

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Medicina

**IMPACTE DE LES MUTACIONS DEL GEN KRAS EN
PACIENTS AFECTES DE CARCINOMA NO MICROCÍTIC DE
PULMÓ ESTADI IV I LA SEVA RELACIÓ AMB ALTRES
BIOMARCADORS**

TREBALL DE RECERCA

Convocatòria setembre de 2011

Autora: Laia Capdevila i Riera

Director: Rafael Rosell i Costa

Certificat del Director del Treball de Recerca

El Dr. Rafael Rosell Costa, Professor associat del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, amb exercici a la Unitat Docent de l'hospital Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona) i Cap de Servei d'Oncologia Mèdica del mateix hospital,

FA CONSTAR,

que el treball titulat "IMPACTE DE LES MUTACIONS DEL GEN KRAS EN PACIENTS AFECTES DE CARCINOMA NO MICROCÍTIC DE PULMÓ ESTADI IV I LA SEVA RELACIÓ AMB ALTRES BIOMARCADORS" ha estat realitzat sota la meva direcció per la llicenciada, Laia Capdevila Riera, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball de investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorar en Medicina Interna (curs 2010/2011), a la convocatòria de setembre.

Barcelona, a vint-i-cinc d'agost de dos mil onze.

ÍNDEX

Acrònims	1
Resum	2
1. Introducció	3
1.1 Biologia molecular del càncer de pulmó.....	6
1.1.1 Via de senyalització de l'EGFR	6
1.1.2 Família del RAS	9
1.1.3 BRCA1 i RAP80	12
2. Objectius	15
3. Material i Mètodes	16
3.1 Anàlisis de l'estat mutacional EGFR, KRAS, RAP80 i BRCA1.....	20
3.2 Anàlisis estadístic	21
4. Resultats	22
4.1 Població	22
4.2 Resultats Moleculars	24
4.3 Resposta a la Quimioteràpia	25
4.4 Temps fins a la progressió	26
4.5 Supervivència Global	28
5. Discussió	32
6. Conclusions	38
7. Bibliografia	39
8. Agraïments	44

Acrònims

BRCA1 (Breast Cancer 1): Càncer de mama 1

DNA (Deoxyribonucleic acid): Àcid desoxiribonuclèic

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor): Receptor del factor de creixement epidèrmic

GF (Growth Factor): Factor de creixement

MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint 1): Mediator del lloc de control de danys en l'ADN 1

ME: Malaltia estable

NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer): Carcinoma de pulmó no cèl·lula petita

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa

PM: Progressió de la malaltia

PS (Performance Status): Estat funcional

RAP 80 (Receptor-associated protein 80): Receptor associat a la proteïna 80

RC: Resposta completa

RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors): Criteris d'avaluació de resposta en tumors sòlids

RNA (Ribonucleic acid): Àcid ribonucleic

RP: Resposta parcial

SCLC (Small Cell Lung Cancer): Carcinoma de cèl·lula petita

SG: Supervivència global

TTP: Temps fins a la progressió

TF: Factor de transcripció

Resum

El càncer de pulmó és la principal causa de mort per càncer, estudiar les vies implicades en la tumorigènesis ens aproximarà en la seva curació. La presència de la mutació KRAS en pacients diagnosticats d'un carcinoma de pulmó no cèl·lula petita (NSCLC) estadi IV ocorre en un 15-25% i està associada a mal pronòstic. El paper d'aquesta mutació és poc coneguda. Estudis recents suggereixen que les mutacions de KRAS són predictors negatius de resposta a la quimioteràpia i a les teràpies dirigides anti-EGFR.

Hem analitzat la mutació de KRAS i els seus subtipus, la mutació d'EGFR i els nivells BRCA1 i RAP80 en les mostres tumorals de 114 pacients diagnosticats d'un NSCLC estadi IV entre agost 2009 i gener 2011.

Un 21,9% dels pacients presentaren la mutació de KRAS. El subtipus de mutació KRAS més freqüent va ser G12C (44%). Dels pacients tractats amb quimioteràpia s'obtingueren un 4,8% de respostes completes, un 14,3% de resposta parcial, un 9,5% de malaltia estable i un 47,6% presentaren progressió de la malaltia. El Temps fins a la Progressió (TTP) va ser de 4 mesos i la Supervivència Global (SG) va ser de 20 mesos. S'observà una tendència significativa a menor TTP i major SG acord amb el Performance Status (PS) i els nivells de RAP 80. Els pacients amb la mutació KRAS-G12C presentaren una tendència no significativa a major SG respecte els altres .

En conclusió, la presència de KRAS és un factor predictiu negatiu de resposta, entre els seus subtipus la G12C sembla tenir una major SG. El PS i els nivells de RAP80 són variables associades al TTP i SG.

1. Introducció

Theodor Boveri va anunciar al 1914 el principi bàsic de la carcinogènesis al reconèixer que el defecte fonamental que condueix al desenvolupament del càncer resideix en el material genètic de la cèl·lula.

El càncer és una malaltia genètica complexa provocada per l'alteració en l'expressió dels gens cel·lulars de forma acumulativa i seqüencial, on les cèl·lules normals es transformen en cèl·lules tumorals. La característica fonamental de la cèl·lula tumoral és que perd la funció habitual que realitza una cèl·lula sana en un determinat òrgan, dividint-se de forma progressiva, accelerada i sense límit, donat que ha perdut una de les característiques que tenen les cèl·lules normals, la mort cel·lular programada. En aquest augment progressiu de cèl·lules tumorals, les cèl·lules filles es van indiferenciant cada vegada més i adquireixen transformacions genètiques que augmenten el seu potencial maligne i són capaces d'envair tant a nivell local com d'infiltrar microvasos limfàtics i sanguinis, donant lloc a la invasió de ganglis limfàtics i òrgans, provocant metàstasis a distància. El desenvolupament d'un tumor maligne requereix interaccions complexes entre factors exògens i endògens; el càncer es deu a l'acció d'agents externs que alteren els gens o a errors en els processos cel·lulars intrínsecs. Els carcinògens són els agents que causen mutacions en protooncogens, gens supressors i gens reparadors del DNA.

El càncer de pulmó és la principal causa de mort per càncer a tot el món amb més d'un milió de morts per any (30% morts per càncer en homes i 26% en dones). La supervivència global a 5 anys dels pacients amb malaltia metastàtica és inferior al 15%.

La principal causa d'aquest mal pronòstic és el retràs al diagnòstic, un factor determinant de la supervivència és l'estadi en el moment del diagnòstic. Tot i això, la supervivència dels pacients tractats de forma regular amb quimioteràpia ha augmentat en els últims anys. A Espanya, són diagnosticats anualment uns 20.000 casos, el que representa el 18,4% dels tumors entre els homes (18.000 casos) i el 3,2% entre les dones (2.000 casos).

El NSCLC és el grup més freqüent afectant al 85% dels tumors de pulmó i s'originen en les cèl·lules epitelials. És un grup molt heterogeni ja que el confereixen tres subtipus histològics: carcinoma escamós, adenocarcinoma, carcinoma de cèl·lules grans.

La localització i la mida del tumor, la presència o absència de disseminació limfàtica o a altres localitzacions determinen l'estadiatge del càncer de pulmó. En l'estadi I, el tumor no s'ha disseminat a cap gangli limfàtic, en l'estadi II, pot haver envaït ganglis limfàtics veïns al pulmó afectat; ambdós estadis permeten la seva extirpació quirúrgica. A l'estadi III, el càncer pot haver disseminat als ganglis limfàtics de dins el tòrax que estan fora del pulmó, o bé a estructures vitals del tòrax com el cor, vasos sanguinis majors, vèrtebres, esòfag o vies respiratòries principals que condueixen als pulmons, en aquesta situació és menys probable que el cirurgià pugui extirpar tot el càncer, i moltes vegades és precís fer un tractament previ per intentar fer operable el tumor o un tractament radical com la quimioradioteràpia. L'estadi IV és l'estadi en el qual el càncer s'ha disseminat a diferents lòbuls del pulmó o a diferents territoris del cos via torrent sanguini. Una vegada a la sang, les cèl·lules tumorals es disseminen a qualsevol part del cos, tot i que presenten una tendència a disseminar-se al cervell, ós,

fetge, glàndules suprarenals. Habitualment quan es diagnostica la malaltia en aquest últim estadi el tractament és pal·liatiu i està basat en la quimioteràpia.

La majoria dels subtipus histològics del càncer de pulmó estan associats al tabaquisme, encara que l'associació és major en SCLC i els carcinomes escamosos. El tabac és amb diferència el factor de risc més important en el càncer de pulmó (10-20 vegades més de risc de càncer en pacients fumadors comparat amb els no fumadors). Varis estudis epidemiològics han identificat altres factors ambientals (asbest, radó...), genètics, hormonals i virals associats al risc de càncer de pulmó, tot i aquests últims tenen una menor relació causal.

Els símptomes més freqüents d'aquesta entitat són la tos seca o amb esputs, hemoptisis, l'astènia, l'anorèxia, la dispnea i el dolor. Sovint els pacients no presenten símptomes i el càncer de pulmó es detecta en una radiografia realitzada per altres motius.

La biòpsia és la única prova que ens confirma el diagnòstic. Tot i això, es realitzen varis procediments o exploracions complementàries per determinar l'extensió de la malaltia i establir un bon diagnòstic.

El tractament del NSCLC estadi IV, es basa amb la quimioteràpia que ha demostrat augmentar la supervivència i millorar la qualitat de vida. Aquests objectius s'aconsegueixen disminuint el tamany tumoral i impedit la disseminació. És difícil que la quimioteràpia elimini per complet el càncer de pulmó disseminat, o si ho fa probablement reapareixerà en el temps. Per tant, els pacients afectats d'un tumor de pulmó estadi IV no es poden considerar curats, independentment de l'èxit de la

quimioteràpia. Tot i l'heterogenicitat del grup NSCLC, fins fa poc es tractava com una malaltia única. El maneig terapèutic era determinat per l'estadiatge i es basava un doblet de quimioteràpia basada en platí. Avui dia, ja es parla de diferents subcategories en funció de criteris moleculars i en els assajos clínics cada vegada més es prova el nou agent quimioteràpic en funció de la biologia molecular del tumor. Una de les estratègies de tractament més prometedora, és el descobriment de mutacions específiques en els gens que codifiquen proteïnes de senyalització, crucials per a la proliferació cel·lular i la supervivència. Fàrmacs dirigits a l'activitat d'aquestes proteïnes mutants poden conduir a la mort cel·lular i el benefici terapèutic. Cada vegada més, es tendeix a confeccionar estratègies de tractament més individualitzat.

1.1.- Biologia Molecular Del Càncer De Pulmó

Els últims estudis d'epidemiologia molecular han contribuït en la descripció de les vies de tumorigènesis pulmonar. S'han descobert múltiples vies i múltiples agents implicats en el desenvolupament tumoral. Entre les vies de senyalització i alteracions més freqüents ens centrarem en l'anàlisi del EGFR, KRAS, BRCA1, RAP80.

1.1.1.- Via de senyalització de l'EGFR (epidermal growth factor receptor)

La proteïna EGFR pertany a la família dels receptors de tiroisin-quinasa i és sobreexpressada en molts càncers, incloent en més d'un 50% el càncer de pulmó. De la unió amb el seu lligant, la forma homodímer del EGFR s'heterodimeritza i s'inicia la

cascada de senyalització, produint l'activació de la senyal anti-apoptòtica, proliferació, angiogènesis, invasió i metàstasi.

Aquests efectes es produeixen a través de tres camins (fig.1):

1. *Via de l'Akt*: provoca la inhibició de la apoptosi.
2. *Via del Ras*: provoca un augment de proliferació.
3. *Via de senyalització STAT*: estimula la transcripció de gens i la proliferació cel·lular, mediador de la supervivència cel·lular.

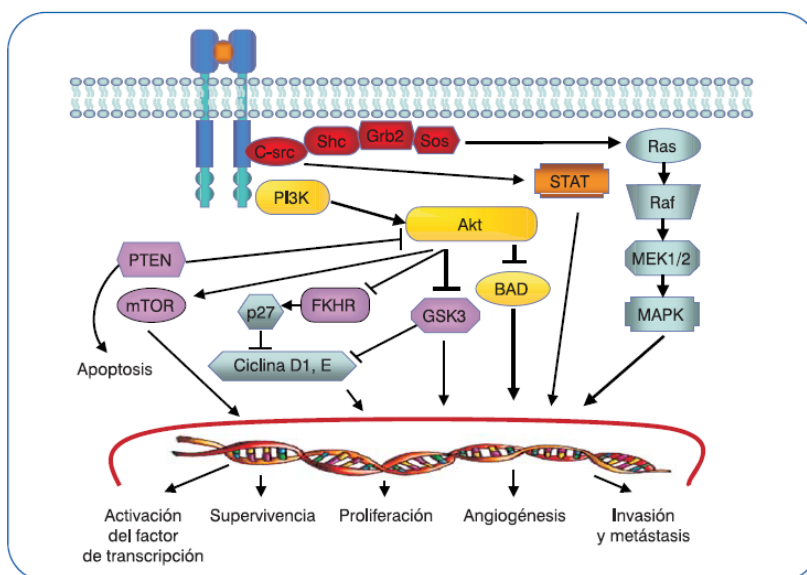


Fig.1. Via de senyalització de EGFR

El procés de senyalització cel·lular es desencadena quan una molècula inductora, com un factor de creixement (GF), s'uneix al seu receptor enzimàtic. Això comporta que la forma homodímer de l'EGFR s'heterodimeritza i es produeixi la fosforilació del domini citoplasmàtic. Si analitzem la via del Ras (fig.2), el receptor fosforilat s'uneix a una

petita proteïna adaptadora Grb2 activant-la, fet que provoca la unió del factor d'intercanvi de guanidilnucleotids SOS. La petita proteïna G Ras s'uneix a la membrana plasmàtica per acció del complex Grb2-SOS. La proteïna Ras s'activa mitjançant la alliberació de la molècula de GDP unida, intercanviant-la per una molècula de GTP. La forma activa de Ras (amb la unió de GTP) fosforila i activa a la proteïna Raf, la qual fosforila i activa a la proteïna MEK, que fosforila i activa a MAP quinasa (ERK). ERK activada va al nucli cel·lular, on fosforila als factors de transcripció (TF) del gen.

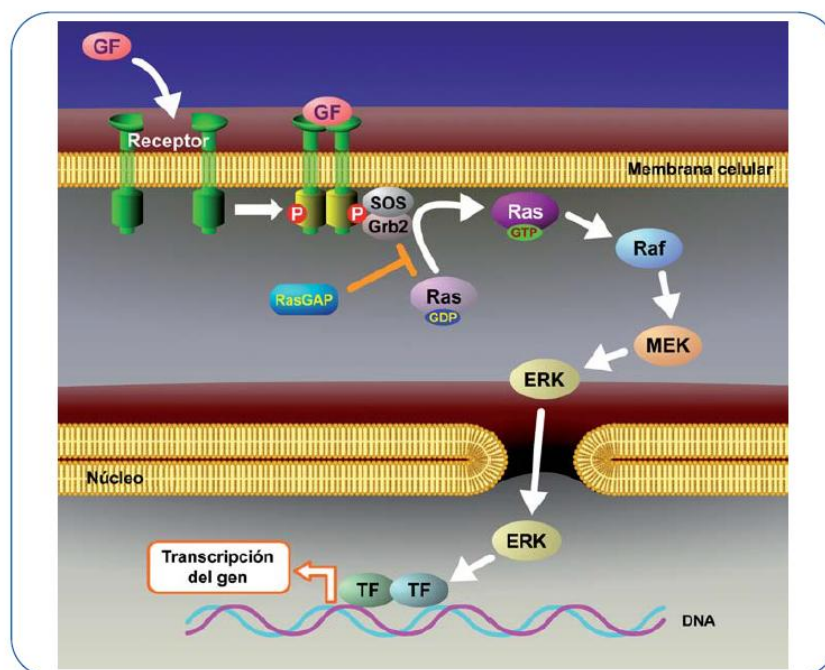


Fig.2 Via RAS de la cascada de senyalització EGFR

Les mutacions en el gen EGFR es troben en un 15% dels tumors NSCLC. El 90% de les mutacions de EGFR són delecions (exó 19) o substitucions (exó 21). Són més freqüents en dones, histologia no escamosa (sobretot en adenocarcinomes), no fumadors i d'ètnia asiàtica. Varis estudis han demostrat l'associació d'aquestes mutacions amb la resposta a fàrmacs inhibidors de la tirosin-quinasa com erlotinib i gefitinib [1].

1.1.2.- Família RAS

Les proteïnes RAS són citoplasmàtiques i pertanyen a la família de les proteïnes G. La funció d'aquestes està caracteritzada per la seva capacitat de transducció de la senyal mitogènica extracel·lular cap a la regió intracel·lular mitjançant la unió amb GTP-GDP (forma activa i inactiva de la senyal, respectivament). L'activació de la proteïna RAS provoca proliferació cel·lular a través de la cascada de senyalització de la via EGFR. Mutacions simples en codons 12, 13 i 61 afecten als aminoàcids que intervenen en el canvi GDP-GTP i per tant, en la senyal mitogènica intervinguda per RAS. Al 1982, es van descriure per primera vegada els 3 protooncogens del RAS: H-ras (cromosoma 11p 15.5), N-ras (cromosoma 1p13.2) i K-ras (cromosoma 12p 12.2).

KRAS codifica una proteïna que s'uneix als nucleòtids de guanina. Les mutacions en KRAS són les més freqüents, el mecanisme pel qual és produeixen són tranversions (substitució d'una pirimidina per una purina o viceversa) i de forma menys freqüent transicions (substitució d'una pirimidina per una pirimidina o d'una purina per una purina), sobretot en els codons 12 i 13. Dins d'aquest tipus de mutacions existeixen varis subtipus depenen del codó afectes i del tipus de mecanisme, les més freqüents:

- G12C: és el resultat d'un canvi d'aminoàcid en el codó 12, d'una glicina a una citosina, afecta un 42% dels subtipus de mutacions KRAS.
- G12A: substitució d'una glicina per una alanina en el codó 12, afecta un 7% dels subtipus de mutacions KRAS.

- G12V: substitució d'una glicina per una valina en el codó 12, afecta un 20% dels subtipus de KRAS.
- G12D: substitució d'una glicina per una àcid aspàrtic en el codó 12, afecta un 17% dels subtipus de KRAS.
- G13D: substitució d'una glicina per una àcid aspàrtic en el codó 13, afecta un 2% dels subtipus de KRAS.
- G13V: substitució d'una glicina per una valina en el codó 13, afecta un 2% dels subtipus de KRAS.

La mutació provoca inactivació de l'activitat GTPsa de la proteïna del RAS, i causa acumulació de la forma activa, això activa PI3K, MAPK, comportant així transformació maligna cel·lular. Es troben sobretot en pàncrees (70-90%), colon (50%), pulmó (30%), cap i coll (10%) i afecten en pacients fumadors i en el subtipus histològic adenocarcinomes [18, 30] .

Existeixen unes característiques en les mutacions de KRAS en el càncer de pulmó. La mutació de KRAS està limitada al NSCLC (sobretot adenocarcinomes), mai estan presents al SCLC. Epidemiològicament són mutacions més freqüents en dones, països de l'oest, molt associat a l'hàbit tabàquic, donat que els derivats nicotínics aminocetonitrosos del tabac són uns potents carcinògens i fàcilment indueixen mutacions KRAS associats a adenocarcinoma, sobretot a nivell del codó 12. Un meta-anàlisi incloent 881 casos de NSCLC suggereix que la presència de la mutació KRAS confereix un factor predictiu de mal pronòstic [2].

En la tumorigènesis del pulmó, l'activació conjunta de les dues vies de senyalització és redundat, per tant la presència de la mutació KRAS i EGFR són mútuament excloents; si trobem una mutació de KRAS el més comú es que sigui wild type per EGFR.

En el càncer de colon, on les mutacions de KRAS es troben en un 50%, s'ha demostrat que fàrmacs inhibidors del EGFR (Cetuximab i Panitumumab, anticossos que competeixen amb el lligant i eviten l'activació del receptor EGFR) aporten un benefici en aquells tumors wild type per KRAS. De totes maneres, la transposició d'aquest fet al NSCLC és un tema de debat. D'una banda, perquè tots els estudis prospectius (BR.21, SATURN, FLEX, BMS099, TRUST) no han establert una relació clara entre la mutació KRAS i la eficàcia dels inhibidors de EGFR (són estudis negatius). D'altra banda, la majoria de series de pacients NSCLC reporten la falta d'eficàcia dels inhibidors EGFR en cas de presentar la mutació KRAS [3]. Un recent meta-anàlisi que inclou a 17 assajos on s'avaluen els inhibidors de EGFR en NSCLC ha estimat que la presència de la mutació KRAS és un factor predictiu negatiu de sensibilitat a aquests inhibidors ($p=0.94$, IC 95% 0.89-0.97) [4].

1.1.3.- BRCA1 i RAP 80

El gen BRCA1 (breast cancer 1) localitzat al cromosoma 17 (17q21) codifica una proteïna nuclear que intervé en nombrosos processos cel·lulars entre ells, la reparació per edició de nucleòtids de DNA associada a la transcripció. Les mutacions d'aquest gen s'associen principalment en formes hereditàries de càncer de mama i ovari.

Estudis previs han mostrat que les cèl·lules deficientes en BRCA1 són hipersensibles al cisplatí. És important senyalar que nivells baixos de BRCA1 incrementen la citotoxicitat del cisplatí però confereixen resistència a paclitaxel i vinorelbina, mentre que s'observa el fenomen contrari quan els nivells de BRCA1 són alts. Per tant, BRCA1 podria ser un marcador predictiu de millor resposta a cisplatí.

RAP 80 (receptor associat a la proteïna 80), interactua amb receptors nuclears, els més coneguts el receptor d'estrògens i el receptor del factor nuclear germinal, modulant la transcripció d'aquests. En estudis recents, s'ha vist que també té activitat en la reparació del DNA.

La resposta a la quimioteràpia es basa en el fet que els gens de reparació del DNA requereixen una sèrie de passos de reconeixement molecular que permeten localitzar i aproximar-se a la lesió del DNA. La unió de la proteïna MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1) a la cua fosforilada de la histona H2AX (γ H2AX) facilita la formació de focus nuclears de BRCA1 en els trencaments bicatenaris induïts per la quimioteràpia. Mitjançant la dimerització amb la proteïna BARD1 a través del domini de l'anell, BRCA1 forma una ubiquïtina E3-ligasa. Recentment, s'ha vist que RAP 80 dirigeix la BRCA1-BARD1 E3-ligasa a proteïnes ubiquïtina unides a la lisina 63

dependent de MDC1- γ H2AX en el trencament bicatenari [fig.3]. Varis estudis han mostrat que l'abolició de RAP 80 disminueix la formació de focus induïts per BRCA1. Si RAP 80 està elevat, podria causar resistència a la quimioteràpia basada amb cisplatí, i per tant influenciar en la supervivència del pacient.

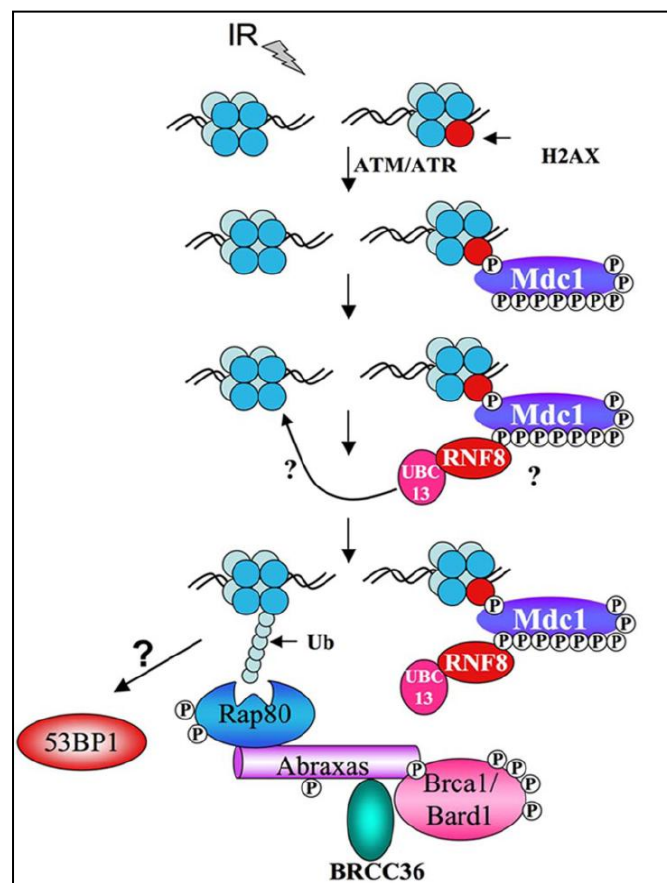


Fig.3 RAP80 i BRCA1 en la reparació DNA

El tractament del NSCLC continua sent un repte clínic. En els últims anys, hi ha hagut un considerable interès en desenvolupar nous agents per millorar el resultat dels pacients, centrant-se en nous fàrmacs que es dirigeixen específicament a les vies del factor de creixement que estan desregulades en les cèl·lules tumorals. Aquests

tractaments milloren la falta d'especificitat dels agents citotòxics tradicional al diferenciar entre cèl·lules malignes i no malignes, augmentant l'índex terapèutic i disminuint la toxicitat respecte tractaments convencionals.

Encara que el tractament principal dels estadis avançats de càncer de pulmó és la quimioteràpia, noves teràpies moleculars han demostrat benefici en estadis avançats. Determinar la biologia molecular de les mutacions de KRAS es necessari per identificar un subgrup de pacients que potser es pot beneficiar d'un tractament més dirigit i per tant més efectiu.

En el nostre centre i com a pràctica clínica habitual, realitzem a tot pacient afecte d'una neoplàsia de pulmó estai IV un estudi mutacional per identificar alteracions genètiques causants amb la finalitat de proporcionar el millor tractament i així millorar la seva supervivència. Sabem que les mutacions de KRAS són un factor predictiu negatiu. Entre els pacients portadors de la mutació KRAS, vam observar que hi havia un subgrup amb millor supervivència respecte la resta. Ens vàrem plantejar... *existeix algun factor epidemiològic o molecular que els diferenciï de la resta i els proporioni més sensibilitat als agents quimioteràpics i així una millor supervivència?*

2. Objectius

- Analitzar variables clíniques dels pacients portadors de la mutació KRAS.
- Corroborar en una població de pacients la distribució de la mutació del gen KRAS i els seus subtipus.
- Determinar si existeix associació entre la mutació KRAS i el PS, el sexe, el tabaquisme, EGFR, els nivells de BRCA i els de RAP80.
- Avaluat la supervivència global i el temps a la progressió de pacients KRAS mutats.

3. Material i Mètodes

S'inclogueren a l'estudi pacients diagnosticats de càncer de pulmó de cèl·lula no petita estadi IV del servei d'Oncologia Mèdica de l'hospital Germans Trias i Pujol- ICO Badalona, en un període comprès entre agost 2009 i gener 2011. S'analitzaren de forma retrospectiva i observacional un total de 114 mostres tumorals.

Les variables analitzades van ser :

- **Edat:** en el moment del diagnòstic.
- **Sexe:** home o dona.
- **Tabaquisme:**
 - *Fumador:* persona que consumeix tabac de forma habitual o ocasional (es registra per número paquets/any).
 - *Ex-fumador:* persona que no ha consumit tabac en els últims 6 mesos.
 - *No fumador:* persona que mai ha tingut exposició al tabac de forma activa i mantinguda.
- **PS:** en el moment del diagnòstic.

L'escala performance status consta de 5 nivells en els que es classifica al pacient segons les seves capacitats físiques des de la normalitat a la mort. Va ser publicada per primer cop al 1982 a l'American Journal of Clinical Oncology per MM. Oken dins el marc de l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). Posteriorment ha estat validada en diverses ocasions.

És una eina habitual en la pràctica clínica de l'oncologia per a una valoració objectiva de l'estat del pacient tant al diagnòstic com en l'evolució de la malaltia. S'utilitza com a guia per a la prescripció de tractaments quimioteràpics, per valoració de les seves toxicitats tant en l'assistència convencional, com dins d'assajos clínics i per determinar la necessitat de la limitació de l'esforç terapèutic i l'inici de les mesures simptomàtiques.

- *PS0*: asimptomàtic, amb activitat normal domèstica i laboral.
 - *PS1*: símptomes de la malaltia però autònom. Capaç de realitzar les seves activitats diàries però restringit a una activitat sedentària.
 - *PS2*: postrat o en repòs, menys del 50% del temps. Necessita assistència de forma ocasional.
 - *PS3*: postrat o en repòs més del 50% del temps. Necessita assistència parcial de la família o dels professionals sanitaris.
 - *PS4*: postrat el 100% del temps. Incapacitat total. Necessita assistència total de la família i dels professionals sanitaris.
- **Data del diagnòstic**: dia, mes i any del diagnòstic de la neoplàsia pulmonar.
 - **Data del diagnòstic de l'estadi IV**: dia, mes i any del diagnòstic de neoplàsia pulmonar estadi IV.
 - **Histologia**: qualsevol que pertanyi al grup NSCLC (carcinoma escamós, adenocarcinoma, carcinoma de cèl·lules grans).
 - **Tipus M1**: localització de les metàstasis.
 - **Número M1**: número d'òrgans afectes.
 - **EGFR**: estat mutacional del gen (del 19, 18, 20, 21; no amplificable; wild type).

- **RAP80:** nivells d'expressió (baixos, intermedis, alts, mostra insuficient).
- **BRCA:** nivells d'expressió (baixos, intermedis, alts, mostra insuficient).
- **KRAS:** tipus de mutació, codó 12 o 13.
- **Tipus KRAS:** subtipus de mutació (G12A, G12C, G12V, G12D, G13D, G13V).
- **Tipus tractament QT 1a línia:** fàrmacs administrats.
- **Inici 1r línia:** dia, mes i any de l'inici del tractament.
- **Fi 1r línia:** dia, mes i any de fi del tractament.
- **Tipus de resposta:** s'utilitzaren els criteris d'avaluació de resposta RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) [26], a partir de les imatges radiològiques per TAC o PET.
 - *Resposta Completa (RC):* desaparició de totes les lesions diana.
 - *Resposta Parcial (RP):* reducció d'almenys un 30% de la suma dels diàmetres de les lesions diana.
 - *Malaltia Estable (ME):* ni la suficient reducció per considerar-se RP ni el suficient increment com per considerar PM.
 - *Progressió de la malaltia (PM):* increment d'almenys un 20% en la suma dels diàmetres de les lesions diana.
- **Estat actual:** viu (data de l'última visita registrada) o èxitus.

De les variables anteriors es calcularen la supervivència global dels pacients i el temps lliure fins a la progressió de la malaltia, definits com:

Supervivència Global (SG): interval de temps transcorregut entre el diagnòstic de l'estadi IV i la data de l'última revisió o èxitus per qualsevol causa.

Temps fins a la progressió (TTP): temps definit com interval entre el diagnòstic histològic (que corresponia a la data de la biòpsia) i la progressió tumoral.

3.1.- Anàlisi De L'estat Mutacional EGFR i KRAS i Dels Nivells D'expressió RAP80 i BRCA1.

L'anàlisi de la mostra tumoral dels pacients es va realitzar al laboratori de biologia molecular del Servei Oncologia Hospital Germans Trias i Pujol.

Un cop obtinguda la mostra tumoral mitjançant una biòpsia, es fixa en formalina i se'n fa un bloc de parafina i laminetes amb tincions d'hematoxilina-eosina. El primer dia que la mostra arriba al laboratori es fa la recepció d'aquesta, anotant-hi la data de recepció i assignant-hi un codi per a cada pacient. El segon dia, el patòleg confirma la histologia tumoral, seguidament selecciona i delimita la zona de la mostra millor conservada d'on farà l'estudi. El tercer dia els tècnics de laboratori fan les disseccions del bloc de parafina i la microdissecció amb làser. El quart dia, es fa l'extracció de DNA per part del biòleg. En el cinquè i sisè dia, mitjançant la tècnica PCR obtenen pel gen KRAS la mutació del 12 o 13 i per l'EGFR la mutació del 19 (genscan E19), 21 (Taqman L858R), 20 (Taqman T790M). El dia següent la data manager reporta els resultats als investigadors.

En quan als nivells de RAP80 i BRCA1 el procediment és el mateix fins al tercer dia. El quart dia l'extracció per part del biòleg és de RNA. A través d'un conjunt de sondes i encebadors comercials capaços de determinar la seqüència i d'analitzar l'expressió d'RNA de BRCA1 i RAP80, es genera mitjançant la tècnica de PCR un producte. La quantificació d'aquest producte és un reflex dels nivells d'expressió d'aquests gens i es classifica segons els nivells en alts, intermedis, baixos, insuficients.

3.2.- Anàlisi Estadístic

Es realitzà un anàlisi descriptiu de les variables analitzades mitjançant estadístics per variables quantitatives: mitja, mitjana, màxim, mínim; i qualitatives: freqüències absolutes i relatives.

El test de Fisher i la prova de Chi quadrat es va utilitzar per avaluar l'associació entre variables categòriques. Per avaluar les variables quantitatives, s'utilitzà la t de Student.

La SG es va calcular segons el mètode de Kaplan-Meier i el de Long rank per objectivar diferències entre els diferents grups amb els seus intervals de confiança al 95%. Es considerà significació estadística quan hi havia un valor de $p < 0.05$.

L'anàlisi es dugué a terme utilitzant SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versió 17 per Windows.

4. Resultats

4.1.- Població

La mutació de KRAS es va identificar en 25 dels 114 pacients analitzats (21.9%). L'estudi minuciós es realitzà de la població mutada pel gen KRAS, tot seguit n'analitzarem les seves característiques (Taula 1). Els pacients tenien una mitjana d'edat de 59 anys, en quan al sexe 64% eren homes i un 37% dones. Pel que fa a l'hàbit tabàquic un 8% eren no fumadors, un 32% eren ex-fumadors i un 60% fumadors. Segons la histologia, un 72% de les mostres tumorals eren adenocarcinoma, un 12% carcinoma escamós, i un 8% carcinoma bronquioalveolar. Pel que fa al PS, el 44% presentaven un PS0, el 32% un PS1, i un 24%, PS2. La distribució de les localitzacions metastàsiques en el moment del diagnòstic de l'estadi IV va ser: 37.8% pulmó, 11.8% ganglionar, 11.8% sistema nerviós central i un 9.9% a l'ós. I en quan al número de localitzacions de metàstasis per pacient en el diagnòstic, la mitjana va ser de 2 (interval 1-4). En el moment de la progressió, la distribució de les metàstasis va ser per ordre de freqüència a nivell de pulmó, ganglis i ós.

Dels 25 pacients inclosos en l'anàlisi, 21 van ser tractats amb una primera línia de quimioteràpia basada en cisplatí (biteràpia), i els 4 pacients restants, dos no van arribar a rebre tractament i van morir al mes del diagnòstic i els altres dos van rebre una primera línia amb monoteràpia i sense platí per baix performance status.

Si analitzem els 21 pacients tractats amb quimioteràpia basada amb platí observem que la mitjana de cicles administrats va ser de tres (interval 1-20). Els esquemes de

tractament eren una biteràpia amb cisplatí i un segon fàrmac: pemetrexed (33,3%), gemcitabina (33,3%), docetaxel (23,8%), vinorelbina (4,8%), taxol (4,8%). A la progressió i com a segona línia de tractament, set pacients (33,3%) van ser inclosos en assajos clínics de teràpia dirigida per a pacients amb mutació de KRAS. En total, els pacients van rebre una mitjana de 2 línies de tractament (interval de 1-5).

Edat		59 (37-76)
Sexe		
	Homes	16 (64%)
	Dones	9 (36%)
Tabaquisme		
	Fumador	15 (60%)
	Ex-fumador	8 (32%)
	Mai fumador	2 (8%)
PS		
	0	11 (44%)
	1	8 (32%)
	≥ 2	6 (24%)
Histologia		
	Adenocarcinoma	18 (72%)
	Escamós	3 (12%)
	Bronquioalveolar	2 (8%)
	Altres	2 (8%)
Localitzacions M1		
	Pulmó	9 (37,8%)
	Ganglis limfàtics	3 (11,8%)
	SNC	3 (11,8%)
	Ós	2 (9,9%)
	Altres	8 (28,7%)

Taula 1. Característiques de la població

4.2.- Resultats Moleculars

D'entre els pacients portadors de la mutació KRAS, vam observar la següent distribució dels subtipus de mutació: G12C 44%, G12V 20%, G12A 16%, G12D 12%, G13D 4%, G13V 4%. La mutació EGFR era present en 1 pacient (4,3%). En quan als nivells d'expressió de BRCA, un 36% tenia nivells baixos, 4% nivells intermedis, 0% tenien nivells alts i un 32% nivells insuficients. Pel que fa a l'expressió de RAP80, un 4% tenia nivells baixos, 24% nivells intermedis, 12% nivells alts i un 32% mostra insuficient (Taula 2).

<u>KRAS subtipus</u>	
G12C	11 (44%)
G12V	5 (20%)
G12A	4 (16%)
G12D	3 (12%)
G13D	1 (4%)
G13V	1 (4%)
<u>EGFR</u>	
Wild type	24 (96%)
Mutation (Del21)	1 (4%)
<u>BRCA</u>	
Baixos	9 (36%)
Intermedis	1 (4%)
Alts	0 (0%)
Insuficients	8 (32%)
No determinat	7 (28%)
<u>RAP80</u>	
Baixos	1 (4%)
Intermedis	6 (24%)
Alts	3 (12%)
Insuficients	8 (32%)
No determinat	7 (28%)

Taula 2. Resultats moleculars

4.3.- Resposta a la Quimioteràpia

Analitzarem la resposta al tractament dels pacients portadors de la mutació KRAS tractats amb una primera línia de quimioteràpia basada en cisplatí (21/25).

Un 4,8% van assolir una resposta completa, un 14,3% una resposta parcial, un 9,5% malaltia estable i un 47,6% progressaren al tractament (Fig.4).

No s'observaren diferències significatives en quan a la resposta a la quimioteràpia.

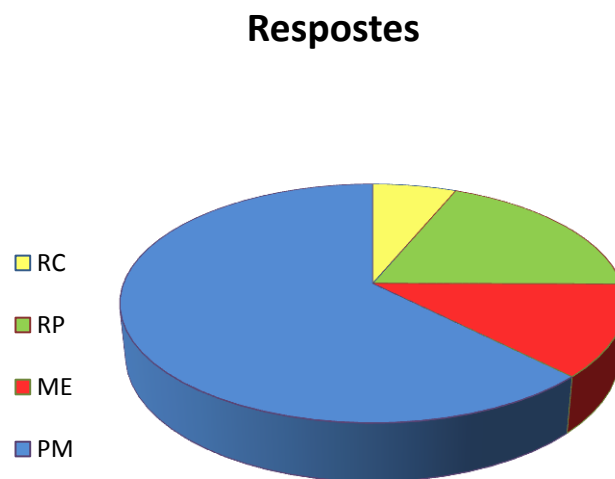
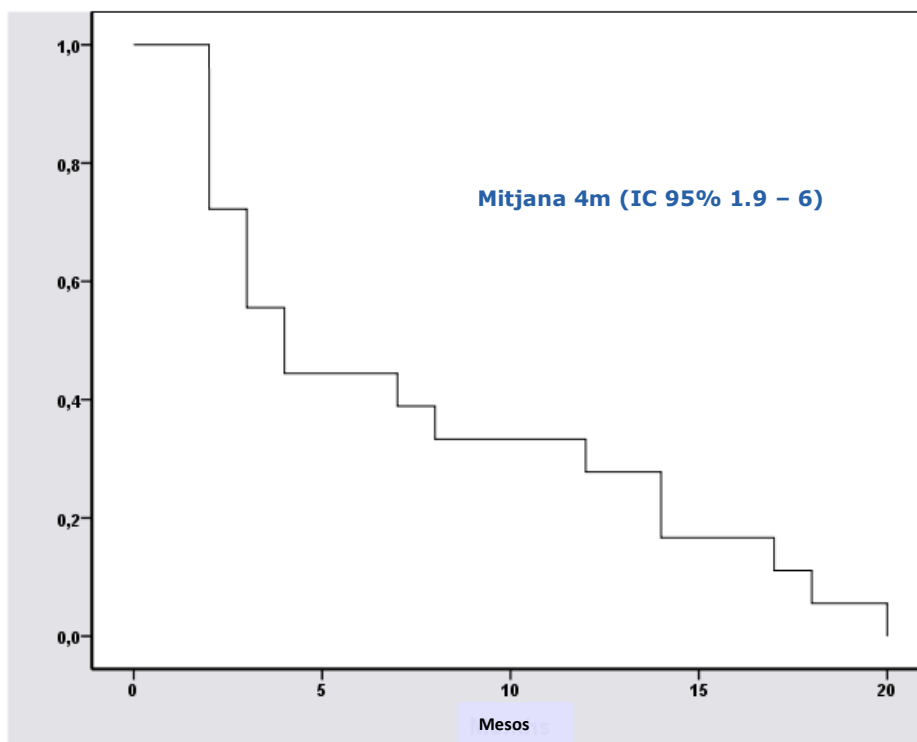


Fig. 4. Taxes de Resposta a la Quimioteràpia

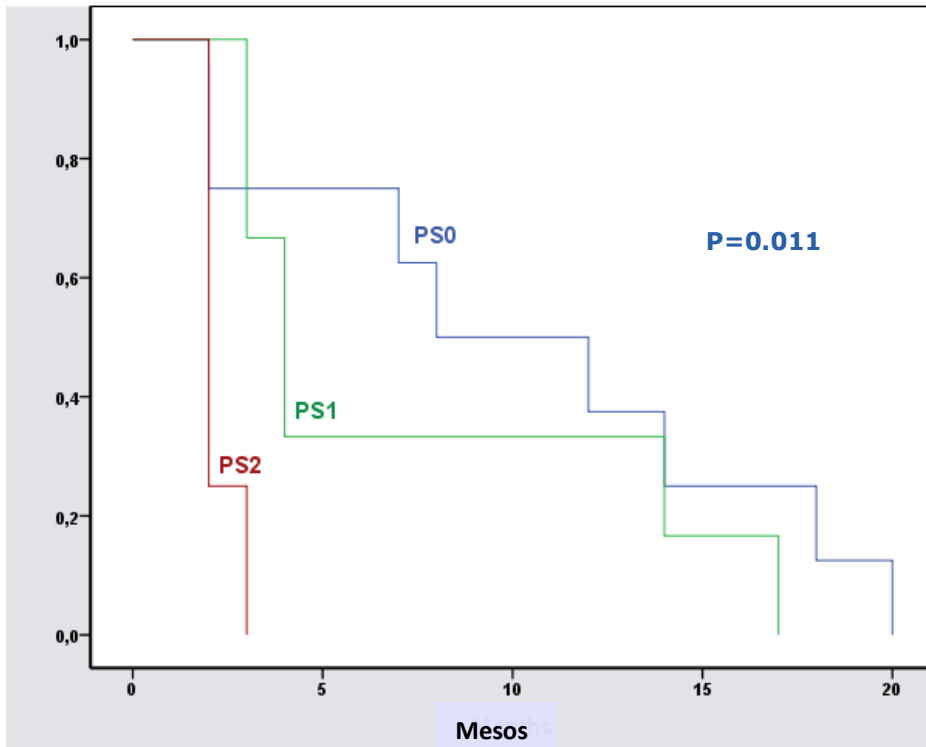
4.4.- Temps Fins a la Progressió

El temps a la progressió dels pacients amb mutació KRAS tractats amb una primera línia de quimioteràpia va ser de 4 mesos amb un interval de confiança del 95% d'entre 1.9 i 6 mesos (Gràfic 1).

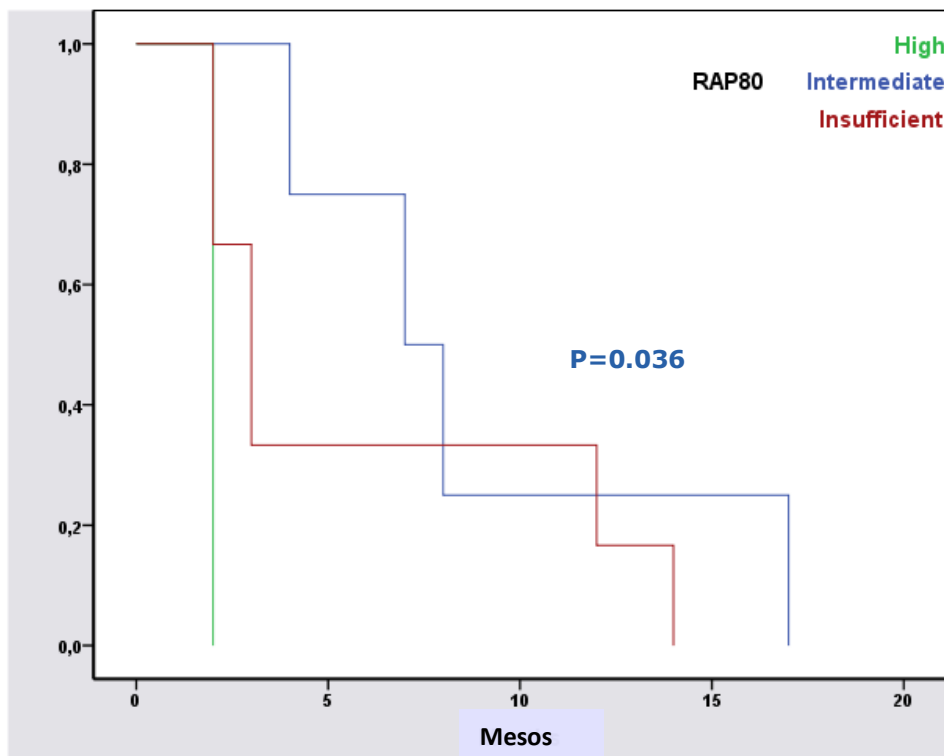


Gràfic 1. Temps fins a la progressió

S'observà una tendència significativa a menor TTP segons el PS ($p=0.011$) i els nivells de RAP 80 ($p=0.036$) (Gràfic 2 i 3). No s'observaren diferències entre TTP i sexe, hàbit tabàquic, subtipus KRAS, nivells de BRCA1.



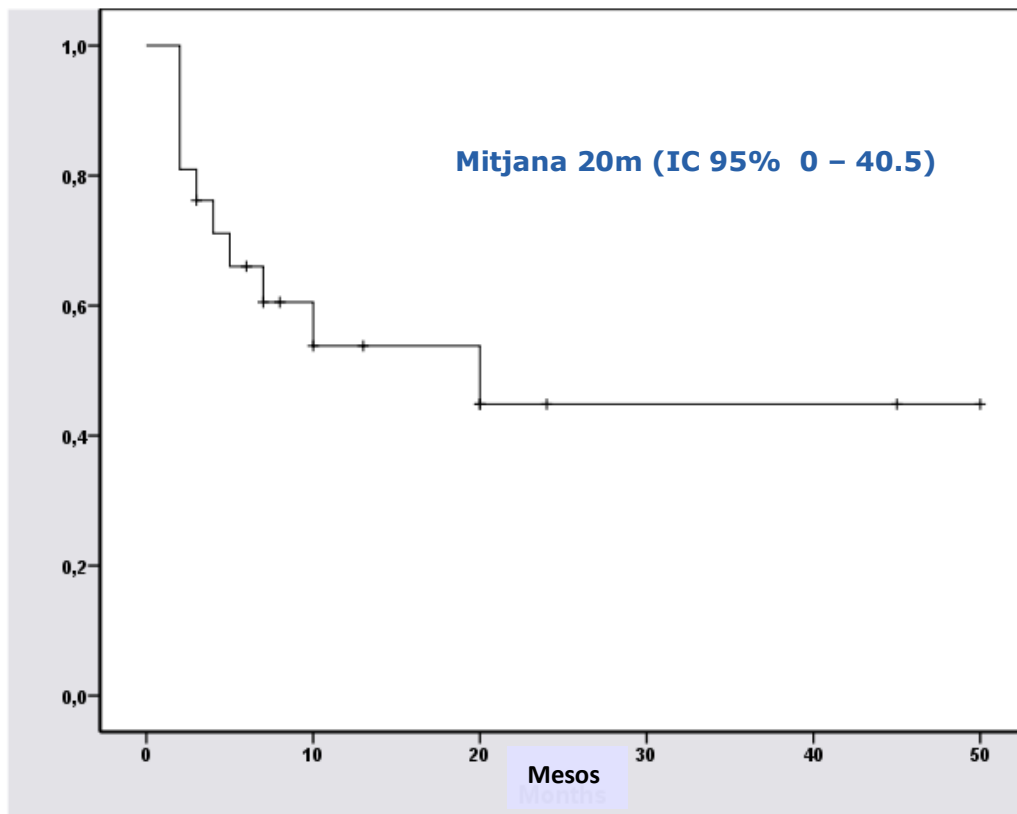
Gràfic 2. Temps fins a la progressió acord amb el PS



Gràfic 3. Temps fins a la progressió acord amb els nivells de RAP80

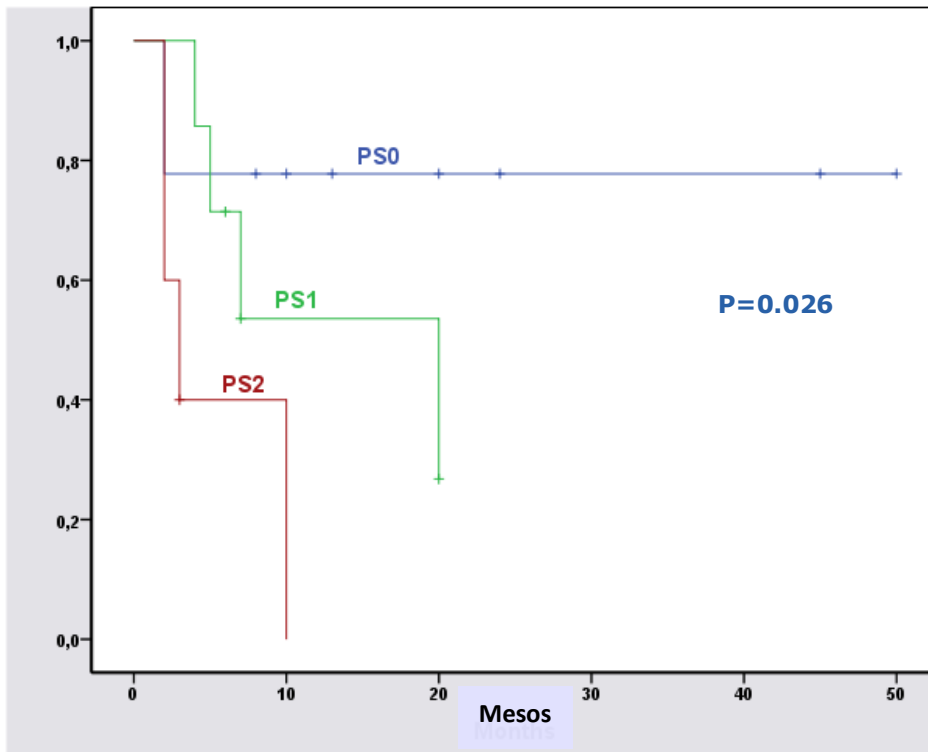
4.5.- Supervivència Global

La supervivència global va ser de 20 mesos, amb un interval de confiança del 95% d'entre 0 i 40,5 mesos (Gràfic 4).

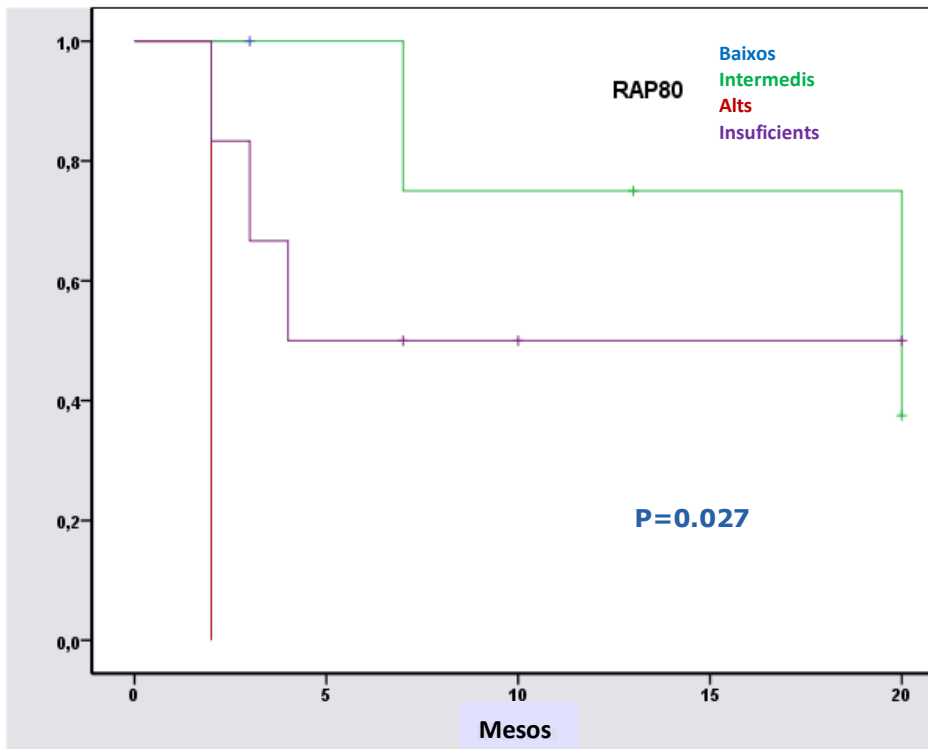


Gràfic 4. Supervivència Global

No s'observaren diferències en SG acord amb el sexe, hàbit tabàquic, nivells de BRCA1, però sí amb els nivells de RAP80 ($p=0.027$) i el PS ($p=0.026$) (Gràfic 5 i 6).

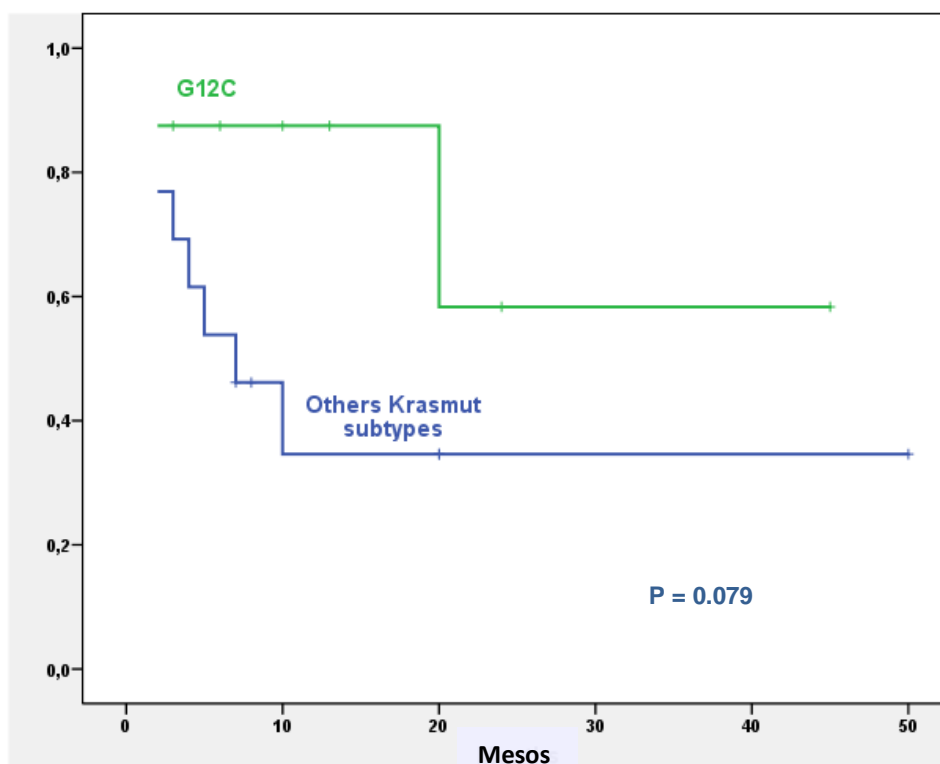


Gràfic 5. Supervivència Global acord amb el PS



Gràfic 6. Supervivència Global acord amb els nivells de RAP80

Segons el subtipus de mutació de KRAS vam observar una tendència no significativa ($p=0.079$) a millor SG en els pacients portadors de la mutació KRAS G12C respecte la resta dels subtipus (Gràfic 7).



Gràfic 7. Supervivència Global segons el subtipus de mutació KRAS

El TTP i la SG segons el subtipus de mutació KRAS van ser:

	TTP (mesos)	SG (mesos)
G12C	10,1	15,4
G12V	5	14,1
G12A	2,3	8,5
G12D	9,1	9,6
G13D	3	8,3
G13V	3,2	6,9

En l'anàlisi multivariant no vam observar diferències entre sexe, PS, tabaquisme, BRCA, RAP80, respecte la mutació de KRAS i els seus subtipus.

5. Discussió

Les mutacions en KRAS es presenten en aproximadament un 15-25% dels NSCLC, sobretot en pacients dones, de països occidentals, en histologia adenocarcinoma i estan molt associades a l'hàbit tabàquic, tot i que l'absència de tabaquisme no elimina la possibilitat de tenir la mutació [9].

En el nostre estudi on hem analitzat de forma retrospectiva el paper del KRAS en NSCLC en una sèrie de 114 pacients, hem observat una prevalença de la mutació similar a la d'altres sèries publicades, un 21,9% (25 de 114 pacients). A diferència de la literatura, el sexe més prevalent ha estat el masculí (64%), probablement degut a l'àrea d'influència del nostre hospital. Si ens fixem en les últimes dades del Ministeri de Sanitat i Consum a Espanya sobre tabaquisme (2001) per a pacients amb grup d'edat similar a la mitjana de la nostra sèrie, observem com el sexe masculí té una prevalença major que el femení en quan a l'hàbit tabàquic, un 66,3% respecte un 24,4% respectivament. Tot i això, cal remarcar que en grups d'edat inferior, s'observa un canvi de tendència d'aquest hàbit a favor d'un augment en la prevalença de dones fumadores, fet que en un futur podrà repercutir en la incidència del càncer de pulmó i consegüentment en la distribució de les mutacions per sexe. En estudis de Kato i Caracta [29,30] on trobem que les mutacions són més freqüents en dones, la prevalença del tabac i el fet que la població analitzada sigui oriental, fa que les seves dades no siguin del tot extrapolables en el nostre estudi. Un dels mecanismes que podria estar relacionat en el cas de les mutacions de KRAS en dones, es basa en un tema hormonal. La selecció de clons de KRAS i els efectes dels estrògens sobre les

cèl·lules d'adenocarcinoma on s'ha demostrat que la cèl·lula precursora d'adenocarcinoma expressa receptors d'estrogen tant α com β , la mutació KRAS millora l'expressió d'aquests receptors i indueix a la transformació cel·lular.

Hem pogut observar com la mutació és més freqüent en pacient fumadors, si agrupem els pacients fumadors i ex-fumadors la prevalença és del 92%, respecte el 8% de no fumadors. Segons Riely [9], l'exposició a hidrocarburs aromàtics policíclics presents en el fum de la cigarreta és la principal causa de tranversions entre parells de bases, i donat que les transversions són el mecanisme més freqüent de mutació KRAS, podem concloure que fumar augmenta el risc de tenir un càncer de pulmó amb la mutació KRAS. Tanmateix, les mutacions de KRAS observades en pacients no fumadors són secundaries a transicions, mecanisme mutacional més infreqüent.

La histologia més freqüent on trobem mutacions de KRAS és l'adenocarcinoma en un 72%, mentre que la resta d'histologies (no escamós, bronquioalveolar...) representen el 28% restant, dades similar a la bibliografia com els articles de Langer, Kosaka i Roberts [12, 13, 28].

En quan als resultats moleculars, hem observat que la mutació més freqüent ha estat G12 i d'entre els seus subtipus la G12C en un 44%. També hem testificat com aquest subtipus és més freqüent en pacients fumadors. Tots aquests resultats són similars als observats en la literatura [5, 9, 10]. Una dada important, és la troballa d'una tendència no significativa ($p=0.079$) a millor SG en els pacients portadors de la mutació KRAS G12C respecte la resta dels subtipus. Això ens fa pensar que els subtipus de mutacions KRAS poden actuar com a factors predictius i/o pronòstics, així com de resposta a la

quimioteràpia. Enfront això, un estudi molt interessant recentment publicat per Garassino et al [10], evidencia que l'expressió del subtipus de mutació KRAS prediu la sensibilitat a agents quimioteràpics. S'ha observat que l'expressió de G12C està associada a una escassa resposta al cisplatí i una alta sensibilitat al taxol i pemetrexed, en canvi l'expressió de G12D comporta resistència al taxol i sensibilitat al sorafenib, G12V té alta sensibilitat pel cisplatí i resistència al pemetrexed. En canvi, els diferents subtipus KRAS no modifiquen la resposta cel·lular a inhibidors EGFR. En aquest sentit, caldrien estudis prospectius on s'administrassin diferents agents quimioteràpics en funció del subtipus de mutació KRAS, per tal de veure'n la seva resposta i la seva conseqüència en la història natural de la malaltia.

Estudis previs de Shigematsu, Kosaka i Tam [34,35,36] han demostrat que la mutació de KRAS i EGFR són mútuament excloents donat que són mutacions redundants, implicades en una mateixa via de proliferació. En la nostra sèrie només trobem un pacient portador d'ambdues mutacions. Revisant articles publicats, Eberhard [19] i Jackman [27] en les seves series també han reportat concomitància de les dues mutacions, amb una incidència baixa. Probablement, els carcinomes de pulmó amb mutacions de KRAS o EGFR representen dues vies diferents amb factors etiològics diferents que finalment porten al desenvolupament d'una malaltia semblant però no igual (carcinoma de pulmó). Per la qual cosa, han de ser tractats amb diferents aproximacions terapèutiques. El nostre pacient portador d'ambdues mutacions, va rebre una primera línia de quimioteràpia basant-nos d'una banda, en la connotació negativa que confereix la mutació de KRAS a major agressivitat i, de l'altra en els resultats negatius evidenciats en assaigs clínics on es combina un inhibidor de la

tirosin-quinasa i la quimioteràpia, observant-se que tant el TTP com la SG es menor [19]. Tot i que aquestes troballes s'haurien de validar amb estudis prospectius, suggereixen que un mecanisme important de resistència primària als inhibidors de la tirosin quinasa són les mutacions de KRAS.

Malauradament el nostre pacient va progressar ràpidament durant aquesta primera línia amb un ràpid desenllaç fatal.

Dels pacients que en el nostre estudi van rebre tractament amb una primera línia de quimioteràpia basada en cisplatí, cal ressenyar l'alt percentatge de malalts que progressaren al tractament, un 47,6%. Això constata el que han demostrat diversos estudis, KRAS com a marcador pronòstic i predictiu negatiu de benefici de la quimioteràpia. L'estudi JBR.10 [31], un assaig clínic fase III del tractament adjuvant amb quimioteràpia basada en cisplatí en pacients estratificats de forma prospectiva segons la mutació KRAS, va revelar un benefici en supervivència a favor de la quimioteràpia adjuvant en comparació amb l'observació en l'anàlisi per intenció de tractar. No es va demostrar que la mutació KRAS fos un factor pronòstic. Entre els pacients amb tumors KRAS wild type (n = 333), s'observà un benefici de supervivència a favor de la quimioteràpia adjuvant (HR = 0,69, IC 95%, 0,49-0,97, p = 0,03), però en els pacients amb tumors KRAS mutats (n = 117), no es va observar cap benefici amb la quimioteràpia adjuvant (HR = 0,95, IC 95% 0,53-1,71; P = 0,87). Aquests resultats són interessants, i suporten els resultats que trobem en el nostre treball, calen estudis prospectius que demostrin en primer lloc que presentar un tumor kras mutat es beneficia menys dels tractaments quimioteràpics habituals i en segon lloc d'estudis amb tractaments dirigits per a aquest subgrup de malalts que millorin els resultats

actuals (per exemple estudis amb inhibidors de mtor, inhibidors de c-met...). Tenint en compte les dades disponibles, no és possible determinar si l'estat mutacional de KRAS és un marcador pronòstic independent o un marcador predictiu negatiu del benefici quimioteràpia adjuvant.

En el nostre estudi, la SG ha estat de 20 mesos i el TTP de 4 mesos. Sembla poc coherent el temps a la progressió comparat amb la supervivència global dels pacients. Hi podria haver varies raons que justifiquessin aquests temps, donat que KRAS va malament en general; en primer lloc, els diferents subgrups de mutació de KRAS es comportarien com a factors pronòstics independents que no podem demostrar pel tamany mostral que tenim; en segon lloc, que actuïn com a factors predictius de resposta i aquí implicaria els estudis dirigits de quimioteràpia i en tercer i últim lloc, altres factors moleculars que interaccionen amb KRAS i que encara desconeixem.

En quan a les variables clíniques, sí que hem observat una correlació significativa entre la SG i el TTP acord amb el PS i els nivells RAP 80. A millor PS i com més baixos siguin els nivells de RAP80, millor TTP i SG. Segons la literatura, la SG està influenciada pels nivells de RAP80; segons un estudi de Rosell et al [37], la SG dels pacients amb baixos nivells de RAP80 no es va arribar a estimar, mentre que els que presentaven nivells intermedis i alts va ser de 6 mesos i de 4mesos respectivament.

Cal remarcar que un alt percentatge de pacients han presentat nivells insuficients de RAP 80 i BRCA1, això s'explica per la poca quantitat de teixit tumoral de qualitat que s'obté en les biòpsies i la necessitat de seleccionar les mutacions analitzades.

Des del descobriment inicial de Ras, la investigació es va centrar en la seva regulació i el seu paper en la oncogènesi. No obstant això, la comprensió de les implicacions clíniques de l'activació del gen KRAS en el desenvolupament de tumors NSCLC i la metàstasi segueix sent elusiva. Tot i els avenços i el coneixement de la biologia molecular del càncer de pulmó, hi ha poca informació sobre els canvis en els perfils moleculars durant la història natural d'un tumor. En aquest sentit és important la necessitat de re-biopsiar el tumor quan aquest deixa de respondre a un esquema de tractament i es constata la progressió de la malaltia, donat que el perfil molecular del tumor pot haver canviat i beneficiar-se de tractaments que fins al moment no. És necessari i tenim la necessitat de desenvolupar fàrmacs que actuïn enfront la mutació KRAS, així com d'incloure pacients en estudis prospectius que aportin un millor coneixement dels factors pronòstics i predictius del KRAS, per tal de desenvolupar dianes terapèutiques que millorin la supervivència d'aquests pacients. En aquest camí, potser la simple definició de mutació KRAS no és suficient, cal definir el seu subtipus i alteracions moleculars que puguin estar relacionades, per identificar pacients amb diferent probabilitat de resposta a tractaments.

Tant per les característiques clíniques i el comportament que tenen els pacients KRAS mutats, com per les vies moleculars implicades i, el més important, el repte que suposa per un Oncòleg planificar un bon esquema de tractament que beneficïi en aquesta subpoblació, fa despertar la inquietud de seguir investigant vies moleculars, mecanismes implicats i fàrmacs que facin augmentar la supervivència d'aquests pacients. En aquest camí, seguirem ampliant i treballant amb els malalts portadors de la mutació KRAS per intentar entendre millor aquesta malaltia.

6. Conclusió

- La mutació de KRAS és més freqüent en dones (tot i que en la nostra població en homes), pacients fumadors i amb histologia adenocarcinoma.
- El subtipus KRAS més freqüent és G12C.
- La taxa de respostes a la quimioteràpia és baixa, un 47,6% dels pacients progressen a un primer esquema de quimioteràpia.
- El PS i els nivells de RAP80 estan associats de forma estadísticament significativa amb SG i TTP. Cap altra variable ha estat associada de forma significativa amb la resposta a la quimioteràpia, TTP i SG.
- Els pacients portadors de la mutació G12C tenen una tendència no estadísticament significativa cap a una SG major comparat amb la resta de subtipus de KRAS.

7. Bibliografia

1. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Medicine* 2009; 361 (10) september 3.
2. Huncharek M, Muscat K, Geschwind JF. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung càncer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis* 1999; 20:1507-10.
3. Ferté C, Besse B, Dansin E, et al. Durable responses to Erlotinib despite KRAS mutations in two patients with metastatic lung adenocarcinoma. *Ann of Oncology* 2010; 6 (21).
4. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D et al. Assessment of somatic K-Ras mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-target agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9 (10): 962-972.
5. Schmid K, Oehl N, Wrba F, et al. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (14).
6. Schiller J, Gazdar A. Lung càncer in never smokers-a different disease. *Nature*, 2007; vol 7.
7. Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung càncer. *Nature*, 2010; vol 10.
8. Garcia-Foncillas J. *Biologia molecular en càncer*. 2º edicion: Prous Science, 2009.

9. Riely G, Kris M, Rosenbom D. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (18).
10. Garassino M, Marabese M, Rusconi P. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 2011;22 (1).
11. Pasi et al. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Implications for Treatment and Tumor Biology. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3227-3234.
12. Langer C, Besse B, Gualberto A. The evolving role of histology in the management of advanced Non-Small-Cell lung Cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:5311-5320.
13. Kosaka et al. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications. *Cancer Res* 2004; 64: 8919-8923.
14. Massarelli et al. KRAS Mutations is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (10): 2890-2896 .
15. García-Foncillas, Díaz-Rubio. *Oncogenes y genes supresores en cáncer*. Aran ediciones, 2007.
16. Cortés-Funes, Colomer Bosch. *Tratado de Oncología*, 2ª edición. Permanyer, 2009.

17. Shuhang W, Tongton A, Jie W, et al. Potential Clinical Significance of a Plasma-Based Kras mutation Analysis in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16(4).
18. Baselga J. Determinants of Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Agents. *J Clin Oncol* 2008; Vol 26, number 10.
19. Eberhard D, Johnson B, Amler L, et al. Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor and in KRAS are predictive and Prognostic Indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005, Vol 23, number 25.
20. Coate L, John T, Tsao M, et al. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2009;10:1001-10.
21. Sun S, Schiller J, Gazdar A. Lung cancer in never smokers – a different disease. *Nature Reviews Cancer* 2007; Vol 7.
22. Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, et al. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (10) May 15.
23. Nelson H, Christiani D, Mark J, et al. Implications and prognostic value of K-Ras mutation for early-stage lung cancer in women. *Journal of the National Cancer Institute* 1999, vol 91, Nº23, decembre 1.
24. Sartori G, Cavazza A, Sgambato A, et al. EGFR and K-ras mutations along the spectrum of pulmonary epithelial tumors of the lung and elaboration of a

- combined clinicopathologic and molecular scoring System to predict clinical responsiveness to EGFR inhibitors. *Am J Clin Pathol* 2009; 131:478-489.
25. Pao E, Wang T, Riely J, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *Plos Medicine* 2005; vol 2, issue 1.
 26. Eisenhauer E, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* 2009; 45, 228-247.
 27. Jackman D, Miller V, Cioffredi L, et al. Impact of Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutations on Clinical Outcomes in Previously Untreated Non-Small Cell lung Cancer Patients: Results of an Online tumor registry of clinical trials. *Clin Cancer Res* 2009; 15:5267-5273.
 28. Roberts P, Stinchcombe T, et al. Personalized Medicine in Non-Small-Cell Lung Cancer: is KRAS a Useful Marker in Selecting Patients for Epidermal Growth factor Receptor-Targeted Therapy? *J Clin Oncol* 2010; 28: 4769-4777.
 29. Kato K, Ueoka Y, et al. Contribution of enhanced transcriptional activation by ER to [12val] K-Ras mediated NIH3T3 cell transformation. *Oncogene* 1997; 15:3037-46.
 30. Khosravi-far R, et al. The Ras signal transduction pathway. *Cancer Met.Rev* 1994; 13: 67-89
 31. Caracta CF, Powell C, et al. Estrogen receptor status of lung cancer cell lines. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:A204.

32. Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Medicine* 2005; 352:2589–2597.
33. Riely J, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Am Thorac soc* 2009; vol 6, 201-206.
34. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 339-46
35. Kosaka T, Yatabe et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 2004; 64:8919-23.
36. Tam IY, Chung LP, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1647-53.
37. Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez J, et al. Customized treatment in non-small cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. *Plos One* 2009; 4.

8. Agraïments

Al Dr. E. Carcereny, sense l'entusiasme, l'ajuda i l'estimulació que m'has donat aquest treball no hagués estat possible.

Al director de la tesina, Dr. Rosell, per la seva confiança i recolzament.

A la Dra. T. Moran per tot el que m'has ajudat, per l'interés en el treball i els ànims que m'has enviat des de l'altra banda del món.

A la l'Erika Mijangos, gràcies per facilitar-me tot el que he necessitat.

A la Maria Sánchez Ronco, per la teva col·laboració en l'estadística.

A la Sara, ja saps que sense tu aquest viatge no hagués estat el mateix, gràcies per tots els cops de mà!

A la Mercè, per fer-hi una ullada i pel teu assessorament.

I especialment al Pau, per tota la paciència i comprensió en aquests mesos.

Moltes gràcies!

Laia