

ESTUDIO DEL GEN KRAS EN CÁNCER DE PULMÓN

Profa. Marta Cuadros Celorrio
Profa. Verónica Arenas Rodríguez

Introducción:El cáncer en cifras

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo (1), siendo la principal causa de muerte prematura en la mayoría de países con un alto HDI (índice de desarrollo humano) (2). Las estimaciones indican que, a nivel mundial, la mortalidad aumentará de 9,9 millones en 2020 a 16,3 millones en 2040 y en España de 113.054 en 2020 a 160.271 en 2040 (1). No obstante, la mortalidad debida al cáncer está disminuyendo en países con alto HDI, debido a medidas de prevención, detección precoz y tratamiento (3).

A nivel mundial, el cáncer de pulmón es uno de los más frecuentes. En 2018 fue el tipo de cáncer más diagnosticado y en 2020 el segundo tras el cáncer de mama. A pesar de esto, debido a su alta mortalidad, su prevalencia es relativamente baja (1,4,5). El cáncer de pulmón es el que más muertes produce, tanto a nivel mundial como en España. Se estima que en hombres será el responsable de una cuarta parte de los fallecimientos debidos a cáncer en nuestro país. En mujeres ocupa el tercer lugar tras el cáncer colorrectal y de mama (1,6).

Oncogen *KRAS*

El gen *KRAS* está mutado en casi el 30% del subtipo más frecuente de cáncer de pulmón, el cáncer de pulmón de célula no pequeña (7). La mayoría de estas mutaciones (97%) afectan a los exones 2 y 3. Este no es un evento casual, ya que estas mutaciones (mutaciones de ganancia de función) son capaces de transformar *KRAS* en una proteína activa permanente, unida a GTP, que promueve continuamente la señalización, lo que lleva a un aumento de la proliferación celular. Por esta razón, las mutaciones del exón 2 de *KRAS* se denominan mutaciones conductoras (*driver mutations*).

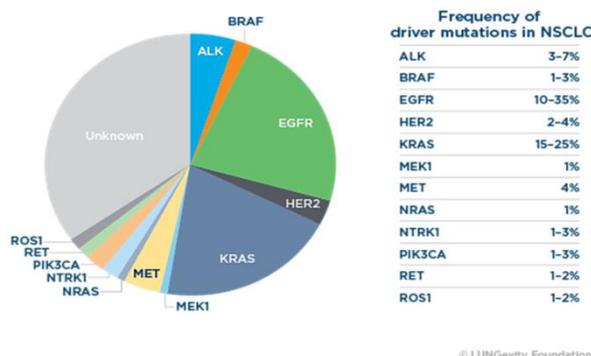


Figura 1. Mutaciones conductoras en cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC)

Las mutaciones puntuales más frecuentes en *KRAS* son: **G12C** (42%), G12V (21%), **G12D** (17%) y G12A (7%), mutaciones con cambio de sentido (missense) que generan un cambio de aminoácido. Además, la sustitución G12C (GGT> TGT; purina por una transversión de pirimidina) prevalece en pacientes fumadores, mientras que G12D (GGT> GAT, purina por transición de purina) está presente con mayor frecuencia en pacientes que nunca han fumado (8).

Tratamiento del cáncer de pulmón

Las terapias dirigidas basadas en EGFR (del inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*) han mostrado excelentes resultados clínicos cuando se combinan con la quimioterapia. Los tumores derivados de mutaciones en *KRAS* no responden a los inhibidores del EGFR. Es por ello, que en la práctica clínica se estudia el estado de *KRAS* antes de administrar inhibidores de EGFR. De hecho, la activación de *KRAS* se ha evidenciado como una de las vías de señalización implicadas en la resistencia a los inhibidores de EGFR (9).

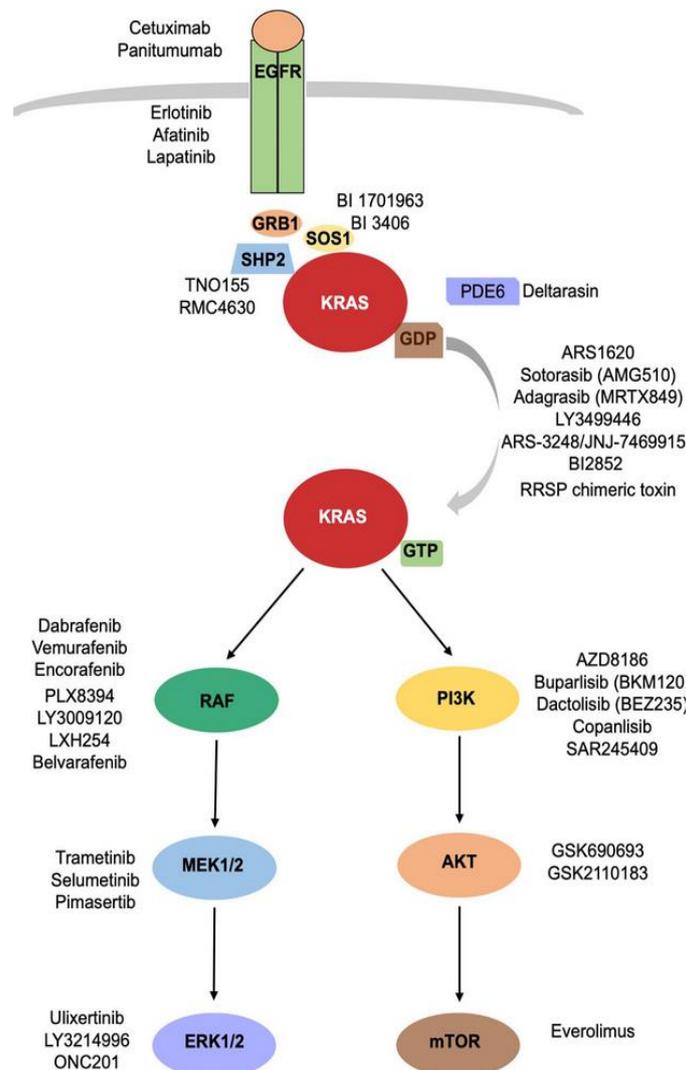


Figura 2. Inhibidores de KRAS y sus mediadores (10)

Objetivo:

Global. Comprender la importancia del estudio genético en la práctica clínica, su valor diagnóstico, pronóstico y farmacológico.

Específico. Extraer ADN para posteriormente amplificar *KRAS* y analizar el exon 2 en muestras humanas.

Etapas:

1. Extracción del material genético (Práctica 1. Extracción ácidos nucleicos. Aplicaciones clínicas. Profa. Marta Cuadros Celorrio).
2. Diseño de oligonucleótidos para el estudio de mutaciones en el exon 2 de *KRAS* en muestras de cáncer de pulmón. Búsqueda de un control positivo (Seminario 1. Aplicación de herramientas bioinformáticas para el estudio de los genes y las enfermedades. Profa. María Soledad Benítez Cantos).
3. Amplificación de *KRAS*, valoración de los resultados. Implicación clínica (Práctica 2. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR. Prof. Francisco Hernández Torres).

Bibliografía:

1. International Agency for Research on Cancer (IARC) WHO (WHO). GLOBAL CANCER OBSERVATORY [Internet]. Available from: <https://gco.iarc.fr>
2. WHO. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization, 2018. [Internet]. World Health Organization. Geneva; 2018. Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/
3. IARC. World cancer report 2020 [Internet]. World Health Organization. 2020. 630 p. Available from: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
4. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2020 [Internet]. Sociedad Española de Oncología Médica. 2020. Available from: www.seom.org
5. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2021 [Internet]. 2021. Available from: www.seom.org
6. International Agency for Research on Cancer (IARC) WHO (WHO). Cancer Incidence in Five Continents [Internet]. Available from: <https://ci5.iarc.fr/Default.aspx>
7. Roberts, P. J., Stinchcombe, T. E., Der, C. J., & Socinski, M. A. (2010). Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy?. *Journal of clinical oncology*, 28(31), 4769-4777.
8. Karachaliou, N., Mayo, C., Costa, C., Magrí, I., Gimenez-Capitan, A., Molina-Vila, M. A., & Rosell, R. (2013). KRAS mutations in lung cancer. *Clinical lung cancer*, 14(3), 205-214.
9. Román, M., Baraibar, I., López, I., Nadal, E., Rolfo, C., Vicent, S., & Gil-Bazo, I. (2018). KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Molecular cancer*, 17(1), 33.
10. Merz V, Gaule M, Zecchetto C, Cavaliere A, Casalino S, Pesoni C, Contarelli S, Sabbadini F, Bertolini M, Mangiameli D, Milella M, Fedele V, Melisi D. Targeting KRAS: The Elephant in the Room of Epithelial Cancers. *Front Oncol*. 2021 Mar 11;11:638360.

PRÁCTICA 1. EXTRACCIÓN ÁCIDOS NUCLEICOS

Fundamento:

Se le llama extracción de ácidos nucleicos al método por el cual se obtiene el ADN/ARN a partir de material biológico (ej.: cepillado bucal, saliva, sangre o cualquier tejido) utilizando técnicas físicas y químicas. La extracción consiste en la separación y purificación del ADN/ARN con el fin de poder estudiarlo, analizarlo o manipularlo. El objetivo de cualquier extracción es:

- Obtener cantidad de ADN/ARN.
- Calidad (integridad) de ADN/ARN.
- Evitar presencia de contaminantes.

En la investigación biomédica, el ADN/ARN se utiliza para analizar genes con implicación en el diagnóstico, pronóstico y selección de tratamientos en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, cáncer, infecciones, etc.

Etapas:

La extracción de ADN/ARN requiere de una serie de etapas básicas:

1. En primer lugar, rotura de la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula.
2. A continuación, rotura de la membrana nuclear para dejar libre el ADN/ARN. La sal evita la unión de las proteínas al ADN/ARN.
3. Para aislar el ADN/ARN hay que hacer que precipite en alcohol. El ADN/ARN es soluble en agua, pero cuando se encuentra en alcohol se desenrolla y precipita en la interfase entre el alcohol y el agua. Además de permitirnos ver el ADN/ARN, el alcohol separa el ADN/ARN de otros componentes celulares, que quedan en la solución acuosa.
4. Cuantificación y medida de la calidad del material genético.
5. Almacenamiento/conservación.

Material:

- Material biológico.
- Guantes de nitrilo/látex: ayudan a evitar la degradación de la muestra y protegernos de la contaminación en caso de muestras biológicas infecciosas.
- Centrífuga: equipo que ayuda a acelerar el proceso de separación de componentes de diferentes densidades por medio de una fuerza giratoria.
- Espectrofotómetro: equipo que sirve para medir la concentración de sustancias como los ácidos nucleicos.
- Termobloque: equipo que sirve para calentar las muestras.

- Material de laboratorio: pipetas, puntas (para coger el volumen de reactivos requerido), y tubos eppendorf de 1,5 mL y 2 mL.
- Reactivos como la proteinasa K, dodecilsulfato sódico (SDS), NaCl, etanol, isopropanol, agua MilliQ, agarosa y tampón TAE.

Pasos generales de la extracción de ácidos nucleicos:

1. Obtención de la muestra.
2. Homogeneización (si fuese necesario).
3. Lavado de la muestra.
4. Lisis celular: proceso físico o químico por el cual se rompen las membranas para liberar sus componentes celulares. Asimismo, se rompen las proteínas que “cubren” al ADN usando proteasas.
5. Procesos de separación: procesos físicos o químicos mediante los cuales se separan diferentes componentes celulares como lípidos, proteínas, ARN, ADN y moléculas pequeñas. Para esto se usa una centrifuga.
6. Cuantificación del ADN/ARN: técnica mediante la cual se mide la concentración del material genético usando un espectrofotómetro.
7. Calidad del ADN/ARN.
8. Almacenamiento/conservación.

Al trabajar en un laboratorio se requiere orden, limpieza y cuidado de la zona de trabajo.

Extracción de ADN:

Protocolo de obtención de muestra biológica con hisopo bucal

Se ruega a los alumnos que para realizar la práctica sigan las siguientes recomendaciones: tras el cepillado bucal no consumir agua, chicle, fumar y no pintarse los labios.

1. Abra el sobre y asegúrese de que el extremo del hisopo no toque ninguna otra superficie que no sea el interior de su boca para evitar contaminar las muestras de ADN.
2. Tome el hisopo y páselo con fuerza por el lado interno de la mejilla y por debajo de la lengua durante 30 segundos.
3. Introduzca el hisopo en el tubo eppendorf de 1,5 mL que contiene 1 mL de tampón de extracción.

Distintos métodos de extracción de ADN

- DNAzol® Reagent de Thermo Fisher Scientific™

Para la extracción de ADN se puede usar el reactivo DNAzol® Reagent de Thermo Fisher Scientific™, seguido de una precipitación del ADN con etanol. Se sigue el protocolo <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/10503.pdf>.

- E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit de Omega Bio-Tek
También puede usarse el kit E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit de Omega Bio-Tek para la extracción y purificación de ADN. Este kit se basa en el empleo de columnas de afinidad por ADN, sin recurrir a las extracciones fenol-cloroformo o a la precipitación con isopropanol o etanol. El protocolo recomendado por el fabricante está disponible en <http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/04/D3396-Tissue-DNA-Kit-Combo-May2013-Online.pdf>.
- Método de alta salinidad. Primero, se añade a cada una de las muestras 250 µL de 50 mM NaOH y se incuba a 98 °C durante 30 minutos en un termobloque. Se neutraliza con 25 µL de un tampón Tris-HCl 1M pH 8. A continuación, se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C, posteriormente se recoge el sobrenadante que contiene el ADN genómico.

Protocolo de extracción de ADN a partir de hisopo bucal

1. Incubar en agitación (600 r.p.m.) las muestras, en tubos de 1,5 mL con 1 mL de tampón de extracción durante 45 minutos a 65 °C.
2. Pasar con micropipeta el contenido de los tubos de 1,5 mL a los de 2 mL que contienen 1 mL de isopropanol. Teniendo en cuenta la absorción del hisopo, podremos recoger unos 800 µL.
3. Tapar los tubos e invertirlos unas 30 veces suavemente.
4. Centrifugar 20 minutos a 14.000 r.p.m. (enfrentados y equilibrados).
5. Finalizada la centrifugación, descartar el sobrenadante (isopropanol) en un vaso de residuos. Dejar el tubo boca-abajo sobre un papel unos segundos, colocar los tubos en la gradilla y dejar secar a temperatura ambiente durante 5 minutos aproximadamente.
6. Añadir 500 µL de etanol al 70% a cada tubo. Resuspender el pellet.
7. Centrifugar 10 minutos a 14.000 r.p.m.
8. Finalizada la centrifugación, descartar el sobrenadante en un vaso de residuos. Dejar el tubo boca-abajo sobre un papel unos segundos, colocar los tubos en la gradilla y dejar secar a temperatura ambiente durante 5 minutos aproximadamente.
9. Añadir a cada muestra en 20 µL (según la concentración que necesitemos y tamaño del pellet) de agua MilliQ.
10. Resuspender el pellet.

Reactivos protocolo de extracción de ADN a partir de hisopo bucal:

Tampón de extracción ADN (1 L):

- 5,844 g ó 100 mL de NaCl 1M.
- 10 mL Tris HCl 1M pH=8.
- 20 mL EDTA 0,5M pH=8 (no es soluble hasta pH 8).
- 50 mL SDS 10%.
- Hasta 1 L con agua MilliQ.
- NO AUTOCLAVAR (SDS precipita).

Proteinasa K (P.K.):

- 1 g de P.K. en 50 mL de agua MilliQ ó 100 mg de P.K. en 5 mL de agua MilliQ.
- Alicuotar en tubos de 2 mL (base cónica) y guardar en el congelador (-20 °C).

Tampón de extracción ADN + P.K. (1 L ó 100 mL):

- 990 mL de tampón de extracción + 10 mL de P.K. (1 L).
- 99 mL de tampón de extracción + 1 mL de P.K. (100 mL).

Extracción de ARN:

Consideraciones previas para trabajar con ARN

El ARN es una biomolécula frágil susceptible a la degradación por ribonucleasas (ARNasas), por lo que deben de tomarse las máximas precauciones posibles en su manejo. El éxito de cualquier extracción de ARN es totalmente dependiente de la eliminación de toda posible contaminación de ARNasas, que degradan el ARN, durante y después de la extracción, provocando bajos rendimientos de ARN de longitud completa. Las ARNasas son enzimas muy resistentes y de gran actividad catalítica. Además, son resistentes al calor, manteniendo incluso una considerable actividad tras un ligero calentamiento, son activas dentro de un amplio rango de pH y no requieren usualmente cofactores para su actividad. El contenido de ARNasas endógenas varía con el tejido que se estudia: páncreas y bazo son tejidos con muy altos contenidos de ARNasas, mientras que riñón, hígado e intestino tienen niveles menores, aunque no despreciables. Por tanto, hay que trabajar con soluciones, superficies y material de laboratorio libre de ARNasas.

Al trabajar con ARN se requiere: rapidez, frío (temperaturas inferiores a 0 °C), asepsia (guantes, EtOH 70%, agentes descontaminantes, puntas con filtro, soluciones tratadas con DEPC (pirocarbonato de dietilo) al 0,1% y material autoclavado).

Métodos de extracción de ARN

- Método del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo.
- TRI reagent®/TRizol®. En esta práctica se usa el reactivo TRizol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. El TRizol® es un reactivo completo, compuesto por fenol, hidroxiquinoleína (inhibidor de ARNasas), tiocianato de amonio, tiocianato de guanidina y glicerol, que permite aislar ARN total, así como ADN y proteínas simultáneamente, a partir de una gran variedad de muestras biológicas (muestras de tejidos y células de origen humano, animal, vegetal, bacteriano o procedentes de levadura). Funciona bien con pequeñas cantidades de tejido (50–100 mg) y células (5×10^6), así como grandes cantidades de tejido (≥ 1 g) y células ($>10^7$).

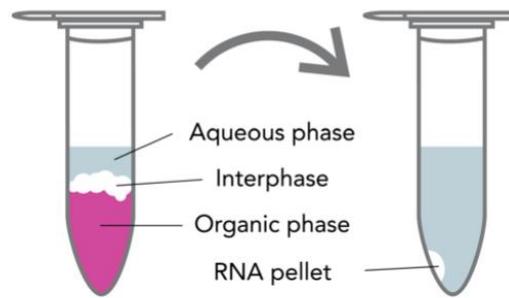


Figura 3. Representación de la fase de separación y precipitación con isopropanol generada por el reactivo TRIzol®

Control de calidad de ácidos nucleicos:

Análisis de calidad mediante gel de agarosa y Bioanalyzer Agilent 2100

La electroforesis en gel de agarosa se utiliza comúnmente para separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma. Se trata de un medio de separación especialmente eficaz para las biomoléculas cargadas como el ADN, el ARN y las proteínas.

El equipo de electroforesis se conecta a una fuente de corriente continua y las moléculas cargadas contenidas en las muestras penetran en los capilares del gel. Las moléculas de carga neta negativa, como el ADN, migran hacia el electrodo positivo del aparato de electroforesis (ánodo), mientras que las moléculas de carga neta positiva migran hacia el electrodo negativo (cátodo).

La electroforesis en gel de agarosa al 1% es el método más empleado para evaluar la integridad del ARN, que permite evaluar la proporción de las bandas ribosomales 18S y 28S. El ARN se puede catalogar como íntegro si se observan las dos bandas ribosomales, y si la proporción 28S/18S es de 2. Sin embargo, este ARN de alta calidad es difícil de conseguir, especialmente en muestras clínicas y está sujeto a la interpretación del investigador. Además, con este método se consume gran cantidad de muestra (0,5–2 µg), lo que supone un inconveniente cuando se dispone de muy poco material.

Bioanalyzer Agilent 2100 está basado en una electroforesis microfluídica capilar automatizada en el que las muestras de ADN o ARN son separadas dependiendo de su peso molecular y detectadas vía láser. Este sistema minimiza la cantidad necesaria de ADN/ARN que se usa para este control además de emplear menos tiempo.

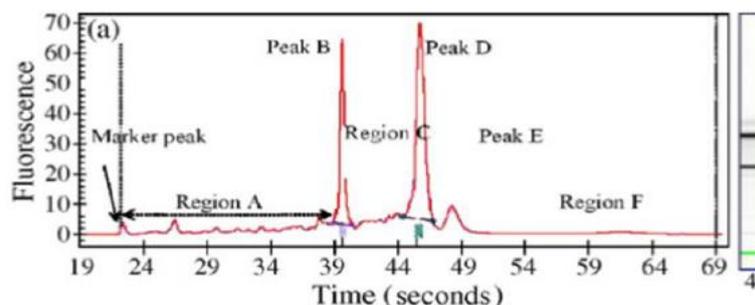


Figura 4. Electroferograma de una muestra obtenida por el Bioanalyzer

En la figura 4 se pueden observar diferentes regiones de un electroferograma de ARN. La región A representa ARN de bajo peso molecular; el pico B es el ARN ribosomal 18S, cuyo peso varía según el nivel de degradación del ARN, la región C representa la región entre el pico de 18S y el de 28S (pico D), cuya longitud incrementa en el caso de que el ARN esté degradado. El pico E representa el precursor nuclear del ARN y, por último, la región F se corresponde con el ARN de alto peso molecular. Asimismo, el electroferograma permite calcular un valor RIN que constituye una nueva herramienta para determinar la integridad del ARN. Su valor está entre 1 y 10: el valor 1 es para muestras completamente degradadas y 10 para ARN intacto. El electroferograma, por tanto, es capaz de otorgar mucha más información del estado de degradación de la molécula de ARN que simplemente el ratio 28S/18S que se consigue visualizando un gel de agarosa.

Protocolo de electroforesis en gel de agarosa para ADN

1. Pesar 1 g de agarosa e introducirlo en un matraz que contiene 100 mL de tampón TAE 1X.
2. Introducir el matraz en el microondas.
3. Se vigila, y se mueve el matraz con cuidado y se introduce tantas veces como fuera necesario en el microondas hasta que se disuelva la agarosa.
4. A continuación, añadir 10 μ L de SYBR safe 1M DNA gel stain.
5. Verter el contenido sobre la bandeja previamente sellada y colocar el peine de 8 pocillos.
6. Esperar hasta que solidifique.
7. Introducir el gel solidificado en la cubeta de electroforesis y cubrir con tampón TAE 1X.
8. Añadir 5 μ L de ADN en un tubo de 1,5 mL que contiene 2 μ L de tampón de carga. Resuspender.
9. Cargar el contenido de cada tubo de 1,5 mL en el gel solidificado.
10. Además, cargar en otro pocillo 5 μ L de marcador de peso molecular.
11. Conectar la fuente a 150 voltios durante 30 minutos.
12. Finalizado el tiempo, revelar el gel en un transiluminador.

Cuantificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta (UV) debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas en su composición. La absorción (A) UV a una determinada longitud de onda es una característica propia de una molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Una absorbancia de 1,0 a A260 nm se corresponde con una concentración de 50 ng/ μ L de ADN de doble hebra, 33 ng/ μ L de ADN de una hebra, 40 ng/ μ L de ARN y 20-30 ng/ μ L de oligonucleótidos.

El ADN/ARN extraído se cuantifica utilizando el espectrofotómetro, en nuestro caso UV-visible NanoDrop 2000 de Thermo Fisher Scientific™, gracias a la absorción característica del ADN/ARN a 260 nm. El grado de pureza puede conocerse a partir de la relación A260/A280 y

A260/A230. El rango óptimo está entre 1,8 y 2. Valores de A260/A280 inferiores a 1,8 indican contaminación por proteínas, fenol u otros contaminantes dada su capacidad de absorción a 280 nm. En cambio, los valores de A260/A280 superiores a 2 advierten de la contaminación con ADN o ARN, ya que contribuye con el ADN absorbiendo a 260 nm. Si la relación de absorbancia 260/230 es menor de 1,8, indica la existencia de contaminación causada probablemente por componentes orgánicos o agentes caotrópicos, que absorben a 230 nm.

Protocolo de cuantificación de ADN por Nanodrop

1. Encender el Nanodrop (espectrofotómetro).
2. Seleccionar el tipo de muestra que se va a medir (ADN o ARN).
3. Limpiar con un papel humedecido en agua destilada. Secar.
4. Calibrar el espectrofotómetro con el blanco que es la solución en la que se haya resuspendido la muestra.
5. Proceder a medir las muestras de ADN depositando 1 μ L de la misma en el lector. Es importante limpiar el lector entre cada medición.

Almacenamiento:

Las muestras de ADN pueden mantenerse por unos días a 4 °C después de su aislamiento. Si va a estar un periodo largo de tiempo, se recomienda congelar la muestra a -20 °C. En cambio, las muestras de ARN deben almacenarse en alícuotas a -80 °C y descongelarse en hielo.

Actividades:

Muestra	A260/A280 nm	A260/A230 nm	ng/ μ L
ADN			

A partir del ADN aislado prepare alícuotas de 100 μ L a 100 ng/ μ L.

Muestra	ng/ μ L	Vol muestra solución madre	Vol. agua MilliQ
ADN			

¿Qué he aprendido hoy?

1. Indique 5 tipos de muestras biológicas humanas donde se puede realizar un estudio genético.
2. Indique en qué tipo de muestra analizaría el estado mutacional de *KRAS*.
3. ¿Qué consideraciones tendría si el estudio genético se realizará en ARN en vez de ADN?
4. ¿Para qué emplearía líneas celulares de cáncer de pulmón en un estudio genético?
5. Indique la función en la extracción de ácidos nucleicos de: proteinasa K, alcohol, inhibidor ARNasas.
6. ¿Por qué hay que cuantificar y medir la calidad del ADN y ARN?
7. Si el ratio 260/280 es inferior a 2, ¿qué significa?
8. Si el RIN de un ARN es de 9, ¿podrá utilizarse con fiabilidad en técnicas muy sensibles?