

**XXVI CONGRESO DE LA SEAP/IAP  
CURSO CORTO BIOMARCADORES**

**Coordinador: Santiago Ramón y Cajal  
Hospital Universitario Vall d'Hebron**

El objetivo del curso es dar una visión práctica del estudio de Biomarcadores y, de su importancia en los tumores de mama, tubo digestivo y pulmón.

En estos tres grupos de tumores participaran los patólogos más implicados en la validación y realización de las guías clínicas, desarrolladas en nuestro entorno.

En todas las presentaciones, la idea es presentar:

- 1) En primer lugar, los principales biomarcadores descritos y validados en la clínica.
- 2) En segundo lugar, discutir el algoritmo clínico-patológico vigente.
- 3) En tercer lugar, resumir la problemática del estudio de biomarcadores en los respectivos tipos de tumores, con especial énfasis en:

- A) La dinámica en la realización del estudio de los biomarcadores: Es decir, Cuando realizarlos? Según criterios de los clínicos, según las oncogías, en tumores primarios vs metástasis, Donde realizar el estudio de Biomarcadores? Criterios de las oncogías, otras sugerencias ...y Como realizar dicho estudio?, que técnica es la más apropiada ..
- B) La gestión de la muestra. Cada vez más importante en tumores de pulmón y en todos los casos tratados con protocolos neoadyuvantes. Un reto y desafío inminentes
- C) Las perspectivas del estudio de los biomarcadores y el problema de la heterogeneidad tumoral molecular

Por último, se presentara un resumen práctico del estudio del genKRAS como paradigma del estudio molecular de biomarcadores y esperamos tener al final una discusión con los ponentes y con todos los que estéis interesados en participar.

## **Actualización en biomarcadores y guía de recomendaciones en el carcinoma de mama**

Dr. Federico Rojo

IIS - Fundación Jiménez Díaz, Madrid

Los factores pronósticos se pueden definir como una característica clínica o biológica del tumor que correlaciona con la supervivencia global o supervivencia libre de enfermedad, e informan de la evolución de la enfermedad, idealmente, en ausencia de tratamiento. Los factores pronósticos no proporcionan información del posible beneficio terapéutico de un paciente ante un tratamiento determinado. Los factores predictivos, sin embargo, se definen como una característica clínica o biológica de las células tumorales que correlaciona con la respuesta a un determinado tratamiento y proporciona información acerca de la eficacia del mismo, sin importar la evolución clínica de la enfermedad.

Un factor pronóstico adecuado es aquel que permite seleccionar qué pacientes no precisan tratamiento debido a un pronóstico favorable, mientras que un factor predictivo adecuado es aquel que identifica qué pacientes responderán al tratamiento, incrementando la tasa de respuesta al máximo en aquellos pacientes que precisan un tratamiento. No existen parámetros biológicos ni clínicos que cumplan de forma global con estos requisitos, sin embargo, en la práctica clínica se emplea de forma habitual la esta información con el objetivo de proporcionar recomendaciones adaptadas a cada uno de los pacientes.

Las decisiones relacionadas con el uso de terapia adyuvante sistémica se han basado en el estadiaje clínico tradicional, incluyendo el grado histológico, evaluación de estado ganglionar y la presencia de metástasis, junto a la identificación y clasificación del subtipo específico del tumor. Estos parámetros son útiles para el diagnóstico inicial e información general relacionada con el pronóstico, pero están limitados en su capacidad para predecir respuesta al tratamiento y/o riesgo de recurrencia a largo plazo.

La incorporación a los laboratorios de Anatomía Patológica de técnicas relativamente sencillas y estandarizadas como la inmunohistoquímica (IHQ), las técnicas de hibridación in situ (ISH) o la PCR cuantitativa (RT-PCR) para la detección de micrometástasis en ganglios linfáticos axilares o de expresión de determinados genes han permitido la universalización de este tipo de marcadores en el manejo de la paciente con cáncer de mama. Sin embargo, en la actualidad, se aceptan únicamente como herramientas o marcadores pronósticos y predictivos clínicamente validados, la evaluación de receptores hormonales -los receptores de estrógeno y de progesterona (ER y PR, respectivamente)- y la sobreexpresión/amplificación del receptor HER2. Otros marcadores predictivos o pronósticos aún están en discusión y no hay un consenso claro para su indicación clínica.

### **Los receptores de estrógenos y progesterona**

La valoración del estado de ER y PR en el cáncer de mama se considera como el mejor marcador pronóstico y predictivo en esta enfermedad. El análisis de la expresión de estos receptores en las células tumorales se realiza de forma rutinaria en los laboratorios de Anatomía Patológica mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica basadas en el uso de anticuerpos extremadamente específicos y con una alta sensibilidad, condiciones que permiten trabajar sobre secciones de tejido fijados en formol y embebidos en parafina. Aunque no todos los anticuerpos disponibles en el mercado reúnen las mismas características, se acepta el uso de una amplia gama de clones para los receptores hormonales con criterios de calidad suficientes.

Sin embargo, el valor predictivo de la determinación de ER y PR no alcanza el 90% por dos principales causas. En primer lugar, las técnicas de inmunohistoquímicas son ensayos escasamente normalizados en la práctica real. A pesar de los enormes esfuerzos de diversos suministradores de anticuerpos de estandarizar las condiciones del ensayo y proporcionar reactivos de alta sensibilidad, las condiciones preanalíticas del tumor, entre las que se incluyen el manejo de la muestra en el quirófano, su procesamiento en el laboratorio y su almacenamiento. También las condiciones del ensayo influyen enormemente en los resultados obtenidos. Y finalmente, la variabilidad inherente al observador o patólogo que interpreta la técnica y al criterio de evaluación, así como en la definición de un punto de corte o umbral a partir del cual se considera un tumor como positivo. En publicaciones recientes se ha descrito sensibilidad a tratamiento inhibidores de la aromatasas incluso en tumores con rangos de expresión de ER que hasta la fecha se han considerado como negativos para el receptor. Sin embargo, además de la estandarización antes mencionada, se están realizando importantes esfuerzos en formación y en la creación de programas de calidad promovidos por las sociedades científicas para garantizar unos mínimos de calidad. En segundo lugar, el valor predictivo de la determinación de ER y PR puede estar mermada por las características del marcador. La expresión de la proteína del propio receptor no garantiza la hormonodependencia de la célula tumoral. Recientemente se han descrito firmas genéticas o grupos de genes relacionados con los ER que modulan la biología de la célula y su metabolismo en función de la presencia de estrógenos. El valor potencial de estos grupos de genes en ensayos clínicos prospectivos será un importante punto de investigación en los próximos años.

En 2010, la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) y el Colegio Americano de Patólogos (CAP) publicaron conjuntamente unas guías o recomendaciones basadas en un documento consenso de un panel de expertos, que tratan de establecer unos requisitos mínimos de calidad y de estandarización en la determinación de ER y PR en cáncer de mama. Uno de las conclusiones principales del trabajo es la definición de un estándar de expresión de ER y PR basado en la evidencia clínica, ante la ausencia de un estándar oro (*gold standard*) analítico, al contrario de lo que sucede en la determinación de HER2, en la que se dispone del FISH como técnica con mayor correlación con el beneficio clínico a trastuzumab.

Un esfuerzo reconocido por estos autores es la reciente comercialización de ensayos aprobados por la FDA tratando de garantizar una mayor estandarización de los resultados, asegura una mayor reproducibilidad e incorpora reactivos con una alta sensibilidad para las proteínas de interés. La razón para estos esfuerzos se deriva de la pobre correlación de la inmunohistoquímica con los resultados de ensayos basados en la medida de RNA mensajero de ambos receptores mediante técnicas de RT-PCR, además de una falta de reproducibilidad de resultados entre laboratorios que alcanza un 9-12% según las series revisadas.

Un punto crucial es la definición de un test como positivo para el receptor a estudio. Los umbrales de positividad originariamente se basaron en los años 70 en técnicas de unión a ligando (*ligand-binding assay*, LBA) y el riesgo de enfermedad metastásica. Una cifra de 10 fmol/mg de proteína citosólica se aceptó como punto de corte de positividad para los ER, aunque cantidades inferiores parecían correlacionarse con respuesta a tratamientos anti-estrogénicos. En los años 90, diversos estudios demostraron que el uso de la IHQ podía ser superior a las técnicas basadas en LBA para predecir la respuesta a la terapia hormonal. Publicaciones recientes han definido poblaciones con beneficio clínico con tumores con

expresión de los receptores en tan sólo un 1% de las células neoplásicas, confirmándose en varios ensayos clínicos comparando la IHQ con técnicas de expresión génica de *ERS1*. El porcentaje de células con presencia detectable del ER podría convertirse así en un factor pronóstico y predictivo de respuesta semi-cuantificable para la supervivencia, la supervivencia libre de progresión, supervivencia a 5 años, tiempo a fallo del tratamiento, respuesta al tratamiento hormonal y tiempo a la recidiva, mientras que los niveles de PR correlacionarían con supervivencia global, tiempo a la progresión y respuesta al tratamiento hormonal. Aunque algunos estudios han demostrado que la presencia de PR añade valor predictivo a los ER, otros trabajos parecen indicar que PR podría ser un factor predictivo independiente en algunas series, en especial en mujeres postmenopaúsicas. En cualquiera de las situaciones, de nuevo el 1% de células tumorales con expresión del receptor parece ser el punto de corte para definir el caso como positivo. Además, se recomienda el uso de sistemas de cuantificación de la expresión normalizados, como el Hscore o el sistema Allred.

En todo caso, la sensibilidad de los anticuerpos empleados en los test basados en técnicas de inmunohistoquímica puede ser el factor más determinante en la correcta identificación de los casos con baja expresión de los receptores. Las recomendaciones publicadas establecen una relación de los reactivos de laboratorio que cumplen con unos criterios de suficiente calidad para garantizar unos resultados reproducibles y con un nivel de detección aceptable. Además de este aspecto clave en la rutina de los laboratorios, el documento de consenso establece una serie de recomendaciones fundamentales en relación a las variables pre-analíticas que pueden modificar los resultados, como el método de obtención de las biopsias, el procesamiento de las muestras en el laboratorio o las características de la conservación en los archivos, y unas recomendaciones en relación a las variables post-analíticas, sobre todo en la interpretación de los resultados. Este último punto tiene como objetivo unificar los criterios en las diversas fuentes de datos que permitan comparaciones más poderosas en el futuro.

### **El receptor HER2**

El receptor HER2 en cáncer de mama se considera actualmente parte de la evaluación estándar en todas las pacientes con esta enfermedad. La sobreexpresión de este receptor en la superficie de las células tumorales o la amplificación del gen que lo codifica confiere una ventaja en su crecimiento y capacidad de diseminación, confiriendo una mayor agresividad a estas neoplasias. Esta alteración se detecta en un 15-20% de los tumores de mama. Existen sólidas evidencias que demuestran la utilidad de HER2 como factor pronóstico en cáncer de mama. Además es un factor predictivo de respuesta a los tratamientos específicos contra el receptor, además de parecer predecir la respuesta a la quimioterapia y al tratamiento hormonal.

En los últimos años se han desarrollado terapias específicas contra HER2, entre ellas trastuzumab o lapatinib, además de una nueva generación de fármacos como T-DM1 o pertuzumab. Trastuzumab es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado con capacidad de unión selectiva al receptor HER2. Lapatinib es un inhibidor de la actividad tirosina-quinasa del receptor. Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal contra el dominio de dimerización de HER2 con otros receptores, impidiendo su formación. T-DM1 es una molécula conjugada de trastuzumab con un agente quimioterápico (Emtansina) citotóxico. El uso de estos fármacos se indica en el tratamiento de tumores de mama con sobreexpresión o amplificación de HER2 determinados mediante un método exacto y validado. Uno de los

retos para el uso de HER2 como factor pronóstico y predictivo en cáncer de mama ha sido establecer unos métodos de valoración con suficiente reproducibilidad y que permitan discriminar el estatus del receptor de forma fiable. Las dos técnicas más comúnmente utilizadas para valorar HER2 son: 1) la IHQ, que mide los niveles de expresión de la proteína HER2, y 2) la hibridación in situ, generalmente con marcaje fluorescente (FISH), que detecta la amplificación del gen HER2.

Las pruebas basadas en la IHQ deben de ser capaces de detectar los niveles de expresión de HER2 superiores a los presentes en las células normales. Se ha debido de crear, por tanto, un test semi-cuantitativo lo suficientemente robusto, que proporciona una interpretación de la expresión de HER2 basada en la intensidad de tinción o expresión y el porcentaje de células teñidas. En los criterios de interpretación de esta técnica se definen cuatro puntuaciones, considerando como positivos aquellos tumores con una puntuación de 3+ y que presentan una tinción intensa con patrón de membrana completa en las células tumorales infiltrantes en al menos el 30% de la superficie del tumor. Aquellos casos con patrón semejante pero con intensidad moderada o débil, definidos como 2+, serían candidatos al estudio de gen.

La valoración de la amplificación génica de HER2 mediante técnicas de ISH se realiza en aquellos casos con un resultado para la expresión del receptor mediante IHQ sea no concluyente ó 2+. Las pruebas de ISH están diseñadas para detectar el número absoluto de señales de HER2 en cada célula, o para calcular el ratio de señales de HER2 con respecto al número de señales del cromosoma 17, que contienen el gen de dicho receptor. Se considera un caso como amplificado cuando el número absoluto de copias es superior a 6 copias del gen por célula o cuando el ratio HER2/cromosoma 17 es igual o superior a 2.2. La no amplificación sigue unos criterios de menos de 4 copias de HER2 por célula o un ratio o cociente inferior a 1.8, estableciendo una última categoría de casos indeterminados entre los valores antes descritos, en los que se recomienda una segunda determinación. Estas pruebas se basan en marcajes con oligonucleótidos específicos del gen marcados con fluoróforos (FISH) o con sustancias ópticamente visible (CISH, SISH).

Diversos estudios han demostrado un alto nivel de concordancia entre la sobreexpresión de patrón 3+ y la amplificación detectada por ISH, así como de negatividad en la expresión (puntuaciones de 0 y 1+) y ausencia de amplificación. En una comunicación reciente, el grupo de Dowsett ha demostrado una concordancia del 99.3% para los casos HER2 negativos y del 94.1% para los sobreexpresados. Además, diversos ensayos clínicos avalan esta clasificación, quedando los casos que muestran beneficio clínico en el tratamiento con trastuzumab confinados al grupo de tumores con sobreexpresión 3+ o amplificación del gen. En un segundo estudio que ha analizado un total de 2.913 muestras de cáncer de mama tanto por FISH como por IHQ ha encontrado un valor predictivo positivo de la amplificación detectada por FISH y/o una sobreexpresión 3+ por IHQ del 91,6%, con un predictivo negativo de la IHQ 1+ del 97,2%. En este estudio, la sensibilidad de la IHQ fue del 92,6% y la especificidad del 98,8%.

Un problema en estudio está en relación a la alta discordancia existente entre niveles de expresión detectados como 2+ y la presencia de amplificación positiva del gen mediante FISH. En este sentido, un estudio reciente con 216 muestras de tumores 2+ encontró que sólo 26 muestras (12%) presentaban una amplificación real del gen HER-2 mientras que 54 muestras (25%) mostraban una duplicación de HER2, 4 (2%) una delección y 123 muestras (57%) ninguna anomalía aparente del gen. En vista de estos resultados y otros, la

recomendación firme es determinar el estado del gen HER2 mediante ISH en todos los tumores con niveles de expresión no concluyentes.

Por otra parte, no se conoce la importancia de una expresión normal del receptor HER2 a nivel proteico (0 ó 1+) y presencia de amplificación del gen HER2, detectable hasta en un 5% de los tumores con estos niveles de expresión, o el valor relativo que tienen los diferentes grados de amplificación de HER2 en las respuestas al trastuzumab. Ambos aspectos están en investigación en la actualidad. Una cuestión adicional a estudio está en relación al momento de la determinación del estado de HER2. Mientras que la expresión de ER y PR puede modularse o ser discordante entre la observada en un tumor primario y la enfermedad diseminada, diversos estudios parecen avalar que la expresión/amplificación de HER2 está conservada en la evolución de la enfermedad hasta en un 97% de los tumores, por lo que puede recurrirse a muestras de archivo para determinar HER2.

Debido a que la determinación del receptor HER2 es, actualmente, un procedimiento estándar para todos los tumores de mama es imprescindible la normalización y los controles de calidad de los procedimientos. Los informes iniciales del National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-31 y del North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) N9831 han demostrado diferencias en los resultados de la valoración de HER2 entre laboratorios locales y laboratorios centrales. El estudio NCCTG N9831 inicialmente mostró discrepancias del 23% entre diferentes laboratorios, aunque otros estudios las reducen a un 5-12%.

Tanto la determinación por IHQ y el FISH tienen desventajas bien conocidas, entre ellas la subjetividad de la interpretación, la dependencia del observador, las inherentes a la propia prueba y la importancia de todas las variables pre-analíticas de obtención, procesamiento y conservación de la muestra en los resultados obtenidos. Por ello se está trabajando en técnicas alternativas cuantitativas robustas para la determinación del estado de receptor HER2, como comentaremos más adelante.

La tasa de respuesta observada en las pacientes tratadas trastuzumab únicamente alcanza un 35%, destacando la necesidad de identificar marcadores predictivos adicionales o complementarios en este grupo de pacientes. Entre estos marcadores se apunta a la expresión de otros receptores de la misma familia, como HER3 o HER4, que heterodimerización con el propio HER2, alteraciones en la cascada de señalización PI3K-AKT, presencia de receptores de otras familias, como IGF1R, o a la presencia de formas truncadas del receptor HER2.

#### Perfiles de expresión génica y biomarcadores en cáncer de mama

El uso de las tecnologías de microarrays de ADN tiene un potencial casi ilimitado en la detección de marcadores de diagnóstico, pronósticos y predictores de respuesta al tratamiento en el cáncer de mama. Su aplicación permite distinguir casos de cáncer de mama esporádicos de los asociados a mutaciones de BRCA, clasificar molecularmente el cáncer de mama, definiendo subtipos de fenotipo luminal y basal e identificar nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos específicos. Además, como estas plataformas de microarrays permiten el estudio simultáneo de las interacciones entre multitud de genes, ayudan a proporcionar una visión completa de procesos biológicos implicados en la carcinogénesis.

La RT-PCR ha permitido estudios cuantitativos de expresión de genes en distintas neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos en los últimos años. De forma general, en esta técnica se construye un DNA complementario (cDNA) a partir de los

moldes de RNA mensajero de interés, obtenidos de los tejidos. Este cDNA se somete a una posterior amplificación, siguiendo una PCR convencional pero con una estimación del número de copias generadas en tiempo real, estableciendo una medida real del gen de interés. En este sentido, el OncotypeDX es ensayo multiplexing (análisis simultáneo de varias dianas) de 21 genes, basado en RT-PCR, que aporta información pronóstica y predictiva de respuesta al tratamiento sistémico. Esta prueba, que puede ser realizada sobre muestras archivadas parafinadas de cáncer de mama primario, estudia 16 genes relacionados con proliferación celular, invasividad y actividad de los receptores de estrógenos y de HER2/neu, calculando un riesgo o puntuación de recurrencia (RS) que determina el índice de recidiva de la enfermedad a los 10 años. Se aplica sobre pacientes con expresión de receptores de estrógenos y ganglios linfáticos negativos, asignando un riesgo estratificado de tres categorías: bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo. De esta forma, las pacientes con alto riesgo serían candidatas a quimioterapia adyuvante, reduciendo el riesgo de recaída. Existen estudios recientes que parecen demostrar la capacidad del test de predecir un beneficio a un régimen de quimioterapia adicional también en pacientes con ganglios positivos.

Los microarrays de expresión génica han sido ampliamente utilizados en los últimos años en diversos estudios sobre muestras de cáncer de mama para tratar de definir alteraciones en las funciones celulares, las vías bioquímicas, la actividad de proliferación y sus mecanismos de regulación en los tumores. Estas tecnologías requieren el uso de extractos de ARNm a partir de muestras frescas o congeladas y están siendo actualmente optimizadas sobre muestras parafinadas. Aspectos importantes en estas tecnologías son el tipo de muestra o calidad de la misma empleada, debido a que el perfil transcripcional obtenido es una suma de todos los componentes del tejido, por lo que la relativa heterogeneidad del tumor, el componente benigno epitelial de la muestra y el estromal puede dar perfiles significativamente diferentes y la necesidad de interpretación de los resultados mediante análisis matemáticos no normalizados. Se están diseñando ensayos multigénicos basados en microarrays pronóstico, predictivos de respuesta a la terapia hormonal y predictores de respuesta a quimioterapia citotóxica. El ensayo MammaPrint, comercializado y diseñado por Agendia, es el primer test multigénico totalmente comercializado sobre un microarray para el cáncer de mama. Esta prueba está ideada como un ensayo pronóstico puro para las mujeres de menos de 61 años, con o sin expresión de receptores de estrógenos, y ganglios linfáticos negativos. La prueba fue desarrollada originalmente en el Cancer Institute de Ámsterdam, trabajando como laboratorio central y elaborando la plataforma desde una colección de las muestras congeladas de pacientes con cáncer de mama y empleando el microarray de ADN Rosetta Inpharmatics, comercializado por Agilent (Agilent Technologies). Este ensayo incluye el análisis de expresión de 70 genes relacionados con la proliferación, con los mecanismos de invasión tumoral, el proceso de metástasis, la integridad del estroma y la angiogénesis. El MammaPrint ha sido validado por el Consorcio Europeo de Centros de Cáncer de Mama, TRANSBIG, a partir de una cohorte de pacientes e identificando a partir de su uso una población de bajo riesgo cuando el algoritmo de cálculo determinaba un 90% de probabilidades de estar libre de enfermedad durante un mínimo de 5 años, y una población de alto riesgo, susceptible de beneficiarse de un tratamiento adyuvante con quimioterapia. Este estudio del Consorcio TRANSBIG también constató que el MammaPrint estratificaba a las pacientes con cáncer de mama con una potencia mayor que cualquiera de los criterios clínicos utilizados habitualmente. El perfil o firma genética de Rotterdam, basado en un microarray de expresión de 76 genes derivado

del Affymetrix U-133, se desarrolló como un ensayo pronóstico en el Centro de Cáncer de la Universidad de Erasmus, Rotterdam, y está comercializado por Veridex. Sus 76 genes no coinciden con ninguno de los incluidos en el OncotypeDX o en el MammaPrint. La validación de este ensayo se realizó en cuatro centros de cáncer europeos sobre pacientes con cáncer de mama y ganglios linfáticos negativos, independientemente de la condición de receptores hormonales, prediciendo la recurrencia en pacientes con ER-positivos tratadas con tamoxifeno. El ensayo NuvoSelect (Nuvera Bioscience, Inc.) está orientado a predecir la respuesta a quimioterapia sobre muestras de tejido u obtenidas por punción aspiración. Un conjunto seleccionado de 30 genes, que incluye proteínas asociadas a los microtúbulos tau, parece predecir la respuesta completa a la neoadyuvancia con paclitaxel, 5-fluorouracilo, doxorubicina y ciclofosfamida, mientras que un segundo conjunto de 200 genes, predice la respuesta a 5 años del tratamiento hormonal.

Recientemente se está acumulando un importante número de evidencias sobre una plataforma que permite clasificar los tumores de mama en subtipos moleculares o intrínsecos siguiendo la clasificación de Perou y colaboradores, a partir de la expresión de 50 genes, denominado PAM50. Esta aproximación se va a comercializar en un futuro inmediato sobre una plataforma nCounter, que requiere mínimas cantidades de RNA y permite ser aplicada sobre material parafinado. Los estudios han validado la capacidad pronóstica del test en todos los subgrupos de pacientes con cáncer de mama y están identificándose datos positivos de respuesta a determinados esquemas terapéuticos que contengan antraciclinas, taxanos o tratamiento anti-estrogénico, tanto en adyuvancia como en neoadyuvancia.

Además de estas aproximaciones, desde los laboratorios de investigación debe darse respuesta a las interrogantes que surgen al observar poblaciones de pacientes que presentan una resistencia inherente o adquirida a una determinada terapia, bien sea biológica o bien sea basada en quimioterapia. Es importante, por tanto, identificar nuevos predictores de respuesta al tratamiento basados en el uso de biomarcadores únicos o de combinaciones de los mismos, que informen no sólo de la historia natural de la enfermedad (marcador pronóstico), sino de la sensibilidad del tumor a un determinado tratamiento. Así, desde modelos celulares y animales pueden crearse hipótesis de trabajo a partir de marcadores que diferencien poblaciones con distinta sensibilidad a un tratamiento y que serán validadas en series amplias de pacientes, de forma ideal con un abordaje prospectivo. Probablemente, en un futuro próximo viviremos un cambio en el paradigma del diagnóstico y del tratamiento del cáncer al incorporar todos estos conocimientos.



## **Actualización en biomarcadores y guía de recomendaciones en carcinomas de pulmón**

Dr José Javier Gómez Román

Servicio de Anatomía Patológica

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

Santander

El cáncer de pulmón es una enfermedad extremadamente prevalente y grave con una incidencia en aumento sobre todo en pacientes de sexo femenino. Se calcula que en 2012 el cáncer de pulmón producirá el 29% de todas las muertes por cáncer entre hombres y el 26% en mujeres en USA. Desde el punto de vista anatomopatológico seguimos usando una clasificación (OMS 2004) que utiliza fundamentalmente criterios basados en hallazgos de piezas quirúrgicas, algo que no parece lógico cuando el 70% de los casos se diagnostican en biopsias pequeñas o citologías. Algo debería cambiar en nuestra forma de diagnosticar, ya que con los nuevos criterios que usan técnicas auxiliares rutinariamente, entidades como el carcinoma de células grandes están llamadas a disminuir en su frecuencia e incluso a desaparecer, mientras que los hallazgos morfológicos se convierten en la base sobre la que construir un algoritmo de técnicas moleculares con implicaciones terapéuticas.

Por tanto, parece preciso una **revisión de nuestros criterios diagnósticos** ya que como ha quedado recogido en diversos textos y consensos el **Diagnóstico morfológico es el primer y esencial biomarcador**.

Por otro lado, ante la explosión del número de biomarcadores en cáncer podemos comprobar como es necesario un trabajo desde la base para no implantar técnicas que pueden no responder a las expectativas clínicas. Nuestra recomendación siempre ha sido la de utilizar aquellos biomarcadores de utilidad clínica contrastada, es decir los que tienen un valor predictivo en cuanto a determinar una respuesta terapéutica concreta.

En este sentido, los biomarcadores que actualmente debemos implantar en la práctica diaria en cáncer de pulmón son las mutaciones de EGFR y el reordenamiento de ALK.

En este breve texto, revisaré las principales novedades en este campo que vienen dadas por el conocimiento de las bases moleculares de dichas mutaciones y su fisiopatología.

Así, en el caso de **EGFR**, Erlotinib y Gefitinib (TKIs) se unen al lugar de unión con ATP de EGFR con lo que compiten en la activación y fosforilación de la ruta molecular. Las mutaciones en EGFR son de tres clases:

- Clase I. Deleciones en exón 19 (44%)
- Clase II. Mutaciones puntuales. L858R (exón 21) (41%), G719X (exón 18) (4%), Otras missense (exónes 21 y 18) (6%)
- Clase III. Inserciones / Deleciones exón 20 (5%)

Como es fácil observar, las **mutaciones en EGFR son múltiples** y no todas están relacionadas con respuesta a tratamiento con TKIs. Existen 207 combinaciones diferentes de las que 149 están relacionadas con control de enfermedad, 42 de ellas con progresión, y 16 con resistencia adquirida

La técnica a utilizar es cualquiera que nos proporcione información acerca del **estado mutacional**, con las limitaciones propias de cada técnica con respecto a sensibilidad y necesidad de celularidad tumoral mutada sobre un fondo celular wild-type.

Existe todavía cierta controversia acerca del **FISH y la IHQ** que son capaces de detectar amplificación o sobreexpresión con anticuerpos validados y que pueden seleccionar ciertos pacientes para tratamiento con Cetuximab (anticuerpos) dentro de ensayos clínicos muy controlados, algo que parece lógico hablando de sobreexpresión proteica susceptible de ser inhibida por anticuerpos. Sin embargo, la norma general es la de detectar el estado mutacional de EGFR como elemento de ayuda al diagnóstico ya que la mayor parte de los estudios muestran relación de la respuesta al tratamiento con las mutaciones en los exones 19 y 21 de EGFR.

Otra cuestión a considerar es la incógnita de los **Carcinomas de células escamosas**. Existe un estudio del grupo del Memorial Sloan-Kettering que publica 95 casos de carcinomas escamosos verificados (p63+/TTF1-) en el que encuentran un 0% de casos mutados en EGFR. Los casos "raros" de escamosos con mutación de EGFR fueron reevaluados y correspondieron a 10 adenoescamosos, 5 adenocarcinomas pobremente diferenciados y un solo caso no concluyente. Así pues, parece poco probable la existencia de carcinomas escamosos puros con mutación en dicho oncogén

Otro de los problemas a los que nos enfrentamos en la actualidad es el de las resistencias adquiridas a los inhibidores de la actividad tirosin-quinasa. Para ello nos resultará de utilidad conocer la definición de **resistencia adquirida**:

- El paciente deberá haber recibido un tratamiento previo como agente único con un TKI. Deberá presentar un Carcinoma de pulmón con una mutación que le hace sensible a TKI ó haber demostrado un beneficio clínico objetivo de tratamiento con TKI. El paciente deberá haber demostrado una progresión sistémica de la enfermedad mientras continuaba con tratamiento con Gefitinib o Erlotinib en los últimos 30 días. Y por último no deberá haber recibido ningún otro tratamiento desde el cese del TKI y la iniciación del nuevo tratamiento

¿Cuáles son los factores que se relacionan con la aparición de resistencias? El mayor porcentaje de resistencias (50%) se debe a la mutación **T790M** en el exón 20. La mutación T790M se encuentra en el dominio catalítico y proporciona mayor afinidad para la unión con ATP con lo que revierte el efecto de los TKIs (reduce su potencia). Los T790M parece por otro lado que tienen mejor supervivencia y se han descrito casos aislados donde coexisten la mutación T790M con reordenamientos de ALK con lo que resulta obligada su determinación en el caso de detección de dicha mutación.

La sobreexpresión o amplificación de **MET** (mouse epidydimal transcriptome) o de su ligando (factor de crecimiento hepatocitario) está involucrada en la resistencia a TKIs en un 18% de los casos a través de un mecanismo de activación paralelo de Her3 o de KRAS

Otros mecanismos de resistencia son las **inserciones en el exón 20** que proporcionan una supervivencia similar a los tumores EGFRwt, la transformación en un **Carcinoma de células pequeñas combinado** o las mutaciones en **PI3K**.

Es importante destacar que existen nuevos fármacos de segunda generación inhibidores irreversibles de EGFR con actividad frente a Her2, Her4 (Afatinib, Dacomitinib, XL647)

así como otros fármacos como los inhibidores de mTOR (Everolimus, temsirolimus) o de IL-6/JAK/STAT (Enzastaurin) por lo que resulta extremadamente importante detectar el tipo de alteración molecular que subyace en una resistencia al tratamiento. Por tanto, es preciso en muchas ocasiones **REBIOPSIAR A LOS PACIENTES** y analizar nuevamente el estado mutacional de EGFR.

El segundo biomarcador a determinar en la actualidad es el reordenamiento del gen **ALK**. El gen ALK se encuentra en el cromosoma 2 y en un porcentaje variable de cánceres de pulmón sufre una inversión con reordenamiento y fusión con otros genes de los que el más frecuente es EML4.

El mecanismo molecular parece estar mediado porque ALK adquiere actividad intracitoplasmática. Aunque parece que todos los dominios de EML4 contribuyen al potencial oncogénico es necesario un residuo de Lys en la posición 589 en el dominio kinasa de ALK para que éste sea transformante

También existen discrepancias en cuanto al punto de ruptura de EML4 ya que algunos artículos hablan que el punto está siempre en el intrón 20 y que la porción citoplasmática siempre está conservada, mientras que existen descripciones de fusiones con el intrón 13 (variante 1).

La presencia de EML4 lo que hace es facilitar la oligodimerización constitutiva de ALK y por tanto su actividad disregulada como kinasa. Existen otras posibles fuentes de fusión TRK-fused gene (TFG 3q12.2), KIF5B (10p11.22) con ALK.

Tampoco está claro si se trata de una inversión simple y de hecho, la pérdida de señal en FISH se considera positiva con un **patrón atípico** además de haberse descrito patrones anómalos de ruptura con fusión.

La alteración molecular originada es compleja ya que existen además descripciones de ganancias y amplificaciones en el gen ALK que proporciona imágenes complicadas de analizar mediante la técnica de FISH. Dichas alteraciones parecen no asociarse con la expresión de la proteína por IHQ.

Existe controversia acerca del **método** que se debe utilizar para la detección del reordenamiento de ALK ya que existen varios anticuerpos en el mercado así como varias sondas de FISH. Existe un documento de consenso europeo donde se estipula que la opción más eficiente es la de utilizar inmunohistoquímica y en los casos negativos no sería necesaria una confirmación por otras técnicas (FISH), mientras que los casos positivos deberían ser reanalizados por FISH. Este hecho se debe a la concordancia que se presenta en dicho consenso de un 100% entre la negatividad por IHQ y por FISH en un metaanálisis. Sin embargo, existe un trabajo de un grupo español donde se cuestiona este hecho y se presenta un caso negativo por IHQ y positivo por FISH. En aras de la eficiencia parece oportuno realizar como primera opción un estudio por inmunohistoquímica reservando el FISH para la confirmación de los casos positivos.

En cuanto al tema de las **resistencias** al tratamiento con Crizotinib también aparecen y en concreto se describen casos con resistencia adquirida a través de una mutación L1196M en el lapso de un año tras tratamiento, por ganancias en el número de copias de ALK además de los ya mencionados casos con mutaciones EGFR y ALK

No debemos olvidar por otra parte que la droga Crizotinib inhibe además otras dianas como

RET, ROS1, MET y RON que pueden ser diagnosticadas en muestras de rutina por medio de FISH si bien aparecen en un porcentaje muy pequeño de casos

Y para finalizar me gustaría hacer alguna reflexión sobre los biomarcadores en cáncer de pulmón. En primer lugar, ¿Qué necesitamos en este momento? La respuesta está en identificar el resto de genes driver en adenocarcinomas que supone alrededor del 50% de los casos. Además debemos incorporar al arsenal diagnóstico y terapéutico el carcinoma escamoso y el carcinoma de células pequeñas, involucrando a la investigación clínica a desarrollar fármacos con diana conocida y susceptible de ser determinada en muestras clínicas

Y en segundo lugar, una reflexión acerca del mercado del diagnóstico molecular, que se estima crecerá de manera importante en estos próximos años. Nuestra especialidad es la diana de este crecimiento y nosotros somos responsables de su incorporación a la rutina, sin que esto suponga un gasto irreflexivo pero al mismo tiempo salvaguardando la necesidad de progreso y de avance en el tratamiento del cáncer de pulmón.

#### **ALGUNAS REFERENCIAS DE UTILIDAD**

1. Yu H, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, Kris MG, Miller VA, Ladanyi M, Riely GJ. Analysis of Mechanisms of Acquired Resistance to EGFR TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res.* 2013 Mar 7. [Epub ahead of print]
2. Erik Thunnissen, Lukas Bubendorf, Manfred Dietel, Göran Elmberger, Keith Kerr, Fernando Lopez-Rios, Holger Moch, Wlodzimierz Olszewski, Patrick Pauwels, Frédérique Penault-Llorca, Giulio Rossi. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendation. *Virchows Arch* DOI 10.1007/s00428-012-1281-4
3. Martinez P, Hernandez-Losa J, Montero MA, Cedres S, Castellvi J, et al. (2013) Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry as Diagnostic Methods for ALK Positive Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *PLoS ONE* 8(1): e52261. doi:10.1371/journal.pone.0052261
4. MacConaill LE. Advancing Personalized Cancer Medicine in Lung Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136:1210–1216

## **ACTUALIZACION EN BIOMARCADORES Y GUIA DE RECOMENDACIONES EN TUMORES DEL APARATO DIGESTIVO**

**DR. SAMUEL NAVARRO**

**Departamento de Patología, Universitat de valencia  
Hospital Clinico Universitario de Valencia**

En los últimos años se ha resaltado la importancia de la determinación de biomarcadores en el cáncer avanzado del tubo digestivo. Dos de las neoplasias con mayor prevalencia y mortalidad son el cáncer gástrico y el cáncer colorrectal.

La colaboración oncólogo-patólogo se hace indispensable para la determinación de biomarcadores con impacto pronóstico-terapéutico.

En el cáncer gástrico la determinación del estatus de Her-2, al igual que ocurre en cáncer de mama ha condicionado la necesidad de establecer unas recomendaciones basadas en la experiencia de los expertos oncólogos y patólogos, tanto nacionales como internacionales para iniciar un tratamiento como el Trastuzumab.

La decisión consensuada establece el uso de la inmunohistoquímica con los kits aprobados por la FDA y EMEA (Herceptest y Pathway), que detectan la expresión de Her-2 cuya evaluación difiere si se realiza en biopsias endoscópicas o en especímenes quirúrgicos.

Además, en cáncer gástrico avanzado se están usando dianas terapéuticas como el Bevacizumab (anti VEGF), anti EGFR como el Panitumumab, inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR como el Everolimus e inhibidores de la vía c-met como el Rilotumumab.

Respecto al carcinoma colorrectal algunas pautas consensuadas entre la SEAP y la SEOM, recomiendan la determinación de inestabilidad de microsatélites en el carcinoma colorrectal localizado ya que es un factor predictivo para decidir tratamiento adyuvante.

Por el contrario, existen firmas de expresión genica como Coloprint y Oncotype Dx que aunque demostraron un valor pronóstico, no existe todavía consenso en su práctica clínica.

En el carcinoma colorrectal avanzado, la determinación del estado mutacional de K-ras es indispensable antes de iniciar un tratamiento con anti receptor del factor de crecimiento epidérmico como el Cetuximab y el Panitumumab. Sin embargo la determinación de otros marcadores como las mutaciones de BRAF, EGFR, PI3K o PTEN no debe llevarse a cabo de forma rutinaria ya que hoy no influye en la planificación del tratamiento.

Las recomendaciones en las guías de consenso publicadas incluyen requisitos organizativos y controles de calidad que deben existir para la adecuada determinación de los diferentes biomarcadores así como las implicaciones legales que se deben tener en cuenta.

## **Aproximación práctica al estudio de KRAS y otros biomarcadores.**

### **Javier Hernández Losa**

El objetivo de esta exposición es sintetizar y hacer hincapié en los diferentes puntos clave que se realizan, en cada una de las diferentes determinaciones moleculares basadas en PCR tanto en la fase pre-analítica, analítica y post-analítica.

En la primera de las fases se enfatizará en el proceso de extracción del ADN, donde se realizará un repaso de los diferentes métodos que se usan en la actualidad y como se puede optimizar dicho paso para obtener resultados satisfactorios en cada una de las determinaciones que se vayan a realizar con posterioridad.

Dentro de la fase analítica, la exposición se centrará en la elección del método o técnica a emplear a la hora de realizar el estudio de los marcadores. A lo largo de la charla se debatirá sobre la implantación de técnicas realizadas en los propios laboratorios, frente a la implantación del uso de kits diagnósticos. Además se realizará una exposición de las características de algunos de los kits más usados en los diferentes laboratorios de Anatomía Patológica, así como una visión de los próximos kits que están por llegar al laboratorio y que actualmente están pendientes de validación.

En la fase post-analítica, existen dos puntos clave necesarios de debatir como son:

- a) la redacción del informe de las determinaciones moleculares,
- b) la implantación de un sistema de control de calidad para garantizar en la medida de lo posible los resultados obtenidos en cada uno de los laboratorios que las realizan.

En esta exposición, se comentaran con detalle los diferentes sistemas de control de calidad que existen en la actualidad y las diferentes normativas de certificación y/o acreditación disponibles en España.