

# Patología molecular y dianas terapéuticas

Santiago Montes-Moreno<sup>1</sup> y Fernando López-Ríos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander;

<sup>2</sup>Laboratorio de Dianas Terapéuticas, Hospital Universitario Sanchinarro, Madrid.

## CONSIDERACIONES GENERALES

El continuo desarrollo en el área de investigación de hematología-oncología aporta continuamente nuevos marcadores con valor diagnóstico, pronóstico y predictivo de respuesta a terapias dirigidas. Esto tiene especial importancia ya que es tarea del patólogo conocer y participar activamente en este avance así como incorporar gradualmente en su práctica diaria aquellos marcadores que sean validados en el ámbito clínico. Esta implementación de nuevos marcadores y tecnologías se debe realizar en condiciones óptimas de calidad, técnica e interpretativa y muchas veces requiere de un equipo multidisciplinar que incluya biólogos moleculares, técnicos de laboratorio, patólogos y hematólogos-oncólogos.

El catálogo de técnicas moleculares que debe incluir un laboratorio de patología se basa en el estado actual de la clasificación de las neoplasias (WHO) y en guías de práctica clínica de consenso elaboradas por comités de expertos patólogos y hematólogos-oncólogos como la NCCN, la BSCH, y en nuestro país las guías de consenso SEAP-SEOM. Estas guías de consenso orientan, no sólo acerca de las técnicas de diagnóstico histopatológico y molecular, sino también acerca de los métodos óptimos de obtención de muestras para diagnóstico, uso adecuado de las muestras e incorporación de excedentes de tejido a biobancos así como de la orientación terapéutica óptima en función de la evidencia clínica disponible. El desarrollo de este tipo de guías de consenso a nivel nacional, con el objetivo de normalizar los criterios diagnósticos y métodos empleados en el mismo, es también una tarea necesaria en nuestro medio.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR. CATÁLOGO DE PRUEBAS

### *Tumores sólidos*

El diagnóstico molecular en los tumores sólidos se encontraba tradicionalmente mucho más estancado cuando se comparaba con las neoplasias hematológicas. La situación cambió radicalmente a principios del siglo XXI con la llegada de los marcadores predictivos (*HER2*, *KIT*, *EGFR*, etc...). En este momento es tal la velocidad en la necesidad de implantar nuevas determinaciones que por vez primera las aprobaciones de fármacos dirigidos podrían sobrepasar la capacidad técnica y humana de los Departamentos de Anatomía Patológica. En este momento las determinaciones imprescindibles

bles serían las mutaciones de *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* y *KIT*, además de la amplificación de *HER2* y la traslocación de *ALK*. Es muy deseable también el estudio de mutaciones de *PI3CA*, de la metilación de *MGMT* o la delección de 1p19q, por ejemplo.

### *Patología no neoplásica*

Aunque conceptualmente cualquier determinación podría incorporarse (como ha demostrado la encuesta), este apartado se limita en la mayoría de las ocasiones a la patología infecciosa. Simplemente hay que destacar los enormes avances metodológicos (la misma prueba se puede hacer a veces por distintas técnicas, inmunohistoquímica, hibridación *in situ* o PCR) y la importancia estratégica que está adquiriendo la determinación de HPV.

### *Hematopatología*

La selección de los marcadores más adecuados para el diagnóstico de procesos linfoproliferativos (anticuerpos de primera, segunda y tercera líneas) y los paneles de inmunohistoquímica óptimos según la sospecha diagnóstica así como los requisitos para la incorporación de nuevos marcadores inmunohistoquímicos al diagnóstico no están tan estandarizados como en otros países. La normalización de estos procedimientos diagnósticos, con la incorporación de paneles de inmunohistoquímica predefinidos permite optimizar el proceso diagnóstico y comparar resultados entre laboratorios, así como estandarizar la emisión de resultados (grado C, nivel de evidencia IV). La definición de estos parámetros de jerarquización de marcadores y reglas para la incorporación de nuevos marcadores inmunohistoquímicos procedentes del campo de la investigación a la práctica clínica debe ser parte de las guías de consenso en patología hematooncológica.

El uso de técnicas de citogenética para la detección de reordenamientos específicos es crucial en el diagnóstico de algunas patologías hematolinfoides (i.e Linfoma de Burkitt, t (8;14), recomendación grado C, nivel de evidencia III). Existen una serie de sondas que constituyen un armamentario básico ya que constituyen marcadores diagnósticos y/o pronósticos de relevancia reconocida en patología hematolinfoide: C-MYC, BCL2, BCL6, MALT1, CCDN1, ALK, del17p (p53).

El análisis de clonalidad linfoide mediante PCR se basa en la detección de reordenamientos de los genes de inmunoglobulinas y TCR. El análisis de clonalidad es una técnica auxiliar en el diagnóstico hematopatológico y por sí sola no es suficiente para establecer un diagnóstico de proceso linfoproliferativo (recomendación grado C, nivel de evidencia III). No obstante existen indicaciones precisas en las que el estudio de clonalidad mediante PCR es de utilidad como son casos en los que los datos histopatológicos e inmunohistoquímicos no son totalmente concluyentes (5-10% de los casos) y casos en los que existe una discordancia entre la presentación clínica y el diagnóstico histopatológico.

## **EVOLUCIÓN Y NIVEL DE IMPLANTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE PATOLOGÍA MOLECULAR EN ESPAÑA**

De la encuesta de la SEAP 2013 (véase edición de este mismo Libro Blanco) se desprende que prácticamente la mitad de los encuestados tiene implementada alguna técnica de patología molecular en su laboratorio (45/86, 52,3%) (Tabla 1).

Es muy revelador que la implementación de técnicas de Patología Molecular se produzca sobre todo entre los años 2005-2010, lo que coincide con el progresivo abandono del concepto de centro

Tabla 1. ¿Tiene implementadas técnicas de Patología Molecular?

		FRECUENCIA	PORCENTAJE
	No	41	47,7
Válidos	Si	45	52,3
	Total	86	100,0

de referencia para el estudio de *HER2* mediante FISH y la necesidad de estudiar mutaciones de *EGFR* y *KRAS* en carcinoma de pulmón y carcinoma de colon respectivamente. Esto se confirma con análisis de las pruebas que realizan los centros, muy centradas en *EGFR*, *KRAS* y *BRAF*. También destacan el estudio de la inestabilidad de microsatélites y las mutaciones en *KIT* y *PDGFR*. En patología no neoplásica, destaca el estudio de agentes infecciosos (sobre todo HPV y micobacterias). El resto de las determinaciones se realizan en centros aislados o en un único centro.

En lo relativo a la metodología, es muy llamativo que todavía en el momento de la encuesta la PCR convencional es todavía más habitual que la PCR en tiempo real, una situación que está invirtiéndose en los últimos años. Sin embargo, la encuesta confirma la enorme popularidad de esta última tecnología para el estudio intraoperatorio de los ganglios centinela en las pacientes con carcinoma de mama. En el caso del estudio del HPV, la PCR parece el método más frecuentemente utilizado, aunque para futuras encuestas quizá sea conveniente desglosar más esta pregunta para evitar confusiones entre técnica y marca comercial. Es interesante la baja aceptación de la hibridación *in situ* en este contexto.

En cuanto a la hibridación *in situ* no hay sorpresas y la encuesta confirma la percepción subjetiva que probablemente tenemos todos. La popularidad de las técnicas de campo claro parecen sobrepasar al FISH para el estudio de *HER2* (23 centros frente a 18). En la cartera de servicios de FISH destacan, como no podría ser de otra manera, los estudios en oligodendrogliomas y sarcomas (sobre todo sarcoma sinovial y sarcoma de Ewing).

Por último, es muy alentador que la media del número de determinaciones moleculares esté alineada con el número mínimo que se sugiere para garantizar la calidad en las guías nacionales e internacionales. Aunque haría falta un estudio estadístico más detallado y este es un asunto controvertido (¿cuándo hace falta un centro de referencia y qué requisitos debe tener?) sí parece que en España la inclusión de una prueba molecular en la cartera de servicios parece realizarse en base a una necesidad clínica real.

En lo relativo a patología hematolinfóide la implantación es menor que las técnicas relacionadas con patologías más prevalentes como los tumores sólidos. Así, un 21% (18/86 centros) realizan determinaciones de clonalidad linfóide y un 7% (6/86 centros) realizan técnicas de citogenética (FISH) frente al 40% (35/86 centros) que realizan determinaciones de *KRAS*, por ejemplo.

El panel de sondas de FISH disponible en los centros es variable. Así las sondas disponibles en centros que realizan FISH para patología hematolinfóide son *ALK* (8 centros), *C-MYC* (7 centros), *BCL2* (5 centros), *BCL6* (3 centros), *MALT 1* (3 centros), ciclina *D1* (2 centros), *17p (p53)* (1 centro) y *13q14* (1 centro).

En relación con las técnicas de hibridación *in situ* cromogénica (CISH) para la detección de RNAs virales (EBV-EBER) y de cadenas ligeras kappa y lambda, la implantación es relativamente baja (4 y 3 centros respectivamente). Este dato es llamativamente bajo, especialmente en lo referente a la detección de la presencia de EBV mediante CISH. Hay toda una serie de procesos linfoproliferativos

en los que la demostración de EBV es una condición para el diagnóstico (i.e. Linfomas B de alto grado asociados a diversos estados de inmunosupresión como el linfoma plasmablastico y el LBDCG asociado a edad avanzada, desórdenes linfoproliferativos B post-trasplante, Linfoma de Hodgkin, Linfomas T/NK, entre otros). Dado que el estado de latencia de EBV es variable en estas condiciones, la expresión inmunohistoquímica de EBV-LMP1 no siempre es un surrogado suficientemente sensible de la infección por EBV. En relación con el uso de la hibridación *in situ* para cadenas ligeras kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), es reconocido que la técnica tiene una sensibilidad menor que una inmunohistoquímica óptima para  $\kappa$  y  $\lambda$  en procesos linfoproliferativos. No obstante es de utilidad como marcador de primera línea en proliferaciones de células plasmáticas si los resultados de IHQ no resultan totalmente específicos.

La implantación de la citometría de flujo (CMF) es equivalente a la de la citogenética con un 7% de centros que la utilizan. El bajo nivel de uso de la citometría de flujo, a pesar de sus ventajas como método de cuantificación de la expresión de uno o varios antígenos se puede explicar en parte por la necesidad de tejido fresco y por el desarrollo notable del uso de inmunohistoquímica en tejido como herramienta de primera línea diagnóstica en los laboratorios de Anatomía Patológica. Este hecho, la preeminencia de la inmunohistoquímica sobre la citometría de flujo, es común a otros países. No obstante, ambos métodos son complementarios, especialmente en la evaluación de procesos mieloproliferativos en los que los paneles de CMF están, por lo general más desarrollados que los de inmunohistoquímica. Además, la citometría de flujo tiene indicaciones muy específicas (por ejemplo como método auxiliar en la evaluación de muestras de PAAF de ganglio linfático) que pueden justificar su uso en un laboratorio de Anatomía Patológica.

## ENVÍO DE MUESTRAS A CENTROS DE REFERENCIA

En relación con el envío de muestras a centros de referencia especializados en diagnóstico molecular, de los 86 centros encuestados, 62 reconocen enviar muestras a centros de referencia externos para la realización del estudio molecular (72,1%) (Tabla 2). El número de centros que envían muestras a centros de referencia se ha ido incrementando gradualmente desde 1989 y especialmente desde 2005, alcanzando una meseta en los últimos 3 años (Tabla 3).

Pueden existir varios motivos que conduzcan al envío de una muestra a un centro de referencia externo. En la mayoría de las ocasiones es la falta del desarrollo técnico suficiente para la realización de una técnica específica (i.e., electroforesis capilar para análisis de clonalidad o secuenciación directa, microscopio de fluorescencia para el análisis de FISH). En relación con esto, en ocasiones, el volumen limitado de muestras procedentes de un único centro para una patología relativamente infrecuente hace inviable la obtención de equipos o material específico (i.e., sondas de FISH específicas para determinados tipos de linfoma). Adicionalmente, la complejidad técnica que exigen muchas de estas tecnologías hace deseable que se realicen en centros que tengan la infraestructura

**Tabla 2 ¿Se envían casos a un centro de referencia?**

		FRECUENCIA	PORCENTAJE
Válidos	Sin respuesta	9	10,5
	No	15	17,4
	Si	62	72,1
	Total	86	100,0

Tabla 3 En caso afirmativo ¿desde que año?

		FRECUENCIA	PORCENTAJE	PORCENTAJE VÁLIDO	PORCENTAJE ACUMULADO
Válidos	1989	1	1,3	1,9	1,9
	1995	1	1,3	1,9	3,7
	1997	1	1,3	1,9	5,6
	1998	1	1,3	1,9	7,4
	2000	3	3,8	5,6	13,0
	2002	1	1,3	1,9	14,8
	2003	1	1,3	1,9	16,7
	2004	3	3,8	5,6	22,2
	2005	9	11,3	16,7	38,9
	2006	4	5,0	7,4	46,3
	2007	3	3,8	5,6	51,9
	2008	11	13,8	20,4	72,2
	2009	8	10,0	14,8	87,0
	2010	4	5,0	7,4	94,4
	2011	3	3,8	5,6	100,0
	Total	54	67,5	100,0	
Perdidos	Sistema	26	32,5		
Total	80	100,0			

ra, el personal cualificado y la certificación de calidad adecuados en cada caso y programas de control de calidad externos.

Esta solicitud de estudio molecular a centros de referencia está regulada de formas diversas en los distintos centros y comunidades autónomas. No existe, por decirlo de otra manera, un conjunto definido de centros de referencia en patología molecular a nivel nacional ni un sistema estructurado de derivación de estudios a estos centros.

### CONCLUSIONES Y DIRECCIONES FUTURAS

El diagnóstico molecular es un diagnóstico de alta complejidad y requiere la integración de los resultados del estudio histopatológico, inmunofenotipo y análisis genético y molecular. Independientemente de si estos estudios se realizan de forma centralizada en un único laboratorio o en diferentes unidades relacionadas funcionalmente, los resultados se deben integrar en un único informe final anatomopatológico por un patólogo experto que forme parte de un equipo multidisciplinar. En este sentido, la elaboración de guías de práctica clínica a nivel nacional (p.ej. SEAP-SEOM) por parte de un comité de patólogos y hematólogos-oncólogos, que normalicen los criterios diagnósticos y méto-

dos y procedimientos empleados en cada caso están siendo de gran utilidad para concretar un marco de actuación común ante el paciente con patología oncológica-hematológica.

Como demuestra la encuesta, ésta área está experimentando un desarrollo sin precedentes en los Departamentos de Anatomía Patológica debido sobre todo a la necesidad de estudiar biomarcadores predictivos de respuesta a fármacos dirigidos. Esta oportunidad histórica plantea una serie de retos y complejidades estratégicas que debemos asumir entre todos. Algunos de los más importantes se resumen a continuación:

- Es muy importante que exista suficiente masa crítica de patólogos con probada formación y experiencia en patología molecular. Un avance importante sería la inclusión reglada de estas habilidades en el programa MIR y la creación de un directorio de laboratorios que ofrezcan formación en este campo.
- El desarrollo de técnicas de diagnóstico complejas exige, cada vez más, de la acreditación de los laboratorios que pretenden dar servicio de diagnóstico molecular. Se hace pues necesario promover desde la SEAP el acceso a sistemas de acreditación de calidad en los laboratorios de patología molecular que aseguren que los resultados se obtienen en condiciones técnicas e interpretativas óptimas. La norma ISO15189 es la más adecuada en este sentido pues está dirigida a laboratorios clínicos. Parece razonable que los departamentos de Anatomía Patológica que decidan ofrecer servicios de diagnóstico molecular inicien las gestiones necesarias para aplicar y obtener dicha acreditación que tiene como objetivo, no sólo asegurar la suficiencia técnica-metodológica sino también garantizar la fiabilidad de los resultados.
- Así la SEAP se enfrenta a la necesidad de regular redes de centros de referencia, de diagnóstico molecular en particular y de segunda opinión anatomopatológica en general, que aseguren el diagnóstico correcto y el manejo óptimo de los pacientes con patología oncológica-hematológica. Estas iniciativas deberían conciliarse con la irrenunciable necesidad de que absolutamente todos los Departamentos de Anatomía Patológica de España incluyan en su cartera de servicios un número mínimo de pruebas moleculares.
- Determinación de HPV. Teniendo en cuenta la desafortunada relevancia que está adquiriendo la determinación de HPV en detrimento de la citología vaginal, sería muy deseable que esta prueba estuviera siempre implementada.
- Cáncer hereditario/familiar. Al tener ya disponibles en nuestra cartera de servicios el estudio de la inestabilidad de microsatélites o la mutación de *BRAF*, habría que incorporar lo antes posible el estudio de las mutaciones de *BRCA1/2* (que además podrían ser predictivas de respuesta a fármacos anti-PARP).
- Secuenciación de próxima generación. Debido a la inexcusable necesidad de control morfológico y a que sus resultados deben complementarse con inmunohistoquímica, FISH o PCR, habría que incorporar al menos la “targeted deep sequencing” en la cartera de servicios de algunos Departamentos de Anatomía Patológica.
- El nuevo carácter predictivo de la patología molecular ha acelerado la integración de los patólogos en equipos multidisciplinares (grupos cooperativos, comités de tumores, etc...). Esto está suponiendo un acercamiento a los pacientes, que piden más información de sus complicados informes “moleculares”. Habría que canalizar esta vertiente clínica para potenciar nuestra visibilidad hospitalaria y social.

Finalmente, pensamos que, poniendo los medios para que el patólogo obtenga e incorpore esta información genética-molecular clínicamente relevante en su informe anatomopatológico final, se asegura su papel central en el manejo adecuado de los pacientes.

## **AGRADECIMIENTOS**

Santiago Montes Moreno desea agradecer al Dr. Miguel Angel Piris Pinilla la revisión crítica del manuscrito y su labor ejemplar como hematopatólogo que fomenta activamente la integración de los avances en investigación traslacional a la actividad diagnóstica diaria en patología.

Fernando López-Ríos da las gracias a todo el personal del Laboratorio de Dianas Terapéuticas por su compromiso en hacer realidad una auténtica oncología personalizada. Muy especialmente quiero destacar la extraordinaria capacidad innovadora y traslacional de los patólogos Esther Conde, Carlos Plaza, Mario Prieto y Ana Suárez-Gauthier.