



Facultat de Biociències
Departament de Genètica i Microbiologia
Unitat de Genètica

Significació pronòstica de l'estatus mutacional del gen *K-RAS* en càncer de còlon. Estudi retrospectiu.

Memòria presentada per M.Lluïsa Surrallés Calonge en el marc del programa de tercer cicle de Genètica de la Universitat Autònoma de Barcelona per optar al grau de Doctor en Genètica per la Universitat Autònoma de Barcelona

Director

Tutor

Autor

Dr Antonio Salas Caudevilla

Dr Jordi Surrallés Calonge

M.Lluïsa Surrallés Calonge

Cap de Servei d'Anatomia
Patològica
Hospital Universitari Mútua
Terrassa

Catedràtic de Genètica
Universitat Autònoma de
Barcelona

Als meus pares

i

als meus fills

Agraïments

No sé si sabré expressar en poques paraules el que m'agradaria dir a totes les persones que m'heu ajudat, encoratjat, aconsellat i aguantat tot aquest temps que ha durat l'elaboració d'aquesta tesi. Han estat uns anys on els moments de defalliment no m'han faltat, i sé que sense el vostre suport no ho hauria aconseguit.

En primer lloc voldria agrair al Dr. Antonio Salas Caudevilla haver acceptat la direcció d'aquesta tesi. Els seus coneixements, ajut, consells, els ànims, la paciència que ha tingut i la predisposició constant han estat la força motora d'aquest treball. L'Antonio és, a més a més, el meu cap des de fa bastants anys: només puc dir que ha estat un honor per mi poder treballar sota la seva direcció.

També voldria agrair al Dr. Jordi Surrallés Calonge que acceptés la tutoria d'aquesta tesi. L'entusiasme i passió que posa en la seva feina és, des de sempre, admirable. Òbviament amb el Jordi compartim moltes coses, entre elles uns quants al·lèls, i el seu suport al llarg de tota la meua vida ha estat constant, incondicional i inalterable.

També vull fer extensiu el meu agraïment a tota una sèrie de companys i amics que m'han ajudat:

Al Dr. Salvador Quintana l'ajut en la realització de la part estadística d'aquest treball; sóc conscient que he estat una alumne difícil, però ha estat un mestre excel·lent, amb paciència, predisposició i encoratjament constant.

A la Dra. Guadalupe González Pont per haver-me ajudat en la realització d'aquesta tesi i per la gran amistat que ens uneix des de fa tants anys.

A tots els meus companys i amics del servei d'Anatomia Patològica: Àngels, Annabel, Carme, Cinthya, Clarisa, Cristina, Fede, Francisca, Hernan, Jaume, Kika, Lorenzo, Maite, Maribel, Pilar, Vicky, Xavi i Xavier. Fa tants anys que treballem junts que sou com la meva segona família; sempre de bon humor, sempre sense protestar quan us he demanat ajuda i consell sobre tantes coses... Moltíssimes gràcies: sou els millors companys que es poden tenir.

Al Dr.Lluis Cirera el seu suport i confiança que m'ha donat al llarg del temps.

A la Dra.Carla Bellido per l'ajuda en la revisió de les històries clíniques.

Al Josep Puertas Agusí per la correcció ortogràfica d'aquest treball i per donar-me un cop de mà sempre que l'he necessitat.

A l'Anna Clariana Muntada per les magnífiques il·lustracions d'aquesta tesi.

Al meus amics: Anna, Cesc, Joan, Lluïsa, M.José, Montse, Pere i Xavi, pels fantàstics sopars i pels fantàstics còctels que hem pres: m'heu ajudat moltíssim en molts moments de la meva vida i no m'heu deixat mai abaixar el llistó.

A la meva estimada família: els meus pares, Alexandre i Lluïsa; els meus germans: Maite i Miquel, Àlex i Hélène, Jordi i Elena; els meus nebots: César i Marta, Anna i Michal, i els més petits Albert, Maria i Clara. Em falten paraules per expressar el que signifiquen per mi.

I finalment, a les dues persones que més estimo en aquest món: els meus fills, la Núria i el Bernat: m'heu ajudat sempre, heu aguantat rotllos sobre gens, sobre *K-RAS*, sobre la importància de menjar fruita i un munt de coses més i heu estat pacients en els moments de crisi i desesperació: no es poden tenir un fills millor.

1	INTRODUCCIÓ	3
1.1	Anatomia del còlon	3
1.2	Epidemiologia del càncer de còlon	4
1.3	Classificació del càncer de còlon	5
1.3.1	Sistema d'estadificació: tumor, nòduls i metàstasis	5
1.3.2	Tipus histològic	6
1.3.3	Grau histològic	7
1.4	Aspectes genètics del càncer de còlon	7
1.4.1	Factors de risc genètics	8
1.4.2	Bases moleculars del càncer de còlon: vies de tumorigènesi	9
1.4.2.1	Via supressora	10
1.4.2.2	Via mutadora	11
1.4.2.3	Canvis epigenètics	11
1.5	Factors pronòstics en CCR	13
1.5.1.1	Factors anatomopatològics clàssics	14
1.5.2	Factors moleculars	16
1.5.2.1	Inestabilitat dels microsatel·lits	16
1.5.2.2	El receptor del factor de creixement epidèrmic	16
1.5.2.3	L'oncogèn <i>BRAF</i>	17
1.5.2.4	Via PI3K-PTEN	18
1.5.2.5	L'oncogèn <i>P53</i>	18
1.5.2.6	Pèrdua d'heterozigositat en 18q	19
1.5.2.7	Altres factors pronòstics	19
1.6	Tractament del càncer de còlon	20
1.7	L'oncogèn <i>K-RAS</i>	21
1.7.1	Estructura i funció	22
1.7.2	L'oncogèn <i>K-RAS</i> com a factor pronòstic	25
1.7.3	L'oncogèn <i>K-RAS</i> com a factor predictiu	27
1.7.4	Mètodes de detecció de mutacions en <i>K-RAS</i>	28
2	HIPÒTESIS I OBJECTIUS	33
2.1	Hipòtesis	33
2.2	Objectius	33
3	MATERIAL I MÈTODES	37
3.1	Població estudiada	37
3.2	Metodologia experimental	38
3.2.1	Selecció dels tumors	38
3.2.2	Extracció i quantificació del DNA	39
3.2.3	Detecció de mutacions en <i>K-RAS</i>	40
3.2.4	Variables clinicopatològiques	43
3.3	Anàlisi estadística	43
4	RESULTATS	47
4.1	Estudis descriptius	47
4.2	Anàlisis bivariables	53
4.2.1	Anàlisis de les mutacions en <i>K-RAS</i>	53
4.2.2	Corbes de supervivència de Kaplan-Meier	55
4.2.2.1	Corbes de supervivència i temps de supervivència total	56
4.2.2.1.1	Temps de supervivència total i afectació de nòduls limfàtics	57
4.2.2.1.2	Temps de supervivència total i classificació pT	57

4.2.2.1.3	Temps de supervivència total i presència de metàstasis d'entrada.....	58
4.2.2.1.4	Temps de supervivència total i altres variables	59
4.2.2.1.5	Temps de supervivència total i presència de mutacions en <i>K-RAS</i>	60
4.2.2.2	Corbes de supervivència i temps lliure de malaltia	61
4.2.2.2.1	Temps lliure de malaltia i presència de nòduls limfàtics ...	62
4.2.2.2.2	Temps lliure de malaltia i classificació pT	63
4.2.2.2.3	Temps lliure de malaltia i presència de metàstasis d'entrada	63
4.2.2.2.4	Temps lliure de malaltia i altres variables	64
4.2.2.2.5	Temps lliure de malaltia i presència de mutacions en <i>K-RAS</i>	65
4.3	Anàlisi multivariable de regressió de Cox.....	66
4.3.1	Temps de supervivència	67
4.3.2	Temps lliure de malaltia	72
5	DISCUSSIÓ	79
6	CONCLUSIONS	95
7	BIBLIOGRAFIA.....	99

Abreviatures utilitzades en aquesta tesi:

ARMS: de l'anglès amplification refractory mutation system

CCR: carcinoma colorectal

CCRM: carcinoma colorectal metastàtic

CIMP: fenotip metil·lador d'illes CpG

CIN: via d'instabilitat cromosòmica

Col.: col·laboradors

Ct: cicle lliardar

ddNTP: didesòxidnucleòtids trifosfats

dNTP: deoxinucleòsids trifosfats

EGFR: receptor del factor de creixement epidèrmic

FAP: poliposis adenomatosa familiar

FOLFIRI: combinació de varis agents terapèutics: àcid fòlic, 5-FU i irinotecan

FOLFOX: combinació de varis agents terapèutics: àcid fòlic, 5-FU i oxaliplatí

FTasa: farnesil protein transferasa

GAPs: de l'anglès GTPases Activating Proteins

GEF: factors d'intercanvi de la guanina

Gen *APC*: de l'anglès gen Adenomatous polyposis coli

Gen *DDC*: de l'anglès gen Deleted Colorectal Cancer

GGTasa: geranilgeranil transfersasa

HNPCC: càncer colorectal no polipòsic hereditari

HRM: de l'anglès high resolution melting

LOH: pèrdua d'heterozigositat

M0: no presència de metàstasis

M1: presència de metàstasis

MMR: gens reparadors del DNA

MSI: instabilitat de microsatèl·lits

MSI-H: alta instabilitat de microsatèl·lits

MSI-L: baixa instabilitat de microsatèl·lits

MSS: estabilitat en els microsatèl·lits

N0: cap gangli limfàtic infiltrat

N1: de 1 a 3 ganglis limfàtics infiltrats

N2: més de 3 ganglis limfàtics infiltrats

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PCR-RT: reacció en cadena de la polimerasa en temps real

RFLP: polimorfismes en la longitud en els fragments de restricció

T1: invasió del tumor a nivell de la submucosa

T2: invasió del tumor a nivell de la capa muscular

T3: invasió del tumor a nivell de la subserosa

T4: invasió del tumor a nivell d'altres òrgans i estructures

Tis: invasió del tumor a nivell intraepitelial

TNM: classificació segons nivell d'infiltració tumoral, nòduls i metàstasis

TS: timidelat sintestasa

INTRODUCCIÓ

1 INTRODUCCIÓ

1.1 Anatomia del còlon

El còlon, també anomenat intestí gruixut, és l'últim tram del tub digestiu. Té una longitud aproximada de 1,5 metres i s'estén des del final de l'intestí prim fins a l'anus. La primera porció del còlon és el cec i està situat a la part inferior dreta de l'abdomen i és on desemboca l'intestí prim. Des d'aquí el còlon ascendeix fins arribar a l'alçada del fetge, que anomenem còlon ascendent i travessa l'abdomen, que és el còlon transvers. Posteriorment, el còlon es dirigeix cap avall i passa a anomenar-se còlon descendent, fins arribar al sigma, que desemboca en el recte i, finalment, a l'anus, que s'obre a la part exterior per l'esfínter anal (Figura 1).

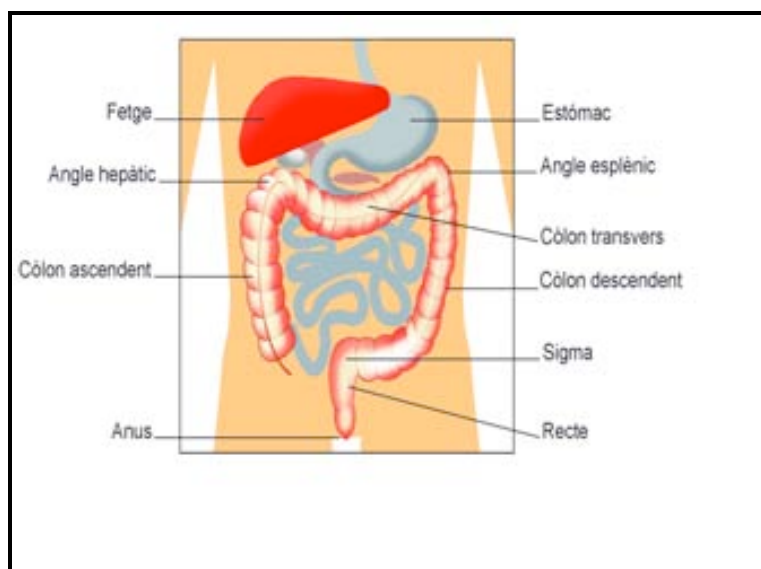


Figura 1: Anatomia del còlon

La funció del còlon ascendent i transvers consisteix en absorbir aigua i electròlits, mentre que la funció del còlon descendent i recte és l'emmagatzematge de les matèries fecals fins al moment de la seva expulsió per l'anus.

El còlon i el recte estan constituïts per varies capes de teixit, la més interna és la mucosa, que es troba envoltada per la submucosa, després la capa muscular i, per últim, la serosa, que és la capa més externa.

1.2 Epidemiologia del càncer de còlon

El càncer colorectal (CCR) és un dels tipus de neoplàsia més comuna en els països desenvolupats i s'estima que a tot el món 1 milió d'individus desenvoluparan aquesta malaltia cada any.¹ Aquest tipus de càncer representa un 9,4% del total de càncers, amb una ràtio entre homes i dones de 1,2:1. En termes d'incidència, el CCR és el quart tipus més freqüent en homes i el tercer en dones.² A Europa es diagnostiquen al voltant de 250.000 casos nous de CCR, que representen aproximadament el 9% de tots els càncers.³ A Europa, la supervivència durant el període 1995-1999 va ser del 72% el primer any i del 54% als cinc anys.⁴ A l'estat espanyol, el CCR és el tumor més freqüent si es considera ambdós sexes en conjunt, amb un patró d'incidència anual ascendent que arriba al 2,5% en els homes. La incidència anual ajustada, segons l'edat, del CCR a Espanya és de 60,4/100.000 en els homes i 34,1/100.000 en les dones, amb taxes similars a la mitjana dels països de la Unió Europea. Respecte a les dades de prevalença, també el CCR és el segon tumor més freqüent a Espanya, amb més de 65.000, només per darrera del càncer de mama amb 69.993 casos. Les dades epidemiològiques espanyoles són similars a les europees, sent el CCR el tumor més freqüent representant el 13,6% de tots els tumors, seguit del càncer de mama (13,1%), càncer de pulmó (12,2%) i el càncer de pròstata (11,9%). Respecte a la mortalitat, el CCR és la segona causa de mort per càncer, per darrera del càncer de pulmó.⁵

Durant l'any 2002 es van diagnosticar a Catalunya 2.609 casos de CCR en homes i 1.938 casos en dones; és el tercer càncer en freqüència en homes i el segon en dones, amb una supervivència al voltant del 50% als cinc anys. En el context europeu, Catalunya presenta una incidència elevada, sobretot en homes però, en canvi, la mortalitat mostra una tendència estable o decreixent

en el període 1995-2004 en ambdós sexes, el qual ens situa en una posició intermèdia en el context europeu.⁶

1.3 Classificació del càncer de còlon

1.3.1 Sistema d'estadificació: tumor, nòduls i metàstasis

La classificació de tumor, nòduls limfàtics i metàstasis (TNM)⁷ proposada per *The American Joint Committee on Cancer* i per *The International Union Against Cancer* és actualment el sistema estàndard recomanat per diferents associacions de patòlegs, cirurgians i oncòlegs per la classificació del CCR.

Les classificacions proposades per C.Dukes entre 1929-1935 són la base de la classificació TNM. Aquesta classificació té en compte 2 característiques histopatològiques: profunditat de la infiltració i presència o absència de metàstasis en ganglis limfàtics regionals. La classificació TNM, actualment, ha substituït a altres classificacions degut a la seva utilitat i estandardització. Aquestes classificacions es van actualitzant periòdicament, i actualment s'utilitza la 7a edició, que és de l'any 2009. En el nostre estudi es va utilitzar la 6a edició, de l'any 2002. La classificació ha tingut relativament poques modificacions importants entre la 6a edició (2002) i la 7a edició (2009), de manera que les categories TNM i els estadis I a IV poden ser fàcilment comparats.⁸

Aquesta classificació es basa en el nivell d'infiltració del tumor des del nivell intramucós (Tis), invasió de la submucosa (T1), invasió de la capa muscular (T2), invasió de la capa subserosa/mesenteri (T3) fins a la invasió de la serosa (peritoneu visceral) o d'altres òrgans i estructures (T4), la presència o no de nòduls limfàtics infiltrats (N0, N1, N2) i la presència o no de metàstasis a distància (M0, M1).⁹ (Taula 1).

T
<p>T0: Sense tumor primari Tis: Tumor intraepitelial o intramucós sense sobrepassar la muscularis mucosae T1: Tumor que invadeix la submucosa T2: Tumor que invadeix la muscular pròpia T3: Tumor que atravesa la muscular pròpia i que invadeix la subserosa o els teixits pericòlics o perirectals no recoberts pel peritoneu T4a: Tumor que perfora el peritoneu visceral T4b: Tumor que i òrgans o estructures adjacents</p>
N
<p>NX: Es desconeix l'estat dels ganglis limfàtics N0: Sense compromís ganglionar regional N1: Metàstasis en 1 a 3 ganglis regionals <ul style="list-style-type: none"> • N1a: Metàstasis en 1 gangli • N1b: Metàstasis en 2-3 ganglis • N1c: Dipòsits tumorals en la subserosa e en el greix del meso pericòlica o perirectal sense metàstasis en ganglis limfàtics regionals N2: Metàstasis en 4 o més ganglis regionals <ul style="list-style-type: none"> • N2a: Metàstasis en 4-6 ganglis • N2b: Metàstasis en 7 o més ganglis </p>
M
<p>MX: Es desconeix l'existència de metàstasis a distància M0: Sense metàstasis a distància M1: Evidència de metàstasis a distància <ul style="list-style-type: none"> • M1a: Metàstasis en sol òrgan • M1b: Metàstasis en més d'un òrgan o en el peritoneu </p>

Taula 1: Estadificació TNM del càncer colorectal (7a edició, 2009)

1.3.2 Tipus histològic

S'utilitza la classificació proposada per la OMS. Les principals variants histopatològiques del CCR són les següents:

- Adenocarcinoma: representa més del 90% de totes les neoplàsies malignes
- Adenocarcinoma mucinós o col·loide: component mucinós >50% del tumor

- Carcinoma de cèl·lules en anell de segell
- Carcinoma adenoescamós
- Carcinoma de cèl·lula petita
- Carcinoma medul·lar
- Carcinoma indiferenciat

1.3.3 Grau histològic

La classificació més admesa dels adenocarcinomes consta de quatre graus i es basa fonamentalment en la proporció de formació de glàndules en el tumor.

- Grau 1: Ben diferenciat (>95% del tumor constituït per glàndules)
- Grau 2: Moderadament diferenciat (50 a 95% de glàndules)
- Grau 3: Pobrament diferenciat (5 a 49 de glàndules)
- Grau 4: Indiferenciat (>5% del tumor constituït per glàndules)

Actualment es recomana estratificar en 2 graus:

- Baix grau: $\geq 50\%$ de formació de glàndules (inclou adenocarcinomes ben diferenciat i moderadament diferenciat)
- Alt grau: $< 50\%$ de formació de glàndules (inclou adenocarcinoma pobrament diferenciat i indiferenciat)

S'ha comprovat que aquesta agrupació és més reproducible i redueix les variacions d'interpretació entre observadors. També té més pes com a variable pronòstica. El carcinoma de cèl·lula petita i de cèl·lules en anell de segell es consideren d'alt grau. El carcinoma medul·lar no es grada.

1.4 Aspectes genètics del càncer de còlon

La majoria dels càncers de còlon tenen un origen esporàdic i només en un 5% hi ha causes hereditàries.¹⁰ S'han fet múltiples estudis sobre els factors de risc

involucrats en aquesta malaltia. S'ha observat que l'edat avançada, el sexe masculí, presència de pòlips en el còlon i factors ambientals com la dieta (alt consum de greixos i carns vermelles, poca fibra, ingesta elevada d'alcohol), l'estil de vida sedentari, el consum de tabac o la presència de malalties com la diabetis mellitus o la malaltia de Crohn tenen una importància elevada a l'hora de desenvolupar un CCR.¹¹

1.4.1 Factors de risc genètics

Aproximadament entre un 10%~30% del total dels CCR tenen lloc en un context d'història familiar, però els factors genètics que predisposen a aquesta malaltia encara no estan del tot identificats. No obstant s'han descrit unes síndromes hereditàries que representen aproximadament un 5% de tots els CCR que es diagnostiquen cada any. Tot i que aquests càncers hereditaris representen una fracció petita de tots els casos de CCR, l'estudi de les bases moleculars d'aquests tipus de càncers pot contribuir al coneixement de factors i mecanismes específics implicats en els CCR esporàdics.¹⁰ S'han descrit varies síndromes hereditàries, les més conegudes són la poliposis adenomatosa familiar (FAP), que representa un 1% de tots els CCR, afectant 1 de cada 7000 persones amb CCR i el CCR no polipòsic hereditari (HNPCC) també anomenat síndrome de Lynch, que representa entre el 5-10% de tots els CCR, afectant a 1 de cada 300 persones amb CCR.¹² Aquestes 2 malalties són autosòmiques dominants. En el cas de la FAP, el gen mutat és el *APC* (*adenomatous polyposis coli*), que es localitza en el cromosoma 5q¹³ i que codifica per una proteïna citoplasmàtica de 300kD. Pel desenvolupament de FAP només es necessita un al·lel mutat, el que suggereix l'efecte dominant negatiu de la proteïna mutada. En la síndrome de Lynch les mutacions responsables es donen en gens de reparació d'aparellaments erronis del DNA. Les mutacions en el gen *hMSH-2* originen el 60% dels casos de HNPCC, en *hMLH-1* el 30%, en *hPMS-1* el 5% i en *hPMS-2* el 5%. Les mutacions en aquests gens provoquen un marcador genètic identificable conegut com

inestabilitat de microsatèl·lits (MSI).¹⁴ Els microsatèl·lits són unes seqüències curtes i repetitives que es repeteixen al llarg del genoma; l'alteració en la longitud d'aquestes seqüències és el que s'anomena MSI. Finalment, s'han descrit altres síndromes, amb una incidència molt menor en la població, com la síndrome de Gardner, la de Peutz-Jeghers, la poliposis juvenil, entre d'altres, amb altres alteracions genètiques conegudes.¹⁵ Tots aquets defectes genètics estan catalogats en les bases de dades d'herència mendeliana en homes.¹⁶

També s'ha descrit el CCR familiar, on s'ha vist que el risc de tenir un CCR si hi ha alguns membres d'una mateixa família afectats augmenta de 2 a 6 cops, depenent del número de persones afectades i de l'edat del diagnòstic. Aquests CCR familiars s'estima que representen un 20% del total de CCR en els països desenvolupats. No obstant, no es poden englobar en les síndromes hereditàries clàssiques perquè clínicament no compleixen els criteris de diagnòstic de CCR hereditari, el que suggereix que hi ha d'haver altres gens menys penetrants implicats i/o les interaccions gens-ambient són restringides a aquests agregats familiars. S'estan estudiant alguns potencials loci en els cromosomes 8,9,11 i 18.¹⁷

1.4.2 Bases moleculars del càncer de còlon: vies de tumorigènesi

El procés de formació tumoral a partir d'una cèl·lula implica l'acumulació successiva d'alteracions en els gens. Les cèl·lules canceroses són inestables genèticament durant el procés de carcinogènesi, i aquelles que adquireixen alteracions successives que els hi proporcionen avantatges respecte el creixement, es van seleccionant i seran majoritàries en el tumor. Cap a principis de la dècada del 1990, Fearon i Vogelstein¹⁸ van proposar un model de carcinogènesi de transició d'adenoma-carcinoma que està acceptat en l'actualitat. En aquest model de carcinogènesi colorectal, es produeixen mutacions en el gen *APC*, durant el desenvolupament dels pòlips i posteriorment, durant l'etapa adenomatosa, mutacions en *K-RAS*, mutacions en *p53* i delecions en el cromosoma 18 que condueixen a la transició al carcinoma.(Figura 2).

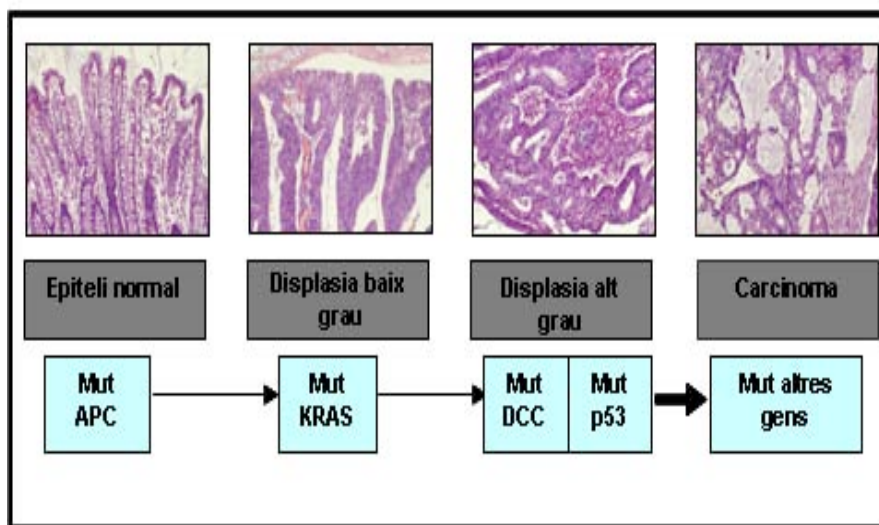


Figura 2: Esquema de la carcinogènesi colorectal (Mut=mutacions)

El desenvolupament de la inestabilitat genòmica és un fet important en la carcinogènesi colorectal. S'han descrit 3 vies per explicar la inestabilitat genòmica: la via supressora (donada per una inestabilitat cromosòmica), la via mutadora (donada per MSI)¹⁹ i una tercera via que són els canvis epigenètics, que es donen per metilacions en les illes CpG donant el fenotip fenotip metilador d'illes CpG (CIMP). De fet, aquestes vies no tenen perquè ser excloents entre si; així s'ha observat que més del 25% dels CCR amb MSI tenen anormalitats cromosòmiques o més del 33% dels tumors amb el fenotip CIMP tenen aberracions cromosòmiques.²⁰

1.4.2.1 Via supressora

Aquesta via també s'anomena via de la inestabilitat cromosòmica (CIN). Es dona en el 85% del CCR. El perfil molecular es caracteritza per amplifícacions cromosòmiques, aneuploidia i pèrdua d'heterozigositat (LOH). Aquesta via s'associa amb mutacions en el gen *APC*, que poden coexistir amb delecions en el cromosoma 5, 18q o 17p. El braç llarg del cromosoma 18 conté els gens *Deleted in Colorectal Cancer (DCC)*, *SMAD2* i *SMAD4*; aquests dos últims juguen un paper important en la via de senyalització de TGF- β . Un altre gen

implicat en aquesta via d'inestabilitat cromosòmica és *K-RAS*, que també juga un paper important en la via CIMP de la carcinogènesi colorectal.²¹

1.4.2.2 Via mutadora

Es dona en el 15% dels CCR i implica una MSI deguda a mutacions en els gens reparadors del DNA (MMR).²² S'han identificat 5 gens de reparació d'aparellaments erronis del DNA: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* i *MLH3*. Els defectes en els gens reparadors del DNA comporten una acumulació d'insercions i delecions dins d'unes seqüències curtes i repetitives anomenades microsatèl·lits. Les alteracions en la longitud d'aquestes seqüències és el que s'anomena MSI.²³

Els microsatèl·lits són abundants en tot el genoma; hi ha polimorfismes entre individus però la longitud és única i uniforme en cada teixit de cada persona.²⁴

Aquesta via de tumorigènesi és freqüent en pacients amb síndrome de Lynch. S'ha descrit MSI en el 90-95% dels CCR en pacients amb síndrome de Lynch.²⁰

Si hi ha 2 o més microsatèl·lits afectats, es diu que hi ha una alta MSI (MSI-H) i s'aconsella un estudi de mutacions germinals en els gens de reparació per poder identificar els pacients amb síndrome de Lynch.²⁴ La identificació dels pacients MSI-H és important perquè estan associats a un millor pronòstic si bé tenen pitjor resposta a la quimioteràpia adjuvant.¹⁶ A més, aquesta identificació permet fer un consell genètic.

1.4.2.3 Canvis epigenètics

Aquesta via es dona en aproximadament en el 15% dels CCR esporàdics. Els canvis epigenètics són canvis heretables de l'expressió gènica que passen de generació en generació sense una alteració de la seqüència del DNA. Aquests

canvis epigenètics poden ser per metilació del DNA, modificacions d'histones o els micro-RNA.

La metilació del DNA consisteix en l'adició d'un grup metil (CH₃) al nucleòtid citosina. Al llarg de tot el genoma es troben distribuïts dinucleòtids CpG que estan metilats. Però hi ha unes regions anomenades illes CpG entre 200 i varies kilobases on la freqüència de dinucleòtids CpG és molt elevada i no estan metilades. Aquestes illes CpG es localitzen generalment entre la regió central del promotor d'un gen i el punt d'inici de la transcripció. S'ha observat que si aquestes regions estan metilades hi ha una repressió de l'expressió del gen. La metilació del DNA dóna lloc a un fenotip característic anomenat CIMP.

²¹ La metilació del DNA és freqüent en els CCR, com per exemple la metilació del gen supressor de tumors *CDKN2A* que es dóna en un 40% dels CCR o la hipermetilació de *P16* que s'ha suggerit que té una importància en la tumorigènesi colòrectal.¹⁷

Les modificacions de les histones són un altre canvi epigenètic que es pot donar en els CCR. Principalment es dóna per acetilació/desacetilació; l'acetilació d'aquestes proteïnes té un efecte activador de la transcripció ja que redueix molt l'afinitat de les histones pel DNA i en canvi la desacetilació es correlaciona amb la compactació de la cromatina i la repressió transcripcional¹⁷.

Els micro-RNA són petits fragments de 20-25 nucleòtids de RNA no codificant que s'uneixen a les regions 3'UTR del RNAm; si troben el complementari total del RNAm bloquegen la transcripció i si el complementari és parcial bloquegen la traducció. Estan implicats en la regulació de la proliferació cel·lular, diferenciació, apoptosi i immunitat. La seva associació amb la formació, angiogènesi, metàstasi i resistència a la quimioteràpia ha fet que esdevingués un dels canvis epigenètics més estudiats recentment.²⁵ Dos dels micro-RNA més estudiats en CCR són el lethal-7 (let-7) i el miR-143; s'ha observat que baixos nivells d'aquests micro-RNA estan associats a un pitjor pronòstic.²⁶

1.5 Factors pronòstics en CCR

Un factor pronòstic ens aportarà informació sobre l'evolució clínica de la malaltia en el moment del diagnòstic independentment del tractament aplicat. Aquests marcadors pronòstic ens serviran per conèixer la malaltia, predir l'evolució, definir grups de risc i decidir el tractament terapèutic més correcte. Aproximadament entre un 50-60% de pacients diagnosticats d'un CCR desenvoluparan metàstasis, principalment en el fetge i el pulmó²⁷; per això el coneixement d'aquests factors pronòstics serà clau a l'hora del maneig del pacient.

En 1999 el *College of American Pathologist* van arribar a un consens per classificar els factors pronòstics del CCR.²⁸ Van fer una extensa revisió de la literatura publicada fins el moment proposant 4 categories per classificar les variables en funció de si tenien un valor pronòstic o no. (Taula 2).

Categoria	Característica
Categoria I	<ul style="list-style-type: none">- Extensió local del tumor- Metàstasis en ganglis regionals- Invasió de vasos limfàtics o sanguinis- Tumor residual- Nivells de CEA
Categoria IIA	<ul style="list-style-type: none">- Grau tumoral- Estatus del marge radial
Categoria IIB	<ul style="list-style-type: none">- Tipus histològic- Troballes histològiques associades amb MSI- MSI-H- Pèrdua d'heterozigositat de 18q- Configuració dels marges tumorals
Categoria III	<ul style="list-style-type: none">- Alguns marcadors tumorals (excepte MSI-H i pèrdua d'heterozigositat de 18q)- Invasió perineural, fibrosis peritumoral, resposta peritumoral inflamatòria, índex de proliferació, etc
Categoria IV	<ul style="list-style-type: none">- Mida del tumor- Configuració del tumor

Taula 2: Classificació dels factors pronòstic en carcinomes colorectals

La categoria I és la que està consensuada per utilitzar com a factor pronòstic, les categories IIA, IIB i III encara no estan ben definides i la categoria IV no té cap rellevància com a factor pronòstic.

1.5.1.1 Factors anatomopatològics clàssics

El factor pronòstic més important és la classificació TNM del tumor en el moment del diagnòstic. En funció d'aquest TNM la malaltia es classifica en 4 estadis. (Figura 3).

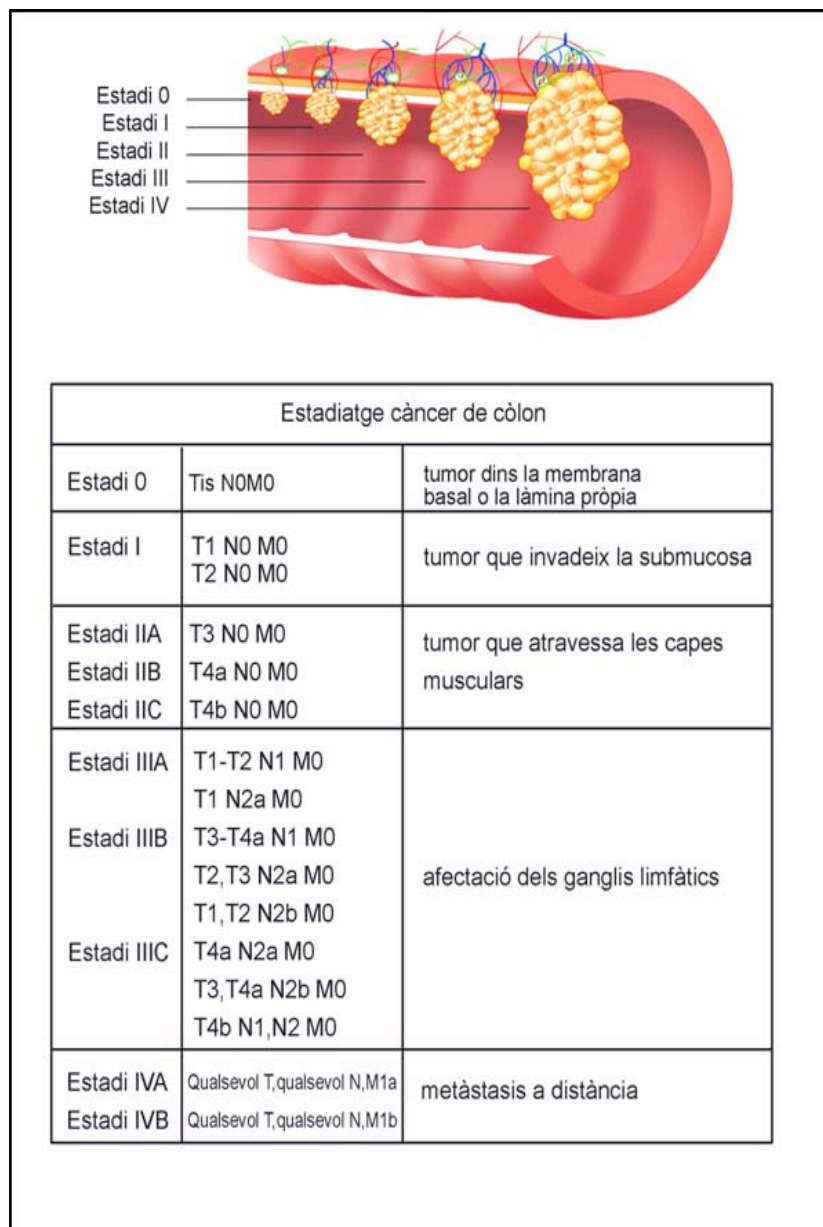


Figura 3: Estadiatge del càncer de còlon

La supervivència varia molt en funció de l'estadi de la malaltia; així en l'estadi inicial trobem una supervivència del 90% mentre que en l'estadi IV, el més avançat, la supervivència decreix al 3%.²⁹ (Taula 3).

Estadi TNM	Supervivència als 5 anys (%)
Estadi 0,1 (TiS;N0;M0)	≥90
Estadi I (T2; No; M0)	80-85
Estadi II (T3, T4; N0;M0)	70-75
Estadi III (T2; N1-3; M0)	70-75
Estadi III (T3;N1-3; M0)	50-65
Estadi III (T4;N1-3;M0)	25-45
Estadi IV (M1)	≤3

Taula 3: Supervivència del càncer de còlon en funció de l'estadiatge en el moment del diagnòstic

Altres factors de mal pronòstic morfològics són l'ampli percentatge d'afectació de circumferència intestinal, el tipus d'invasió del tumor en profunditat o marge infiltratiu versus marge expansiu, la invasió de venes i vasos limfàtics així com la invasió d'espais perineurals. El mesorecte no íntegre amb tumor residual (marge radial positiu) o mínima distància del tumor a marge radial són també factors de pronòstic adversos. Per últim, la inflamació limfocitària tipus Crohn en el marge d'invasió tumoral, la inflamació intratumoral, la desmoplàsia i els ganglis regionals amb limfadenitis reactiva s'han interpretat com una resposta de l'hoste favorable.³⁰

1.5.2 Factors moleculars

S'ha vist que tumors histològicament idèntics poden tenir pronòstics i/o respostes a la teràpia diferents entre si; per això l'anàlisi molecular dels CCR és actualment clau per determinar quins pacients tindran millor pronòstic i quina podrà ser la millor elecció terapèutica.³¹ Per això, l'estudi dels factors pronòstic normalment va lligat al valor predictiu d'aquests; el valor predictiu ens dona informació de la probabilitat de resposta tumoral a un agent terapèutic o a una combinació d'aquests.

Hi ha varis factors pronòstics en CCR. Alguns d'aquests factors estan acceptats per la comunitat científica i altres encara estan en discussió.³² Respecte l'oncogen *K-RAS*, es discutirà més extensament en l'apartat 1.7.2 i 1.7.3.

1.5.2.1 Inestabilitat dels microsatèl·lits

Malgrat que s'han fet molts estudis sobre el valor com a factor pronòstic de MSI, els resultats no són del tot concloents, si bé que Popat et al (2005) van fer una revisió sistemàtica de 32 treballs on hi havia implicat un total de 7642 pacients i van concloure que els tumors amb MSI tenien millor pronòstic que els tumors amb estabilitat en els microsatèl·lits (MSS).³³

1.5.2.2 El receptor del factor de creixement epidèrmic

El receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) és un membre de la família dels receptors tirosina-quinasa (també anomenats ErbB o HER). És una proteïna transmembrana que té 3 dominis. En el domini extracel·lular hi ha el punt d'unió al lligand; hi ha varis lligands, com EGF, Eprexigulin o Anfiregulin.³⁴ La unió del receptor amb el lligand fa que comenci una cascada de reaccions intracitoplasmàtiques, enviant senyals de proliferació cel·lular, control d'apoptosi i angiogènesi. Aquest receptor està implicat en la tumorigènesi

colorectal, progressió tumoral i metàstasi. Hi ha tres vies d'activació: la via MAPK-RAS-BRAF, la via PI3K (via quinasa serina/treonina AKT) i la via JAK/STAT.³⁵ (Figura 4). El 65-70% dels CCR tenen sobreexpressió d'EGFR i està associat a un estadi avançat de la malaltia. No obstant, els estudis fets sobre EGFR i supervivència no són del tot conclouents respecte a la utilització com a factor pronòstic, però els inhibidors farmacològics d'EGFR sí que són beneficiosos en certs tipus de CCR com els metastàtics.¹⁹

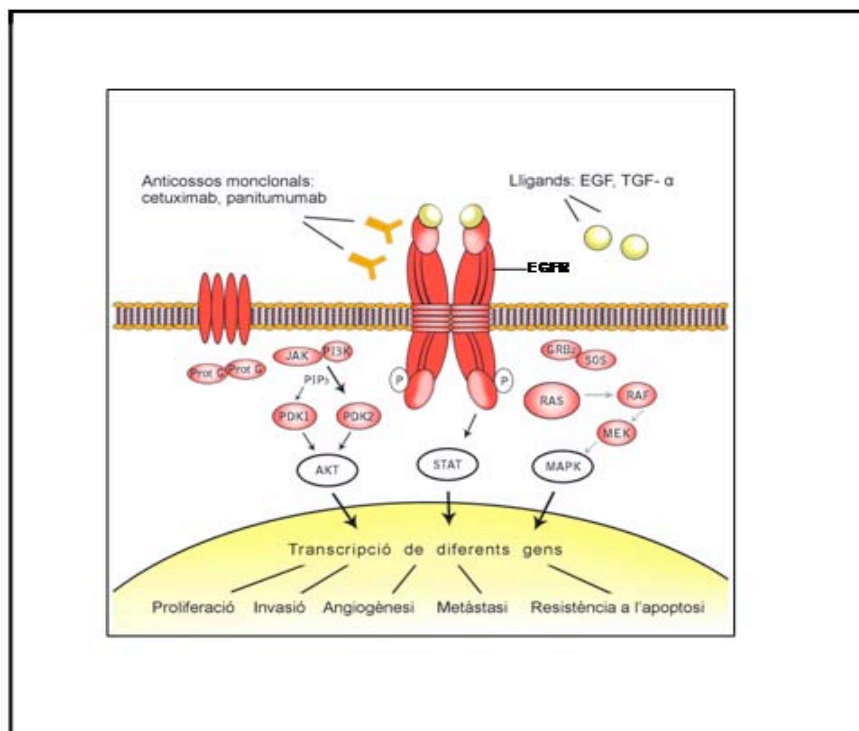


Figura 4: Vies de senyalització de l'EGFR

1.5.2.3 L'oncògen *BRAF*

L'oncògen *BRAF* codifica per una proteïna de la família RAF quinasa, proteïna intracitoplasmàtica que ve regulada per l'activació de RAS. S'han descrit mutacions entre un 5-15% en els CCR, i en més del 80% d'aquestes mutacions hi ha involucrat un canvi de timina per adenina en el nucleòtid 1799, el que implica una substitució del codó 600 (V600E) de valina per glutàmic, el que comporta una desregulació d'aquesta via MAPK-RAS-BRAF.¹⁹ (Figura 4). Les mutacions en *K-RAS* i *BRAF* són mútuament excloents.³⁶

1.5.2.4 Via PI3K-PTEN

El gen *PIK3CA* codifica per una proteïna citoplasmàtica anomenada PI3K, de la família de lípid-quinases, que està implicada en la via de transmissió dels senyals quan s'activa l'EGFR. (Figura 4). Les mutacions en el gen *PIK3CA* es donen entre el 15-18% dels CCR, sobretot en l'exó 9 i l'exó 20. Les mutacions en aquest gen poden coexistir amb mutacions en *K-RAS* o en *BRAF*. S'ha vist que les mutacions en *PIK3CA* estan associades a una baixa supervivència, però el seu valor pronòstic no està encara establert. La proteïna PTEN inhibeix el senyal iniciat per PI3K. L'activitat de PTEN es pot inhibir per varis mecanismes, com mutacions en el gen *PTEN* (5%), pèrdues al·lèliques del cromosoma 10q23 (23%) o per hipermetilació de la regió promotora (~ 20%). La inhibició d'aquesta proteïna pot coexistir amb mutacions en *K-RAS*, *BRAF* i *PIK3CA*. El paper de la pèrdua de la funció de la proteïna PTEN en CCR no està del tot definida. S'ha suggerit que la pèrdua de l'expressió de PTEN (mesurable per immunohistoquímica) està associada a una disminució del benefici del tractament amb cetuximab en CCR metastàssic (CCRM).³⁷

1.5.2.5 L'oncogèn P53

El gen *P53* és un gen supressor de tumors que es localitza en el braç curt del cromosoma 17 (17p13). S'han observat mutacions en un 50% dels CCR.²¹ Aquest gen codifica per una proteïna de 53KD que té varies funcions: aturar el cicle cel·lular en el punt de control G1/S o G2/M quan es detecten errors en la replicació del DNA, activar els enzims de reparació del DNA per corregir els danys detectats en el DNA i, si els danys que s'han detectat són irreparables, conduir a l'apoptosi cel·lular per evitar la proliferació de cèl·lules amb DNA anormal.³⁸ La majoria de les mutacions en *P53* (~80%) són mutacions de canvi de sentit, produint proteïnes defectuoses i inactives detectables per immunohistoquímica.²⁰

1.5.2.6 Pèrdua d'heterozigositat en 18q

El braç llarg del cromosoma 18 conté molts gens que tenen una importància clau en la patogènesi i progressió del CCR, com el gen *DCC*, el gen *SMAD4*, el gen *SMAD2* i el gen *SMAD7*. El desequilibri al·lèlic o la LOH18q en el braç llarg del cromosoma 18 es dóna en el 70% dels CCR.²¹ El gen *DCC* és un gen supressor de tumors que codifica per un receptor transmembrana neutrin-1 important en l'adhesió cel·lular i l'apoptosi. El gen *SMAD4* codifica per una proteïna intracitoplasmàtica implicada en la via de regulació de la proteïna extracitoplasmàtica TGF- β . La molècula TGF- β s'uneix als receptors de membrana amb activitat serina-treonina quinasa i aquesta unió desencadena la fosforilació dels factors citoplasmàtics SMAD dels quals n' existeixen diferents formes. Aquests SMAD fosforilats s'uneixen a SMAD4 i formen heterodímers que entren en el nucli i s'associen a altres proteïnes d'unió al DNA per activar o inhibir la transcripció de gens específics implicats en el control i la proliferació cel·lular. En les cèl·lules epitelials, TGF- β és un inhibidor del creixement perquè promou l'expressió d'inhibidors del cycle cel·lular de les famílies Cip/Kip i INK4/ARF. Per tant la desregulació de l'activació i de la ruta de senyalització del TGF- β poden desencadenar apoptosi.¹⁹

1.5.2.7 Altres factors pronòstics

Altres factors pronòstic que s'han estudiat són timidilat sintetasa (TS) (tumors amb baixos nivells de la proteïna TS tenen un temps de supervivència més alt i responen millor al tractament amb 5-FU), dihidropirimidina deshidrogensasa (marcador molecular a la resposta al tractament amb 5-FU), uridina difosfat glucuronosil transferasa (toxicitat més alta en pacients tractats amb irinotecan), nucleasa de reparació per excisió ERCC1 (una baixa expressió del gen *ERCC1* està associada a una supervivència millor en CCR avançats en pacients tractats amb oxiliplatí).³⁹

1.6 Tractament del càncer de còlon

La inducció de l'apoptosi en les cèl·lules tumorals és el mecanisme clau de la majoria dels tractaments oncològics incloent la quimioteràpia, la radioteràpia o la immunoteràpia. El tractament oncològic escollit dependrà de múltiples factors, com la localització del tumor (còlon o recte), l'estadiatge en el moment del diagnòstic, aspectes clínics del pacient, etc, i per això en el Hospital Universitari Mútua Terrassa es disposa d'un comitè que avalua cada pacient amb la finalitat d'obtenir la millor estratègia terapèutica personalitzada.

La base del tractament del CCR és la quimioteràpia clàssica amb agents citostàtics. Les fluoropirimidines (anàlogues al fluorouracil 5-FU) combinades amb oxaliplatí o irinotecan són el tractament estàndard d'aquestes neoplàsies. Les fluoropirimidines actuen principalment inhibint la TS, provocant un dany en la síntesi del DNA i per tant la mort cel·lular. L'oxaliplatí també produeix una desregulació de la TS. L'irinotecan és hidrolitzat per la carboxilesterasa, convertint-se en un potent metabòlit actiu, anomenat SN38. L'irinotecan i els seus metabòlits interactuen amb les forquilles de replicació del DNA inhibint la topoisomerasa I, produint la fragmentació del DNA i en conseqüència la mort cel·lular.⁴⁰ Actualment s'utilitzen combinacions de varis quimioteràpics i fàrmacs, com FOLFIRI (àcid fòlic, 5-FU i irinotecan) i FOLFOX (àcid fòlic, 5-FU i oxaliplatí).⁴¹

Un altre tipus d'agents terapèutics són els anticossos monoclonals dirigits contra l'EGFR (Figura 4) o contra el VEGF. El cetuximab (anticòs monoclonal quimèric de ratolí IgG1) i el panitumumab (anticòs monoclonal humà IgG2)¹⁹ són anticossos monoclonals dirigits contra l'EGFR i el bevacizumab (anticòs monoclonal recombinant humanitzat IgG1) va dirigit contra VEGF.³⁹ Aquests agents terapèutics s'utilitzen en CCRm. El cetuximab presenta una afinitat per l'EGFR d'aproximadament 5-10 cops més que els lligands endògens provocant així la inhibició de la funció del receptor. A més, indueix la internalització de l'EGFR el que implica una disminució dels receptors disponibles en la superfície cel·lular.

1.7 L'oncogèn *K-RAS*

El començament de la recerca de l'oncogèn *RAS* va ser l'any 1964 quan Jennifer Harvey va observar que preparacions de virus de leucèmia murina, obtinguts de rates amb leucèmia, induïen sarcomes en rates acabades de néixer. Posteriorment es van identificar tres retrovirus, que contenen els oncogens *RAS*. Kirsten-MSV es va obtenir al 1967, BALB-MSV es va aïllar al 1974 i Rasheed, de la família dels virus del sarcoma de rata, es va generar el 1978 a partir de cultius cel·lulars. Cap a la dècada dels 70 es va definir la seqüència responsable de les propietats oncogèniques d'aquests virus. El 1975 Ed Scolnick i col·laboradors van establir que les estirps Harvey (Ha-MSV) i Kirsten (Ki-MSV) eren virus recombinants que portaven les seqüències derivades del genoma de les rates. El 1977 es va poder fer la seqüenciació d'aquests retrovirus i es va veure que eren triple recombinats entre retrovirus (que els hi confereixen les propietats infeccioses), seqüències cel·lulars de rates d'un origen retroviral ancestral conegut com 30S RNA i uns gens cel·lulars de rates (*Hras* en Ha-MSV i *Kras* en Ki-MSV). La seqüència dels nucleòtids dels oncogens *v-h-ras* i *v-k-ras* no es va publicar fins 1982. El 1983 es va identificar el tercer gen de la família dels oncogens *RAS*, anomenat *NRAS*.⁴²

Les oncoproteïnes H-RAS, K-RAS i N-RAS formen part d'una superfamília de proteïnes que s'uneixen amb molta afinitat a GDP i GTP. La superfamília *RAS* està formada per més de 150 proteïnes i s'han descrit 5 subfamílies: Ras, Rho, Rab, Arf i Ran. La subfamília Ras inclou 21 membres: H-Ras, K-Ras (A i B), N-Ras, R-Ras, TC21/R-Ras2, M-Ras/R-Ras3, Rap1a, Rap1b, Rap2a, Rap2b, Rap2c, Rit, Rin, Rheb, Noey2, DiRas1/Rig, DiRas2, ERas, RalA, RalB, DexRas/RasD1 i RasD2/Rhes.⁴³

1.7.1 Estructura i funció

El gen *K-RAS* es localitza en el braç curt del cromosoma 12 (12p12.2) (Figura 5), el *H-RAS* en el cromosoma 11 (11p15.5) i *N-RAS* en el cromosoma 1 (1p13.2). Les investigacions dutes a terme al llarg de varies dècades han proporcionat l'evidència que en molts tipus de càncers humans, com còlon, pulmó o pàncrees, es troben mutacions en *K-RAS*.⁴²

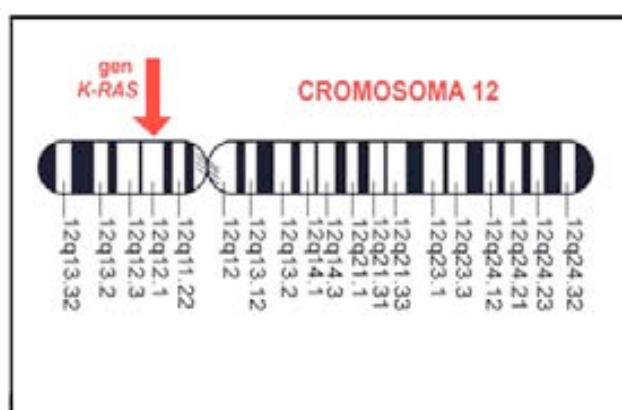


Figura 5: Localització del gen *K-RAS* en el cromosoma 12

El gen *KRAS* codifica per una proteïna de 21kDA que s'uneix al GTP i al GDP. La proteïna *KRAS* fa de nexa entre l'EGFR i el nucli controlant els processos de la cascada de reaccions intracitoplasmàtiques. (Figura 4)

La forma hidrofílica de *KRAS* necessita una modificació post-traduccional per prenilació per la seva activació. La proteïna *KRAS* té un residu CAAX: 1 cisteïna (C), 2 aminoàcids alifàtics (AA) i qualsevol aminoàcid (X) C-terminal. Aquesta seqüència CAAX és sotmesa a una farnesilació o geranilació post-traduccional. L'enzim farnesilproteintransferasa (FTasa) fa que el grup farnesil de 15 carbonis de la cadena de farnesilpirofosfat s'uneixi al residu de cisteïna tancant el grup carboxil terminal. Quan aquest enzim FTasa està inhibit, *KRAS* es podrà geranilgeranilitzar mitjançant l'enzim geranilgeraniltransferasa i d'aquesta manera el grup de 20 carbonis de la cadena de geranilgeranilfosfat es pot unir a *KRAS*. Després de la isoprenilació de *RAS*, la proteasa endopeptidasa RCE1 separa els aminoàcids AAX del grup carboxil terminal.

Aquesta nova terminació és metilada per l'enzim isoprenilcisteïna carboxil metiltransferassa i RAS és transportat cap a la membrana cel·lular. Com a conseqüència d'aquesta modificació post-traducciona, KRAS esdevé més hidrofòbica i es desplaça del citosol i s'enganxa a la membrana cel·lular pel grup farnesil o pel grup geranilgeranil. L'associació de KRAS amb la membrana cel·lular és crucial per la funció de senyalització. La forma inactiva de KRAS està unida a GDP i l'activació passa quan hi ha una conversió de GDP a GTP, controlat pels factors d'intercanvi de la guanina (GEF). En les cèl·lules normals la ratio GDP/GTP és controlada tant pels GEF com per l'activació dels enzims proteïna activadora de GTPases (GAPs). La forma activa de KRAS és hidrolitzada per GAPs i retorna a l'estat inactiu.⁴⁴ (Figura 6).

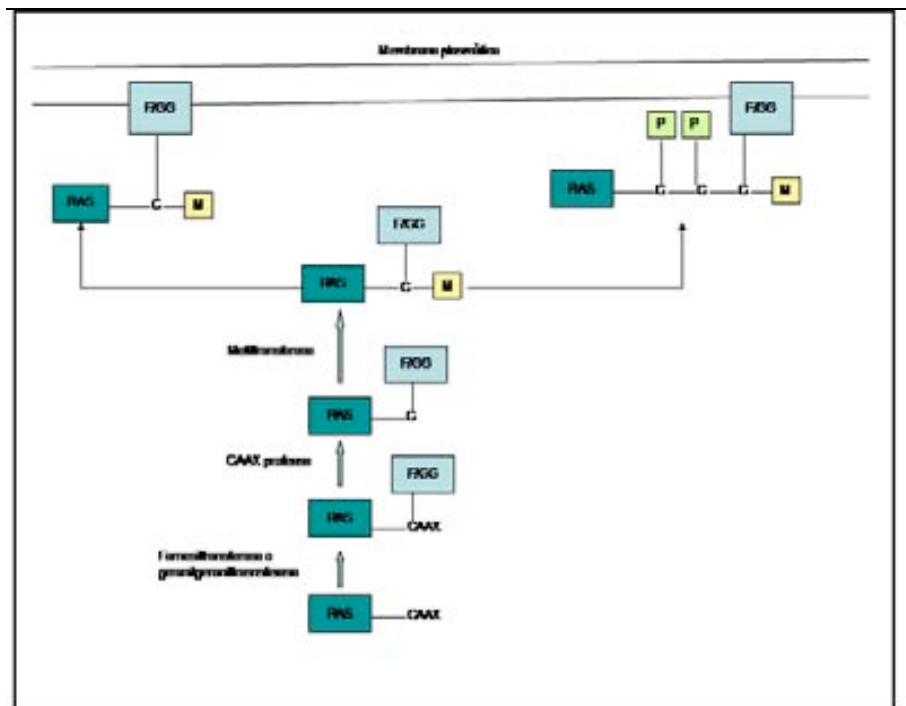


Figura 6: Modificació post-traducciona de la proteïna RAS.
(F=farnesilpirofosfat; **GG=geranilgeranilpirofosfat**; **M=grup metil**; **P=grup palmitoil**)

Les proteïnes RAS es localitzen, com ja hem vist, en la part interna de la membrana cel·lular i poden ser activades (quan estan unides a GTP) o inactivades (unides a GDP) en funció dels estímuls fisiològics extracel·lulars (com per exemple, factors de creixement, citoquines, senyals d'adhesió)

gràcies als receptors específics de la superfície cel·lular. La interacció de factors de creixement específics (p.ex. *Epidermal Growth Factor*) amb els receptors de membrana tirosin quinasa indueix a l'autofosforilació d'aquests receptors, produint un residu tirosin específic. Existeixen unes proteïnes, com *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*, que interaccionen amb les proteïnes fosforilades del receptor en els dominis SH2 i fan que les proteïnes RAS/GEF s'uneixin a través del domini SH3. L'activació de RAS promou diferents funcions a través de vies transduccionals com RAS/RAF, RAS/PI3-K i RAS/RAL. S'ha de destacar que mentre que les proteïnes RAS natives s'inactiven després d'un temps curt, les proteïnes RAS mutades continuen activades.⁴⁵

Entre un 30-50 % dels CCR tenen mutacions en l'oncogèn *KRAS*. S'han descrit més de 3.000 punts de mutació el *KRAS*.⁴⁶ La majoria de les mutacions es donen en el codó 12 (~82%) i en el codó 13 (~17%) de l'exó 2, tot i que entre 1-4% de mutacions es donen en els codons 61 i 146.⁴⁷ Les mutacions més freqüents en el codó 12 i 13 es mostren en la taula 4.

Mutacions Codó 12	Tipus Mutació	Mutacions Codó 13	Tipus Mutació
GGT (glicina) →AGT (serina)	G-A transició	GGC (glicina)→GAC (aspàrtic)	G-A transició
GGT (glicina) →GAT (aspàtic)	G-A transició	GGC (glicina)→TGC (cisteïna)	G-T transversió
GGT (glicina) →TGT (cisteïna)	G-T transversió	GGC (glicina)→GTC (valina)	G-T transversió
GGT (glicina) →GTT (valina)	G-T transversió	GGC(glicina)→CGC (arginina)	G-C transversió
GGT (glicina) →CGT (arginina)	G-C transversió	GGC (glicina)→GCC (alanina)	G-C transversió
GGT (glicina) →GCT (alanina)	G-C transversió	GGC (glicina)→AGC (serina)	G-A transició

Taula 4: Mutacions més freqüents en *K-RAS* (Gly=glicina, Ser=serina, Asp=aspàrtic, Cys=cisteïna, Val=valina, Arg=arginina, Ala=alanina)

En el codó 12, el 33% de les mutacions observades es donen de G a A, provocant el canvi de l'aminoàcid glicina per aspàrtic i en un 31% de G a T, conduint al canvi de glicina a valina. En el codó 13, un 94% de les mutacions (que representen el 21% de totes les mutacions de *KRAS*) són per transició de G a A, el que implica el canvi de l'aminoàcid glicina per aspàrtic.⁴⁸ (Taula 5).

Mutacions activants de <i>KRAS</i> i relació amb càncer de còlon				
Codó	Tipus mutació	Codó no mutat (aminoàcid)	Codó mutat (aminoàcid)	Freqüència en CCR
12	G>A	GGT (glicina)	GAT (aspàrtic)	33% de totes les mutacions de <i>KRAS</i>
12	G>T	GGT (glicina)	GTT (valina)	31% de totes les mutacions de <i>KRAS</i>
13	G>A	GGC (glicina)	GAC (aspàrtic)	21% de totes les mutacions de <i>KRAS</i>

Taula 5: Mutacions activants en *K-RAS*

Les mutacions de guanina per adenina estan associades amb el silenciament epigenètic de metilguanina metiltransferasa.⁴⁴ Les formes mutants de la proteïna RAS tenen una debilitat intrínseca per l'acció de les GTPases i són insensibles a l'acció de les GAPs, i per tant, són incapaces de desconnectar la transmissió del senyal. Com a conseqüència de l'acció reguladora negativa de GAP, les proteïnes RAS no mutades es troben unides a la forma inactiva GDP en les cèl·lules no estimulades, mentre que en les formes oncogèniques de les proteïnes RAS continuen unides a GTP.⁴⁹

1.7.2 L'oncogèn *K-RAS* com a factor pronòstic

L'any 1988, abans de proposar el model de tumorigènesi, Vogelstein, Fearon i col.⁵⁰ van fer un estudi de les alteracions genètiques durant el procés de desenvolupament dels tumors colorectals, on van veure que les mutacions en

K-RAS tenien lloc en els estadis inicials de la patogènesi del CCR. Van demostrar que en el 50% dels adenomes hi havia mutacions en *K-RAS* i van descriure-ho com l'alteració genètica clau per la progressió d'adenoma a carcinoma. Per tant, el fet que entre un 30%-50% dels CCR presentin mutacions en *K-RAS* ha fet pensar que això podria comportar un pitjor pronòstic. Amb aquesta intenció s'han fet nombrosos estudis per avaluar si la presència de mutacions en *K-RAS* es pot utilitzar com a factor pronòstic, però els resultats no són concloents, perquè hi ha discrepància entre els estudis (51,52,53,54,55,56,57,58). El 1998 Andreyev i col.⁵⁹ van publicar un treball on es recollien dades clinicopatològiques de 2721 pacients procedents d'un estudi multicèntric de 22 grups provinents de 13 països. Van arribar a la conclusió que les mutacions en *K-RAS* estaven associades amb un major risc de recaiguda ($p > 0,001$) i de mort ($p = 0,004$), i que les mutacions en el codó 12 on es substituïa una guanina per una timina, sent el canvi més freqüent de GGT a GTT (on l'aminoàcid resultant és una valina en lloc d'una glicina) es comportaven com un factor pronòstic independent, incrementant el risc de recurrència ($p = 0,007$) i de mort ($p = 0,004$). Andreyev i col.⁶⁰, el 2001, van ampliar aquest estudi, anomenat RASCAL II, incloent 3439 pacients procedents de 42 centres de 21 països diferents. Aquest segon estudi, no obstant, només va poder confirmar que la mutació G12V tenia significació pronòstica respecte el temps lliure de malaltia ($p = 0,004$, HR=1,3) i la supervivència ($p = 0,008$, HR=1,45) i que els pacients en estadi Dukes C portadors d'aquesta mutació específica G12V tenien un risc d'un 50% més de malaltia ($p = 0,008$, HR=1,5) o de mort ($p = 0,002$, HR=1,45) que els pacients d'estadi Dukes B (temps lliure de malaltia $p = 0,46$, HR=1,12 i supervivència $p = 0,36$, HR=1,15).

Ren i col.⁶¹ van fer una extensa revisió d'unes bases de dades bibliogràfiques publicades des de gener de 1992 fins el novembre de 2011 i van analitzar 23 estudis comparables entre ells, amb un total de 4687 pacients, on van trobar com a mitjana un 29% de mutació en el gen *K-RAS*. Van arribar a la conclusió que no hi ha una associació estadísticament significativa entre la presència de mutacions en *K-RAS* i el temps de supervivència ($p = 0,11$, HR=1,04).

1.7.3 L'oncogèn *K-RAS* com a factor predictiu

A principis de 2009 l'*American Society for Clinical Oncology*⁶² i *The National Comprehensive Cancer Network*⁶³ van revisar les directrius de la pràctica clínica pels CCR, i van proposar la necessitat de la determinació de les mutacions en *K-RAS* en pacients amb CCRm per seleccionar aquells pacients que poden rebre teràpia amb cetuximab o panitumumab. S'han fet molts estudis comparant la presència o no de les mutacions en *KRAS* en pacients amb CCRm i la resposta al tractament amb cetuximab o panitumumab, observant un temps de supervivència i un temps lliure de malaltia més llarg estadísticament significatiu en pacients amb *KRAS* natiu.⁶⁴ (Taula 6).

Estudi	Tractament	Total de pacient inclòs en l'anàlisi, N (K-RAS mutats, %)	Resposta objectiva, %		TLM/TDP		TST	
			Natiu	Mutat	Natiu	Mutat	Natiu	Mutat
Di Fiore ⁶⁵	C ± I	281 (37%)	27,4	0	24 set	12 set	44 set	36 set
Valor P			NN		< 0,0001		<0,0001	
De Roock ⁶⁶	C ± I	113 (41%)	25	0	24 set	12 set	43 set	27,3 set
Valor P			NN		0,074		0,02	
Cohn ⁶⁷	P + I	109 (41%)	22	19	26 set	19 set	20 set	15 set
Valor P			NN		NN		NN	
Lièvre ⁶⁸	C ± I	114 (27%)	40	0	31,4 set	10,1 set	14,3 mesos	10,1 mesos
Valor P			<0,001		0,0001		0,026	
Benvenuti ⁶⁹	C o P ± I	48 (33%)	31	6	NN	NN	NN	NN
Valor P			NN		-		-	
Di Fiore ⁷⁰	C ± I o O	59 (27%)	28	0	5,5 mesos	3,0 mesos	NN	NN
Valor P			NN		0,15		-	
Finocchiaro ⁷¹	C ± I o O	81 (40%)	26	6	6,1 mesos	3,7 mesos	10,8 mesos	-
Valor P			0,02		0,07		NN	
Khambata-Ford ³⁴	C	80 (38%)	10	0	61 dies	59 dies	NN	NN
Valor P			0,0003		0,14		-	
Freeman ⁷²	P	62 (39%)	11	0	HR (natiu vs. Mutat) = 0,4		HR (natiu vs. Mutat) = 0,5	
Valor P			NN		NN		NN	
Lièvre ⁷³	C ± I	30 (43%)	37	0	NN	NN	16,3 mesos	6,9 mesos
Valor P			0,0003		-		0,016	

Taula 6: Taula comparativa de varis estudis amb cetuximab o panitumumab (Taula de Bekaii-Saab⁶⁴) Abreviacions: C= cetuximab; HR= hazard ratio; I= Irinotecan; NN: no notificat; O= oxaliplatí; P= panitumumab; TLM= temps lliure de malaltia; TST= temps supervivència total.

1.7.4 Mètodes de detecció de mutacions en *K-RAS*

Hi ha uns principis bàsics generals per l'estudi molecular dels tumors sòlids, com són la puresa del tumor, la fixació i processament dels teixits i la quantitat de tumor. La puresa del tumor dependrà de la quantitat de teixit no tumoral, la necrosis, la presència de cèl·lules inflamatòries, etc i això serà important per evitar falsos negatius deguts a la contaminació d'elements no tumorals. La fixació també és determinant per l'èxit de les tècniques moleculars, ja que alguns fixadors com l'àcid pícric o solucions descalcificadores no són aptes per les tècniques moleculars. El fixador més habitual de les peces quirúrgiques és el formol, i si el temps de fixació és superior de 24 hores, es produeix una degradació del DNA per encreuament de les proteïnes. La mida de la mostra tumoral també serà clau a l'hora que una tècnica molecular es pugui fer amb èxit, donat que alguns assaigs necessiten una quantitat mínima de DNA perquè l'especificitat i la sensibilitat d'aquesta tècnica no es vegin afectades.

Hi ha altres variables que ens poden alterar el resultat d'una tècnica molecular, com és, per exemple, si el pacient ha rebut quimioteràpia neoadjuvant, perquè això farà que la presència de cèl·lules tumorals sigui molt baixa i aquestes es trobin distribuïdes enmig d'un fons de teixit fibrós o reactiu; per evitar aquest problema, el millor seria obtenir una mostra tumoral pretractament; si això no és possible, s'ha de fer una microdissecció tumoral per obtenir el màxim de cèl·lules tumorals o també es pot fer una amplificació de tot el genoma (*whole genome amplification WGA*) abans de la determinació de les mutacions.⁷⁴

Un test de detecció de mutacions, idealment, hauria de distingir entre els pacients que respondran al tractament i els que no; però actualment només poden seleccionar els pacients portadors d'aquesta mutació, sense poder determinar si respondran o no al tractament.⁴⁷ Hi ha varies tècniques utilitzades per la detecció de les mutacions en *K-RAS* i dependrà de les disponibilitats de cada laboratori l'ús d'una tècnica en concret; ara bé, en totes les tècniques s'ha de fer prèviament una amplificació en cadena de la polimerasa (PCR). Hi ha varies tècniques: la seqüenciació directa, la piroseqüenciació, PCR a temps real (PCR-RT) amb sondes fluorescents tipus Scorpion (Amplification refractory mutation system ARMS), High resolution melting (HRM), polimorfismes en la

longitud en els fragments de restricció (RFLP), etc. Cada mètode té una sensibilitat (capacitat de detectar un DNA mutat enmig d'un fons de DNA no mutat) un temps d'assaig i un cost diferents, però l'elecció es basa, com hem dit abans, en criteris de disponibilitat de cada laboratori.⁷⁵

La seqüenciació directa es basa en la incorporació de deoxinucleòsids trifosfats (dNTP) de forma que cada una de les quatre bases conté un fluorocrom que es detecta pel sistema de lectura. El mètode utilitzat actualment és el de finalització de cadena: la DNA polimerasa va incorporant dNTP fins que s'incorpora un didesoxinucleòsid trifosfat (ddNTP), que no té el grup hidroxil en posició 3' del sucre, necessari per la formació del següent enllaç fosfodièster. La incorporació d'un ddNTP impedeix la incorporació de successius dNTP o ddNTP. Aquest pas es repetirà unes 25-30 vegades de manera que, per atzar, obtindrem cadenes còpia de la mostra de DNA de diferents longituds amb ddNTP que finalitzen la cadena. Aquests ddNTP estan marcats amb diferents fluorocroms i serà aquest marcatge el que ens permetrà la lectura posterior de la seqüència, realitzant una electroforesi en gel de poliacrilamida. La sensibilitat d'aquesta tècnica està entre un 12-20%, però permet la detecció de qualsevol mutació.

La piroseqüenciació és un mètode similar a la seqüenciació directa, però la detecció no es basa en el marcatge dels nucleòtids amb fluorocroms sinó que quan s'incorpora un nucleòtid a la cadena genera un pirofosfat que es converteix en llum que es tradueix en un pic en la representació informàtica. L'excés de nucleòtids és degradat abans de l'addició de la següent base i d'aquesta forma es pot avaluar la incorporació dels diferents nucleòtids. L'alçada dels pics és proporcional al nombre de nucleòtids que s'incorporen i el pirograma ens proporcionarà informació de la seqüència. La sensibilitat d'aquesta tècnica està entre un 2-10%.

La HRM permet la detecció de mutacions, polimorfismes o canvis en l'estat de metilació de la doble cadena de DNA. Amb tecnologia PCR-RT es visualitzen els canvis en les corbes d'hibridació utilitzant fluorocroms. Els fluorocroms s'uneixen a la doble cadena de DNA, de manera que la fluorescència només apareix quan s'arriba a la temperatura d'hibridació. Quan la seqüència conté canvis en heterozigotitat o en homozigotitat, el perfil de la corba canviarà, i així

es podrà identificar la mostra que conté aquest canvi. Aquesta tècnica té una sensibilitat del voltant del 5%.⁷⁶

La tècnica ARMS consisteix en la combinació de dues sondes: les sondes ARMS i les sondes Scorpions. Les sondes ARMS permeten una amplificació específica dels al·lels o les mutacions. L'enzim Taq DNA polimerasa resulta extremadament eficaç per diferenciar entre una coincidència i un error de coincidència en l'extrem 3' d'un cebador de PCR. Algunes seqüències mutades es poden amplificar de manera selectiva, inclús en mostres on la majoria de les seqüències no presenten la mutació. La detecció de l'amplificació es realitza amb les sondes Scorpions. Scorpions és una tècnica de molècules bifuncionals que contenen un cebador de PCR unit covalentment a una sonda. El fluoròfor d'aquesta sonda interactua amb un silenciador, també incorporat a la sonda, que redueix la fluorescència. Durant la reacció de PCR, quan la sonda s'uneix a l'amplicó, es separa el fluoròfor i el silenciador. El resultat és un augment de fluorescència en el tub de reacció. Aquesta tècnica té una sensibilitat del 1%, existint un kit comercial amb certificat CE, tot i que és un kit tancat on es detecten 7 mutacions, 6 en el codó 12 i 1 en el codó 13 de l'exó 2 de *K-RAS*.

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

2 HIPÒTESIS I OBJECTIUS

2.1 Hipòtesis

1. Els individus amb càncer de còlon amb mutacions de *K-RAS* tindran un temps lliure de malaltia i una supervivència menor que els pacients no portadors de la mutació.
2. L'estatus mutacional de *K-RAS* és un factor pronòstic independent en càncer de còlon.

2.2 Objectius

1. Determinar la presència de mutacions en el gen *K-RAS* en mostres tumorals de còlon.
2. Valorar el temps lliure de malaltia en relació a la presència o no d'aquestes mutacions.
3. Valorar la supervivència global dels pacients en relació a aquesta mutació.
4. Valorar si la mutació de *K-RAS* es comporta com un factor pronòstic independent.

MATERIAL I MÈTODES

3 MATERIAL I MÈTODES

3.1 Població estudiada

Aquest estudi va rebre l'aprovació del Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari Mútua Terrassa el 22 de juny de 2011.

Es van seleccionar tots els pacients diagnosticats de CCR a l'Hospital Universitari Mútua Terrassa entre els anys 2004-2005 per tenir com a mínim 5 anys de seguiment. Els criteris d'inclusió dels pacients en l'estudi van ser els següents:

- Disposar de peça quirúrgica o biòpsia endoscòpica
- Disposar de seguiment clínic en el nostre hospital
- No ser èxits en la intervenció o en el post-operatori immediat

Els pacients que no es van poder incloure en l'estudi van ser:

- 9 pacients es van excloure perquè van ser èxits en la intervenció o en el post-operatori immediat
- 12 pacients en van excloure perquè no es tenia seguiment clínic
- 1 pacient es va excloure perquè no quedava tumor residual en la peça i no es disposava de biòpsia endoscòpica prèvia ni presentava metàstasi

Tenint en compte aquests criteris es van seleccionar els següents pacients:

- 220 pacients tenien peça quirúrgica
- 14 pacients no tenien teixit tumoral en la peça quirúrgica o bé perquè hi havia molta necrosi o bé perquè no quedava tumor residual perquè havien rebut tractament neoadjuvant i per tant es va utilitzar la biòpsia endoscòpica prèvia a la cirurgia
- en un pacient es va utilitzar teixit tumoral obtingut d'una metàstasi pulmonar del CCR perquè no es disposava de cap altre mostra tumoral

Per tant, el número total de pacients estudiats va ser de 235.

3.2 Metodologia experimental

3.2.1 Selecció dels tumors

En tots els casos, entre els blocs de teixit tumoral inclosos en parafina, es va seleccionar el que vam considerar de més qualitat o més representatiu. En una secció d'aquests blocs, tenyida amb hematoxilina-eosina, es va seleccionar l'àrea on hi havia més quantitat de cèl·lules tumorals, i es van evitar les zones amb teixit estromal, teixit adipós i necrosi. D'aquestes zones seleccionades es van fer 4 talls de 10 µm cada un i es van col·locar en un tub ependorf fins el moment de l'extracció del DNA (Figura 7).

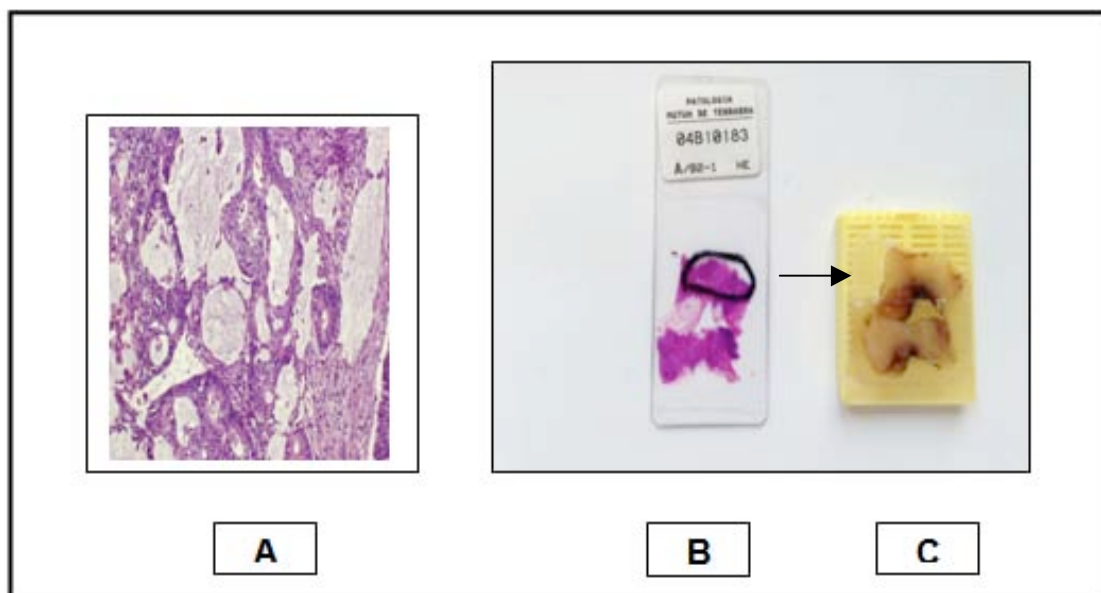


Figura 7: Fotografia il·lustrativa del procés de microdissecció. (A) Carcinoma infiltrant x10 tenyit amb hemtoxilina-eosina. (B) Zona seleccionada del tall microscòpic. (C) Bloc parafinat del teixit tumoral.

3.2.2 Extracció i quantificació del DNA

L'extracció del DNA es va fer seguint el protocol del kit comercial *Qiagen DNA extraction FFPE QIAamp®* per mostres parafinades.

El protocol és el següent:

1. S'incuba durant 5 minuts amb 1000µl de xilol a temperatura ambient i es vorteja
2. Es centrifuga durant 2 minuts a 13200 rpm
3. Es retira el xilol
4. Es repeteixen els passos 1-3
5. S'incuba durant 5 minuts amb 1000 µl d'etanol a temperatura ambient i es vorteja
6. Es centrifuga durant 2 minuts a 13200 rpm
7. Es retira l'etanol
8. Es repeteixen els passos 5-7
9. S'incuba en un termoblock a 37°C durant 15 minuts
10. S'afegeix 20µl de proteïnasa K i 180µl de Buffer ATL i es vorteja
11. S'incuba tota la nit a 56°C
12. S'incuba 1 hora a 90°C
13. Es centrifuga breument el tub
14. S'afegeix 200µl de Buffer AL i 200µl d'etanol i es vorteja
15. Es centrifuga breument el tub
16. S'aspira el sobrenedant i es posar en una columna de precipitació (*QIAamp MinElute*)
17. Es centrifuga durant 1 minut a 800 rpm
18. Es posa la columna de precipitació en un tub net
19. S'afegeix 500µl de Buffer de rentat numero 1
20. Es posa la columna de precipitació en un tub col·lector net
21. Es centrifuga durant 1 minut a 800 rpm
22. S'afegeix 500µl de Buffer de rentat numero 2
23. Es centrifuga durant 1 minut a 800rpm

24. Es posa la columna de precipitació en un tub col·lector net
25. Es centrifuga durant 3 minuts a 13200 rpm
26. Es posa la columna de precipitació en un tub ependorf net
27. S'incuba 5 minuts amb 50µl de Buffer ATE
28. Es centrifuga 1 minut a 13200 rpm
29. El DNA es guarda a -18°C fins el moment de la quantificació.

La qualitat i la concentració de les mostres de DNA es van determinar amb l'espectrofotòmetre NanoDrop 2000, que mesura l'absorbància de les longituds d'ona de la llum ultraviolada. L'absorbància del DNA és màxima a 260nm, el valor de la lectura a 230nm (longitud d'ona mínima d'absorbància del DNA) està influenciada per la quantitat de sals presents en la mostra i la longitud d'ona de 280nm és específica per les proteïnes. Per tant, en funció de les relacions 260/280 i 260/230 es pot establir el grau de puresa de la mostra.

El procés de mesura consisteix en la introducció de 1-2µl de mostra en el NanoDrop 2000, el qual mesura l'absorbància de la mostra a 230nm, 260nm i 280nm.

Es van rebutjar les mostres de DNA inferiors a 20 µg/µl i les que no tenien la ratio 260/280 aproximadament a 2. El DNA resultant es va diluir amb aigua a una concentració de 50 ng/µl. Les mostres es van mantenir a -18°C fins el moment de la seva utilització.

3.2.3 Detecció de mutacions en *K-RAS*

Per la detecció de les mutacions de *K-RAS* s'ha utilitzat el kit comercial *Therascreen®KRAS PCR kit* (aprovat per la Comunitat Europea), que detecta 7 mutacions (6 en el codó 12 i 1 mutació en el codó 13) en l'exó 2 del gen *K-RAS* i combina dues tecnologies, ARMS® i Scorpions® per la detecció de les mutacions mitjançant assaigs realitzats amb la tècnica de PCR-RT. L'ARMS permet dur a terme una amplificació específica dels al·lels i Scorpions permet la

detecció de l'amplificació. Els assaigs en temps real de Scorpions utilitzen el número de cicles de PCR necessaris per detectar una senyal de fluorescència superior a la senyal de referència com a mesura de les molècules diana presents a l'inici de la reacció. El punt en el que es detecta una senyal superior a la lectura de la fluorescència de referència s'anomena "cicle llindar" (Ct). El càlcul dels valors de ΔCt d'una mostra s'obtenen de la diferència entre el valor de Ct de l'assaig de mutació i el valor de Ct de l'assaig de control d'una mateixa mostra. Les mostres es classifiquen com a positives per a mutacions si el seu valor de ΔCt és inferior al valor de ΔCt del 1% corresponent a aquest assaig. Per sobre d'aquest valor es considera que la mostra conté menys d'un 1% de mutacions (per sobre dels límits de l'assaig) o que la mostra és negativa per la mutació.

El kit de *K-RAS* consta de 8 assaigs: un assaig de control i 7 assaigs de mutacions. L'assaig de control serveix per valorar el DNA total de la mostra i amplifica una regió de l'exó 4 del gen *K-RAS*. En cada determinació s'utilitza l'estàndard (subministrat pel kit) com a control positiu i aigua (la que hem utilitzat per les dilucions del DNA) com a control negatiu. Es fa una mescla de reacció amb 19,8 μ l per l'assaig control i també per cada assaig de mutació i s'hi afegeix 0,2 μ l de l'enzim Taq (subministrat pel kit). A aquests 20 μ l s'hi afegeix 5 μ l de l'estàndard (pel control positiu), 5 μ l d'aigua (pel control negatiu) i 5 μ l de cada un del DNA de les mostres que es volen analitzar.

L'aparell de PCR-RT que s'ha utilitzat és l'ABI7300 d'Applied BioSystems i les condicions del termociclador són les que s'expressen en la taula 7.

Temperatura	Temps	Cicles
Fase 1		
95°C	4 min.	1
Fase 2		
95°	30 seg.	40
60°	1 min.	

Taula 7: Condicions del termociclador

Un cop passat els 40 cicles es procedeix a l'anàlisi dels resultats, definint manualment el llindar en la meitat de la fase exponencial, i posteriorment es fa el càlcul del valor de ΔCt de la següent forma:

$\Delta Ct = [Ct \text{ de l'assaig de mutació de la mostra}] - [Ct \text{ de l'assaig de control de la mostra}]$.

Els valors de ΔCt de l'estàndard han de ser els indicats en la taula 8:

Assaig	ΔCt de l'estàndard	Interval acceptable de l'estàndard	ΔCt de l'1% de la mostra
12ALA	-0,70	-2,70 fins 1,30	6,5
12ASP	-1,04	-3,04 fins 0,96	8
12ARG	-0,02	-2,02 fins 1,98	8
12CYS	-0,98	-2,98 fins 1,02	7
12SER	-0,02	-1,98 fins 2,02	9
12VAL	-0,19	2,19 fins 1,81	6,5
13ASP	-1,12	-3,12 fins 0,88	9

Taula 8: Valors de ΔCt de l'estàndard

Un cop fet els càlculs del ΔCt , les mostres es classifiquen com a negatives per la mutació si el valor és més gran que els valors de ΔCt de referència. Si els valors del ΔCt són inferiors als valors de referència, les mostres es classifiquen com a mutades.

3.2.4 Variables clinicopatològiques

De cada pacient es van recollir una sèrie de variables clinicopatològiques, incloent totes les variables reconegudes en l'actualitat amb significació pronòstica. Aquestes variables van ser: edat, sexe, localització del tumor, tipus histològic, grau de diferenciació del tumor, invasió limfàtica, invasió venosa intramural o extramural, invasió perineural, afectació dels marges, classificació TNM, quimioteràpia neoadjuvant o adjuvant i nombre de cicles de cada una, presència de recidiva local, presència de metàstasis pulmonars, hepàtiques o en altres localitzacions i quimioteràpia per les metàstasis (incloent cetuximab), nivells de CEA, èxits i situació actual així com la presència de mutacions en *K-RAS* i el tipus de codó mutat. No totes les variables que es van recollir s'han utilitzat en l'estudi estadístic com es veurà més endavant, ja que algunes d'aquestes variables o es presentaven en molt pocs casos (com per exemple el tractament amb cetuximab que només l'havien rebut 12 pacients), o perquè les dades es desconeixien en molts casos (com per exemple els nivells de CEA en sang).

3.3 Anàlisi estadística

Es planteja la presència de mutacions en *K-RAS* com estudi de factors pronòstic respecte el temps lliure de malaltia i el temps de supervivència total amb un seguiment mínim de 5 anys des del moment del diagnòstic de la malaltia.

En tots els estudis de comparació es va acceptar un nivell de significació de 0,05.

Per l'estudi de comparació de variables s'han utilitzat les proves de Khi-quadrat per les variables qualitatives. Es van realitzar test de Kolmogorov-Smirnov per veure si les variables quantitatives tenien una distribució normal. Amb les variables que tenien una distribució normal es van fer estudis de comparació

utilitzant test paramètrics de T-Student o correlació de Pearson i amb les que no tenien una distribució normal es van aplicar estudis de comparació amb test no paramètrics de Rho de Spearman i U de Mann-Whitney.

Per l'estudi del temps lliure de malaltia i per la supervivència total es va utilitzar el mètode de Kaplan-Meier. Es van definir 2 intervals de temps: temps lliure de malaltia i temps de supervivència global. Pel temps lliure de malaltia, l'interval de temps es va considerar com el temps transcorregut des del moment del diagnòstic o del tractament quirúrgic amb intenció curativa fins a la presència de les metàstasis si n'hi havia o fins el moment actual. L'estat (status) va ser la presència o absència de metàstasis i el factor es va anar modificant segons les variables d'interès. De la mateixa forma, per estudiar la supervivència global, l'interval de temps va correspondre al temps transcorregut des del moment del diagnòstic fins a l'esdeveniment de l'èxitus (si va tenir lloc) o fins el moment actual. L'estat va correspondre a la mort o no i el factor va correspondre a cada una de les variables de l'estudi.

L'anàlisi multivariable es va fer amb el model de regressió de Cox, utilitzant les variables que clàssicament estan reconegudes que tenen una influència sobre la supervivència. Aquest tipus d'anàlisi té com objectiu esbrinar la importància relativa que cada variable d'interès té en el resultat de mort o metàstasis en el temps. D'aquesta manera, és possible quantificar el valor pronòstic independent de les variables analitzades.

El programa estadístic utilitzat per a la realització de l'estudi va ser el paquet SPSS versió 19.

RESULTATS

4 RESULTATS

4.1 Estudis descriptius

Es van recollir una sèrie de variables clinicopatològiques de cada un dels 235 pacients inclosos en l'estudi. La distribució per sexes va ser de 150 homes (63,8%) i 85 dones (36,2%), amb una ràtio entre homes i dones de 1,76. La mitjana d'edat va ser de 66,98 anys (amb un rang entre 30 anys-92 anys).

Els tumors es van agrupar en 3 localitzacions:

- Còlon dret: tumors localitzats en el còlon ascendent, cec, còlon transvers i angle hepàtic (n=71, 30,2%).
- Còlon esquerre: tumors localitzats en el còlon descendent, angle esplènic i sigma (n=90, 38,3%).
- Recte: tumors localitzats en el recte (n=74, 31,5%).

Respecte el tipus histològic, 222 (94,5%) tumors es van classificar com adenocarcinoma i 13 (5,5%) es van classificar com a carcinomes mucinosos. Majoritàriament els tumors eren de baix grau (n=224, 95,3%) i els restants d'alt grau (n=11, 4,7%).

També es va mirar si els tumors presentaven invasió limfàtica (n=62, 26,4%) o no en presentaven (n=152, 64,7%). Invasió venosa intramural la presentaven 182 (77,4%) tumors i 15 (6,4%) tumors no la presentaven. Respecte la invasió venosa extramural, 210 (89,4%) tumors no en tenien i 19 (8,1%) tumors si que en presentaven. Respecte la invasió perineural, 142 (60,4%) tumors no en tenien i 60 (25,5%) si que en presentaven.

Respecte la classificació pT, que ens indica el nivell d'infiltració del tumor vam trobar 5 categories:

- Tis: el tumor està limitat a la zona mucosa (n= 7, 3% tumors)
- T1: el tumor infiltra la capa submucosa (n=10, 4,8% tumors)
-
- T2: el tumor infiltra la capa muscular pròpia (n=41, 17,8% tumors)
- T3: el tumor infiltra la subserosa (n=142, 60,4% tumors)
- T4: el tumor infiltra peritoni visceral o altres òrgans i estructures (n= 30, 12,8% tumors)

Segons la infiltració dels nòduls limfàtics, els tumors es van classificar en tres categories:

- N0: no hi ha cap nòdul limfàtic infiltrat (n=141, 60% tumors)
- N1: entre 1 i 3 nòduls limfàtics infiltrats (n=57, 24,3% tumors)
- N2: més de 3 nòduls limfàtics infiltrats (n=27, 11,5% tumors)

L'estudi de l'estatus mutacional de *K-RAS* va determinar que 137 (58,3%) tumors no tenien mutacions en cap dels 7 codons que es van estudiar i per tant es van classificar com a nadius i 98 (41,7%) tumors presentaven una mutació en algun dels 7 codons estudiats i es van classificar com a mutats.

Totes aquestes variables s'expressen en la taula 9.

Variable	Grup d'estudi n=235	%
Edat		
-Mitjana	66,98 anys	
-Rang	30-92 anys	
Sexe		
-Homes	150	63,8
-Dones	85	36,2
Localització del tumor		
-còlon dret	71	30,2
-còlon esquerre	90	38,3
-recte	74	31,5
Tipus histològic		
-adenocarcinoma	222	94,5
-carcinoma mucinos	13	5,5
Grau tumoral		
-alt	11	4,7
-baix	224	95,3
Invasió limfàtica		
-no	152	64,7
-si	62	26,4
-valor faltant	21	8,9
Invasió venosa intramural		
-no	182	77,4
-si	15	6,4
-valor faltant	38	16,2
Invasió venosa extramural		
-no	210	89,4
-si	19	8,1
-valor faltant	6	2,6
Invasió perineural		
-no	142	60,4
-si	60	25,5
-valor faltant	33	14,0
Classificació pT		
-T0	7	3,0
-T1	10	4,3
-T2	41	17,8
-T3	142	60,4
-T4	30	12,8
-valor faltant	5	2,1
Infiltració nòduls limfàtics		
-N0	141	60,0
-N1	57	24,3
-N2	27	11,5
-valor faltant	10	4,3
Mutació <i>K-RAS</i>		
-natiu	137	58,3
-mutat	98	41,7

Taula 9: Característiques clinicopatològiques dels pacients

Dels 98 tumors que presentaven alguna mutació, 83 (84,7%) tumors presentaven les mutacions en el codó 12 i 15 (15,3%) en el codó 13. La distribució segons el tipus de mutació va ser la que s'expressa en la següent taula (Taula 10).

Tipus de mutació	Freqüència (n total 98)	Percentatge
12 ALA	5	5,1
12 ARG	1	1,1
12 ASP	35	35,7
12 CYS	8	8,1
12 SER	10	10,2
12 VAL	24	24,5
13 ASP	15	15,3

Taula 10: Freqüència de cada una de les 7 mutacions en *K-RAS* analitzades

La classificació segons els estadis va ser (Taula 11):

Estadi	Freqüència	Percentatge
Estadi I	52	22,1
Estadi II	86	36,6
Estadi III	65	27,7
Estadi IV	32	13,6
Total	235	100,0

Taula 11: Distribució segons els estadis

També es va recopilar els pacients que havien tingut recidives locals, així com metàstasis pulmonars, hepàtiques o en altres localitzacions (metàstasis cerebrals, peritoneals, adenopàtiques), per tal de poder calcular el temps lliure de malaltia. Els valors s'expressen en al següent taula (Taula 12).

Variable	Categoria	Grup d'estudi n=235	%
Recidiva local	No	221	94,0
	Si	14	6,0
M1 pulmonars	No	187	79,6
	Si	48	20,4
M1 hepàtiques	No	173	73,6
	Si	62	26,4
M1 altres localitzacions	No	183	77,9
	Si	52	22,1

Taula 12: Incidència de les metàstasis i les recidives
(M1=metàstasis)

Els pacients es van classificar segons si van ser èxits per malaltia o èxits lliure de malaltia. No obstant, pels estudis de supervivència total s'han englobat tots els pacients èxits independentment de la causa. Tal com s'observa en la següent taula (Taula 13), 124 (52,8%) pacients estaven vius en la data de finalització de l'estudi i 111 (47,2%) dels pacients havien mort dins el nostre període de seguiment.

Èxits	Freqüència	Percentatge
No	124	52,8
Si	111	47,2
Total	235	100,0

Taula 13: Freqüència dels pacients èxits i els pacients no èxits

Tal com observem en la següent taula (Taula 14) dels 111 pacients que van ser èxits dins el període de seguiment, 83 (74,7%) pacients es van morir per causes relacionades amb la seva malaltia oncològica.

Situació actual	Freqüència	Percentatge
Mort lliure	28	11,9
Mort malalt	83	35,3
Viu lliure	117	49,8
Viu malalt	7	3,0
Total	235	100,0

Taula 14: Estatus vital dels pacients al final de l'estudi

També es va recopilar si els pacients havien rebut quimioteràpia neoadjuvant, quimioteràpia adjuvant o si havien rebut quimioteràpia per les metàstasis, incloent si havien rebut tractament amb cetuximab. Com es pot observar, només 12 pacients van ser tractats amb cetuximab (Taula 15).

Quimioteràpia	Freqüència	Percentatge
Neoadjuvant		
-no	196	83,4
-si	39	16,6
Adjuvant		
-no	150	63,8
-si	85	36,2
Quimioteràpia Metàstasis		
-no	177	75,3
-si	57	24,3
Cetuximab		
-no	223	94,9
-si	12	5,1

Taula 15: Freqüència i tipus de tractament oncològic

4.2 Anàlisis bivariables

4.2.1 Anàlisis de les mutacions en *K-RAS*

Es va estudiar si hi havia diferències significatives entre els pacients amb *K-RAS* natiu i els pacients amb *K-RAS* mutat. El grup de pacients amb *K-RAS* mutat i *K-RAS* natiu tenien unes característiques similars respecte a les variables clinicopatològiques clàssiques que es van estudiar. Com es pot observar en la següent taula (Taula 16), no es van trobar diferències significatives entre els pacients amb *K-RAS* natiu i els pacients amb *K-RAS* mutat amb cap de les variables clinicopatològiques estudiades.

Característica	n (%)	K-RAS mutat n (%)	K-RAS natiu n (%)	P
Edat				
-mitjana	66,98 anys	66,9 anys	67,1 anys	0,93
-rang	30-92			
Sexe				
-dones	85 (36,2)	42 (49,4)	43 (50,6)	0,071
-homes	150 (63,8)	56 (37,3)	94 (62,6)	
Localització tumor				
-còlon dret	71 (30,2)	30 (42,5)	41 (57,7)	0,387
-còlon esquerre	90 (38,3)	33 (36,6)	57 (63,3)	
-recte	74 (31,5)	35 (47,3)	39 (52,7)	
Tipus histològic				
-adenocarcinoma	222 (94,5)	92 (41,4)	130 (58,5)	0,738
-carcinoma mucinos	13 (5,5)	6 (46,1)	7 (53,8)	
Grau tumoral				
-alt	11 (4,7)	2 (18,1)	9 (81,8)	0,127
-baix	224 (95,3)	96 (42,8)	128 (57,1)	
Invasió limfàtica				
-no	152 (64,7)	67 (44,1)	86 (56,7)	0,075
-si	62 (26,4)	19 (30,6)	43 (69,4)	
Invasió venosa intramural				
-no	182 (92,4)	89 (48,9)	124 (68,1)	0,711
-si	15 (7,6)	7 (46,7)	8 (53,3)	
Invasió venosa extramural				
-no	210 (91,7)	86 (40,9)	124 (59,1)	0,323
-si	19 (8,3)	10 (52,6)	9 (47,4)	
Invasió perineural				
-no	142 (70,3)	58 (40,8)	84 (59,2)	0,739
-si	60 (29,7)	23 (38,3)	37 (61,7)	
Classificació pT				
-T0	7 (3,04)	1 (14,3)	6 (85,7)	0,464
-T1	10 (4,3)	6 (60)	4 (40)	
-T2	41 (17,8)	17 (41,4)	24 (58,6)	
-T3	142 (61,7)	60 (42,2)	82 (57,8)	
-T4	30 (13,1)	12 (40)	18 (60)	
Infiltració nòduls limfàtics				
-N0	141 (62,6)	65 (46,1)	76 (53,9)	0,171
-N1	57 (25,3)	18 (31,6)	39 (68,4)	
-N2	27 (12)	11 (40,7)	16 (59,3)	
M1 d'entrada				
-M0	204 (86,8)	87 (42,6)	117 (57,4)	0,451
-M1	31 (13,2)	11 (35,4)	20 (64,5)	
Qt neoadjuvant				
-no	196 (83,4)	79 (40,3)	117 (59,7)	0,331
-si	39 (16,6)	19 (48,7)	20 (51,3)	
Qt adjuvant				
-no	150 (63,8)	68 (45,3)	82 (54,7)	0,134
-si	85 (36,2)	30 (35,3)	55 (64,7)	
Recidiva local				
-no	221 (90,1)	95 (42,9)	126 (57,1)	0,113
-si	14 (5,9)	3 (21,4)	11 (78,4)	
M1 Pulmó				
-no	187 (79,6)	74 (39,5)	113	0,191
-si	48 (20,4)	24 (50)	24	
M1 Fetge				
-no	173 (73,6)	69 (39,8)	104	0,345
-si	62 (26,4)	29 (46,7)	33	
M1 Altres localitzacions				
-no	183 (77,8)	74 (40,3)	109	0,461
-si	52 (22,2)	24 (46,1)	28	

Taula 16: Descripció de la població en funció de l'estatus mutacional de *K-RAS* (M0= no presència de metàstasis, M1= presència de metàstasis, QT= quimioteràpia)

4.2.2 Corbes de supervivència de Kaplan-Meier

Es van fer corbes de supervivència de Kaplan-Meier per veure com les diferents variables clinicopatològiques, incloent les mutacions en *K-RAS* influeixen en el temps de supervivència i el temps lliure de malaltia.

Com a característica general en totes les taules, el temps de supervivència total i el temps lliure de malaltia s'expressa en mesos. En les bases de dades dels hospitals, a vegades resulta complex conèixer si la mort està relacionada o no amb la malaltia, o si el seguiment del pacient s'ha realitzat fins al final del temps fixat en el nostre estudi. Aquest individus dels quals no es té tota la informació completa són els individus censurats en les corbes de Kaplan-Meier.

Com que ni la mortalitat ni la taxa de recaiguda o metàstasis arriba al 50% dels individus no s'han pogut estimar les medianes, i per tant hem utilitzat les mitjanes.

La supervivència mitjana va ser de 67,7mesos, amb un rang de seguiment entre 1,40 i 179,43 mesos. La corba de supervivència va ser la següent (Figura 8):

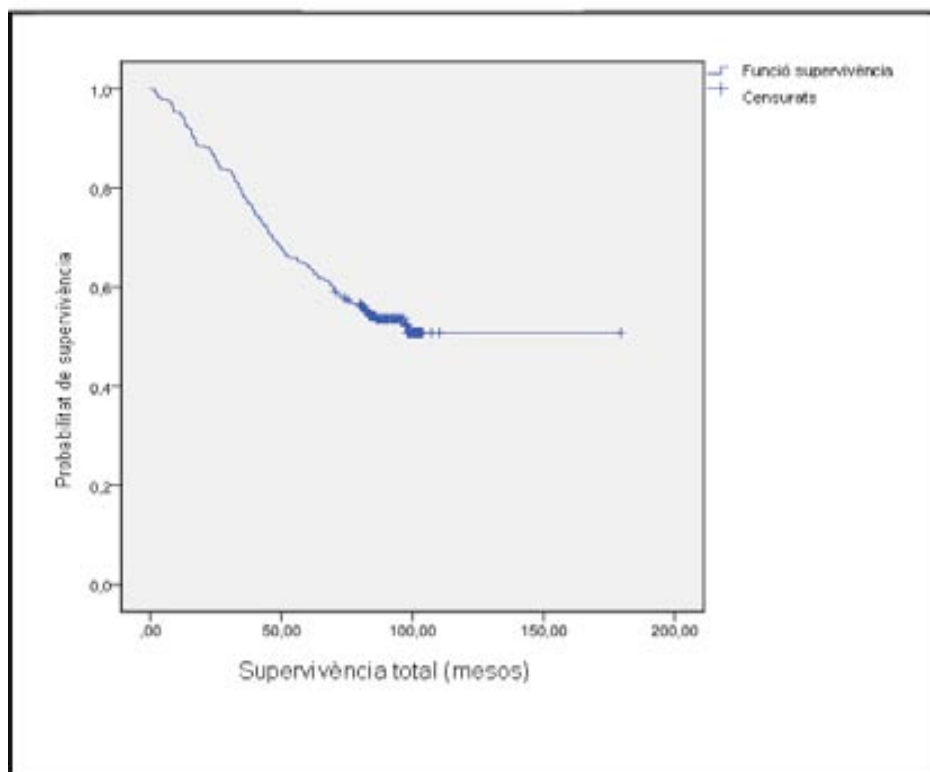


Figura 8: Corba de supervivència total

El temps lliure de malaltia va ser de mitjana de 57,28 mesos, amb un rang entre 0 mesos (pacients que presentaven metàstasis en el moment del diagnòstic) i 160,90 mesos .La corba va ser la següent (Figura 9):

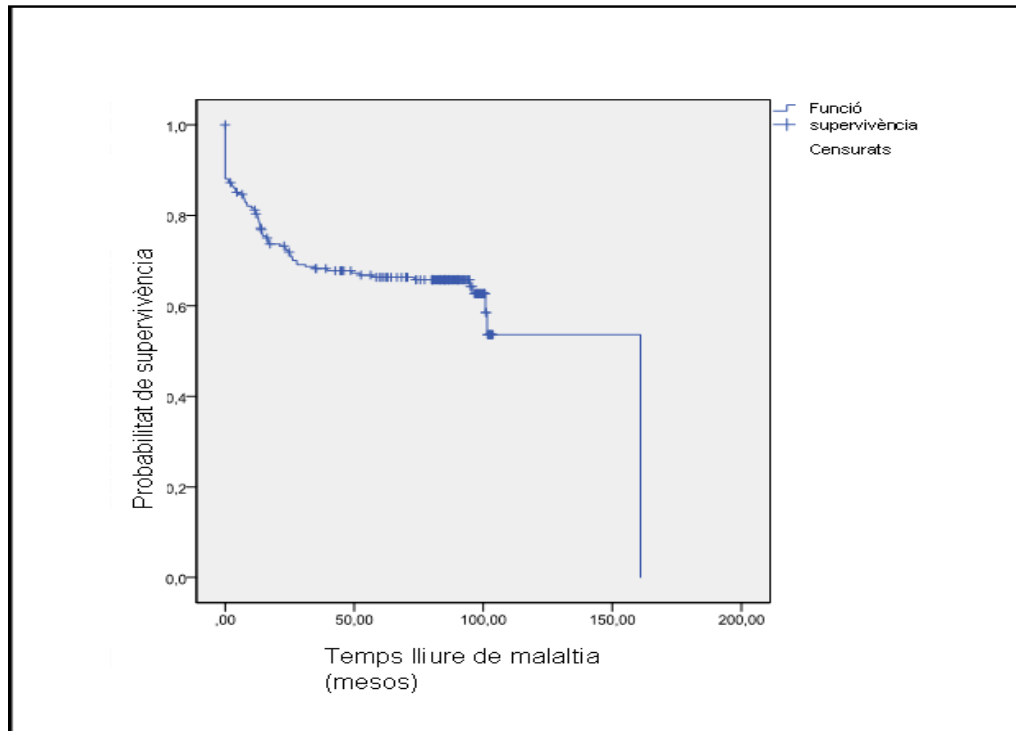


Figura 9: Corba del temps lliure de malaltia

4.2.2.1 Corbes de supervivència i temps de supervivència total

Es va mirar si es trobaven diferències significatives amb les variables amb més impacte sobre la mortalitat com són l'afectació dels nòduls limfàtics, la classificació pT i la presència de metàstasis en el moment del diagnòstic; posteriorment es va mirar com les diferents variables clinicopatològiques influïen en la supervivència, incloent les mutacions en *K-RAS*.

4.2.2.1.1 Temps de supervivència total i afectació de nòduls limfàtics

Com es pot observar en aquesta figura (Figura 10), es van trobar diferències significatives entre la presència de nòduls limfàtics infiltrats ($p < 0,001$) i la supervivència, observant un increment de la mortalitat en relació amb el número de nòduls limfàtics afectats (>3 nòduls).

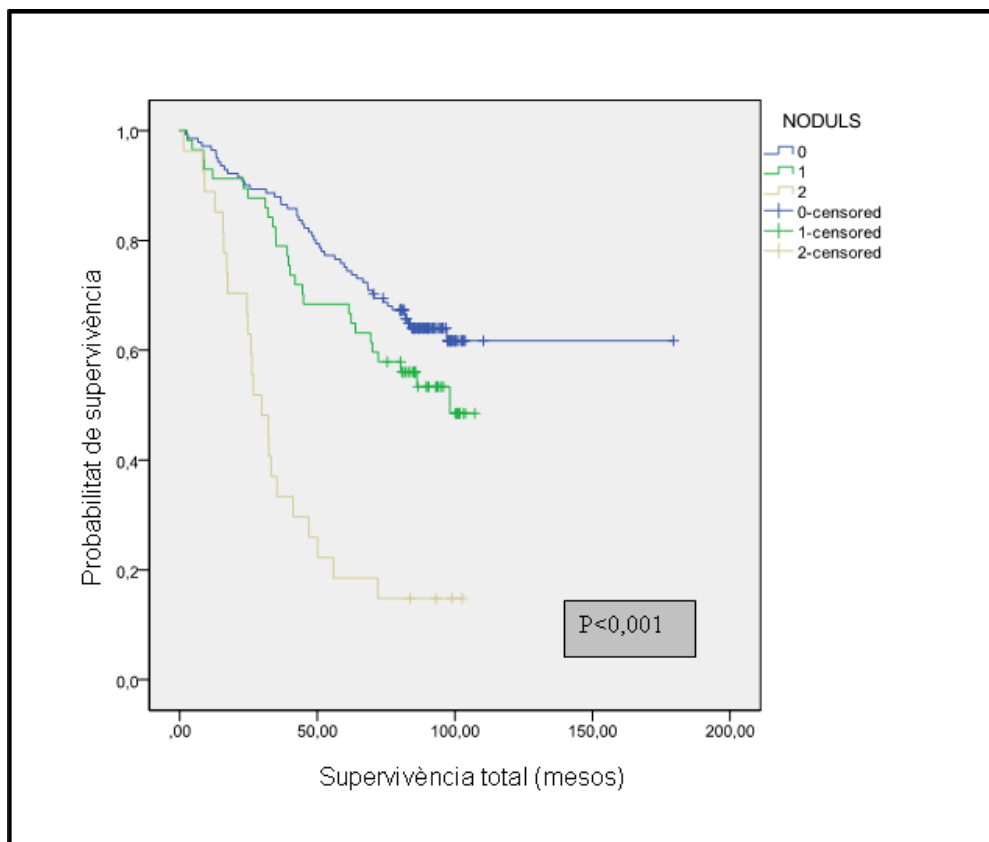


Figura 10: Corbes de Kaplan-Meier de supervivència total en funció de la infiltració dels nòduls limfàtics (0= N0, 1= N1, 2=N2)

4.2.2.1.2 Temps de supervivència total i classificació pT

No es van trobar diferències significatives ($p = 0,142$) entre la classificació pT i la supervivència total, tot i que observem un descens del temps de supervivència

en els pacients amb tumors classificats com T3 i T4 (Figura 11).

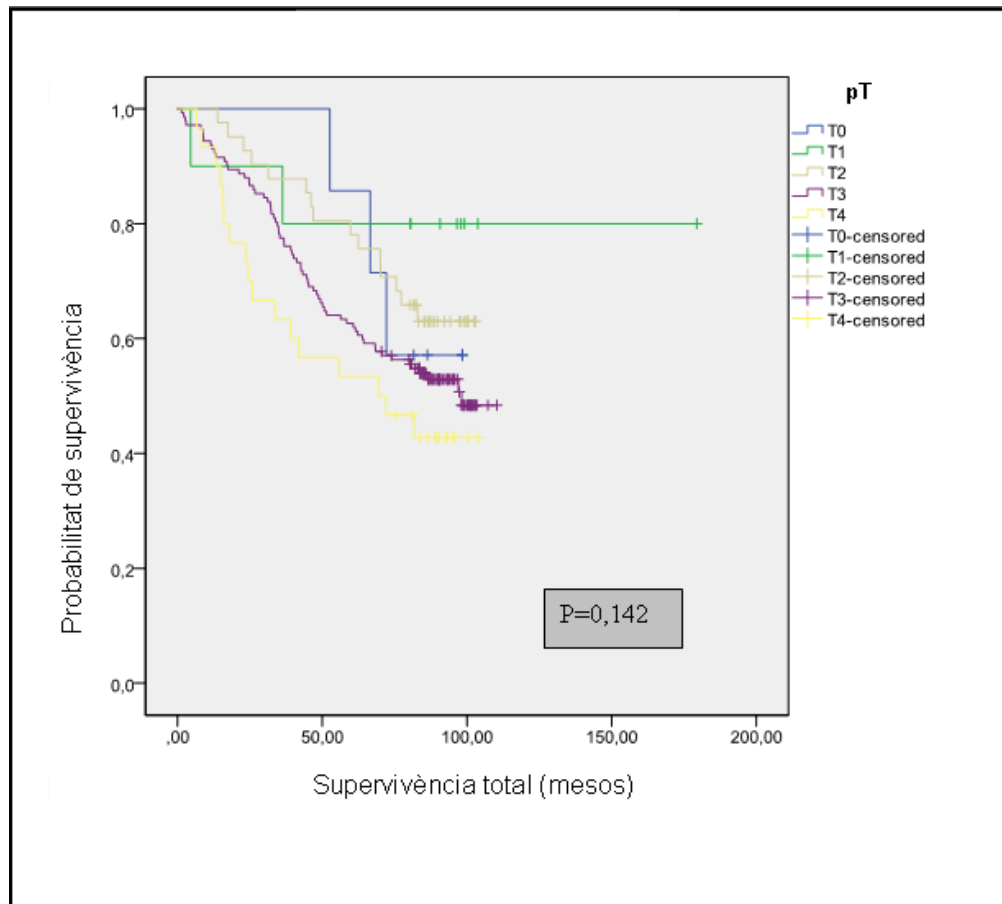


Figura 11: Corbes de Kaplan-Meier de supervivència total en funció de la infiltració tumoral (pT)

4.2.2.1.3 Temps de supervivència total i presència de metàstasis d'entrada

Com es pot observar en la gràfica següent, (Figura 12), es van trobar diferències significatives ($p < 0,001$) entre la presència de metàstasis en el moment del diagnòstic i el temps de supervivència.

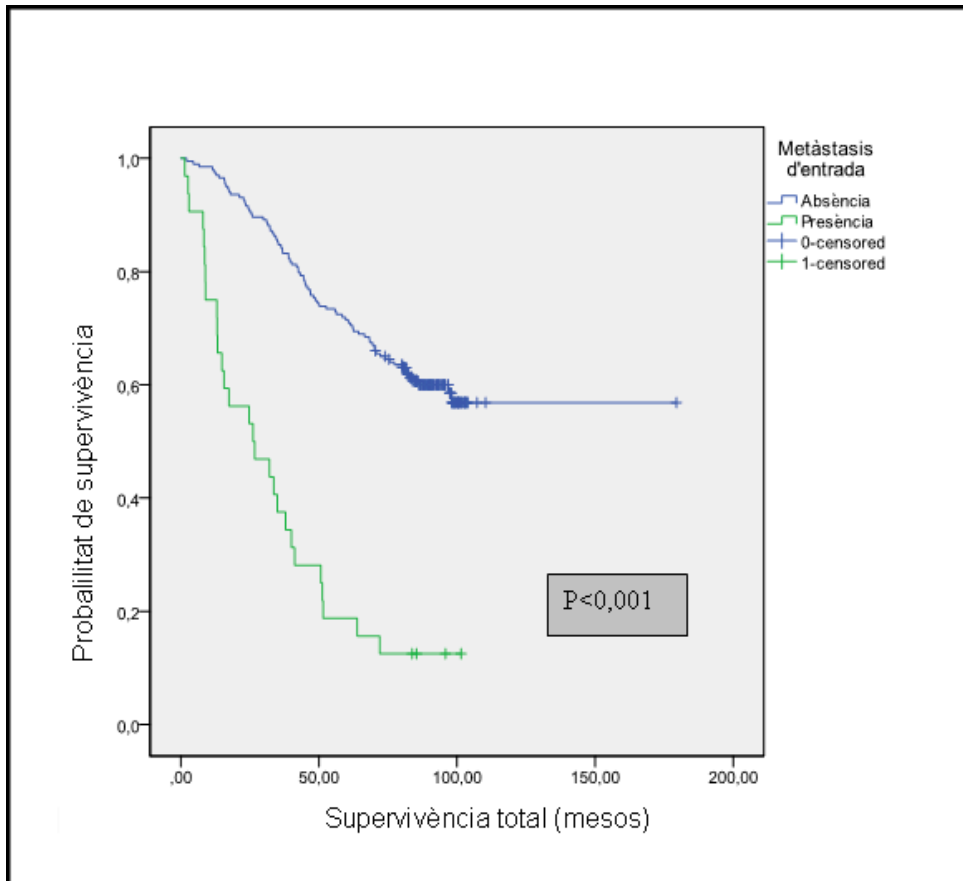


Figura 12: Corbes de Kaplan-Meier de supervivència total en funció de la presència de metàstasis en el moment del diagnòstic

4.2.2.1.4 Temps de supervivència total i altres variables

Respecte les altres variables clinicopatològiques que es van comparar amb el temps de supervivència total, vam trobar diferències significatives amb la invasió limfàtica ($p < 0,001$), la invasió venosa extramural ($p < 0,001$), la invasió perineural ($p < 0,001$), la quimioteràpia adjuvant ($p = 0,012$) i l'aparició de metàstasis pulmonars ($p < 0,001$), hepàtiques ($p < 0,001$) o en altres localitzacions ($p < 0,001$) al cap d'un temps del diagnòstic. No vam trobar diferències significatives respecte la localització del tumor ($p = 0,280$), el tipus histològic ($p = 0,313$), el grau tumoral ($p = 0,138$), la invasió venosa intramural ($p = 0,098$) i la quimioteràpia neoadjuvant ($p = 0,968$).

4.2.2.1.5 Temps de supervivència total i presència de mutacions en *K-RAS*

No es van trobar diferències significatives entre la presència de mutacions en *K-RAS* i el temps de supervivència ($p=0,140$) (Figura 13).

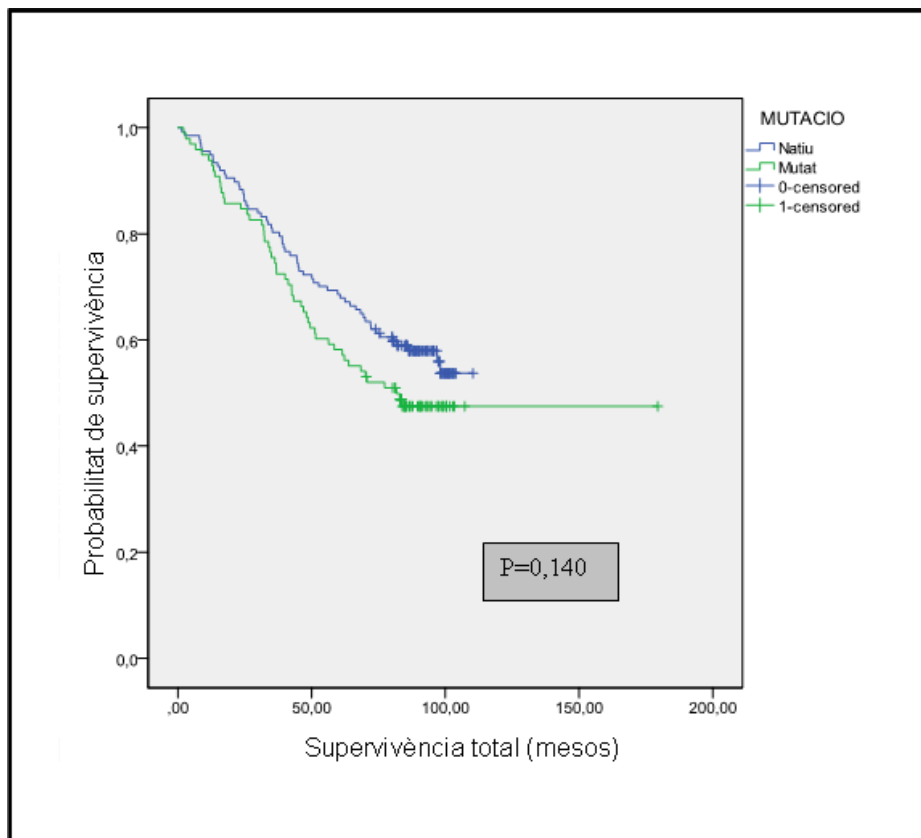


Figura 13: Corbes de Kaplan-Meier de supervivència total en funció de la presència de mutacions en *K-RAS*

Tampoc es van trobar diferències significatives entre el temps de supervivència i la presència de les mutacions en *K-RAS* més freqüents ($p=0,148$) (12 ASP, 12VAL i 13 ASP) (Figura 14).

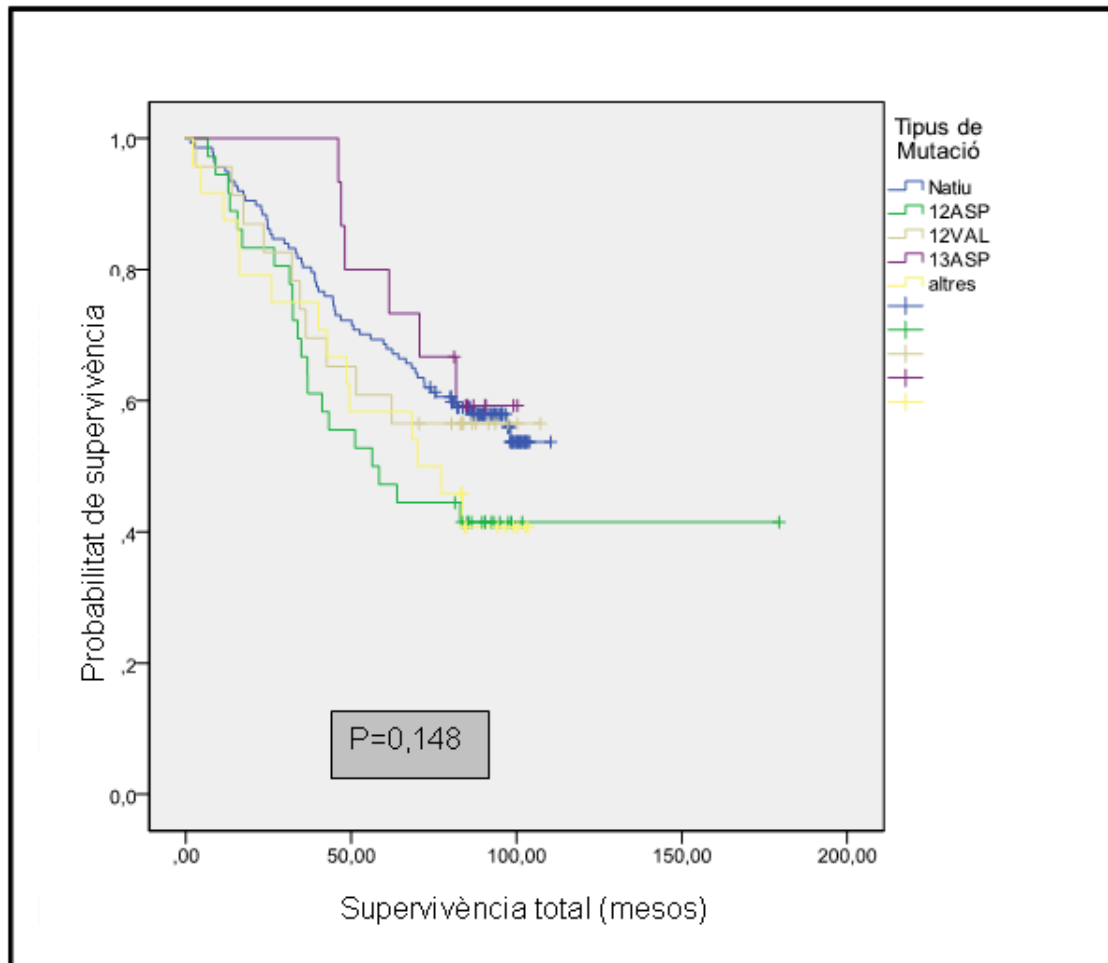


Figura 14: Corbes de Kaplan-Meier de supervivència total en funció del tipus de mutació

4.2.2.2 Corbes de supervivència i temps lliure de malaltia

De la mateixa manera que vam fer amb les corbes de Kaplan-Meier respecte el temps de supervivència total, vam mirar si hi havien diferències significatives amb les variables amb més impacte sobre el temps lliure de malaltia, com són l'afectació dels nòduls limfàtics, la classificació pT i la presència de metàstasis en el moment del diagnòstic, i després es va mirar com les diferents variables clinicopatològiques influïen en el temps lliure de malaltia, incloent les mutacions en *K-RAS*.

4.2.2.2.1 Temps lliure de malaltia i presència de nòduls limfàtics

Respecte el període de temps lliure de malaltia, observem diferències significatives ($p < 0,001$) segons la infiltració dels nòduls limfàtics (Figura 15).

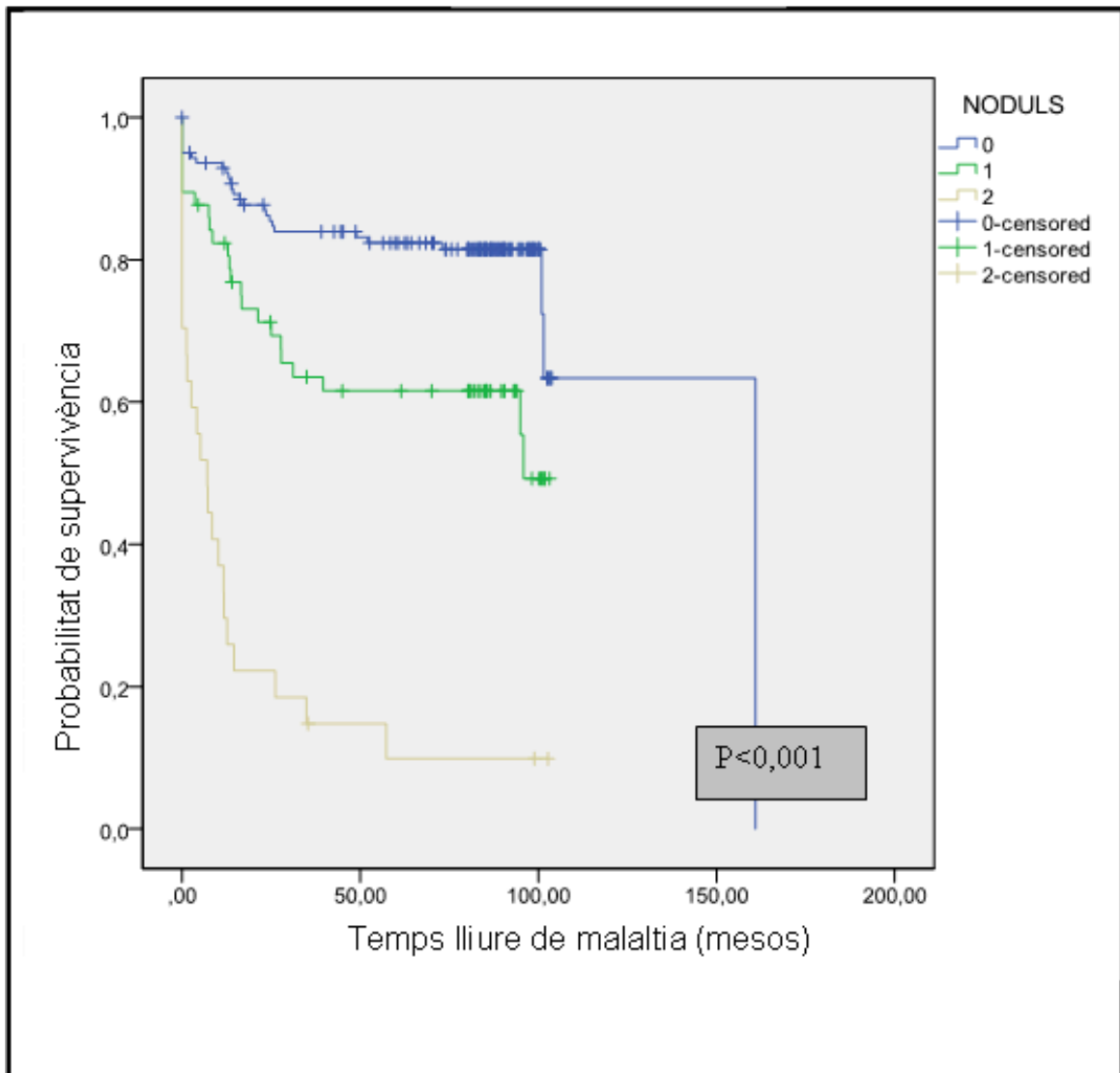


Figura 15: Corbes de Kaplan-Meier del temps lliure de malaltia en funció de la presència de nòduls limfàtics infiltrats (0= N0, 1= N1, 2=N2)

4.2.2.2.2 Temps lliure de malaltia i classificació pT

Es van trobar diferències significatives entre la classificació pT i el temps lliure de malaltia ($p < 0,001$) (Figura 16).

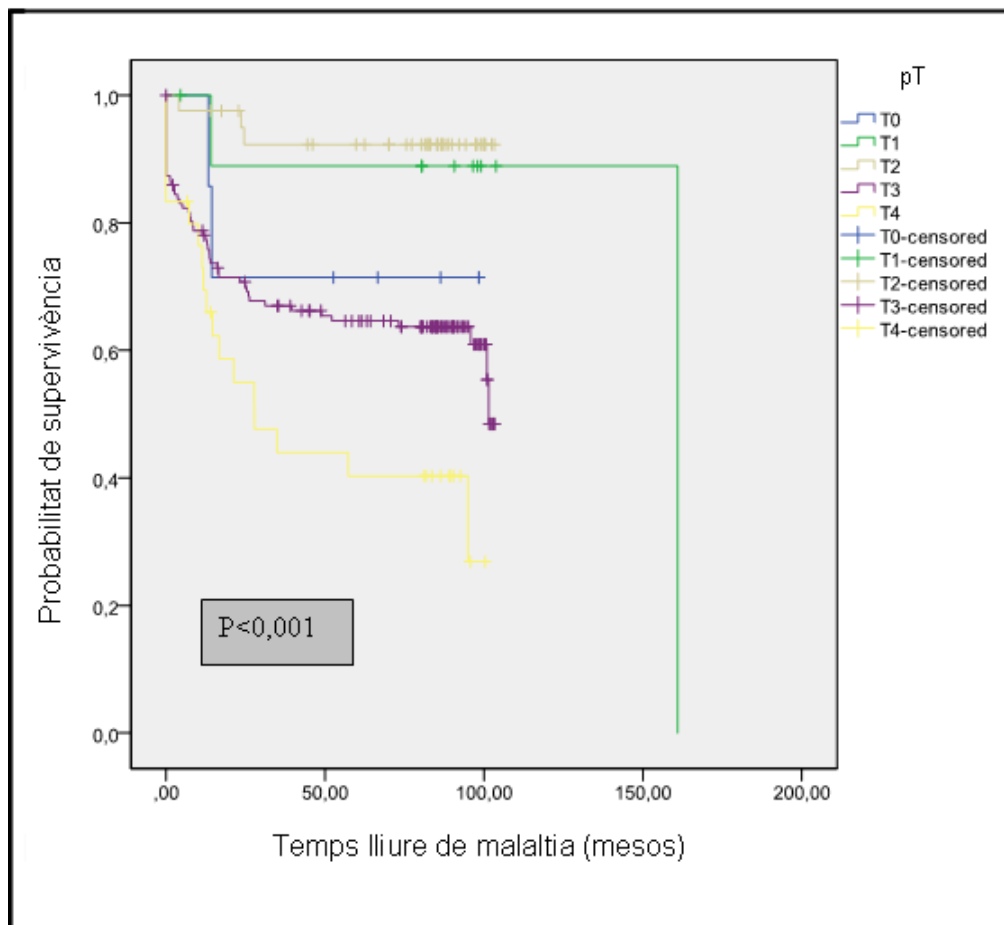


Figura 16: Corbes de Kaplan-Meier del temps lliure de malaltia en funció de la infiltració tumoral (pT)

4.2.2.2.3 Temps lliure de malaltia i presència de metàstasis d'entrada

Respecte el temps lliure de malaltia i la presència de metàstasis en e moment del diagnòstic (metàstasis d'entrada), també observem diferències significatives ($p < 0,001$) (Figura 17).

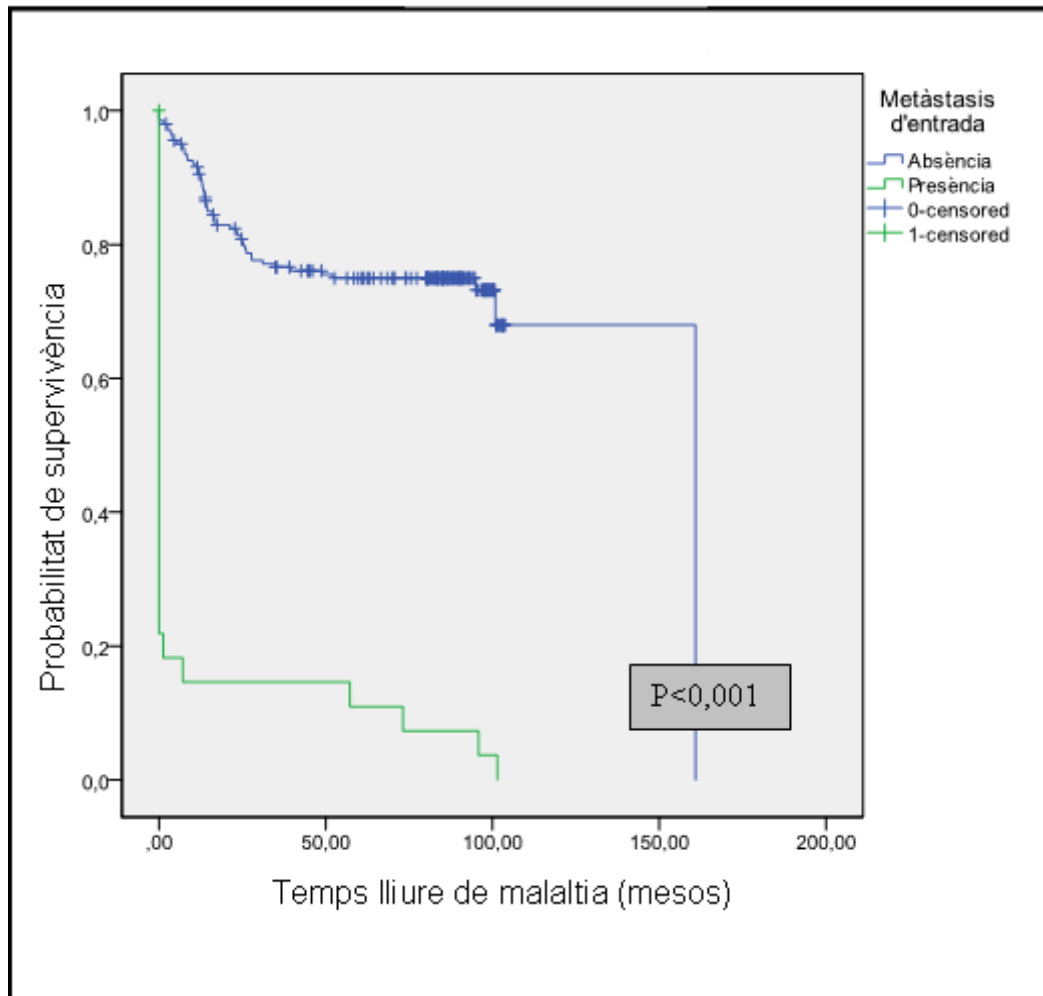


Figura 17: Corbes de Kaplan-Meier del temps lliure de malaltia en funció de la presència de metàstasis d'entrada en el moment del diagnòstic

4.2.2.2.4 Temps lliure de malaltia i altres variables

Respecte les altres variables clinicopatològiques que es van comparar amb el temps lliure de malaltia, vam trobar diferències significatives amb la invasió limfàtica ($p < 0,001$), la invasió venosa intramural (0,035), la invasió venosa extramural ($p < 0,001$), la invasió perineural ($p < 0,001$) i la presència de metàstasis pulmonars ($p < 0,001$), hepàtiques ($p < 0,001$) o en altres localitzacions ($p < 0,001$) al cap d'un temps del diagnòstic. No vam trobar diferències significatives respecte la localització del tumor ($p = 0,157$), el tipus

histològic ($p=0,755$), el grau tumoral ($p=0,304$), la quimioteràpia neoadjuvant ($p=0,414$) i la quimioteràpia adjuvant ($p=0,226$).

4.2.2.2.5 Temps lliure de malaltia i presència de mutacions en *K-RAS*

No es van trobar diferències significatives entre la presència de mutacions en *K-RAS* i el temps lliure de malaltia ($p=0,525$) (Figura 18).

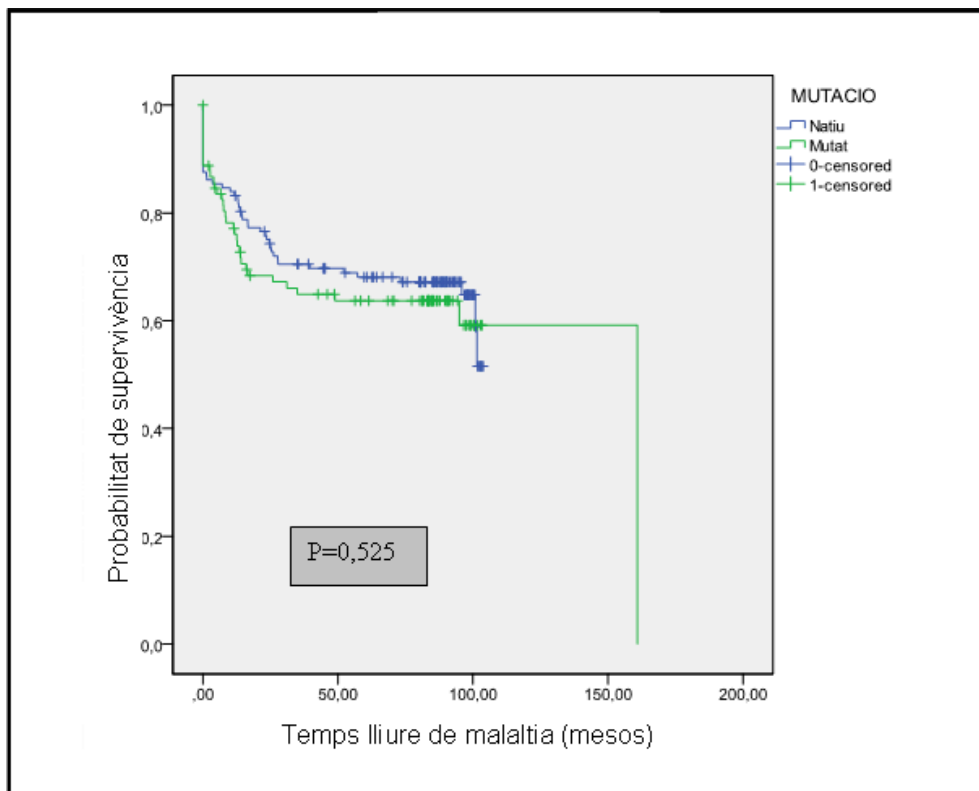


Figura 18: Corbes de Kaplan-Meier del temps lliure de malaltia en funció de la presència de mutacions en *K-RAS*

No obstant, si que es van trobar diferències significatives entre el temps lliure de malaltia i la presència de les mutacions en *K-RAS* més freqüents ($p=0,014$) (12 ASP, 12 VAL i 13 ASP) (Figura 19).

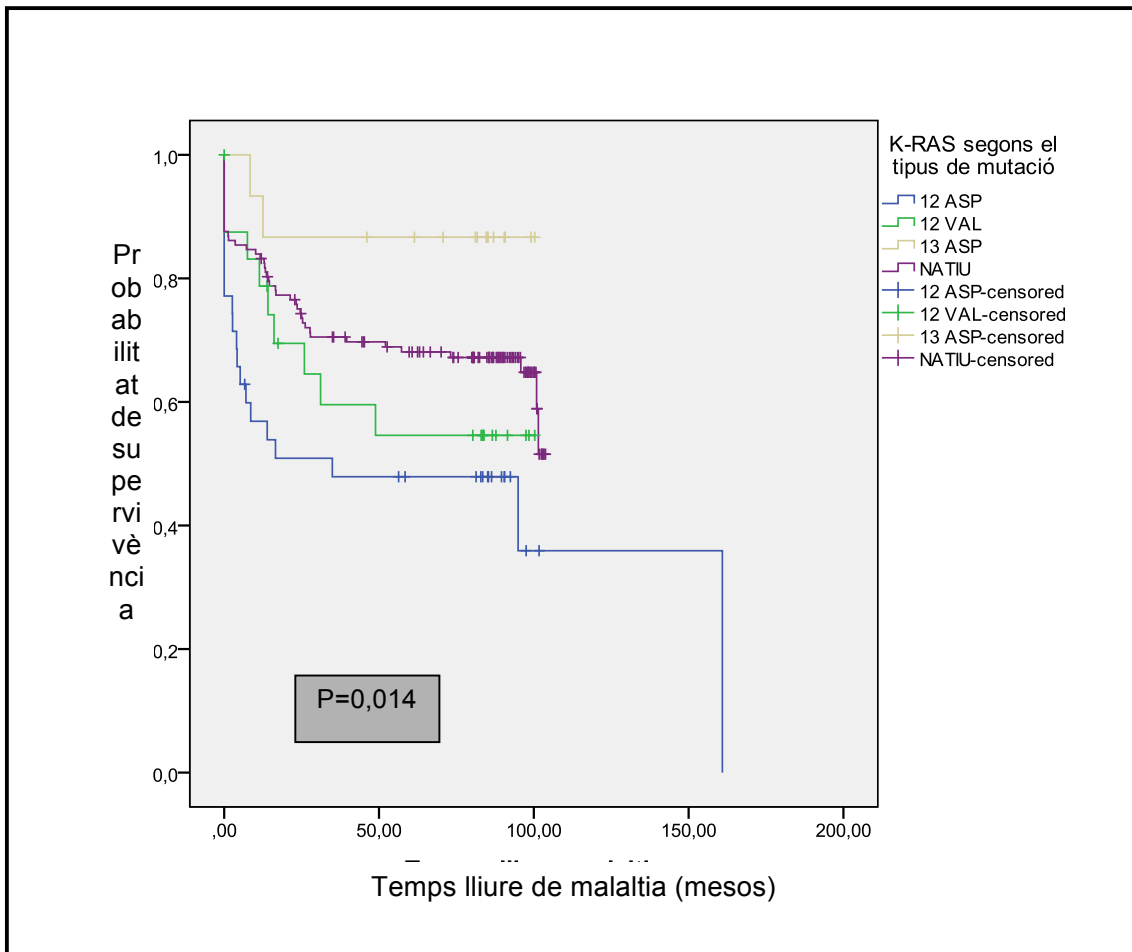


Figura 19: Corbes de Kaplan-Meier del temps lliure de malaltia en funció del tipus de mutació

4.3 Anàlisi multivariable de regressió de Cox

Per estimar l'efecte de les diferents variables clinicopatològiques sobre el temps de supervivència i el temps lliure de malaltia, es va fer una anàlisi multivariable de regressió de Cox. Així, es va poder veure si hi havia correlació entre el temps de supervivència i el temps lliure de malaltia amb les variables clinicopatològiques clàssiques i poder valorar si la presència de mutacions en *K-RAS* es comportava com un factor pronòstic independent.

4.3.1 Temps de supervivència

Es van incloure totes les variables que en l'anàlisi bivariàble van presentar significació estadística, a més a més de la presència de mutacions, ajustant-ho també per l'edat i el sexe. Com es pot observar en la següent taula (Taula 17), l'edat ($p < 0,001$) els nòduls limfàtics (0,002), la recidiva local (0,018), les metàstasis en altres localitzacions ($p < 0,001$) i la presència de mutacions ($p = 0,033$) són estadísticament significatives, el que vol dir que es comporten com a factors pronòstics independents (Figura 20).

Variable	Significació p	Hazard Ratio (HR)	95% Interval de confiança (IC)	
			Inferior	Superior
Edat	0,000	1,052	1,029	1,075
Sexe	0,264	0,762	0,473	1,228
Inv limfàtica	0,332	1,352	0,735	2,485
Inv venosa extramural	0,752	1,142	0,502	2,595
Inv perineural	0,253	1,396	0,788	2,471
pTr	0,480	0,900	0,672	1,205
Nòduls limfàtics	0,002	1,779	1,240	2,554
M1 d'entrada	0,005	2,719	1,361	5,432
QT adjuvant	0,081	0,591	0,328	1,066
Recidiva local	0,018	2,680	1,183	6,071
M1 pulmó	0,356	0,737	0,385	1,410
M1 altres localitzacions	0,000	3,319	1,724	6,388
M1 fetge	0,152	1,577	0,846	2,941
Mutació K-RAS	0,033	1,663	1,040	2,659

Taula 17: Anàlisi multivariàble de regressió de Cox del temps de supervivència total en funció de totes les variables amb significació estadística en l'anàlisi univariàble (Inv= invasió, M1= metàstasis, QT= quimioteràpia)

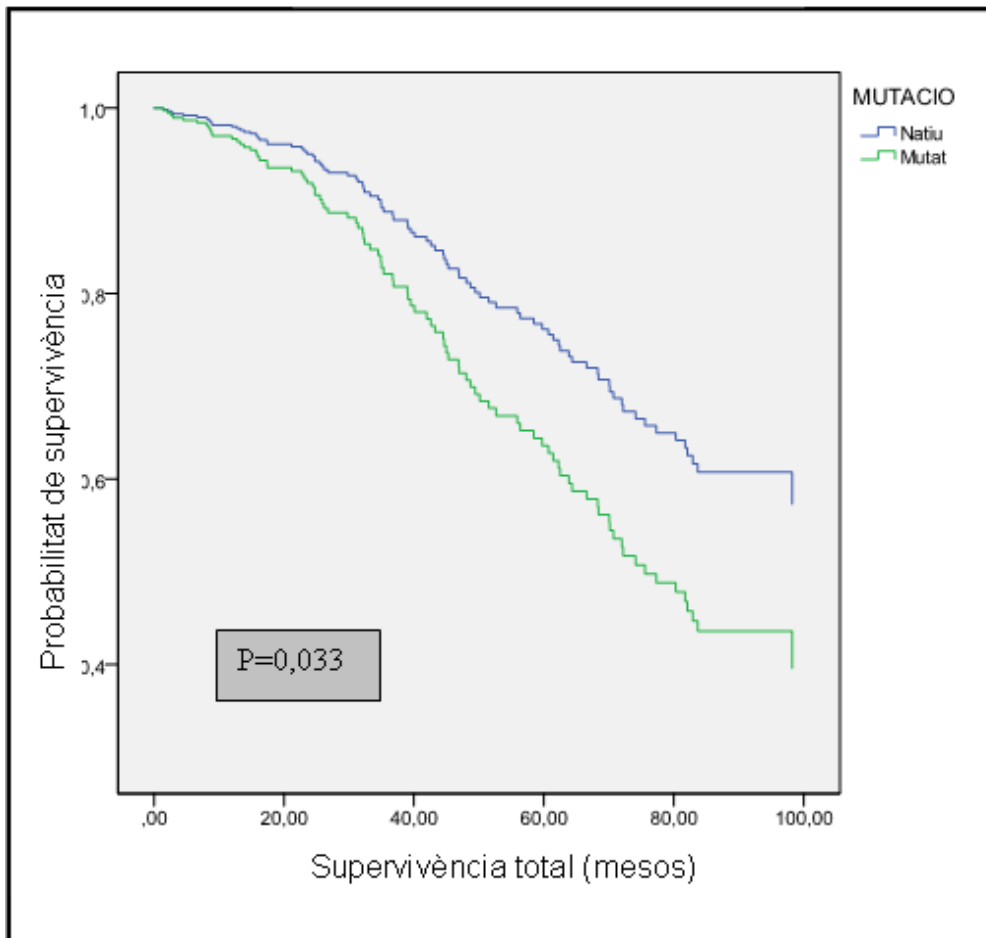


Figura 20: Representació gràfica de l'anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps de supervivència total en funció de la presència de mutacions en *K-RAS*

Com es pot observar en la Taula 18, si només es tenen en compte les 3 mutacions de *K-RAS* més freqüents (12ALA, 12VAL 13ALA), no trobem significació estadística (Figura 21).

Variable	Significació p	Hazard Ratio (HR)	95% Interval de confiança (IC)	
			Inferior	Superior
Edat	0,000	1,057	1,032	1,083
Sexe	0,302	0,753	0,439	1,290
Inv limfàtica	0,208	1,514	0,794	2,885
Inv venosa extramural	0,934	1,041	0,406	2,670
Inv perineural	0,133	1,612	0,864	3,006
pTr	0,252	0,829	0,602	1,142
Nòduls	0,012	1,651	1,115	2,444
M1 entrada	0,002	3,239	1,544	6,794
QTadjuvant	0,142	0,613	0,319	1,178
Recidiva local	0,015	2,852	1,225	6,640
M1 pulmó	0,494	0,790	0,401	1,554
M1 fetge	0,095	1,730	0,908	3,294
M1altres localitzacions	0,001	3,163	1,580	6,329
12 ASP	0,325	1,292	0,776	2,150
12 VAL	0,968	1,014	0,526	1,955
13 ASP	0,872	0,942	0,455	1,952

Taula 18: Anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps de supervivència total en funció de totes les variables amb significació estadística en l'anàlisi bivariante segons les mutacions més freqüents (Inv= invasió, M1= metàstasis, QT= quimioteràpia)

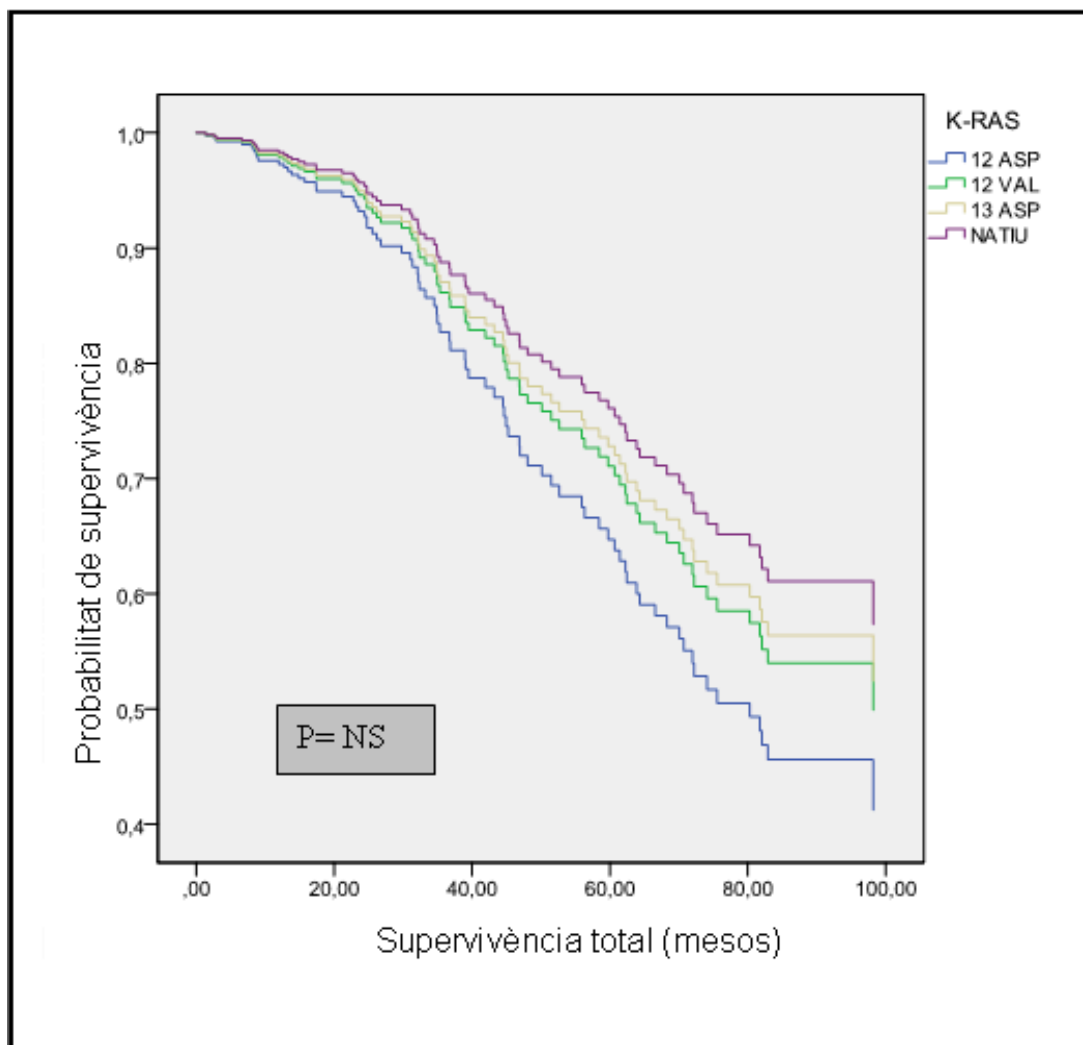


Figura 21: Representació gràfica de l'anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps de supervivència total en funció de la presència de les mutacions més freqüents en *K-RAS* (NS= no significatiu)

També es va fer la regressió de Cox però només tenint en compte les variables que són presents en el moment del diagnòstic. Com podem observar en la següent taula (Taula 19), l'edat ($p < 0,001$), la invasió perineural ($p = 0,038$), la presència de nòduls limfàtics, ($p = 0,001$) les metàstasis d'entrada ($p < 0,001$) i la presència de mutacions ($p = 0,017$) tenen significació estadística (Figura 22).

Variable	Significació p	Hazard Ratio (HR)	95% Interval de confiança (IC)	
			Inferior	Superior
Edat	0,000	1,048	1,026	1,070
Sexe	0,222	0,749	0,471	1,191
Localització tumor	0,652	0,933	0,692	1,260
Tipus histològic	0,080	2,180	0,911	5,215
Grau tumor	0,901	1,064	0,402	2,814
Inv limfàtica	0,360	1,330	0,722	2,448
Inv venosa intramural	0,261	1,562	0,718	3,399
Inv venosa extramural	0,182	1,657	0,790	3,478
Inv perineural	0,038	1,724	1,030	2,888
pTr	0,174	0,801	0,582	1,103
Nòduls limfàtics	0,001	1,888	1,303	2,735
M1 d'entrada	0,000	3,660	1,887	7,099
Mutació K-RAS	0,017	1,733	1,103	2,724

Taula 19: Anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps de supervivència total en funció de les variables clinicopatològiques presents en el moment del diagnòstic. (Inv= invasió, M1= metàstasi)

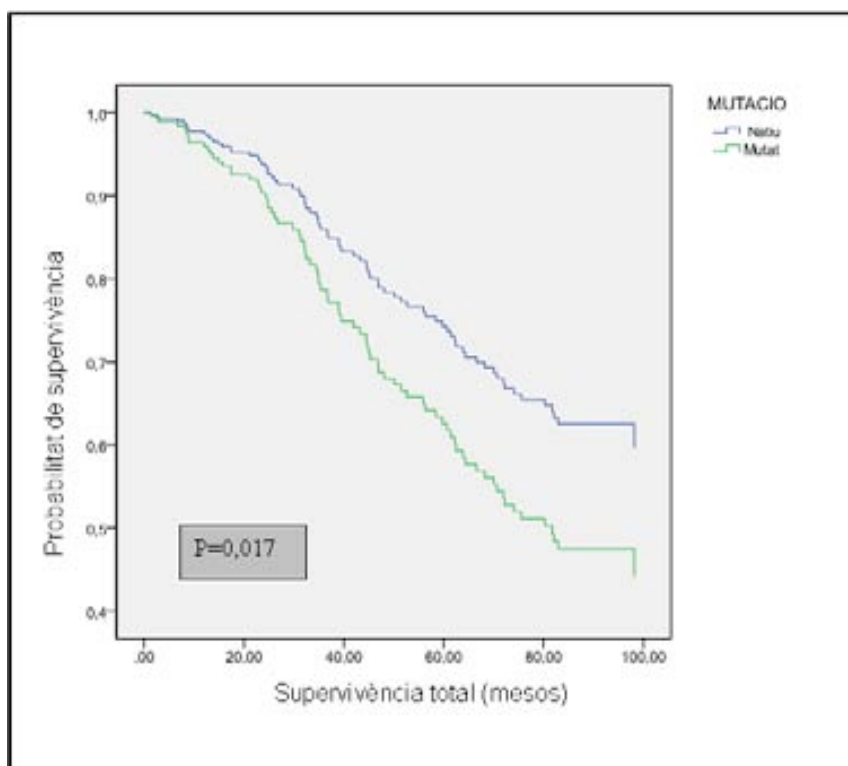


Figura 22: Representació gràfica de l'anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps de supervivència total (de les variables clinicopatològiques presents en el moment del diagnòstic) en funció de la presència de mutacions en K-RAS

4.3.2 Temps lliure de malaltia

Tal com hem fet a l'estudi de la supervivència, respecte el temps lliure de malaltia, es van agafar totes les variables que en l'anàlisi bivariàble van tenir significació estadística, a més a més de la presència de mutacions, ajustant-ho també per l'edat i el sexe. Com es pot observar (Taula 20), l'edat, la invasió perineural, els nòduls limfàtics, les metàstasis d'entrada, la recidiva local, les metàstasis en pulmó, fetge i altres localitzacions són estadísticament significatives, el que vol dir que es comporten com un factor pronòstic independent. Les mutacions en *K-RAS* no es comporten com un factor pronòstic independent, però hi ha certa tendència sense arribar a la significació ($p=0,092$) (Figura 23).

Variable	Significació p	Hazard Ratio (HR)	95% Interval de confiança (IC)	
			Inferior	Superior
Edat	0,236	1,014	0,991	1,037
Sexe	0,247	1,488	0,759	2,918
Inv limfàtica	0,207	0,578	0,247	1,353
Inv venosa intramural	0,125	1,991	0,826	4,801
Inv venosa extramural	0,069	0,399	0,148	1,074
Inv perineural	0,007	2,809	1,331	5,927
pTr	0,245	0,775	0,504	1,191
Nòduls limfàtics	0,000	2,585	1,667	4,009
M1 d'entrada	0,000	6,728	3,048	14,851
Recidiva local	0,008	3,106	1,350	7,146
M1 pulmó	0,001	2,853	1,563	5,207
M1 altres localitzacions	0,000	8,724	4,343	17,523
M1 fetge	0,001	2,947	1,591	5,458
Mutació <i>K-RAS</i>	0,092	1,751	0,912	3,367

Taula 20: Anàlisi multivariàble de regressió de Cox del temps lliure de malaltia en funció de totes les variables amb significació estadística en l'anàlisi bivariàble (Inv= invasió, M1= metàstasis)

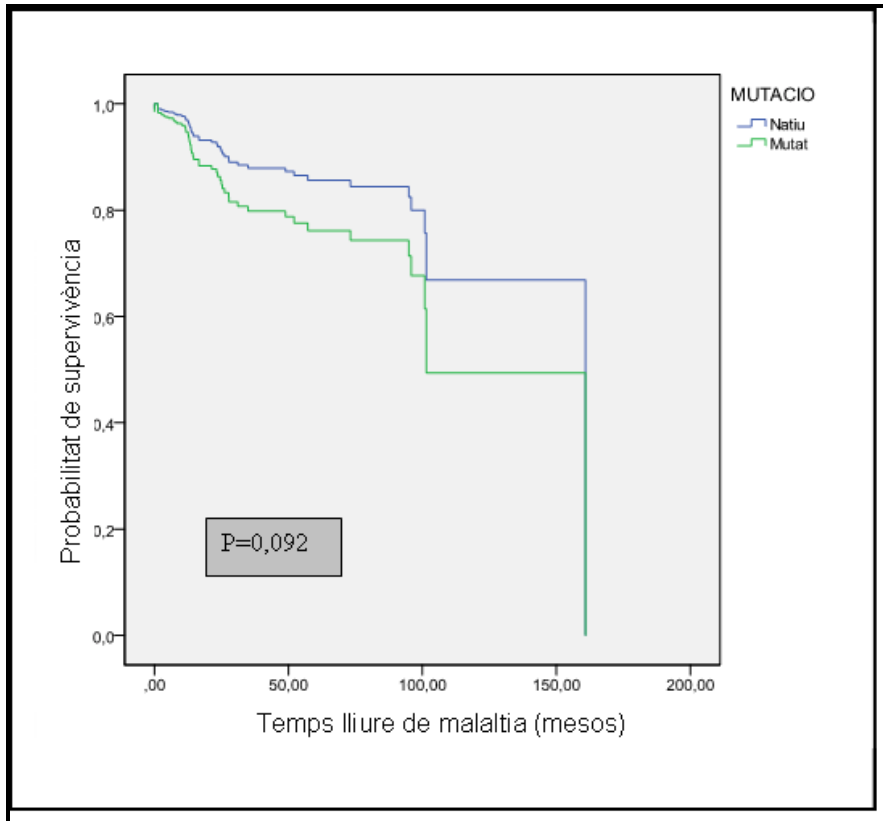


Figura 23: Representació gràfica de l'anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps lliure de malaltia en funció de la presència de les mutacions en *K-RAS*

També es va fer la regressió de Cox però només tenint en compte les variables que són presents en el moment del diagnòstic. Com podem observar (Taula 21), la invasió perineural ($p < 0,001$), la presència de nòduls limfàtics, ($p < 0,001$), les metàstasis d'entrada ($p < 0,001$) i la presència de mutacions ($p = 0,023$) tenen significació estadística (Figura 24).

Variable	Significació p	Hazard Ratio (HR)	95% Interval de confiança (IC)	
			Inferior	Superior
Edat	0,906	1,001	0,980	1,023
Sexe	0,199	0,683	0,382	1,222
Localització tumor	0,599	1,103	0,765	1,592
Tipus histològic	0,515	0,826	0,464	1,469
Grau tumor	0,168	0,168	0,707	7,293
Inv limfàtica	0,596	0,810	0,372	1,764
Inv venosa intramural	0,427	1,410	0,604	3,292
Inv venosa extramural	0,573	1,276	0,546	2,982
Inv perineural	0,001	2,873	1,555	5,306
pTr	0,889	1,034	0,648	1,650
Nòduls limfàtics	0,000	2,639	1,648	4,227
M1 d'entrada	0,000	7,457	3,570	15,576
Mutació <i>K-RAS</i>	0,023	1,923	1,092	3,378

Taula 21: Anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps lliure de malaltia en funció de les variables clinicopatològiques presents en el moment del diagnòstic. (Inv= invasió, M1= metàstasi)

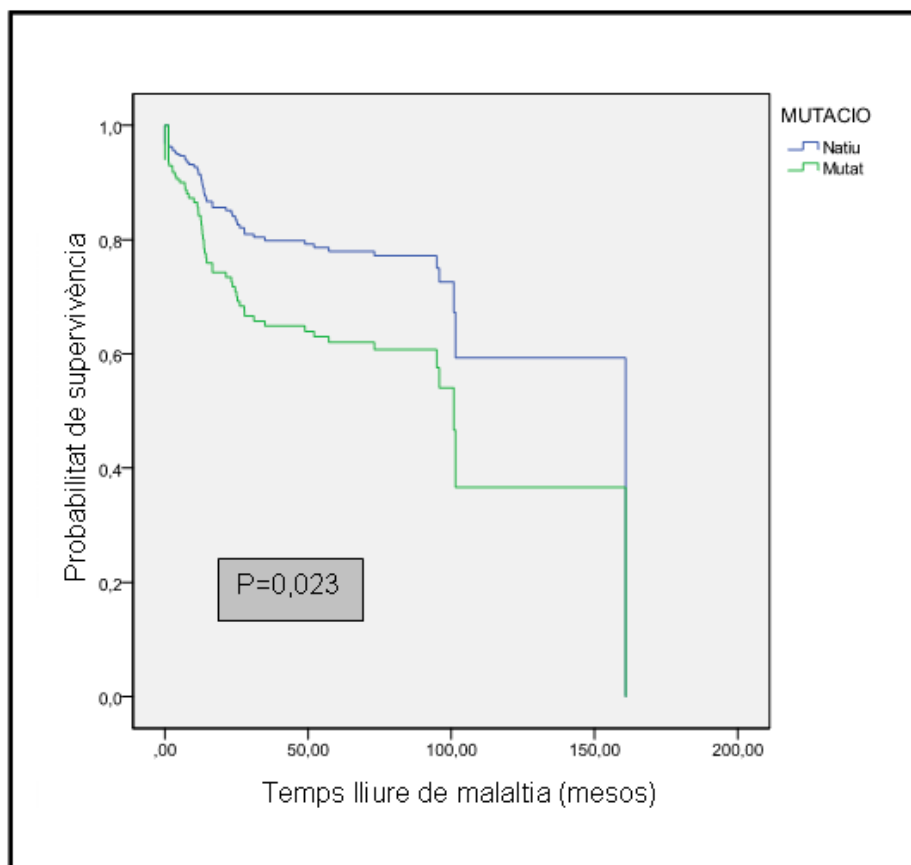


Figura 24: Representació gràfica de l'anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps lliure de malaltia (de les variables clinicopatològiques presents en el moment del diagnòstic) en funció de la presència de mutacions en *K-RAS*

També es va mirar si hi havia correlació entre el temps lliure de malaltia i les diferents variables clinicopatològiques (Taula 22) (amb significació estadística en l'anàlisi bivariable) però només tenint en compte les mutacions més freqüents. (Figura 25).

Variable	Significació p	Hazard Ratio (HR)	95% Interval de confiança (IC)	
			Inferior	Superior
Edat	0,158	1,017	0,993	1,042
Sexe	0,073	1,863	0,944	3,679
Inv limfàtica	0,549	1,228	0,627	2,405
Inv venosa extramural	0,084	2,261	0,895	5,711
Inv perineural	0,293	0,589	0,219	1,581
pTr	0,297	0,795	0,516	1,224
Nòduls limfàtics	0,006	1,814	1,189	2,768
M1 d'entrada	0,000	5,917	2,792	12,541
Recidiva local	0,003	3,338	1,487	7,489
M1 pulmó	0,000	2,980	1,647	5,392
M1 altres	0,005	2,440	1,314	4,531
M1 fetge	0,000	9,338	4,559	19,128
12 ASP	0,418	1,299	0,690	2,445
12 VAL	0,342	1,413	0,693	2,882
13 ASP	0,559	0,713	0,229	2,220

Taula 22: Anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps lliure de malaltia en funció de totes les variables amb significació estadística en l'anàlisi bivariable segons les mutacions més freqüents (Inv= invasió, M1= metàstasis)

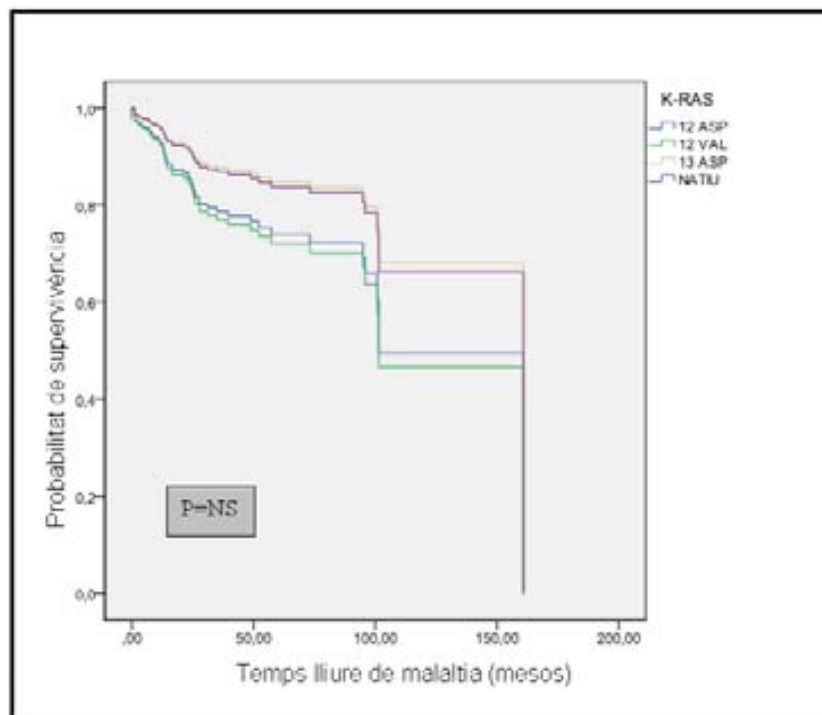


Figura 25: Representació gràfica de l'anàlisi multivariable de regressió de Cox del temps lliure de malaltia en funció de la presència de les mutacions més freqüents en K-RAS (NS= no significatiu)

DISCUSSIÓ

5 DISCUSSIÓ

El CCR és un dels problemes de salut més importants en els països desenvolupats ja que representa el càncer més freqüent si es tenen en compte ambdós sexes. Tot i que en alguns països s'han implementat programes de prevenció, com són la detecció de sang oculta en femtes, o colonoscòpies de cribatge, la càrrega de la malaltia i la mortalitat són encara elevades. Les millores en el diagnòstic i el tractament han fet que el CCR, en els estadis inicials, tingui un pronòstic millor i per tant una supervivència més gran. La cirurgia és, encara en l'actualitat, el tractament curatiu principal, però pel correcte maneig dels pacients és necessari un equip multidisciplinari experimentat. Per això, el tractament individualitzat, tenint en compte les característiques clinicopatològiques, i també les característiques biològiques i moleculars dels tumors, que ens ajudaran a l'elecció del tractament més adequat, són actualment imprescindibles per prendre la millor decisió terapèutica per mantenir una bona qualitat de vida amb un temps de supervivència gran.

La teràpia amb agents anti-EGFR s'ha vist que és d'utilitat en pacients amb CCRm i a partir de finals del 2008 les guies de recomanació europees del maneig dels pacients amb CCRm van incloure la utilitat d'aquest tractament però limitat al subgrup de pacients sense mutacions en el gen *K-RAS*⁴⁷, així com també les guies de l'American Society for Clinical Oncology⁶² i The National Comprehensive Cancer Network.⁶³

En la sèrie que hem estudiat, només 12 pacients van poder rebre tractament amb Cetuximab donat que els pacients inclosos en aquest treball van ser diagnosticats entre 2004 i 2005 i l'ús d'aquest agent terapèutic encara estava en fase experimental i la majoria de pacients no se'n van poder beneficiar, ja que la mitjana del temps lliure de malaltia va ser de 57,28 mesos. No hem pogut incloure aquesta dada en l'anàlisi multivariable ja que 12 pacients és un valor massa baix perquè el programa estadístic el pugui utilitzar i tingui significació real i pràctica. Aquest tractament es va administrar en 8 pacients no

portadors de la mutació i en 4 pacients portadors de la mutació. Tots els pacients van ser èxits.

Respecte les característiques demogràfiques de la mostra, edat i sexe, i les diferents variables clinicopatològiques que s'han estudiat en aquest treball, es poden considerar equivalents a les dels altres treballs realitzats sobre el mateix tema.^{52,56,57,59,60}

Hi ha uns factors anatomopatològics clàssics reconeguts des de fa temps com a factors pronòstic i definits en les guies de maneig del CCR³², com per exemple la presència d'invasió limfàtica, o la presència d'invasió venosa intramural o extramural, o la classificació TNM. Com es pot veure en els resultats, aquestes variables les hem tingut en compte a l'hora de fer aquest estudi però els resultats estadístics no els discutirem perquè no és l'objectiu d'aquesta tesi.

Respecte a la tecnologia utilitzada per la determinació de les mutacions, com ja hem comentat no hi ha un mètode concret recomanat sinó que en funció de les disponibilitats de cada laboratori es tendeix a escollir algun mètode que sigui reproducible i validat per la comunitat científica. Com ja hem explicat en la metodologia d'aquest treball, nosaltres vam optar per la utilització del kit comercial *Therascreen® KRAS PCR kit*^{CE} que combina dues tecnologies, ARMS® i Scorpions® per la detecció de les mutacions mitjançant assaigs realitzats amb la tècnica de PCR-RT. Aquesta tècnica està acceptada per la societat Europea de Patologia.⁴⁷ Hi ha varis treballs que han estudiat la concordança entre diferents tècniques metodològiques i l'elecció d'alguna en concret es basa, com ja hem mencionat, en les disponibilitats de cada centre.^(77,78,79) La sensibilitat d'aquesta tècnica és molt alta (es capaç de detectar un 1% de DNA mutat enmig d'un fons de DNA genòmic natiu)⁸⁰ i detecta les 7 mutacions més freqüents en CCR (6 mutacions en el codó 12 i 1 en el codó 13) en l'exó 2 del gen *K-RAS*.

La determinació de les mutacions en *K-RAS* dels 235 pacients inclosos en l'estudi es va fer utilitzant DNA extret de mostres tumorals del còlon o de recte exceptuant un cas que es va fer amb DNA extret d'una metàstasi pulmonar. Aquest pacient tenia un tumor en el recte i havia rebut quimioteràpia neoadjuvant i en la peça quirúrgica del tumor primari de recte no quedava tumor residual, i per això es va utilitzar teixit tumoral procedent d'una biòpsia

pulmonar. Hi ha varis estudis que comparen l'estatus mutacional de *K-RAS* entre els tumors primaris localitzats en el còlon i les metàstasis. En el treball publicat el 2010 per H.L.Wang i col.⁷⁸ s'exposa una taula amb diversos treballs realitzats per diferents autors on s'analitza l'estatus mutacional de *K-RAS* entre els tumors primaris i les corresponents metàstasis (veure Taula 23).

Estudi	Pacients amb <i>K-RAS</i> en el tumor primari, n	Concordança entre tumor primari i metàstasis, %	Tècnica utilitzada per les determinacions de mutacions
Etienne-Grimaldi i col. ⁸¹	16	100	PCR-RFLP
Artale i col. ⁸²	13	77	Seqüenciació DNA
Losi i col. ⁸³	25	100	PCR Al·lel-específic
Schimanski i col. ⁸⁴	67	31	PCR-RFLP
Oudejans i col. ⁸⁵	28	93	PCR+ Al·lel-específic oligonucleòtid hibridació
Albanese i col. ⁸⁶	14	50	SSCP
Suchy i col. ⁸⁷	23	100	PCR+ Al·lel-específic oligonucleòtid hibridació
Al-Mulla i col. ⁸⁸	26	81	PCR +Al·lel-específic oligonucleòtid hibridació
Santini i col. ⁸⁹	38	92	Seqüenciació DNA

Taula 23: Concordança de l'estatus mutacional de *K-RAS* entre el tumor primari i les metàstasis (extret de Wang i col.⁷⁸)

Analitzant aquestes dades, observem que en un 73% de promig es manté l'estatus mutacional de *K-RAS* entre el tumor primari i la metàstasi. La

concordança en la majoria dels estudis és molt alta, recolzant la idea que les mutacions en *K-RAS* es mantenen estables en el procés metastàtic. No obstant, actualment, es tendeix a avaluar les mutacions tant en el tumor primari com en la metàstasi per evitar qualsevol possible canvi en l'estatus mutacional entre el tumor primari i la metàstasi. Les discrepàncies en alguns resultats poden ser degudes per problemes de sensibilitat o especificitat de la tècnica utilitzada i no per una veritable falta de concordança.

Com ja s'ha comentat, la presència de mutacions en *K-RAS* si que és un factor predictiu important perquè ens condicionarà l'ús de determinats fàrmacs però la utilització com a factor pronòstic encara no està del tot establerta; en aquest sentit la determinació de l'estatus mutacional de *K-RAS* té una aplicació pràctica en la clínica diària. Per això, igual que altres autors, hem intentat esbrinar si la presència de mutacions en *K-RAS* es podia utilitzar com a factor pronòstic.

En la nostra sèrie vam trobar mutacions en el gen *K-RAS* en un 41,7% dels tumors. La freqüència d'aquestes mutacions és comparable a la d'altres treballs, tant si es tracta de sèries grans de pacients o sèries més petites equiparables a la nostra mostra. Les sèries grans són estudis multicèntrics, com per exemple l'estudi realitzat per Brink i col.⁹⁰ (n=737, 37% mutacions), l'estudi realitzat per De Roock i col.⁹¹ (n=773, 40% mutacions), l'estudi realitzat per Hutchins i col.⁹² (n=1913, 34% mutacions), o l'estudi realitzat per Andreyev i col.⁵⁹ (n=2721, 37,7% mutacions). En sèries més petites, com les realitzades per Yokota i col.⁹³ (n=349, 34,5% mutacions), De Roock i col.⁶⁶ (n=113, 40,7% mutacions), Laurent-Puig i col.⁵⁷ (n=109, 40,4%), Pricolo i col.⁵² (n=70, 36%mutacions), Morrin i col.⁵⁶ (n=52, 36,6% mutacions) o Lièvre i col.⁷³ (n=30, 43% mutacions) els resultats també són comparables. A l'Estat Espanyol es va iniciar a finals del 2008 un projecte anomenat *Determina KRAS*, on al llarg de 2 anys es van anar recollint dades de 12262 pacients i van fer una comparativa entre els resultats obtinguts respecte la freqüència i tipus de mutació amb altres estudis multicèntrics (Opus i Crystal) i van trobar resultats similars i comparables (n=12262, 44,7% mutacions).⁷⁹

Com ja hem vist anteriorment, per cada mostra de DNA tumoral es van determinar 7 possibles mutacions: 6 en el codó 12 i 1 en el codó 13. La seqüència de bases del DNA del gen *K-RAS* en el codó 12 és GGT, i codifica

per l'aminoàcid Glicina i la seqüència en el codó 13 és GGC i també codifica per l'aminoàcid Glicina. Les mutacions que tenen lloc en el gen *K-RAS* són per substitucions puntuals d'una d'aquestes bases. Si la substitució és d'una base purina (A,G) per una altra base purina es parla d'una transició i si la substitució és d'una base purina per una base piridímic (C,T) es parla d'una transversió. En el nostre cas, vam trobar un 61,3% de transicions i un 38,7% de transversions i majoritàriament les mutacions tenien lloc en la segona base tant en el codó 12 com en el 13 (80,6% en total). El 84,7% de totes les mutacions es van trobar en el codó 12 i les mutacions més freqüents que vam observar en aquest codó 12 van ser 12 ASP (n=35, 35,7%) i 12 VAL (n=24, 24,5%). Les mutacions presents en el codó 13 representaven el 15,3% del total de mutacions. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per altres autors, com per exemple el treball realitzat per Andreyev i col.⁵⁹ on en la seva sèrie de 2721 pacients van trobar mutacions en el codó 12 de Glicina a Aspàrtic en un 30,6%, de Glicina a Valina en un 16,7% i en el codó 13 de Glicina a Aspàtic en un 16,7%. Les mutacions també eren preferentment en la segona base dels codons 12 i 13 (78,1%) i van trobar un 55% de transicions i un 45% de transversions.

Com ja s'ha comentat en la introducció, l'estat conformacional de les proteïnes RAS està regulat per 2 tipus de factors: GEF i GAP. El complex molecular format per GAP-RAS està format per una sèrie d'interaccions i forces d'atracció moleculars on intervenen varies proteïnes. La posició de l'aminoàcid Gly12 en aquest complex és clau perquè s'activi la hidròlisi del GTP. Les proteïnes KRAS mutades tenen debilitat per GEF però són insensibles a l'acció de GAP, i aquest no pot desconnectar la transmissió del senyal i la proteïna continua activada permanentment.⁴⁹ Hi ha varis treballs en els que s'avalua si alguna mutació en concret té algun tipus de rellevància com a factor pronòstic; normalment es tracta d'estudis multicèntrics on han inclòs un gran nombre de pacients i per tant al fer subdivisions de la mostra continuen tenint un volum important de pacients en cada subgrup.^{94,95} No obstant, també hi ha altres treballs, inclosos el nostre, on s'avalua l'estatus mutacional de *K-RAS* com a factor pronòstic sense tenir en compte quin tipus de mutació en concret s'ha trobat.^{52,57}

Hem de considerar que tots els pacients inclosos en el nostre estudi eren d'ètnia caucàsica i pertanyien a una mateixa àrea geogràfica; per tant podem suposar que estaven sotmesos a unes condicions d'entorn ambiental així com de dieta similars. Hi ha varis estudis on valoren des del perfil sociocultural fins a diversos hàbits d'ingesta alimentaria o hàbits tòxics per valorar si es trobava alguna associació entre els tipus de mutacions en *K-RAS* i el risc de CCR.^{96,97} En aquesta línia, D.Bautista i col.⁹⁸ van fer un estudi amb 108 pacients de la Illa de Mallorca que havien estat diagnosticats d'un CCR i van observar que l'alt consum de greixos monoinsaturats (presentes en l'oli d'oliva, producte típic de la dieta mediterrània) estava associat amb un risc menor de patir un CCR però només amb els pacients que no presentaven mutacions en *K-RAS*. La pertinença en una àrea geogràfica concreta fa que la mostra que s'estudiï sigui més homogènia i així minimitzar les diferències que es poden produir en els estudis multicèntrics, on poden disposar d'un gran número de pacients però amb condicions ambientals heterogènies.

Un dels treballs més importants que s'ha realitzat per determinar si l'estatus mutacional de *K-RAS* es podia utilitzar com a factor pronòstic, va ser el realitzat per Andreyev i col.⁵⁹ i publicat el 1998 del qual ja n'hem parlat amb anterioritat. Aquest estudi, per tal de tenir una mostra gran i poder obtenir resultats concloents, van agrupar els pacients de CCR aportats per 22 grups provinents de 13 països. La mostra obtinguda va ser de 2721 pacients. Un 37,7% dels tumors presentava alguna mutació en el gen *K-RAS*. Les mutacions en el codó 12 representaven el 27,7% i en el codó 13 el 6,6%. En aquest estudi no van trobar correlació entre l'estatus mutacional i diverses variables clinicopatològiques com són: sexe, localització tumoral o l'estadiatge de Dukes, dades que concorden amb les nostres troballes. En l'anàlisi multivariable van trobar que la presència de mutacions incrementava el risc de recurrència ($p < 0,001$, HR=1,25, 95% IC=1,10-1,42) o de mort ($p = 0,004$, HR=1,22, 95% IC=1,04-1,40) i que la mutació 12VAL és comportava com un factor pronòstic independent, incrementant el risc de recurrència ($p = 0,007$, HR=1,39, 95% IC=1,10-1,74) i de mort ($p = 0,004$, HR=1,43, 95% IC=1,13-1,82). Els nostres resultats concorden amb aquest estudi, ja que nosaltres també vam trobar que la presència de mutacions incrementa el risc de recurrència ($p = 0,023$, HR=1,923, 95% IC=1,092-3,378) si es tenen en compte només les variables

presentes en el moment del diagnòstic, i també augmenta el risc de mort ($p=0,033$, $HR=1,663$, $95\% IC=1,040-2,659$). El que nosaltres no hem pogut confirmar és que la mutació 12VAL es comporta com un factor pronòstic independent, probablement degut a que només 24 individus presentaven aquesta mutació i no és suficient per tenir un pes estadístic important.

Aquests autors també van trobar que les mutacions eren més freqüents en els tumors ben o moderadament diferenciats que en els pobrament diferenciats ($p=0,002$), dada sorprenent si tenim en compte que els tumors més ben diferenciats tenen millor pronòstic, i en canvi la presència de mutacions té precisament un sentit oposat. Una explicació plausible per aquest fet podria ser donada per la variabilitat en la procedència de les mostres cosa que implica criteris menys homogenis de classificació.

Seguint aquesta línia de treball, l'any 2001 es va publicar una ampliació d'aquest estudi, liderat també per Andreyev i col⁶⁰ on després d'una selecció en funció d'uns criteris d'exclusió (per falta de dades clíniques, mostres provinents d'autòpsies, pacients morts post quirúrgicament, etc) es van recopilar 3439 pacients provinents de 35 centres de 19 països involucrats. En aquest treball, però, només es va poder confirmar que una mutació en concret en el codó 12, 12VAL, tenia un impacte negatiu sobre el temps lliure de malaltia ($p=0,004$, $HR=1,3$) i el temps de supervivència ($p=0,02$, $HR= 1,45$).

Ara bé, durant el procés de la carcinogènesi colorectal és evident que l'oncogen *K-RAS* no és l'únic gen implicat en aquest procés; la combinació entre varis oncogens, gens supressors de tumors i altres alteracions genètiques i epigenètiques seran el que finalment conduiran al fenotip tumoral i a l'expansió clonal. Revisant la literatura hem trobat molts treballs que tenen per objectiu determinar quins altres biomarcadors es poden utilitzar, junt amb *K-RAS*, per la selecció dels pacients que tindran més risc de recaiguda, o per l'elecció del tractament amb millor resposta.

Barault i col.⁹⁹ van fer un estudi ($n=586$) on es relacionaven les mutacions presents en 3 oncogens (*K-RAS*, *BRAF* i *PI3CA*) amb la supervivència. La cascada de reaccions RAS-MAPK i PI(3)K forma una xarxa d'interaccions bioquímiques que, quan algunes d'aquestes proteïnes estan mutades, condueixen al creixement cel·lular sense restriccions. Les proteïnes d'aquesta via RAS-MAPK i PI(3)K estan fortament interconnectades i juguen un paper

central en la tumorigènesi a través de coordinar la fosforilació d'altres proteïnes o factors de transcripció que regulen directament el creixement cel·lular, la diferenciació i l'apoptosi. La mutació en un d'aquests tres gens implicarà l'activació d'aquesta xarxa i un increment de la transcripció de diferents oncogens com c-MYC, CREB, NF-κB i altres. Aquests autors van trobar mutacions en *K-RAS* (34,4%), mutacions en *BRAF* (13,3%) i mutacions en *PI3CA* (17,8%). Un 56,4% dels tumors presentava, com a mínim, una mutació en algun d'aquests gens, el que activava la xarxa RAS-MAPK i PI(3)K. Van trobar que els pacients amb aquesta xarxa activada tenien un temps de supervivència menor ($P=0,017$, $HR1=48$, $IC\ 95\%=1,07-2,04$) que els pacients sense cap mutació en els tres gens. Respecte a les mutacions en *K-RAS* van trobar una associació significativa amb la localització proximal del tumor. En el nostre estudi aquesta associació no l'hem poguda corroborar.

Oliveira i col.¹⁰⁰ van fer un treball que relacionava les mutacions en *K-RAS* i *BRAF* en 250 CCR MSS i 45 nòduls limfàtics metastàtics (de 28 casos diferents) amb la progressió tumoral. Van trobar que les mutacions en *K-RAS* i *BRAF* estaven relacionades amb l'agressivitat de la malaltia i amb un pitjor pronòstic. Els pacients amb mutacions en *K-RAS* (35%), mutacions en *BRAF* (5,6%) o en ambdós gens (0,4%) tenien pitjor pronòstic amb un temps de supervivència menor que els pacients amb genotip *K-RAS* i *BRAF* nadius.

En aquesta línia, Zlobec i col.¹⁰¹ van fer un estudi mirant les implicacions de les mutacions en *K-RAS* i *BRAF* en 404 pacients amb CCR esporàdic i també van estudiar les implicacions pronòstiques de mutacions en *K-RAS* i 94 pacients amb CCR amb síndrome de Lynch (MSI-H). En els CCR esporàdics (MMS) van trobar mutacions en *K-RAS* (en el codó 12 i en el codó 13) en un 30,1% i en els CCR amb síndrome de Lynch (MSI-H), també en els 2 codons, en un 35,6%. També van trobar mutacions en *BRAF* en un 12% dels casos de CCR esporàdic i en un 1,2% dels CCR amb MSI-H. Van trobar que en CCR esporàdics, les mutacions en *K-RAS* en 12ASP tenien un efecte pronòstic negatiu comparat amb els tumors no mutats o amb mutacions en 13ASP ($p=0,038$). En contrapartida, van trobar que els pacients amb MSI-H i mutacions en *KRAS* 13ASP tenien un pronòstic excel·lent ja que tots els pacients amb aquestes característiques genètiques estaven vius. Aquests autors van proposar un algoritme on classificaven els pacients de CCR en 3 grups amb

característiques moleculars diferents i amb conseqüències pronòstiques també diferents, sent els pacients classificats en el grup 1 els de pitjor pronòstic i els del grup 3 els de millor pronòstic (Figura 26).

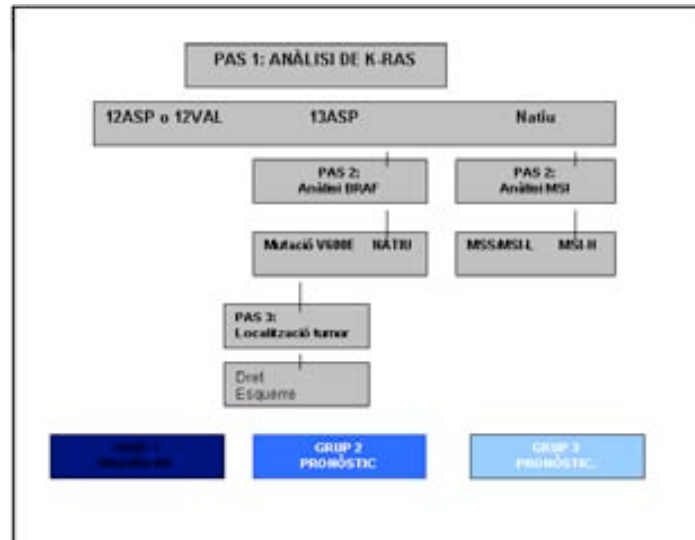


Figura 26: Algorisme il·lustratiu dels passos de les anàlisis moleculars on es classifiquen els pacients en 3 grups pronòstics en funció de l'estatus mutacional de *K-RAS*, *BRAF* (amb la localització tumoral) i la inestabilitat dels microsatèl·lits (esquema de l'article de Zlobec i col. ³¹)

Esteller i col. ¹⁰² van estudiar si l'activació de *K-RAS* i la inactivació de *p16* tenien relació amb la supervivència en pacients amb CCR. El gen *p16* és un gen supressor de tumors que codifica per una proteïna (quinasa dependent de ciclina) que intervé en la regulació del cicle cel·lular. La inactivació, que té lloc principalment per metilació del promotor 5' associat a les illes CpG, provoca un creixement cel·lular descontrolat. Van estudiar 115 casos de CCR i van trobar mutacions en *K-RAS* (38%) i metilacions en *p16* (37%). Els resultats que van obtenir van demostrar que les mutacions en *K-RAS* i les alteracions en *p16* eren successos genètics independents i la presència d'aquestes mutacions (amb presència simultània o alternativa) estava associada a una supervivència baixa. No obstant, quan s'anализava la presència de mutacions en *K-RAS* exclusivament no s'obtenien diferències significatives respecte el temps de supervivència.

Un altre treball relacionat amb els marcadors biomoleculars va ser realitzat per Fariña-Sarasqueta i col.¹⁰³ on van determinar l'estat mutacional de *BRAF*, MSI i *KRAS* i la seva relació amb el temps lliure de malaltia així com amb el temps de supervivència. En el seu treball van incloure 364 pacients diagnosticats d'un CCR (106 Estadi II i 258 Estadi III, ambdós estadis en el moment del diagnòstic); van trobar mutacions en *K-RAS* (33% Estadi II i 35% Estadi III), mutacions en *BRAF* (22% Estadi II i 19% Estadi III) i MSI (25% Estadi II i 14% Estadi III). Les mutacions en *KRAS* i en *BRAF* eren mútuament excloents ($p < 0,001$), com ja s'havia confirmat anteriorment.¹⁰⁴ En l'anàlisi univariable, aquests autors van observar que hi havia una associació entre l'estatus mutacional de *K-RAS* i el temps lliure de malaltia ($p = 0,003$); en la nostra sèrie també vam observar resultats similars respecte el temps lliure de malaltia ($p = 0,014$) si només teníem en compte les mutacions més freqüents, però si valoràvem la presència o absència de mutacions totals no vam trobar diferències significatives ($p = 0,525$). Fariña i col, van concloure que la presència de mutacions en *K-RAS* no tenien un efecte sobre la supervivència en pacients tant en estadi II com en estadi III de la malaltia. No obstant, si que hi havia diferències significatives respecte el temps lliure de malaltia entre els tumors amb *K-RAS* natiu i *K-RAS* mutat (tant en estadi II com en estadi III) i per tant les mutacions en *K-RAS* es comportaven com un factor pronòstic independent ($HR = 0,6$, $95\% IC = 0,4-0,97$) reduint el temps lliure de malaltia. En la nostra sèrie vam trobar resultats similars. Aquests autors també van arribar a la conclusió que la presència de mutacions en *BRAF* comportava un pitjor pronòstic, independentment de l'estadi de la malaltia.

Bazan i col.¹⁰⁵ van fer un estudi per veure si alguna mutació en concret de *K-RAS* tenia una significació pronòstica o estava associada a algun paràmetre clinicopatològic. Es va establir l'estatus mutacional de 160 pacients diagnosticats de CCR. Van trobar que un 46% de tumors presentaven mutacions en algun dels 2 codons, 54% en el codó 12 i 42% en el codó 13. Els resultats que van obtenir suggerien que les mutacions en el codó 13 incrementaven el risc de mort ($p < 0,05$, $HR = 1,93$, $IC = 1,17-3,18$) i el risc de recaiguda ($p < 0,05$, $HR = 1,9$, $IC = 1,01-3,20$). També van observar que les mutacions en el codó 12 s'associaven al fenotip mucinós i les mutacions en el

codó 13 al fenotip no-mucinós, que és més agressiu i té un potencial metastàtic més alt.

Russo i col.¹⁰⁶ van fer una ampliació de l'estudi RASCAL II⁶⁰ per avaluar el valor pronòstic de les mutacions en *TP53* en CCR. EL gen *TP53* és un proto-oncogèn que es localitza en el cromosoma 17 i codifica per una proteïna, anomenada TP53, que inhibeix la proliferació cel·lular en cèl·lules que tenen errors en el DNA que no han pogut ser reparats. Les mutacions (que poden tenir lloc en varies regions i poden ser per insercions, delecions, transversions o transicions) en un o dos dels al·lels d'aquest gen interfereixen en la seva funció. En aquest estudi es va avaluar un total de 2397 tumors i es van trobar mutacions en *TP53* tant en còlon proximal (34%) com en còlon distal i recte (45%). En aquest estudi van demostrar que diferents tipus de mutació en *TP53* podrien tenir diversos rols en el comportament biològic dels tumors en diverses localitzacions del còlon i influir en el pronòstic dels pacients. Aquest treball també confirmava els resultats obtinguts per l'estudi RASCAL on es suggeria que les mutacions en *K-RAS* tenien un efecte sobre la supervivència i en concret la mutació en el codó 12 (12VAL) jugava un paper en la progressió d'aquestes neoplàsies, ja que s'observava un 30% més de risc de recaiguda o de mort. A més a més, si aquestes mutacions estaven presents en estadis més avançats de la malaltia, el risc augmentava al 50%.

Els resultats que han obtingut altres grups de treball difereixen d'aquest treballs anteriorment exposats. Laurent-Puig i col.⁵⁷ van realitzar un treball on estudiaven tres possibles tipus d'alteracions genètiques (mutacions en *K-RAS*, índex de DNA i pèrdues al·lèliques dels cromosomes 17p, 18q, 5q i 1p) en 109 pacients diagnosticats de CCR respecte el temps de supervivència. Un 40,4% dels tumors presentaven alguna mutació en el codó 12 o 13 de *K-RAS*. Els resultats que van obtenir només van confirmar que les pèrdues al·lèliques de 17p es comportaven com un factor pronòstic independent reduint el temps de supervivència ($p < 0,004$, HR=4,5, 95% IC=1,3-15,6); també van arribar a la conclusió que la supervivència no es veia influenciada per la presència de mutacions en el codó 12 i 13 de *K-RAS*.

Norheim Andersen i col.¹⁰⁷ van fer un estudi amb 100 CCR on miraven si hi havia relació entre l'estatus mutacional de *K-RAS*, l'estadiatge de Dukes i la supervivència. Un 40% dels tumors presentava alguna mutació en el codó 12 i

13 de *K-RAS* . Aquests autors van trobar que els pacients portadors de la mutació tenien un risc relatiu (RR=1,22, 95% IC= 0,67-2,20) més elevat de morir per càncer sense arribar a ser significatiu ($p>0,05$) que els pacients sense mutació. Per tant van concloure que la presència de mutacions no tenia un valor pronòstic significant pels pacients.

Pricolo i col.⁵² van estudiar 70 CCR (tots classificats en l'estadi III en el moment del diagnòstic). Van determinar l'estatus mutacional de *K-RAS* (36%) i *TP53* (61%) per determinar si podien tenir una significació pronòstica respecte la supervivència. En funció del genotip (presència o absència de mutacions en *K-RAS* i *TP53*) van establir 4 grups. El grup que tenia els 2 gens nadius tenia una supervivència més alta en comparació amb el grup que tenia *TP53* mutat i *K-RAS* natiu. Els pacients amb *TP53* mutat tenien més risc de morir per càncer ($p=0,006$, RR=2,39, 95% IC=1,29-4,42) que els pacients amb *TP53* natiu i els pacients amb *K-RAS* mutat no presentaven més risc de mort ($p=0,81$, RR=0,93, 95% IC=0,51-1,69) que els pacients amb *K-RAS* natiu.

Un altre treball realitzat en aquesta línia va ser el publicat per Bouzourene i col.¹⁰⁸ on van estudiar l'estatus mutacional de *K-RAS* (38% mutats) *TP53* (32% mutats) i la sobreexpressió de p53 (47% sobreexpressió) en 122 casos de CCR en estadi Dukes B. Aquest autors van trobar que només la sobreexpressió de p53 es comportava com un factor pronòstic independent ($p=0,02$, HR=2,16, 95% IC=1,12-4,11). Les mutacions en *K-RAS* i en *TP53* no es correlacionaven amb un pitjor pronòstic.

Samowitz i col.⁹⁴ van fer un altre estudi on hi havia un gran nombre de pacients amb CCR implicats ($n=1413$), amb una freqüència de mutacions en *K-RAS* del 32%. Aquests autors van fer un estudi detallat de les diferents mutacions en el codó 12 i 13, així com també van correlacionar si les transicions o transversions en les mutacions estaven associades amb algunes característiques clinicopatològiques (edat, sexe, localització del tumor i estadi tumoral). Van trobar alguna associació entre les mutacions en el codó 12 i l'estadiatge tumoral, la localització proximal i el gènere masculí. Ara bé, no van trobar associacions estadísticament significatives entre les mutacions en *K-RAS* i la supervivència.

Roth i col.⁹⁵ van publicar un treball on també hi havia un gran nombre de pacients implicats ($n=1321$) els quals van ser classificats en estadi II (69%) i en

estadi III (30,9%). Van determinar l'estatus mutacional de *K-RAS* (37%), l'estatus mutacional de *BRAF* (7,9%). També van classificar els pacients en funció del MSI. Amb l'anàlisi multivariable, no van trobar diferències significatives entre la presència de mutacions en *K-RAS* i la supervivència ($p=0,60$, $HR=1,20$, $95\% IC=0,99-1,67$) o el temps lliure de malaltia ($p=0,11$, $HR=1,05$, $95\% IC=0,96-1,49$) tant en estadi II com III. Tampoc van trobar un valor pronòstic significatiu quan s'analitzava cada una de les 7 mutacions en particular. En canvi, sí que van trobar diferències significatives entre l'estatus mutacional de *BRAF* i el temps de supervivència sobretot en pacients amb estadi II i MSS. Una explicació plausible d'aquestes discordances respecte als nostres resultats podria ser, o bé pel baix nombre de pacients implicats en alguns d'aquests estudis (entre 70 i 122 pacients) en contrapartida dels 235 pacients que nosaltres hem estudiat, o en el cas dels estudis realitzats per Samowitz i col. o per Roth i col. el baix percentatge de mutacions en *K-RAS* que van determinar (32% i 37% respectivament), respecte el 41,7% de mutacions en *K-RAS* que nosaltres vam determinar.

L'estudi de l'estatus mutacional de *K-RAS* és habitual en la pràctica clínica en pacients amb CCRm per determinar si podran ser tributaris de la teràpia amb anticossos monoclonals dirigits contra l'EGFR. Ara bé, la necessitat de trobar el màxim de factors pronòstics i predictius possibles per poder seleccionar els pacients que tindran un pronòstic millor, és a dir, poder seleccionar aquells pacients que amb alta probabilitat recauran o metastatitzaran (i per tant necessitaran uns controls més estrictes) o els que seran sensibles o resistent a determinades teràpies, és un camí complex i amb gran nombre d'interaccions on hi ha implicats múltiples factors, des de genètics fins a ambientals.

Tots aquests estudis exposats anteriorment ens indiquen que el valor pronòstic de les mutacions en *K-RAS* encara no està del tot establert, probablement degut a varis factors, com la mida de la mostra, la selecció dels pacients, les mostres tumorals, l'ús de teixit parafinat versus teixit congelat, mètodes de laboratori no estandarditzats, etc. el que ens indica que és necessari continuar investigant en aquesta línia.

CONCLUSIONS

6 CONCLUSIONS

1. En la nostra sèrie, la presència de mutacions en el gen *K-RAS* es comporta com un factor pronòstic independent respecte la supervivència global en pacients diagnosticats d'un carcinoma colorectal.
2. El risc de morir en pacients diagnosticats d'un carcinoma colorectal és 1,7 cops més gran en pacients portadors d'una mutació en *K-RAS* que en pacients no portadors d'aquesta mutació.
3. La presència de mutacions en el gen *K-RAS* es comporta com un factor pronòstic independent respecte el temps lliure de malaltia en pacients diagnosticats d'un carcinoma colorectal.
4. El risc de recaiguda o d'aparició de metàstasis en pacients diagnosticats d'un carcinoma colorectal és 1,9 cops més gran en pacients portadors d'una mutació en *K-RAS* que en pacients no portadors d'aquesta mutació.
5. Donada la significació pronòstica de les mutacions en el gen *K-RAS* en el CCR, seria recomanable efectuar la determinació de l'estatus mutacional de *K-RAS* en tots els casos de CCR i no només en els casos de carcinomes colorectals metastàtics.

BIBLIOGRAFIA

7 BIBLIOGRAFIA

¹ Cunninham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. Lancet. 2010;375:1030-1047.

² Parkin Dm, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005;55:74-108.

³ Labianca R, Beretta JD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, et al. Colon cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2010;74:106-133.

⁴ Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, et al. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. Lancet Oncol. 2007; 8:773-83.

⁵ Morillas JD, Castells A, Oriol I, Pastor A, Pérez-Segura P, Echevarría JM, et al. Alianza para la Prevención del Cáncer de Colon en España: un compromiso cívico con la sociedad. Gastroenterol Hepatol. 2012;35:109-128.

⁶ Borràs JM, Pareja L, Peris M, Espinàs JA. Análisis de la incidencia, la supervivencia y la mortalidad según las principales localizaciones tumorales, 1985-2019: cáncer colorrectal. Med Clin. 2008;131:58-62.

⁷ Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. (eds). Seventh edition. TNM. Classification of malignant tumors. Oxford : Wiley-Blackwell, 2009.

⁸ Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. (eds). Fourth Edition. WHO. Classification of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2010.

⁹ Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin.* 2004;54:295-308.

¹⁰ Kwak EL, Chung DC. Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clin Colorectal Cancer.* 2007;6:340-344.

¹¹ World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective.* Washington DC: AICR, 2007.

¹² Benardaf R, Lamlum H, Pyrhönen S. Prognostic and predictive molecular markers in colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2004;24:2519-2530.

¹³ Bodmer W, Bailey C, Bodmer J, Bussey H, Ellis A, Gorman P, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature.* 1987;328:614–616.

¹⁴ Pino MS, Chung DC. Application of molecular diagnostics for the detection of Lynch syndrome. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10:651–665.

¹⁵ Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6:479-507.

¹⁶ Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet.* 2009;76:1-18.

¹⁷ Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1-19.

¹⁸ Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61:759-767.

-
- ¹⁹ Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, Lardonand F, Vermorken JB. A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *Oncologist*. 2010;15:699-731.
- ²⁰ Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2059-2072.
- ²¹ Harrison S, Benziger H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *Surgeon*. 2011;9:200-210.
- ²² Waldner MJ, Neurath MF. The molecular therapy of colorectal cancer. *Mol Aspects Med*. 2010;31:171-178.
- ²³ Drescher KM, Sharma P, Lynch HT. Current hypotheses on how microsatellite instability leads to enhanced survival of Lynch syndrome patients. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:1-13.
- ²⁴ Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2073-2087.
- ²⁵ Liu M, Chen H. The role of microRNAs in colorectal cancer. *J Genet Genomics*. 2010;37:347-358.
- ²⁶ Arrington AK, Heinrich EL, Lee W, Duldulao M, Patel S, Sanchez J, et al. Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;25:2153-2168.
- ²⁷ Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, Köhne CH, Pozzo C, Poston G, et al. On behalf of European Colorectal Metastases Treatment Group. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer*. 2006;42:2212-2221.

-
- ²⁸ Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:979-994.
- ²⁹ Compton C. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol.* 2003;16:376-88.
- ³⁰ Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 2011;29:610-618.
- ³¹ Zlobec PI, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Postgrad Med J.* 2008;84:403-411.
- ³² Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012; 23:2479-2516.
- ³³ Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005;23:609-618.
- ³⁴ Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2007;25:3230-3237.
- ³⁵ Duffy MJ, O'Donovan N, Crown J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer Treat Rev.* 2011;37:151-159.
- ³⁶ Monticone M, Biollo E, Maffei M, Donadini A, Romeo F, Tiziana C, et al. Gene expression deregulation by KRAS G12D and G12V in a BRAF V600E context. *Mol Cancer.* 2008;7:92-103.

-
- ³⁷ De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PI3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Oncol* . 2011;12:594-603.
- ³⁸ Esteban J, Herrerías JM, Esteban P. Oncogenes y cáncer colorectal. *Rev Gastroenterol*. 2001;3:181-198.
- ³⁹ Winder T, Lenz HJ. Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat Rev*. 2010;36:550-556.
- ⁴⁰ El-Shami K, Nallapareddy S, Messersmith W. Systemic therapy for colon cancer. A: Gearhart S, Ahuja N. *Colorectal cancer-early diagnosis and treatment of cancer series*: Philadelphia: Elsever, 2010: p.167-183.
- ⁴¹ Aiello M, Vella N, Cannavò C, Scalisi A, Spandidos D, Toffoli G, al. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy (Review). *Mol Med Rep*. 2011;4:203-208.
- ⁴² Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:459-465.
- ⁴³ Young A, Lyons J, Miller AL, Phan VT, Alarcón IR, McCormick F. Ras signaling and therapies. *Adv Cancer Res*. 2009;102:1-17.
- ⁴⁴ Krens LL, Baas JM, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Therapeutic modulation of k-ras signaling in colorectal cancer. *Drug Discov Today*. 2010;15:502-516.
- ⁴⁵ Castagnola P, Giaretti W. Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1756:115-125.
- ⁴⁶ Trust Sanger Instituted. Cosmic: Catalogue of somatic mutations in cancer. Pàg.web.[Juliol,2011] Disponible a: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

⁴⁷ Van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch.* 2008;453:417-431.

⁴⁸ Mancl EE, Kolesar JM, Vermeulen LC. Clinical and economic value of screening for Kras mutations as predictors of response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Am J Health Syst Pharm.* 2009;66:2105-2112.

⁴⁹ Scheffzck K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, et al. The Ras/RasGAP Complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science.* 1997;277:333-338.

⁵⁰ Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319:525-32.

⁵¹ Tanaka M, Omura K, Watanabe Y, Oda Y, Nakanishi I. Prognostic factors of colorectal cancer: K-ras mutation, overexpression of the p53 protein, and cell proliferative activity. *J Surg Oncol.* 1994;57:57-64.

⁵² Pricolo VE, Finkelstein SD, Wu TT, Keller G, Bakker A, Swalsky PA, et al. Prognostic value of TP53 and K-ras-2 mutational analysis in stage III carcinoma of the colon. *Am J Surg.* 1997;171:41-46.

⁵³ Troungos C, Valavanis C, Kapranos N, Kittas C. K-ras mutation in Greek patients with poorly and moderately differentiated tumours of the lower intestinal tract. *Anticancer Res.* 1997;17:1399-1404.

⁵⁴ Rochlitz CF, Heide I, de Kant E, Böhmer R, Peter F, Neuhaus P, et al. Position specificity of Ki-ras oncogene mutations during the progression of colorectal carcinoma. *Oncology.* 1993;50:70-76.

⁵⁵ Dix BR, Robbins P, Soong R, Jenner D, House AK, Lacopetta J. The common molecular genetic alterations in Dukes' B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer*. 1994;59:747-751.

⁵⁶ Morrin M, Kelly M, Barrett N, Delaney P. Mutations of Ki-ras and p53 genes in colorectal cancer and their prognostic significance. *Gut*. 1994;35:1627-1631.

⁵⁷ Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Remvikos Y, Asselain B, Melot T, et al. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1992;102:1136-1141.

⁵⁸ Inoue Y, Saigusa S, Iwata T, Okugawa Y, Toiyama Y, Tanaka K et al. The prognostic value of KRAS mutations in patients with colorectal cancer. *Oncol. Rep*. 2012;28:1579-1584.

⁵⁹ Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:675-684.

⁶⁰ Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Lacopetta BJ et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*. 2001;85:692-696.

⁶¹ Ren JJ, Li GX, Ge J, Li X, Zhao YS. Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2012;55:913-923.

⁶² Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27:2091-2096.

⁶³ Burtness B, Anadkat M, Basti S, Hughes M, Lacouture ME, McClure JS, et al. NCCN Task force report: management of dermatologic and other toxicities associated with EGFR inhibition in patients with cancer. *J Natl Compr Ca Netw*. 2009;7:S5-21.

⁶⁴ Bekaii-Saab T. KRAS testing in metastatic colorectal cancer: implications on the use of biologic agents. *Clin Colorectal Cancer*. 2009;8:135-140.

⁶⁵ Di Fiore F, Van Cutsem P, Laurent-Puig P, Siena S, Frattini M, De Roock W, et al. Role of *KRAS* mutation in predicting response, progression-free survival, and overall survival in irinotecan-refractory patients treated with cetuximab plus irinotecan for metastatic colorectal cancer: analysis of 281 individual data from published series. *J Clin Oncol*. 2008;26:4035(403A).

⁶⁶ De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, et al. *KRAS* wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol*. 2008;19:508-515.

⁶⁷ Cohn L, Smith DA, Neubauer MA, Houston G, Khandelwal P, Wiggans RG, et al. Panitumumab (pmab) regimen evaluation in colorectal cancer to estimate primary response to treatment (PRECEPT): effect of *KRAS* mutation status on second-line treatment (TX) with pmab and FOLFIRI. *J Clin Oncol*. 2008; 26:209 (4127 A).

⁶⁸ Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. *KRAS* mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008; 26:374-379.

⁶⁹ Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, et al. Oncogenic activation of de RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res*. 2007; 67:2643-2648.

⁷⁰ Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer*. 2007;96:1166-1169.

⁷¹ Finochchiaro G, Cappuzzo F, Jänne PA, Bencardino K, Carnaghi C, Franklin WA, et al. EGFR, HER2 and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:1166-1169.

⁷² Freeman DJ, Juan T, Reiner M, Hecht JR, Meropol NJ, Berlin J, et al. Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin Colorectal Cancer*. 2008; 7:184-190.

⁷³ Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006;66:3992-3995.

⁷⁴ Plesec TP, Hunt JL. KRAS Mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol*. 2009;16:196-203.

⁷⁵ Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch R, Franklin WA, Eckhardt SG. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol*. 2009; 27:1130-1136.

⁷⁶ Heideman DA, Thunnissen FB, Doeleman M, Kramer D, Verheul HM, Smit E, et al. A panel of high resolution melting (HRM) technology-based assays with direct sequencing possibility for effective mutation screening of EGFR and K-ras genes. *Cell Oncol*. 2009;31:329-33.

-
- ⁷⁷ Pinto P, Rocha P, Veiga I, Guedes J, Pinheiro M, Peixoto A, et al. Comparison of methodologies for KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Genet.* 2011;204:439-446.
- ⁷⁸ Wang HL, Lopategui J, Amin MB, Patterson SD. KRAS mutation testing in human cancers: the pathologist's role in the era of personalized medicine. *Adv Anat Pathol.* 2010;17:23–32.
- ⁷⁹ Hernández-Losa J, Sanz J, Landolfi S, López-Ríos F, Palacios JB, Díaz-Rubio MD, et al. Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. *Rev Esp Patol.* 2012;45:76-85.
- ⁸⁰ Fakhri MM. KRAS mutation screening in colorectal cancer: from paper to practice. *Clin Colorectal Cancer.* 2010;9:22-30.
- ⁸¹ Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, François E, Formento P, Renée N, et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:4830-4835.
- ⁸² Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, Gambi V, Sarnataro CS, Gambacorta M, et al. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J.Clin Oncol.* 2008; 26:4217-4219.
- ⁸³ Losi L, Benhattar J, Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1992; 28:1115–1120.
- ⁸⁴ Schimanski CC, Linneman U, Berger MR. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res.* 1999; 59:5169-5175.

⁸⁵ Oudejans JJ, Slebos RJ, Zoetmulder FA, Mooi WJ, Rodenhuis S. Differential activation of ras genes by point mutation in human colon cancer with metastases to either lung or liver. *Int J Cancer*. 1991; 49:875-879.

⁸⁶ Albanese I, Scibetta AG, Migliavacca M, Russo A, Bazan V, Tomasino RM, et al. Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325:784-791.

⁸⁷ Suchy B, Zietz C, Rabes HM. K-ras point mutations in human colorectal carcinomas: Relation to aneuploidy and metastasis. *Int J Cancer*. 1992; 52:30-33.

⁸⁸ Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET, Winter A, Pickford IR, Birnie GD. Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol*. 1998; 185:130-138.

⁸⁹ Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Florian I, Stasi I, Canestrari E, et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist*. 2008; 13:1270-1275.

⁹⁰ Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pache MM, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2003;24:703-710.

⁹¹ De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11: 753-762.

⁹² Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of Mismatch Repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *Clin Oncol*. 2011;29:1261-1270.

⁹³ Yokota T, Ura T, Shibata N, Takahari D, Shitara K, Nomura M, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011;104:856-62.

⁹⁴ Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: A population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:1193-1197.

⁹⁵ Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic Role of KRAS and BRAF in Stage II and III resected colon cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 Trial. *J Clin Oncol*. 2009;28:466-474.

⁹⁶ Weijenberg MP, Lüchtenborg M, de Goeij AF, Brink M, van Muijen GN, de Brüne AP, et al. Dietary fat and risk of colon and rectal cancer with aberrant MLH1 expression, APC or KRAS genes. *Cancer Causes Control*. 2007;18: 865-879.

⁹⁷ Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Edwards S, Leppert M, et al. Associations between dietary intake and Ki-ras mutations in colon tumors: A population-based study. *Cancer Res*. 2000;60:6935-6941.

⁹⁸ Bautista D, Obrador A, Moreno V, Cabeza E, Canet R, Benito E, et al. Ki-ras mutation modifies the protective effect of dietary monounsaturated fat and calcium on sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997;6:57-61.

⁹⁹ Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer*. 2008;122:2255-2259.

¹⁰⁰ Oliveira C, Velho S, Moutinho C, Ferreira A, Preto A, Domingo E, et al. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene*. 2007;26:158-163.

¹⁰¹ Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, Molinari F, Bihl MP, Ruffle A, et al. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010;127:2569-2575.

¹⁰² Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello R, Mangués JR, Germà JG, et al. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19:299-304.

¹⁰³ Fariña-Sarasqueta TA, Van Lijnschoten G, Moerland E, Creemrs GJ, Lemmens VE, Rutten HJ, et al. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. *Ann Oncol*. 2010;21:2396-2402.

¹⁰⁴ Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor – targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:1308-1324.

¹⁰⁵ Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol*. 2002;13:1438-1446.

¹⁰⁶ Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies. *Ann Oncol.* 2005;16:44-49.

¹⁰⁷ Norheim Andersen S, Løvig T, Breivik J, Lund E, Gaudernack G, Meling GI, Rognum TO. K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas. *Scand J Gastroenterol.* 1997;32:62-69.

¹⁰⁸ Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini JP, Benhattar J, Chaubert P, Saraga E, et al. P53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2000;36:1008-1015.

