

Madrid, 9 de mayo de 2012

USCAP
& AACR
HIGHLIGHTS

Avances en Patología Molecular

M^a Dolores Bautista
Hospital Carlos Haya de Málaga



Avances en Patología Molecular

I. Avances Metodológicos- Pangenomics

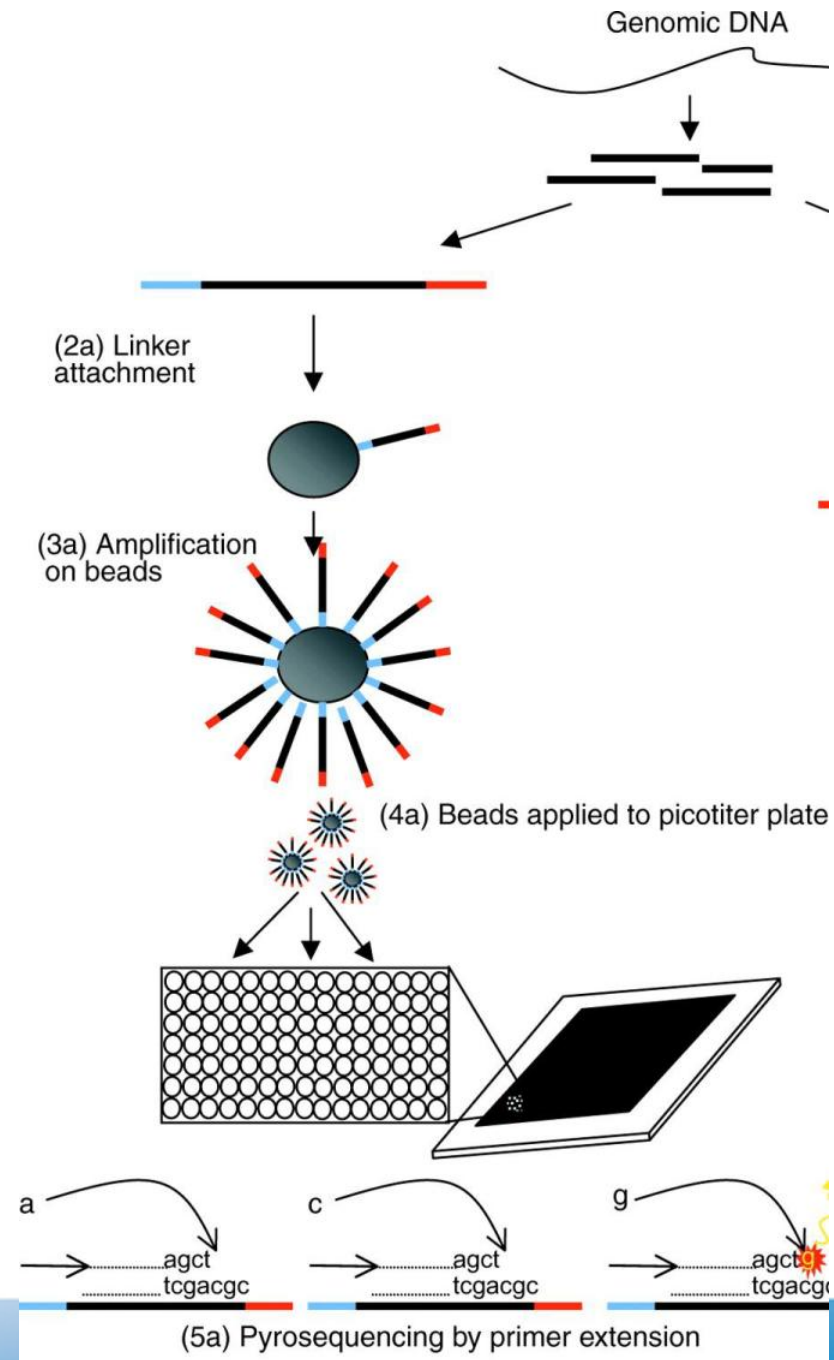
II. Nuevos Marcadores, Dianas Terapéuticas y Factores Pronósticos

Secuenciación de nueva generación

Tecnología	454	Solexa	SOLiD
Secuenciador	GS FLX serie Titanium	HiSeq 2000	SOLiD 4 System
Potencia por análisis	500 x 10 ⁶ pb	200 x 10 ⁹ pb	100 x 10 ⁹ pb
Tiempo de ejecución	10 horas	8 días	14 días
Longitud de los fragmentos (reads)	450 pb	30-100 pb	50 pb
Fragmentos por ejecución	>10 ⁶	2 x 10 ⁹	1,4 x 10 ⁹
Precio por secuenciar un genoma humano	180.000 \$	<10.000 \$	6.000 \$

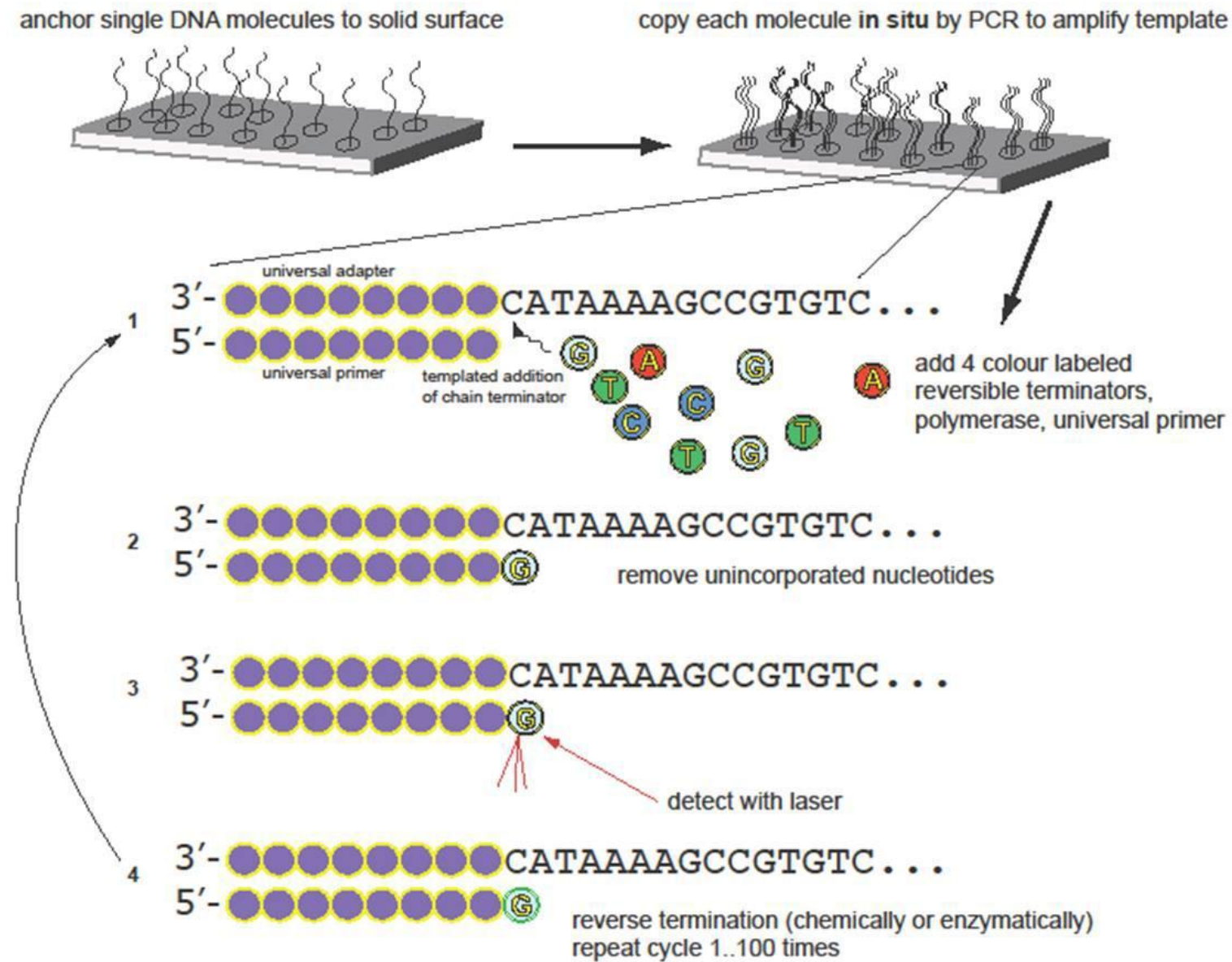
Secuenciación de nueva generación

Secuenciación 454



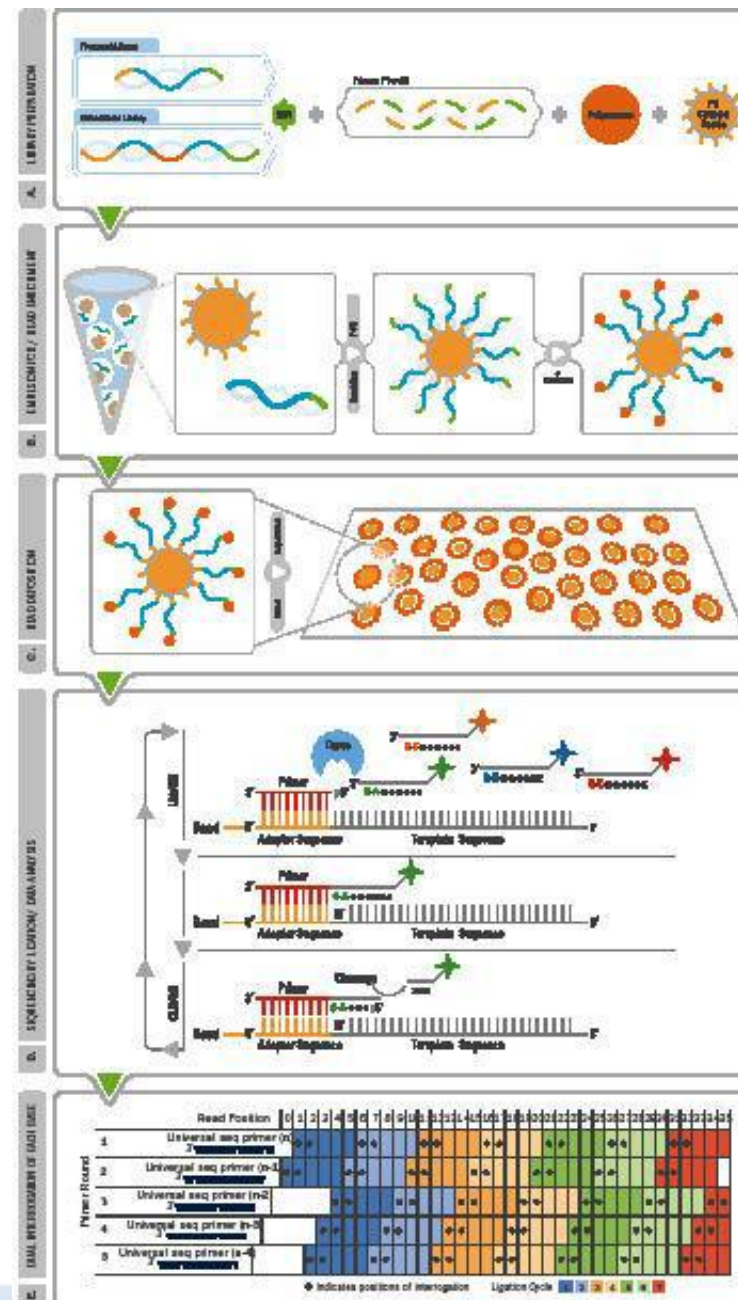
Hall N J Exp Biol 2007;210:1518-1525

Secuenciación de nueva generación



Secuenciación Solexa

Secuenciación de nueva generación



Secuenciación SOLiD

Secuenciación de nueva Generación

[1905] A Comparison of Targeted Next Generation Sequencing from Paired Formalin-Fixed and Fresh Frozen Specimens

David H Spencer, Eric Duncavage, Robi D Mitra, Shashikant Kulkarni, Karen Seibert, Rakesh Nagarajan, Mark A Watson, John D Pfeifer. Washington University, St. Louis, MO.

Tuesday, March 20, 2012 1:00 PM Platform Session: Section H1

Evalúan el rendimiento y calidad de la NGS dirigida en una serie paralela de 15 casos en parafina y en fresco para determinar si los tejidos fijados en formol son un sustrato adecuado para estas plataformas.

Se obtuvieron librerías enriquecidas para 28 genes mediante reactivos de captura “custom” que posteriormente se sometieron a multiplex sequencing

La calidad de las lecturas y el índice de errores fueron similares. La concordancia entre muestras pareadas fue >99.99%

Conclusión: NGS del ADN obtenido de muestras en parafina proporciona información completa y exacta y comparable a la de los tejidos en fresco/congelados

Secuenciación de nueva generación

[2152] Next-Generation Pathology: Deep DNA Sequencing and Targeted Therapy for Cancer

Next-Generation Sequencing

Christine Sheehan, Alex Parker, Mirna Jarosz, Sean Downing, Roman Yelensky, Doron Lipson, Gary Palmer, Maureen Cronin, Jeffrey Ross. Albany Medical College, Albany, NY; Foundation Medicine Inc., Cambridge, MA.

Tuesday, March 20, 2012 1:00 PM Platform Session: Section E

Analizan 145 genes mediante NGS en muestras en parafina de 83 tumores solidos (50 CRC, 29 NSCLC, 4 MM) en los que se conocían las mutaciones puntuales existentes en Kras, EGFR y BRAF. Se crearon librerías mediante captura-hibridación de 2574 exones para secuenciación mediante análisis en el Illumina HiSeq2000 platform (Illumina, Inc., San Diego, CA).

Se confirmaron todas las mutaciones conocidas y se detectaron múltiples mutaciones puntuales en otros oncogenes y genes supresores (p53, PIK3CA, APC, JAK2, MET, KIT, etc) y múltiples alteraciones en el número de copias de otros genes.

Conclusión: NGS permite analizar de forma fiable cientos de genes relacionados con el cáncer en muestras clínicas en parafina con una alta sensibilidad y especificidad

Secuenciación de nueva generación

[1947] Identification of Pathogens in Archival Tissues Using a High-Throughput Sequencing Approach, 3SEQ

Robert T Sweeney, Alayne L Brunner, Kelli D Montgomery, Shirley X Zhu, Christina Kong, Quynh Le, Robert B West. Stanford University School of Medicine, Stanford, CA

Monday, March 19, 2012 11:15 AM. Platform Session: Section G2.

3SEQ es un método recientemente descrito de RNA-seq que requiere solo 3' ends y permite obtener el perfil de expresión genética de tejidos de archivo histopatológico (Beck AH et al, 2010)

Se analizaron 193 muestras de tejidos de archivo neoplásicos y no neoplásicos y todas las secuencias no humanas fueron comparadas con 3752 genomas virales (viroma) y 1016 genomas bacterianos (bacterioma). Tras los alineamientos se identificaron las regiones con especial riqueza de lectura de secuencias mediante el “peak-calling algorithm”, que probablemente representen transcritos de genes microbianos. De las 193 muestras en parafina se obtuvieron 2.900 millones de secuencias de 36-pb, de las que 222 millones de lecturas no eran humanas y se compararon con el viroma y el bacterioma.

Conclusión: 3SEQ es una herramienta útil para explorar la expresión genética de patógenos en enfermedades humanas. Este método, combinado con el algoritmo “peak-calling” aumenta la sensibilidad y el alcance de indentificación de patógenos.

Métodos de alineamiento

[1912] Alignment in a SNAP: Cancer Diagnosis in the Genomic Age

Matei Zaharia, Bill Bolosky, Kristal Curtis, David Patterson, Armando Fox, David Patterson, Scott Shenker, Ion Stoica, Taylor Sittler. UCSF, San Francisco, CA; UC Berkeley, Berkeley, CA; Microsoft, Redmond, WA.

Tuesday, March 20, 2012 1:15 PM. Platform Session: Section H1

Valoración de un método automatizado de lectura de secuencias: el alineamiento o ensamblaje de secuencias SNAP (Scalable Nucleotide Alignment Package) contra los más usados alineadores de secuencias cortas BWA, Bowtie, y SOAP.

Comparison of Aligners using 125bp Simulated Single End Reads			
Aligner	Seconds per Million Reads	Accuracy (%)	False Positive (%)
bowtie*	1966	88	0.07
BWA*	3021	93	0.05
MAQ*	17506	92.7	0.08
SOAP2*	555	91.5	0.17
SNAP	10	94	0.05

[1912] Alignment in a SNAP: Cancer Diagnosis in the Genomic Age

Matei Zaharia, Bill Bolosky, Kristal Curtis, David Patterson, Armando Fox, David Patterson, Scott Shenker, Ion Stoica, Taylor Sittler. UCSF, San Francisco, CA; UC Berkeley, Berkeley, CA; Microsoft, Redmond, WA.

Tuesday, March 20, 2012 1:15 PM. Platform Session: Section H1

SNAP superó significativamente a los alineadores existentes en términos de velocidad, a la vez que logró un mayor grado de precisión.

Este nuevo algoritmo y paquete de software es capaz de ensamblar hasta **300 millones de secuencias de 100 pb** en una hora sin equipación sofisticada. Además, es capaz de **alinear contra una secuencia consenso**, lo que permite **diferenciar con mayor precisión entre variaciones de secuencia hereditarias y mutaciones somáticas**.

Microarrays de miARN

miARN



- Moléculas de regulación post-transcripcional de la expresión genética.
- >1000 descritos
- Algunos tissue-specific y otros moléculas house-keeping
- Regulación de la apoptosis, diferenciación celular y progresión del ciclo celular
- Oncogénicos y supresores de tumores

A novel microRNA-based test demonstrates 92% accuracy in classification of metastatic tumors from patients diagnosed with carcinoma of unknown primary

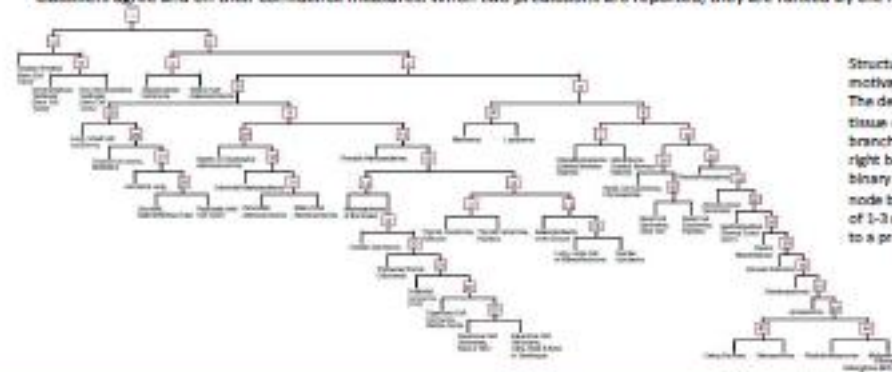
Mats Sanden¹, George Pentheroudakis², Brianna St. Cyr¹, Anna Goussia², Yael Spector³, Aikaterini Stoyianni², Alexander Faerman¹, George Fountzilas⁴, Hila Benjamin¹, Vassiliki Malamou-Mitsi², Karin Ashkenazi¹, Nicholas Pavlidis²
¹Rosetta Genomics Inc., Philadelphia, PA; ²Ioannina University Hospital, Ioannina, Greece; ³Rosetta Genomics Ltd., Rehovot Israel; ⁴Hellenic Cooperative Oncology Group, Athens, Greece

miRview[®] mets²

- Cancer of unknown primary (CUP) constitutes 3%-5% of all newly diagnosed cancer cases. It presents a major diagnostic challenge due to the significant therapeutic management implications for the patients.
- We developed miRview[®] mets², capable of identifying the tissue of origin using a set of 64 microRNAs and a custom array platform.
- The assay was trained on a total of 1282 primary and metastatic samples from 42 tumor types (all from known origins). The assay returns either a single tissue of origin or two possible origins.
- The assay was validated on an independent set of 509 samples, and demonstrated high level of accuracy: sensitivity for a single answer prediction of 90%, overall sensitivity of 85% and overall specificity of up to 99%.
- An inter-lab reproducibility study of 179 samples verified high technical concordance of 98% agreement between labs.
- A separate validation study on 52 true CUP cases from CNS origin showed 88% concordance with clinical presentation and pathology.
- Here we present miRview[®] mets² performance in a blinded study on a well annotated cohort of real CUP patients.

Test Protocol and Tumor Classification

- High quality RNA is extracted from FFPE sections of a tissue or a cell block from resection, biopsy or FNA procedure.
- RNA is labeled and hybridized onto custom microarrays with triplicate probes to measure the expression of each of the 64 test microRNAs in the specific specimen, as well as hundreds of microRNAs for normalization and control.
- The test relies on two classifiers to determine the tissue of origin: a binary decision-tree classifier and a k-nearest neighbors (KNN) classifier. Each of the two classifiers predicts one of the 42 tumor types or one of 7 combined tumor classes (e.g. Adenocarcinoma of Biliary Tract or Pancreas), and assigns a confidence measure to its prediction.
- The two predictions are then combined into a single predicted tissue of origin or two different predictions, based on whether the two classifiers agree and on their confidence measures. When two predictions are reported, they are ranked by the PPV of each answer.



Structure of the biologically motivated binary decision tree. The decision tree predicts the tissue of origin by following the branches and choosing the left or right branch at each node. This binary decision is made at each node by comparing a combination of 1-3 microRNA expression levels to a preset threshold.

Validation on real CUP cases

- FFPE CUP blocks were collected retrospectively from patients diagnosed with CUP according to a standardized clinicopathologic diagnostic algorithm and managed in HCCOG-affiliated centers from 2001 until 2009. Most patients were males (59), and belonged to visceral (34), squamous head neck (18), nodal (11), peritoneal carcinomatosis (20) and axillary nodal (9) CUP subgroups.
- Samples from 92 CUP patients were tested blindly on the miRview[®] mets² assay.
- 8 samples failed the process due to inadequate RNA quality.
- Samples from 84 patients were processed successfully and were assigned test results.
- In 77 patients (92%) the test results were fully concordant with diagnosis based on all the clinical and pathological information available including follow-up and outcome data.
- The diagnosis based on the clinical and pathological data available at presentation, and without additional data gathered throughout patient management, had only 70% agreement with the test results.
- For CUP patients, time is of the essence and our test can help by both narrowing down the potential diagnostic options and increasing confidence in a suspected tissue of origin or by suggesting a different origin at presentation, resulting in earlier correct management.

Summary

- miRview[®] mets² assay can be successfully performed on most clinical FFPE tissue samples.
- In the studied cohort of real CUP patients, miRview[®] mets² assay demonstrates agreement with pathological and clinical information in 92% of cases.
- microRNA profiling can be a useful adjunct to traditional clinical and pathologic evaluation for CUP cases.

Summary of all 84 cases which were successfully processed by the test

Code name	Sex	Clinical diagnosis at presentation	Was clinical Dx at presentation high confidence?	Current clinical Dx (option 1)	Current clinical Dx (option 2)	Current clinical Dx (option 3)	miRview mets2 1st result	miRview mets2 2nd result	Dx at Presentation & miRview mets2	Clinical Dx & miRview mets2 1st result agreement	Clinical Dx & miRview mets2 2nd result agreement
SOXY	M	Head & Neck	no	Head & Neck	Lung	Gastric	Stomach-Esophagus		No	Yes	
ADCL	F	Head & Neck	no	Head & Neck	Skin	Ovary peritoneal	Ovarian Carcinoma		No	Yes	
GOAT	M	Arms	no	Arms	Skin		Upper SCC		No	Yes	
PASODI	F	Ovary peritoneal	no	Ovary peritoneal	Endometrial	Mesothelioma	Pleural Mesothelioma		No	Yes [†]	
PMO	M	Head & Neck	no	Head & Neck	Skin	Lung	Arms or Skin SCC		No	Yes	
BRM	M	Head & Neck	yes	Head & Neck	Lung	Lung	Arms or Skin SCC		No	Yes	
ESC	M	Prostate	yes	Prostate			Upper SCC		No	Yes	
STTH	F	Head & Neck	yes	Head & Neck	Skin		Arms or Skin SCC		No	Yes	
ONDI	F	Lung	no	Lung	Breast		Breast		No	Yes	
FIAT	M	Head & Neck	no	Skin	Head & Neck		Arms or Skin SCC		No	Yes	
EGAP	M	Pancreas	no	Pancreas	Lung		Upper SCC		No	Yes	
JVA	M	Lung	no	Lung	thyroid		Thyroid papillary		No	Yes	
KAPA	M	Colon	no	Colon	Mesothelioma		Pleural Mesothelioma		No	Yes [†]	
TSFI	F	Gastric	no	Gastric	Breast	ovary peritoneal	Ovarian Carcinoma	Breast	No	Yes	
GGPE	M	GGP NET	no	GGP NET	Hepatoma	Lung	Liver HCC	MPH or Fibrosarcoma	No	Yes	
KOSO	M	Lung	no	Lung	thyroid	Pancreas	Thyroid papillary	Pancreas or Bile	No	Yes	
SISI	M	Lung	no	Lung	Mesothelioma	Gastric	Breast	Neural Mesothelioma	No	No	Yes
RTLA	F	Ovary peritoneal	no	Ovary peritoneal	Pancreas		Colon	Pancreas	No	No	Yes
MPRO	M	Lung	no	Lung	Head & Neck	Esophageal	Upper SCC		Yes	Yes	
SAIO	M	Skin	no	Skin	Head & Neck	Lung	Arms or Skin SCC		Yes	Yes	
RAOI	M	Arms	no	Arms	Pancreas	Skin	Arms or Skin SCC		Yes	Yes	
GVIV	M	Skin	no	Arms & Neck	Skin	Lung	Arms or Skin SCC		Yes	Yes	
TZAF	F	Pancreas	no	Ovary peritoneal	Pancreas	Gastric	Pancreas or Bile		Yes	Yes	
KVCH	M	Hepatoma	yes	Hepatoma	Biliary	Colon	Liver HCC		Yes	Yes	
KLFP	M	Lung small	no	Lung	GGP NET		Lung small		Yes	Yes	
AMMM	M	Colon	no	Colon	Lung		Colon		Yes	Yes	
SMS	M	Colon	no	Colon	Pancreas		Colon		Yes	Yes	
VADI	M	Lung	no	Head & Neck	Lung		Upper SCC		Yes	Yes	
IAIO	M	Arms	no	Arms	Skin		Arms or Skin SCC		Yes	Yes	
BBV	M	Bladder	yes	Bladder	Breast		TCC		Yes	Yes	
GKDI	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal	Colon		Ovarian Carcinoma		Yes	Yes	
MPSE	F	Lung NE	yes	Lung NE	GGP NET		Lung neuroendocrine		Yes	Yes	
MRPI	M	Breast	yes	Breast	Lung		Breast		Yes	Yes	
JOL	F	Lung small	yes	Lung	Melanoma		Lung small		Yes	Yes	
ZATH	M	Colon	yes	Colon	Pancreas		Colon		Yes	Yes	
CAIO	M	Head & Neck	yes	Head & Neck	Lung		Upper SCC		Yes	Yes	
BRFP	M	Head & Neck	yes	Head & Neck	Lung		Upper SCC		Yes	Yes	
KORY	F	Head & Neck	yes	Head & Neck	Lung		Upper SCC		Yes	Yes	
PALA	M	Head & Neck	yes	Head & Neck	Lung		Upper SCC		Yes	Yes	
FOSSA	M	Lung	no	Lung			Upper SCC		Yes	Yes	
ALST	M	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma		Yes	Yes	
AMOL	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma		Yes	Yes	
DIAL	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma		Yes	Yes	
PASODI	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma		Yes	Yes	
TRER	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma		Yes	Yes	
VOVE	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma		Yes	Yes	
VOCH	M	Lung small	yes	Lung small			Lung small		Yes	Yes	
INEV	F	Breast	yes	Breast			Breast		Yes	Yes	
VAAG	F	Breast	yes	Breast			Breast		Yes	Yes	
MBIO	M	Melanoma	yes	Melanoma			Melanoma		Yes	Yes	
TSOI	M	Colon	yes	Colon			Colon		Yes	Yes	
TSOR	F	Colon	no	Ovary peritoneal	Colon	Biliary	Colon	Biliary Tract	Yes	Yes	
ERH	F	Cervical	no	Cervical	Bladder	Pancreas	TCC	Cervix SCC	Yes	Yes	
MPFA	F	Biliary	no	Biliary	Biliary	Pancreas	Biliary Tract		Yes	Yes	
IDGE	M	Pancreas	no	Pancreas	Lung	Biliary	Pancreas	Lung adeno	Yes	Yes	
GAIA	M	Lung	no	Lung adeno	Pancreas	Lung small	Lung small		Yes	Yes	
NRCH	M	Colon	no	Biliary	Biliary	Colon	Colon	Neural-Esophagus	Yes	Yes	
ASO	M	Colon	no	Biliary	Colon	Gastric	Colon	Biliary Tract	Yes	Yes	
RTNI	M	Hepatoma	no	Hepatoma	Gastric	Pancreas	Liver HCC	Renal clear cell	Yes	Yes	
GAIV	F	Lung	no	Lung	Breast	Head & Neck	Thyroid	Upper SCC	Yes	No	Yes
FIST	F	Gastric	yes	Gastric	Pancreas	Colon	Stomach-Esophagus	Colon	Yes	Yes	
VVV	F	Biliary	no	Biliary	Gastric	Colon	Pancreas or Bile	Stomach-Esophagus	Yes	Yes	
ERAU	M	Lung	no	Lung	Head & Neck		Upper SCC	Lung adeno	Yes	Yes	
NLDA	F	Breast	no	Breast	Pancreas		Breast	Pancreas or Bile	Yes	Yes	
HIDA	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal	Breast		Ovarian Carcinoma	Breast	Yes	Yes	
HOR	F	Breast	yes	Breast	Lung		Breast	Lung adeno	Yes	Yes	
MADE	F	Colon	yes	Colon	Pancreas		Colon	Pancreas	Yes	Yes	
FOGE	M	Head & Neck	yes	Head & Neck	Lung		Upper SCC	Colon	Yes	Yes	
GOAS	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal	Breast		Ovarian Carcinoma	Arms or Skin SCC	Yes	Yes	
ADV	M	Lung	no	Lung			Upper SCC	Lung adeno	Yes	Yes	
ANAN	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma	Breast	Yes	Yes	
BRV	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma	Breast	Yes	Yes	
AMO	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma	TCC	Yes	Yes	
ROSO	F	Ovary peritoneal	yes	Ovary peritoneal			Ovarian Carcinoma	Lung adeno	Yes	Yes	
MRFA	F	Breast	yes	Breast			Breast	TCC	Yes	Yes	
NRHANG	F	Breast	yes	Breast			Breast	TCC	Yes	Yes	
BECS	F	Breast	yes	Breast			Breast	Upper SCC	Yes	Yes	
PAJE	M	Lung	no	Lung	Pancreas		Breast	Arms or Skin SCC	No	No	No
CAU	M	Head & Neck	no	Head & Neck	Lung		TCC	Pleural Mesothelioma	No	No	No
HAMA	F	Head & Neck	no	Head & Neck	Breast	Lung	Melanoma		No	No	N/A
AVI	F	Pancreas	no	Lung	Pancreas		Upper SCC		No	No	N/A
LOS	M	Head & Neck	no	Head & Neck	Skin	Lung	Biliary Tract		No	No	N/A
CB	M	Lung	no	Lung			TCC		No	No	N/A
NAPPE	M	Lung	no	Lung			Arms or Skin SCC		No	No	N/A

Microarrays de miARN

[1901] A Novel microRNA-Based Test Demonstrate above 90% Accuracy in Classification of Metastatic Tumors from Patients Diagnosed with Carcinoma of Unknown Primary

Next-Generation Sequencing

Mats Sanden, George Pentheroudakis, Brianna St. Cyr, Anna Goussia, Danit Lebanony, Katerina Stoyianni, Alexander Faerman, George Fountzilas, Lahav Cohen, Vassiliki Malamou-Mitsi, Nicholas Pavlidis. Rosetta Genomics Inc., Philadelphia, PA; Ioannina University Hospital, Ioannina, Greece; Rosetta Genomics Ltd., Rehovot, Israel; Hellenic Cooperative Oncology Group, Athens, Greece.

Tuesday, March 20, 2012 9:30 AM. Poster Session III # 267.

Se ha desarrollado un test basado en microarrays que mide la expresión de 64 microARNs como herramienta para determinar el tejido de origen de neoplasias de primario desconocido.

Se analizaron 92 pacientes (93 muestras, de las que 85 fueron válidas para el estudio).

El test asignó un único tejido de origen en 50 muestras y dos posibles orígenes con uno de ellos más probable en otros 34 pacientes. Frente al 70% de filiación conseguida con los datos clínicos y patológicos, el test por sí solo pudo determinar el origen en el 83% de los casos.

Microarrays de miARN

[462] microRNAs as Prognostic Biomarkers in Malignant Melanoma

Marie S Abi Daoud, Paulo Nuin, Jiamen Chen, Xiao Zhang, Harriet Feilloter, Victor A Tron. Queen's University, Kingston, ON, Canada

Monday, March 19, 2012 11:45 AM. Platform Session: Section F.

Con la plataforma de microarray Agilent miRNA se generó un perfil global de expresión de miARN en 66 melanomas primarios para analizar el papel regulador de estas moléculas en el melanoma.

Numerosos miARN mostraron asociación entre la disminución de su expresión y factores clinicopatológicos de enfermedad agresiva. En particular, la disminución de expresión de miR-150 y de miembros de la familia miR-200 se asociaron significativamente a melanoma de mayor espesor y con elevados índices mitóticos.

Conclusión: El nivel de expresión de miARNs analizado en el tumor primario puede ser empleado para pronosticar la evolución clínica del melanoma.

Marcadores

[591] EGFR Expression and V600E BRAF Mutations Influence Disease Progression in Thyroid Carcinoma

Kevin E Fisher, Charles E Hill, Cora Foulks, Collin J Weber, Jyotirmay Sharma, Cynthia Cohen. Emory University, Atlanta, GA.

Monday, March 19, 2012 9:30 AM. Poster Session I Stowell-Orbison/Surgical Pathology Awards Poster Session # 97.

Se analizaron 79 carcinomas tiroideos para expresión de EGFR, mutación V600E de BRAF, mutaciones del exon 21 y deleciones del 19 de EGFR mediante pirosecuenciación.

No se detectaron mutaciones o deleciones de EGFR pero sí sobreexpresión, que se asoció a recurrencia en la variante de céls de Hurthle y metástasis ganglionares en el carcinoma papilar.

Las mutaciones de BRAF V600E se asociaron a metástasis gangliones y disminución de la supervivencia.

Marcadores

[1797] Pilocytic Astrocytomas with Infiltrating Patterns of Growth Carry a High Rate of BRAF V600E Mutation

Gokul Kandala, Sergui Bannykh, Sean Fan, Kevin Baden, Andy Pau, Lara Baden, Patricia Fournier, Erica Thorpe, Kathy Porpora, James Mirocha, Kevin Kawachi, Amin Riley-Portuges, Jean Lopategui. Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA. Tuesday, March 20, 2012 2:15 PM. Platform Session: Section F.

Prendían evaluar si los astrocitomas pilocíticos de crecimiento infiltrativo se asocian a una alteración específica a nivel de BRAF, para lo cual analizaron 19 casos de astrocitoma pilocítico infiltrativo (5 en pacientes con NF1) y los compararon con otros 18 casos localizados. La mutación V600E se detectó mediante PCR aleloespecífica y la duplicación de la región 7q34 (indicativa de fusión BRAF-KIAA1549) mediante FISH.

Se detectó alteración de BRAF en 17 /37 casos. 6 casos contenían la mutación V600E. Mutación y duplicación fueron mutuamente excluyentes, excepto en un caso. La mutación se asoció con mayor frecuencia a casos infiltrativos, mientras que la duplicación no fue discriminativa.

Conclusiones: 1. **La presencia de mutación V600E de BRAF parece relacionarse con el patrón infiltrativo en los astrocitomas pilocíticos en pacientes no-NF1.**

2. **La duplicación del gen se presenta tanto en casos infiltrativos como en localizados.**

3. **Son raras las alteraciones de BRAF en astrocitomas pilocíticos de pacientes con NF1.**

Marcadores

[1789] Low Rate of IDH1 R132H Mutation in Adult Non-Supratentorial Low and Intermediate Grade Diffuse Gliomas

Benjamin Ellezam, Lindsey Heathcock, Gregory N Fuller, Janet M Bruner, Kenneth D Aldape.

University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX

Tuesday, March 20, 2012 1:45 PM. Platform Session: Section F, Tuesday Afternoon

Para evaluar la presencia de mutaciones en Isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mediante inmunohistoquímica (R132H) en gliomas difusos (G II y III) infratentoriales se analizaron 33 gliomas de tronco encefálico, cerebelo y médula espinal.

Solo tres casos mostraron positividad inmunohistoquímica para la mutación de IDH1, 2 tumores cerebelosos y uno troncoencefálico.

En contraste con los gliomas supratentoriales, que en su mayoría muestran mutaciones detectables por inmunohistoquímica y en los que esta técnica es de utilidad diagnóstica, en los infratentoriales la alteración es muy poco frecuente, revelando una biología diferente en estas neoplasias según su localización.

Marcadores

[1762] The p53 Negative Regulator MDM4 Is Amplified and Over-Expressed in Hepatoblastoma

Angshumoy Roy, Kayuri U Patel, Kristy L Hamilton, Xinyan Lu, Milton J Finegold, Dolores Lopez-Terrada. Baylor College of Medicine, Houston, TX

Monday, March 19, 2012 2:45 PM. Platform Session: Section E, Monday Afternoon

Ya que las mutaciones de p53 en hepatoblastomas son muy poco frecuentes, los autores analizan la posible inactivación de la vía supresora de p53 por la amplificación/sobreexpresión de MDM4/MDM2.

Se analizaron mediante FISH y real time-qPCR 26 casos de hepatoblastoma. La técnica de FISH demostró que MDM4 estaba amplificado en el 38,4% de los casos, y mediante qPCR se detectó sobreexpresión del mismo en el 38%. La expresión de la diana transcripcional de p53, p21 estaba “down-regulated” en 7/21 casos (33%), lo que sugiere una supresión de la vía p53 posterior a la sobreexpresión de MDM4.

Conclusión: la amplificación/ganancia de copias de MDM4 y su sobreexpresión es un mecanismo frecuente por el que un p53 wild-type puede ser inactivado en los hepatoblastomas. Su interés radica en que existen estudios que muestran que se podría restablecer la función de p53 mediante pequeñas moléculas inhibidoras que interrumpieran las interacciones MDM4/MDM2/p53.

Marcadores

[39] Clinicopathological and Prognostic Significance of Akt-mTOR and MAPK Pathways and Antitumor Effect of mTOR Inhibitor in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor

Makoto Endo, Nokitaka Setsu, Yusuke Takahashi, Takeaki Ishii, Kenichi Kohashi, Hidetaka Yamamoto, Sadafumi Tamiya, Shuichi Matsuda, Yukihide Iwamoto, Michiyuki Hakozaiki, Hiroshi Iwasaki, Yoshinao Oda. Kyushu University, Fukuoka, Japan; Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, Japan; Fukuoka University, Fukuoka, Japan

Monday, March 19, 2012 9:30 AM. Poster Session I Stowell-Orbison/Surgical Pathology Awards Poster Session # 10.

Investigan la posible activación de las vías Akt-mTOR y MAPK en MPNSTs en busca de potenciales dianas terapéuticas.

Se estudiaron 99 pacientes mediante inmunohistoquímica y Western-blotting, encontrando que las formas fosforiladas de Akt (p-Akt), p-mTOR, p-p70S6K, p-S6RP, p-4E-BP1, HIF-1 α y p-Erk1/2 aparecían en 59.7%, 48.8%, 62.8%, 54.3%, 62.8%, 74.4% y 72.9% de los MPNST. Lo que se correlacionaba con los WB. Estos casos correspondían a los de grado histológico más alto, localización más profunda, mayor índice divisional y alto Ki67.

Marcadores

[39] Clinicopathological and Prognostic Significance of Akt-mTOR and MAPK Pathways and Antitumor Effect of mTOR Inhibitor in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor

Makoto Endo, Nokitaka Setsu, Yusuke Takahashi, Takeaki Ishii, Kenichi Kohashi, Hidetaka Yamamoto, Sadafumi Tamiya, Shuichi Matsuda, Yukihide Iwamoto, Michiyuki Hakozaiki, Hiroshi Iwasaki, Yoshinao Oda. Kyushu University, Fukuoka, Japan; Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, Japan; Fukuoka University, Fukuoka, Japan

Monday, March 19, 2012 9:30 AM. Poster Session I Stowell-Orbison/Surgical Pathology Awards Poster Session # 10.

Paralelamente, realizaron estudios de sensibilidad al Everolimus (inhibidor de mTOR) en 6 líneas celulares de MPNST, observando que provocaba una inhibición de la proliferación celular dependiente de la concentración y de la invasión y migración celular a muy baja dosis.

Conclusión: La activación de la vía Akt-mTOR se asocia en los MPNST a progresión maligna y mal pronóstico. La inhibición de mTOR con Everolimus muestra efectos antitumorales, lo que le hace candidato a diana terapéutica en estas neoplasias.

Marcadores

[1953] Aurora Kinase Inhibitors as a Novel Targeted Drug Therapy for Bladder Cancer

Ning Zhou, Kamini Singh, Alex Almasan, Donna E Hansel. Cleveland Clinic, Cleveland, OH
Monday, March 19, 2012 11:30 AM. Platform Session: Section G2.

Se evaluó la expresión de genes asociados a la mitosis, incluyendo las aurora quinasas A y B en carcinoma vesicales uroteliales y escamosos con el fin de determinar potenciales dianas terapéuticas.

Se realizaron microarrays de ARN y reverse-transcriptase PCR en 17 carcinomas, demostrándose en los tejidos tumorales sobreexpresión de 13 transcritos relacionados con el control de las mitosis (prevención de segregación anómala de los cromosomas), incluyendo las aurora quinasas A y B.

Paralelamente, analizaron el efecto de inhibidores de aurora quinasas (ZM447439 y MLN8237) en dos líneas celulares de carcinomas de vejiga, observando que detenían la proliferación y provocaban mitosis anormales

Conclusión: Varias proteínas que controlan las mitosis están sobreexpresadas en los carcinomas vesicales y son una diana potencial para fármacos inhibidores de aurora quinasas.

Background

- Radial scars are breast lesions of uncertain pathogenesis that are associated with a two-fold increased risk of breast cancer compared to controls
- Activating point mutations in *PIK3CA* are found in 25-30% of invasive breast cancers; however, they have not previously been investigated in most non-carcinomatous lesions, including radial scars
- We sought to evaluate radial scars for known mutations commonly seen in invasive breast cancer

Design

- Sixteen surgical cases containing 24 distinct lesions were identified from pathology archives (2002-2010)
- Radial scars were associated with a spectrum of epithelial morphology ranging from columnar cell change to invasive carcinoma (Table 1)
- Lesional tissue was macro-dissected from unstained paraffin sections
- Genomic DNA was then extracted and screened for a panel of known hotspot mutations using PCR and mass-spectroscopy analysis (643 point mutations in 53 genes, including 41 substitutions in 23 *PIK3CA* codons)
- Results were then confirmed with conventional Sanger sequencing with or without locked nucleic acid (LNA) suppression

Results

Figure 1 (below): Schematic of *PIK3CA* domains and mutations; exon 9 is in the helical domain, while exon 20 is in the kinase domain.
Modified from: Troxell M, *J Clin Exp Invest Pathol* 2012, in press.

PIK3CA Domains & Hotspot Mutations

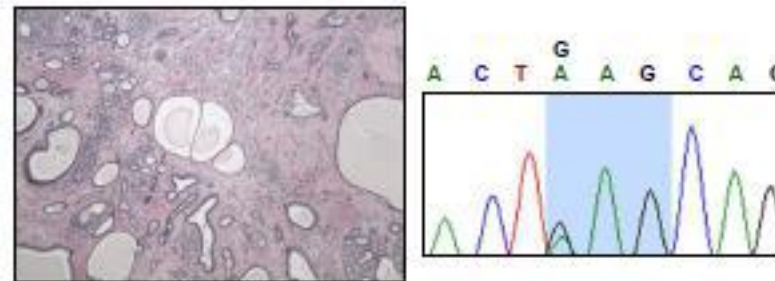
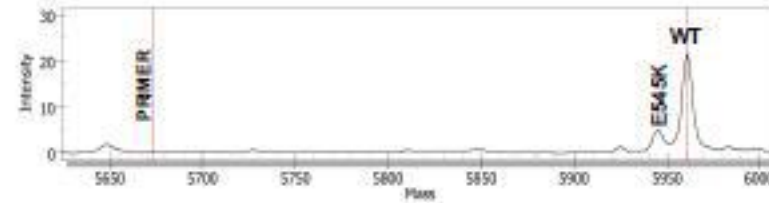
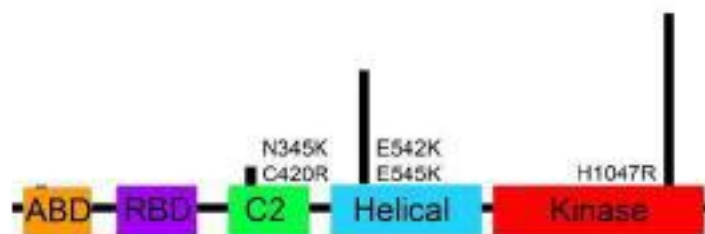


Figure 2 (above): A radial scar without atypia and *PIK3CA* E545K mutation, showing mass-spectroscopy analysis, H&E image, and LNA sequence.

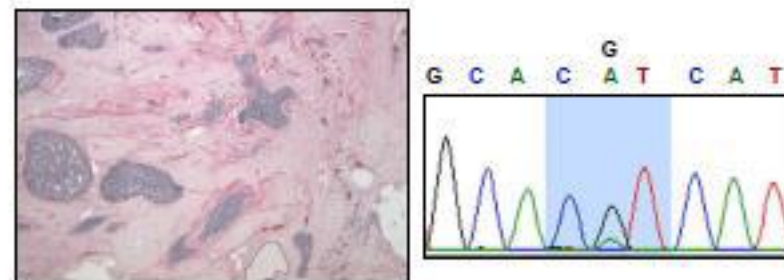
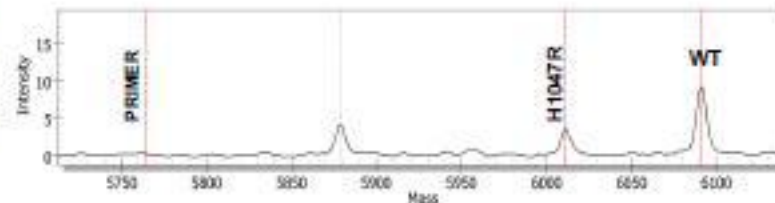


Figure 3 (above): A radial scar with associated atypia and *PIK3CA* H1047R mutation, showing mass-spectroscopy analysis, H&E image, and LNA sequence.

Results

- 14/22 (63.6%) of radial scars had mutations in *PIK3CA*
 - 9/16 (56.3%) of radial scars without atypia
 - 5/6 (83.3%) of radial scars with atypia

Lesion	Mutant	Wild-type	TOTAL
Radial Scar, No atypia	9	7	16
Radial Scar, Atypia	5	1	6
Invasive ductal carcinoma	0	1	1
Metastatic carcinoma in lymph node	1	0	1
TOTAL	15	8	24

Table 1 (above): Presence or absence of *PIK3CA* mutations based on epithelial morphology associated with radial scars. Non atypical epithelium includes columnar cell change; usual ductal hyperplasia, adenosis. Atypical includes atypical ductal hyperplasia, flat epithelial atypia, ductal carcinoma in situ.

Lesion	H1047R	G1049R	E542K	E545K	TOTAL
Radial Scar, No atypia	5	2	1	1	9
Radial Scar, Atypia	5				5
Invasive ductal carcinoma					0
Metastatic carcinoma	1				1
TOTAL	11	2	1	1	15

Table 2 (above): Types and frequency of *PIK3CA* mutations based on epithelial morphology associated with radial scars.

- In a single patient, 2 of 3 radial scars without atypia as well as metastatic carcinoma each had mutations in *PIK3CA* H1047R.
- Results amended from abstract to reflect additional data.

Conclusions

- In this study, 63.6% of radial scars showed mutations in *PIK3CA*, which is notably higher than the 25-30% mutation frequency of invasive breast cancer
- This finding raises interesting questions as to the role of *PIK3CA* in breast cancer development
- Additional larger studies are indicated to confirm and extend these observations in understanding the pathogenesis of radial scars and their relationship to breast cancer

Marcadores

[296] Frequent PIK3CA Mutations in Radial Scars

Katie Wolters, Daphne Ang, Andrea Warrick, Carol Beadling, Christopher Corless, Megan Troxell.
Oregon Health & Science University, Portland, OR

Monday, March 19, 2012 9:30 AM. Poster Session I Stowell-Orbison/Surgical Pathology/Autopsy Awards Poster Session # 44

Son lesiones de patogénesis incierta y doble riesgo de carcinoma que los controles. Las mutaciones de PIK3CA se detectan en 25-30% de los carcinomas de mama infiltrantes, aunque no se han estudiado en otras lesiones mamarias.

Analizan 16 casos con 24 cicatrices radiales mediante PCR y análisis de espectrometría de masas para 643 mutaciones en 53 genes, incluyendo AKT1/2/3, BRAF, CDK4, CTNNB1, EGFR, ERBB2, FBX4, FBXW7, FGFR1/2/3/4, GNAQ, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1/2/7, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET, SOS1y TP53.

De las 24 lesiones, 12 (50%) contenían mutaciones de PIK3CA (11 mutaciones H1047 en exón 20 y una mutación E545K en exón 9). Las restantes 12 lesiones eran wild-type para todos los genes analizados.

Conclusión: La presencia de mutaciones de PIK3CA en el 50% las cicatrices radiales, más elevada que en los carcinomas infiltrantes, subraya el papel de este gen en la carcinogénesis mamaria.