

KRAS en cáncer colorrectal: características clínico-patológicas y sobrevida global. Experiencia Institucional

Jeremías Tomás Sierra (1), Juliana Mandrile (1), Rodolfo Agustín Ávila (1), Virginia Soledad Miretti (1), Leandro Roberto Castellanos (1), Andrea Gabriela Soria (1), Juan José García (1).

(1) Servicio de Oncología y Hematología. Hospital Privado de Córdoba

RESUMEN

El conocimiento del gen Kirsten Rat Sarcoma Virus (KRAS) ha llevado a comprender uno de los mecanismos moleculares de señalización involucrados en el cáncer colorrectal y a desarrollar terapias dirigidas contra esta vía. Exploramos las características clínico patológicas y la sobrevida de los pacientes con cáncer colorrectal, en relación con el estado del KRAS.

Analizamos retrospectivamente 82 pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Se recopilaron las características como edad al diagnóstico, sexo, histología, localización del tumor primario, sitio de metástasis, y la sobrevida global en función del estado del gen KRAS. El análisis de éste gen se realizó mediante extracción de ADN de biopsias en taco de parafina, luego se amplificó mediante PCR y se estudiaron los exones 2, 3 y 4 en laboratorios de referencia.

Se incluyeron 82 pacientes de los cuales 45 (54,9%) fueron hombres, la media para la edad acorde al sexo fue de 59,8 años para hombres y 52,3 años para mujeres. Se encontraron 36 (43,9%) mutaciones, la mayoría en el exón 2 (97,2%).

La distribución por subtipo histológico fue: adenocarcinoma invasor 74 casos (92,68%), seguido de 6 casos (7,31%) de adenocarcinoma mucinoso y 2 (2,43%) de adenocarcinoma de células en anillo de sello.

No se encontró asociación estadística entre el estado de KRAS con la edad, sexo, con el sitio de localización primario y tampoco con la presencia de metástasis pulmonares en ausencia de hepáticas. La supervivencia global media fue de 32 meses con un seguimiento medio de 24 meses. No hubo diferencias significativas en sobrevida global entre los pacientes con KRAS WT y KRAS mutados (28,9 vs. 35,8 meses $p=0,77$), ni entre los pacientes con KRAS WT tratados con quimioterapia y cetuximab vs los que no

recibieron cetuximab (28,3 vs 30,4 meses $P=0,8$).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global entre los pacientes con resección completa de las metástasis y quimioterapia en comparación con los pacientes que solo recibieron quimioterapia. (48 meses vs 24,8, $P=0,001$).

En conclusión, no se encontraron asociaciones entre las características clínico-patológicas y el estado del KRAS, como así tampoco hubo diferencia en la sobrevida asociada a la mutación de este gen ni al tratamiento con cetuximab; lo que quizás estuvo condicionado por el escaso número de pacientes. Por otro lado, se demostró que la resección quirúrgica completa de las metástasis en el cáncer colorrectal duplica la tasa de supervivencia global.

Palabras clave: Cáncer colorrectal, KRAS; Cetuximab

ABSTRACT

The study of KRAS gene has led to the interpretation of molecular signaling mechanisms related to colorectal cancer and has helped to develop targeted therapies.

We explored the clinic pathological features and the overall survival in patients with diagnosis of metastatic colorectal cancer, and the relationship with mutation pattern of KRAS. We analyzed the relationship between the KRAS mutation status and the clinic pathological features and the overall survival in patients with diagnosis of metastatic colorectal cancer.

A retrospective analysis including patients with metastatic colorectal cancer and known KRAS-mutation status was performed. Age, sex, histology, tumor localization, metastatic sites, treatment and overall survival were evaluated in all patients. Gene study was performed by PCR-DNA amplification of paraffin-embedded tissue. Mutations exons 2, 3 and 4 were studied.

From a total of 82 patients included in the study, 45 (54,9%) of the patients were men. The mean male age was 59.8 years; the mean female age was 52.3. Positivity for KRAS mutation was detected in 36 patients (43,95%), most of them related to exon 2.

The distribution according to subtype histopathology was: invasive adenocarcinoma 74 (92,68%) cases, mucinous adenocarcinoma 6 (7,31%) cases and signet ring adenocarcinoma 2 (2,43%) cases.

Recibido 07/09/2016 - Aceptado 10/10/2016

Correspondencia:

Jeremías Tomás Sierra
Servicio de Oncología y Hematología
Hospital Privado Universitario de Córdoba
Av. Naciones Unidas 346, X5016KEH, Córdoba, Argentina
Te: +54 0351 156199823
Correo electrónico: jeremias.sierra@hotmail.com

No relationship was found between KRAS mutation status and age, sex or tumor localization nor the presence of lung metastasis in the absence of hepatic metastasis. The mean overall survival was 32 months.

There were no significant differences in the overall survival between patients with KRAS-WT and KRAS-mutated (28.9 vs 35.8 months $p=0.77$), neither between KRAS-WT patients treated with chemotherapy and cetuximab vs those who did not receive cetuximab (28.3 vs 30.4 months $p=0.8$). Finally, significant difference was found in patients with complete metastasis resection compared with the others (24.8 vs 48 months, $p=0.001$).

In conclusion, there was no evidence of association between the clinic pathological features and the KRAS mutation status, no differences in the overall survival related to the mutations for this gene and in the treatment with cetuximab. These results may be due to the small number of patient analyzed. On the other hand, the benefits of complete metastasis resection were found.

Key words: colorectal cancer, KRAS, cetuximab

INTRODUCCIÓN

La incidencia esperada del cáncer colorrectal para el año 2015 en Argentina, fue de 14295 nuevos casos según lo estimado por la International Agency Research on Cancer (IARC), siendo esta enfermedad la tercera causa de muerte por cáncer en nuestro país (1).

En los últimos años se han descubierto nuevos genes involucrados en la carcinogénesis y sus productos, permitiendo de esta forma crear terapias dirigidas frente a blancos moleculares con intento de combatir el cáncer. El oncogen RAS es un controlador de funciones celulares como proliferación, apoptosis y diferenciación celular entre otras, por lo que su mutación tiene implicancias predictivas en neoplasias malignas de diferente localización anatómica, incluyendo al cáncer colorrectal (2).

Analizamos las características clínicas y patológicas de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico de nuestra institución y su sobrevida de acuerdo al estado del KRAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo que incluyó 82 pacientes con cáncer colorrectal metastásico y estado de KRAS conocido, entre el año 2009 y 2015.

Se obtuvieron de sus historias clínicas las características como edad, sexo, localización anatómica, histología y sitio de metástasis. Además, se calculó la sobrevida global (SG) en relación al estado del Kirsten Rat Sarcoma Virus (KRAS), la resección completa de las metástasis, y a la incorporación de cetuximab en el tratamiento de pacientes con KRAS no mutado (WT: wilde type)

El material fue procesado en laboratorios de referencia donde a partir de biopsias en parafina, se extrajo el ADN de células tumorales y se amplificó mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con primers específicos para codones 12 y 13 (exón 2), 59 y 61 (exón 3), 117 y 146 (exón 4). Posteriormente se purificaron, secuenciaron y analizaron los

Tabla 1. Codones estudiados

Secuencias de KRAS- WT		
Exón 2	Codón 12	GGT
	Codón 13	GGC
Exón 3	Codón 59	CGA
	Codón 61	CAA
Exón 4	Codón 117	AAA
	Codón 146	GCA

productos de amplificación (Tabla 1).

Para el análisis de variables no paramétricas y paramétricas se utilizaron los test de Chi cuadrado y el t-test. La valoración de la SG se realizó mediante el método de curvas de supervivencia de Kaplan- Meier.

RESULTADOS

De los 82 pacientes incluidos, 45 (54,9%) fueron hombres y la media para la edad de acuerdo al sexo fue de 59,8 (52,9-66,7) años y 52,3 (40-64,6) años para hombres y mujeres respectivamente.

Cincuenta (60,9%) pacientes tenían metástasis al diagnóstico y 32 las desarrollaron posteriormente.

En todos los pacientes se secuenció el exón 2 (codones 12 y 13); mientras que los exones 3 (codones 59 y 61), y exón 4 (codones 117 y 146) se estudiaron solo en el 18,3 % de los pacientes. Se encontró un total de 36 (43,9%) de KRAS mutados.

De estas 36 mutaciones las más frecuentes fueron la del exón 2 codón 12 (29), seguida por mutaciones concomitante del codón 12 y 13 (5), mutación del codón 13 (2) y una sola mutación del exón 4 (80,56%, 13,88% y 5,55% respectivamente). Las características clínicas y patológicas se detallan en la Tabla 2.

Un total de 74 pacientes (92,68%) tuvieron histología de adenocarcinoma invasor, 6 (7,31%) de adenocarcinoma mucinoso y 2 (2,43%) de adenocarcinoma en células en anillo de sello.

No se encontró asociación entre el estado del KRAS y el subtipo histológico, la edad del paciente ni el sitio de localización del tumor primario. No hubo asociación con la presencia de metástasis pulmonares en ausencia de metástasis hepáticas.

Los esquemas de tratamiento más utilizados en primera línea fueron combinaciones de fluoropirimidinas (capecitabina o 5FU) con oxaliplatino (FOLFOX 51,2%, XELOX 18,3%) o irinotecan (FOLFIRI 13,4%). Las fluoropirimidinas solas se utilizaron en el 9,8% de los pacientes. Un 7,3% de los pacientes recibieron quimioterapia de conversión con FOLFOXIRI. Asociado a los esquemas anteriores se indicó bevacizumab en primera línea en el 22% de los pacientes.

Tabla 2. Características clínico-patológicas

Características	Pacientes n (%)	Mutado	KRAS Wild Type	Valor de p
Total	82	36	46	NS
Hombres	45 (54,9)	22	23	
Mujeres	37 (45,1)	14	23	
Edad				
<50 años	21 (25,6)	9	12	NS
>50 años	61 (74,4)	27	34	
<65 años	63 (76,8)	29	34	NS
>65 años	19 (23,2)	7	12	
Localización del primario				
Colon derecho	14 (17,1)	4	9	
Ciego	10 (12,2)	3	7	
Ascendente	4 (4,9)	1	3	
Colon izquierdo				
Descendente	57 (69,5)	32	25	
Sigmoides	32 (39)	16	16	
Unión recto sigmoidea	8 (9,8)	5	3	
Colon transverso	11 (3,4)	4	7	
Pacientes con metástasis pulmonar sin metástasis hepática	12	7	5	NS

NS: valor de P no significativo.

De los 46 pacientes con KRAS-WT, 20 recibieron cetuximab: 6 lo hicieron en 1ra línea, 8 en 2da y 6 en 3ra línea.

El análisis de la sobrevida global media fue de 32,7 meses, y no se demostró diferencia estadísticamente significativa entre pacientes con KRAS-WT y pacientes con KRAS mutado (28,9 meses vs. 35,8 meses p= 0.77) (Fig 1), tampoco hubo diferencias entre los pacientes con KRAS-WT tratados con cetuximab (28,3 meses) en comparación con los que no lo hicieron (30,4meses P= 0,8) (Fig 2).

Por último, solo encontramos una diferencia significativa en sobrevida global en aquellos pacientes en que además del tratamiento con quimioterapia estándar (QT) se logró una resección completa (R0) del tumor primario y de sus metástasis [OSm de 24,8 meses (QT) vs. 48 meses (QT+R0) P=0.001]. (Fig 3).

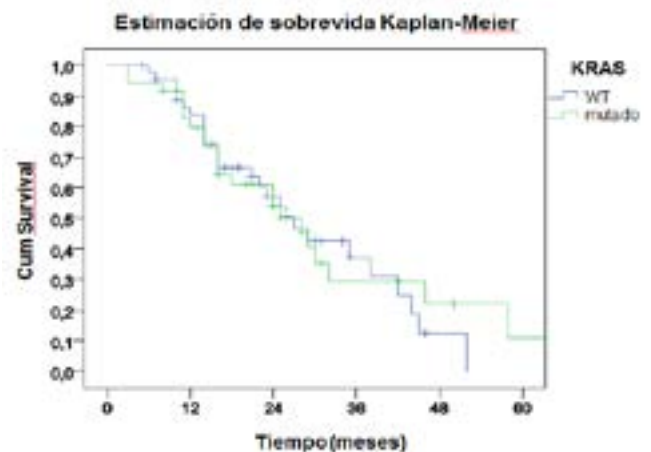


Figura 1. Sobrevida global KRAS WT vs. KRAS mutado.

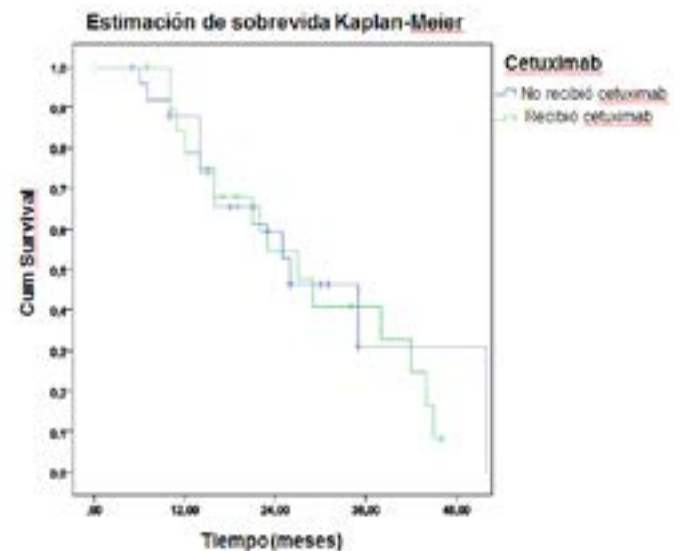


Figura 2. Sobrevida global en pacientes con KRAS-WT con o sin tratamiento con cetuximab

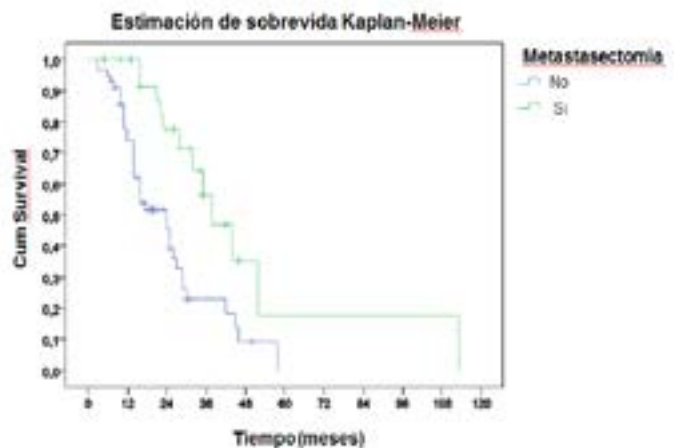


Figura 3. Sobrevida global pacientes con metastasectomía (R0) vs. quimioterapia estándar

DISCUSIÓN

KRAS es una proteína G de membrana asociada al receptor del factor crecimiento epidérmico (EGFR) y cuya función es la traducción de señales intracelulares. La presencia del KRAS mutado, origina una activación permanente de esta proteína G y de las vías de señalización, lo que ha sido implicado en el mantenimiento y crecimiento de tumores (3). Posteriormente se descubrió que las tres isoformas del oncogen RAS: KRAS, NRAS, y en menor frecuencia HRAS, también están implicadas en este mecanismo fisiopatogénico.

Numerosos estudios describen la prevalencia de las mutaciones de este oncogen y recientemente Peeters M y cols publicaron una prevalencia del 55,9% de mutaciones del RAS en el cáncer colorrectal (KRAS 52,6% y NRAS 7,4%) (4).

Los estudios son discrepantes en cuanto a la asociación de las mutaciones de KRAS con la edad y sexo de los pacientes (5,6). También lo son con la localización anatómica del tumor, existiendo reportes de mayor frecuencia de mutaciones en el colon derecho, y otros en el colon izquierdo (7,8,9). En el presente estudio no hemos hallado asociación con ninguno de estos factores.

Por otro lado, varios autores han demostrado relación entre los subtipos histológicos y la frecuencia de mutaciones del KRAS, pudiendo existir una mayor prevalencia de éstas en los adenocarcinomas de colon con diferenciación mucinosa (9,10). A pesar de esto, no pudimos demostrar esta asociación en los pacientes estudiados.

El hígado y en segundo lugar el pulmón son los órganos más afectados por el cáncer colorrectal. Existen patrones de diseminación metastásica donde su afectación inicial es pulmonar sin afectación hepática. Algunos han encontrado una incidencia mayor de este fenómeno en tumores con KRAS mutado comparado con KRAS WT (11,12). Esta relación no ha sido demostrada en este análisis.

En las últimas décadas, se ha comprobado que el estado del KRAS es un factor pronóstico y predictivo. Su impacto sobre la supervivencia libre de progresión y global ha sido publicado en el estudio multicéntrico RASCAL, el cual incluyó un análisis de 3439 pacientes, demostrando que los tumores con mutación del KRAS en el codón 12 presentaban mayor agresividad con una supervivencia significativamente menor (13).

Por otro lado, el KRAS predice la respuesta a anticuerpos monoclonales contra EGFR como cetuximab y panitumumab, logrando mayor supervivencia aquellos pacientes que poseen tumores colorrectales con KRAS-WT (14-17).

En el estudio multicéntrico fase III Crystal, se obtuvieron beneficios significativos con el agregado de cetuximab al tratamiento con FOLFIRI en primera (supervivencia media libre de progresión 9,9 vs 8,4 meses; HR 0.696 P=0012, supervivencia global 23,5 vs. 20,0 meses; hazard ratio [HR] 0.796; P=0093) (14-15). Similares beneficios han demostrado la utilización de cetuximab o panitumumab en combinación con quimioterapia basada en oxaliplatino (16-17).

Actualmente con la utilización de quimioterapia combinada con biológicos, la supervivencia global media de pacientes con cáncer colorrectal metastásico es de aproximadamente 30 meses (18). En pacientes seleccionados, la resección de

metástasis hepáticas o pulmonares mediante cirugía y/o técnicas ablativas como radiofrecuencia, junto con la extirpación del tumor primario, logra resultados superiores en supervivencia global a 5 años (27 al 68%), con una baja morbi-mortalidad (19-22). Este beneficio, fue evidente en nuestro estudio, al demostrar la duplicación de la supervivencia media en pacientes con resección completa de la enfermedad.

CONCLUSIÓN

No se encontró asociación entre el estado del KRAS y las características clínico-patológicas. La supervivencia global media de nuestra población fue ligeramente mayor a la conocida en la actualidad con la combinación de quimioterapia y biológicos, pero al realizar el análisis comparativo entre los pacientes sometidos a resección completa del tumor primario y sus metástasis frente a los que no, los resultados se asemejaron a los de las publicaciones actuales, encontrando un claro beneficio de la resección de las metástasis hepáticas. Por otro lado, es probable que el número de pacientes estudiados no sea el suficiente para encontrar una diferencia significativa en la SG de acuerdo con el estado del KRAS o con el tratamiento con cetuximab.

Conflicto de intereses: ninguno para declarar.

REFERENCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].
2. Arrington AK, Heinrich EL, Lee W, Dululao M, Patel S, Sanchez J. Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13:12153-68.
3. Tan C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2012;18:5171-80.
4. Peeters M, Kafatos G2, Taylor A, Gastanaga VM, Oliner KS, Hechmati G, Terwey JH. Prevalence of RAS mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: A pooled analysis of randomised controlled trials. *Eur J Cancer.* 2015;51:1704-13.
5. Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO, Gaudernack, et al. G. K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br J Cancer.* 1994; 69:367-371.
6. Gil Ferreira C, Aran V, Zalberg-Renault I, Victorino AP, Salem JH, Bonamino MH. KRAS mutations: variable incidences in a Brazilian cohort of 8,234 metastatic colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:73.
7. Bleeker WA1, Hayes VM, Karrenbeld A, Hofstra RM, Hermans J, Buys CC, Plukker JT, et al. Impact of KRAS and TP53 mutations on survival in patients with left- and right-sided Dukes' C colon cancer. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:2953-7.
8. Zulhabri O, Rahman J, Ismail S, Isa MR, Wan Zurinah WN. Predominance of G to A codon 12 mutation K-ras gene in Dukes' B colorectal cancer. *Singapore Med J.* 2012;53:26-31.
9. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Walters RJ, Pearson S, et al. Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. *Mod Pathol.* 2013;26:825-34.

10- Lin JK, Chang SC, Wang HS, Yang SH, Jiang JK, Chen WC, et al. Distinctive clinicopathological features of Ki-ras mutated colorectal cancers. *J Surg Oncol.* 2006;94:234-41.

11- Talha B, Abdelsalam I. Higher prevalence of KRAS mutations in colorectal cancer in Saudi Arabia: Propensity for lung metastasis. *Alejadria Journal of Medicine* 2014;50,203-09.

12- Tie JI, Lipton L, Desai J, Gibbs P, Jorissen RN, Christie M, et al. KRAS Mutation Is Associated with Lung Metastasis in Patients with Curatively Resected Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17:1122-30.

13. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer.* 2001;85:692-6

14. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:1408-17.

15. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor KRAS and BRAF Mutation Status. *JCO* 2011; 29:2011-19

16. Taberero J, Van Cutsem E, Díaz-Rubio E, Cervantes A, Humblet Y, André T, et al. Phase II Trial of Cetuximab in Combination With Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer . *J Clin Oncol.* 2007; 25:5225-32

17. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Taberero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol.* 2010;28:4697-705.

18. Elez E, Argilés G, Taberero J. First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: Interpreting FIRE-3, PEAK, and CALGB/SWOG 80405. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16:52

19. Gonzalez M, Poncet , Combescure C, Robert J, Ris HB, Gervaz P. Risk factors for survival after lung metastasectomy in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2013;20:572-9.

20. Wei A, Greig P, Grant D, Taylor B, Langer B, Gallinger S. Survival after hepatic resection for colorectal metastases: a 10-year experience. *Ann Surg Oncol.* 2006; 13:668.

21. Rees M, Tekkis P, Welsh FK, O'Rourke T, John TG. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients. *Ann Surg.* 2008; 247:125-35.

22. Ruers T, J. Punt C, van Coevorden F et al. Radiofrequency ablation (RFA) combined with chemotherapy for unresectable colorectal liver metastases (CRC LM): Long-term survival results of a randomized phase II study of the EORTC-NCRI CCSG-ALM Intergroup 40004 (CLOCC). *J Clin Oncol* 33. 2015 (suppl; abstr 3501)