



ESTUDI MULTIVARIANT DE CORRELACIÓ DE KRAS AMB EL PERFIL HISTOPATOLÒGIC I MOLECULAR DEL CARCINOMA COLORRECTAL

Natalia Rodon¹, Ruth Román¹, Montse Verdú^{1,3}, Miquel Calvo⁴, Beatriz García-Pelaez¹, Marta Gonzalez¹, Carme Pubill³ i Xavier Puig^{1,2,3}. ¹BIOPAT. Biopatologia Molecular, SL, Grup Assistència; ²Hospital de Barcelona-SCIAS, Grup Assistència; ³Histopat Laboratoris; ⁴Departament d'Estadística, Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓ I OBJECTIU

Les mutacions de l'oncogen KRAS, presents al 30-50% dels carcinomes colorrectals, expliquen la manca de resposta a inhibidors dels receptors EGF. Tot i que publicacions recents relacionen l'estatus de KRAS amb alta activitat mitòtica i mal pronòstic, la seva relació amb altres paràmetres histopatològics i moleculars no està ben determinada.

L'objectiu del present estudi és confirmar, mitjançant un estudi multivariant, les correlacions observades en un estudi univariant inicial entre l'estat mutacional de KRAS i 29 paràmetres histopatològics i moleculars (Taula 1.).

MATERIAL I MÈTODES

Pacients. Per l'estudi retrospectiu es van incloure 308 pacients amb adenocarcinoma colorrectal primari. Les mostres es van fixar en formaldehid tamponat al 10% i es van incloure en parafina. Dos patòlegs independents van examinar una mitjana de 4 laminetes de cada tumor. Les característiques histopatològiques es van recollir seguint criteris publicats previament. Es va realitzar la microdissecció manual de 10 seccions de 5µm de cada cas (teixit normal i tumoral) seguida de l'extracció de DNA amb un protocol de fenol-cloroform.

Anàlisi d'instabilitat de microsatèl.lits (MSI). L'estatus MSI es va evaluar amb un panell del 11 microsatèl.lits: BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 and D17S250; 5 microsatèl.lits addicionals originàriament estudiats per evaluar LOH al cromosoma 18q i un microsatèl.lit al locus TP53 al cromosoma 17p (P53CA)..

PCR i estudis de seqüenciació. Es van amplificar mitjançant PCR els gens KRAS (exó 1), BRAF (exó 15) i P53 exons 4 a 8. L'estudi mutacional es va dur a terme mitjançant seqüenciació directa.

Anàlisi estadístic. Es va utilitzar l'algorisme glmnet per seleccionar quines variables estaven associades amb l'estat mutacional de KRAS i construir el model multivariant. El mecanisme de selecció va ser validat de forma creuada mitjançant un exhaustiu procediment de remostratge que analitza els resultats de 1000 conjunts diferents.

RESULTATS

El procediment combinat glmnet i validació creuada amb la sèrie global de dades indica que la mutació V600E de BRAF, la sobre-expressió de p53 i l'estatus de P53 mostren simultàniament associació amb l'estatus de KRAS (Figura 1).

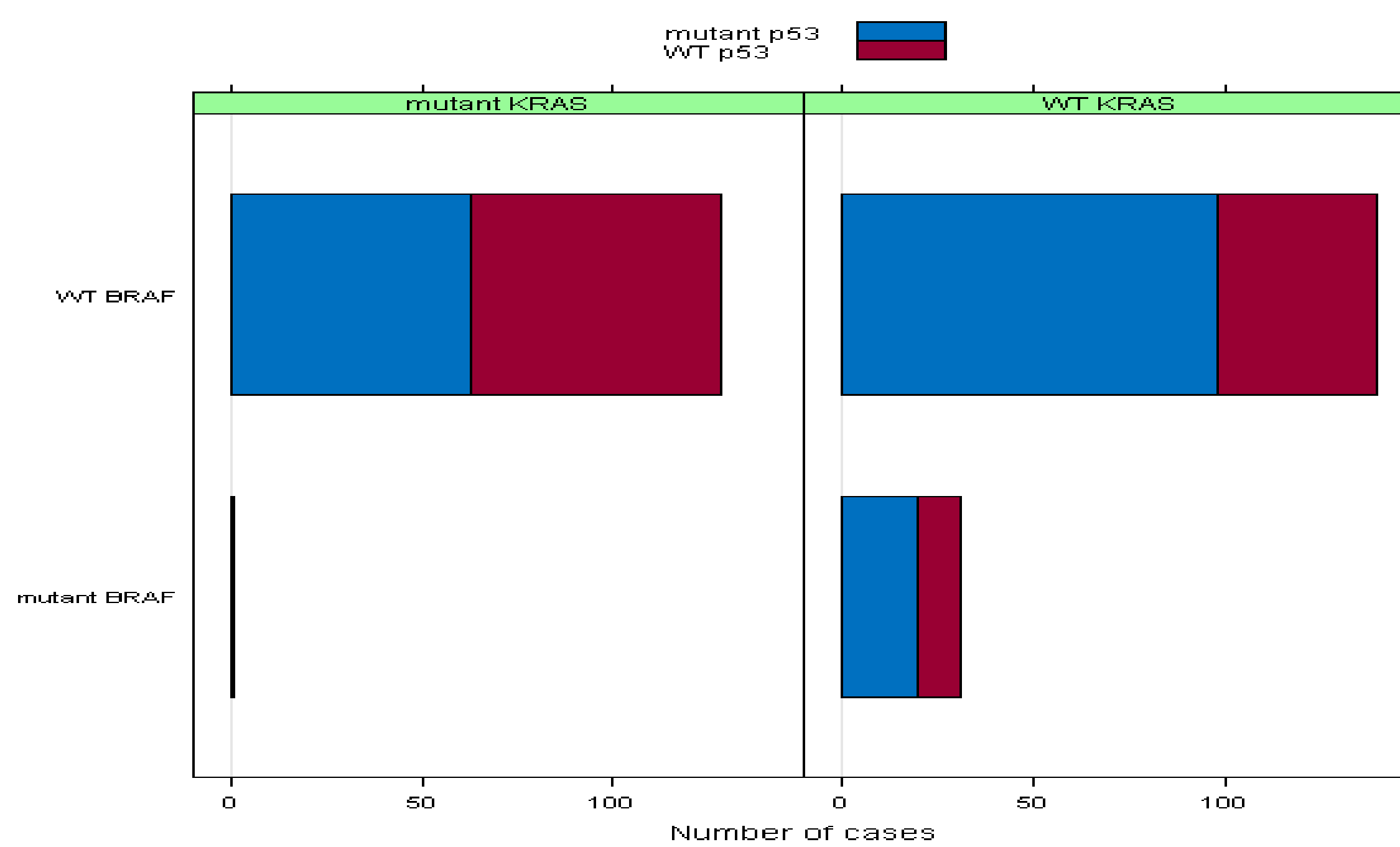


Figura 1. Associació entre estat mutacional de KRAS i mutacions de BRAF i p53

CONCLUSIONS

- L'anàlisi multivariant confirma els resultats de l'anàlisi univariant previ.
- La no mutació de KRAS s'associa amb la sobreexpressió de p53 i la presència de mutacions a p53 i V600E del gen BRAF
- L'associació entre les mutacions de KRAS i el percentatge de component mucinos i sòlid trobada en l'anàlisi univariant no queda recollida en el model multivariant.
- La manca d'associació entre KRAS i paràmetres d'alt grau com el pT, la mida tumoral o la presència de metàstasi als nòduls limfàtics concorden amb el fet que la mutació de KRAS es dona en estats primerencs de la carcinogènesi colorrectal.

REFERENCIES

- Amado et al. Wild-type KRAS is required for Panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26:1626-1634.
- Nicolantonio F et al: Wild-Type BRAF is required for response to Panitumumab or Cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26:5706-5712.
- Rodon N et al: KRAS mutations correlates with P53 status in colorectal carcinomas. *P4.92. Virchows Arch* (2009) 455 (Suppl 1): S1-S482
- Friedman et al: Glmnet: Lasso and elastic-net regularized generalized linear models. *Journal of Statistical Software*, 33(1), 2010.

Variables Categòriques	KRAS WT (%) N=178 (57.8)	KRAS MUTAT (%) N=130 (42.2)
Gènere		
Masculí	106 (34.4)	74 (24.0)
Femení	72 (23.4)	56 (18.2)
Localització		
Proximal	55 (17.9)	52 (16.9)
Distal	63 (20.4)	39 (12.7)
Recte	53 (17.2)	38 (12.3)
Desconeguda	7 (2.3)	1 (0.3)
Configuració		
Exofític	55 (17.9)	54 (17.5)
Ulcerat	69 (22.4)	46 (15.0)
Estenosant	37 (12.0)	17 (5.5)
Polipoide	17 (5.5)	13 (4.2)
Abast de la invasió (pT)		
pT1	13 (4.2)	8 (2.6)
pT2	22 (7.2)	21 (6.8)
pT3ab	57 (18.5)	37 (12.0)
pT3cd	30 (9.8)	19 (6.2)
pT4a	2 (0.6)	4 (1.3)
pT4b	54 (17.5)	41 (13.3)
TWVI Intramural		
Present	66 (21.4)	37 (12.0)
Absent	112 (36.5)	93 (30.2)
TWVI Extramural		
Present	60 (19.5)	44 (14.3)
Absent	118 (38.3)	86 (28.0)
I VVI Intramural		
Present	14 (4.5)	7 (2.3)
Absent	164 (53.2)	123 (40.0)
VVI Extramural		
Present	42 (13.6)	27 (8.8)
Absent	136 (44.2)	103 (33.4)
PNI Intramural		
Present	5 (1.6)	2 (0.6)
Absent	173 (56.2)	128 (41.6)
PNI Extramural		
Present	24 (7.8)	13 (4.2)
Absent	154 (50.0)	117 (38.0)
Patró de creixement		
Expansiu	62 (20.1)	36 (11.7)
Infiltrantiu	116 (37.7)	94 (30.5)
Reacció linfocitària Crohn-like		
Present	56 (18.2)	44 (14.3)
Absent	122 (39.6)	86 (28.0)
TIL		
Present	24 (7.8)	19 (6.2)
Absent	154 (50.0)	111(36.0)
Adenoma Residual		
Present	53 (17.2)	54 (17.5)
Absent	125 (40.6)	76 (24.7)
Mutació BRAF V600E		
Present	31 (10.1)	1 (0.3)
Absent	147 (47.7)	129 (41.9)
Mutació p53		
Present	124 (40.3)	63 (20.5)
Absent	54 (17.5)	67 (21.7)
MSI		
MSI-H	25 (8.1)	7 (2.3)
MSI-L	24 (7.8)	19 (6.2)
MSS	129 (41.9)	104 (33.8)
MMR (IHC)		
Expressió conservada	158 (51.3)	125 (40.6)
Pèrdua d'expressió	20 (6.5)	5 (1.6)

Variables numèriques	Mitjana± SD	Mitjana± SD
Edat	68.2 ± 12.4	69.8 ± 11.1
Mida tumoral (mm)	40.9 ± 17.6	43.5 ± 21.9
Component sòlid (%)	12.9 ± 23.3	6.6 ± 14.0
Component mucinos extracelular (%)	11.6 ± 24.7	14.6 ± 25.7
Component mucinos intracelular (%)	0.5 ± 3.8	0.1 ± 0.7
Patró cribriforme (%)	7.5 ± 15.3	9.3 ± 18.6
Patró micropapilar (%)	2.2 ± 8.9	2.4 ± 8.2
Patró microglandular(%)	3.1 ± 11.5	2.0 ± 5.1
Nòduls limfàtics (n)	2.5 ± 4.4	1.9 ± 3.2
Índex proliferatiu Ki67 (%)	59.7 ± 21.3	56.5 ± 21.0
Sobreexpressió P53 (%)	42.1 ± 35.9	28.2 ± 33.5

Taula 1. Correlació entre l'estat mutacional de KRAS i els 29 paràmetres histopatològics i moleculars estudiats