

ESTUDIO MUTACIONAL DE *BRAF* Y *KRAS* EN CÁNCER COLORRECTAL: CARCINOMA ESPORÁDICO *VERSUS* SÍNDROME FAMILIAR NO ASOCIADO A POLIPOSIS.

Colomer Valero A¹, Erill Sagalés N¹, Vidal Bel A^{1,2}, Verdú Artufel M², Roman Lladó R¹, Cerdón Cardó C^{1,3}, Puig Torrus X^{1,2}.

¹BIOPAT. Biopatología Molecular, Grup Assistència, Barcelona; ²HISTOPAT Laboratoris, Barcelona; y ³Divisió de Patologia Molecular, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

- El 15% de carcinomas colorrectales esporádicos comparte la patogénesis molecular del síndrome familiar no asociado a poliposis (HNPCC), que cursa con inestabilidad de microsatélites (MSI-H) secundaria a la alteración de uno o más genes de reparación del DNA (*MMR*).
- Los tumores MSI-H tienen un fenotipo histopatológico característico e independiente de la presentación clínica, siendo las formas familiares morfológicamente indistinguibles de las esporádicas.
- El 10% de los pacientes con cáncer colorrectal MSI-H es susceptible de neoplasia hereditaria, y el despistaje basado en la historia clínica (criterios de Bethesda) no siempre permite identificarlos.
- El gen *BRAF* codifica una serina/treonina quinasa que, inducida por factores de crecimiento y mediada por *RAS*, activa la cascada *RAS/RAF/MEK/ERK* implicada en la proliferación celular.
- La alteración más frecuente de *BRAF*, la mutación V600E, induce la activación constitutiva de la vía MAPK, facilitando la evasión de la apoptosis, y se asocia a inactivación transcripcional del gen reparador *hMLH1* por hipermetilación de su promotor, pero no a mutación en línea germinal de éste.
- El cáncer colorrectal con MSI-H tiene una incidencia significativamente menor de mutación de *KRAS* que el que de fenotipo estable (MSS).
- El objetivo del presente estudio fue evaluar la incidencia de mutación de *BRAF* en una serie prospectiva de tumores (n= 244) obtenidos de pacientes intervenidos quirúrgicamente por cáncer colorrectal primario, y correlacionar los hallazgos con otros factores previamente asociados a la mutación de *BRAF*, como la expresión de los genes *MMR*, la mutación de *KRAS*, y la localización proximal de la lesión.

Vía de transducción de señales *RAS/RAF/MEK/ERK*.

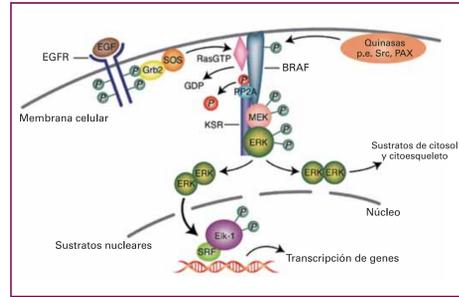
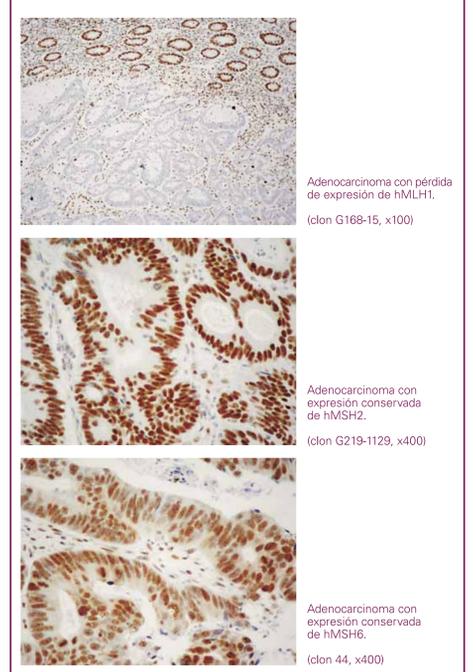


Tabla 1. Características clinicopatológicas de la serie de cáncer colorrectal.

Características clinicopatológicas (n = 244)	MSI-H (n = 25)	no MSI-H (n = 219)
Localización		
Proximal	20 (80,0)	64 (29,2)
Distal	5 (20,0)	146 (66,7)
No especificada	0 (0,0)	9 (4,1)
Tipo histológico (OMS)		
Adenocarcinoma (ICD-O 8140/3)	14 (56,0)	197 (90,0)
Adenocarcinoma mucosoide (ICD-O 8480/3)	10 (40,0)	22 (10,0)
Carcinoma indiferenciado (ICD-O 8020/3)	1 (4,0)	0 (0,0)
Grado histológico (OMS)		
Grado 1	6 (24,0)	97 (44,3)
Grado 2	3 (12,0)	86 (39,3)
Grados 3 y 4	16 (64,0)	34 (15,5)
No graduable*	0 (0,0)	2 (0,9)
Extensión de la invasión (TNM)		
pT1	2 (8,0)	15 (6,9)
pT2	4 (16,0)	29 (13,2)
pT3	14 (56,0)	102 (46,6)
pT4	5 (20,0)	73 (33,3)
Afectación ganglionar (TNM)		
pN1	17 (68,0)	105 (47,9)
pN2	3 (12,0)	67 (30,6)
No valorable	5 (20,0)	47 (21,5)
Estadio clínico (Astler-Coller's)		
A	5 (20,0)	36 (16,5)
B	12 (48,0)	64 (29,2)
C	8 (32,0)	97 (44,3)
D	0 (0,0)	22 (10,0)
Expresión de MMR		
Normal	6 (24,0)	218 (99,5)
hMLH1	18 (72,0)	1 (0,5)
hMSH2	1 (4,0)	0 (0,0)
hMSH6	0 (0,0)	0 (0,0)
Mutación de <i>KRAS</i>		
Ausente	21 (84,0)	96 (43,8)
Presente	4 (16,0)	120 (54,8)
No valorable	0 (0,0)	3 (1,4)
Mutación V600E		
Ausente	10 (40,0)	202 (92,2)
Presente	15 (60,0)	15 (6,9)
No valorable	0 (0,0)	2 (0,9)
Otra mutación de <i>BRAF</i>		
Ausente	25 (100,0)	208 (95,0)
Presente	0 (0,0)	7 (3,2)
No valorable	0 (0,0)	4 (1,8)

* El grado histológico se asignó en base a la clasificación de la OMS, que considera los adenocarcinomas mucosoides y los indiferenciados de Grado 3 y Grado 4, respectivamente. Dos lesiones radiadas previa intervención fueron consideradas no gradables.

Figura 1. Ejemplos representativos de la inmunohistoquímica de los genes *MMR*.



MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes. Serie de 244 pacientes consecutivos, constituida por 143 varones (59%) y 101 mujeres (41%) con edad promedio de 68,6±12,1 años (rango 36-98). En la **Tabla 1** se hallan las características clinicopatológicas de la misma.

Tejidos. Procedentes de piezas quirúrgicas para el estudio histopatológico rutinario. Selección de áreas representativas de tejido tumoral y mucosa normal a distancia del mismo a partir de secciones de 4 µm de tejido fijado en formol e incluido en parafina, teñidas con H&E.

Inmunohistoquímica. Detección de la expresión de los genes reparadores *MMR* por técnica indirecta de inmunoperoxidasa con avidina-biotina, en secciones de 4 µm previa recuperación antigénica por calor en tampón citrato. La positividad de los núcleos de la base de las criptas de la mucosa cólica normal adyacente al tumor y de los linfocitos sirvió de control interno. En los casos con ausencia de inmunoreactividad en todos los núcleos tumorales y positividad del control interno, se determinó pérdida de expresión de *MMR* (hMLH1-, hMSH2-, ó hMSH6-), mientras que en los que se preservaba la inmunoreactividad nuclear de las células neoplásicas se determinó expresión conservada (hMLH1+, hMSH2+, ó hMSH6+) (**Figura 1**).

Purificación y control de calidad del DNA. Obtenido tras disección manual de secciones de 5 µm de los pares de tejido normal/tumor por método de proteinasa K con extracción fenólica. La calidad del DNA se comprobó mediante amplificación de un fragmento del gen de la β-globina humana.

Análisis de inestabilidad de microsatélites. Amplificación de 11 marcadores por PCR: los 5 del panel del NCI (**Figura 2**), 5 de los usados convencionalmente para estudiar LOH en el cromosoma 18q (D18S55, D18S58, D18S61, D18S64 y D18S69), y otro del locus TP53 en el cromosoma 17p (P53CA). Acorde a las directrices del US National Cancer Institute, los casos con inestabilidad en más del 30% de los loci testados se clasificaron como MSI-H.

Análisis mutacional. Para *BRAF*, amplificación de fragmentos de los exones 11 y 15, ensayo de movilidad en gel preformado de acrilamida no desnaturalizante (SSCP) con tinción de plata, y secuenciación bidireccional de los nuevos fragmentos amplificados de los tumores con patrón anómalo de movilidad electroforética. Para *KRAS*, amplificación de un fragmento del exón 1 que abarca los codones 12 y 13, y secuenciación unidireccional con cebador interno antisentido.

Análisis estadístico. Relación de la mutación de *BRAF* con el estado de inestabilidad de microsatélites, con la expresión de *MMR* y con la mutación de *KRAS* analizada mediante test exacto de Fisher con cálculo de *odd-ratios* (OR), considerándose estadísticamente significativa una *p*<0,05.

RESULTADOS

Veinticinco de los 244 casos de la serie (10%) presentaron fenotipo MSI-H. En 19 de ellos (76%) se observó pérdida de expresión de *MMR* (18 hMLH1 y 1 hMSH2). Catorce de los 18 casos hMLH1- (78%) fueron lesiones proximales con mutación V600E de *BRAF* en ausencia de mutación de *KRAS*. De los cuatro restantes, sin mutación alguna de *BRAF*, 2 presentaron mutación de *KRAS*, y los otros 2 fueron considerados susceptibles de HNPCC en base a la edad de presentación (48 y 55 años). El caso inestable hMSH2- no presentó ni mutación de *BRAF* ni de *KRAS*. Ningún caso con MSI-H presentó mutaciones en el exón 11 (**Tabla 2A**).

Veintidós de los 219 casos con fenotipo MSS (10%) presentaron patrones anómalos de movilidad de *BRAF*, 20 para el exón 15 y 2 para el 11. La secuenciación reveló que 15 de los 16 tumores que compartían patrón tenían la mutación V600E, mientras que el otro portaba una G596R, otros 3 casos tenían una D594G, y el caso restante tenía una delección de 2pb en el codón 599, que generaba un codón de terminación prematura (**Figura 3**). Ambas mutaciones en el exón 11 correspondieron a una G466A (**Tabla 2B**).

La pérdida de expresión de hMLH1 se asoció al fenotipo inestable (test de Fisher, *p*<0,001), pues sólo un caso con MSS resultó ser hMLH1- (OR= 0,0020 [0,0001-0,0155]). También se halló relación entre el estado mutacional de *BRAF* y la expresión de hMLH1 (test de Fisher, *p*<0,001), siendo la mutación más frecuente en lesiones hMLH1- que en las que retenían la expresión (OR= 34,97 [10,35-140,47]).

No se halló ninguna mutación de *KRAS* en lesiones con mutación de *BRAF*, lo que apoya la hipótesis de que ambas alteraciones son eventos genéticos mutuamente excluyentes (test de Fisher, *p*<0,001).

Las lesiones proximales globalmente acumularon más mutaciones V600E que las distales (test de Fisher, *p*<0,001; OR= 9,66 [3,61-30,40]), siendo especialmente significativo el hecho de que todos los tumores MSI-H con V600E fueran proximales.

CONCLUSIONES

- Estos resultados apoyan la hipótesis de que las mutaciones de los genes *BRAF* y *KRAS* son eventos genéticos mutuamente excluyentes en el cáncer colorrectal.
- El hallazgo de la mutación V600E de *BRAF* en tumores colorrectales con MSI-H permite asignar carácter esporádico a la enfermedad, por lo que la detección de ésta puede utilizarse como estrategia para el despistaje de familias HNPCC (**Figura 4**).
- Es necesario clarificar el rol de *BRAF* en la carcinogénesis colorrectal, pues constituye una posible diana terapéutica para el manejo clínico de los pacientes.

REFERENCIAS

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.

Deng G, Bell I, Crawley S, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:191-5.

Domingo E, Espin E, Armengol M, et al. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:138-42.

Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004;41:664-8.

McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL, et al. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer* 2004;3:101-7.

Miyaki M, Iijima T, Yamaguchi T, et al. Both BRAF and KRAS mutations are rare in colorectal carcinomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Lett* 2004;211:105-9.

Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934.

Tabla 2. Resultados porcentuales del estudio mutacional de *BRAF* en relación a la expresión inmunohistoquímica de los genes *MMR* y a las mutaciones de *KRAS*.

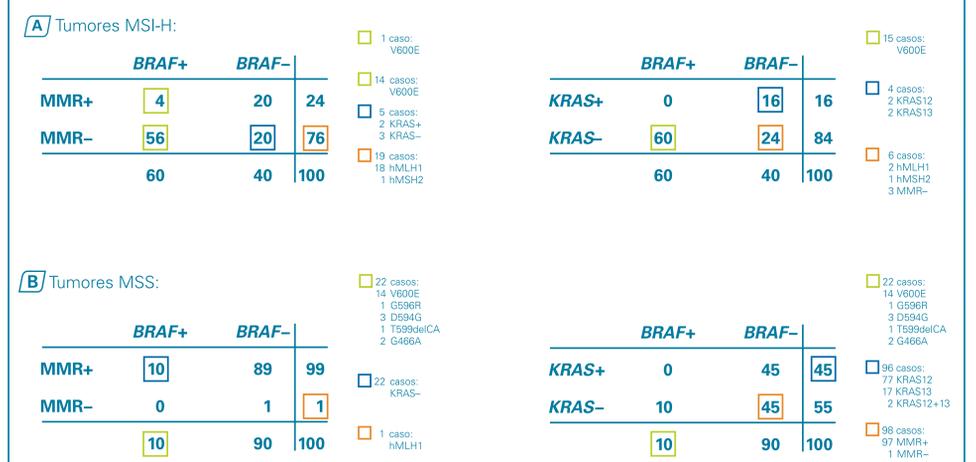


Figura 2. Electroferogramas obtenidos tras el análisis del estado de inestabilidad de un tumor MSI-H utilizando los marcadores microsatélites del panel del NCI.

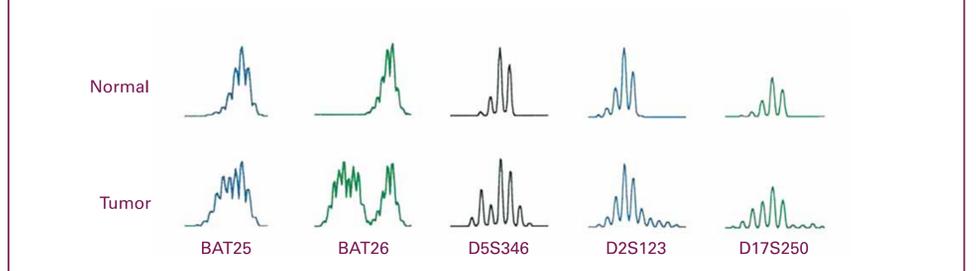


Figura 3. Electroferogramas representativos del análisis mutacional del exón 15 de *BRAF* con sus respectivos patrones de movilidad por SSCP.

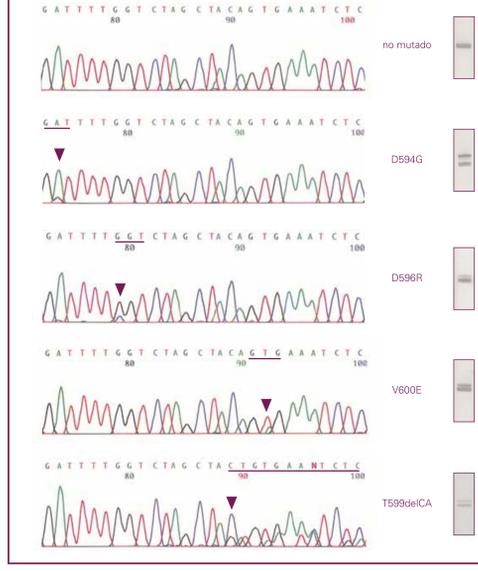


Figura 4. Algoritmo propuesto para el despistaje genético del HNPCC.

