



Biomarcadores en cáncer colorrectal: metaloproteinasa 7 en pacientes intervenidos y mutaciones tras progresión a terapias anti-EGFR en enfermedad metastásica

Alejandro Martínez Fernández

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**BIOMARCADORES EN CÁNCER COLORRECTAL:
METALOPROTEINASA 7 EN PACIENTES INTERVENIDOS Y
MUTACIONES TRAS PROGRESIÓN A TERAPIAS ANTI-EGFR EN
ENFERMEDAD METASTÁSICA.**

Tesis presentada por

Alejandro Martínez Fernández

para aspirar a la titulación de Doctor en Medicina

Directores de la tesis:

Dr. Joan Albanell Mestres

Dra. Clara Montagut Viladot

Tutora de Tesis

Dr. Pere Gascón Vilaplana

Programa de Oncología Molecular y Translacional

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Barcelona, 2014

I. RESULTADOS

IV.I MMP-7 COMO FACTOR PRONÓSTICO EN CÁNCER COLORRECTAL RESECABLE

IV.I.I PACIENTES

Desde julio de 2003 hasta diciembre de 2004 se identificaron 217 posibles pacientes que cumplían los criterios de inclusión del estudio. De ellos, 190 firmaron el consentimiento informado y autorizaron realizar la extracción de sangre periférica para la determinación de MMP-7. De éstos, 15 fueron excluidos al no presentar histología tumoral compatible con adenocarcinoma colorrectal. Los 175 pacientes restantes se incluyeron en el análisis y el seguimiento al cumplir todos los criterios de inclusión.

Nueve de los 175 pacientes incluidos presentaron pérdida de seguimiento. Cinco de estos fueron pérdidas tardías al producirse más allá de los treinta meses de seguimiento. Dos de los pacientes se perdieron a los 18 meses por causas desconocidas, y otros dos realizaron el seguimiento de su neoplasia colorrectal en otro centro médico. Todos estos pacientes se incluyeron en el análisis utilizando la fecha de la última visita como momento para ser censurados en el estudio.

Las características de los pacientes se resumen en la tabla 3. La edad mediana fue de 71 años, con un rango de 31 a 90 años. La mayoría de los pacientes

fueron resecados utilizando técnicas laparoscópicas (85.1%) y la mediana de ganglios linfáticos identificados fue de 14.

Variables	Total (n=175)	MMP-7<4.3 (n=87)	MMP-7≥4.3 (n=88)	P
Edad mediana (rango)	71 (31-90)	64 (31-88)	75 (40-90)	<0.001
Género masculino (%)	103 (58.9%)	51 (58.6%)	52 (59.1%)	0.950
Laparoscopia (%)	149 (85.1%)	81 (93.1%)	68 (78.2%)	0.008
Ganglios analizados (mediana)	14	14	14	0.950
CEA (mediana)	3.1	2.3	4.2	<0.001
Localización (%)				
Colon ascendente	37 (22.3%)	13 (16%)	24 (28.2%)	
Colon transverso	9 (5.4%)	5 (6.2%)	4 (4.7%)	
Colon descendente	11 (6.6%)	4 (4.9%)	7 (8.2%)	
Colon sigmoide	64 (38.6%)	36 (44.4%)	28 (32.9%)	
Recto	45 (27.1%)	23 (28.4%)	22 (25.9%)	0.264
Estadio T (%)				
T1	27 (15.6%)	18 (20.7%)	9 (10.5%)	
T2	20 (11.6%)	15 (17.2%)	5 (5.8%)	
T3	88 (50.9%)	40 (46.0%)	48 (55.8%)	
T4	38 (22.0%)	14 (16.1%)	24 (27.9%)	0.010
Estadio N (%)				
N0	108 (62.4%)	56 (64.4%)	52 (60.5%)	
N1	42 (24.3%)	21 (24.1%)	21 (24.4%)	
N2	23 (13.3%)	10 (11.5%)	13 (15.1%)	0.766
Bilirrubina (mediana)	0.5	0.5	0.5	0.928
Creatinina (mediana)	1.0	1.0	1.1	0.002
Tratamiento adyuvante (%)	73 (41.7%)	43 (58.9%)	30 (41.1%)	0.061
Tratamiento neoadyuvante (%)	33 (18.9%)	20 (23%)	13 (14.8%)	0.181

Tabla 3: Determinación de MMP-7. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Para minimizar posibles variaciones en la concentración de MMP-7 por un efecto temporal, la extracción de MMP-7 debía realizarse por protocolo dentro de los 10 días previos de la cirugía. Un total de 123 muestras se obtuvieron en el mismo día de la cirugía, 30 el día previo y 22 entre los 2 y 10 días anteriores.

La mediana de la concentración de MMP-7 en sangre periférica obtenida fue de 4.3 ng/ml (rango 0.2 a 19 ng/ml). Cuando se divide la muestra atendiendo al valor mediano de MMP-7 (inferior a la mediana versus superior y/o igual a la mediana) se observaron algunas diferencias entre ambos grupos: los pacientes con valores de MMP-7 igual o superiores a 4.3 ng/ml tenían mayor edad (mediana 75 versus 64 años, $P<0.001$), mayor concentración de Antígeno Carcinoembrionario (CEA) en sangre (mediana 4.2 versus 2.3 ng/ml; $P<0.001$) y mayor proporción de tumores T3 y T4 (83.7% versus 62.1%, $P=0.01$). Además de estos factores, existían otras diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, como la concentración de creatinina o el tipo de cirugía realizada.

Dado que MMP-7 está relacionada en procesos inflamatorios y de cicatrización, se analizaron los pacientes que presentaban infecciones postquirúrgicas o reintervenciones. No se objetivaron diferencias significativas en la concentración plasmática de MMP-7 en los 26 pacientes que presentaron infecciones postquirúrgicas ni en los 14 pacientes que requirieron una segunda intervención.

IV.1.II PAPEL PRONÓSTICO DE MMP-7

La mediana de seguimiento al considerarse cerrado el estudio fue de 45 meses, presentando un rango que comprendía de uno a 59 meses. De entre los 175 pacientes reclutados, en trece no se disponía de alguna variable predeterminada para el análisis multivariante, por lo que estos pacientes fueron excluidos de este análisis en particular.

En relación a la supervivencia libre de enfermedad (SLE), el análisis univariante señaló a las siguientes variables como potenciales factores pronósticos: estadio T, estadio N, tipo de cirugía realizada (cirugía laparoscópica versus abordaje por laparotomía), localización del tumor y concentración plasmática de MMP-7. Al realizar el análisis multivariante ajustado por estas variables se obtuvo que MMP-7 predecía de manera independiente la recurrencia o muerte de los pacientes (supervivencia libre de enfermedad), presentando una Hazard Ratio (HR) igual a 1.119 (Intervalo de Confianza, IC 95%=1.038-1.207; P=0.004). Otras variables asociadas a menor supervivencia libre de enfermedad fueron la presencia de afectación ganglionar por el tumor (N1 o N2) y la localización anatómica, teniendo peor pronóstico los tumores localizados en el recto (Tabla 4).

Variables	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad	1.019	0.998-1.042	0.079			
Género						
Femenino	1					
Masculino	1.103	0.653-1.861	0.714			
Estadio N						
0	1			1		
1-2	2.168	1.288-3.649	0.004	2.378	1.334-4.239	0.003
Estadio T						
T1	1			1		
T2	1.018	0.228-4.550	0.981	0.498	0.103-2.401	0.385
T3	2.630	0.926-7.469	0.069	1.351	0.437-4.117	0.601
T4	5.005	1.709-14.66	0.003	2.207	0.702-6.936	0.175
Adenopatías resecaadas	0.983	0.950-1.018	0.342			
Localización tumoral						
Colon ascendente	1			1		
Colon transverso	1.938	0.597-6.295	0.271	2.062	0.521-8.164	0.302
Colon descendente	1.902	0.637-5.678	0.249	2.516	0.800-7.918	0.115
Colon sigmoideo	0.929	0.411-2.103	0.860	1.313	0.531-3.246	0.555
Recto	2.297	1.057-4.993	0.036	3.448	1.417-8.082	0.004
CEA	1.005	0.992-1.018	0.491			
Tratamiento adyuvante	1.279	0.757-2.160	0.357			
Cirugía laparoscópica	0.455	0.245-0.845	0.013	0.562	0.280-1.127	0.105
MMP-7	1.125	1.055-1.200	<0.001	1.119	1.038-1.207	0.004

Tabla 4: Determinación de MMP-7. Estudio uni y multivariante de la supervivencia libre de enfermedad.

Debido a que MMP-7 fue introducido en el análisis como variable continua, el valor de la Hazard Ratio hace relación al aumento del riesgo por cada unidad numérica. Es decir, es posible concluir con el valor de la Hazard Ratio=1.119 que el incremento de MMP-7 en 1 ng/ml en suero incrementa el riesgo de recidiva o muerte en un 11.9%.

La concentración de MMP-7 en sangre periférica previa a la cirugía es también predictor de la supervivencia global (HR=1.113; IC 95% = 1.025-1.209). Otros parámetros independientes en este análisis fueron edad y presencia de adenopatías afectadas por la neoplasia (Tabla 5).

Variables	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Edad	1.054	1.023-1.086	0.001	1.040	1.006-1.075	0.021
Estadio N						
0	1			1		
1-2	1.719	0.931-3.175	0.156	1.971	1.022-3.799	0.043
Estadio T						
T1	1			1		
T2	0.646	0.118-3.527	0.613	0.488	0.085-2.802	0.421
T3	1.779	0.613-5.162	0.290	1.092	0.352-3.383	0.879
T4	2.864	0.933-8.790	0.066	1.125	0.321-3.951	0.854
CEA	1.004	0.989-1.021	0.581			
Tratamiento adyuvante	0.775	0.412-1.460	0.430			
Cirugía laparoscópica	0.402	0.197-0.819	0.012	0.496	0.222-1.110	0.088
MMP-7	1.164	1.088-1.245	<0.001	1.113	1.025-1.209	0.011

Tabla 5: Determinación de MMP-7. Análisis uni y multivariante de la Supervivencia Global.

Tal y como estaba predefinido, se clasificaron los pacientes según presentar MMP-7 inferior a la mediana de 4.3 ng/ml, o MMP-7 igual o superior a este valor. Posteriormente se analizaron las variables de supervivencia dentro de cada grupo.

Los pacientes con MMP-7 reducida (inferior a la mediana) presentaban una supervivencia libre de enfermedad a 4 años del 78.4%, mientras que en los pacientes con MMP-7 elevada (superior a la mediana) era de 50.6%; siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) (Figura 18).

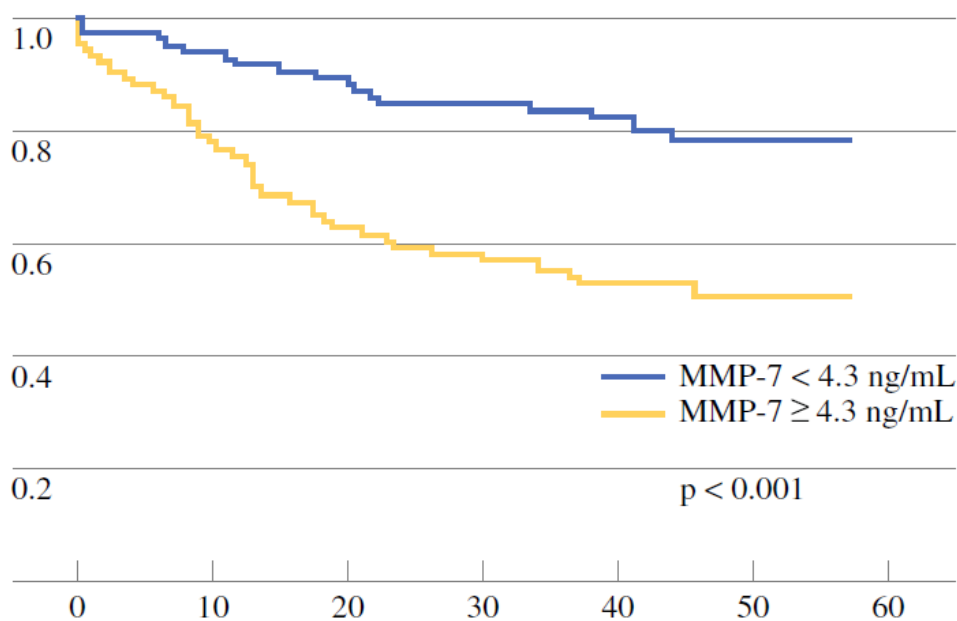


Figura 18: Representación mediante curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad de acorde con la concentración de MMP-7. Eje x: tiempo en meses.

Respecto la supervivencia global de los pacientes, la supervivencia a 4 años fue del 92.6% en el grupo de MMP-7 reducida; mientras que en el grupo de MMP-7 elevada del 56.9% ($P < 0.001$) (Figura 19).

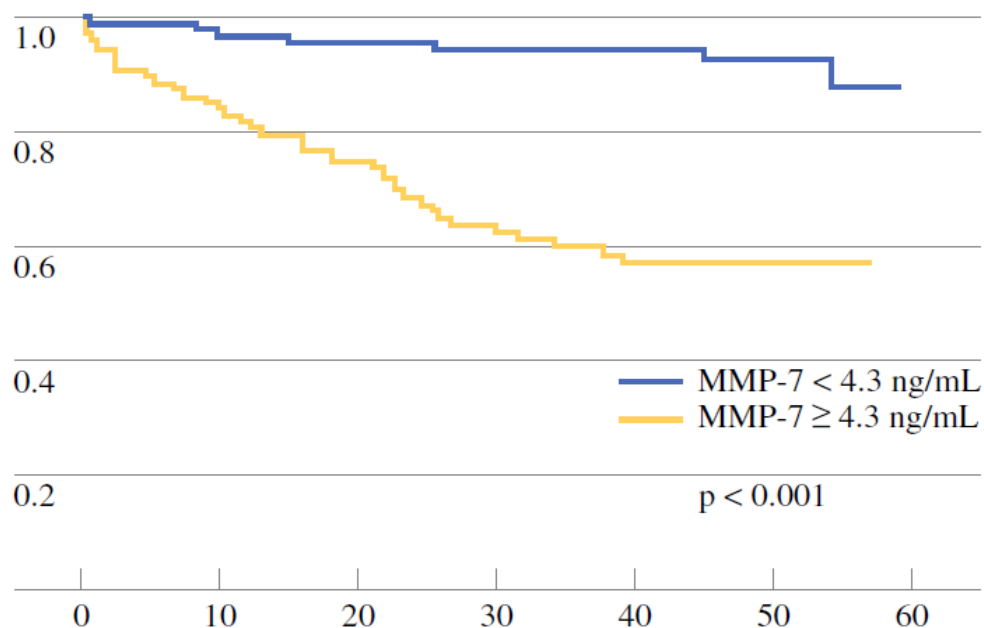


Figura 20: Representación mediante curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global de acorde con la concentración de MMP-7. Eje x: tiempo en meses.

En caso de excluirse los 33 casos de pacientes con cáncer de recto tratados con tratamiento neoadyuvante, la significancia estadística de la magnitud de la diferencia se mantuvo tanto en SLE como en SG ($P < 0.001$) (Tabla 6).

	Toda la muestra (n=175)			Excluyendo neoadyuvancia (n=142)		
	MMP-7<4.3	MMP-7≥4.3	Diferencia	MMP-7<4.3	MMP-7≥4.3	Diferencia
SLE 4 años	78.4%	50.6%	27.8%	84.5%	54.5%	30%
SG 4 años	92.6%	56.9%	35.7%	94.0%	60.6%	29.4%

Tabla 6: Determinación de SLE y SG según MMP-7 en todos los pacientes y excluyendo los pacientes tratados con tratamiento neoadyuvante.

IV.I.III RECIDIVA TUMORAL Y CONCENTRACIÓN DE MMP-7

En el grupo de pacientes con MMP-7 elevada se produjeron 26 recidivas, mientras que en el grupo de MMP-7 inferior a la mediana fueron 16. El análisis estadístico, sin embargo, no mostró que la diferencia entre ambos grupos fuera significativa (29.5% versus 18.4%, $P=0.084$).

El tiempo transcurrido hasta la aparición de la recidiva fue menor en el grupo con MMP-7 elevada (mediana de 8 meses) respecto al grupo con MMP-7 reducida (mediana de 18 meses). Esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa ($P=0.065$). En ambos grupos el patrón de recidiva fue mayoritariamente en forma de metástasis a distancia. No existieron diferencias en cuanto al tratamiento quirúrgico con intención curativa en estos pacientes: 8 (50%) en el grupo con MMP-7 <4.3 ng/ml y 9 (35%) en el grupo con MMP-7 ≥4.3 ng/ml.

Los 42 pacientes que presentaron recidiva tuvieron una mediana de supervivencia tras la recurrencia de 16.7 meses. Al analizar este resultado según los valores de MMP-7 se objetivó que los 16 pacientes con MMP-7 no elevada tuvieron una supervivencia mediana de 46.2 meses. Este valor era significativamente superior a los 9.1 meses de mediana de los pacientes que presentaban MMP-7 elevada ($P=0.001$).

La afectación ganglionar es el principal predictor pronóstico para la recidiva en el cáncer colorrectal. Por este motivo se analizó la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global atendiendo al estado nodal y a la concentración de MMP-7. Debido a que este estudio no fue randomizado, es asumible que exista un desequilibrio de los factores pronósticos en los pacientes clasificados según el valor de MMP-7.

Para evitar este sesgo, se realizó una estimación a través de un modelo multivariante que incluía como potenciales factores pronósticos el estadio T, estadio N, tipo de cirugía y la elevación o no de MMP-7. Con este modelo, se realizó un ajuste según estas variables pronósticas y se clasificaron los pacientes atendiendo a la afectación ganglionar y la elevación o no de MMP-7.

- Los pacientes sin afectación ganglionar y MMP-7 no elevada (factores buen pronóstico) tenían una SLE estimada por este modelo del 95% a un año y el 88% a los 4 años.

- En el caso de presentar ambos factores de mal pronóstico (afectación ganglionar y MMP-7 elevada) la SLE estimada se reducía a 80% en un año y 53% a 4 años.
- Presentar uno de los factores pronósticos conllevaba una SLE intermedia, siendo de 91% a un año y 77% a 4 años en caso de presentar MMP-7 elevada sin afectación ganglionar; y de 89% a un año y 72% a 4 años en el caso de presentar MMP-7 no incrementada pero afectación adenopática (Figura 21 y Tabla 7) .

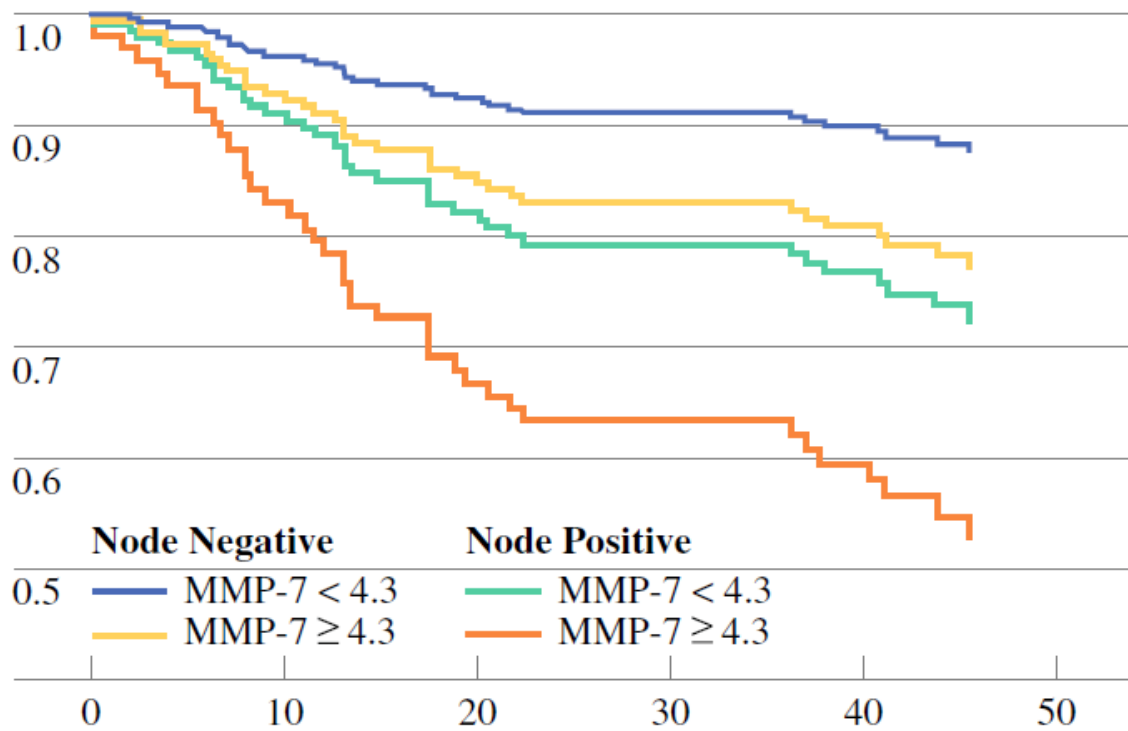


Figura 21: Representación de la predicción de la supervivencia libre de enfermedad mediante un modelo multivariante. Se incluye para el cálculo, además de MMP-7 y la afectación ganglionar, la edad, el estado T y el tipo de abordaje quirúrgico.

	Supervivencia libre de enfermedad (%)	
	1 año (95% IC)	4 años (95% IC)
N negativo, MMP-7 < 4.3	95 (93-98)	88 (83-92)
N negativo, MMP-7 ≥ 4.3	91 (89-93)	77 (73-81)
N positivo, MMP-7 < 4.3	89 (87-91)	72 (68-77)
N positivo, MMP-7 ≥ 4.3	80 (77-82)	53 (49-57)

Tabla 7: Predicción de la supervivencia libre de enfermedad por el modelo multivariante de acuerdo con las variables MMP-7 y afectación ganglionar.

IV.II DETERMINACIÓN DE EVENTOS GENÉTICOS EN PACIENTES RESISTENTES A CETUXIMAB

IV.I.II ANÁLISIS MUTACIONAL

En el estudio se incluyeron un total de 37 pacientes con el diagnóstico de cáncer colorrectal metastásico, que habían adquirido resistencia al tratamiento con cetuximab y de los que se disponía de biopsias pre y post-tratamiento de suficiente calidad para realizar el estudio molecular.

Las biopsias a la progresión se obtuvieron de las siguientes localizaciones: hígado (21 pacientes), pulmón (6 pacientes), hueso (2 pacientes), peritoneo (3 pacientes), tumor primario (3 pacientes), tejido subcutáneo (1 paciente) y nódulo linfático retroperitoneal (1 paciente). Todas las muestras se obtuvieron mediante la guía de técnicas de imagen (ultrasonidos o tomografía computarizada), excepto las lesiones obtenidas a partir del tumor primario, obtenidas mediante la realización de fibrocolonoscopia. En ninguno de los procedimientos realizados para obtener la muestra se produjeron complicaciones graves.

De los 37 pacientes incluidos, en 29 (78%) se identificó algún tipo de evento molecular en la biopsia post-tratamiento. Un tercio de los pacientes presentaba coexistencia de dos o más alteraciones en la misma muestra (rango 2-5 alteraciones). Las mutaciones que más frecuentemente coexistían con otro evento molecular fueron las de *BRAF* y *PIK3CA* (100% de los casos), seguidas

de las mutaciones en *EGFR* (50% de los casos), *NRAS* (40% de los casos) y finalmente *KRAS* (30%). En total, se detectaron 49 alteraciones genéticas (35 mutaciones y 14 amplificaciones) (Tablas 8-10).

ID	Edad	Sexo	Estadio	ILP	Esquema de tratamiento (línea)	Mejor respuesta	Duración de respuesta (semanas)	Biopsia previa a cetuximab	Biopsia posterior a cetuximab
1	69	F	IV		FOLFOX (1)	RP	20	Recto	Hígado
2	78	M	III	74	FOLFIRI (2) †	EE	23	Colon*	Hígado
3	60	M	III	18	Irinotecan (2) †	EE	48	Colon derecho	Pulmón
4	78	M	IV		FOLFIRI (2)	EE	39	Colon derecho	Hígado
5	74	M	IV		- (3)	EE	16	Colon derecho	Hígado
6	45	M	III	15	FOLFIRI (1) ††	EE	42	Recto	Recto
7	52	F	IV		Irinotecan (3)	EE	26	Sigma	Pulmón
8	42	F	IV		Irinotecan (3)	RP	55	Recto	Pulmón
9	52	F	IV		FOLFIRI (2)	RP	41	Sigma	Sigma
10	61	F	IV		FOLFOX (1)	RP	72	Sigma	Hígado
11	61	M	III	23	Irinotecan (2) ††	EE	24	Recto	Pulmón
12	58	M	IV		FOLFOX (1)	RP	34	Recto	Pulmón
13	77	M	IV		Irinotecan (2)	RC	48	Recto	Hígado
14	56	F	III	16	Irinotecan (3) ††	EE	20	Recto	Tejido subcutáneo
15	53	M	IV		Irinotecan (3)	RP	33	Sigma	Sigma
16	60	M	IV		Irinotecan (3)	EE	95	Sigma	Peritoneo
17	62	M	IV		FOLFOX (1)	EE	13	Sigma	Hígado
18	74	F	III	9	FOLFOX (1) †	EE	54	Colon*	Hígado
19	71	F	IV		Irinotecan (3)	EE	51	Colon derecho	Hueso
20	59	M	IV		Irinotecan (2)	RP	25	Colon derecho	Hueso

ID	Edad	Sexo	Estadio	ILP	Esquema de tratamiento (línea)	Mejor respuesta	Duración de respuesta (semanas)	Biopsia previa a cetuximab	Biopsia posterior a cetuximab
21	53	M	IV		FOLFIRI (2)	EE	23	Colon derecho	Hígado
22	51	F	IV		Irinotecan (3)	EE	51	Recto	Hígado
23	52	M	IV		FOLFOX (1)	RP	42	Cecum	Peritoneo
24	40	F	IV		FOLFOX (1)	RP	60	Sigma	Hígado
25	53	M	III	15	Irinotecan (3) [¥]	RP	51	Recto	Hígado
26	49	M	III	20	FOLFIRI (2) [†]	EE	26	Recto	Hígado
27	62	M	IV		FOLFOX (1)	RP	45	Hígado	Hígado
28	65	M	IV		Irinotecan (3)	EE	27	Sigma	Hígado
29	76	M	IV		- (2)	RP	22	Sigma	Hígado
30	80	M	IV		Irinotecan (2)	EE	25	Sigma	Hígado
31	59	M	IV		Irinotecan (4)	RP	52	Recto	Hígado
32	59	M	IV		Irinotecan (3)	RP	36	Recto	Hígado
33	34	M	III	12	Irinotecan (3) [‡]	EE	73	Cecum	Pulmón
34	47	F	III	12	Irinotecan (3) [‡]	EE	21	Recto	Hígado
35	64	F	IV		Irinotecan (3)	EE	22	Sigma	Peritoneo
36	61	M	IV		FOLFOX (1)	EE	23	Colon*	Hígado
37	65	M	III	22	Irinotecan (2) [‡]	EE	78	Sigma	Nódulo linfático

Tabla 8: Características clínicas de los pacientes y esquema de quimioterapia administrado.

ILP: Intervalo libre de Progresión (pacientes tratados con intención curativa al diagnóstico)

† tratados con quimioterapia neoadyuvante; ‡ tratados con quimioterapia adyuvante; ¥ tratados con quimiorradioterapia adyuvante

EE: Enfermedad Estable. RP: Respuesta parcial. RC: Respuesta completa. * localización exacta no descrita. M: Masculino; F: Femenino.

ID	Alteraciones moleculares pre-cetuximab (% de alelos mutados si disponible)					Alteraciones moleculares pre-cetuximab (% de alelos mutados si disponible)				
	KRAS	NRAS	BRAF	PIK3CA	EGFR	KRAS	NRAS	BRAF	PIK3CA	EGFR
1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
3	•	•	V600E	E542K	•	•	•	V600E (5%)	E542K (5%)	•
4	•	•	•	•	•	Q61H [†] (37%) V114I (2%)	•	•	H1047Q [†] (22%)	•
5	•	•	V600E	•	•	•	•	V600E [†]	E545G [†]	•
6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
7	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
8	•	G12S (10%)	F595L (7%)	•	•	•	G12S [†] (28%)	F595L [†] (18%)	•	•
9	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
10	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
11	•	•	•	•	•	•	G60R (2%)	•	•	•
12	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
13	•	•	•	•	•	G12V	•	•	•	•
14	Q61H (2%)	•	•	•	•	Q61H (60%)	•	•	•	•
15	•	•	•	•	•	•	T58I (12%) G60E (12%)	•	•	•
16	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
17	•	•	•	•	•	•	•	•	•	S492R (1%)
18	•	•	•	•	•	G12S (10%)	•	•	•	•
19	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
20	•	•	•	•	•	G12A (9%)	•	•	•	•
21	•	•	•	•	•	G12V [†]	•	•	•	•
22	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
23	•	•	•	•	•	•	•	•	•	S492R
24	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
25	•	•	•	H1047L (13%)	•	•	•	•	H1047L (1%)	•
26	Q61L (14%)	•	•	E545K (11%)	•	Q61L (27%)	•	•	E545K (19%)	•
27	•	•	•	•	•	•	•	•	•	S492R [‡] (25%)
28	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
29	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
30	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
31	•	•	•	•	•	•	•	•	•	K467T [‡] (15%)
32	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
33	•	•	•	•	•	•	G12S (1%)	•	•	•

ID	Alteraciones moleculares pre-cetuximab (% de alelos mutados si disponible)					Alteraciones moleculares pre-cetuximab (% de alelos mutados si disponible)				
	KRAS	NRAS	BRAF	PIK3CA	EGFR	KRAS	NRAS	BRAF	PIK3CA	EGFR
34	•	Q61K (20%)	•	•	•	V114I (2%)	Q61K (40%)	•	•	•
35	•	•	•	E545K (11%) H1047L (14%)	•	•	G12D (2%) G60D (14%)	•	E545K (3%) H1047L (23%)	R451C (6%)
36	•	•	•	•	•	•	•	V600E	•	•
37	•	•	•	E542K	•	•	Q61L [†] (8%)	•	E542K [†] (22%)	•

Tabla 9: Estudio molecular de las mutaciones presentes antes y después del tratamiento con cetuximab.

• estado nativo; [†] mutación detectada en sangre; [‡] mutación no detectada en sangre.

GEN (% de pacientes)	Eventos moleculares (detectados en la muestra post-cetuximab / número presentes también en la muestra pre-cetuximab)								
KRAS (27%)	G12V (2/0) [‡]	G12A (1/0)	G12S (1/0)	Q61H (2/1) [†]	Q61L (1/1)	V114I (2/0)	A146T (1/0)		
NRAS (27%)	G12S (2/1) [†]	G12D (1/0)	T58I (1/0)	G60R (1/0)	G60E (1/0)	G60D (1/0)	Q61L (1/0) [†]	Q61K (1/1)	
BRAF (11%)	F595L (1/1) [†]	V600E (3/2)							
PIK3CA (22%)	E542K (2/2) [†]	E545G (1/0) [†]	E545K (2/2)	H1047 L (2/2)	H1047Q (1/0) [†]				
EGFR (46%)	Amplificación (12/6) [*]	S492R (3/0) [‡]	R451C (1/0)	K467T (1/0) [‡]					
HER2 (5%)	Amplificación (2/2) [*]								

Tabla 10: Resumen de las mutaciones y amplificaciones detectadas en las biopsias pre y post tratamiento. Se recogen los codones mutados. Los números entre paréntesis hacen referencia al número de muestras detectadas post y pre tratamiento.

* La amplificación de EGFR fue evaluada en 20 muestras y la de HER2 en un total de 6; [†] mutación detectada en el suero; [‡] mutación no detectada en suero.

IV.II.II MUTACIONES DE *EGFR*

En una publicación previa se detectó la presencia de la mutación S492R en dos pacientes en el momento de progresar al tratamiento basado en cetuximab. En modelos *in vitro* e *in vivo* se demostró que esta mutación era causante de la resistencia al tratamiento. En este estudio se ha detectado la aparición de la mutación S492R en tres pacientes (8% del total) tras progresión a cetuximab. En dos de ellos, *EGFR* estaba amplificado tanto antes como después de recibir el tratamiento con cetuximab; y en el tercero no se pudo analizar el número de copias de *EGFR* al no disponerse finalmente de suficiente muestra tumoral para el análisis FISH.

La aparición de otras mutaciones diferentes a S492R en el dominio extracelular de *EGFR* podría interferir también con el reconocimiento y bloqueo por las moléculas de cetuximab. Por este motivo se secuenciaron los dominios del segmento extracelular de *EGFR*, mostrando la presencia de dos nuevas mutaciones en sendos pacientes; K467T y R451C. Ambas mutaciones están localizadas en el dominio extracelular del receptor. En el paciente 31, la muestra post-tratamiento presentaba una sustitución de citosina por adenosina en el nucleótido 1400 de *EGFR*, no presente en la muestra pre-tratamiento. Este cambio provocaba la sustitución de una lisina por una treonina en el aminoácido 467 (K467T). En el paciente 35 se detectó la sustitución de una timina por una citosina en el nucleótido 1351, induciendo la aparición de una arginina en vez de cisteína en la posición 451 (R451C) (Figura 21).

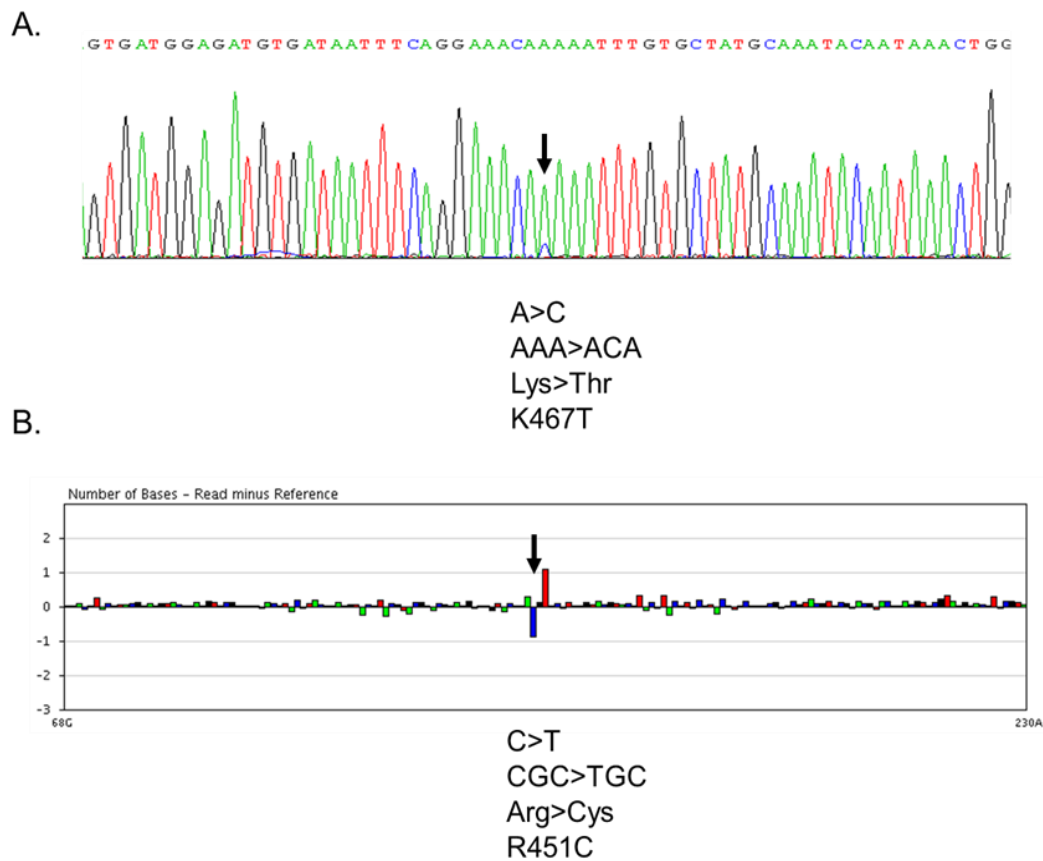


Figura 21: A): Presencia de la mutación K467T en el paciente 31 en la secuenciación por método de Sanger. B): R451C en el paciente 35 obtenida por ultra-secuenciación.

IV.II.III MUTACIONES DE *KRAS*, *BRAF* Y *PIK3CA*

Las mutaciones más frecuentes en las muestras post-tratamiento fueron aquellas que afectaban a los genes de *NRAS* (9 eventos) y *KRAS* (9 eventos), seguidas de las mutaciones en *PIK3CA* (8 eventos) y *BRAF* (4 eventos). La mayoría de mutaciones que afectaban a los genes *RAS* se producían en los exones 3 y 4 (11/18, 62% del total de mutaciones).

De los pacientes que presentaban mutaciones a la progresión a cetuximab, en 9 las mutaciones eran detectables en la biopsia inicial, incluyendo 4 mutaciones en *RAS*, 6 en *PIK3CA* y 3 en *BRAF*. Por otro lado, el porcentaje de alelos que presentaban la mutación en la muestra pre-tratamiento era inferior que la objetivada a la progresión, a excepción de 2 mutaciones en el gen *PIK3CA* (Tabla 11)

Nº Paciente	PRE-TRATAMIENTO								POST-TRATAMIENTO												
	KRAS exon 2	KRAS exon 3	KRAS exon 4	NRAS exon 2	NRAS exon 3	NRAS exon 4	BRAF exon 15	PIK3CA exon 9	PIK3CA exon 20	EGFR exon 12	KRAS exon 2	KRAS exon 3	KRAS exon 4	NRAS exon 2	NRAS exon 3	NRAS exon 4	BRAF exon 15	PIK3CA exon 9	PIK3CA exon 20	EGFR exon 12	
3																					
4																					
5																					
8																					
11																					
13																					
14																					
15																					
17																					
18																					
20																					
21																					
23																					
25																					
26																					
27																					
31																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					

 No evaluado
 <10%
 11-24%
 >25%

Tabla 11: Pacientes con mutaciones detectadas tras el tratamiento de cetuximab. Se indica en color la proporción de células detectadas con esas mutaciones.

IV.II.IV AMPLIFICACIÓN GENÉTICA

El número de copias del gen *EGFR* fue evaluado por FISH en un total de 21 muestras pre-tratamiento y 20 post-tratamiento (de las que 14 fueron muestras pareadas pre y post-tratamiento de los mismos pacientes). En el resto de muestras no se pudo disponer de material suficiente para obtener un resultado inequívoco. En cuatro pacientes la amplificación aparecía en la muestra post-tratamiento pero no en las biopsias previas a la terapia con cetuximab. Por otro lado, ningún paciente presentó pérdida de la amplificación de *EGFR* en la muestra post-tratamiento cuando ésta aparecía en la primera biopsia.

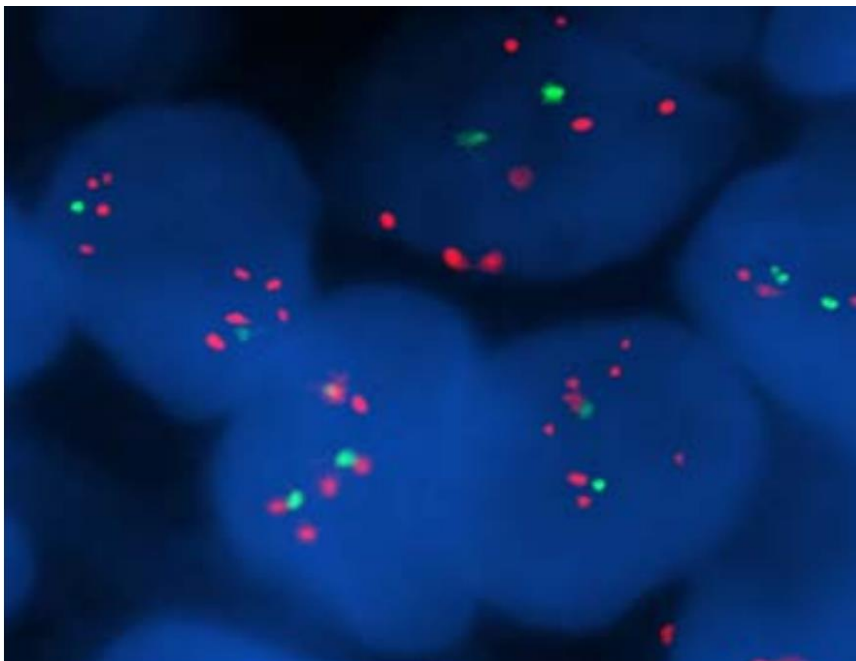


Figura 22: Amplificación de *EGFR* tras resistencia a cetuximab en el paciente número 17 evaluada mediante FISH.

En las muestras post-tratamiento, la amplificación de *EGFR* habitualmente aparecía asociada a otros eventos moleculares: mutaciones en *EGFR*

(pacientes 17, Figura 22; y 27), mutación en *BRAF* (paciente 36), mutación de *KRAS* junto con *PIK3CA* (paciente 26), mutación de *PIK3CA* (paciente 25) y amplificación de *HER2* (paciente 2)

La amplificación de *HER2* también fue estudiada en aquellas muestras con suficiente material. En total fue posible evaluarla en 16 pacientes antes del tratamiento y en 6 a la progresión. Dos pacientes presentaban amplificación de *HER2* tanto antes como después del tratamiento, y uno presentaba *HER2* amplificado tras el tratamiento con cetuximab pero no antes de la terapia. En todos los pacientes con *HER2* amplificado se detectó además amplificación del gen *EGFR*.

El análisis de *KRAS* mediante FISH no mostró ninguna amplificación en las muestras evaluadas, pero 5 pacientes presentaban un aumento el número de copias del cromosoma 12 (donde se localiza el gen *KRAS*), dos de ellos con alta polisomía (CEP12 superior a 4).

IV.II.V EVOLUCIÓN DINÁMICA DE LAS MUTACIONES

Tres de los pacientes se sometieron a más de dos biopsias durante el curso de la enfermedad. Esto permitió la oportunidad no sólo de detectar los eventos moleculares, sino también de evaluar la evolución de estos cambios durante el transcurso de la enfermedad.

En el primer caso (paciente número 27, Figura 23) la muestra pre-tratamiento se obtuvo de una metástasis hepática en la que no se detectaron alteraciones genéticas. Tras la progresión al tratamiento con cetuximab, se obtuvo una muestra histológica de la misma metástasis, objetivando la aparición de la mutación S492R de *EGFR*. El paciente recibió entonces tratamiento con panitumumab en monoterapia, mostrando nuevamente una respuesta parcial que se mantuvo durante 5 meses. Ante una nueva progresión de la enfermedad se realizó una biopsia de la misma lesión hepática. El resultado mostró que la mutación S492R era indetectable, pero por el contrario había aparecido una nueva mutación en el codón 61 de *KRAS*. Todas las biopsias realizadas mostraron la presencia de amplificación de *EGFR*, sin cambios durante toda la evolución de la enfermedad.

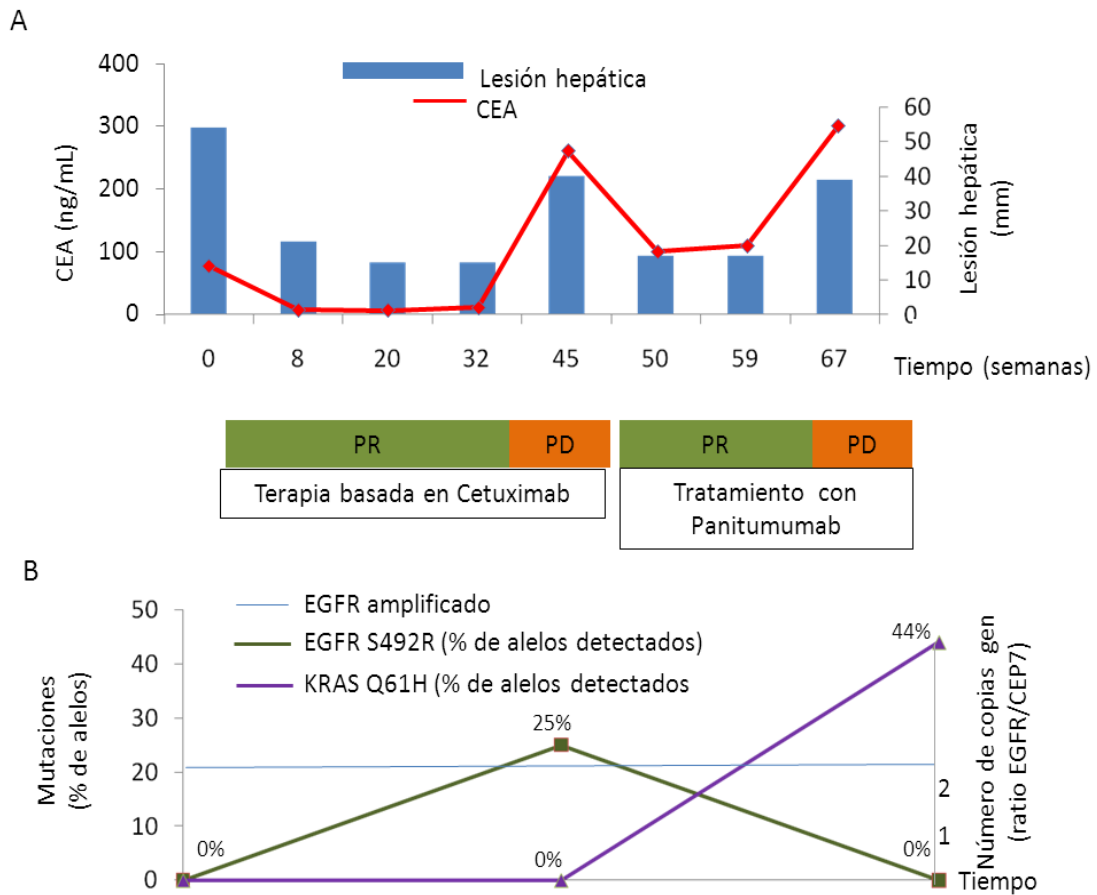


Figura 23: Evolución de los eventos moleculares tras biopsias hepáticas repetidas en el paciente 27. A: Tamaño de la metástasis tumoral evaluada por TC (azul) y de la concentración plasmática de antígeno carcinoembrionario (rojo). B: Mutaciones detectadas mediante ultra-secuenciación.

PR: Respuesta parcial. PD: Progresión de la enfermedad.

En un segundo caso (paciente 31), la biopsia realizada tras progresión a cetuximab sobre una metástasis hepática mostró la presencia de la mutación K467T de *EGFR*, no presente previamente. El paciente fue tratado en ese momento con un anticuerpo experimental contra otra diana terapéutica dentro de un ensayo clínico. A la progresión, se realizó una nueva biopsia de la misma metástasis. En el tejido obtenido la mutación K467T de *EGFR* era, al igual que el paciente previo, indetectable. Pero en su lugar apareció una mutación

localizada en el gen *NRAS*, G12V, no presente en ninguna de las muestras analizadas con anterioridad (Figura 24).

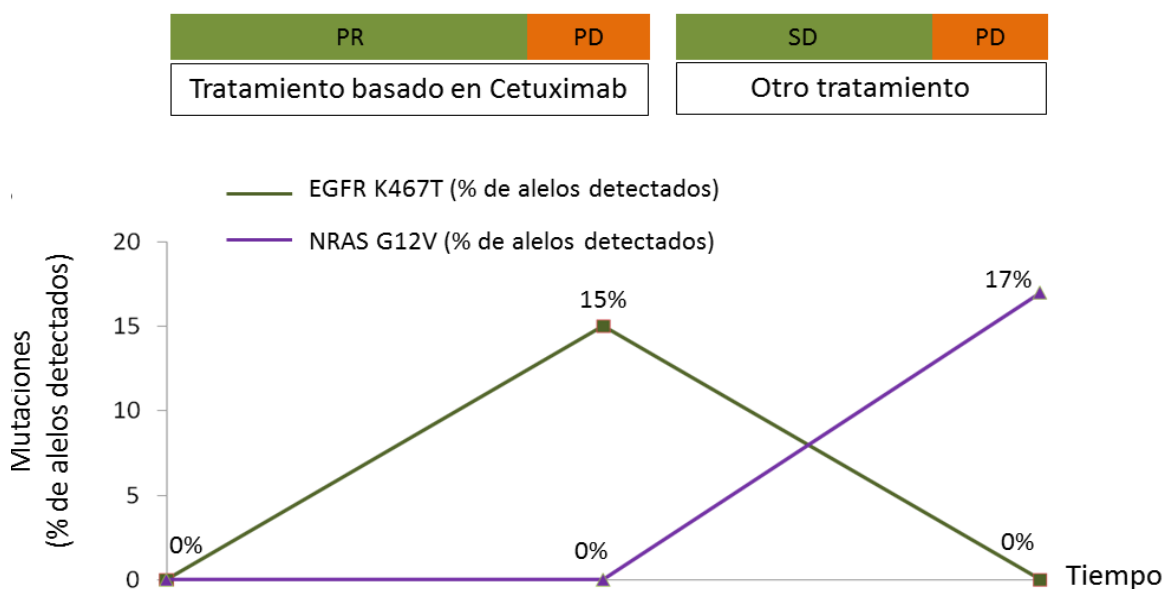


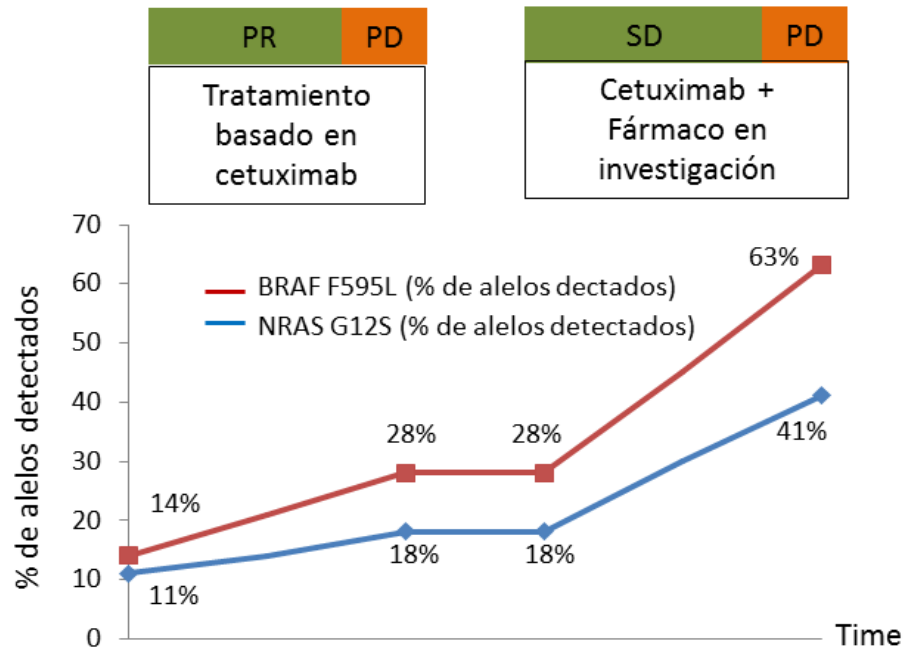
Figura 24: Evolución de las mutaciones en el paciente 31. Tras progresar al tratamiento con Cetuximab apareció una mutación en el gen *EGFR*. Tras una nueva terapia, esta mutación desapareció, pero apareciendo en su lugar una nueva mutación en el gen *NRAS*.

PR: Respuesta parcial. PD: Progresión de la enfermedad.

En la muestra pre-tratamiento obtenida del tumor primario rectal de un tercer paciente (número 8) se objetivó la presencia de una mutación en *NRAS* (G12S) y en *BRAF* (F595L). Además, el paciente fue sometido a una biopsia hepática para confirmar la extensión de la enfermedad. En esta muestra también se objetivaron las mismas mutaciones que en el tumor primario. El paciente inició

un tratamiento de quimioterapia asociada a cetuximab, objetivándose una estabilización de la enfermedad según criterios radiológicos RECIST. Tras la progresión a cetuximab, se realizó una nueva biopsia de la lesión hepática y de una lesión pulmonar. En ambas se objetivó la presencia de las mismas mutaciones pero afectando a un número mayor de células tumorales (*BRAF* F595L del 14% al 28% y *NRAS* G12S del 11% al 18%). El paciente fue incluido en ese momento en un ensayo clínico con una terapia experimental asociada a cetuximab. Una quinta biopsia realizada en el momento de la progresión a este tratamiento mostró nuevamente la presencia de las dos mutaciones, pero en un mayor número de células tumorales que conformaban el tumor (mutación *BRAF* 63% de los alelos y mutación *NRAS* en el 41%).

Estos resultados sugieren que durante la terapia basada en cetuximab, las clonas que presentaban las mutaciones en los genes *BRAF* y *NRAS* fueron aumentando de manera progresiva según se fue manteniendo la terapia anti-EGFR, seleccionándose dichas clonas sobre el resto que no presentaban estas mutaciones (Figura 25)



Lugar de biopsia	Biopsia 1 Hígado y primario	Biopsia 2 Hígado	Biopsia 3 Pulmón	Biopsia 4 Hígado
		Sangre 1		Sangre 2

Figura 25: Evolución dinámica de las mutaciones presentes en el tumor del paciente 8. Las mutaciones en BRAF F595L y en NRAS G12S fueron detectadas mediante deep-sequencing tanto en el tejido tumoral como en sangre periférica.

PR: Respuesta parcial. PD: Progresión de la enfermedad.

IV.II.VI DETECCIÓN DE MUTACIONES EN MUESTRAS SANGUÍNEAS

Para determinar si las mutaciones detectadas en las muestras tumorales podían ser analizadas mediante un método no invasivo, se estudió de manera exploratoria el ADN tumoral circulante en muestras obtenidas tras la progresión a cetuximab. El análisis fue realizado en 8 muestras de 7 pacientes que presentaban mutaciones detectables en la muestra post-tratamiento (Tabla 9 y 10). Del paciente 5 se extrajo además una segunda muestra sanguínea coincidiendo con la quinta biopsia tumoral.

En 5 de las 8 muestras (62%) se hallaron las mismas mutaciones presentes en el análisis del tejido tumoral. En todos los casos analizados de mutaciones de *NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* se logró un resultado correlativo en las muestras sanguíneas. Por el contrario, las mutaciones en *EGFR* no fueron detectadas en ninguna de las muestras de sangre; como tampoco se logró determinar en un caso de *KRAS* mutado (G12V). El porcentaje de alelos mutados en sangre periférica fue inferior a los detectados mediante el análisis en muestras tumorales, debido a la contaminación de ADN no tumoral en sangre periférica.