

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR

IDENTIFICACIÓN POR MEDIO DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA  
GENERACIÓN DE LAS VARIANTES EN LOS GENES KRAS, NRAS Y BRAF  
EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL EN PANAMÁ

POR:

MARIA ISABEL LASSO DE LA VEGA GUERRA

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOLOGÍA  
MOLECULAR

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

OCTUBRE, 2025

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y  
POSTGRADO

**PROTOCOLO DEL ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

PROGRAMA DE MAESTRÍA/DOCTORADO EN:

Título de la Tesis: \_\_\_\_\_

Nombre del Estudiante: \_\_\_\_\_ Doc., de I. P. \_\_\_\_\_

Miembros del Jurado: \_\_\_\_\_ Calificación otorgada: \_\_\_\_\_

<b>FIRMA DE LOS MIEMBROS DEL JURADO</b>	<b>TRABAJO ESCRITO</b>	<b>DEFENSA</b>	<b>PROMEDIO</b>
a.			
b.			
c.			
<b>NOTA FINAL:</b>			

Recomendaciones del Jurado: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma del Coordinador del Programa \_\_\_\_\_

Firma del Representante de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado(VIP)

\_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Firma del Estudiante: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente, agradezco a Dios por permitirme culminar esta importante meta en mi vida. Este logro ha sido posible gracias a su guía y fortaleza en todo momento.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Instituto Oncológico Nacional y, en especial, al Departamento de Patología, liderado por la Dra. Ruth Vergara. Agradezco profundamente a todos los integrantes del departamento, cuyo trabajo, apoyo y colaboración fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación. Su profesionalismo y compromiso han sido una inspiración durante este proceso.

Mi gratitud también está dirigida al Dr. Edgardo Castro Pérez, por su guía, asesoramiento y apoyo constante durante el desarrollo de este proyecto. Su experiencia y dedicación fueron esenciales para alcanzar este objetivo. Asimismo, agradezco a los miembros del Jurado, la Dra. Magaly De Chial, al Dr. Carlos Ramos, y al Programa de Maestría en Biología Molecular.

Agradezco profundamente a mi familia, quienes han sido mi soporte y motivación durante este camino. En especial, a mi hija, Luna Isabel, por ser mi mayor inspiración y la razón de mi esfuerzo diario. Asimismo, agradezco a Ana Valentina Osorio por su invaluable ayuda en el análisis de datos y por su respaldo en los momentos más desafiantes de este proceso.

Finalmente, este logro no habría sido posible sin la colaboración y apoyo de todas las personas que, directa o indirectamente, contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

# ÍNDICE GENERAL

<b>HOJA DE APROBACIÓN</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>ABREVIATURAS UTILIZADAS</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>CAPÍTULO I:</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO</b>	<b>13</b>
Cáncer Colorrectal	13
Datos Globales y Regionales	13
Factores de Riesgo Asociados a CCR	15
Estadios del Cáncer Colorrectal	18
Metástasis del Cáncer Colorrectal	19
Pruebas Biomarcadoras en el Cáncer Colorrectal Metastásico	21
Vía MAPK de RAS/RAF/MEK/ERK	21
RAS: Importante marcador molecular	22
Mutaciones KRAS y NRAS en el Cáncer Colorrectal Metastásico	23
RAF: Quinasa Dimérica Esencial	26
Mutaciones BRAF	27
<b>CAPÍTULO II:</b>	<b>29</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>30</b>
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
Objetivo General	33
Objetivos Específicos	33
<b>CAPÍTULO III:</b>	<b>34</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
Diseño del estudio	35
Variables a Analizadas	35
Sujetos y recolección de datos	36
Extracción del ADN	36
Perfil de las mutaciones	39
Análisis estadísticos	40
<b>CAPÍTULO IV:</b>	<b>41</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>

<b>CAPÍTULO V:</b>	<b>54</b>
DISCUSIÓN	55
<b>CAPÍTULO VI:</b>	<b>62</b>
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	65
REFERENCIAS	67

## ÍNDICE DE CUADROS

- Tabla 1. Distribución de Mutaciones en los Genes KRAS, NRAS, y BRAF por Sexo/Edad en pacientes con CCR.<sup>1</sup> Prueba de chi-cuadrado. 44
- Tabla 2. Frecuencia y Distribución de Mutaciones en los Genes KRAS, NRAS, y BRAF en Pacientes con CCR. Las mutaciones BRAF se clasifican en: <sup>1</sup>Clase 1, monómeros independientes de RAS; <sup>2</sup>Clase 2, dímeros independientes de RAS; <sup>3</sup>Clase 3, mutaciones dependientes de RAS; \*Indica variante no reportada en la literatura. 47
- Tabla 3. Distribución de Mutaciones en los Genes KRAS, NRAS, y BRAF por Sexo/Edad en Pacientes con CCR nacidos en la provincia de Panamá.<sup>1</sup> Prueba de chi-cuadrado. 49
- Tabla 4. Asociación entre mutaciones en KRAS, NRAS, y BRAF en pacientes con CCR. Frecuencia y distribución de mutaciones en KRAS, NRAS y BRAF, incluyendo análisis detallado de las mutaciones en el exón 2 de KRAS. <sup>1</sup> Prueba de chi-cuadrado. 51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la Frecuencia de Localizaciones Tumorales para el 2022. A. Pacientes femeninos. B. Pacientes masculinos. (Instituto Oncológico Nacional, 2022)	14
Figura 2. Factores de Riesgo del Cáncer Colorrectal. Creado con BioRender.com	16
Figura 3. Modelo de Evolución del Cáncer Colorrectal. El desarrollo de la neoplasia maligna se ilustra desde el epitelio normal, pasando por un pólipo benigno que acumula alteraciones genéticas, hasta progresar a una masa con crecimiento celular desordenado (marcado en amarillo) que eventualmente permea la pared del colon. Creado con BioRender.com	18
Figura 4. Transducción de señales de la vía RAS-RAF-MEK-ERK. Creado con BioRender.com	22
Figura 5. Esquema gráfico con resumen de procedimientos. Las muestras obtenidas en bloques de parafina se cortaron para su posterior extracción de ADN. Este ADN se utilizó para la preparación de bibliotecas, secuenciación y análisis bioinformático. Esta información es la que se utilizó finalmente para establecer el perfil genético poblacional. Creado con BioRender.com	38
Figura 6. Distribución de Pacientes por Género (A), Edad (B) y Provincia de Nacimiento (C).	42
Figura 7. Diagrama de cascada (oncoplot) de la distribución de las mutaciones encontradas en nuestras muestras tumorales. El gráfico superior muestra la frecuencia de mutación para cada muestra tumoral.	45
Figura 8. Porcentaje de pacientes según estado mutacional en genes relacionados con CRC. (A) Gráfico de barras que muestra la distribución porcentual de pacientes con mutaciones en los genes BRAF, KRAS, y NRAS, así como aquellos no mutados. (B) Gráfico de pastel que indica la proporción de pacientes según el número de mutaciones detectadas.	46
Figura 9. Gráfico “lollipop” generado por la herramienta MutationMapper de cBioPortal. El gráfico identifica los diferentes dominios en cada proteína respectiva. Se muestra la naturaleza de las mutaciones y su posición. El número de veces que se ha detectado cada mutación se muestra con la escala de la izquierda y está representado por la altura del punto.	52

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated (gen de reparación del ADN)
CCR	Cáncer colorrectal
cBioPortal	Cancer BioPortal for Cancer Genomics (plataforma de análisis de datos genómicos)
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (base de datos de mutaciones en cáncer)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (receptor del factor de crecimiento epidérmico)
ERBB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 (también conocido como HER2)
ERBB4	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4
FASTQ	Formato estándar de archivo de datos de secuenciación
FBXW7	F-Box and WD Repeat Domain Containing 7 (gen supresor de tumores)
FFPE	Formalina Fijado y Parafina Embebido
hg19	Human Genome version 19 (versión de referencia del genoma humano)
ION	Instituto Oncologico Nacional
mCCR	Cáncer colorrectal metastásico
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (vía de señalización celular)
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
NGS	Next-Generation Sequencing (secuenciación de nueva generación)
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
OncoKB	Oncology Knowledge Base (base de datos de biomarcadores oncológicos)
PASS	Variantes que pasan todos los filtros de calidad en análisis de NGS
PET	Positron Emission Tomography (tomografía por emisión de positrones)

## VIII

PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog (gen supresor de tumores)
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (familia de proteínas quinasa)
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
RM	Resonancia Magnética
SMAD4	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4 (gen implicado en la vía TGF-beta)
TC	Tomografía Computarizada
TCGA	The Cancer Genome Atlas (proyecto de caracterización genómica del cáncer)
VUS	Variant of Uncertain Significance (variante de significado incierto)

## RESUMEN

El cáncer colorrectal es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad oncológica en el mundo, y su abordaje terapéutico depende en gran medida de las características moleculares del tumor. Por ejemplo, las mutaciones en los genes KRAS, NRAS y BRAF en estos tumores constituyen biomarcadores esenciales para guiar decisiones clínicas, especialmente en el contexto de enfermedad metastásica. Sin embargo, en Panamá, la información sobre la frecuencia y distribución de estas alteraciones era limitada.

Esta tesis presenta el primer análisis exhaustivo del perfil mutacional de KRAS, NRAS y BRAF en tumores de pacientes panameños con cáncer colorrectal metastásico (mCCR), utilizando tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS). Se estudiaron 440 muestras de tejido tumoral obtenidas en el Instituto Oncológico Nacional entre 2021 y 2024. Los resultados mostraron una alta frecuencia de mutaciones en KRAS (48.6%), seguida de BRAF (8.2%) y NRAS (4.3%). La mayoría de las mutaciones en KRAS se localizaron en el exón 2, siendo las variantes p.Gly12Asp y p.Gly12Val las más prevalentes. En BRAF, predominó la mutación p.Val600Glu (V600E), aunque también se detectaron variantes diferentes V600E, potencialmente relevantes para la práctica clínica.

La caracterización molecular evidenció patrones mutacionales similares a los reportados en otras poblaciones, pero con ciertas particularidades que podrían reflejar influencias poblacionales o metodológicas. Asimismo, se documentaron casos raros de mutaciones concurrentes KRAS/BRAF y NRAS/BRAF, resaltando la utilidad de tecnologías de alta sensibilidad para identificar alteraciones infrecuentes.

Estos hallazgos confirman la viabilidad de integrar el análisis genético sistemático en la atención clínica del mCCR en Panamá. Se destaca la importancia de expandir los paneles de evaluación molecular para incluir genes como APC, ATM, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, PTEN y SMAD4, así como correlacionar las alteraciones genéticas con variables clínicas relevantes, como la localización del tumor y la respuesta terapéutica.

Este trabajo sienta una base sólida para la implementación de estrategias de medicina de precisión en el tratamiento del cáncer colorrectal en Panamá y abre nuevas oportunidades para investigaciones futuras sobre la interacción entre factores genéticos y ambientales en la biología tumoral de la región.

## ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the leading causes of cancer-related morbidity and mortality worldwide, and its therapeutic management increasingly depends on the tumor's molecular characteristics. For instance, mutations in the KRAS, NRAS, and BRAF genes are key biomarkers guiding clinical decisions, particularly in metastatic disease. However, data on their prevalence and distribution in Panamanian patients was previously limited.

This thesis presents the first comprehensive analysis of the mutational profile of KRAS, NRAS, and BRAF in Panamanian patients with metastatic colorectal cancer (mCRC), using next-generation sequencing (NGS) technology. A total of 440 tumor tissue samples collected at the Instituto Oncológico Nacional between 2021 and 2024 were analyzed. The results revealed a high frequency of mutations in KRAS (48.6%), followed by BRAF (8.2%) and NRAS (4.3%). Most KRAS mutations were located in exon 2, with p.Gly12Asp and p.Gly12Val being the most common variants. In BRAF, the predominant mutation was p.Val600Glu (V600E), although non-V600E variants, potentially significant for therapy, were also detected.

The molecular profiling revealed mutational patterns similar to those described in other populations, with some differences that may reflect population-specific or methodological influences. Additionally, rare cases of concurrent KRAS/BRAF and NRAS/BRAF mutations were identified, highlighting the value of high-sensitivity technologies in detecting uncommon alterations.

The findings support the feasibility of integrating systematic genetic testing into clinical practice for mCRC patients in Panama. The study also emphasizes the need to expand molecular panels to include additional genes such as APC, ATM, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, PTEN, and SMAD4, and to correlate genetic findings with key clinical variables like tumor location and treatment response.

This research provides a foundational step toward implementing precision medicine strategies for colorectal cancer treatment in Panama and opens new avenues for investigating the interplay between genetic and environmental factors in the tumor biology of Latin American population

**CAPÍTULO I:**  
**INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO**

# INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

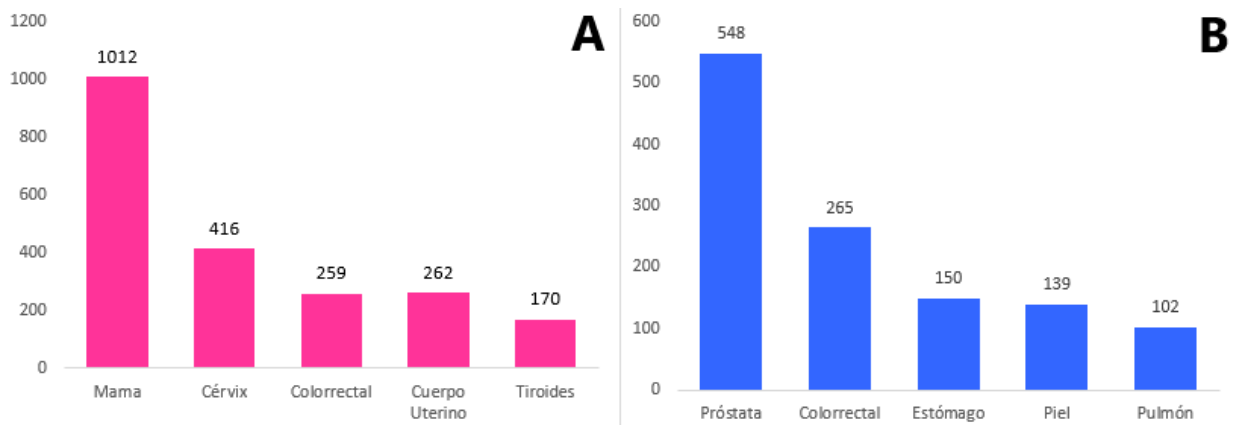
## Cáncer Colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad que afecta el colon y el recto, partes del intestino grueso. Este tipo de cáncer se desarrolla con frecuencia a partir de pólipos adenomatosos, que son pequeñas formaciones en la mucosa del colon o recto. Si no se detectan y se tratan a tiempo, estos pólipos pueden evolucionar a CCR (Mayo Clinic, 2023).

## Datos Globales y Regionales

A nivel global, el CCR se posiciona como el tercer cáncer más común en términos de incidencia y el segundo en mortalidad. En 2020, se estimaron más de 1.9 millones de nuevos casos y más de 930,000 muertes por CCR a nivel mundial, con tasas de incidencia más altas en Europa, Australia y Nueva Zelanda. Las tasas de mortalidad fueron más elevadas en Europa del Este. Se proyecta que para 2040, la carga del CCR aumentará a 3.2 millones de nuevos casos anuales y 1.6 millones de muertes, representando un incremento del 63% y 73%, respectivamente (International Agency for Research on Cancer, 2022). En Europa, el 5% de la población ha tenido un diagnóstico de cáncer en su vida, siendo el CCR el segundo más común en ambos sexos, con una mayor prevalencia en hombres (691 por 100,000) en comparación con mujeres (564 por 100,000) (Joint Research Centre, 2021).

En Asia, las tasas de incidencia y mortalidad del CCR muestran una considerable variabilidad, influenciada por factores como los estilos de vida, el acceso a servicios de salud y el nivel de desarrollo económico. En los países en transición económica, se ha observado un aumento en las tasas de incidencia, particularmente entre los adultos jóvenes. Este incremento resalta la necesidad de implementar programas de prevención y detección temprana eficaces (International Agency for Research on Cancer, 2023).



**Figura 1.** Distribución de la Frecuencia de Localizaciones TumORAles para el 2022. A. Pacientes femeninos. B. Pacientes masculinos. (Instituto Oncológico Nacional, 2022)

En el Boletín de 2022 del Instituto Oncológico Nacional (ION) de Panamá (**Figura 1**), se observa que el cáncer de colon y recto sigue siendo una de las localizaciones más frecuentes de neoplasias malignas. En 2021, se reportaron 469 casos de cáncer de colon y recto, representando el 10.3% de todos los casos de cánceres registrados, mientras que en 2022, se diagnosticaron 524 casos, un aumento en 11.7% y equivalentes al 10.2% del total de cánceres. La

distribución por sexo en ambos años muestra una proporción similar, con 223 casos en hombres y 246 en mujeres en 2021, y 265 casos en hombres y 259 en mujeres en 2022. La mayoría de los casos se presentaron en pacientes mayores de 50 años, especialmente en el grupo de 60 a 74 años, en ambos años. (Instituto Oncológico Nacional, 2022).

### **Factores de Riesgo Asociados a CCR**

Los factores de riesgo para el CCR incluyen la edad avanzada, ya que el riesgo aumenta significativamente después de los 50 años (**Figura 2**). La historia familiar de CCR es otro factor importante; aquellos con antecedentes familiares tienen un riesgo mayor. Además, una dieta rica en grasas saturadas y baja en fibra se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad. El consumo excesivo de carnes rojas y procesadas (como embutidos) también ha sido vinculado con un aumento en la incidencia del CCR (World Health Organization, 2021).



**Figura 2.** Factores de Riesgo del Cáncer Colorrectal. Creado con BioRender.com

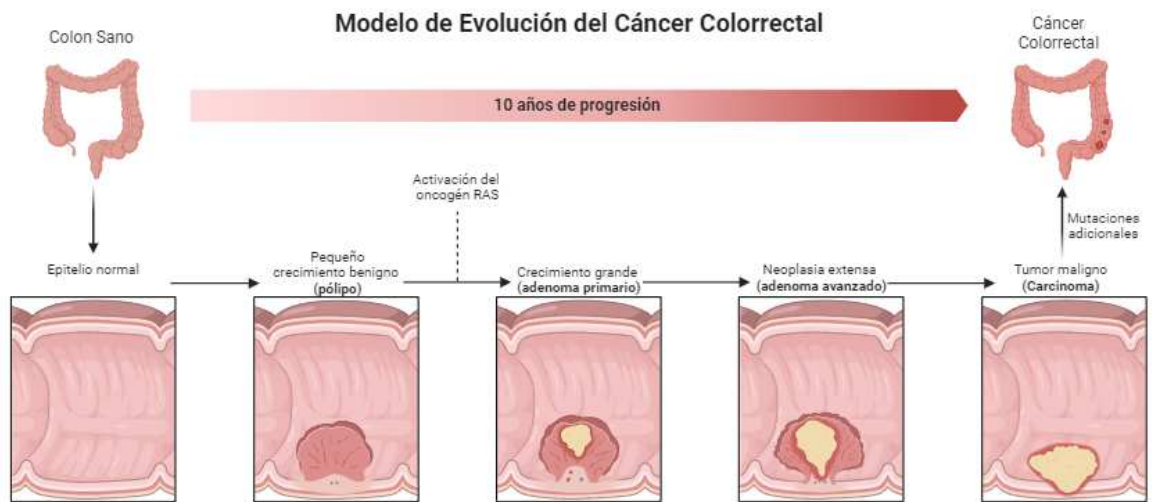
Ciertos síndromes genéticos, como la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome de Lynch, aumentan el riesgo de CCR. Estos síndromes hereditarios pueden predisponer a los individuos a desarrollar múltiples pólipos en el colon o recto y a cánceres a una edad más temprana que la población general. La poliposis adenomatosa familiar se caracteriza por la formación de numerosos pólipos en el colon, que con el tiempo pueden convertirse en cáncer. Por su parte, el síndrome de Lynch, también conocido como CCR hereditario no polipósico (HNPCC), está asociado con un mayor riesgo de varios tipos de

cáncer, incluyendo el colorrectal (Mayo Clinic, 2023) y está causada por una disfunción del sistema de reparación de los errores de emparejamiento del ADN, caracterizada por la expansión o contracción de las regiones de microsatélites en el tumor en comparación con el tejido sano, denominada inestabilidad de microsatélites (MSI), y detectada en el análisis molecular. Además, estos tumores muestran deficiencia de proteínas de reparación de emparejamientos erróneos en la inmunohistoquímica. Sin embargo, la MSI no es específica del síndrome de Lynch, y aproximadamente el 15% de los cánceres colorrectales espontáneos también muestran MSI (Dekker, et al., 2019).

Además, factores como la obesidad, el tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol están asociados con un aumento en el riesgo de CCR. La obesidad, en particular, se ha vinculado a un mayor riesgo de desarrollar CCR debido a los efectos adversos sobre el metabolismo y la inflamación. El tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol también son factores de riesgo bien establecidos, ya que ambos contribuyen al desarrollo de cánceres en el tracto gastrointestinal. La falta de actividad física y el sedentarismo se han identificado como factores de riesgo adicionales, ya que un estilo de vida inactivo puede contribuir al aumento de peso. (Centers for Disease Control and Prevention, 2023).

La mayoría de los cánceres surgen a partir de un pólipo (**Figura 3**). Este proceso comienza con una cripta aberrante, que evoluciona hacia una lesión neoplásica precursora (un pólipo) y, finalmente, progresa a cáncer colorrectal en un periodo estimado de 10-15 años. Actualmente se considera que la célula de origen de la

mayoría de los cánceres colorrectales es una célula madre o una célula similar a una célula madre. Estas células madres tumorales son el resultado de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que inactivan los genes supresores de tumores y activan los oncogenes. Las células madre tumorales residen en la base de las criptas colónicas y son esenciales para el inicio y el mantenimiento de un tumor (Dekker, et al., 2019).



**Figura 3.** Modelo de Evolución del Cáncer Colorrectal. El desarrollo de la neoplasia maligna se ilustra desde el epitelio normal, pasando por un pólipo benigno que acumula alteraciones genéticas, hasta progresar a una masa con crecimiento celular desordenado (marcado en amarillo) que eventualmente permea la pared del colon. Creado con BioRender.com

### Estadios del Cáncer Colorrectal

El estadiaje del CCR se basa en el nivel de la extensión del cáncer dentro del cuerpo y se clasifica usando el sistema TNM, que evalúa:

1. **Tamaño y Extensión del Tumor Primario (T):** Determina cuán profundo ha invadido el tumor en la pared del colon o recto.
2. **Involucramiento de Ganglios Linfáticos Regionales (N):** Identifica si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos.
3. **Metástasis a Distancia (M):** Evalúa si el cáncer ha viajado a otras partes del cuerpo, como el hígado o los pulmones (Cancer Research UK, 2023).

El sistema TNM clasifica el cáncer en estadios del I al IV, según lo establecido por la Asociación Americana del Cáncer (American Cancer Society, 2023):

- **Estadio I:** El cáncer está limitado a la capa interna del colon o recto.
- **Estadio II:** El cáncer ha invadido más allá de la pared del intestino, pero no ha alcanzado los ganglios linfáticos.
- **Estadio III:** El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos.
- **Estadio IV:** El cáncer ha metastatizado a órganos distantes

## **Metástasis del Cáncer Colorrectal**

Las metástasis del CCR se producen cuando las células cancerosas se desprenden del tumor primario en el colon o el recto y se diseminan a otras partes del cuerpo. Este proceso puede ocurrir a través del sistema sanguíneo o linfático y generalmente se manifiesta en órganos distantes, como el hígado, los pulmones y, menos comúnmente, el peritoneo (Cancer Center, 2024).

1. **Metástasis Hepáticas:** El hígado es el órgano más frecuentemente afectado por las metástasis del CCR debido a su función en la filtración de la sangre que drena del tracto gastrointestinal. Las células cancerosas pueden viajar a través de los vasos sanguíneos del intestino y alojarse en el hígado, donde forman tumores secundarios. Las metástasis hepáticas pueden causar síntomas como dolor abdominal, ictericia y pérdida de peso, y a menudo requieren un enfoque combinado de cirugía, quimioterapia y, a veces, terapias dirigidas para su manejo.
2. **Metástasis Pulmonares:** Los pulmones también son un sitio común de metástasis, ya que las células cancerosas pueden viajar a través del torrente sanguíneo y alojarse en los pulmones. Las metástasis pulmonares pueden llevar a síntomas como tos persistente, dificultad para respirar y dolor en el pecho. El tratamiento puede involucrar cirugía, quimioterapia y terapia dirigida, dependiendo de la extensión y el número de metástasis.
3. **Metástasis Peritoneales:** En algunos casos, el CCR puede diseminarse al peritoneo, la membrana que recubre la cavidad abdominal. Esta forma de diseminación puede provocar ascitis (acumulación de líquido en el abdomen), dolor abdominal y malestar general. Las metástasis peritoneales suelen tratarse con quimioterapia intraperitoneal, que administra el medicamento directamente en el abdomen, además de cirugía en algunos casos.

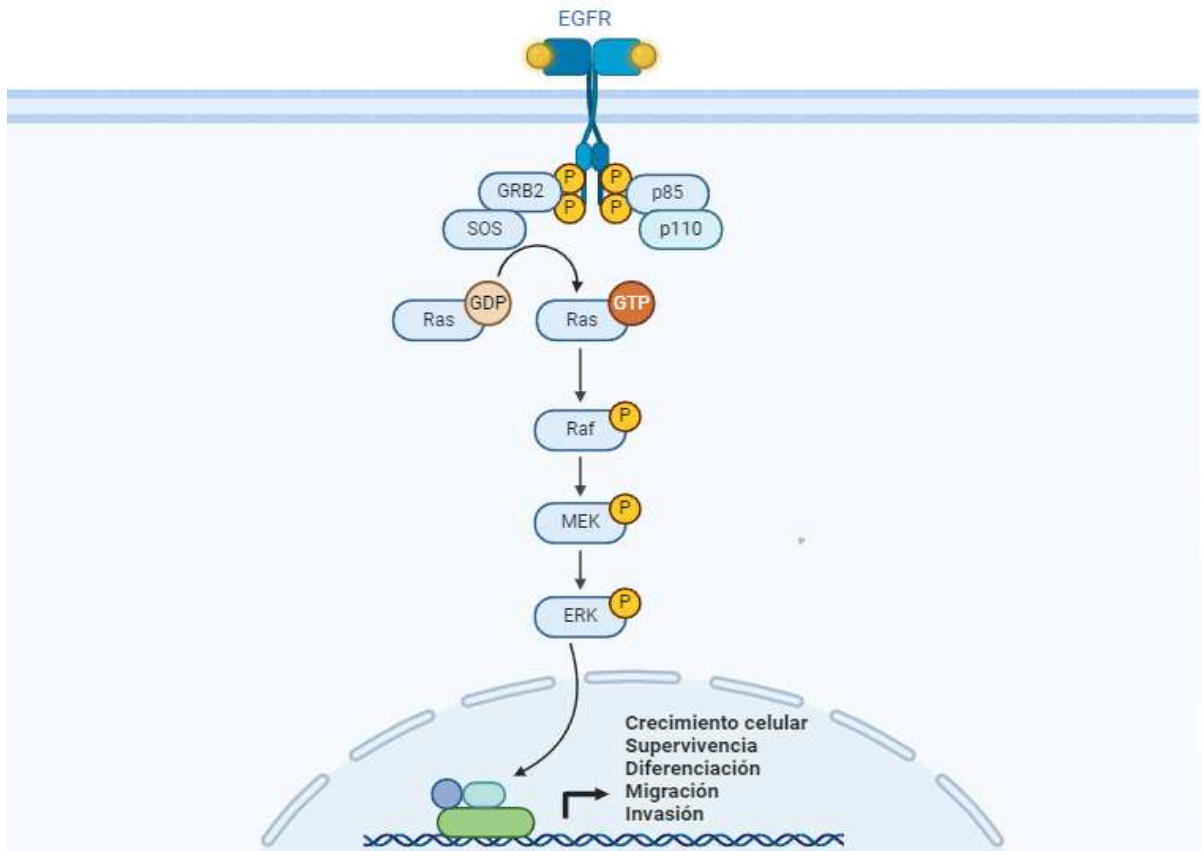
La detección de metástasis generalmente se realiza mediante imágenes avanzadas como tomografías computarizadas (TC), resonancias magnéticas (RM) y, a veces, tomografías por emisión de positrones (PET), (Cañellas-Socias, et al., 2024).

### **Pruebas Biomarcadoras en el Cáncer Colorrectal Metastásico**

Aproximadamente el 50%–60% de los pacientes diagnosticados con CCR desarrollan metástasis (Lee, et al., 2007; Van Cutsem, et al., 2006; Yoo, et al., 2006). La gestión actual del cáncer colorrectal metastásico (mCCR) implica el uso de diversos medicamentos activos, ya sea en combinación o como agentes individuales. Con un papel cada vez más prominente de la terapia dirigida en el tratamiento del mCCR avanzado o metastásico, en la actualidad, se recomienda la determinación del estado genético del tumor para mutaciones en KRAS/NRAS y BRAF, así como amplificaciones de HER2 y el estado de inestabilidad de microsatélites (MSI)/reparación de emparejamiento (MMR), para los pacientes con mCCR. Las pruebas pueden realizarse para genes individuales o como parte de un panel de secuenciación de nueva generación (NGS), siendo NGS preferido (Benson, et al., 2024). Los paneles NGS tienen la ventaja de poder detectar alteraciones genéticas raras y accionables y pueden realizarse utilizando una biopsia de tejido o una biopsia líquida (Parikh, et al., 2019).

### **Vía MAPK de RAS/RAF/MEK/ERK**

La vía RAS-RAF-MEK-ERK, también conocida como la vía MAPK, es una vía de señalización conservada que desempeña un papel fundamental en la regulación de la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular. La activación aberrante de esta vía es un factor clave en la formación de muchos tipos de tumores malignos, incluyendo CCRs (**Figura 4**). Desde que fueron identificados por primera vez como genes con potencial oncogénico un gran número de investigaciones muestran que aproximadamente el 30% de los tumores presentan mutaciones en RAS, mientras que el 8% están impulsados por mutaciones en RAF (Maik-Rachline, et al., 2019). En las dos últimas décadas, la Food and Drug Administration de Estados Unidos ha aprobado 43 fármacos dirigidos contra estas dianas moleculares que regulan la proliferación celular, el metabolismo y la modulación inmunitaria (Bedard, et al., 2020).



**Figura 4.** Transducción de señales de la vía RAS-RAF-MEK-ERK. Creado con BioRender.com

#### **RAS: Importante marcador molecular**

Las proteínas Ras, GTPasas de 21 kD, juegan un papel crucial en la regulación de vías de señalización celular involucradas en la proliferación y supervivencia. RAS actúa como un interruptor molecular al unirse a guanosina trifosfato/guanosina difosfato (GTP/GDP) (Simanshu et al., 2017). La activación de RAS ocurre cuando el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se une a su ligando, activando la proteína unida al receptor de factor de crecimiento (GRB2) y Son Of Sevenless (SOS), que convierten RAS-GDP en

RAS-GTP. Este proceso es mediado por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) y regulado por proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), que hidrolizan RAS-GTP a su forma inactiva, manteniendo así la señalización dependiente del estímulo (Huang et al., 2019).

La identificación por parte de Scolnick et al de los genes RAS, HRAS y KRAS en 1975, a partir de estudios de virus causantes de cáncer, resaltó su importancia en la oncogénesis. Las mutaciones oncogénicas en los protooncogenes RAS, específicamente en las tres isoformas de expresión ubicua: Kirsten Rat Sarcoma (KRAS localizado en 12p12.1), Harvey Rat Sarcoma (HRAS localizado en 11p15.5) y Neuroblastoma RAS (NRAS localizado en 1p13.2), resultan en proliferación y transformación celular anormales, asociadas con diversos tipos de cáncer (Prior et al., 2012). Aunque estas isoformas son casi idénticas, no son biológicamente redundantes debido a su localización diferencial en la membrana plasmática y endomembrana, lo que provoca distribuciones superpuestas pero distintivas (Henis et al., 2009).

### **Mutaciones KRAS y NRAS en el Cáncer Colorrectal Metastásico**

Las mutaciones en los componentes de la vía MAPK que causan su activación constitutiva están estrechamente vinculadas con la progresión tumoral (Maik-Rachline, et al., 2019) lo que convierte a la vía en un objetivo atractivo para terapias dirigidas. Estas mutaciones esencialmente excluyen la eficacia de

la terapia con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que corresponde al tratamiento inicial recomendado por las guías del **National Comprehensive Cancer Network (NCCN)** de la enfermedad avanzada o metastásica, subrayando la necesidad de estrategias terapéuticas alternativas para los tumores con dichas alteraciones genéticas (National Comprehensive Cancer Network, 2024). Una considerable cantidad de literatura ha demostrado que los tumores con una mutación en los exones 2, 3 ó 4 de los genes KRAS o NRAS son esencialmente insensibles a la terapia con anti-EGFR (Sorich, et al., 2015). KRAS es la más frecuentemente mutada de las tres isoformas Ras en 19 de los 29 tipos de cáncer y es responsable del 75% de los cánceres con mutación Ras. NRAS (17% de los pacientes) y HRAS (7%) muestran un fuerte vínculo con sólo un pequeño subconjunto de tipos de cáncer (Prior, et al., 2020). Por lo tanto, se recomienda la genotipificación RAS (KRAS/NRAS) del tumor (ya sea el tumor primario o la metástasis) en todos los pacientes con mCCR. Los pacientes con tumores mutantes en KRAS o NRAS conocidos no deben ser tratados con anti-EGFR, ya sea solo o en combinación con otros agentes anticancerígenos, porque tienen una probabilidad casi nula de beneficio y la exposición a toxicidad y gasto no puede justificarse.

Una excepción a esto es la mutación KRAS G12C, presente en el 14% de los cánceres de pulmón y el 5% de los cánceres colorrectales (Drosten, 2020). Un grupo describió por primera vez un compuesto, que podía unirse de forma irreversible a la cisteína de KRAS G12C en lugar de a la glicina de KRAS no

mutado (Ostrem, et al., 2013). Esto ha permitido el uso de tratamientos anti-EGFR en pacientes que presentan esta mutación específica, cuando se administran en combinación con medicamentos derivados de este compuesto.

La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO, por sus siglas en inglés) publicó una Actualización Provisional de Opinión Clínica sobre la prueba extendida de RAS en pacientes con mCCR que es consistente con las recomendaciones del panel de NCCN (Allegra, et al., 2016). Una guía sobre biomarcadores moleculares para CCR desarrollada por la American Society of Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, y ASCO también recomienda la prueba de RAS consistente con las recomendaciones de NCCN (Sepulveda, et al., 2017).

La recomendación para la prueba de RAS, en este momento, no está destinada a indicar una preferencia respecto a la selección del régimen en el entorno de primera línea. Más bien, este establecimiento temprano del estado de RAS es apropiado para planificar el tratamiento continuo, de modo que la información pueda obtenerse de manera no sensible al tiempo y el paciente y el proveedor puedan discutir las implicaciones de una mutación RAS, si está presente, mientras aún existen otras opciones de tratamiento. Cabe señalar que, dado que los agentes anti-EGFR no tienen un papel en la gestión de la enfermedad en estadio I, II o III, la genotipificación RAS de CCR en estas etapas tempranas no se recomienda (Benson, et al., 2024).

Las mutaciones KRAS son eventos tempranos en la formación de CCR, y por lo tanto existe una correlación muy estrecha entre el estado de mutación en el tumor primario y las metástasis (Artale, et al., 2008; Etienne-Grimaldi, 2008; Knijn, 2011). Por esta razón, la genotipificación RAS puede realizarse en muestras archivadas ya sea del tumor primario o de una metástasis.

### **RAF: Quinasa Dimérica Esencial**

RAF, la quinasa descendente de RAS, es reclutada y fosforilada directamente después de que RAS activa el interruptor. Incluyen tres isoformas: CRAF, BRAF y ARAF. Aunque tienen estructuras moleculares similares, las proteínas RAF tienen una actividad bastante diferente y desempeñan papeles distintos en la función celular. BRAF, localizado en 7q34 es muy conocida en el cáncer, ya que es un blanco importante de mutaciones genéticas en la tumorigénesis, tiene la mayor actividad entre las tres isoformas. CRAF, tiene una actividad intermedia. Por último, ARAF rara vez se ve alterado genéticamente y tiene la menor actividad (Degirmenci, et al., 2020). La dimerización de RAF es crucial para su activación. RAS activo induce la formación de complejos entre CRAF y BRAF, y algunos mutantes de BRAF con actividad quinasa reducida pueden activar MEK a través de CRAF. BRAF no mutado forma complejos con CRAF de manera dependiente de RAS, mientras que los mutantes lo hacen independientemente de RAS (Tkacik, et al., 2023).

## **Mutaciones BRAF**

Aunque las mutaciones en RAS indican una falta de respuesta a los anti-EGFR, muchos tumores que no contienen mutaciones en RAS aún no responden a estas terapias. Por lo tanto, se han abordado otros factores de la vía MAPK como posibles biomarcadores predictivos de la respuesta a anti-EGFR.

La mutación en el codón 600 de BRAF, caracterizada por el cambio de valina a ácido glutámico (c.1799T>A o p.V600E), ocurre en el exón 15 y se produce mediante una transversión de timina a adenina en el nucleótido 1799. Esta mutación, originalmente reportada como nucleótido 1796 y codón V599E, imita la fosforilación del sitio de activación, desencadenando la activación constitutiva de la vía MAPK de forma independiente de RAS. Esta activación promueve la proliferación descontrolada de células tumorales y la formación de metástasis, lo cual se asocia con un peor pronóstico en la supervivencia del paciente. Entre las isoformas de RAF, BRAF presenta la mayor frecuencia de mutación, siendo la mutación V600E la más prevalente, representando el 95% de las mutaciones en BRAF y mostrando una elevada actividad quinasa constitutiva que estabiliza su conformación catalítica (Song et al., 2023). Aunque la mutación V600E se ha asociado con una menor respuesta a los inhibidores de EGFR, el impacto clínico de otras mutaciones en BRAF aún no es completamente claro. Alrededor de un 25% de las mutaciones en BRAF ocurren fuera de este codón, y con el avance de la secuenciación de nueva generación, estas mutaciones atípicas están siendo identificadas con mayor frecuencia en la práctica clínica (Yaeger et al.,

2019). Las mutaciones en BRAF pueden clasificarse en tres grupos según sus mecanismos bioquímicos y de señalización. La clase 1 incluye las mutaciones V600 de BRAF, que presentan una alta actividad quinasa y son independientes de RAS, ya que pueden actuar como monómeros. Las mutaciones fuera del codón V600 en BRAF se dividen en clase 2 y clase 3. Los mutantes de clase 2 son activadores e independientes de RAS; dimerizan y señalizan sin la necesidad de activación de RAS. Los mutantes de clase 3 tienen una baja actividad quinasa o son inactivos como quinasas, pero activan la vía MAPK a través de una mayor afinidad por RAS y la subsiguiente activación de CRAF dependiente de RAS. Un estudio que incluyó pacientes con mCCR portadores de mutaciones en BRAF diferentes a V600 mostró una respuesta a la terapia anti-EGFR similar a la de pacientes sin mutaciones en BRAF, destacándose de manera significativa en pacientes con mutaciones de clase 3 (Osterlund, et al., 2024).

**CAPÍTULO II:**  
**JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS**  
**Y OBJETIVOS**

## JUSTIFICACIÓN

Los reportes previos demuestran los beneficios de determinar el perfil genético tumoral individual para evaluar el estado de las mutaciones RAS/BRAF como requisito en la selección específica de terapias efectivas y mejorar el pronóstico del mCCR (Bokemeyer, et al., 2009; Sorich et al., 2015; Di Nicolantonio, et al., 2008). Para abordar esto, se han realizado estudios genéticos sobre la frecuencia de estas mutaciones y la eficacia de las terapias dirigidas principalmente en países de Europa, Estados Unidos y Asia (Innocenti, et al., 2023; Martianov, et al., 2023; Afrăsânie, et al., 2023). Sin embargo, estas poblaciones son genéticamente diferentes a la población panameña, por lo que no serían representativas de los pacientes locales. Los genes de la población panameña son el resultado del mestizaje de poblaciones principalmente indígenas (51%), españolas (25%) y africanas (24%), (Castro-Pérez, et al., 2018). No existen datos genéticos disponibles para estas mutaciones en tumores de mCCR pacientes de Panamá, lo cual limita la aplicación de la medicina personalizada. Identificar las mutaciones de estos genes y la frecuencia en que afectan a los pacientes del país sería de mucha utilidad para mejorar los tratamientos y la calidad de vida de pacientes y sus familias. Esto permitiría, además, el desarrollo de mejores estrategias en el uso de los recursos, por ejemplo, maneras más efectivas en la compra de los medicamentos y reactivos diagnósticos que más necesitan los pacientes locales. Para abordar esto, proponemos realizar secuenciación de nueva generación

para determinar las mutaciones de las vías de señalización EGFR, KRAS, NRAS y BRAF en tumores de pacientes locales de mCCR.

Adicionalmente, estudios previos reportan que diferencias en el trasfondo genético de las diferentes provincias del país podrían estar asociadas con la susceptibilidad en riesgo genético a algunos tipos de cáncer como el cáncer de próstata y otras enfermedades como las cardio/cerebrovasculares (Castro-Pérez et al., 2016; Ramos et al., 2018). Estos estudios sugieren, además, que los diferentes estilos de vida podrían estar también involucrados en diferencias en susceptibilidad a algunos cánceres y otras enfermedades. En el caso del mCCR, estos datos son desconocidos. Por lo tanto, estimaremos las frecuencias de las mutaciones KRAS, NRAS y BRAF generales del país y las compararemos con datos de otras poblaciones/países. Inferiremos de manera general que el trasfondo genético ancestral de la población panameña (con diversas mezclas de genes indígenas, africanos y europeos), así como y estilos de vida, arrojarán frecuencias diferentes a las reportados previamente en otros países de estas mutaciones tumorales en mCCR.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Hipotetizamos que las frecuencias de las mutaciones oncogénicas en los genes RAS (KRAS/NRAS) y BRAF en tumores de pacientes de cáncer colorrectal serán diferentes entre sí. Asimismo, anticipamos que tanto el estado mutacional como las mutaciones puntuales presentes en los pacientes panameños diferirán de las observadas en otras poblaciones del mundo reportadas en la literatura.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Identificar mutaciones en los genes KRAS, NRAS, y BRAF, en tumores de pacientes del Instituto Oncológico Nacional diagnosticados con cáncer colorrectal metastásico (mCCR).

### **Objetivos Específicos**

- Determinar la frecuencia de las mutaciones en los genes KRAS, NRAS, y BRAF en la población de pacientes diagnosticados con mCCR del Instituto Oncológico Nacional.
- Comparar las frecuencias de las mutaciones por edad, sexo y provincias de nacimiento y del país con los datos de otras poblaciones/países reportados en la literatura y bases de datos.

**CAPÍTULO III:**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño del estudio**

Se realizó un estudio observacional retrospectivo para evaluar las frecuencias de las mutaciones de RAS y BRAF en muestras de tejido de mCCR fijados en parafina. Entre diciembre de 2021 y julio 2024, se analizaron 440 pacientes que sometieron bloques de tejido o a tratamientos quirúrgicos en el Instituto Oncológico Nacional (ION). El estudio se llevó a cabo con la aprobación del Comité de Bioética en Investigación Hospital del Niño Doctor José Renan Esquivel por medio del memorando CBIHN-M-202110-0003.

### **Variables a Analizadas**

Durante el proceso de revisión de expedientes médicos, se extrajeron y analizaron diversas variables relevantes para el estudio, incluyendo:

- Edad: Se registró la edad de cada paciente.
- Sexo: Se documentó el sexo de cada paciente, clasificándolos en masculino o femenino.
- Provincia de Nacimiento: Se registró la provincia de nacimiento de cada paciente como una variable geográfica. La provincia de Panamá incluye Panamá y Panamá Oeste.

- **Mutaciones Encontradas:** Se registraron las mutaciones genéticas específicas identificadas en cada paciente durante los análisis.

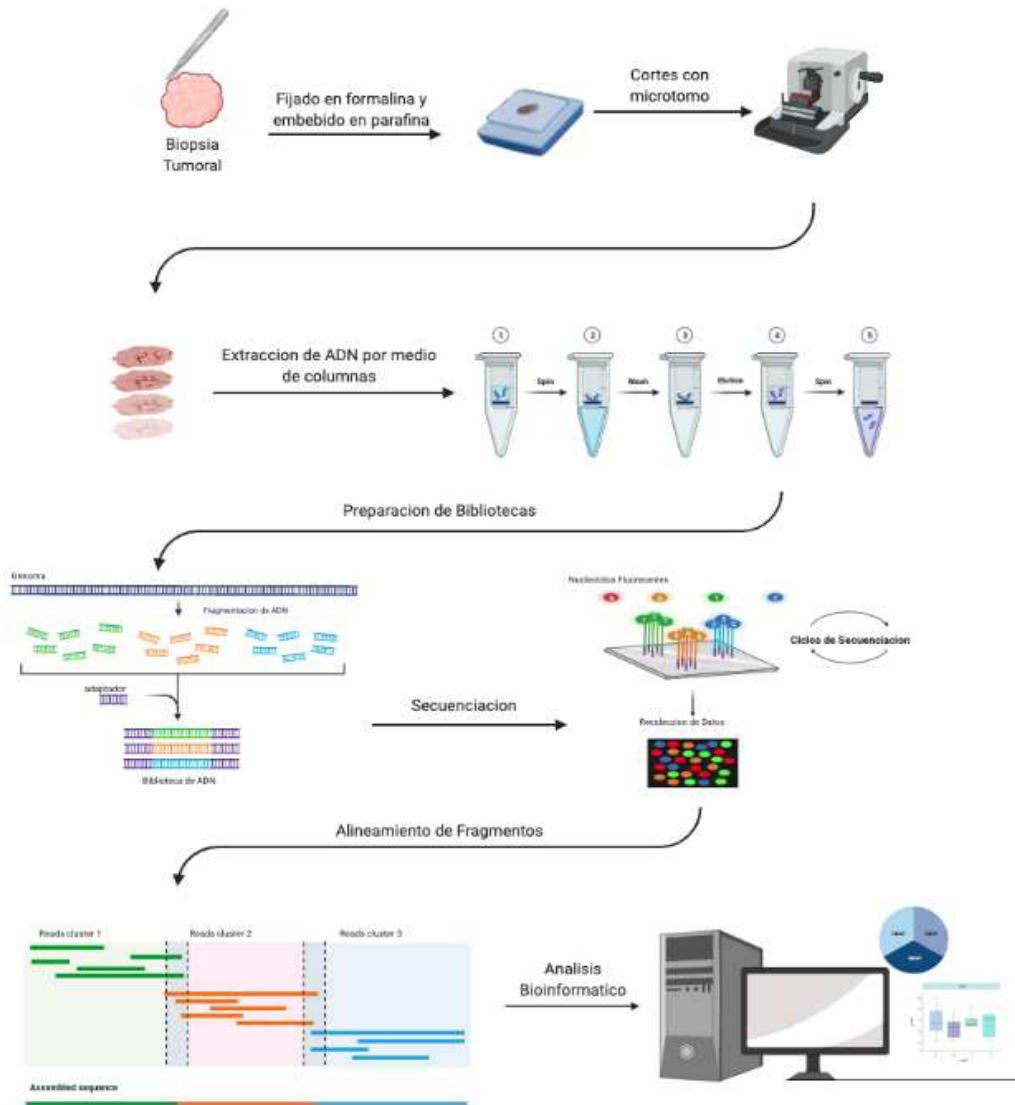
## **Sujetos y recolección de datos**

Para poder ser incluidos en el análisis, los pacientes debían cumplir simultáneamente los siguientes criterios: tener un informe histopatológico que confirmara un carcinoma colorrectal y tener un diagnóstico de enfermedad en estadio IV no resecable (no extirpable, mediante algún método quirúrgico) certificado mediante pruebas de imagen y/o resultados patológicos. Dado que el estudio era de naturaleza retrospectiva, y todos los datos de los pacientes fueron anonimizados y reportados en forma agregada, no se requirió el consentimiento específico de los pacientes y se utilizó el consentimiento informado que firman todos los pacientes de la institución cuando se admiten por primera vez. No se intentó encontrar mutaciones en sangre total debido a que sólo se disponía de tejidos FFPE.

## **Extracción del ADN**

Los procedimientos aparecen resumidos en la **Figura 5**. Brevemente, el ADN se aisló a partir de tejidos tumorales fijados en formaldehído y embebidos en parafina (FFPE), recolectados durante una colonoscopia o una resección

quirúrgica con estadio IV no resecable certificado por patólogo. Se utilizó el kit QIAamp DNA FFPE de Qiagen (QIAGEN, Hilden, Germany) con el certificado de calidad para aplicaciones de diagnóstico clínico *in vitro* (CE-IVD). El ADN se aisló de un bloque de parafina y se utilizaron de 5 a 10 secciones de 5 µm de grosor macrodisecadas para extraer ADN que contenía al menos un 30% de células tumorales. El porcentaje y la presencia de células cancerosas se confirmaron en la laminilla de hematoxilina-eosina siguiendo el protocolo estandarizado del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Oncológico Nacional y examinados mediante microscopía óptica por un patólogo experimentado en un examen morfológico. La concentración preliminar y pureza del ADN (260/280, 260/230) se evaluó utilizando el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Hong Kong, China), mediante el ratio de absorbancia 260/280 para descartar la contaminación con proteínas y el ratio de absorbancia 260/230 para descartar la existencia de restos de sales. Se acepta como ADN puro cuando ambos ratios oscilan entre 1,8 y 2,0. La concentración final se determinó con mayor precisión utilizando el kit de ensayo Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).



**Figura 5.** Esquema gráfico con resumen de procedimientos. Las muestras obtenidas en bloques de parafina se cortaron para su posterior extracción de ADN. Este ADN se utilizó para la preparación de bibliotecas, secuenciación y análisis bioinformático. Esta información es la que se utilizó finalmente para establecer el perfil genético poblacional. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

## Perfil de las mutaciones

Se realizó secuenciación de próxima generación (NGS) en los 440 tumores utilizando el kit *Cancer Hotspot Panel v2* para la plataforma Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA), que permitió un análisis dirigido de 50 genes, de los cuales para este estudio nos enfocamos en los tres genes indicados: KRAS, NRAS y BRAF. En particular, se evaluaron en cada muestra las regiones conocidas de alta frecuencia de mutaciones de los genes KRAS, NRAS y BRAF. Para el panel NGS *Cancer Hotspot Panel v2*, se prepararon bibliotecas utilizando 100 ng de ADN genómico. Las bibliotecas enriquecidas se cuantificaron utilizando el kit de ensayo Qubit dsDNA HS y se realizó un análisis de fragmento de los amplicones utilizando el High Sensitivity D1000 ScreenTape en el TapeStation 4150 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Las bibliotecas individuales con una molaridad de 2 nmol/L se agruparon y se diluyeron a una concentración de 60pM. Posteriormente 20µL de la biblioteca agrupada diluida se sometió a la generación de clústeres (racimos) en la celda del flujo iSeq. La secuenciación de extremos pareados se realizó utilizando el kit de reactivos iSeq 100 i1 v2 de 300 ciclos. El demultiplexado de los datos, la generación del archivo de secuenciación FASTQ y alineación con la secuencia de referencia humana hg19 se llevaron a cabo por el Local Run Manager (Illumina). La identificación de variantes y la anotación se realizaron con la plataforma de análisis genético Franklin (Genoox, Tel Aviv-Yafo, Israel). Se excluyeron las variantes con una puntuación de calidad inferior a Q20. Solo las variantes con una profundidad acumulada de 500 y una frecuencia de variantes

≥5%, se marcaron como “PASS” en el archivo de llamada de variantes. Las variantes se seleccionaron manualmente. Por último, se evaluó la patogenicidad de las variantes de secuencia basándose en la bibliografía y las bases de datos (COSMIC, ClinVar, OncoKB, Varsome). Las mutaciones se clasificaron como patogénicas, probablemente patogénicas, variantes de significado desconocido (VUS), probablemente benignas o benignas. Se reportaron solamente mutaciones no sinónimas, exónicas y aquellas clasificadas como VUS o de mayor significancia, según los criterios que recomiendan las Guías y Estándares de la Asociación Médica Americana de Genética y Genómica Médica para el análisis e interpretación de variantes moleculares (Li et al., 2017; Richards et al., 2015). Todas las pruebas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **Análisis estadísticos**

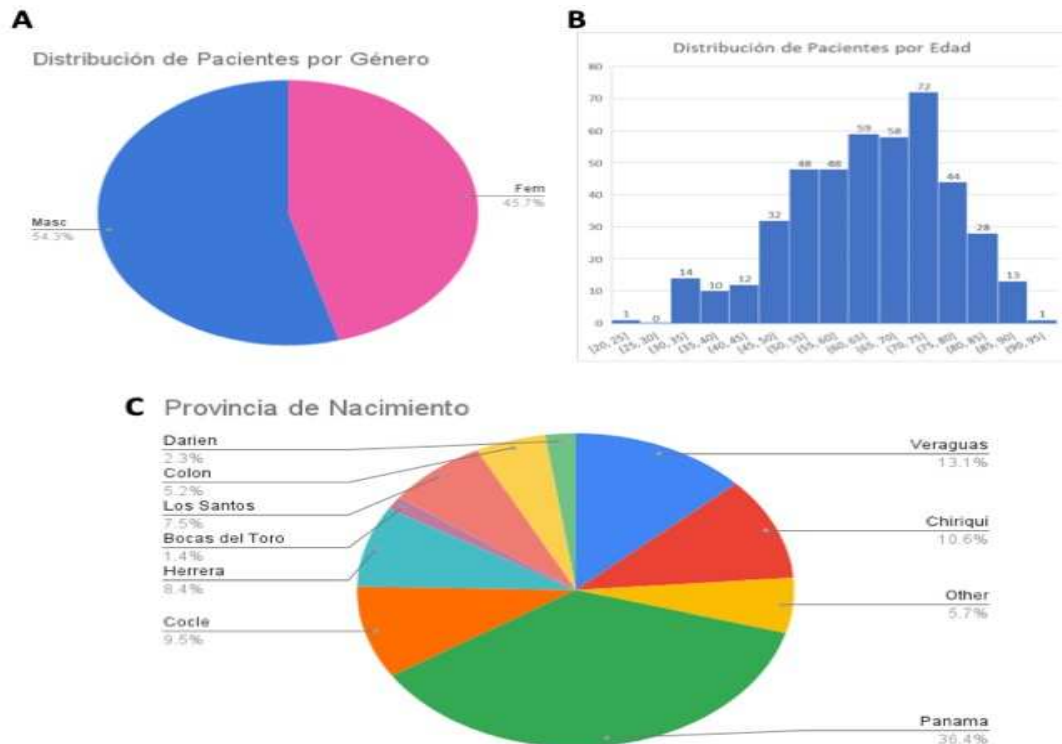
Los análisis estadísticos se realizaron con el programa R 4.4.1. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante una prueba de Chi-cuadrado y un valor de  $p \leq 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Las figuras de mapeo de mutaciones se generaron utilizando cBioPortal. El oncoplot se generó utilizando el paquete ComplexHeatmap version 2.20.0.

## **CAPÍTULO IV:**

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

En este estudio se analizaron de modo retrospectivo un total de 440 tumores de igual número de pacientes con el objetivo de describir la frecuencia y distribución de las mutaciones, así como sus correlaciones. En la cohorte de estudio, la prevalencia de pacientes masculinos fue mayor en comparación con las pacientes femeninas (54.3% frente a 45.7%). La mediana de edad del grupo de estudio fue de 65 años, con una distribución equitativa entre los grupos (48.9% frente a 51.1%), **Figura 6**.

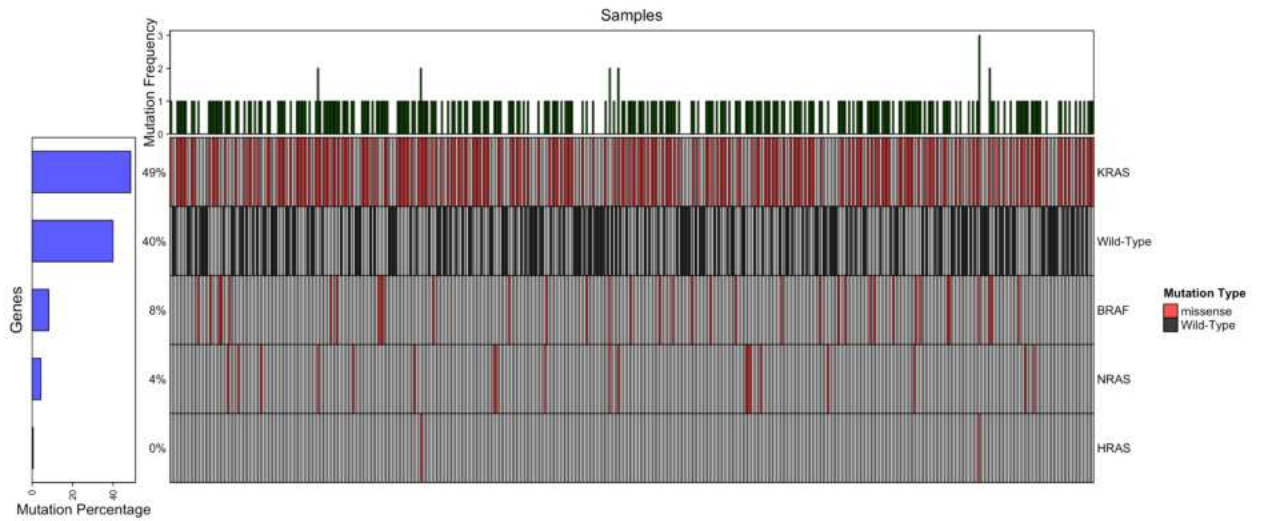


**Figura 6.** Distribución de Pacientes por Género (A), Edad (B) y Provincia de Nacimiento (C).

Entre los genes analizados, KRAS mostró la mayor frecuencia de mutaciones, seguido por BRAF y NRAS (**Figura 8**). Las mutaciones en KRAS se detectaron en el 48.7% de los casos (27.3% hombres y 21.4% mujeres, **Tabla 1**), principalmente en el exón 2 (43.2%), seguido del exón 4 (3.9%) y, por último, el exón 3 (2.0%), **Tabla 2**. El 87.8% de las mutaciones de KRAS se produjeron en el codón 12 ó 13. La sustitución más común en el gen KRAS fue p.Gly12Asp (31.3%). Las mutaciones en BRAF se identificaron en el 8.2% de los individuos, localizándose en el exón 15 (7.5%) y en el exón 11 (0.7%). El 83.3% de las mutaciones BRAF se detectaron en el codón 600, siendo Val600Glu la sustitución más común (80.6%) (**Tabla 2**). En los 6 pacientes con mutaciones en BRAF distintas de V600, se identificaron de manera única las siguientes variantes: D594G, D594N, K601N, R444Q, G469A y G469E, como se muestra en la **Tabla 2**. Estas representan mutaciones de clase 2 en 3 pacientes (8.3%), de clase 3 en 2 pacientes (5.6%), y una mutación (2.7%) no clasificada. Las mutaciones en NRAS se observaron en el 4.3% de los casos, en el exón 2 (2.5%) y el exón 3 (1.8%). El 57.9% de las mutaciones NRAS se encontraron en el codón 12 o 13. Las sustituciones más comunes fueron Gln61Lys (26.3%) y p.Gly12Asp (26.3%). Se encontraron mutaciones en el exón 3 de HRAS en 2 pacientes (0.45%) y en ambos casos, el paciente también presentaba otra mutación en uno de los genes mencionados anteriormente.

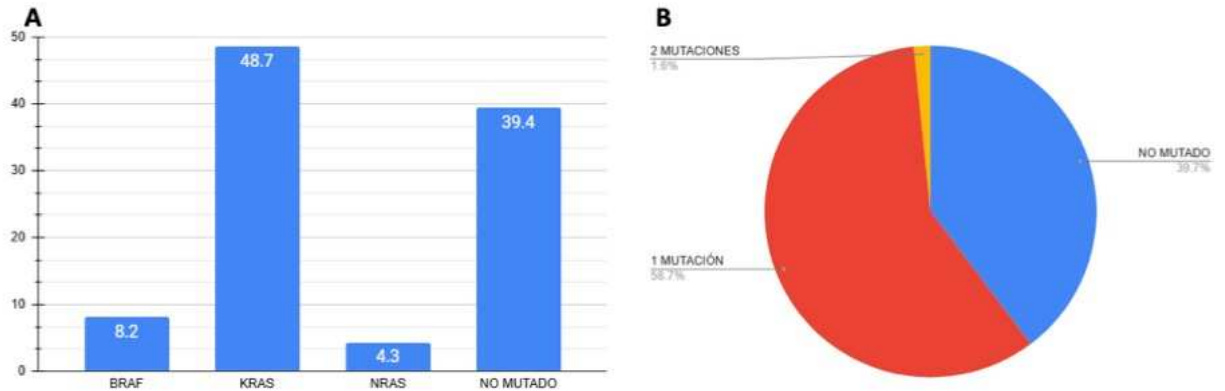
**Tabla 1.** Distribución de Mutaciones en los Genes KRAS, NRAS, y BRAF por Sexo/Edad en pacientes con CCR.<sup>1</sup> Prueba de chi-cuadrado.

Caso	Sexo		Edad	
	Masculino	Femenino	<65	≥65
440, n (%)	239 (54.3)	201 (45.7)	215 (48.9)	225 (51.1)
<b>KRAS Mutado</b>				
No, n (%)	119 (27.0)	107 (24.3)	110 (25.0)	116 (26.3)
Si, n (%)	120 (27.3)	94 (21.4)	105 (23.9)	109 (24.8)
Valor de p	0.46 <sup>1</sup>		1 <sup>1</sup>	
<b>NRAS Mutado</b>				
No, n (%)	234 (53.2)	187 (42.5)	206 (46.8)	215 (48.9)
Si, n (%)	5 (1.1)	14 (3.2)	9 (2.1)	10 (2.2)
Valor de p	<b>0.02<sup>1</sup></b>		1 <sup>1</sup>	
<b>BRAF Mutado</b>				
No, n (%)	220 (50.0)	184 (41.8)	197 (44.8)	207 (47.0)
Si, n (%)	19 (4.3)	17 (3.9)	18 (4.1)	18 (4.1)
Valor de p	1 <sup>1</sup>		1 <sup>1</sup>	
<b>No Mutado</b>				
No, n (%)	130 (29.5)	134 (30.5)	129 (29.3)	135 (30.7)
Si, n (%)	109 (24.8)	67 (15.2)	86 (19.6)	90 (20.4)
Valor de p	<b>0.01<sup>1</sup></b>		1 <sup>1</sup>	



**Figura 7.** Diagrama de cascada (oncoplot) de la distribución de las mutaciones encontradas en nuestras muestras tumorales. El gráfico superior muestra la frecuencia de mutación para cada muestra tumoral.

Entre los pacientes, el 39.4% no tenía ninguna mutación en los genes mencionados (Wild-Type), mientras que el 60.6% presentaba al menos una mutación en los mismos (**Figura 7**). De todos los pacientes, el 58.2% presentaba una única mutación, el 1.6% dos mutaciones coexistentes en el mismo gen y el 0.23% tres mutaciones concurrentes en diferentes genes. Las combinaciones de mutaciones concurrentes dobles fueron: KRAS exon 2/NRAS exón 2 en 2 casos, KRAS exón 4/BRAF exón 11 en 1 caso, NRAS exon 2/BRAF exon 15 en 1 caso, KRAS codon 12 /KRAS codon 12 en 2 casos y KRAS exón 4/HRAS exón 3 en 1 caso. Además, se observó un caso con mutaciones en tres genes: BRAF exón 11/KRAS exon 2/HRAS exón 3.



**Figura 8.** Porcentaje de pacientes según estado mutacional en genes relacionados con CRC. (A) Gráfico de barras que muestra la distribución porcentual de pacientes con mutaciones en los genes BRAF, KRAS, y NRAS, así como aquellos no mutados. (B) Gráfico de pastel que indica la proporción de pacientes según el número de mutaciones detectadas.

No se observaron asociaciones entre la edad de los pacientes con mCCR y la frecuencia de mutaciones de los genes KRAS, NRAS y BRAF (**Tabla 1**). Sin embargo, estas mutaciones se diagnosticaron con una frecuencia significativamente mayor en mujeres (66.7% de pacientes femeninos) que en hombres (54.4% de pacientes masculinos,  $p < 0,05$ ). La frecuencia de las mutaciones NRAS fue significativamente mayor en las mujeres (7.0%) que en los varones (2.1%,  $p < 0,05$ ), mientras que la frecuencia de las mutaciones KRAS y BRAF fue similar en ambos sexos ( $p = 0,14$  y  $p = 1$  respectivamente).

**Tabla 2.** Frecuencia y Distribución de Mutaciones en los Genes KRAS, NRAS, y BRAF en Pacientes con CCR. Las mutaciones BRAF se clasifican en: <sup>1</sup>Clase 1, monómeros independientes de RAS; <sup>2</sup>Clase 2, dímeros independientes de RAS; <sup>3</sup>Clase 3, mutaciones dependientes de RAS; \*Indica variante no reportada en la literatura.

Frecuencia y distribución de mutaciones			
Gen	Secuencia de referencia	Cambio de aminoácido	Mutaciones (%)
KRAS exon 2			190 (43.2)
	NM_004985.5	p.Gly12Asp	67
	NM_004985.5	p.Gly12Val	56
	NM_004985.5	p.Gly13Asp	29
	NM_004985.5	p.Gly12Cys	13
	NM_004985.5	p.Gly12Ala	11
	NM_004985.5	p.Gly12Ser	9
	NM_004985.5	p.Gly13Cys	2
	NM_004985.5	p.Gly10dup	1
	NM_004985.5	p.Gly13Arg	1
	NM_004985.5	p.Ala18Asp	1
KRAS exon 3			9 (2.0)
	NM_004985.5	p.Gln61His	5
	NM_004985.5	p.Ala59Thr	2
	NM_004985.5	p.Gln61Arg	1
	NM_004985.5	p.Gln61Leu	1

KRAS exon 4			17 (3.9)
	NM_004985.5	p.Ala146Thr	10
	NM_004985.5	p.Ala146Val	4
	NM_004985.5	p.Ala146Pro	2
	NM_004985.5	p.Lys117Arg	1
NRAS exon 2			11 (2.5)
	NM_002524.5	p.Gly12Asp	5
	NM_002524.5	p.Gly13Arg	2
	NM_002524.5	p.Gly12Ala	2
	NM_002524.5	p.Gly12Val	1
	NM_002524.5	p.Gly13Asp	1
NRAS exon 3			8 (1.8)
	NM_002524.5	p.Gln61Lys	5
	NM_002524.5	p.Gln61Arg	2
	NM_002524.5	p.Gln61His	1
BRAF exon 15			33 (7.5)
	NM_004333.6	p.Val600Glu <sup>1</sup>	29
	NM_004333.6	p.Val600Arg <sup>1</sup>	1
	NM_004333.6	p.Asp594Asn <sup>3</sup>	1
	NM_004333.6	p.Asp594Gly <sup>3</sup>	1
	NM_004333.6	p.Lys601Asn <sup>2</sup>	1
BRAF exon 11			3 (0.7)

	NM_004333.6	p.Arg444Gln*	1
	NM_004333.6	p.Gly469Ala <sup>2</sup>	1
	NM_004333.6	p.Gly469Glu <sup>2</sup>	1
HRAS exon 3			2 (0.4)
	NM_005343.4	p.Thr50Met	1
	NM_005343.4	p.Arg73His	1

Asimismo, se investigaron las asociaciones entre estos genes en pacientes nacidos en la ciudad de Panamá (**Tabla 3**). Se encontró que, además de mantenerse la diferencia significativa entre mujeres (72.7%) y hombres (52.4%,  $p < 0.05$ ) con al menos una mutación, también se detectó una diferencia significativa en la frecuencia de mutaciones en el gen KRAS, siendo mayor en mujeres (59.7%) que en hombres (44.0%,  $p = 0.05$ ) (**Tabla 3**). En esta población no se detectó diferencia entre las edades ni en los genes NRAS y BRAF.

**Tabla 3.** Distribución de Mutaciones en los Genes KRAS, NRAS, y BRAF por Sexo/Edad en Pacientes con CCR nacidos en la provincia de Panamá.<sup>1</sup> Prueba de chi-cuadrado.

Caso	Sexo		Edad	
	Masculino	Femenino	<65	≥65
161, n (%)	84 (52.2)	77 (47.8)	88 (54.7)	73 (45.3)
<b>KRAS Mutado</b>				
No, n (%)	47 (29.2)	31 (19.2)	42 (26.1)	36 (22.3)
Si, n (%)	37 (23.0)	46 (28.6)	46 (28.6)	37 (23.0)

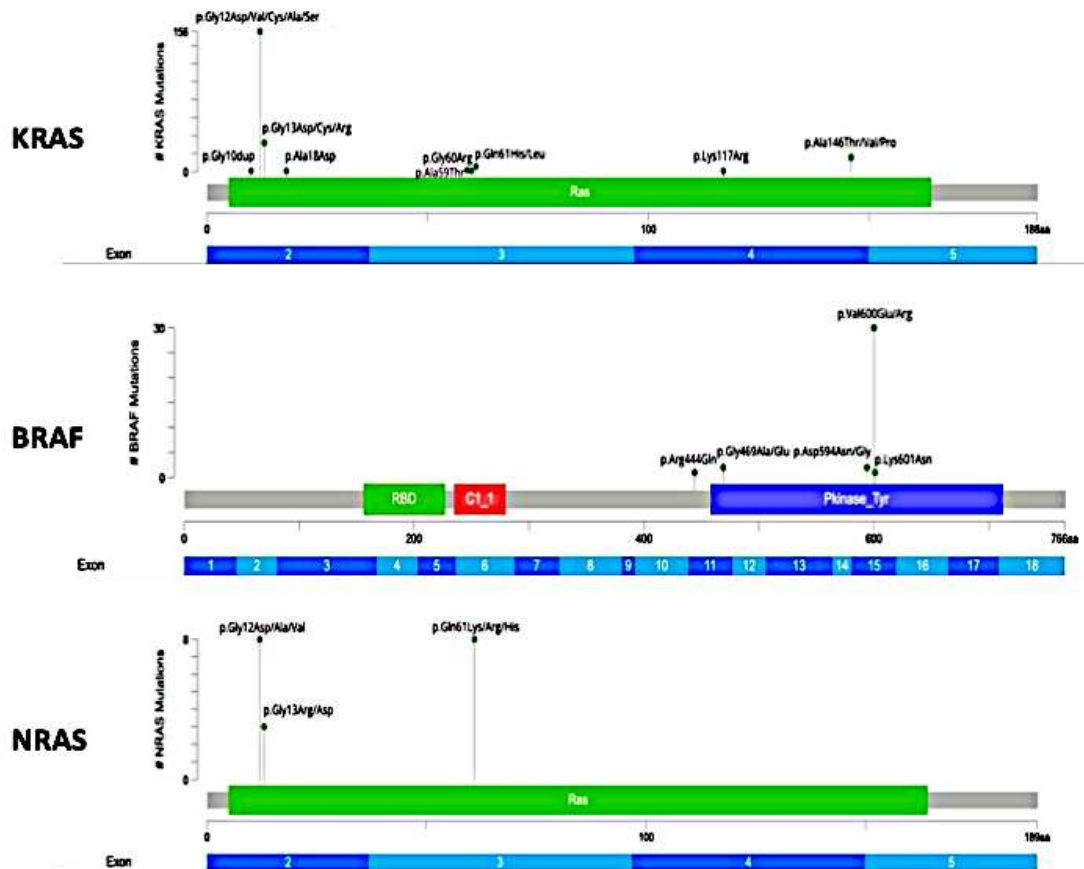
Valor de p	<b>0.05<sup>1</sup></b>			1 <sup>1</sup>
<b>NRAS Mutado</b>				
No, n (%)	82 (50.9)	70 (43.5)	84 (52.2)	68 (42.2)
Si, n (%)	2 (1.3)	7 (4.3)	4 (2.5)	5 (3.1)
Valor de p	0.1 <sup>1</sup>		0.75 <sup>1</sup>	
<b>BRAF Mutado</b>				
No, n (%)	78 (48.5)	72 (44.7)	82 (51.0)	68 (42.2)
Si, n (%)	6 (3.7)	5 (3.1)	6 (3.7)	5 (3.1)
Valor de p	1 <sup>1</sup>		1 <sup>1</sup>	
<b>No Mutado</b>				
No, n (%)	44 (27.3)	56 (34.8)	54 (33.5)	46 (28.5)
Si, n (%)	40 (24.9)	21 (13.0)	34 (21.2)	27 (16.8)
Valor de p	<b>0.03<sup>1</sup></b>			1 <sup>1</sup>

Se llevaron a cabo análisis para evaluar la asociación entre las mutaciones en los pacientes (**Tabla 4**). Los resultados revelaron que los pacientes con mutación en KRAS presentan una frecuencia significativamente menor de mutaciones en NRAS (0.4% frente a 48.2%,  $p < 0.01$ ) y en BRAF (0.4% frente a 48.2%,  $p < 0.001$ ). Esta relación se mantiene al examinar los datos correspondientes a muestras que contienen mutaciones en el exón 2 de KRAS, observándose para NRAS una frecuencia de mutación del 0.4% frente al 3.9% ( $p < 0.01$ ) y para BRAF del 0.2% frente al 8.0% ( $p < 0.001$ ).

**Tabla 4.** Asociación entre mutaciones en KRAS, NRAS, y BRAF en pacientes con CCR. Frecuencia y distribución de mutaciones en KRAS, NRAS y BRAF, incluyendo análisis detallado de las mutaciones en el exón 2 de KRAS. <sup>1</sup> Prueba de chi-cuadrado.

	KRAS Mutado			KRAS Exon 2 Mutado			NRAS Mutado			BRAF Mutado			
	Caso 440, (n%)	No, (n%)	Si, (n%)	Valor de p	No, (n%)	Si, (n%)	Valor de p	No, (n%)	Si, (n%)	Valor de p	No, (n%)	Si, (n%)	Valor de p
<b>KRAS Mutado</b>													
No, (n%)	226 (51.4)							209 (47.5)	17 (3.9)	<b>0.001<sup>1</sup></b>	192 (43.6)	34 (7.8)	<b>&lt;0.00 01<sup>1</sup></b>
Si, (n%)	214 (48.6)						212 (48.2)	2 (0.4)	212 (48.2)		2 (0.4)		
<b>KRAS Exon 2 Mutado</b>													
No, (n%)	252 (57.3)							235 (53.4)	17 (3.9)	<b>0.007<sup>1</sup></b>	217 (49.3)	35 (8.0)	<b>&lt;0.00 01<sup>1</sup></b>
Si, (n%)	188 (42.7)						186 (42.3)	2 (0.4)	187 (42.5)		1 (0.2)		
<b>NRAS Mutado</b>													
No, (n%)	421 (95.7)	209 (47.5)	212 (48.2)	<b>0.001<sup>1</sup></b>	235 (53.4)	186 (42.3)	<b>0.007<sup>1</sup></b>				386 (87.7)	35 (8.0)	<b>1<sup>1</sup></b>
Si, (n%)	19 (4.3)	17 (3.9)	2 (0.4)		17 (3.9)	2 (0.4)					18 (4.1)	1 (0.2)	
<b>BRAF Mutado</b>													
No, (n%)	404	192	212	<b>&lt;0.00</b>	217	187	<b>&lt;0.00</b>	386	18	<b>1<sup>1</sup></b>			

	(91.8)	(43.6)	(48.2)	01 <sup>1</sup>	(49.3)	(42.5)	01 <sup>1</sup>	(87.7)	(4.1)			
Si, (n%)	36 (8.2)	34 (7.8)	2 (0.4)		35 (8.0)	1 (0.2)		35 (8.0)	1 (0.2)			



**Figura 9.** Gráfico “lollipop” generado por la herramienta MutationMapper de cBioPortal. El gráfico identifica los diferentes dominios en cada proteína respectiva. Se muestra la naturaleza de las mutaciones y su posición. El número de veces que se ha detectado cada mutación se muestra con la escala de la izquierda y está representado por la altura del punto.

El análisis de la distribución de mutaciones en los genes BRAF, KRAS y NRAS (Figura 8) revela patrones consistentes con los principales sitios de activación

conocidos en cáncer colorrectal metastásico. En BRAF, la mutación más destacada corresponde a p.Val600Glu/Arg, localizada en el dominio quinasa (Pkinase\_Tyr), con una frecuencia claramente superior al resto de variantes detectadas, en concordancia con la predominancia clínica de la mutación V600E en esta neoplasia. En KRAS, la mayoría de las mutaciones se concentran en el dominio de unión a GTP (Ras), particularmente en los codones 12 y 13 (p.Gly12Asp/Val/Cys/Ala/Ser y p.Gly13Asp/Cys/Arg), que representan puntos críticos para la activación oncogénica. También se identificaron mutaciones en los codones 61 y 146, aunque con menor frecuencia, en línea con reportes que las vinculan con resistencia a terapias anti-EGFR. En el caso de NRAS, el patrón de mutaciones también se agrupa en los codones 12, 13 y 61, siendo p.Gln61Lys/Arg/His la alteración más recurrente observada.

**CAPÍTULO V:**  
**DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

En este estudio retrospectivo, se evaluaron las frecuencias de mutaciones en los genes RAS y BRAF en una cohorte de 440 tumores de pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCCR). Los bloques de tejido o muestras quirúrgicas fueron procesados en el Instituto Oncológico Nacional entre diciembre de 2021 y julio de 2024. Los resultados arrojaron algunas similitudes y divergencias con los reportados previamente en otras poblaciones del mundo.

**Las mutaciones en KRAS son las más prevalentes y son altamente consistentes con las reportadas previamente.**

Se observó una elevada frecuencia de mutaciones en KRAS (48.6%), ligeramente superior a la reportada en los datos de “The Cancer Genome Atlas Program (TCGA)” (40%) y a la de otras poblaciones internacionales (Afrăsânie et al., 2023; Levin-Sparenberg et al., 2020), incluyendo estudios regionales como el de Ecuador (Freire et al., 2023), que reportaron una frecuencia del 40.2%. A nivel nacional, investigaciones previas señalaron una prevalencia menor (36.7%) (Adames Crespo, 2017). Estas diferencias, aunque relativamente ligeras podrían atribuirse, en parte, al uso de tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) en nuestro estudio, que permite una detección más sensible y abarca regiones génicas que no fueron exploradas en estudios anteriores.

Adicionalmente, dichas variaciones podrían estar relacionadas con el mayor tamaño de la cohorte analizada (440 muestras) en comparación con las cohortes previamente reportadas (alrededor de 100 muestras), lo que incrementa la potencia estadística y la probabilidad de detectar alteraciones genéticas de baja frecuencia.

En consonancia con análisis globales que abarcaron 77,104 casos de mCCR de más de 34 países, encontramos que las mutaciones en KRAS se concentran mayoritariamente en el exón 2 (39.1% globalmente frente al 42.7% en nuestra serie), mientras que las mutaciones en los exones 3 y 4 fueron menos frecuentes (Levin-Sparenberg et al., 2020). Las variantes p.Gly12Asp (15.2%) y p.Gly12Val (12.7%) fueron las más comunes en nuestra cohorte, superando ligeramente las tasas internacionales (14.6% y 10.2%, respectivamente). Las prevalencias de otras variantes como p.Gly12Cys, p.Gly12Ala y p.Gly12Ser fueron consistentes con los datos mundiales, reflejando un patrón mutacional similar.

### **El sexo de los pacientes es un factor significativo en la variabilidad de mutaciones de tumores de mCCR.**

Se identificaron diferencias significativas en NRAS, con 3.2% en mujeres frente a 1.1% en hombres ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, al analizar los tumores que no presentan mutaciones, la proporción fue mayor en hombres (24.8%) que en

mujeres (15.2%,  $p < 0.05$ ). Al analizar específicamente las asociaciones entre estos genes en pacientes nacidos en la provincia de Panamá, se mantuvo la diferencia significativa en la proporción de mujeres (27.3%) y hombres (47.6%) con al menos una mutación ( $p < 0.05$ ), y se observó una mayor frecuencia de mutaciones en KRAS en mujeres (59.7%) frente a hombres (44.0%) ( $p = 0.05$ ). No se detectaron diferencias significativas en NRAS, BRAF ni en la edad, indicando que estas variables no contribuyen de manera relevante a la variabilidad observada en esta población. Este hallazgo es consistente con la literatura, en la que se ha descrito una asociación significativa entre el sexo femenino y una mayor frecuencia de mutaciones en genes asociados a la vía RAS-RAF en cáncer colorrectal metastásico (Booker et al., 2024). La tendencia observada en la provincia de Panamá mantiene la asociación femenina para KRAS, pero con menores diferencias en NRAS y no mutado, sugiriendo que factores poblacionales locales podrían modular la frecuencia y distribución de estas mutaciones. Futuros estudios deberían explorar los determinantes subyacentes a estas diferencias.

**El gen BRAF presenta frecuencia en V600E menor a la reportada en otras poblaciones.**

Respecto a BRAF, identificamos mutaciones en el 8.2% de los casos, dentro del rango esperado (4–10%) según la literatura (Johnson et al., 2020). Sin embargo, la frecuencia de la mutación p.Val600Glu (V600E) fue del 80.6%, algo inferior a la proporción clásica del 90–95% (Johnson et al., 2020). Esta discrepancia

podría deberse a diferencias poblacionales o a las características específicas de la metodología de secuenciación utilizada. A pesar de la incertidumbre estadística asociada al tamaño relativamente reducido de los subgrupos, nuestra prevalencia general de BRAF V600E es consistente con la de grandes series hospitalarias reportadas previamente (1.6–2.2%) (Jones et al., 2017; Cremolini et al., 2015). Asimismo, se detectaron mutaciones distintas V600E en un pequeño porcentaje de pacientes, un hallazgo de especial interés dado que estos subtipos atípicos pueden presentar características biológicas y respuestas terapéuticas distintas. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de mutaciones BRAF en una población panameña, aportando nueva información sobre el perfil molecular local de mCCR.

Un aspecto relevante de nuestro estudio fue la identificación de casos con mutaciones concurrentes en KRAS/BRAF (2 casos) y en NRAS/BRAF (1 caso), representando el 0.68% de la cohorte. La coexistencia de estas mutaciones es inusualmente rara debido a su acción redundante en la vía de señalización MAPK (Levin-Sparenberg et al., 2020). Estudios recientes que integran grandes bases de datos sugieren una frecuencia de doble mutación de aproximadamente 1.2% (Uchida et al., 2022), mucho mayor de lo previamente estimado, lo cual destaca el valor de utilizar tecnologías de secuenciación más amplias para detectar combinaciones raras.

No obstante, nuestro estudio presenta ciertas limitaciones. El uso de muestras FFPE implica riesgos inherentes a la degradación del ADN y a la aparición de

artefactos de fijación. Aunque se aplicaron protocolos de calidad y plataformas NGS optimizadas para FFPE, no puede descartarse la posibilidad de pérdida de sensibilidad en variantes de baja frecuencia o la generación de falsos positivos. Asimismo, no se realizaron validaciones ortogonales de todas las variantes poco frecuentes mediante métodos independientes, lo cual constituye una limitación técnica reconocida. Si bien el tamaño total de la muestra fue considerable para el contexto regional, la baja frecuencia de algunas variantes limitó el poder estadístico para análisis más finos de asociación clínica. Además, el enfoque en solo tres genes diana dejó fuera otras alteraciones moleculares relevantes en CCR, que también poseen impacto pronóstico y terapéutico.

**Los datos generados son un referente de perfiles clínicos útil para los pacientes del país.**

A pesar de estas limitaciones, nuestros resultados establecen una base sólida para futuras investigaciones y refuerzan la importancia de integrar la genotipificación molecular en la práctica clínica de Panamá. La caracterización de las mutaciones KRAS, NRAS y BRAF no solo orienta el uso racional de terapias dirigidas, sino que también ofrece una ventana hacia estrategias terapéuticas emergentes en la oncología de precisión. Sobre la base de estos hallazgos, consideramos prioritario expandir los estudios hacia un panel molecular más amplio que incluya otros genes con relevancia biológica y clínica en cáncer colorrectal, como APC, ATM, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, PTEN

y SMAD4, cuya alteración puede impactar el pronóstico, la progresión tumoral o la respuesta a terapias específicas. Además, será esencial correlacionar las alteraciones genéticas con características clínicas relevantes de los pacientes, tales como la edad de diagnóstico, la localización del tumor, el patrón de metástasis, la respuesta a los distintos esquemas terapéuticos y la supervivencia global. Estas líneas futuras de investigación permitirán construir perfiles moleculares y clínicos integrados, mejorando la estratificación de riesgos y facilitando la implementación de estrategias de medicina personalizada en el manejo del cáncer colorrectal en Panamá.

**CAPÍTULO VI:**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

Este estudio representa un aporte fundamental al conocimiento molecular del cáncer colorrectal metastásico en Panamá, al ofrecer el primer análisis exhaustivo de las mutaciones en los genes RAS y BRAF en una cohorte de pacientes locales. Al establecer las frecuencias de alteraciones genéticas más relevantes, se proporciona una referencia indispensable tanto para la investigación biomédica como para la evolución hacia una práctica clínica más personalizada.

Los resultados obtenidos confirman la diversidad molecular que caracteriza al cáncer colorrectal y evidencian la necesidad de incorporar la genotipificación sistemática en el proceso diagnóstico y terapéutico. La identificación de patrones mutacionales prevalentes y combinaciones infrecuentes refuerza la importancia de adecuar las estrategias de tratamiento a las particularidades biológicas de cada tumor, especialmente en poblaciones latinoamericanas donde las variaciones genéticas pueden diferir de las observadas en otras regiones.

Este trabajo también sienta las bases para expandir la investigación hacia subtipos moleculares menos estudiados, integrando el análisis de otros genes relevantes como SMAD4, PIK3CA, y futuros paneles ampliados, así como correlacionando las alteraciones genéticas con factores clínicos y epidemiológicos específicos de nuestra población. En conjunto, estos hallazgos impulsan la necesidad de consolidar un enfoque de medicina de precisión en el

tratamiento del cáncer colorrectal en Panamá, abriendo nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas que respondan a las necesidades reales de nuestros pacientes.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios multicéntricos que incluyan un mayor número de pacientes panameños y latinoamericanos con el fin de confirmar y ampliar los hallazgos obtenidos en este estudio, lo que permitirá un análisis más detallado de las correlaciones clínico-patológicas y las alteraciones moleculares asociadas al mCCR. Además, es crucial continuar investigando la presencia de mutaciones menos comunes en genes clave como SMAD4 y PIK3CA, y evaluar su impacto en la resistencia a terapias dirigidas, con el objetivo de optimizar las estrategias terapéuticas y mejorar las tasas de respuesta. También es esencial que los profesionales clínicos adopten un enfoque integral que no solo considere las mutaciones tradicionales en RAS y BRAF, sino también otras alteraciones moleculares que afectan la respuesta al tratamiento. La integración de análisis genómicos avanzados, como la secuenciación de próxima generación (NGS), en la práctica clínica será clave para ofrecer terapias personalizadas que mejoren los resultados en pacientes con mCCR. Además, es fundamental profundizar en la investigación sobre la heterogeneidad genética observada en las poblaciones latinoamericanas, lo que ayudará a comprender mejor la interacción entre factores genéticos y ambientales en el desarrollo y progresión del cáncer colorrectal. Finalmente, se debe priorizar el desarrollo de herramientas predictivas moleculares positivas que permitan identificar a los pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de terapias dirigidas, optimizando el uso de tratamientos oncológicos y mejorando así los resultados clínicos. Estas acciones

son indispensables para avanzar hacia una medicina de precisión en el tratamiento del mCCR.

## REFERENCIAS

- Adames Crespo, A. R. (2017). Identificación de variantes del gen KRAS asociadas a cáncer colorrectal en la población panameña (Doctoral dissertation, Universidad de Panamá).
- Afrăsânie, V. A., Marinca, M. V., Gafton, B., Alexa-Stratulat, T., Rusu, A., Froicu, E. M., ... & Rusu, C. (2023). Clinical, pathological and molecular insights on KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and TP53 mutations in metastatic colorectal cancer patients from Northeastern Romania. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12679.
- Allegra, C. J., Rumble, R. B., Hamilton, S. R., & Haller, D. G. (2016). Extended RAS gene mutation testing in metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion update 2015. *Journal of Clinical Oncology*, 34(2), 179–185.
- American Cancer Society. (2023). *Colorectal cancer stages*. Recuperado de <https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
- Artale, S., Sartore-Bianchi, A., Nagtegaal, I. D., & Marsoni, S. (2008). KRAS and BRAF testing of primary and corresponding metastatic sites in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(25), 2658–2664.
- Bedard, P. L., Hyman, D. M., Davids, M. S., & Siu, L. L. (2020). Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. *The Lancet*, 395(10229), 1078-1088.
- Benson, A. B., Venook, A. P., Adam, M., Chang, G., Chen, Y. J., Ciombor, K. K., ... & Jones, F. (2024). Colon Cancer, Version 3.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 22(2D).
- Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Makhson, A., Hartmann, J. T., Aparicio, J., De Braud, F., & Koralewski, P. (2009, February). Fluorouracil leucovorin and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *American Society of Clinical Oncology*.
- Booker, B. D., Markt, S. C., Schumacher, F. R., Rose, J., Cooper, G., Selfridge, J. E., & Koroukian, S. M. (2024). Variation in KRAS/NRAS/BRAF-mutation status by age,

- sex, and race/ethnicity among a large cohort of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 55(1), 237-246.
- Cancer Center. (2024). *Metastatic colorectal cancer*. Recuperado de <https://www.cancercenter.com/cancer-types/colorectal-cancer/types/metastatic-colorectal-cancer>
- Cancer Center. (2024). *Metastatic colorectal cancer*. Recuperado de <https://www.cancercenter.com/cancer-types/colorectal-cancer/types/metastatic-colorectal-cancer>
- Cancer Research UK. (2023). *Staging of bowel cancer*. Recuperado de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/bowel-cancer/stages-types-and-grades/TNM-staging>
- Cañellas-Socias, A., Sancho, E., & Batlle, E. (2024). Mechanisms of metastatic colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 1-17.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2023). *Colorectal cancer screening*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/colorectal-cancer/screening/>
- Colorectal Cancer Alliance. (n.d.). *Stages of colorectal cancer*. Recuperado de <https://colorectalcaner.org/basics/stages-colorectal-cancer>
- Cremolini, Chiara, et al. "BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis." *Annals of oncology* 26.10 (2015): 2092-2097.
- Degirmenci, U., Wang, M., & Hu, J. (2020). Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy. *Cells*, 9(1), 198.
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*, 394(10207), 1467–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D., et al. (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 Oncology*, 11(8), 753–762.
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., & Bardelli, A. (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer.

- Dos Santos, W., Sobanski, T., De Carvalho, A. C., Evangelista, A. F., Matsushita, M., Berardinelli, G. N., ... & Guimarães, D. P. (2019). Mutation profiling of cancer drivers in Brazilian colorectal cancer. *Scientific reports*, 9(1), 13687.
- Drosten, M., & Barbacid, M. (2020). Targeting the MAPK pathway in KRAS-driven tumors. *Cancer cell*, 37(4), 543-550.
- Etienne-Grimaldi, M. C., Formento, J. L., Francoual, M., François, E., Formento, P., Renée, N., ... & Milano, G. (2008). K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clinical Cancer Research*, 14(15), 4830-4835.
- Freire, M. Á. F., Salazar, G. I. G., Mushtaq, A. W., Freire, A. F., Vallejos, E. P., Vega, V. Z., ... & Iza, L. G. (2023). Molecular Markers and Survival Outcomes in Patients with Metastatic Colorectal Cancer at the Hospital de Especialidades Eugenio Espejo. *Cancer Screening and Prevention*, 2(3), 154-161.
- Huang, W. Y., Alvarez, S., Kondo, Y., Lee, Y. K., Chung, J. K., Lam, H. Y. M., ... & Groves, J. T. (2019). A molecular assembly phase transition and kinetic proofreading modulate Ras activation by SOS. *Science*, 363(6431), 1098-1103.
- Ikenoue, T., Hikiba, Y., Kanai, F., et al. (2003). Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors. *Cancer Research*, 63(21), 8132–8137.
- Innocenti, F., Mu, W., Qu, X., Ou, F. S., Kabbarah, O., Blanke, C. D., ... & Rashid, N. U. (2024). DNA mutational profiling in patients with colorectal cancer treated with standard of care reveals differences in outcome and racial distribution of mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 42(4), 399-409.
- Instituto Oncológico Nacional. (2022). *Boletín del Registro Hospitalario de Cáncer 2022*. Panamá.
- International Agency for Research on Cancer. (2022). *Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN*. Recuperado de <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/8-colon-fact-sheet.pdf>
- Johnson, Benny, and Scott Kopetz. "Applying precision to the management of BRAF-mutant metastatic colorectal cancer." *Targeted oncology* 15.5 (2020): 567-577.
- Joint Research Centre. (2018). *JRC and WHO scientists release indicators of the burden of cancer in Europe*. Recuperado de

[https://joint-research-centre.ec.europa.eu/jrc-news-and-updates/jrc-and-who-scientists-release-indicators-burden-cancer-europe-2018-12-14\\_en](https://joint-research-centre.ec.europa.eu/jrc-news-and-updates/jrc-and-who-scientists-release-indicators-burden-cancer-europe-2018-12-14_en)

Joint Research Centre. (2021). *Colorectal cancer: Top 3 most diagnosed and fatal cancers for both EU men and women*. Recuperado de

[https://joint-research-centre.ec.europa.eu/jrc-news-and-updates/colorectal-cancer-top-3-most-diagnosed-and-fatal-cancers-both-eu-men-and-women-2021-03-15\\_en](https://joint-research-centre.ec.europa.eu/jrc-news-and-updates/colorectal-cancer-top-3-most-diagnosed-and-fatal-cancers-both-eu-men-and-women-2021-03-15_en)

Jones, Jeremy C., et al. "Non-V600 BRAF mutations define a clinically distinct molecular subtype of metastatic colorectal cancer." *Journal of Clinical Oncology* 35.23 (2017): 2624-2630.

Khan, A. Q., Kuttikrishnan, S., Siveen, K. S., Prabhu, K. S., Shanmugakonar, M., Al-Naemi, H. A., ... & Uddin, S. (2019, February). RAS-mediated oncogenic signaling pathways in human malignancies. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 54, pp. 1-13). Academic Press.

Knijn, N., Mekenkamp, L. J. M., Klomp, M., Vink-Börger, M. E., Tol, J., Teerenstra, S., ... & Nagtegaal, I. D. (2011). KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *British journal of cancer*, 104(6), 1020-1026.

Lee, W. S., Yun, S. H., Chun, H. K., & Kim, M. J. (2007). Pulmonary resection for metastases from colorectal cancer: Prognostic factors and survival. *International Journal of Colorectal Disease*, 22(6), 699–704.

Levin-Sparenberg, E., Bylsma, L. C., Lowe, K., Sangare, L., Fryzek, J. P., & Alexander, D. D. (2020). A systematic literature review and meta-analysis describing the prevalence of KRAS, NRAS, and BRAF gene mutations in metastatic colorectal cancer. *Gastroenterology research*, 13(5), 184.

Maik-Rachline, G., Hacoheh-Lev-Ran, A., & Seger, R. (2019). Nuclear ERK: mechanism of translocation, substrates, and role in cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1194.

Martianov, A. S., Mitiushkina, N. V., Ershova, A. N., Martynenko, D. E., Bubnov, M. G., Amankwah, P., ... & Imyanitov, E. N. (2023). KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and MSI status in a large consecutive series of colorectal carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4868.

- Mayo Clinic. (2023). *Colon cancer*. Recuperado de <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/syc-20353603>
- Osterlund, E., Ristimäki, A., Mäkinen, M. J., Kytölä, S., Kononen, J., Pfeiffer, P., ... & Osterlund, P. (2024). Atypical (non-V600E) BRAF mutations in metastatic colorectal cancer in population and real-world cohorts. *International Journal of Cancer*, 154(3), 488-503.
- Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A., & Shokat, K. M. (2013). K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, 503(7477), 548-551.
- Parikh, A. R., Leshchiner, I., Elagina, L., & Mandelker, D. (2019). Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nature Medicine*, 25(10), 1415–1421.
- Prior, I. A., Hood, F. E., & Hartley, J. L. (2020). The frequency of Ras mutations in cancer. *Cancer research*, 80(14), 2969-2974.
- Safae Ardekani, G., Jafarnejad, S. M., Tan, L., et al. (2012). The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 7(3), e47054.
- Sanchez-Ibarra, H. E., Jiang, X., Gallegos-Gonzalez, E. Y., Cavazos-Gonzalez, A. C., Chen, Y., Morcos, F., & Barrera-Saldana, H. A. (2020). KRAS, NRAS, and BRAF mutation prevalence, clinicopathological association, and their application in a predictive model in Mexican patients with metastatic colorectal cancer: A retrospective cohort study. *PloS one*, 15(7), e0235490.
- Sepulveda, A. R., Hamilton, S. R., Allegra, C. J., & Alese, O. B. (2017). Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Journal of Molecular Diagnostics*, 19(2), 187–225.
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*, 170(1), 17-33.
- Song, Y., Bi, Z., Liu, Y., Qin, F., Wei, Y., & Wei, X. (2023). Targeting RAS–RAF–MEK–ERK signaling pathway in human cancer: current status in clinical trials. *Genes & diseases*, 10(1), 76-88.

- Sorich, M. J., Wiese, M. D., Rowland, A., Kichenadasse, G., McKinnon, R. A., & Karapetis, C. S. (2015). Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Annals of Oncology*, 26(1), 13-21.
- Tkacik, E., Li, K., Gonzalez-Del Pino, G., Ha, B. H., Vinals, J., Park, E., ... & Eck, M. J. (2023). Structure and RAF family kinase isoform selectivity of type II RAF inhibitors tovorafenib and naporafenib. *Journal of Biological Chemistry*, 299(5).
- Uchida, S., Kojima, T., & Sugino, T. (2022). Frequency and Clinicopathological Characteristics of Patients With KRAS/BRAF Double-Mutant Colorectal Cancer: An In Silico Study. *Pathology and Oncology Research*, 28, 1610206.
- Van Cutsem, E., Nordlinger, B., Adam, R., & Gruenberger, T. (2006). Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *European Journal of Cancer*, 42(14), 2212–2221.
- Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116(6), 855–867.
- World Health Organization. (2021). *Cancer*. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Yaeger, R., Kotani, D., Mondaca, S., Parikh, A. R., Bando, H., Van Seventer, E. E., ... & Ebi, H. (2019). Response to anti-EGFR therapy in patients with BRAF non-V600–mutant metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 25(23), 7089-7097.
- Yoo, P. S., Lopez-Soler, R. I., Longo, W. E., & Fong, Y. (2006). Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab. *Clinical Colorectal Cancer*, 6(3), 202–207.