

# Relación de la alteración del gen *BRAF* y la metilación del gen reparador *hMLH1* en tumores colorrectales \*

S. Veganzones<sup>1</sup>, ML. Maestro<sup>1</sup>, M. Vidaurreta<sup>1</sup>, MT. Sanz-Casla<sup>1</sup>, S. Rafael<sup>1</sup>, A. Martínez<sup>2</sup>, MD. Herranz<sup>2</sup>, C. Aguilera<sup>2</sup>, J. Cerdán<sup>3</sup>, M. Arroyo<sup>1</sup>

## Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido observar si las alteraciones del oncogén *BRAF* se relacionan con la metilación del gen reparador *hMLH1* y si establece diferencias en la supervivencia, así como analizar el papel de la actividad telomerasa en estos tumores. La población comprende 351 pacientes intervenidos por carcinoma colorrectal. El estudio de la metilación del promotor de *hMLH1* se realiza mediante modificación del ADN con bisulfito sódico y un posterior análisis de los productos amplificados mediante electroforesis. El gen *BRAF* es amplificado mediante primers específicos y las secuencias mutadas son detectadas mediante PCR a tiempo real. La actividad de la telomerasa fue determinada por enzoinmunoanálisis basado en la amplificación de las repeticiones de las secuencias teloméricas (TRAP-assay).

Se observó un 3,7% de mutaciones en el gen *BRAF*. En el estudio de la metilación de *hMLH1* se observó metilación en el 67,2% de los pacientes. Se detectó actividad telomerasa positiva en el 92,8%. En el análisis de la supervivencia, los pacientes con mutación de *BRAF* presentaban un incremento del 62% del riesgo de fallecer, aunque esta relación no es estadísticamente significativa. La metilación de *hMLH1* no presenta significado pronóstico. Respecto a la actividad telomerasa, ninguno de los pacientes con telomerasa negativa falleció durante el seguimiento.

**Palabras clave:** Proteína hMLH1. Oncogen *BRAF*. Neoplasias colorrectales

## Summary. Association between alterations in *braf* gene and promoter methylation of the *hMLH1* repairing gene in colorectal tumors.

*The aim of this study has been to determine whether the alterations of BRAF oncogene are related to hMLH1 promoter methylation and whether it means a difference in survival. The role of telomerase activity levels has also been evaluated in these tumors.*

*The study population consisted of 351 colorectal cancer patients. The analysis of the methylation status of hMLH1 promoter was performed using specific PCR of the bisulphite-modified DNA and verification by agarose electrophoresis. BRAF gene was amplified using specific primers and mutations were detected by real-time PCR. An enzyme immunoassay based on telomere repeat amplification protocol (TRAP-assay) was used to measure telomerase activity.*

*BRAF mutation was detected in 3,7% of patients. In the hMLH1 study, methylation was found in the 67,2%. Telomerase activity was positive in 92,8%. In the survival analysis, patients who carried BRAF mutations showed a 62% increase in death risk, although this relationship was not statistically significant. hMLH1 did not show prognostic significance/value. With respect to telomerase activity, none of the telomerase negative patients died during the follow-up period.*

**Key words:** hMLH1 protein, human. Proto-oncogene proteins B-raf. Colorectal neoplasms.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores mejor caracterizados en cuanto a los mecanismos genéticos implicados en su desarrollo. En su tumorigénesis se describen dos vías genéticas

diferentes: la más frecuente es la vía de la inestabilidad cromosómica caracterizada por alteraciones en oncogenes y genes supresores (1). En un 10-15% de los casos la vía implicada es la inestabilidad de los microsatélites (MSI) que se debe a una alteración de los genes reparadores del ADN (MMR), responsables de la reparación de los errores que ocurren durante la replicación del ADN. Estas dos vías genéticas dan lugar a dos fenotipos clínicos de tumores colorrectales que difieren en las características del tumor y en su evolución clínica (2,3).

En el control del ciclo celular las proteínas Raf participan en la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK, que media la respuesta celular a señales de crecimiento. Recientemente, se han descrito mutaciones de *BRAF* en el CCR, como mecanismo alternativo a la alteración de *Kras* en esta vía (4,5). Las alteraciones de *BRAF* se describen asociadas a la vía MSI de la tumorigénesis colorrectal, siendo la

<sup>1</sup> Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico San Carlos, Madrid

<sup>2</sup> Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Reina Sofía, Córdoba.

<sup>3</sup> Servicio de Cirugía General, Hospital Clínico San Carlos, Madrid

\* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Bilbao el 9, 10 y 11 de octubre de 2006.

Este estudio ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias con el proyecto n° PI030514 y por la Comunidad de Madrid con el proyecto n° 08.1/0012/1999.1. Premio Bilbao 2006

mutación V599E, localizada en el exón 15, la más frecuentemente identificada en estos tumores con defectos en los MMR (5).

Otra de las características de la transformación neoplásica es la proliferación celular descontrolada. Los telómeros son segmentos especializados de ADN altamente repetitivo que se encuentran en los extremos de los cromosomas. Los telómeros protegen el final del cromosoma frente a la degradación, la recombinación aberrante y las fusiones terminales. También favorecen la unión de las enzimas reparadoras a los extremos del ADN. En células inmortalizadas, con un potencial de replicación indefinido, se han descrito dos mecanismos que mantienen la longitud del telómero. La actividad de la enzima telomerasa es el mecanismo más frecuente de inmortalización celular en la transformación neoplásica, como lo demuestra el hecho de que aproximadamente el 90% de las células tumorales presentan actividad telomerasa (6). La enzima telomerasa es capaz de restaurar la secuencia del telómero y, por tanto, prolongar la vida de la célula, manteniendo su capacidad de multiplicación y su inmortalidad. El segundo mecanismo descrito es la vía ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) que se basa en la recombinación homóloga. Debido a un defecto en la recombinación telómero específica, las células ALT recombinan críticamente los telómeros cortos para mantener la proliferación celular (7). En el CCR, diferentes autores muestran una alta actividad telomerasa (80-100%) (8,9). Actualmente se está investigando la utilidad clínica de fármacos que inhiban la actividad telomerasa (10).

El objetivo de este trabajo ha sido observar si las alteraciones del gen *BRAF* se relacionan con la alteración del gen *hMLH1* y si establece diferencias en la supervivencia, así como analizar el papel de la actividad de la telomerasa en estos tumores.

## PACIENTES Y MÉTODOS

### Pacientes

La población de nuestro estudio comprende un total de 351 pacientes consecutivos intervenidos quirúrgicamente por carcinoma colorrectal primario en el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico San Carlos de Madrid entre marzo de 1995 y abril de 2003. Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. Todos los pacientes fueron intervenidos por el mismo cirujano, realizándose una cirugía radical oncológica en función de la localización del tumor. La cirugía se definió como curativa cuando tras la resección no existía evidencia de tumor macroscópico residual. Según este criterio, en 290 pacientes (82,6%) se efectuó una resección curativa y en 61 pacientes (17,4%) se reseccó el tumor primario con intención paliativa. Fueron excluidos de nuestro estudio los casos de carcinomas metacrónicos, las poliposis familiares, pacientes con criterios de carcinoma colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) y la enfermedad inflamatoria intestinal. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento neoadyuvante. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes previo a la investigación. El proyecto fue valorado favorablemente por el comité de ética e investigación clínica de este hospital. El seguimiento clínico de los pacientes se realizó según el protocolo diseñado en nuestro servicio. Los tumores fueron estadificados según la clasificación de Dukes. Se consideró colon proximal cuando los tumores estaban localizados en colon derecho y transversal y colon distal cuando afectaba a colon izquierdo y sigma. El 51,3% de la población estudiada recibió quimioterapia adyuvante basada en 5-fluoracilo (5-FU).

### Método

#### Procesamiento de las muestras

Inmediatamente después de retirada la pieza, se recogió una muestra de tumor y de tejido sano y se introdujeron en nitrógeno líquido para su posterior conservación en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El estudio anatomopatológico lo realizaron dos patólogos de forma independiente y especialmente para este estudio. Se comprobó que todas las muestras tumorales tenían más del 80% de células tumorales.

Para la extracción del ADN, el tejido de las muestras, tumoral y no tumoral, se incubó durante toda una noche a  $50^{\circ}\text{C}$  en el tampón de lisis (10 mM tris HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  proteinasa K). Posteriormente el ADN se aisló con fenol:cloroformo y precipitado con etanol.

#### Determinación de las mutaciones del gen *BRAF*

El análisis del gen *BRAF* se realizó en el *LightCycler* (Roche). Los cebadores utilizados en la amplificación del exón 11 del gen fueron: *BRAF-F*

(5'-CACTTGGTAGACGGGACTCG-3') y *BRAF-R*

(5'-CATGCCACTTCCCTTGTAG-3') y los cebadores del exón 15 fueron: *BRAF-F*

(5'-CTACTGTTTCCTTTACTTACTACAC-3') y *BRAF-R*

(5'-GACCTTCAATGACTTTCTAGTAAC-3'). La PCR fue realizada con 5  $\mu\text{L}$  de ADN en 20  $\mu\text{L}$  de volumen. Durante la PCR a tiempo real, la disminución de la señal de fluorescencia fue monitorizada y las curvas de fusión fueron construidas automáticamente por el software del *LightCycler*. Las curvas fueron convertidas en picos de fusión mediante la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura. Cuando en la PCR a tiempo real se detectó una mutación, ésta se comprobó secuenciado la muestra en el analizador ABI PRISM 3100.

#### Análisis del estado de metilación del promotor del gen *hMLH1*

El análisis del estado de metilación de la región promotora del gen *hMLH1* fue realizado mediante tratamiento con bisulfito sódico y el método de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP). Los cebadores utilizados en la PCR fueron *hMLH1-F* (5'-ACGTAGACGTTTTATTAGGGTTCGC) y *hMLH1-R* (5'-CCTCATCGTAACTACCCGCG) para el ADN metilado y *hMLH1-F*

(5'-TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT) y *hMLH1-R*

(5'-ACCACCTCATCATACTACCCACA) para el ADN no metilado. Cuando en el análisis por SSCP las bandas muestran distinta movilidad electroforética, se cortan del gel y se secuencian en el analizador ABI PRISM 3100.

#### Análisis de la actividad telomerasa

La actividad telomerasa es determinada en tejido tumoral por ensayo inmunoenzimático (ELISA) basado en la amplificación de las repeticiones de las secuencias teloméricas (TRAP-assay). Las muestras del tejido congelado fueron homogeneizadas en tampón de lisis durante 30 minutos. La actividad telomerasa se determinó en un extracto celular (3-6  $\mu\text{g}$  de proteína total) sobre el que se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000). Se midió la actividad de la fosfatasa alcalina como control de una posible degradación proteica, por ser la proteína más lábil. Todos los

extractos proteicos presentaban valores semejantes de esta actividad enzimática. La integridad del ARN fue estudiada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes. Se utilizó ARN extraído de hígado de rata como control de la integridad del ARN. Las muestras fueron amplificadas siguiendo el protocolo descrito por Kim et al en un volumen final de 50 mL. La elongación de las muestras fue amplificada por PCR usando los cebadores específicos marcados con una molécula de biotina en 3' y adecuando las condiciones de la PCR. La detección de la actividad telomerasa a través de los productos de amplificación se realiza por método de ELISA. La placa del ELISA está tratada con estreptavidina y los productos de amplificación se unen por medio de la biotina a la estreptavidina. Posteriormente son desnaturizados e hibridados con una sonda que contiene antioxigenina peroxidasa, conjugado de la peroxidasa. Sobre esta sonda se añade el sustrato TMB que tras ser metabolizado por la enzima da lugar a un color correspondiente al producto de amplificación. En la determinación de la actividad telomerasa de todas las muestras se incluyó un control positivo y un control negativo.

### Análisis estadístico

La variable edad es recodificada en dos grupos de acuerdo con la mediana (71 años). Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con la prueba de  $\chi^2$  y, en el caso de que más de un 25% de los esperados fuera menor de 5, por la prueba exacta de Fisher.

Se incluye como definición del evento en la supervivencia global (SG) aquellos fallecimientos producidos como consecuencia del tumor y quedando censurados los pacientes vivos y fallecidos por otra causa. La SG fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la del *exitus* o última revisión. Se estimaron las funciones de SG por el método de Kaplan-Meier, y se compararon las funciones de supervivencia de los distintos grupos mediante la prueba exacta de Breslow, debido a que la capacidad de inferencia del estudio está en el tiempo mediano de seguimiento. Se ajustó un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Se presenta la *hazard ratio* (HR) y su intervalo de confianza al 95% (IC95%). Las variables introducidas en el modelo, a partir de criterios biológicos, fueron sexo, edad, estadio de Dukes, localización del tumor, grado de diferenciación, tipo histológico y alteraciones genéticas. Se evaluó la asociación de proporcionalidad de riesgos. Se estudió la presencia de interacciones. En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I menor a 0,05.

El paquete informático utilizado para el análisis fue SSPS para Windows versión 11,5.

## RESULTADOS

De la población objeto de nuestro estudio, el 52,1% eran varones y el 47,9% mujeres. La edad media fue de 69,6 años, desviación estándar de 11,3, mediana de 71,0 años y intervalo comprendido entre 30 y 95 años. Si establecemos como valor discriminante la mediana de la edad, el 48,4% de los pacientes presentaba menos de 71 años. Las variables clínico-patológicas de la población se muestran en la tabla I, II y III.

Se realizó el estudio de la MSI en 350 pacientes y la determinación de la mutación del gen *BRAF* en 324 pacientes. Se observó un 3,7% (12 casos) de mutaciones en el gen *BRAF*, en todos los casos fueron V599E. Se realizó el estudio de la metilación del promotor

del gen reparador hMLH1 en 61 pacientes (en todos los que presentaban MSI-L o MSI-H y/o mutación en *BRAF*) y se observó metilación total del gen en 30 pacientes (49,2%), metilación parcial en 11 (18,0%) y ausencia en 20 pacientes (32,8%). Presentaban metilación (total o parcial) 41 pacientes (67,2%). Se detectó actividad telomerasa positiva en el 92,8% de los pacientes estudiados.

Las alteraciones de *BRAF* se relacionaban con la localización del tumor, las mutaciones de *BRAF* únicamente se observaban en los cánceres de colon y no se vio ninguna en tumores de recto ( $P=0,002$ ).

La relación de la metilación del promotor con las variables clínico-patológicas se resume en la tabla II. La metilación total del promotor era más frecuente en los tumores localizados en colon proximal ( $P=0,002$ ). Con respecto al tipo histológico, el 100% de los tumores mucinosos presentaban metilación total ( $P=0,01$ ).

La actividad de la telomerasa se relacionaba con el estadio de Dukes. Los pacientes en estadio A presentaban un menor porcentaje de positividad que los estadios B, C y D ( $P=0,001$ ). Los tumores localizados en colon presentaban mayor porcentaje de positividad que los localizados en recto ( $P=0,09$ ).

La relación entre la alteración genética de *BRAF* y la actividad telomerasa se muestra en la tabla IV. Todos los pacientes con mutación de *BRAF* presentaban metilación de hMLH1 (tabla V).

## Evolución postoperatoria.

### Estudio de la supervivencia global

La mediana del tiempo de seguimiento de nuestro estudio fue de 43 meses (3 años), con un intervalo intercuartílico entre 27 y 63 meses. En nuestra población de pacientes la SG a los 43 meses fue del 68,9%. Todos los análisis de supervivencia quedan referidos a nuestra mediana de seguimiento.

El análisis univariante de la SG se muestra en la tabla VI. En el análisis estratificado de las variables con respecto a la metilación de hMLH1, en el estadio D de Dukes, la SG de los pacientes con metilación total fue del 80% y con parcial o ausencia de metilación del 0% ( $P=0,009$ ).

Las alteraciones de *BRAF* y de *hMLH1* no inflúan en la SG de nuestra población de pacientes. Respecto a la actividad telomerasa, ninguno de los pacientes con telomerasa negativa falleció durante el seguimiento ( $P=0,04$ ). En el análisis estratificado de la SG de las variables clínico-patológicas con respecto a las dos alteraciones genéticas estudiadas no se observaron diferencias significativas en los diferentes estratos.

En el análisis multivariante, los pacientes con mutación de *BRAF* presentaban un incremento del 62% del riesgo de fallecer, aunque esta relación no es estadísticamente significativa ( $P=0,38$ ).

## DISCUSIÓN

En nuestro estudio, la mutación del gen *BRAF* se observa en el 3,7% de los tumores colorrectales estudiados, siendo en todos los casos del tipo V599E; hecho que ya ha sido descrito con anterioridad en este tipo de carcinomas (5). Algunos autores han sugerido que la alteración de este gen podría tratarse de un mecanismo alternativo a las mutaciones de *K-ras* en la tumorigénesis CCR (4,5). Realizamos la determinación de la metilación del promotor del gen *hMLH1* en los tumores que presentaban MSI y/o alteración de *BRAF*. En los tumores MSI debido a que el gen reparador

**Tabla I.** Variables clínico-patológicas de los pacientes con carcinoma colorrectal. Relación de la alteración genética de BRAF con estas variables

Variable	(%)	BRAF		P
		Mutado (%)	Normal (%)	
Sexo	Hombres: 52,1	2,9	97,1	0,55
	Mujeres: 47,9	4,6	95,4	
Edad	≥ 71 años: 51,6	4,2	95,8	0,77
	< 71 años: 48,4	3,2	96,8	
Dukes	A+B: 51,3	3,0	97,0	0,58
	C: 25,9	4,9	95,1	
	D: 22,8	3,9	96,1	
Localización tumor	Colon: 59,8	6,2	93,8	<b>0,002</b>
	Recto: 40,2	0	100	
Localización en Colon	Proximal: 105	11 (11,8)	82 (88,2)	<b>0,002</b>
	Distal: 105	1 (1,0)	101 (99,0)	
Grado	I: 73,7	3,0	97,0	0,20
	II: 19,9	7,0	93,0	
	III: 6,4	6,3	93,8	
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 92,9	3,3	96,7	0,19
	Mucoide: 7,1	9,1	90,9	

Significación estadística:  $P < 0,05$ **Tabla II.** Relación de la metilación de hMLH1 con las variables clínico-patológicas de interés en el carcinoma colorrectal

Variable	(%)	Metilación			P
		Total (%)	Parcial (%)	No (%)	
Sexo	Hombres	42,9	17,9	39,3	0,30
	Mujeres	54,5	18,2	27,3	
Edad	≥ 71 años	50,0	22,2	27,8	0,54
	< 71 años	48,0	12,0	40,0	
Dukes	A+B	40,6	25,0	34,4	0,29
	C	57,9	5,3	36,8	
	D	60,0	20,0	20,0	
Localización del tumor	Colon	54,5	20,5	25,0	<b>0,06</b>
	Recto	35,3	11,8	52,9	
Localización en Colon	Proximal	64,5	25,8	9,7	<b>0,002</b>
	Distal	30,8	7,7	61,5	
Grado	I	46,2	15,4	38,5	0,65
	II	70,0	20,0	10,0	
	III	42,9	14,3	42,9	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	43,6	20,0	36,4	<b>0,01</b>
	Mucoide	100	0	0	

Significación estadística:  $P < 0,05$ 

*hMLH1* es el que con mayor frecuencia se altera en esta vía y en los tumores con alteración de *BRAF* porque el grupo de Koinuma et al asociaron la alteración de dicho gen a la metilación de *hMLH1* (4). Detectamos que en el 100% de los carcinomas con mutación de *BRAF* existe metilación de *hMLH1*. Samowitz et al, han especulado recientemente sobre el hecho de que existen tumores colorrectales MSI que presentan frecuentemente mutaciones en *BRAF* y fenotipo metilador (CIMP), que incluye la metilación del promotor de *hMLH1* (11). Según el grupo de Domingo la inactivación de *hMLH1* por metilación se relaciona con la activación de *BRAF*, sugiriendo que modulaciones específicas de la vía RAS/RAF pueden ocurrir dependiendo del estado de metilación de *hMLH1* en CCR (12).

La metilación del promotor es característica de los carcinomas localizados en colon proximal y es la clave, según Miyakura et al, para entender por qué los tumores con inestabilidad son más frecuentes en esta localización (13). En nuestro trabajo, las alteraciones genéticas estudiadas son más frecuentes en los tumores de colon proximal y parece claro que los tumores localizados en el recto no se desarrollan a partir de la vía genética con alteración del gen *BRAF*.

En nuestro estudio la mutación del gen *BRAF* no presenta significación estadística en su relación con el pronóstico debido al escaso tamaño muestral de la población con esta alteración genética; pero, se observa mayor riesgo de fallecer en los pacientes con esta mutación. Samowitz et al, en su estudio observan un peor pronós-

**Tabla III.** Relación de la actividad telomerasa con las variables clínico-patológicas de interés en el carcinoma colorrectal

Variable	(%)	Telomerasa		P
		Positiva (%)	Negativa (%)	
Sexo	Hombres	90,2	9,8	0,44
	Mujeres	95,7	4,3	
Edad	≥ 71 años	94,0	6,0	0,70
	< 71 años	91,5	8,5	
Dukes	A+B	89,4	10,6	0,13
	C	92,3	7,7	
	D	100	0	
Localización tumor	Colon	95,7	4,3	0,09
	Recto	85,2	14,8	
Localización en Colon	Proximal	91,9	8,1	<b>0,04</b>
	Distal	100	0	
Grado	I + II	93,1	6,9	1,00
	III	92,9	7,1	
	Tipo histológico	Adenocarcinoma	92,0	
	Mucoide	100	0	

Significación estadística:  $P < 0,05$

**Tabla IV.** Relación entre la alteración genética de BRAF y la actividad telomerasa

Telomerasa	BRAF-M (%)	BRAF-N (%)	P
Positiva	6,7	93,3	0,48
Negativa	0	100	

BRAF-M: BRAF mutado. BRAF-N: BRAF normal Significación estadística:  $P < 0,05$

**Tabla V.** Relación entre la alteración genética de BRAF y la metilación del promotor del gen hMLHI

BRAF	hMLHI Metilado (%)	hMLHI No Metilado (%)	P
Mutado	100	0	<b>0,002</b>
Normal	51,3	48,7	

Significación estadística:  $P < 0,05$

tico en los pacientes con tumores MSS y mutación de BRAF, pero no ocurre lo mismo en los tumores MSI, en los cuales el pronóstico es excelente, independientemente de la alteración genética de BRAF (11). La hipótesis de este grupo es que no es la mutación en sí la que confiere mal pronóstico sino que la mutación presenta diferentes efectos dependiendo del tipo de vía genética en la que se produzca.

Independientemente, de las distintas alteraciones genéticas que se sucedan en la tumorigénesis, es necesario que se perpetúe indefinidamente el ciclo celular. Para mantener esta proliferación descontrolada, la célula tumoral presenta frecuentemente activación de la enzima telomerasa. En nuestro estudio se detectó telomerasa positiva en el 92,8% de los tumores.

Aunque la actividad de la telomerasa es el mecanismo más frecuente de inmortalización celular en la transformación neoplásica, existe un segundo mecanismo descrito que es la vía ALT. Las células con activación de ALT recombinan críticamente los telómeros cortos para mantener la proliferación celular (14). Las proteínas MMR inhiben la recombinación homóloga entre secuencias que se han unido de forma incorrecta, por ello defectos en el sistema MMR aumenta la recombinación homóloga entre secuen-

**Tabla VI.** Análisis univariante de la supervivencia global a los 43 meses en relación con las variables clínico-patológicas de los pacientes con carcinoma colorrectal

Variable	Categorías	SG (43 m) (%)	HR*	IC 95%	P
Sexo	Hombres	65	1,28	0,87-1,90	0,20
	Mujeres	72			
Edad	≥ 71 años	67	1,22	0,82-1,80	0,31
	< 71 años	70			
Dukes	A+B	92	5,61	2,83-11,10	<b>&lt;0,0001</b>
	C	67			
	D	18			
Localización del tumor	Colon	67	1,39	0,93-2,07	0,10
	Recto	71			
Localizados en Colon	Proximal	62	1,39	0,84-2,27	0,18
	Distal	72			
Grado	I	71	1,72	1,04-2,85	<b>0,02</b>
	II	63			
	III	40			
Tipo histológico	Adenocarcinoma	69	2	0,90-3,33	0,13
	Mucoide	57			
BRAF	Mutado	41	1,09	0,34-3,45	0,87
	Normal	68			
hMLHI	Metilado	81	2,04	0,38-10,85	0,72
	Parcialmente No metilado	43			
Telomerasa	Positiva	75	1,11	0,29-4,13	<b>0,05</b>
	Negativa	67			
		100			

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%. Significación estadística:  $P < 0,05$ . \* Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.



cias divergentes (15). Rizki et al demostraron que la pérdida de función del sistema MMR promueve la proliferación en ausencia de actividad telomerasa (16). Bechter et al mostraron en líneas celulares de cáncer de colon que existe inhibición de la telomerasa y activación de la vía ALT cuando existen mutaciones en el sistema MMR (17).

Cerone et al, sin embargo, adujeron que existen evidencias que sugieren que algunos tumores pueden presentar activación de la vía ALT, incluso en presencia de actividad telomerasa, lo cual significa que ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes (18). Se ha observado que las células ALT presentan un menor potencial tumorigénico que las células telomerasa positivas (19). Bechter et al, observan que la vía ALT, al menos en algunas líneas celulares, no sustituye funcionalmente a la telomerasa en la proliferación neoplásica y su potencial metastásico (17).

En nuestra población de pacientes la SG de aquellos que no tienen activada la enzima telomerasa es del 100%. Estos resultados coinciden con el trabajo publicado por Tatsumoto et al (8), en el que observan una menor SG con alta actividad de la enzima.

En nuestro estudio los pacientes sin actividad telomerasa no presentan alteraciones del gen *BRAF*. Esto hace suponer que la vía ALT de proliferación celular se relaciona con la ausencia de alteraciones en *BRAF*, ambos sucesos relacionados con un mejor pronóstico en los pacientes con CCR en nuestro estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
2. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.
3. Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 87: 1197-202.
4. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2004; 108: 237-42.
5. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418: 934.
6. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-9.
7. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 2000; 26: 447-50.
8. Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsura Y, et al. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2696-701.
9. Kawanishi-Tabata R, López F, Tratantonió S, Kim N, Goldblum J, Tubbs R, et al. Telomerase activity in stage II colorectal carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 1834-39.
10. Ulaner GA. Telomere maintenance in clinical medicine. *Am J Med* 2004; 117: 262-9.
11. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 6063-9.
12. Domingo E, Espín E, Armengol M, Oliveira C, Pinto M, Duval A, et al. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes, Chromosomes Cancer* 2004; 39: 138-42.
13. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, et al. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2001; 121: 1300-9.
14. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 1997; 3: 1271-4.
15. Elliott B, Jasin M. Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2671-82.
16. Rizki A, Lundblad V. Defects in mismatch repair promote telomerase-independent proliferation. *Nature* 2001; 411: 713-6.
17. Bechter OE, Zou Y, Walker W, Wright WE, Shay JW. Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. *Cancer Res* 2004; 64: 3444-51.
18. Cerone MA, Londono-Vallejo JA, Bacchetti S. Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1945-52.
19. Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, Banner EN, Lundberg AS, Modha P, et al. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12606-11.

### Correspondencia

Dra. M<sup>a</sup> Luisa Maestro de las Casas  
Servicio de Análisis Clínicos  
Hospital Clínico San Carlos  
C/ Martín Lagos s/n  
28040 Madrid  
mmaestro.hcsc@salud.madrid.org