

PAPEL DE MSI, BRAF Y KRAS COMO  
FACTORES PRONÓSTICOS DE  
SUPERVIVENCIA EN EL CANCER  
COLORRECTAL:  
ANÁLISIS DE LA EXPERIENCIA EN  
NUESTRA INSTITUCIÓN

**FACULTAT DE MEDICINA**  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Autor: **Agostina Stradella**

Director: **Dr. José Pablo Maroto Rey**

Trabajo de investigación correspondiente al Máster Oficial  
“INVESTIGACIÓ CLÍNICA APLICADA EN CIÈNCIES DE LA  
SALUT”

Junio 2013

## **Índice**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Resumen .....            | pág. 1  |
| Introducción .....       | pág. 2  |
| Material y Métodos ..... | pág. 4  |
| Resultados .....         | pág. 6  |
| Discusión .....          | pág. 17 |
| Conclusiones .....       | pág. 20 |
| Bibliografía .....       | pág. 21 |

## **Resumen**

El cáncer colorrectal (CCR) presenta una elevada incidencia y mortalidad. El tratamiento en estadios localizados es la cirugía, con lo que se le logran índices de supervivencia a 5 años. La quimioterapia como tratamiento complementario ofrece un moderado beneficio absoluto en la supervivencia.

En las últimas décadas se han estudiado y descrito factores pronósticos moleculares como KRAS, BRAF y MSI para intentar comprender el curso evolutivo de esta neoplasia.

Con la hipótesis de aclarar cuáles son los verdaderos factores de mal pronóstico analizamos, en nuestra cohorte de 198 pacientes afectados de CCR con recidiva tras la cirugía inicial, el estado de KRAS, BRAF y MSI para poder determinar su posible papel como factor pronóstico.

En nuestro estudio, la inestabilidad de microsatélites y la mutación de BRAF resultaron factores independientes de mal pronóstico. KRAS no resultó factor pronóstico en nuestra serie.

Nuestros resultados sobre MSI son opuestos a los publicados con anterioridad, posiblemente debido a las características de la población incluida en nuestra serie y el reducido tamaño de la muestra.

Dado que los resultados continúan siendo contradictorios en varios estudios creemos que podrían existir factores moleculares aún desconocidos que podrían estar ocultando el verdadero valor pronóstico de MSI.

## **Introducción**

El cáncer colorrectal (CCR) representa el segundo cáncer más frecuente en todo el mundo siendo en España la 2º causa de muerte por cáncer (tras el cáncer de pulmón en los hombres y tras el Cáncer de mama en las mujeres)<sup>1</sup>. El riesgo de recurrencia después de la cirugía radical en los estadios II y III se mantiene entre 45-50%<sup>2</sup>. La quimioterapia complementaria con un esquema basado en fluoropirimidinas logra reducir el riesgo de recaída en 21% para el estadio II y en 25% para el estadio III<sup>3-5</sup>.

En la actualidad se recomienda la administración de quimioterapia (QT) adyuvante en todos los casos diagnosticados en estadio III y en los pacientes estadios II ante la presencia de factores de riesgo de recidiva (T4, perforación u oclusión intestinal como debut de la enfermedad, tumores de alto grado histológico, invasión linfática, vascular o perineural y Linfadenectomía subóptima). No obstante, el beneficio absoluto aportado por tratamiento complementario en la supervivencia sólo se refleja en un 10-15% en estadios III y menos del 5% en los tumores de estadio II.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de encontrar otros factores de pronóstico para el cáncer colorrectal estadio III y especialmente en estadio II, para seleccionar mejor a los pacientes con mayor riesgo de recurrencia que más se beneficiarían de la quimioterapia adyuvante.

Se han descrito dos vías principales como responsables de la tumorigénesis en CRC. La inestabilidad cromosómica se observa en el 85% de los CCR esporádicos (tumores CIN). En el 15% restante se presenta una alteración en los genes de reparación del ADN (mismatch repair, MMR)<sup>6,7</sup>. Esta deficiencia en los genes de reparación del ADN produce errores en la replicación, especialmente en los microsatélites.

Los microsatélites son cortas secuencias repetitivas de ADN distribuidas por todo el genoma, situadas con frecuencia en la región promotora de los genes y, su replicación alterada, denominada inestabilidad de microsatélites (MSI), conduce a proteínas truncadas.

Los cánceres MSI presentan un fenotipo específico. Son más frecuentes en colon derecho, en tumores mal diferenciados, con la histología mucinosa y muestran un porcentaje elevado de infiltración linfocitaria en el estudio anatomopatológico. Además, frecuentemente estos tumores están asociados a mutaciones BRAF.

El análisis del papel del estado de MSI en CRR estadios II y III ha sido estudiado en cuatro grandes estudios aleatorizados, evidenciándose que la inestabilidad de microsatélites confiere una supervivencia libre de enfermedad y global más larga.<sup>8-11</sup>

Así pues MSI se ha propuesto como un posible factor pronóstico.

La mutación en los genes de BRAF y KRAS también se ha relacionado a la carcinogénesis del CCR. Se ha estudiado su capacidad para predecir la evolución de los pacientes con CCR. En los cuatro grandes estudios realizados para analizar el papel del tratamiento adyuvante, además del estado de MSI se analizó el estado de BRAF<sup>8-11</sup>.

Todos confirmaron la fuerte asociación entre MSI y la mutación BRAF. La mutación BRAF se asoció con una supervivencia global más corta en dos de los estudios, pero su valor pronóstico no se confirmó en los otros dos.

Si bien es indiscutible el papel de KRAS como factor predictivo de respuesta al tratamiento anti-EGFR, el valor pronóstico es más incierto. En tres estudios se analizó la relación entre la mutación KRAS y la evolución clínica, pero sólo en una de ellas se detectó una relación con un aumento del riesgo de recidiva<sup>12-14</sup>.

En el primer meta-análisis publicado, con datos de 2721 pacientes, se encontró una correlación entre los tumores KRAS mutados y una supervivencia general más corta<sup>14</sup>. Posteriormente, subestudios traslacionales realizados sobre la población incluida en ensayos clínicos de adyuvancia no pudieron demostrar que la mutación de KRAS sea un factor pronóstico<sup>11,15</sup>.

Cabe destacar que estos estudios describieron que una mutación específica G12val confería un peor pronóstico de los tumores en estadio III.

A la luz de estas disparidades, decidimos evaluar el valor pronóstico de MSI, KRAS y BRAF para el CCR en estadio II y III desde un ángulo diferente. Para ello, se ha analizado el estado de MSI, mutación de KRAS y de BRAF en una serie de pacientes con CCR en estadio II y III que presentaron una recurrencia de la enfermedad tras el tratamiento radical inicial y posteriormente lo hemos correlacionado con la supervivencia.

## **Material y Métodos**

Es un estudio retrospectivo realizado sobre pacientes diagnosticados de Cáncer Colorrectal en estadio localizado que sufrieron una recaída tras el tratamiento radical inicial. El periodo de estudio fue entre diciembre de 1995 octubre de 2011. Para su realización se revisaron los datos de la historia clínica y los datos introducidos en el Registro de tratamiento y control del Servicio de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Se incluyeron en el estudio un total de 198 pacientes.

Los criterios de inclusión fueron: confirmación histológica de Adenocarcinoma, Estadio clínico al diagnóstico I, II o III, estudio de extensión negativo al momento del tratamiento inicial (mediante TC abdominal y TC torácica o Rx de tórax), cirugía inicial radical y disponibilidad de bloque de muestras de parafina en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital.

### **- Extracción de ADN**

Los bloques tumorales fijados en formaldehído e incluidos en parafina fueron revisados en un primer momento por el patólogo para valorar el contenido del tumor y la calidad del material genético.

Posteriormente se analizaron aquellas muestras con cantidad tumoral representativa (con por lo menos un 70% de las células neoplásicas)

El ADN genómico fue extraído utilizando el kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) según lo especificado por las instrucciones del fabricante.

### **- Análisis del estado mutacional de K-RAS**

Sobre las muestras seleccionadas se evaluaron el codón 12 y 13 de K-RAS. El análisis mutacional se realizó mediante amplificación por PCR del exón 2 del gen K-RAS siguiendo instrucciones del kit TheraScreen KRAS por PCR QIAGEN (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden)

Teniendo en cuenta la evidencia de que las mutaciones KRAS y BRAF son mutuamente excluyentes<sup>16,17</sup>, BRAF no se ha estudiado en pacientes portadores de la mutación KRAS.

### **- Análisis del estado mutacional de B-RAF**

Para la valoración del estado de B-RAF el ADN tumoral fue amplificado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente mediante secuenciación del exón 15 del gen BRAF.

El procesamiento mediante PCR las muestras se procesaron bajo las siguientes condiciones térmicas; inicialmente se mantuvieron durante 12 min a 94°, luego se centrifugaron (40 ciclos de 45 segundos) a la misma temperatura. Posteriormente se procesaron 45 segundos a 55° y 10 minutos a 72°, para finalmente realizar la extensión de 10 minutos a 72°.

Cada muestra se analizó bajo electrofluorescencia en el ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### - Análisis MSI

Estado de estabilidad- inestabilidad de microsatélites se determinó mediante PCR utilizando cebadores marcados con fluorocromos para los cinco marcadores de microsatélites recomendados (BAT 25, BAT 26, NR-21, NR-24 y NR-27). Los cebadores y condiciones de amplificación de PCR se realizaron como se ha descrito anteriormente. Se realizaron PCR individuales para cada marcador, y a continuación, cada muestra fue analizada mediante electroforesis en el ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los tumores se consideraron inestables cuando se encontraron dos o más marcadores alterados. (NCCN).

#### - Análisis estadístico

Los objetivo principal del estudio fue analizar el estado de MSI, BRAF y KRAS y su correlación con la Supervivencia libre de enfermedad (SLE), la supervivencia tras recaída (STR) y la supervivencia global (SG). La SLE se definió como el tiempo desde la cirugía radical hasta el momento de la recaída, muerte o aparición de una segunda neoplasia. La STR se definió como el tiempo desde la recaída hasta la muerte relacionada a la enfermedad u otra causa. La SG se definió como el tiempo desde la cirugía radical hasta la muerte del paciente o último control en los casos de discontinuarse el seguimiento por motivos no relacionados a la enfermedad.

Los datos clínicos, las fechas de recaída y muerte se obtuvieron de los registros médicos de los pacientes con seguimiento completo hasta el 15 de octubre de 2012. Los pacientes que permanecían vivos al momento del análisis, se consideró su estado en la última visita.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS versión 19.0. El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier y el test de log-rank. El modelo de regresión proporcional de Cox se utilizó para el análisis multivariante de supervivencia.

También se estimó el riesgo relativo (HR) con intervalo de confianza (IC) del 95%. Para todo el análisis estadístico se consideró un valor de p de corte de 0,05 para la significación estadística.

## **Resultados**

Entre 1995 y 2011, se detectaron 202 pacientes que cumplían los criterios de inclusión en el estudio. Cuatro pacientes fueron excluidos del análisis; uno de ellos debido al diagnóstico de un segundo tumor de manera sincrónica, un paciente era un estadio IV al momento del diagnóstico y otros dos pacientes debido a que se perdieron durante el seguimiento. Ciento noventa y ocho pacientes (P) fueron incluidos en el estudio de los cuales 125 (63,1%) eran hombres y 73 (36,9%) mujeres, con una edad mediana de 65 años (28-86).

La mayoría de los pacientes tenían cáncer de colon (70,7%), de ellos, 59 pacientes tenían cáncer de colon derecho y 81 cáncer de colon izquierdo. Siete pacientes (3,5%) fueron diagnosticados en estadio I, 86 (43,34%) tenían un estadio II y 105 (53%) eran un estadio III.

De los pacientes diagnosticados en estadio III, 92 (87,6%) recibieron tratamiento adyuvante; 85,7% recibió quimioterapia (de ellos, el 45,7% recibió un régimen con oxaliplatino) y un 1,9% (2 pacientes) hizo radioterapia quimioterapia concomitante (ambos afectos de cáncer de recto). (Tabla 1)

### **- Análisis de MSI**

La inestabilidad de microsatélites (MSI) se ha estudiado en sólo 170 pacientes (85,9%) debido a la falta de material disponible. En cuanto a la ubicación del tumor primario, MSI se ha estudiado en 54 casos de cáncer de colon derecho, 68 casos de colon izquierdo y 48 de cáncer rectal. Sólo ocho pacientes (4%) presentaron MSI.

Dentro de los tumores inestables, se evidenció una diferencia significativa entre de los casos de cáncer de recto respecto a los tumores de colon derecho e izquierdos (0%, 9,3% y 4,4%, respectivamente  $p = 0,03$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre el estado de MSI y sexo (el 93,4% de las mujeres y el 96,3% de los hombres tenían tumores estables  $p = 0,4$ ). Tampoco se hallaron diferencias entre MSI y el estadio al momento del diagnóstico (0% de los estadios I presentaban MSI, 5.4% de los estadios II y 4.5% de los estadios III  $p = 0,68$ ).

Además, MSI fue más frecuente en los tumores BRAF mutado que en aquellos con BRAF nativo (33,3% en BRAF mutado y el 3,7% de los nativos  $p = 0,02$ ). No se observaron diferencias entre MSI y el estado de KRAS (6% frente a 3,9%  $p = 0,39$ ).

### **- Estado mutacional BRAF**

El estado de BRAF se analizó en 196 muestras. En dos pacientes no pudo ser estudiado debido al mal estado del material genético. La mayoría de los tumores fueron BRAF nativo (188 P, 94,9%), sólo ocho (4%) tenían BRAF mutado. No se observaron diferencias respecto al sexo, 4,1% de las mujeres y el 4,1% de los hombres tenían tumores BRAF mutado ( $p=0.988$ ).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el estado de BRAF respecto a la edad del paciente al diagnóstico ni respecto a la ubicación del tumor

primario (6,9% de los tumores de colon derecho, 3,8% de colon izquierdo y el 1,7% de los de recto tenía BRAF mutado,  $p = 0,36$ )

Una asociación interesante fue la que se evidenció en nuestra cohorte respecto al estado de BRAF y el perfil de la recaída. Todos los pacientes que presentaron una recaída hepática (79 P) eran tumores BRAF nativos (100% vs 0% HR 8,48  $p = 0,015$ ). Los tumores BRAF mutado tuvieron un riesgo más alto de recaída peritoneal que los nativos (50% vs 12,2% HR 6,34  $p = 0,014$ ).

#### - Estado mutacional de KRAS

El análisis de KRAS se realizó sobre 197 pacientes (falta de material en 1 paciente). La mayoría de los pacientes (115, 58,1%) presentaron KRAS nativo mientras que sólo 82 (41,4%) tenían una mutación KRAS. No se encontraron diferencias en el estado de K-RAS en cuanto al sexo y la edad de los pacientes.

La mutación KRAS fue más frecuente en aquellos pacientes diagnosticados en Estadio II que aquellos con Estadio I o III (44,2%, 28.6% y 40.4% respectivamente  $p = 0.667$ ). No se encontraron diferencias significativas entre el estado KRAS y la localización primaria del tumor (de colon izquierdo 37% y 50% de los de colon derecho presentaron mutación  $p = 0,29$ )

En el análisis de su relación respecto a MSI no se observaron diferencias estadísticamente significativas, los tumores KRAS mutados representaron el 38.9% de los tumores estables y el 50% de los tumores inestables  $p = 0.391$ .

Tampoco se halló una relación entre el estado de KRAS y el patrón de recaída.

Cuando se analizaron las diferentes mutaciones de KRAS, las más frecuentemente detectadas fueron G12D y G12V (16,7% y 10,1% respectivamente). La mayoría de los pacientes con mutación G12D se diagnosticaron en un estadio III (54,5%). Estos pacientes presentaron un mayor riesgo de recidiva en forma de metástasis a distancia que recidivas locales (66,7% y 24,2%, respectivamente).

Para analizar los diferentes posibles factores pronósticos entre sí, los pacientes fueron divididos en tres grupos en función del estado de KRAS y de BRAF: en el Grupo 1 pacientes eran KRAS y BRAF nativos, en el grupo 2 los pacientes presentaban KRAS nativo y BRAF mutado. El Grupo 3 estaba formado por pacientes con KRAS nativo y BRAF mutado. La mayoría de los pacientes estaba en el primer grupo 105 (53%), 82 (41,4%) 8 (4%) en los otros, respectivamente.

Tabla 1. Características clínicas y moleculares de los pacientes

| Características                       |                 | N: 198 (%)      |  |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|--|
| Edad al diagnóstico                   |                 | 65 años (28-86) |  |
| Sexo                                  | Mujeres         | 73 (36.9%)      |  |
|                                       | Hombres         | 125 (63.1%)     |  |
| Localización tumor primario           | Colon derecho   | 59 (29.8%)      |  |
|                                       | Colon izquierdo | 81 (40.9%)      |  |
|                                       | Recto           | 58 (29.3%)      |  |
| Estadio al diagnóstico                | I               | 7 (3.5%)        |  |
|                                       | II              | 86 (43.4%)      |  |
|                                       | III             | 105 (53%)       |  |
| Tratamiento adyuvante<br>Estadios III | No              | 12 (12.4%)      |  |
|                                       | Si              | 92 (87.6%)      |  |
|                                       |                 | QT              | 42 (40%)   |
|                                       |                 | QTOx            | 48 (45.7%)   |
|                                       | QT-RT           | 2 (1.9%)        |  |
| Estado KRAS                           | Nativo          | 115 (58.1)      |  |
|                                       | Mutado          | 82 (41.4)       | G12V 33(16.7%),<br>G12V 20 (10.1%),<br>G13D 13 (6.6%)... |
|                                       | Desconocido     | 1 (0.5%)        |  |
| Estado BRAF                           | Nativo          | 188 (94.9%)     |  |
|                                       | Mutado          | 8 (4%)          |  |
|                                       | Desconocido     | 2(1%)           |  |
| Estado MSI                            | Estable         | 162 (81.9%)     |  |
|                                       | Inestable       | 8 (4%)          |  |
|                                       | Desconocido     | 28 (14.1%)      |  |

MSI: Inestabilidad de microsatélites. QT: quimioterapia, QTOx: Quimioterapia basada en platino, RT: Radioterapia

#### - Factores pronósticos relacionados a supervivencia

Todos los pacientes recayeron después de la cirugía radical inicial en una mediana de tiempo de 18,21 meses (3.08-123.08m). Ciento cuarenta y dos pacientes (71,7%) recayeron con enfermedad metastásica, 47 P (23,7%) presentaron una recurrencia local y 9 P (4,5%) sufrieron una recidiva local y metastásica. (Tabla 2)

El sitio más común de recidiva a distancia fue el hígado (79P 40,9%), seguido de pulmón (49P 24,7%) y el peritoneo (27P). Otros sitios de recurrencia menos frecuentes fueron el cerebro, los ganglios linfáticos y el hueso. A la recaída los pacientes fueron tratados con cirugía, quimioterapia y radioterapia. La terapéutica utilizada fue diferente según el tipo (enfermedad local o a distancia) y sitio donde se presentaba la recaída.

La mediana de supervivencia tras la recaída (STR) fue de 20,65 meses (0,2 m-117.44m) y la mediana de supervivencia global (SG) fue de 43,93 m (5.48m-175.37m)

Tabla 2: Resultados: Datos de supervivencia y curso evolutivo

| Parámetros analizados             | Mediana en meses (rango) |                   |             |
|-----------------------------------|--------------------------|-------------------|-------------|
| Supervivencia libre de Enfermedad | 18.21 (3.08-123.8)       |                   |             |
| Supervivencia tras la recaída     | 20.65 (0.2-114.4)        |                   |             |
| Supervivencia global              | 43.93 (5.48-175.37)      |                   |             |
| Tipo de recaída                   | A distancia              | 142 (71.7%)       |             |
|                                   | Local                    | 47 (23.7%)        |             |
|                                   | Local y a distancia      | 9 (4.5%)          |             |
| Estado en momento de análisis     | Vivo                     | Sin enfermedad    | 15 (7.6%)   |
|                                   |                          | Con enfermedad    | 119 (60.1%) |
|                                   | Muerto                   | Sin enfermedad    | 1 (0.5%)    |
|                                   |                          | Por la enfermedad | 63 (31.8%)  |

El análisis univariado mostró que el estado de MSI se comportó como factor pronóstico con una relación estadísticamente significativa respecto a SLE, STR y SG. Los tumores inestables presentaron una peor evolución con una SLE más corta (10 m vs 18 m  $p=0,05$ ), menor STR (11,9 m vs 59.83 m  $p<0,001$ ) y una SG más corta (30,78 m vs 103,08 m  $p<0,001$ ). (Tabla 4) (Figuras 1, 2 y 3)

Figura 1 MSI- Supervivencia libre de enfermedad.

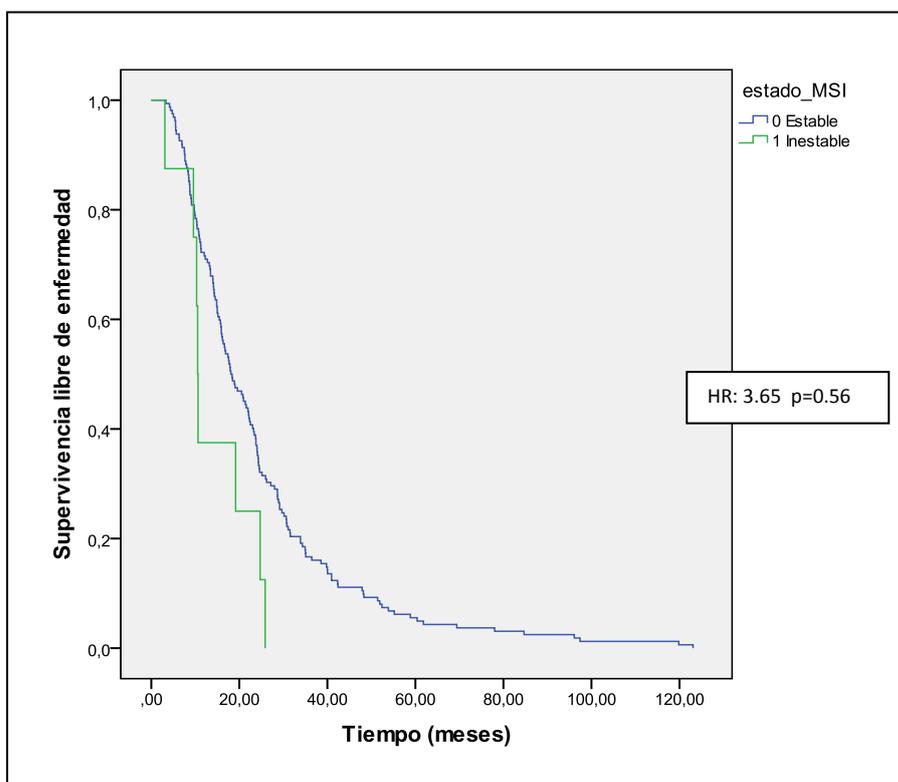


Figura 2 MSI- Supervivencia tras la recaída.

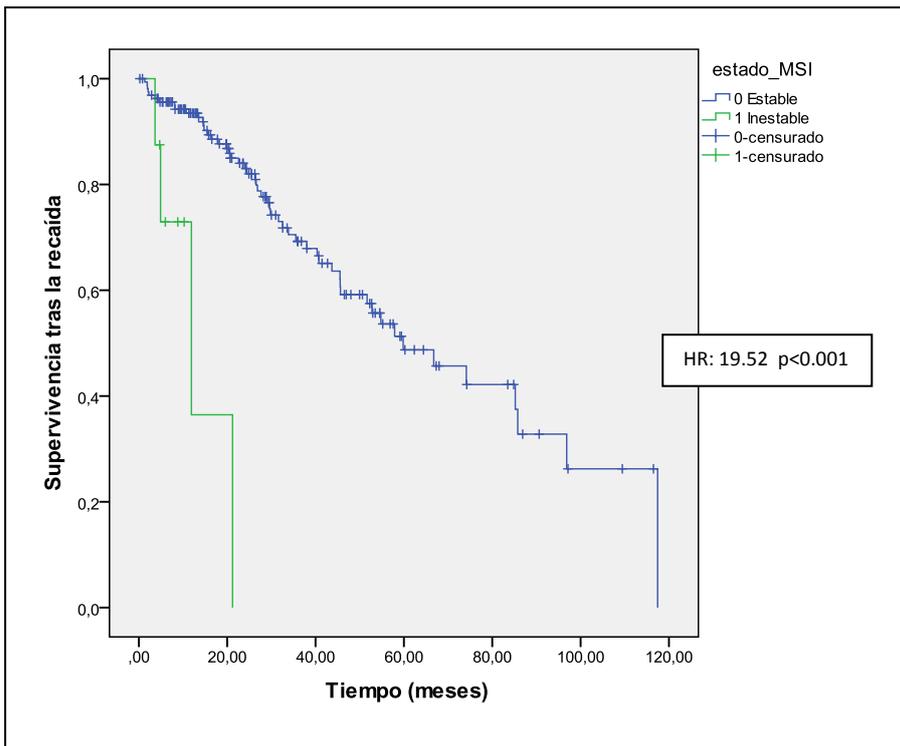
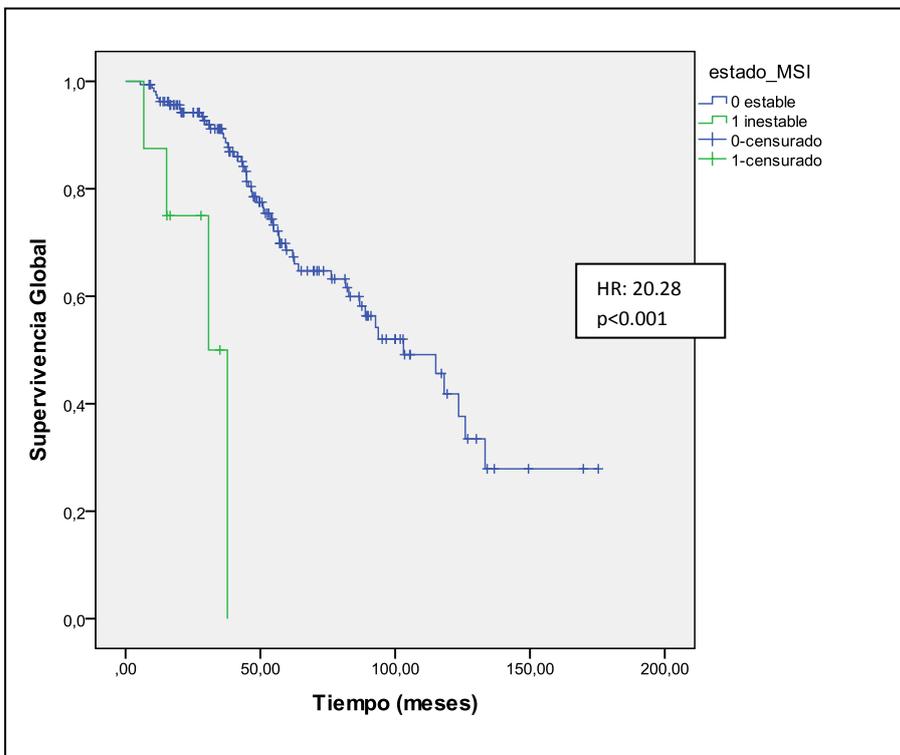


Figura 3 MSI – Supervivencia Global



Respecto a B-RAF, los pacientes con tumores BRAF mutados presentaron tendencia a una peor SLE (14.98m vs 18.36m  $p= 0,093$ ). (Tabla 3)

El análisis univariado evidenció que BRAF se comportó como factor pronóstico para STR y SG. Los tumores con BRAF mutado presentaron una STR significativamente más corta (31.6m vs 57.9m;  $p=0.002$ ) así como también una peor SG respecto a los tumores nativos (103m vs 37.7m  $p= 0,001$ ). (Figura 4, 5 y 6)

Figura 4 BRAF-Supervivencia libre de enfermedad

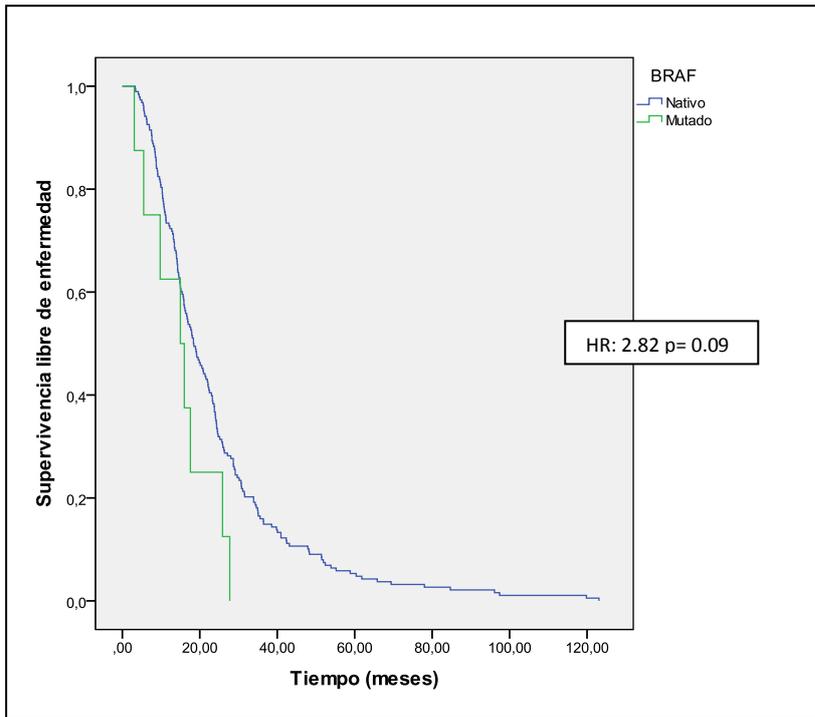


Figura 5 BRAF – Supervivencia tras la recaída.

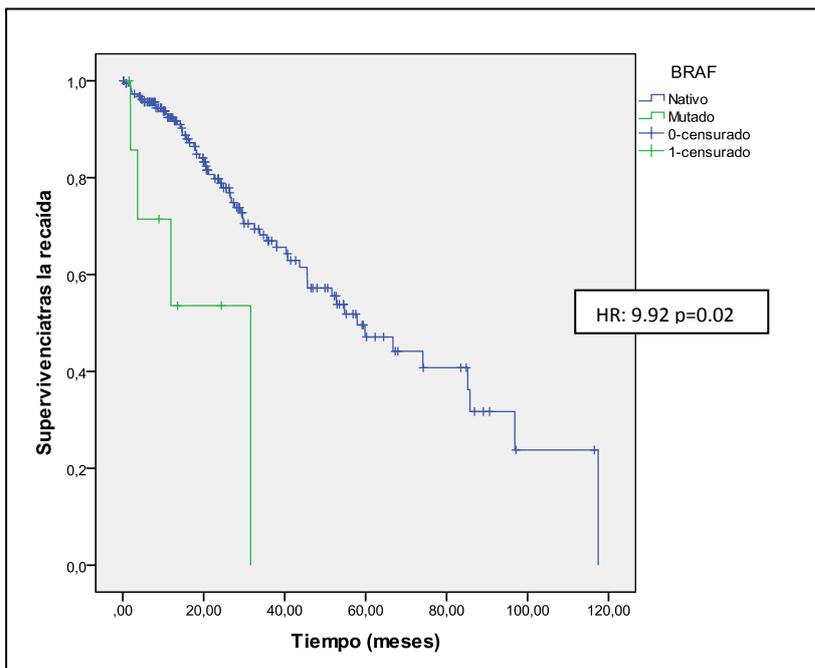
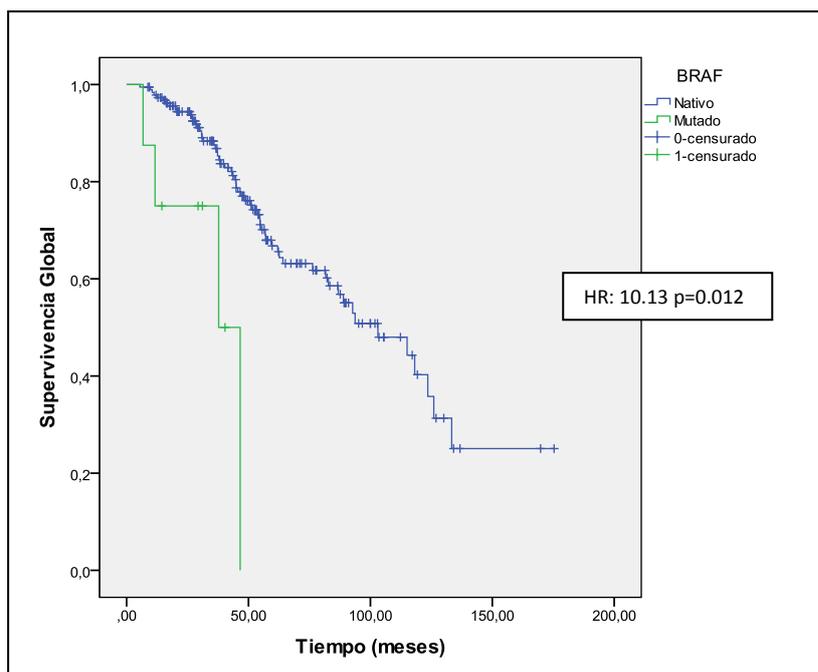


Figura 6 BRAF Supervivencia Global.



Para analizar conjuntamente el estado de MSI y de BRAF los pacientes fueron divididos en cuatro grupos: 2 grupos con BRAF nativo (Grupo 1: BRAF nativo + MS estable ( siendo éste el más grande con 92,8% de la población), Grupo 2: BRAF nativo + MSI (3,6%) ) y 2 grupos donde los pacientes presentaban BRAF mutado (Grupo 3: BRAF mutado + MS estable (2,4%), Grupo 4: BRAF mutado + MSI (1,2%)). 30 pacientes (15,2%) no pudieron incluirse en el análisis por imposibilidad de analizar BRAF y/o MSI. (Tabla 3)

Tabla 3 Grupos para el análisis de MSI y BRAF

| GRUPO<br>NºPacientes (%) | BRAF   | MSI       | Supervivencia<br>libre de<br>enfermedad | Supervivencia<br>tras la recaída | Supervivencia<br>Global |
|--------------------------|--------|-----------|---|----------------------------------|-------------------------|
| <b>1:</b> 156 (92.9)     | Nativo | Estable   | 42.42m                                  | 59.83m                           | 103.08m                 |
| <b>2:</b> 6 (3.6)        | Nativo | Inestable | 14.98m                                  | 21.21m                           | 30.78m                  |
| <b>3:</b> 4 (2.4)        | Mutado | Estable   | 21.05m                                  | 31.60m                           | 46.59m                  |
| <b>4:</b> 2 (1.2)        | Mutado | Inestable | 3.08m                                   | 3.67m                            | 6.75m                   |
| <b>Valor de p</b>        |        |           | 0.009                                   | <0.001                           | <0.001                  |

MSI: inestabilidad de microsatélites, m: meses

Los pacientes incluidos en los grupos con tumores B-RAF nativo (Grupo 1 y 2) presentaron una SLE más larga que en aquellos con BRAF mutado, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (42,42 m en el grupo 1; 14,98 m en el grupo 2 en comparación con 3,08m en el grupo 4 p = 0,009).

La estabilidad de MS se comportó como un factor de buen pronóstico para STR, objetivándose una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con MS

estable (Grupo 1 y 3) respecto de aquellos con MSI (grupo 2 y 4) (59.83m y 31.60m vs. 21.21m y 3.67m respectivamente  $p = <0,001$ ).

En el análisis de SG, la asociación de tumores BRAF nativo y MS estable se comportó como un factor de buen pronóstico, presentando estos pacientes (Grupo 1) una supervivencia más larga; siendo también esta diferencia estadísticamente significativa (103,08 m vs 30.78m, 46.59m y 6.75mp  $<0,001$ ).

Es importante tener en cuenta que los pacientes con inestabilidad de microsatélites mostraron un peor pronóstico independientemente del estado de BRAF, aunque el grupo de BRAF mutado fue el grupo de peor supervivencia.

En el análisis univariado, KRAS no se comportó como un factor pronóstico.

No se encontraron diferencias entre el estado de KRAS y la SLE (mutados vs nativos: 18.36m vs 17.67 m  $p= 0,676$ ), STR (45.63m vs 57.9m  $p= 0,316$ ) y la SG (76.29m vs 118.16m  $p = 0,446$ ). (Tabla 4) (Figura 7, 8 y 9)

Asimismo no se encontraron diferencias entre las diferentes mutaciones del gen KRAS respecto con la supervivencia.

Figura 7 KRAS- Supervivencia Libre de enfermedad.

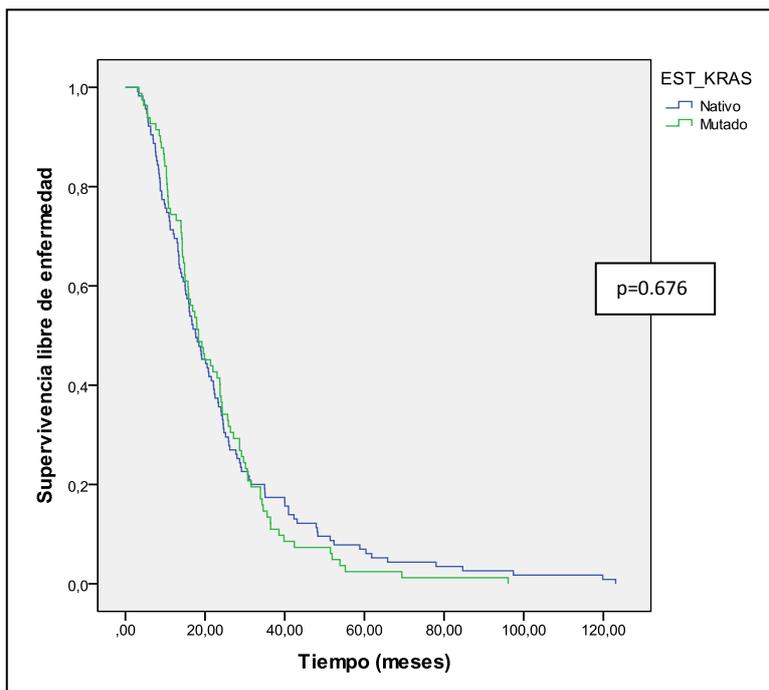


Figura 8 KRAS- Supervivencia tras la recaída.

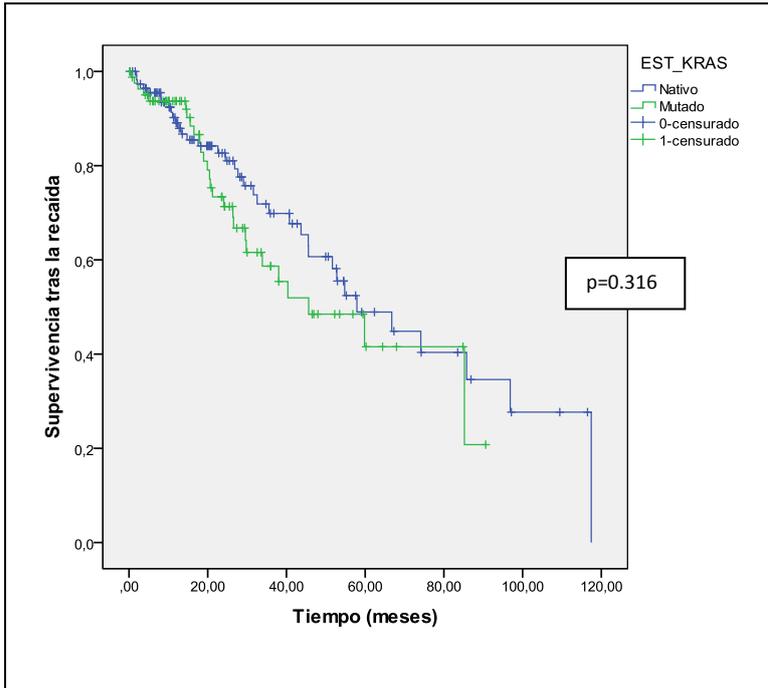


Figura 9 KRAS- Supervivencia Global

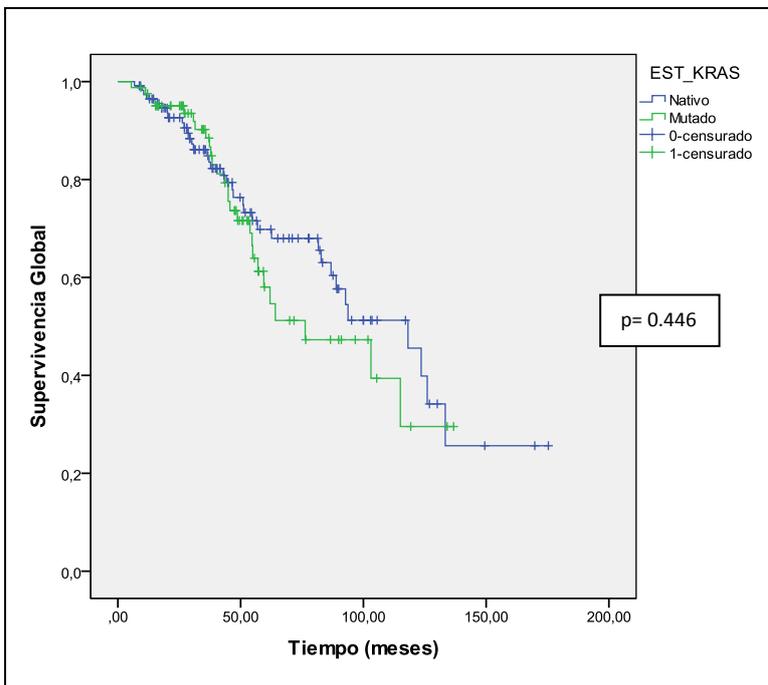


Tabla 4: Factores pronósticos y relación con Supervivencia

| Factor Pronóstico |           | Supervivencia Libre de Enfermedad (valor p) | Supervivencia Tras la Recaída (valor p) | Supervivencia Global en meses (valor p) |
|-------------------|-----------|---|---|---|
| <b>MSI</b>        | Estable   | 18 m  | 59.83 m                                 | 103.08 m                                |
|                   | Inestable | 10 m (p=0.056)                              | 11.90 m (p<0.001)                       | 30.78 m (p<0.001)                       |
| <b>BRAF</b>       | Nativo    | 18.36m                                      | 57.9m                                   | 103.08 m                                |
|                   | Mutado    | 14.98m (p=0.09)                             | 31.60m (p=0.002)                        | 37.7m (p=0.001)                         |
| <b>KRAS</b>       | Nativo    | 17.67m                                      | 57.9m                                   | 118.16m                                 |
|                   | Mutado    | 18.37m (p=0.676)                            | 45.63m (p=0.316)                        | 76.29m (p=0.446)                        |

Para el análisis conjunto del estado de KRAS y BRAF y su posible relación hemos formado 3 grupos de pacientes: Grupo 1 que incluía pacientes con KRAS y BRAF nativo, el grupo 2 incluyó pacientes con K-RAS mutado y B-RAF nativo y el 3º grupo: KRAS nativo y BRAF mutado.

Los pacientes del primer grupo (BRAF y KRAS nativos) presentaron una mejor evolución clínica con una SLE más larga (18.45m, 18.36m y 14.98mp = 0,200) así como también una mejor STR (66.75m 45.64m vs 31.61m p= 0,003) y mejor supervivencia global (118,16 m vs 76.28m vs 37.77m p= 0,004); los 2 últimos con significación estadística. (Tabla 5) (Figura 10 y 11)

Tabla 5: Análisis de KRAS y BRAF

| Grupo Nº pacientes (%) | KRAS   | BRAF   | Supervivencia Libre de enfermedad | Supervivencia tras la recaída | Supervivencia Global |
|------------------------|--------|--------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| <b>1:</b> 105 (53.8)   | Nativo | Nativo | 18.45m                            | 66.75m                        | 118.16m              |
| <b>2:</b> 82 (42.1)    | Mutado | Nativo | 18.36m                            | 45.64m                        | 76.29m               |
| <b>3:</b> 8 (4.1)      | Nativo | Mutado | 14.98m                            | 31.61m                        | 37.77m               |
| <b>Valor p</b>         |        |        | 0.200                             | 0.003                         | 0.004                |

Figura 10: KRAS+BRAF – Supervivencia tras la recaída.

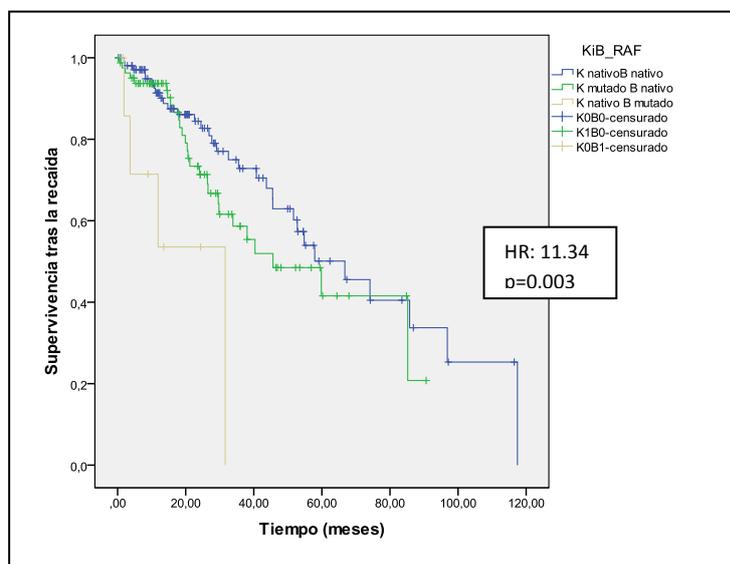
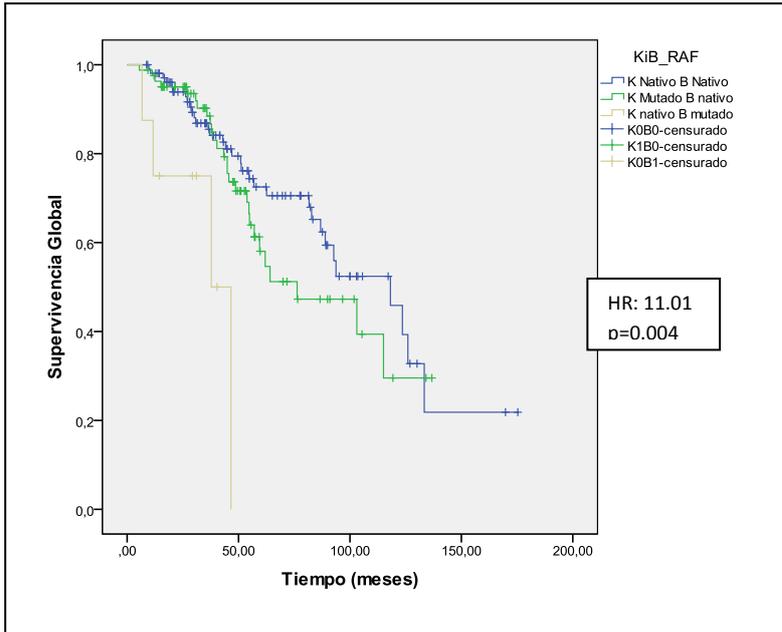


Figura 11: KRAS+BRAF – Supervivencia Global.



El análisis multivariado confirmó a BRAF y MSI como factores pronósticos de supervivencia; respecto a SLE (HR 1.6 (0.7-3.62) y HR 1.85 (0.7-4.7) respectivamente), STR (HR 4.5 (1.39-14.60) y HR 5.28 (1.5-18.1) respectivamente) y para SG (HR 4.26 (1.19-15.27) y HR 4.61 (1.25-17.01) respectivamente).

## **Discusión**

En el trabajo realizado sobre nuestra cohorte de pacientes la inestabilidad de microsatélites (MSI) se comportó como factor de mal pronóstico independiente para supervivencia libre de enfermedad, supervivencia tras la recaída y para supervivencia global.

Aunque la mutación BRAF se asoció más frecuentemente a tumores con MSI, hemos demostrado que la mutación BRAF es también un factor pronóstico negativo independiente, y los pacientes con tumores mutados BRAF muestran un STR y SG más cortas.

No obstante, la mutación de KRAS no demostró ser un factor pronóstico de supervivencia.

Inesperadamente, encontramos en nuestra cohorte que los tumores con MSI presentan una peor supervivencia libre de progresión y supervivencia global que los tumores estables. Este valor pronóstico negativo se encontró en el análisis univariado y se confirmó en el análisis multivariado. Estos resultados son lo opuesto a lo que se ha publicado previamente, donde la MSI se ha propuesto como un potencial factor de pronóstico favorable.

Los datos más relevantes acerca de la correlación de la MSI con el resultado en el CCR, provienen del análisis del estado de la MSI en al menos cuatro estudios aleatorizados de tratamiento adyuvante del CCR en el estadio II y III <sup>8-11</sup>. Tres de estos estudios fueron planeados para evaluar dos esquemas diferentes de quimioterapia y en el otro, la quimioterapia se comparó con ausencia de tratamiento. La evaluación de la MSI como factor pronóstico era parte de un análisis secundario, y sólo en un 40%-60% de la población incluida en esos estudios fueron analizados. En tres de los estudios, los tumores con MSI estaban relacionados con una mejor supervivencia global y en el cuarto, la MSI se asoció con una menor tasa de recidivas respecto de aquellos tumores con estabilidad de microsatélites.

También, de manera sorprendente se detectó una menor tasa de los tumores MSI (4%) de lo que podría esperarse en CCR en estadio II y III, donde las tasas en otras series oscilan del 15% en el estadio II al 6% en el estadio III.

Se debe considerar que aunque nuestra cohorte también estaba compuesta por CCR en estadio II y III, esta población seleccionada mostraba un mal pronóstico al momento de su inclusión porque todos los pacientes presentaban recidiva de la enfermedad.

El argumento más simple para explicar este suceso sería considerar que se cometió un error en las determinaciones de MSI. Sin embargo, parece poco probable ya que se han realizado siguiendo los protocolos de laboratorio ya conocidos.

Probablemente esta gran diferencia se deba a las características de la población (grupo de peor pronóstico) así como también al número bajo de pacientes incluidos a los que se le realizó el estudio (170 P).

También se encontró una correlación entre los tumores con MSI y las demás características clínico-patológicas como la localización derecha del tumor primario y

una mayor proporción de mutaciones BRAF. Estas correlaciones si se han asociado al típico fenotipo del tumor MSI ya descrito. Este hecho refuerza la correcta realización de la técnica para las determinaciones de MSI.

Otra forma de explicar la discrepancia entre el valor pronóstico de la MSI en nuestro trabajo con respecto los otros estudios, es tener en cuenta la posibilidad de que la MSI en realidad se comporte como un factor pronóstico desfavorable, pero que generalmente se asocie con otro factor pronóstico muy favorable aún desconocido. Esto podría producir que los casos con MSI tengan un riesgo de recidiva menor con una mejor supervivencia pero los casos donde la recaída se produce (donde no se encontraría este factor) tengan una peor evolución.

Por este motivo, en general, cuando se analizan series de CCR estadios II y III, la MSI se comporta como factor de buen pronóstico pero debido a este factor desconocido asociado; mientras que cuando analizamos nuestra serie, compuesta por tumores CCR clínicamente desfavorables, y probablemente carentes del marcador favorable desconocido, aparece el valor pronóstico real de MSI.

A excepción de KRAS y BRAF, no se analizó ningún otro indicador en nuestra serie por lo que no se puedo proponer otro candidato para nuestra hipótesis (como podría ser PI3K, AKT, PTEN).

En nuestra serie las mutaciones KRAS y BRAF se presentan en un 41% y 4%, similar a otras series publicadas de CCR en estadios II-III<sup>18-21</sup>.

En nuestra serie el estado de BRAF se comportó como factor independiente para supervivencia tras la recaída y supervivencia global con relevancia estadística. Se observó que los tumores BRAF mutado presentaron una supervivencia libre de enfermedad más corta que tumores BRAF nativo (14,9 vs 18,3 meses,  $p$  0,09), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa por lo que nuestros resultados están de acuerdo con los datos ya publicados.

En tres grandes estudios aleatorizados y multicéntricos también se evaluó; de manera retrospectiva; el papel pronóstico de estado mutacional de BRAF para la supervivencia global. En dos de ellos, el estado de BRAF mutado estuvo asociado con una menor supervivencia global, tanto en el análisis univariado como en el multivariado<sup>11,21</sup>. En el tercer estudio se observó esta asociación sólo en tumores con estabilidad en el estudio de microsatélites<sup>9</sup>.

Ante estos resultados contradictorios, el valor de la mutación BRAF no está definido en los tumores MSI. Se conoce que la mutación de BRAF está altamente asociada con la presencia MSI, siendo esta asociación estadísticamente significativa en tres de los cuatro estudios donde se analizaron, pero sólo en uno de ellos BRAF mantuvo con valor pronóstico negativo en los tumores MSI.

Es importante señalar que en nuestra serie la presencia de MSI se relacionó con la mutación de BRAF. Los resultados del análisis multivariado, confirmaron que los dos factores se comportaron como factor pronóstico negativo independiente.

Con respecto al valor pronóstico KRAS, no se encontró ninguna diferencia significativa entre SLE, STR y la SG entre tumores KRAS nativo y KRAS mutado. Esto está en consonancia con los estudios anteriormente publicados donde KRAS también carece de un valor pronóstico <sup>14</sup>.

De los estudios de tratamiento adyuvante para estadios II y III se realizó un meta-análisis que incluyó 2721 pacientes; el análisis multivariado sugirió que la presencia de mutación de KRAS confería un mayor riesgo de recidiva tumoral <sup>14</sup>. Una revisión realizada con posterioridad, basada en 3439 pacientes evidenció en el estudio multivariante que la mutación G12V del KRAS determinaba una SLE y SG más corta <sup>13</sup>.

En el año 2011 fue publicado el estudio QUASAR donde observó que KRAS mutado se asociaba con un mayor riesgo de recidiva <sup>10</sup>.

La falta de análisis de MSI y BRAF en el análisis multivariado del Estudio RASCAL II, donde se describía la mutación G12V como factor de mal pronóstico podría hacer cuestionar el real valor como factor pronóstico en este artículo.

Con el fin de dilucidar el valor de MSI, BRAF y KRAS como factores pronósticos en CCR resecaados, se decidió realizar este estudio para analizar el papel de estos factores sobre la supervivencia en nuestra serie de pacientes afectados de Cáncer colorrectal diagnosticados en estadio localizado y con recaída tras el tratamiento quirúrgico inicial radical.

Estudiando esta cohorte de pacientes con mal pronóstico, se hipotético que se podría aclarar el papel de los posibles factores de mal pronóstico. De esta manera, nuestros resultados demostraron que los tumores BRAF mutados una peor supervivencia global y una supervivencia libre de enfermedad más corta, en concordancia con los estudios anteriormente publicados, mientras que KRAS mutado no mostró valor pronóstico.

A destacar de nuestro estudio que se identificó a MSI como factor independiente de mal pronóstico, mostrando una SLE y SG más cortas; observándose este mismo resultado sin evidenciarse diferencias entre los tumores BRAF nativos y BRAF mutados.

Este análisis y la revisión del tema nos condujeron a pensar que en otros estudios en los que la MSI parecía tener un buen pronóstico, la alta asociación con BRAF y posiblemente con otros factores desconocidos confunden el valor real de la MSI.

No debemos olvidar que nuestra serie es pequeña y las características de la población así como los tratamientos recibidos a la recaída son muy heterogéneos y esto puede actuar como factor de confusión en nuestros resultados.

## **Conclusiones**

En nuestro estudio, realizado sobre una cohorte de pacientes (198) diagnosticados de Cáncer colorrectal en estadio localizado con posterior recidiva, se observó que BRAF mutado se comportó como factor independiente de mal pronóstico.

Un hallazgo sorprendente fue que en nuestro análisis la presencia en el tumor de Inestabilidad de Microsatélites (MSI) también se comportó como un factor independiente de mal pronóstico.

Analizados de manera conjunta; los pacientes que presentaron un peor pronóstico fueron aquellos con BRAF mutado e MSI, evidenciándose una diferencia estadísticamente significativa.

La mutación de KRAS no demostró ser un factor pronóstico de supervivencia, si bien; al analizarlo junto a BRAF, la presencia del estado nativo de ambos factores predijo una mejor supervivencia tras la recaída y más larga supervivencia global respecto a los grupos donde alguno de estos estaba mutado.

En las publicaciones previas que valoraron el papel del estado de MSI se describió como un factor de buen pronóstico. Que nuestro resultado sea el contrario puede deberse a que en los demás estudios se incluyeron a todos los pacientes diagnosticados de CCR en estadio II y III y tratados de manera radical; en cambio en nuestra serie sólo se incluyeron pacientes que habían presentado una recaída, lo que condicionó que sea un grupo de peor pronóstico.

Otro motivo por el que pueden presentarse diferentes resultados es que posiblemente existan otros factores, aún desconocidos, que no permitan analizar el verdadero valor de MSI.

No podemos dejar de lado que este estudio tiene sus limitaciones. Se trata de un análisis retrospectivo y formado por una serie pequeña de pacientes muy heterogéneos (tanto en las características clínicas como en los tratamientos recibidos tras la recaída), lo que conlleva a que estos datos podrían no ser representativos de la población general.

Creemos que es importante que se continúe con el estudio de posibles factores pronósticos moleculares implicados en el desarrollo y evolución del Cáncer Colorrectal. Así como también la posible relación entre ellos para poder, en el futuro, conocer mejor a los pacientes que presentarán un peor pronóstico con la finalidad de optimizar el manejo terapéutico.

## **Bibliografía**

1. Anna Cabanes Domenech, Beatriz Pérez-Gómez, Nuria Aragonés, Marina Pollán, Gonzalo López-Abente. Vigilancia Epidemiológica del Cáncer. Monitorización de la situación del Cáncer en España. Instituto de Salud Carlos III, Área de Epidemiología ambiental y Cáncer. Junio 2009
2. Desch CE, Benson III AB, Somerfield LR et al. Colorectal cancer surveillance: 2005 update of the American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol* 2005;23:8512-8519.
3. Colorectal cancer in the adjuvant setting: perspectives on treatment and the role of prognostic factors. *Ann Oncol* 2003;14 (suppl 2):ii25-ii29.
4. Andre T, Boni C, Mounedji - Boudiaf L et al. Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for cancer colon. *N Engl J Med* 2004;350(23):2343-51.
5. Wolmark N, Wieand S, Kueber JP et al. A phase III trial comparing FULV to FULV + Oxaliplatin in stage II or III carcinoma of the colon: Results of NSABP Protocol C-07. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2005;23:3500.
6. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012;18(6):1506-12.
7. Sanford D, Markowitz MD, Ph.D and Monica M Bertagnolli MD. Molecular basis of colorectal cancer. *N Eng J. Med* 2009;361:2449-60.
8. French AJ, Sargent DJ, Burgart LJ, Foster NR, Kabat BF, Goldberg R, et al. Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(11):3408-15.
9. 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* 2010;28(3):466-74.
10. 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. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1261-70.
11. Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, McCleary NJ, Ng K, Hollis D, et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2012;18(3):890-900.
12. Bazan V, Agnese V, Corsale S et al. Specific TP53 and/or Kras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Italian's group (GOIM) prospective study. *Annals of Oncology* 2005; 16 (supl 4):iv 50-5
13. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D et al. Kirsten ras mutation in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study. *British Journal of Cancer* 2001;85:692-6.

14. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten Ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *Journal of the National Institute* 1998;90:675-84.
15. Alberts SR, Thibodeau SN, Sargent DJ et al. Influence of KRAS and BRAF mutational status and rash on disease-free survival in patients with resected stage III colon cancer receiving cetuximab: Results from NCCTG N0147. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29 (Suppl.)
16. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M et al. PI3K/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Annals of Oncology* 2009;69:1851-7.
17. Barault L, Veyrie N, Jooste V et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI3K signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *International Journal of Cancer* 2008;122:2255-9.
18. Cunningham D, Humblet Y, Siena S et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Eng J Med* 2004;35:337-45.
19. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Eng J Med* 2007;357:2040-8.
20. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J of Clinical Oncology* 2008;26:5705-12.
21. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick C et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Research* 2005;65:6063-9.