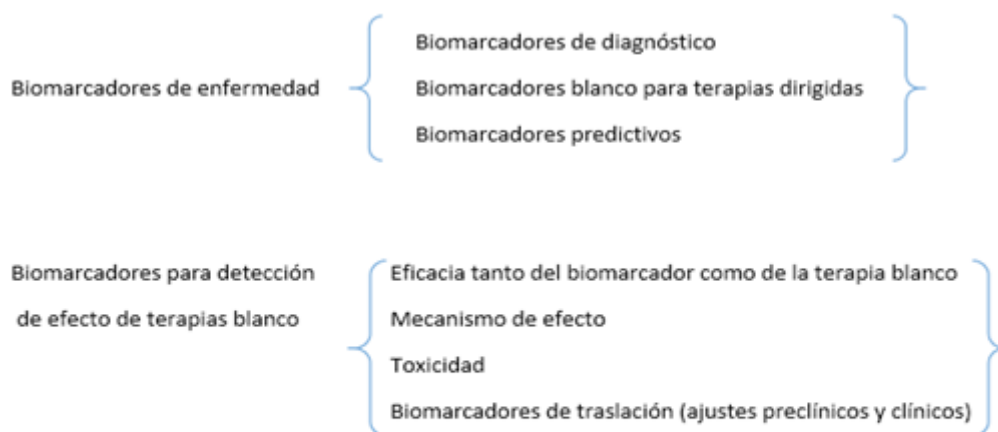
#### Biomarcadores en cáncer:

Es definido como una característica biológica que puede ser medida y evaluada como un indicador de un proceso fisiológico o biológico normal, un proceso patológico o una respuesta a una intervención terapéutica. Un biomarcador puede estar representado por un parámetro clínico medible (p. ej edad, presión arterial, etc), características histopatológicas (índice mitótico, pleomorfismo celular, etc) y compuestos conforman estructuras celulares o que forman parte de su metabolismo como proteínas (enzimas o receptores), ácidos nucleicos (DNA, mRNA, miRNA) anticuerpos o péptidos (Henry Lynn ; cols. 2012).

Los biomarcadores son útiles en diversos aspectos: con ellos se puede estimar el riesgo de desarrollo de cáncer, realizar diagnóstico, pueden contribuir a una mejor clasificación de la enfermedad así como brindar información acerca de la progresión de la enfermedad, pronóstico y respuesta a posibles terapias blanco.

Jain Kewa (2010) clasificó los biomarcadores moleculares de la siguiente manera:

Tabla 6. Clasificación de biomarcadores. Tomada y modificada de Kewal K. Jain (2010)



#### Biomarcadores como criterios de evaluación de ensayos clínicos

De acuerdo con Henry Lynn y colaboradores para poder validar una molécula como biomarcador es importante considerar:

- a) los factores pre-analíticos: que se refiere que el método de extracción-purificación de los biomarcadores sea el adecuado;
- b) validez analítica en la cual se describe los aspectos técnicos de la prueba de detección y los criterios de aceptación;
- c) la validación clínica: en la cual se determina si el biomarcador diferencia las poblaciones de interés así como su reproducibilidad.

Estos rubros aseguran la utilización de biomarcadores como herramientas de diagnóstico, predicción y pronóstico para brindar beneficio directo al paciente y que se pueda utilizar información adicional la toma de decisiones.

La organización de Administración de alimentos y medicamentos (por su siglas en inglés



FDA) define que un biomarcador ideal es aquel que presenta las siguientes características (K.K. Jain,2010):

- Está específicamente asociado a una enfermedad en particular o un estado de alguna enfermedad.
- Es fácilmente de diferenciar entre otras condiciones fisiológicas similares.
- Usa fuentes biológicas estándar.
- La detección debe ser rápida, precisa y sencilla, además de que debe haber una línea de base como referencia.

En el estudio del cáncer existen diferentes tipos de biomarcadores de acuerdo al parámetro biológico evaluado. algunos ejemplos son:

- Biomarcadores genéticos (síndromes de predisposición al cáncer): gen PTEN, mutaciones en genes y oncogenes.
- Biomarcadores DNA (mutaciones somáticas) : Amplificación de genes, inestabilidad microsatelital.
- Biomarcadores RNA: microRNA, mRNA
- Biomarcadores de proteínas: ligandos
- Biomarcadores metabólicos
- Biomarcadores epigenéticos
- Biomarcadores inmunológicos
- Biomarcadores de células madre cancerígenas

En CCR el pronóstico del paciente depende de diferentes factores que tienen que ver con el estadio en el que se encuentra el tumor y están definidos en diferentes guías clínicas para indicar terapias adyuvantes, pero no es posible basarse sólo en características clínico-patológicas. Por ello se utilizan los biomarcadores para completar este perfil con el diagnóstico molecular. Histológicamente el CCR es muy homogéneo pero molecularmente puede tener diferentes perfiles de expresión genética. Actualmente se han identificado diferentes genes como *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PI3K*, *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4*, *ARID1A*, *SOX9* que tienen una alta tasa de mutación, también los genes *ERBB2* y *IGF2* que pueden presentar cambio en el número de copias y cambios en la metilación como en el gen *MLH1*. Aun cuando se han caracterizado varias vías de señalización e identificado genes de valor pronóstico, clínicamente no están suficientemente validados. Actualmente hay pocos biomarcadores en CCR que son tomados en cuenta como de valor pronóstico o predictivo,

el más usado es la presencia de mutaciones en el gen KRAS (Danielsen, cols. 2014).

Los tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE) son un recurso valioso para la realización de pruebas que pueden ayudar en el diagnóstico y seguimiento del CCR. Este tipo de espécimen puede utilizarse para identificar biomarcadores y favorecer la clasificación molecular de estos tumores. El manejo de la muestra es importante (recolección de la muestra, uso de formol amortiguado, tiempo de fijación > a 24 hrs) porque puede causar la fragmentación y degradación del DNA lo cual afecta los resultados generando falsos negativos.

El diagnóstico de la presencia de mutaciones en un tumor puede ser limitado por factores de diferentes tipos, como:

Biológicos:

- El tipo de tumor.
- La etapa de desarrollo tumoral en la que se realiza la detección ya que en etapas tempranas del tumor predominan las células no mutadas.
- El tipo de muestra.

Metodológicos:

- Metodología usada para detección de mutaciones
- Procesamiento de la muestra
- Calidad del DNA obtenido

Para poder tener material de buena calidad a partir de muestras FFPE, se debe considerar integralmente el proceso de estudio: (Hernández Losa, et.al 2012):

- Pre-analitica.
  - Fijación de la muestra: La pieza debe de ser fijada dentro de la siguiente hora después de su obtención en formol al 10% pH neutro de 8-48 hrs. No se deben utilizar fijadores basados en alcohol.
  - Procesamiento con parafina de calidad adecuada para estudios histológicos y su conservación a largo plazo.
- Analítica:
  - Selección de la sección del tejido: Los cortes histológicos deben ser

examinados por un patólogo o personal entrenado adecuadamente para identificar la zona de tumor. Idealmente se elige el bloque que tenga como mínimo 20% de carcinoma. En caso de tener una proporción menor del tejido de interés, existen diferentes metodologías de enriquecimiento celular como la macrodissección (guiada o no con el uso de microscopio) o la microdissección láser.

- Extracción de ácidos nucleicos: Existen diferentes métodos validados clínicamente como:
  - Métodos orgánicos: las células son lisadas y las proteínas son digeridas usando proteasas y precipitadas usando solventes orgánicos como fenol-cloroformo y separadas de los ácidos nucleicos por centrifugación. El DNA purificado es recuperado por precipitación con etanol o isopropanol. Algunas desventajas de este método es que utiliza solventes orgánicos peligrosos, requiere de tiempo y los residuos de fenol-cloroformo pueden afectar la calidad del DNA.
  - Métodos con sílica: Tiene como principio la unión reversible del DNA a membranas de sílica en presencia de sales y pH particular. Las células son lisadas utilizando sales caotrópicas que desnaturalizan proteínas e incrementa la solubilidad de sustancias apolares; estos contaminantes son removidos con soluciones de lavado. El DNA es eluido utilizando un buffer de baja salinidad y cambio de pH. Esta metodología es usada por muchos kits comerciales siendo de bajo costo y de metodología rápida.
  - Separación magnética: También es una unión irreversible del DNA a esferas/partículas magnéticas con un grupo funcional o un anticuerpo que interactúa específicamente con el DNA y los contaminantes son removidos con buffers de lavado, para que se pueda separar por medio de alcohol. Este método puede ser costoso.
- Post-analítica:
  - Interpretación de resultados: De acuerdo con la metodología usada los resultados deben estar dentro de los criterios de evaluación establecidos por el proveedor.

### Diferentes métodos utilizados para la identificación de mutaciones

La identificación de mutaciones en los diferentes biomarcadores es posible gracias a los diferentes métodos desarrollados en los últimos años, los más utilizados son:

- **Secuenciación Sanger:** Es el método general para determinar el orden de los nucleótidos en un ácido nucleico. La secuenciación Sanger utiliza las propiedades de la DNA polimerasa así como de dideoxynucleotidos trifosfato respectivamente (ddNTP's) que sirven como terminadores de la reacción. Los dideoxynucleótidos difieren de los deoxynucleótidos por tener un átomo de hidrógeno (H) en el carbono 3' en vez de un grupo hidroxilo (-OH), por lo tanto una vez que un grupo ddNTP es añadido a la secuencia la DNA polimerasa se detiene. Al final de la reacción resulta en un conjunto de cadenas de DNA que son complementarias al DNA molde pero de diferentes tamaños de pares de bases determinado por el ddNTP (Sepulveda A. cols 2016)
- **Pirosecuenciación** fue diseñada para monitorear en tiempo real la secuenciación del DNA. La secuencia molde es amplificada, los deoxinucleótidos son añadidos en presencia de cuatro enzimas: polimerasa (cuando añade un ddNTP a la cadena genera un PP), sulfurilasa (convierte el PP en ATP), luciferasa (en presencia de ATP convierte la luciferasa en oxiluciferina, generando un fotón de luz visible) y aspirasa (degrada los nucleótidos que no se incorporan a la cadena). La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados. A diferencia de la secuenciación, la pirosecuenciación es más sensible ya que puede detectar hasta menos del 10% de alelos mutantes (Buckingham, 2012; Hye Seung Lee, 2017; Sepulveda A. cols 2016)
- **Secuenciación de siguiente generación:** Este método fue diseñado para secuenciar un gran número de fragmentos de manera simultánea.
- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Hace posible la amplificación de un fragmento de un gen, de DNA o RNA previamente purificado. La amplificación efectiva del ácido nucleico requiere en la práctica de varios ciclos de reacción y en cada ciclo los productos generados actúan como molde para el siguiente. Es un método sensible ya que tiene la capacidad de detectar una sola molécula de DNA blanco (Alberts, 2002).

La reacción de PCR requiere de los siguientes componentes:

- DNA molde.
- Taq DNA polimerasa obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*; enzima que cataliza la reacción de amplificación y que es estable a altas temperaturas.
- Primers específicos que flanquean la región de interés.
- Nucleótidos trifosfato que se unen de forma complementaria a la nueva cadena
- Amortiguador que provee un ambiente estable para la Taq DNA polimerasa.

Y esta reacción comprende los siguientes pasos (Fig.8):

- Desnaturalización: El DNA se calienta entre 94-96°C para favorecer la apertura rompiendo los enlaces de hidrógeno durante unos 5 minutos en promedio.
- Después del primer paso de desnaturalización se realizan ciclos (aproximadamente de 35-40) y se compone de los siguientes pasos (Rahman,MT; cols 2013):
  - Desnaturalización: La doble cadena de DNA es desnaturalizada para que queden cadenas individuales a una temperatura de 94-96°C.
  - Alineamiento: Los primers identifican la secuencia blanco, a una temperatura (45-60°C) dependiendo de cada juego primer.
  - Extensión: Se genera una copia denominada DNA complementario por medio de la Taq DNA polimerasa a una temperatura de 72°C.
- Después del último ciclo se realiza una incubación a 72°C para asegurar la extensión de los últimos fragmentos generados.

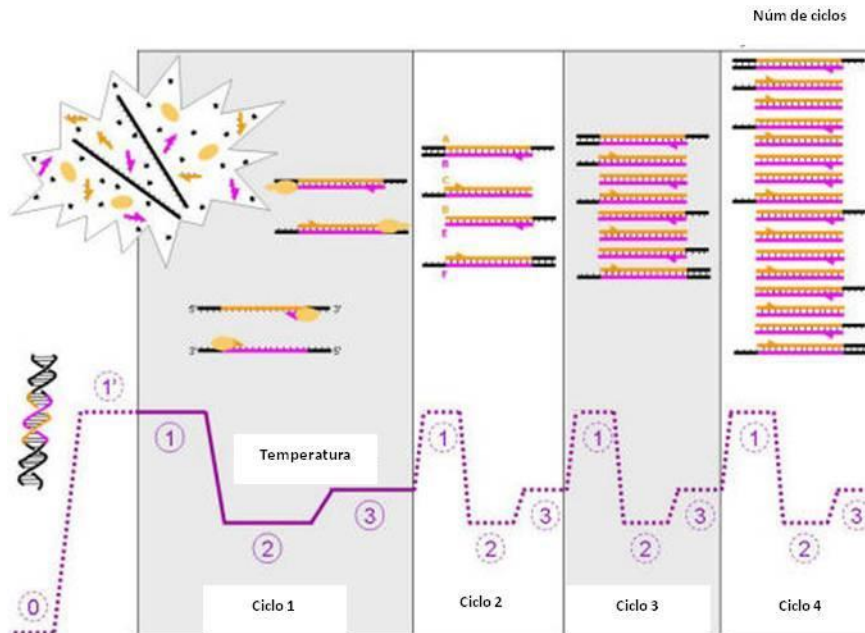


Fig. 8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se observa la amplificación del producto de acuerdo al número de ciclos. Tomada de BioPharmaceutical Technology Center.

Al final de cada ciclo se obtiene un crecimiento exponencial del número total de fragmentos de DNA ( $2^n$ , donde  $n$  es el número de ciclos). (Joshi; cols. 2010).

### PCR tiempo real

Es una técnica que combina la amplificación y la detección del producto en un solo paso mediante el uso de fluoróforos. Tiene como ventajas alta especificidad, un amplio rango de detección (aproximadamente de 1 copia a  $10^7$ ) y la visualización de la curva de amplificado. Los fluoróforos que se utilizan para PCR en tiempo real tienen un espectro muy amplio y pueden ser de dos tipos:

- a) Fluoróforos con afinidad: Se unen al DNA generando una emisión de fluorescencia. La intensidad es proporcional a la concentración de DNA de doble cadena. En los 90's se utilizaba el bromuro de etidio pero este no diferenciaba entre DNA de doble cadena o cadena sencilla e interfiere con la polimerización además de ser tóxico y cancerígeno. En el 2000 se introduce el uso de un nuevo marcador, que se une a la cadena doble de DNA llamado SYBR Green el cual absorbe la luz a una longitud de onda de 480 nm y la emite a 520 nm, además de ser amable con el ambiente.
- b) Transferencia de energía entre fluoróforos (Sondas FRET): en el cual la excitación

de un fluorocromo puede transferirse a otro cercano, generalmente cuando ambos se sitúan en la misma molécula mediante un mecanismo acoplador diplo-diplo (Sondas Taq-Man, Molecular beacons, Scorpions) (Fig. 9).

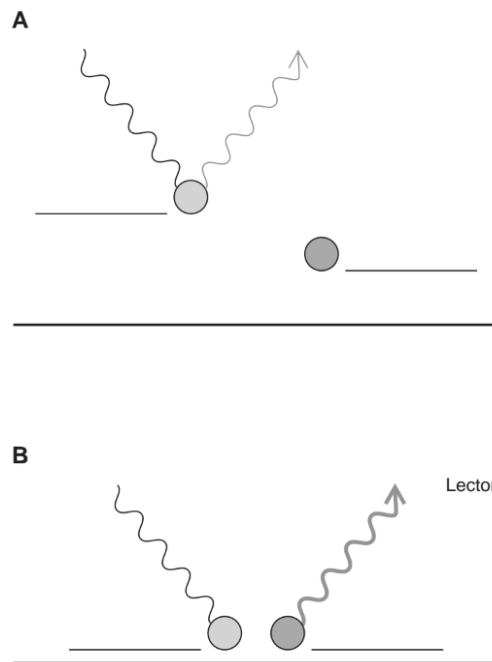


Fig. 9 Sondas FRET. Tomada de Costa, 2004

- i) SondasTaqMan Utiliza la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq DNA polimerasa para generar una señal, el fluorocromo donador en el extremo 5' y el aceptor en el extremo 3, espacialmente próximas y por lo tanto la fluorescencia del donador es absorbida por el aceptor. La DNA taq polimerasa al ir sintetizando la nueva cadena, se desplaza e hidroliza la sonda, cuando se separan el donador del aceptor entonces se emite una señal de fluorescencia (Buckingham, 2012; Costa, 2004) (Fig. 10).

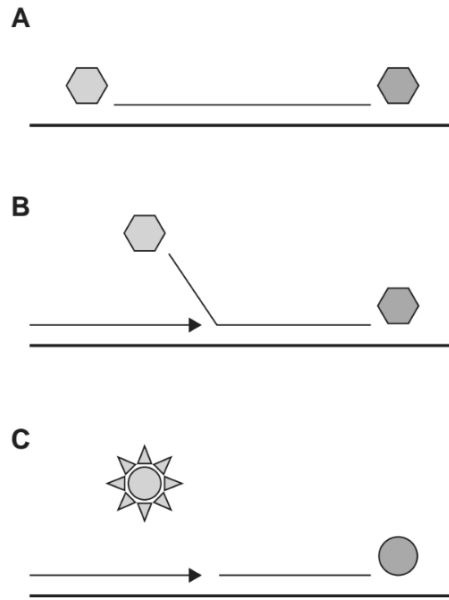


Fig. 10 Sonda de hidrólisis. Tomada de Costa, 2004

- ii) **Molecular Beacons:** Esta sonda tiene una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3', pero están en una estructura de horquilla en la que está la secuencia de unión al DNA diana. Cuando se realiza la hibridación de la sonda con el DNA entonces el donador y aceptor se separan emitiéndose la fluorescencia un tipo de estas sondas son las sondas Scorpions (Buckingham, 2012; Costa, 2004) (Fig. 11).

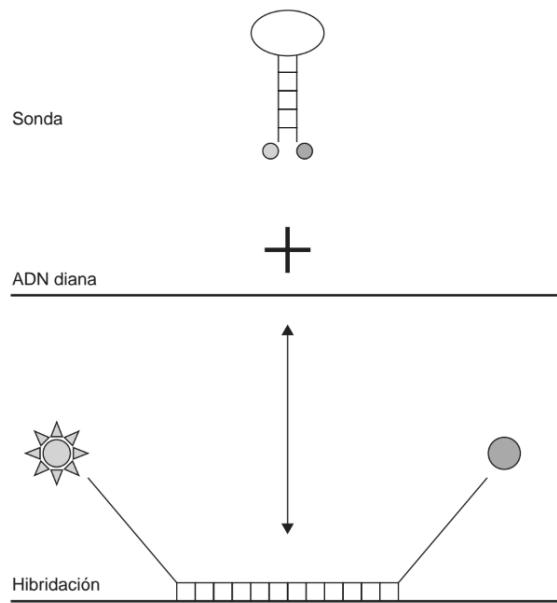


Fig. 11 Molecular Beacons. Tomada de Costa, 2004



La combinación de dos sistemas de detección de mutaciones puntuales como los ARMS y los Scorpions (variante de las sondas Molecular Beacons) , produce suficientes copias que pueden detectar hasta en 1% de DNA mutado en un fondo de DNA wt. Los ARMS realizan la amplificación alelo específica mediante el uso de dos primers idénticos en su secuencia excepto en su nucleótido 3', ya que uno tiene el nucleótido complementario del gen no mutado y el otro correspondiente al gen mutado. (García; cols 1999).

Las sondas SCORPIONS tienen marcado un oligonucleótido en su extremo 5' con un aceptor y en 3' con su donador, que se encuentra formando una horquilla y así se mantienen cercanos para llevar a cabo la transferencia de energía y mantener el reportero sin emisión de fluorescencia. Si se une a la secuencia de interés entonces la horquilla se abre permitiendo el alejamiento del donador del aceptor y lo que genera la emisión de fluorescencia.

## **JUSTIFICACIÓN:**

El uso de biomarcadores en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de colon es reciente. Actualmente se cuentan con diversas guías en las cuales se expresa la necesidad de realizar la determinación de mutaciones en RAS y RAF. Se ha determinado que no solo se debe de realizar el diagnóstico con las mutaciones en estos genes sino que existen otros componentes de la vía de señalización de EGFR que pueden conferir resistencia a la terapias con anticuerpos monoclonales. Actualmente aquellos pacientes con CCRm que son candidatos a recibir terapia anti-EGFR se les debe realizar la determinación de KRAS y NRAS (García -Alfonso,et.al 2015) pero se ha observado que existe un alto porcentaje de estos pacientes no mutados que no responden a la terapia anti-EGFR y por lo tanto se han explorado otras vías de señalización alternas que puedan activar estos mecanismos tumorales, como la vía de señalización de PI3K. Así pues en el presente estudio se realiza la descripción de la incidencia de mutaciones en KRAS, NRAS y BRAF así como la determinación de mutaciones en PI3KC en una población del Centro Médico ABC.

## **OBJETIVOS:**

Evaluar la presencia de mutación del gen PI3KCA con KRAS no mutado en pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal.

- Determinar la presencia de mutaciones en el gen PI3KCA en aquellos pacientes con CCR que no presenten mutaciones en otros biomarcadores.
- Correlacionar la prevalencia de mutaciones de KRAS/BRAF/NRAS/PI3KCA en una población con diagnóstico de cáncer colorrectal en el Centro Médico ABC.
- Correlacionar la integridad del DNA para el diagnóstico molecular de biomarcadores.

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Se realizó un análisis retrospectivo de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal con estudio de KRAS realizado en el departamento de Patología Molecular del Centro Médico ABC de enero del 2013 a abril del 2016. Se consideró también si tenían determinación para otros marcadores adicionales como BRAF y/o NRAS. Se realizó una base de datos que incluía: fecha de recepción, número asignado, nombre del paciente, diagnóstico, grado de diferenciación, hospital de procedencia, sitio de biopsia, número de quirúrgico y determinación de la mutación reuniendo un total de 99 casos.

Aquellos pacientes con KRAS y/o BRAF no mutado y con suficiente material biológico se les realizó PI3KCA (20 casos).

### Extracción de DNA

El DNA se obtuvo utilizando el sistema de extracción kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, USA). De los bloques se realizaron 5 cortes de 8 micras y se colocaron en tubos de polipropileno de 1.5 ml. Se eliminó la parafina adicionando 1 ml de Xilol (J.T Baker), se homogeniza y se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm repitiendo el proceso dos veces y después se adicionó 1 ml de alcohol etílico desnaturalizado (J.T Baker) y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos repitiendo el proceso dos veces. Se dejó secar el botón a temperatura ambiente y una vez seco se agregaron 150 µl de buffer ATL y 50 µl de proteinasa K; se incubó a 56°C por 1 hr con agitación. Posteriormente se incubó a 90°C 10 minutos para evitar la formación de puentes disulfuro y se dejó atemperar. Se agregaron 200 µl de buffer de lisis (AL) y 200 µl de alcohol etílico desnaturalizado (J.T Baker). El lisado se homogeneizó y se transfirió a la columna, centrifugando a 14,000 rpm por 1 minuto. La columna se lavó con Buffer AW1 y AW2. Se secó la membrana de la columna centrifugando por 3 minutos a 14,000 rpm. En seguida se agregaron 60 µl de buffer ATE y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm y el DNA se guardó a -20°C.

### Integridad del DNA

Para la determinación de la integridad del DNA obtenido se realizó un ensayo de PCR de acuerdo al protocolo BIOMED-2. Una reacción de PCR utiliza 12.5 µl del kit HotStar Master Mix y se añaden 0.75 µl de cada primer (con una concentración de 50 pmol de cada uno) de la tabla 7, seguido de la adición de 4 µl del DNA purificado para una reacción total de 24 µl.

Tabla 7. Lista de Primers para ensayo constitutivo con el método BIOMED-2. Se indica el tamaño de los productos amplificados y la Tm para cada primer.

Nombre	Secuencia	Tamaño pb	Tm °C
100 reverse	gggttgccggaagggtt	100	60.9
100 forward	gcccgacattctgcaagtcc	100	58.9
200 reverse	tgagctgcaagttggctgaa	200	57.7
200 forward	tgttgactcgatccaccca	200	58.4
300 reverse	cgtgtcattgtcgtctgaggc	300	58.2
300 forward	tgcgatgtggtcatcatggtg	300	57.8
400 reverse	gcttcctctggcggctcc	400	61.4
400 forward	ccgcagcaagcaacgaacc	400	60.2
600 reverse	catccatgggccggacataa	600	57.4
600 forward	ggagcagcattccatccagc	600	58.9

Se agitó suavemente y se colocó en el termociclador Veriti de Applied Biosystems con el siguiente programa de amplificación: 95°C por 7 minutos, 35 ciclos de 95°C 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1:30 minutos y una extensión final de 72°C por 7 minutos.

En un gel de agarosa (Bio-Rad) al 3% en amortiguador TAE 0.5x (Bio-Rad) que contiene SyBR Green (Life Technologies) se corrieron 10 µl de cada muestra junto con un marcador de peso molecular (AmpliSize Molecular Ruler, Bio-Rad) de 50-2,000 pb por 50 minutos a 120 volts. El gel se analizó en el fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad).

#### Mutaciones *PI3KCA*

Para el análisis de mutaciones del gen *PI3KCA* se utilizó el kit commercial PI3K Mutation Test Kit (Qiagen) que incluye la detección de 4 mutaciones somáticas (H1047, E542K, E545K y E545D) de los exones 9 y 20.

La determinación de *PI3KCA* comprende dos pasos: a) el ensayo control para

evaluar el ADN de la muestra y b) ensayo de mutaciones en el cual se determina la presencia o ausencia de mutaciones.

Para el ensayo control se preparó una mezcla con las siguientes cantidades: 19.8 µl de master mix control (vial 1), 0.2 µl de Taq DNA polimerasa para un volumen total de 20 µl por reacción, se incluyó el control positivo y negativo. Se adicionaron 5 µl de control positivo, 5 µl de agua libre de DNAsas para control negativo y 5 µl de la muestra problema, se homogeniza y se colocó en el termociclador ABI 7500 real-time PCR con el siguiente programa:

Tabla 8. Parámetros de ciclado para ensayo control y determinación de mutaciones de PI3K

95°C	4 minutos	1 ciclo
95°C	30 segundos	40 ciclos
60°C	1 minuto	

El fabricante indica que cuando el Ct obtenido en el ensayo control es menor o igual a 29 el límite de detección analítica corresponde a el 1% de alelos mutantes para las mutaciones (H1047R, E542K y E545K) y hasta en un 2% de la mutación E545D. Si el control es igual a 35 o mayor, se debe repetir la extracción.

Si el control positivo y las muestras cuentan con estos dos puntos se continúa con la evaluación de mutaciones preparando la mix de PCR con las siguientes cantidades:

Tabla 9. Volumen de reacción para cada mutación de PI3K.

Vial	Master Mix (1)	Taq Polimerasa (1)	Volumen total
Control (1)	19.8 µl	0.2 µl	20 µl
H1047R (2)	19.8 µl	0.2 µl	20 µl
E542K (3)	19.8 µl	0.2 µl	20 µl
E545K/D (4)	19.6 µl	0.4 µl	20 µl

Se homogeniza y se colocó en el termociclador ABI 7500 real-time PCR con el programa utilizado para la evaluación. Para cada grupo de mutación se compara el valor de corte (CT) del control positivo para considerar la muestra positivo o negativo.

## RESULTADOS

Se registraron un total 99 casos con diagnóstico de CCR y determinación de KRAS en el Centro Médico ABC de Enero 2013- Mayo 2016 . De estos 58 casos (59%) son no mutados para KRAS y 41 casos (41%) presentaron alguna mutación para KRAS. (Fig.12)

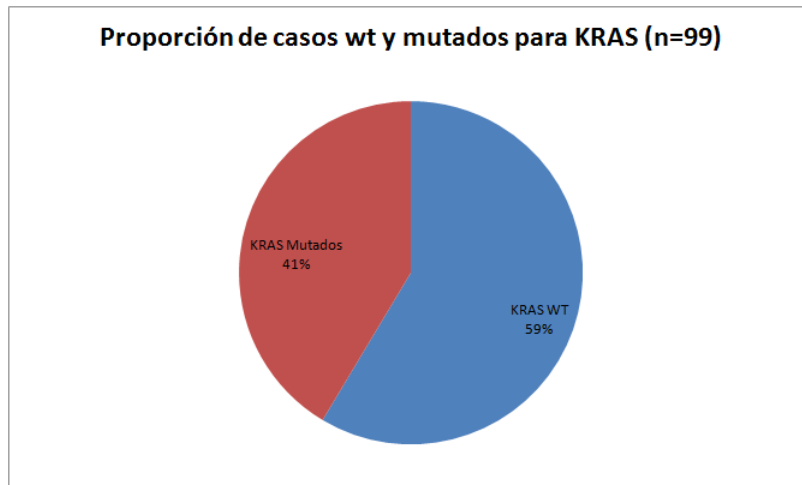


Fig 12. Porcentaje de pacientes mutados para el gen KRAS.

La distribución de las mutaciones para KRAS fue de la siguiente manera (Tabla 10, Figura 13):

Tabla 10. Distribución de mutaciones KRAS

Mutación	Frecuencia
c.35 G>A (p.G12D)	35%
c.35 G>T (p.G12V)	20%
c.38 G>A (p. G13D)	17.5%
c.34 G>T (p.G12C)	10%
c.34 G>A (p.G12S)	7.5%
c.35 G>C (p.G12A)	5%
c.34 G>A (p.G12R)	5%

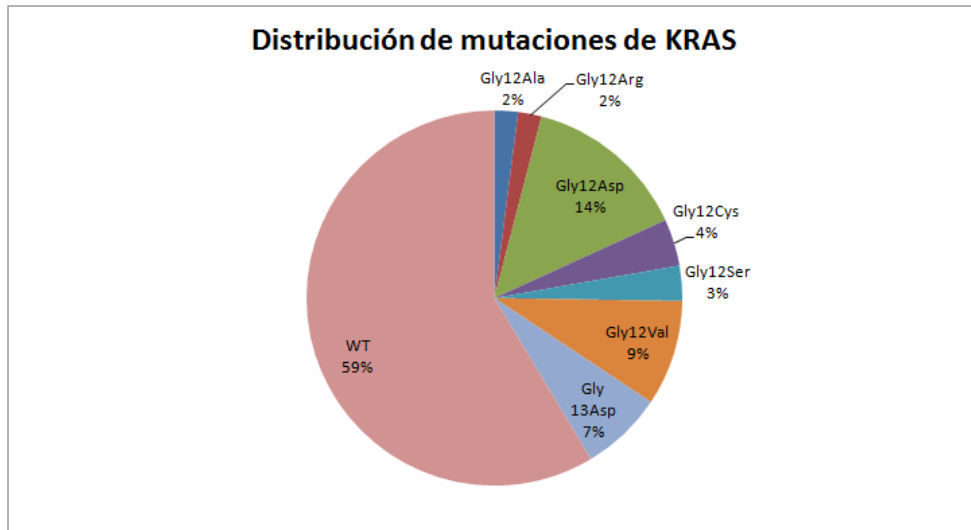


Fig 13. Distribución de mutaciones del gen KRAS en nuestra población n=99.

De los casos estudiados solo 24 tenían determinación de KRAS y BRAF, sólo uno presentaban mutación en BRAF y otro mostró mutación en ambos genes (BRAF y KRAS). Del total de casos 33% tenían prueba para NRAS la cual se realizó en un laboratorio externo mediante secuenciación Sanger amplificando regiones de los codones 12, 13 y 61, ningún caso presentó mutación (Fig. 14)

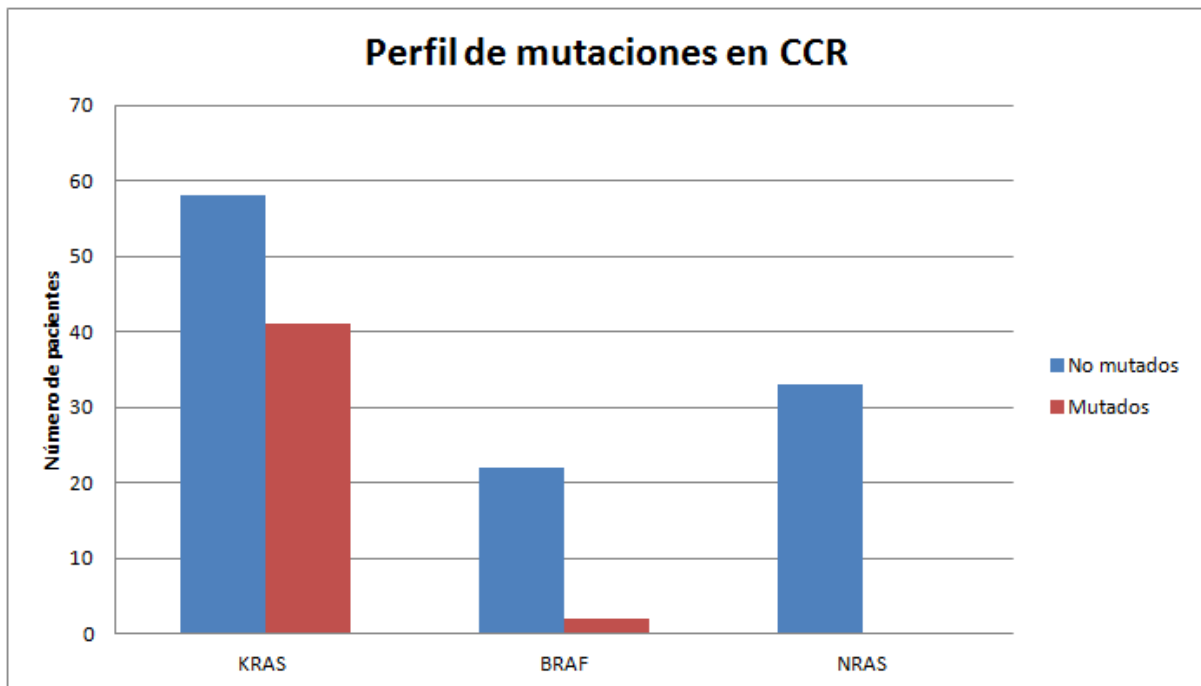


Fig 14. Prevalencia de mutaciones para KRAS, BRAF y NRAS para CCR en el Centro Médico ABC del 2013-2016. Las mutaciones que se encuentran con mayor frecuencia son KRAS. No se encontraron mutaciones en NRAS.



La determinación de PI3K se realizó en 20.2% (n=20) casos que tuvieran KRAS no mutado, y otros marcadores como BRAF y/o NRAS no mutado, además de disponer de material en bloques de parafina para la extracción de ácidos nucleicos.

Del DNA obtenido se procedió a la evaluación de la integridad por medio de un PCR para la evaluación de calidad, en la cual se amplificaron fragmentos de 100-600 pb de acuerdo al protocolo BIOMED- 2 .Los fragmentos por debajo de 100 pb no se tomaron en consideración ya que pueden ser productos de unión inespecífica o restos de primer (Fig. 15; Tabla 11).

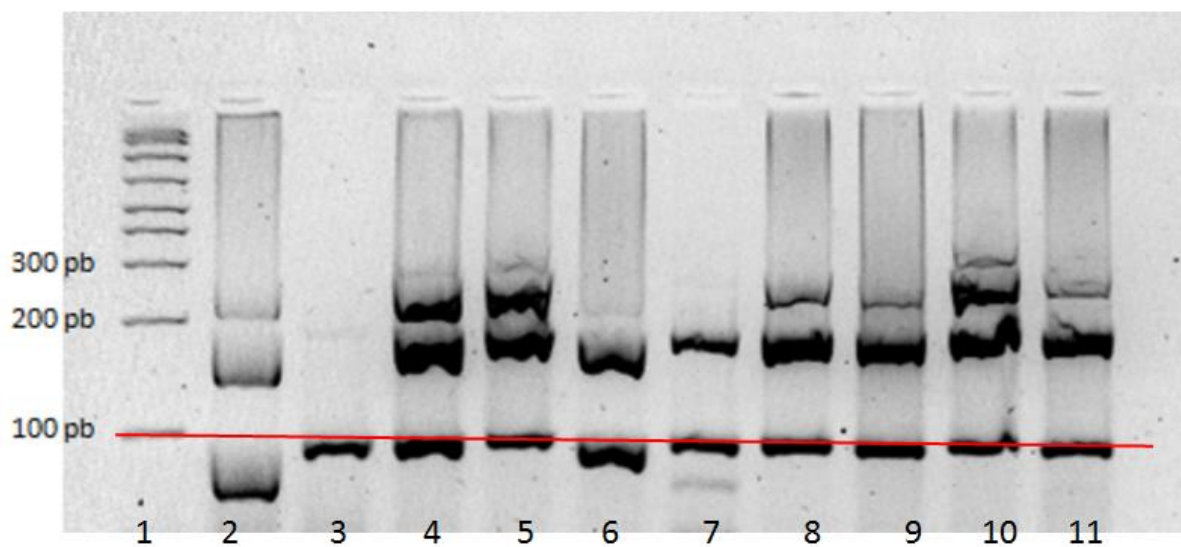


Fig 15. Gel de agarosa con productos de PCR constitutivos. En el carril 1 está el marcador de peso molecular, carril 2-11 muestras.

Tabla 11. Porcentaje de muestras con 1, 2 o 3 bandas

<b>Bandas</b>	<b>% de muestras</b>
1	10%
2	40%
3	40%
4	10%

De 20 casos con material biológico suficiente se realizó la determinación de PI3KCA. Para cada ensayo se corre un control positivo y negativo. De las 20 muestras analizadas 5 no presentaron un ensayo control adecuado por lo tanto fueron clasificadas como indeterminadas y no se realizó el ensayo de mutaciones (Fig 16).

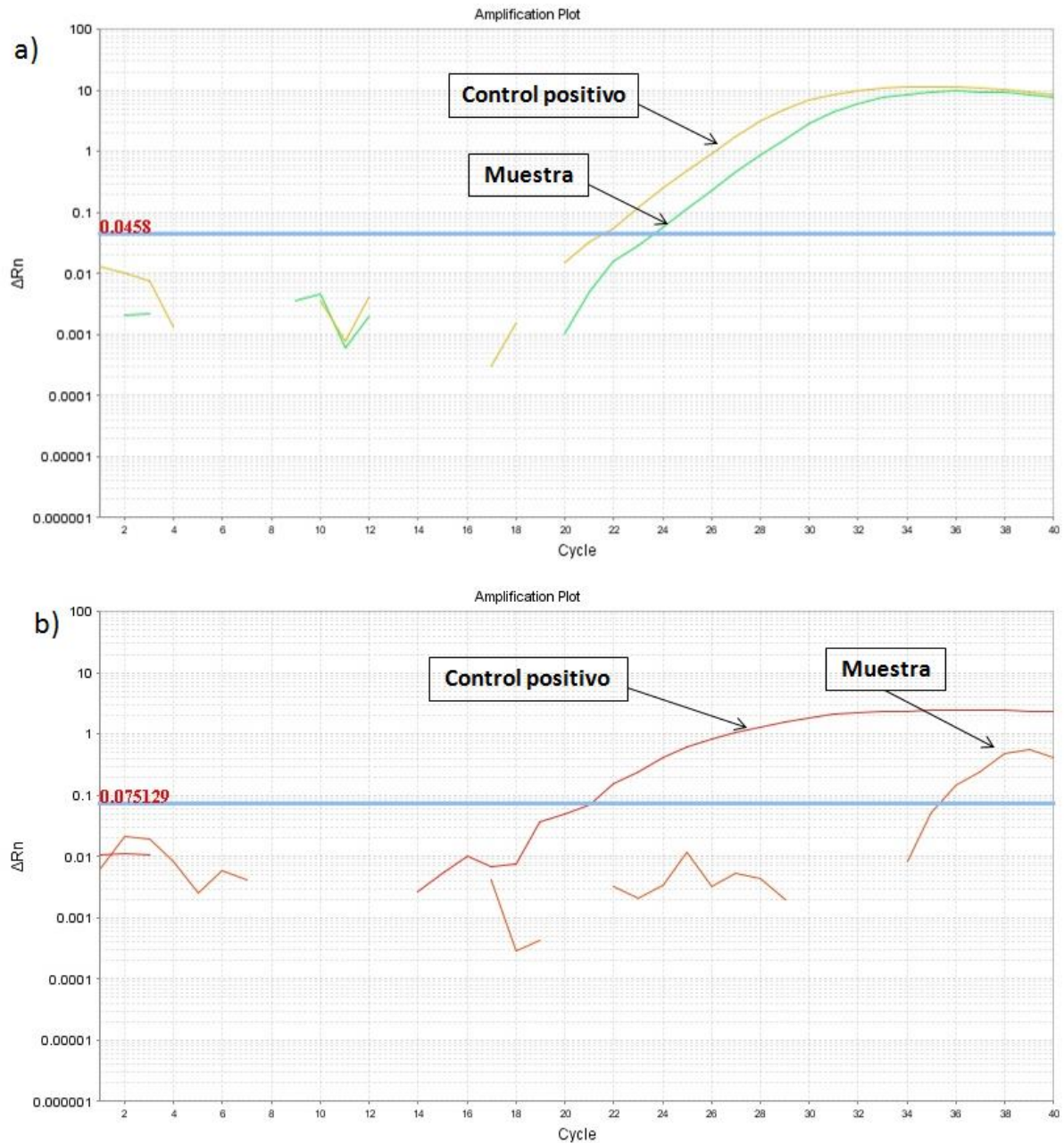


Fig 16. a) Muestra identificada como adecuada para ensayo de mutaciones con un Ct de 24.07. b) muestra identificada como indeterminada para ensayo de mutaciones con un Ct de 35.94

Con las muestras restantes se procedió a realizar el ensayo de mutaciones. Los resultados obtenidos se muestran que 3 de ellas presentaban alguna mutación en PI3KCA (dos en E542K y una en H1047K) (Fig. 17, Tabla 12). Estas muestras representaron el 15% del total de muestras analizado, y en relación a los 99 casos documentados, representan el 3.03% de casos mutados.

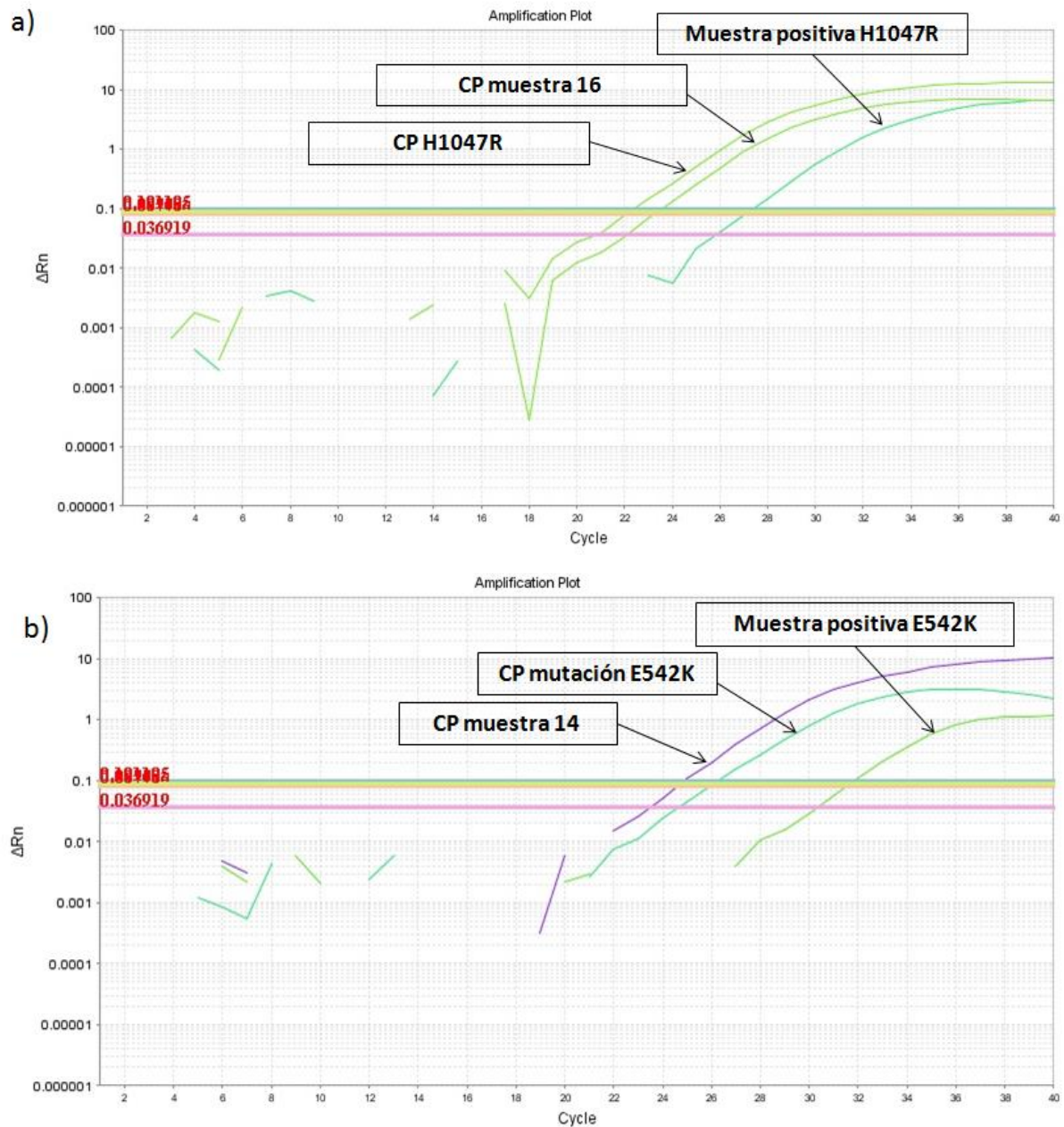


Fig 17. Gráficas con los dos tipos de mutaciones identificados, los controles positivos están indicados como CP  
a) Muestra 16 con amplificación positiva para la mutación H1047R b) Muestra 14 con amplificación positiva para la mutación E542K.

Se realizó la cuantificación de las muestras tomando lecturas A260/A280. Para analizar concentración y pureza de cada una se utilizó un equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) tomando 1ul de cada muestra. En promedio se obtuvieron 84.3 ng/μl, con rangos de 7.6-408.6 ng/μl. Los datos se muestran en la tabla 12.

Muestra	ng/μl	Relación A260/A280	Número de bandas en PCR de integridad	PI3KCA	Ct de mutación
1	239.76	2.16	3	wt	
2	408.62	2.1	2	wt	
3	130.16	2.09	3	wt	
4	105.60	1.32	3	Indeterminado	
5	42.12	1.67	3	Indeterminado	
6	11.18	4.13	2	wt	
7	7.61	1.17	1	Indeterminado	
8	16.14	1.72	3	wt	
9	106.94	2.24	2	wt	
10	172.19	1.52	3	Indeterminado	
11	10.89	0.9	1	Indeterminado	
12	33.94	3.28	4	wt	
13	64.55	2.31	2	wt	
14	21.30	1.88	2	E542K	30.42
15	12.16	5.56	3	wt	
16	87.08	2.22	2	H1047R	27.3
17	38.04	3.39	3	wt	

18	96.48	2.21	2	wt	
19	24.4	2.22	2	E542K	30.47
20	57.11	2.35	4	wt	

Tabla 12. Cuantificación de DNA en ng/ul, relación A260/280, número de bandas en PCR de evaluación de la integridad y *PI3KCA* yCt de la mutación.

Relación 260/280	N=
<1.7	25%
>1.7	70%
=1.7	5%

Tabla 13. Porcentaje de muestras con relación menor, mayor o igual a 1.7

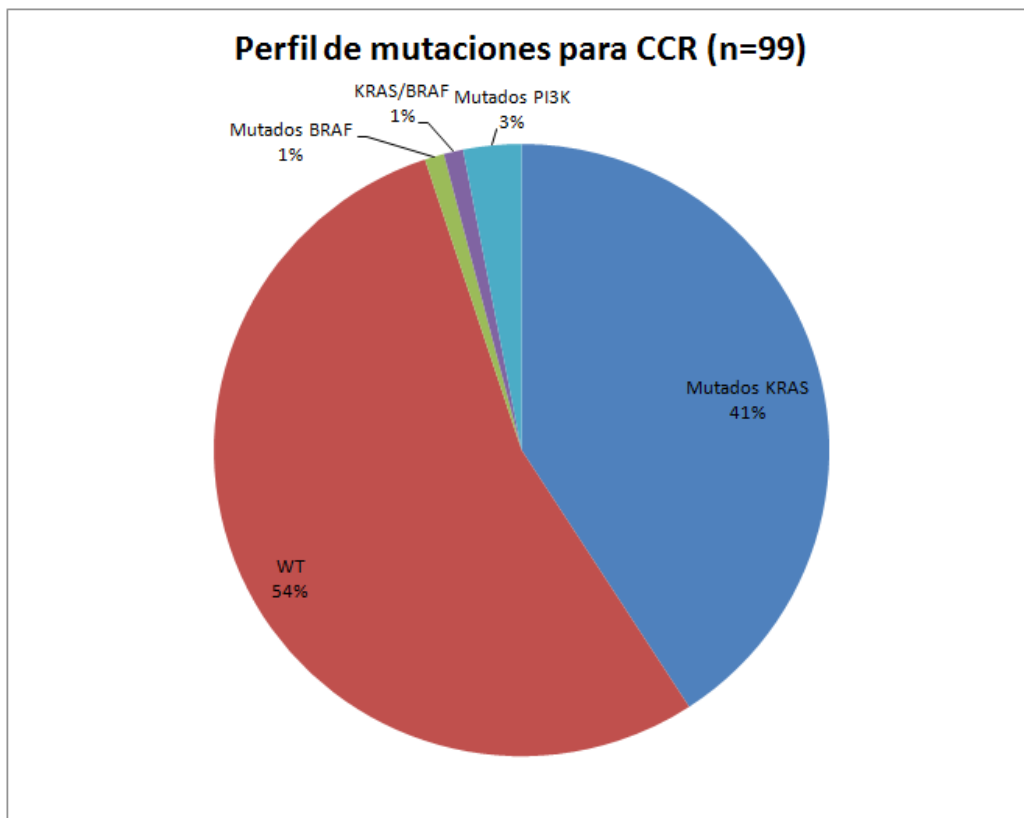


Fig 18. Distribución total de mutaciones en nuestra población n=99

## DISCUSIÓN:

El desarrollo tumoral de CCR se da por medio de mutaciones heredadas o adquiridas. En los últimos años se ha logrado identificar diferentes vías de señalización que podrían tener un papel importante en el desarrollo del CCR, ya que dan como resultado la proliferación celular descontrolada y, por lo tanto, se puede clasificar en diferentes genotipos.

Uno de los genes con mayor prevalencia de mutaciones en CCR es KRAS, y la mutación que se presenta con mayor frecuencia es c.35 G>A (p.G12D), por lo cual este gen es considerado un biomarcador importante que ha comprobado tener un valor predictivo en el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR.

En nuestro estudio realizamos una búsqueda retrospectiva de aquellos pacientes con diagnóstico de CCR y determinación de KRAS, reuniendo un total de 99 casos entre los años 2013-2016. Se mostró una prevalencia de 41% de pacientes que presentan alguna mutación, lo que correlaciona con la literatura donde se reportan frecuencias de 30-45% en pacientes con CCR. Dentro de estas, observamos que la de mayor incidencia es c.35G>A (p.G12D) [35%], seguida de la mutación c.35G>T (p.G12V), ambas en el codón 12. Y finalmente, la mutación c.38G>A (p.G13D) en el codón 13. (Sepulveda, A; cols.2016; Phipps, cols 2013; Maus MKH, cols. 2013; Yuan, cols. 2015).

Se han realizado pocos estudios sobre la frecuencia de mutaciones de KRAS en la población mexicana, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

<b>Estudio:</b>	<b>n=</b>	<b>% de KRAS mutado:</b>	<b>Distribución de mutaciones:</b>
Martínez-Garza; cols 1999	59	27%	c.35 G>A (p.G12D)= 43.7% c.38 G>A (p. G13D)= 31.2% c.35 G>T (p.G12V)= 25% c.34 G>C (p.G12R)= 12.5%
Cabrera-Mendoza; cols (2014)	31	38.7%	No especifica

Pérez-Báez W; cols (2017)	104	40.35%	c.35 G>A (p.G12D)= 40.5% c.35 G>T (p.G12V)= 26.1% c.38 G>A (p. G13D)= 19% c.34 G>C (p.G12R)= 4.8% c.34 G>A (p.G12C)= 4.8% c.34 G>A (p.G12S)= 4.8%
Cárdenas-Ramos; cols (2017)	888	35%	c.35 G>A (p.G12D)= 32.5% c.38 G>A (p. G13D)= 22.5% c.35 G>T (p.G12V)= 18.3% c.34 G>T (p.G12C)= 8.7% c.35 G>C (p.G12A)= 6.1% c.34 G>A (p.G12S)= 3.5%
García-Alanís; cols (2017)	99	41%	c.35 G>A (p.G12D)= 35% c.35 G>T (p.G12V)= 20% c.38 G>A (p. G13D)= 17.5% c.34 G>T (p.G12C)= 10% c.34 G>A (p.G12S)= 7.5% c.35 G>C (p.G12A)= 5% c.34 G>A (p.G12R)= 5%

La mutación más frecuente en población mexicana es la c.35 G>A (p.G12D) del codón 12 (entre un 32-43%), la cual es comparable con la población mundial. Las siguientes dos mutaciones se encuentran invertidas en frecuencia ya que dos estudios reportan que c.38 G>A (p. G13D) se encuentra en un 22-31% y c.35 G>T (p.G12V) en 18-25% de los casos. Mientras que nuestro estudio y el de Pérez-Báez W; cols (2017) mencionan que la segunda mutación más frecuente es c.35 G>T (p.G12V) de 20-26%, seguida de c.38 G>A (p. G13D) con 17-19%.

Las diferencias en frecuencias pueden deberse a: 1) a la diferencia en el número de pacientes incluidos en cada estudio; 2) las diferentes metodologías utilizadas, ya que el estudio de Martínez-Garza; cols (1999), la determinación de mutaciones fue con PCR y el DNA amplificado tratado con enzimas de restricción, Cárdenas-Ramos; cols (2017) utilizó secuenciación y Pérez-Báez W; cols (2017), junto con el presente estudio, utilizamos PCR en tiempo real por medio de un kit comercial.

Es importante señalar que la bibliografía hace mención que la región geográfica, así como el tamaño de muestra, edad, sexo y tipo histológico, influye en la distribución de frecuencias de cada mutación [Vaughn cols. (2011) y Licar cols. (2011)].

En nuestro grupo de estudio encontramos que 2 casos presentaron la mutación c.1799T>A (V600E) en BRAF. Algunos estudios estructurales acerca de las proteínas RAF han revelado que la posición del aminoácido valina es esencial para mantener inactiva la proteína, por lo tanto el cambio de este aminoácido resulta en una activación constitutiva de la proteína-quinasa BRAF (Morkel, cols 2015). Esta mutación ha sido reportado hasta en un 10% de la población con diagnóstico de CCR asociado a dos tipos histológicos: a) pólipos adenomatosos (Adenomas serrados tradicionales y sésiles), y b) inestabilidad microsatelital (MSI) (Barras, 2015). Las mutaciones en BRAF y KRAS pueden ocurrir en eventos tempranos de la carcinogénesis y raramente se presentan juntas, sin embargo en nuestra población encontramos un solo caso con mutación en BRAF [ c.1799T>A (V600E)] y mutación en KRAS [posición c.35G>T (p.G12V)]. Varios estudios previos reportan que estas dos mutaciones son mutuamente excluyentes ya que tienen funciones similares. Phipps y cols.(2013) reportan que la co-ocurrencia de estas dos mutaciones no representan un cambio en la sobrevida del paciente ya que ambas muestran resistencia a la terapia anti-EGFR.

Se han publicado diversas guías para la realización de pruebas moleculares que otorgan información sobre la respuesta de diferentes terapias dirigidas en pacientes con CCRm, y estas han evolucionado de acuerdo a los estudios de mutaciones en KRAS y NRAS que confieren resistencia a la terapia con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Pero debido a la alta incidencia de pacientes no mutados que no responden favorablemente a la terapia, es indispensable considerar el estado de otros genes que pudieran beneficiar el desarrollo tumoral. De tal forma, en este estudio se evalúan mutaciones en el gen PI3KCA.

Nuestro estudio demuestra la presencia de mutaciones de PI3KCA en el exón 9 y 20 en 3 (15%) pacientes de los 20 casos estudiados [E542K (n=2) y la mutación H1047R (n=1)] ), lo cual se ha demostrado de manera *in vitro*, aumenta la actividad cinasa de la proteína PI3K (Kang, cols. 2005). Diversos estudios reportan que la frecuencia de esta mutación en pacientes con CCR es de 10-27%, sin embargo no hay estudios claros o concluyentes en cuanto al valor predictivo de este biomarcador (Velho, cols. 2005).

Se ha sugerido que hay una asociación de las mutaciones de PI3K, específicamente del exón 9 con KRAS. Zhao, cols. (2008) reportó que existe una dependencia del exón 9 con mutaciones en el gen KRAS, actuando de manera sinérgica con RAS-GTP a diferencia



de las mutaciones en el exón 20, que son independientes de KRAS donde existe una simulación de la unión RAS-GTP.

Si bien es reportado que mutaciones KRAS y PI3K pueden coexistir, es más alto el porcentaje de casos reportados KRAS no mutado y con mutación en otro punto de la vía, dando como resultado el desarrollo tumoral, por lo tanto en este estudio se eligieron aquellos pacientes no mutados. Debido al pequeño número de muestras en nuestro estudio, no es posible evaluar la prevalencia de PI3K o la relación KRAS-no mutado/PI3K, sin embargo nos permite observar la presencia de mutaciones de PI3KCA en una población con CCR del Centro Médico ABC, además de describir el perfil de otros marcadores con KRAS, BRAF y NRAS.

Otro punto a resaltar de este trabajo es la importancia de mantener o preservar las muestras en condiciones adecuadas tomando en cuenta las diferentes variables, como son la fijación con formol amortiguado, el tiempo de fijación, procesamiento e inclusión de la muestra, ya que el material obtenido de este proceso es el más utilizado para preservar la morfología y componentes celulares, con el fin de usarlo en ensayos moleculares. El análisis de expresión de biomarcadores ha sido empleado para diseñar terapias dirigidas, o bien para obtener información de valor pronóstico. Por lo tanto, proponemos que la identificación de mutaciones en CCR de KRAS, BRAF, NRAS, junto con PI3K mediante PCR en tiempo real, es necesaria para poder tener un perfil molecular completo y así mismo brindar un beneficio al paciente.

La calidad, cantidad y amplificación exitosa del DNA utilizando PCR (es decir un resultado exacto y reproducible), dependen de una gran cantidad de variables (Gilbert, cols. 2007):

- tipo de tejido
- tamaño de la pieza
- factores relacionados con la fijación: pH, tipo de fijador, tiempo y temperatura de fijación;
- variables post-fijación: preservación del bloque de parafina, condiciones de almacenamiento

La fijación en formol causa enlaces cruzados del DNA. Cuando se utiliza formol que no está amortiguado provoca la fragmentación de los ácidos nucleicos. Se ha reportado que una fijación mayor a 72 hrs afecta la viabilidad de la muestra.

Aunque en promedio se obtuvieron 84.3 ng/μl de DNA, una cuantificación alta no garantiza una determinación apropiada de mutaciones, ya que los casos en los que no se presentó un ensayo control adecuado tenían cuantificaciones con rangos de 7.61-130.1 ng/μl., mientras que los demás tejidos con una evaluación aceptable presentaban cuantificaciones entre 11.18-408.g ng/μl.

Con respecto al PCR constitutivo y el número de bandas observadas en el gel de agarosa, no se mostraron diferencias significativas, ya que la mayoría de los tejidos indeterminados tenían hasta 3 bandas, mientras que los casos con evaluación aceptable, e incluso con mutaciones, tenían 1 o 2 bandas. Sin embargo la relación A260/A280 señala que las muestras que son menores a 1.7 son las que revelaron un ensayo de evaluación deficiente, por lo tanto no se logró determinar mutaciones, en cambio en todas las demás muestras con lecturas iguales o mayores de 1.7 obtuvieron una buena evaluación. Se ha indicado que lecturas que se encuentran en rangos de 1.7-1.8 son consideradas como DNA puro. Cuantificaciones menores a 1.7 podrían señalar contaminación con proteínas o residuos de reactivos usados en la extracción, y las cuantificaciones mayores a 1.7 indican presencia de RNA. Las muestras que obtuvieron una buena evaluación tenían lecturas de 1.72-5.56, lo cual muestra que la presencia de RNA no afecta la reacción de PCR, pero las muestras con lecturas menores a 1.7 afectan la reacción de PCR, haciendo imposible la evaluación de mutaciones de PI3KCA.

### **CONCLUSIONES:**

En nuestro estudio, observamos la presencia de mutaciones en PI3KCA en 20 casos con diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal y que estas se pueden presentar en pacientes wt para otros biomarcadores principalmente para KRAS así como para BRAF y NRAS.

La realización de la determinación de mutaciones en PI3KCA es importante ya que es uno de los efectores de KRAS y por lo tanto tiene efectos sobre el crecimiento, la supervivencia y la inhibición de la apoptosis. Siendo que tiene diferentes puntos de activación, inhibición e interacción con otras señalizaciones se ha hecho difícil poder definir si tiene un valor predictivo sobre la progresión de la enfermedad, y por lo tanto se requiere realizar otros estudios para poder definir cómo podría afectar a la respuesta a terapias dirigidas.

Por otro lado se muestra que el perfil de mutación para KRAS en adenocarcinoma colorrectal coincide con lo que se ha encontrado en diferentes poblaciones alrededor del

mundo pero debido a que hay una selección sesgada en la realización de los demás biomarcadores (NRAS y BRAF) no se puede determinar por completo la prevalencia de estas mutaciones.

También observamos que para poder obtener un diagnóstico certero es importante la relación A260/280 ya que esto permite una evaluación correcta de mutaciones. El control de estas variables hace posible que los resultados obtenidos sean reproducibles y seguros.

### **BIBLIOGRAFÍA:**

Alberts, Bruce; cols (2002) *Biología Molecular de la célula*. 4 Edición. New York: Garland Science

Appert-Collin Aline; cols (2015) Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front. Pharmacol* from <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00283>

Barras David, (2015) BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomarkers in Cancer* :7(S1)

Bo-Young, Lee RA, Chung SS, Kim KH. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Colorectal Cancer Patients. *J Korean Soc Coloproctol*. 2011 Jun;27(3):127-132.

Buckingham Lela. *Molecular diagnostics: fundamentals, methods, and clinical applications*. 2° edición, F.A Davis.

Campos-Parra Alma Delia; cols (2012) Genotipificación en cáncer de pulmón de células no pequeñas. *GAMO Vol. 11 Núm. 1*, enero – febrero.

Cardenas-Ramos Susana G., Alcazar-Gonzalez Gregorio, Reyes-Cortés Luisa M, Torres-Grimaldo Abdiel A, Calderón-Garcidueñas Ana L., Morales-Casas José, Flores-Sánchez Patricia, De León-Escobedo Raúl, Gómez-Díaz Antonio, Moreno-Bringas Carmen, Sánchez-Guillén Jorge, Ramos-Salazar Pedro, González-de León César, Barrera-Saldaña Hugo A. The Frequency and Type of K-RAS Mutations in Mexican Patients With Colorectal Cancer A National Study

The Cancer Genome Atlas Network. (2012) Comprehensive molecular characterization of

human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337

Cathomas, Gieri; (2014) PIK3CA in colorectal cancer. *Front. Oncol.*, 03 March Vol 4, from <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00035/full>

Costa Josep (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*;22(5):299-305.

Courtney Kevin D., . Corcoran Ryan B, . Engelman Jeffrey A. The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, no. 6 (February 2010) 1075-1083.

Cox D. Adrienne, Fesik Stephen W. , Kimmelman Alec C. , Ji Luo and Channing J. Der. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 828–851 (2014).

Cuyun Carter Gebra; cols (2015). KRAS testing of patients with metastatic colorectal cancer in a community-based oncology setting: a retrospective database analysis. Carter et al. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 34:29

Danielsen Stine Aske; cols (2014) Portrait of the PI3K/AKT-pathway in colorectal cancer, *BB A- Reviews on Cancer*, doi: 10.1016/j.bbcan.2014.09.008

De Roock Wendy; cols (2010) Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*; 11: 753–62.

Engelman Jeffrey A; (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* Aug;9(8):550-62.

Fumarola Claudia; cols (2014). Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology* 90 197–207

García-Alfonso P. Updated guidelines for biomarker testing in colorectal carcinoma: a national consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol* 17:264–273.

García Rojo, M; cols (1999). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico en dermatología. Dermatología Peruana - Vol. 9, Suplemento 1, Diciembre.

Gilbert, M. Thomas P; cols (2007) The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues—Which Methods Are Useful When? PLoS ONE 2(6): e537.

Guinney Justin; cols (2015) The consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer Nat Med. Nov;21(11):1350-6.

Hernández-Losa Javier; cols (2011) Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. Rev Esp Patol;45(2):76-85.

Henry N. Lynn; cols (2012) Cancer biomarkers. Molecular Oncology; 6: 140-146.

Herbst Roy S. (2004), Review of Epidermal Growth Factor Receptor biology. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 59, No. 2, Supplement, pp. 21–26

Hejmadi Momna. (2010). Introduction to Cancer Biology. Bookboon Publishing. 12-13. from <http://csbl.bmb.uga.edu/mirrors/JLU/DragonStar2016/download/introduction-to-cancer-biology.pdf>

Ihle Nathan T; cols (2012) Effect of KRAS Oncogene Substitutions on Protein Behavior: Implications for Signaling and Clinical Outcome. J Natl Cancer Inst. Feb 8;104(3):228-39.

Jančík Sylwia; cols (2010) Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Volume 2010, Article ID 150960, 13 pages.

Joshi, Mohini; (2010) Polymerase chain reaction: Methods, principles and application. IJBR 1 (5): 81-97.

K.K. Jain; cols (2010), The Handbook of Biomarkers. New York : Springer, from [www.springer.com/us/book/9781607616849](http://www.springer.com/us/book/9781607616849)

Kuipers E.J; cols (2015) Colorectal cancer. Nature Reviews Disease Primers 1: 1-25

Kang Sohye; cols (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci*; 102(3): 802–807.

Labianca Roberto; cols (2010) Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 74 (2010) 106–133

Licar Alenka; cols (2011) Distribution of some activating KRAS and BRAF mutations in Slovene patients with colorectal cancer. *Med Oncol* 28:1048–1053.

Lievre Astrid; cols (2006) KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Res*;66: (8). April 15, 2006.

Qiu Li-Xin; cols (2010) Predictive and prognostic value of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: A meta-analysis of 22 studies. *European Journal of Cancer* 46 (2010) 2781 – 2787.

Martínez-Ciarpaglini; cols (2012) Carcinoma colorrectal serrado. Descripción histopatológica, inmunohistoquímica y molecular de un caso. *Revista Española de Patología*. Volume 46, Issue 4 Pages 2101–2114.e5

Maus M.K.H; cols (2014) KRAS mutations in non-small-cell lung cancer and colorectal cancer: Implications for EGFR-targeted therapies. *Lung Cancer* 83, 163-167.

Natsumi Irahara, PhD, Yoshifumi Baba, MD, PhD, Katsuhiko Nosho, MD, PhD, Kaori Shima, DDS, PhD, Liying Yan, MS, Dora Dias-Santagata, PhD, A. John Iafrate, MD, PhD, Charles S. Fuchs, MD, Kevin M. Haigis, PhD, and Shuji Ogino, MD, PhD. NRAS Mutations Are Rare in Colorectal Cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2010 September ; 19(3): 157–163.

Nash, Garrett M; cols (2010). KRAS Mutation and Microsatellite Instability: Two Genetic Markers of Early Tumor Development That Influence the Prognosis of Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. February ; 17(2): 416–424.

Polivka Jiri Jr; cols (2014) Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & Therapeutics* 142, 164–175.

Papadatos-Pastosa Dionysios; cols (2015) The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 94, 18–30.

Perez-Baez Wendy, García-Latorre Ethel , Maldonado-Martínez Hector Aquiles, Coronado-Martínez Iris, Flores-García Leonardo, Taja-Chayeb Lucía. Impact of fixation artifacts and threshold selection on high resolution melting analysis for KRAS mutation screening. *Molecular and Cellular Probes* 35 (2017) 34e43

Pillai Raju K; cols (2016) The State of the Art in Colorectal Cancer Molecular Biomarker Testing. *Adv Anat Pathol* Volume 23, Number 2.

Phipps A I; cols (2013) KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. *British Journal of Cancer* (2013) 108, 1757–1764.

Pritchard Colin C; cols (2011) Colorectal Cancer Molecular Biology Moves Into Clinical Practice. *Gut*. January;60(1):116–129.

Rabeneck Linda; cols (2004) Surgical Volume and Long-Term Survival Following Surgery for Colorectal Cancer in the Veterans Affairs Health-Care System Long-Term Survival Following Surgery for Colorectal Cancer. *The American Journal of Gastroenterology* **99**, 668-675

Rahman, MT; cols (2013) Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *AKMMC J*: 4(1): 30-36.

Samuels Yardena; cols (2004) High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science* 23 April Vol 304: 554.

Sepulveda, A; cols. (2016). Colorectal cancer. In: *Molecular Pathology in Clinical Practice*, Debra G.B. Leonard ed. 2nd ed. USA.

Siegelin Markus D; cols (2014) Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Laboratory Investigation* 94, 129–137.

Teran A; cols (2012) Cáncer de colon y recto. *Medicine*. 2012;11(7):420-30

Terzić; cols (2010) Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*. Volume 138, Issue 6, Pages 2101–2114.e5

Torres Sanchez L; cols (2014) Tendencias en la mortalidad por cáncer en México de 1980 a 2011. *Salud Publica Mex* ;56:473-491.

Velho, Sérgia; cols (2005) The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *European Journal of Cancer* 41: 1649–1654.

Vanhaesebroeck Bart , Guillermet- Guibert Julie, Graupera Mariona and Bilanges Benoit. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 329–341 (2010).

Vaughn Cecily P, cols (2011) Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS Mutations in Colorectal Cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer* 50:307–312.

Wang Yuanxiang; cols (2013) Targeting Mutant KRAS for Anticancer Therapeutics: A Review of Novel Small Molecule Modulators. *J Med Chem*. 2013 July 11; 56(13): 5219–5230.

Yuan-Tzu Lan, cols (2015) Mutations in the RAS and PI3K Pathways are Associated With Metastatic Location in Colorectal Cancers. *Journal of Surgical Oncology*;111:905–910.

Zhao,Li; cols (2008) Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*. September 18; 27(41): 5486–5496.

Zhao Li; Vogt Peter K.(2008) Helical domain and kinase domain mutations in p110 of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*;105(7):2652-7.