



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS
DOCTORAL

VALOR PRONÓSTICO DE
LAS ALTERACIONES GENÉTICAS
DE LA VÍA MTOR EN PACIENTES
CON CÁNCER RENAL METASTÁSICO
TRATADOS CON INHIBIDORES
DE MTOR

Cristina Suárez Rodríguez

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona





Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Medicina
Departamento de Medicina
2018

TESIS DOCTORAL

VALOR PRONÓSTICO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS
DE LA VÍA MTOR EN PACIENTES CON CÁNCER RENAL
METASTÁSICO TRATADOS CON INHIBIDORES DE MTOR

Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctor
Cristina Suárez Rodríguez

Programa de Doctorado en Medicina

Director de la Tesis

Joan Carles Galceran. Doctor en Medicina
Departamento de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Tutor de la Tesis

Josep Àngel Bosch Gil. Doctor en Medicina
Departamento de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

“El futuro pertenece a quienes
creen en la belleza de sus sueños”

Eleanor Roosevelt

A mis padres
A Víctor y Ariadna



AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por los valores transmitidos y por todo lo que me han dado.

A mi marido y mi hija por ser mi motor de vida, por darme todo lo que necesito y mucho más.

Al Dr Joan Carles por ser mi mentor, por su ayuda y generosidad desde mis inicios en la oncología y por estar siempre allí cuando lo he necesitado.

Al Dr Josep Taberner por todas las oportunidades que me ha dado desde que llegué a Vall d'Hebron y por ser un ejemplo de trabajo y sabiduría para todos.

A todos mis compañeros de equipo actuales y pasados. A Claudia Valverde, Jordi Rodón, Isaac Núñez, Fabricio Racca y Macarena González por saber formar equipo y hacer las cosas fáciles. Agradecimiento especial a Rafael Morales por ser un buen amigo además de un gran compañero.

A Ana Vivancos y Josep Lluís Parra por colaborar y emocionarse con el proyecto desde el primer día.

Al Dr Josep Àngel Bosch y Dr. Albert Selva y todos aquellos que durante la carrera nos transmitieron la pasión por la medicina.

A Dr Jose Àngel Arranz por su inestimable ayuda y su apoyo incondicional.

A Quique, Arancha, Begoña y Ma Jose por ser amigos y compañeros de fatigas en el mundo de la oncología.

Y, por supuesto, a todos los pacientes y sus familiares, porque con su lucha dan sentido a nuestro trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	13
2.	GENERALIDADES DEL CÁNCER RENAL.....	14
	2.1- FACTORES DE RIESGO.....	14
	2.2- CLÍNICA.....	15
	2.3- DIAGNÓSTICO.....	16
	2.4- CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES RENALES.....	17
3.	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN CÁNCER RENAL	19
	3.1- Vía de Von Hippel-Lindau (VHL) y factor inducible de hipoxia (HIF).....	19
	3.2- VÍA DE PI3K-AKT-mTOR.....	22
	3.3- LA VÍA MET.....	22
4.	SUBTIPOS HISTOLÓGICOS CÁNCER RENAL.....	23
	4.1- CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CRCC).....	23
	4.2- CARCINOMA RENAL PAPILAR (PRCC).....	23
	4.2.1- Carcinoma renal papilar tipo 1.....	23
	4.2.2- Carcinoma renal papilar tipo 2.....	23
	4.3- CARCINOMA RENAL CROMÓFOBO (ChRCC).....	23
	4.4- ONCOCITOMA.....	24
	4.5- TUMORES RENALES CON TRANSLOCACIÓN TFE3.....	24
	4.6- CARCINOMA RENAL CON DIFERENCIACIÓN SARCOMATOIDE.....	25
	4.7- CARCINOMA DE LOS TÚBULOS COLECTORES Y CARCINOMA MEDULAR.....	25
5.	ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS: TCGA (The Cancer Genome Atlas)	26
6.	SÍNDROMES HEREDITARIOS ASOCIADOS A CÁNCER RENAL.....	31
	6.1- SÍNDROME DE VON HIPPEL- LINDAU (VHL).....	31
	6.2- CARCINOMA RENAL PAPILAR HEREDITARIO TIPO I (HPRC).....	31
	6.3- CARCINOMA RENAL PAPILAR HEREDITARIO TIPO II O LEIOMATOSIS HEREDITARIA.....	32
	6.4- SÍNDROME DE BIRT-HOGG-DUBÉ (BHD).....	32
	6.5- ESCLEROSIS TUBEROSA.....	33
7.	TRATAMIENTO DEL CÁNCER RENAL LOCALIZADO Y SEGUIMIENTO.....	34
8.	FACTORES PRONÓSTICOS EN ENFERMEDAD AVANZADA	35
9.	NEFRECTOMÍA CITOREDUCTORA EN PACIENTES METASTÁSICOS	37
10.	TRATAMIENTOS ANTIGUOS DEL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES LOCALMENTE AVANZADO O METASTÁSICO	38
	10.1- Interleukina -2 (IL-2) en altas dosis.....	38
	10.2- Interferon-Alfa (IFN).....	38

11.	TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES LOCALMENTE AVANZADO O METASTÁSICO DE PRIMERA LÍNEA EN EL MOMENTO ACTUAL.....	39
11.1-	PACIENTES DE BUEN PRONÓSTICO Y PRONÓSTICO INTERMEDIO.....	39
11.1.1-	BEVACIZUMAB	39
11.1.2-	SUNITINIB.....	41
11.1.3-	PAZOPANIB.....	42
11.2-	PACIENTES DE MAL PRONÓSTICO.....	44
11.2.1-	TEMSIROLIMUS	44
11.2.2-	SUNITINIB.....	45
12.	ESTUDIOS RECIENTES QUE CAMBIARÁN EL TRATAMIENTO DE PRIMERA LÍNEA	47
12.1-	CABOSUN.....	47
12.2-	CHECKMATE-214	47
12.3-	IMMOTION 151	48
13.	TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES LOCALMENTE AVANZADO O METASTÁSICO DE SEGUNDA LÍNEA Y SUCESIVAS.....	49
13.1-	EVEROLIMUS	49
13.2-	AXITINIB.....	50
13.3-	NIVOLUMAB	51
13.4-	CABOZANTINIB	52
13.5-	LENVATINIB+EVEROLIMUS.....	52
14.	PROPUESTA DE ALGORITMO DE TRATAMIENTO EN CCRm EN NUESTRO MEDIO (A la espera de nuevas aprobaciones en primera línea).....	54
15.	LA VÍA mTOR.....	55
15.1-	RAPAMICINA.....	55
15.2-	REGULADORES DE mTORC1	56
15.3-	DOWNSTREAM mTORC1	58
15.4-	Red de señalización de mTORC2	59
16.	RELEVANCIA DE LA VÍA PI3K/AKT/mTOR EN CÁNCER RENAL.....	62
17.	INHIBIDORES mTOR EN CÁNCER RENAL	69
18.	FACTORES PREDICTORES DE RESPUESTA A INHIBIDORES DE mTOR.....	70
18.1-	ESTUDIOS PRECLÍNICOS.....	70
18.2-	ESTUDIOS EN MUESTRA TUMORAL.....	75
18.2.1-	OTROS TUMORES.....	75
18.2.2-	CÁNCER RENAL.....	82
18.3-	FACTORES CLÍNICOS	86
18.3.1-	LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)	86
18.3.2-	NEUMONITIS.....	88
18.3.3-	HIPERCOLESTEROLEMIA.....	89

19.	JUSTIFICACIÓN	91
20.	HIPÓTESIS	93
	20.1- HIPÓTESIS CONCEPTUAL.....	93
	20.2- HIPÓTESIS NULA	93
	20.3- HIPÓTESIS ALTERNATIVA	93
	20.4- HIPOTESIS OPERATIVA	93
21.	OBJETIVOS	95
	21.1- OBJETIVO PRINCIPAL.....	95
	21.2- OBJETIVOS SECUNDARIOS	96
22.	TIPO DE ESTUDIO	97
23.	SELECCIÓN DE LA MUESTRA: POBLACION DIANA, POBLACION ACCESIBLE Y MUESTRA ANALIZADA.	98
	23.1- POBLACION DIANA.....	98
	23.2- POBLACION ACCESIBLE:	98
	23.3- MUESTRA ANALIZADA	99
24.	MÉTODOS	100
	24.1- FACTOR DE EXPOSICION o FACTOR DE ESTUDIO.....	100
	24.2- EFECTO O VARIABLE RESULTADO	100
	24.3- TAMAÑO MUESTRAL Y HORIZONTE TEMPORAL.	100
	24.4- RECOGIDA DE DATOS CLINICOS Y EVOLUTIVOS	100
	24.4.1- VARIABLES DE ESTUDIO	100
25.	TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR	102
	25.1- Amplicon-seq (M&M)	102
	25.2- <i>Whole-Exome Sequencing</i> (WES).....	103
	25.3- ONCO CARTA “LOS 300”	104
26.	PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	106
27.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO	108
	27.1- POBLACIÓN DE ESTUDIO	108
	27.2- CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE COMPLETA COMPARANDO LA POBLACIÓN SIN MUESTRA DISPONIBLE CON LA POBLACIÓN ANALIZADA	108
	27.2.1- CARACTERÍSTICAS BASALES	109
	27.2.2- CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON EL TRATAMIENTO	114
	27.3- RESPUESTA GLOBAL AL TRATAMIENTO con imTOR	117
	27.4- SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL PRIMER TRATAMIENTO EN ENFERMEDAD METASTÁSICA	117
	27.5- SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL INICIO DE TRATAMIENTO CON imTOR.....	118
	27.6- SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESION DESDE EL INICIO DE imTOR	119

27.7-	DESCRIPCIÓN VARIABLES MOLECULARES.....	120
27.7.1-	MUTACIONES EN GENES DE LA VÍA mTOR.....	120
27.7.2-	MUTACIONES EN LA VÍA DE LA ANGIOGÉNESIS.....	120
27.7.3-	MUTACIONES EN OTROS GENES.....	121
28.	EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA (SGM1)	123
28.1-	SEGUIMIENTO Y RESULTADOS GLOBALES	123
28.2-	SUPERVIVENCIA GLOBAL (SGM1) NO AJUSTADA	124
28.3-	MODELO AJUSTADO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE SGM1.....	124
28.4-	MODELO MULTIVARIANTE EXPLICATIVO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE SGM1.....	128
28.4.1-	COMPROBACIÓN DEL SUPUESTO DE RIESGOS PROPORCIONALES.....	132
28.4.2-	CONCLUSIÓN.....	133
29.	EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL INICIO DEL TRATAMIENTO CON imTOR (SGMT)	134
29.1-	SEGUIMIENTO Y RESULTADOS GLOBALES	134
29.2-	SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL INICIO DEL TRATAMIENTO CON imTOR (SGMT) NO AJUSTADA	134
29.3-	MODELO AJUSTADO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE SGMT.....	136
29.4-	MODELO MULTIVARIANTE EXPLICATIVO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE SGMT.....	136
29.5-	COMPROBACIÓN DEL SUPUESTO DE RIESGOS PROPORCIONALES	139
29.6-	CONCLUSIONES.....	140
30.	EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN DESDE EL INICIO CON imTOR (SLPT)	141
30.1-	SEGUIMIENTO Y RESULTADOS GLOBALES	141
30.2-	MODELO AJUSTADO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE SLPT142	
30.3-	MODELO MULTIVARIANTE EXPLICATIVO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE SLPT.	143
30.4-	COMPROBACIÓN DEL SUPUESTO DE RIESGOS PROPORCIONALES	146
30.5-	CONCLUSIÓN.....	146
31.	DISCUSIÓN.....	148
31.1	VARIABLES CLÍNICAS	149
31.2-	VARIABLES MOLECULARES	153
31.3-	EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE SGM1, SGMT Y SLPT	159
31.4-	OTROS ASPECTOS	163

32.	CONCLUSIONES	169
33.	ANEXOS	171
	33.1- DOCUMENTO DE LA AEMPS	171
	33.2- DOCUMENTO DEL CEIC	174
	33.3- DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	176
	33.4- HOJA DE RECOGIDA DE DATOS.....	177
34.	RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS	180
35.	BIBLIOGRAFÍA	184

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

4EBP1:	<i>eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1</i>
AEMPS:	Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios
ALT:	alanino-aminotransferasa
AMPK:	AMP-activated kinase
AP:	anatomía patológica
AST:	aspartato-aminotransferasa
BHD:	síndrome de Birt-Hogg-Dubé
BP1:	<i>binding protein 1</i>
CAIX:	anhidrasa carbónica IX
CALGB:	<i>Cancer and Leukemia Group B</i>
CCR:	carcinoma de células renales
CCRM:	carcinoma renal metastásico
CEIC:	Comité Ético de Investigación Clínica
ChRCC:	carcinoma renal cromóforo
CIMP:	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CNV:	variaciones en el número de copias (<i>copy number variations</i>)
CRCC:	carcinoma renal de células claras
EA:	efecto adverso
eIF4E:	<i>eukaryotic initiation factor 4E</i>
EORTC:	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
ER:	retículo endoplasmático
ETC:	cadena de transporte de electrones
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF:	factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR:	receptor del factor de crecimiento fibroblástico
FH:	fumarato hidratasa
FLT-3:	<i>fetal liver tyrosine kinase receptor 3</i>
FP:	factores pronósticos
GATK:	<i>Genome Analysis ToolKit</i>
H0:	hipótesis nula
H1:	hipótesis alternativa
HGF/SF:	<i>hepatocyte growth/scatter factor</i>
HIF:	factor inducible de hipoxia
HPRC:	carcinoma renal papilar hereditario tipo I
HR:	<i>hazard ratio</i>
IFN:	interferon-Alfa
IGS:	firma génica inmune
IL-2:	interleukina -2
IMC:	índice de masa corporal
IMDC:	<i>International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium</i>
IMPACT:	<i>Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets</i>
imTOR:	inhibidores de la vía mTOR
ITT:	pacientes por intención de tratar
KPS:	índice de Karnofsky
LDH:	lactato deshidrogenasa
LRP1B:	low-density lipoprotein receptor related protein-1
Met:	<i>mesenchymal epithelial transcription factor</i>
Mr:	respuesta minor

MSKCC: *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*
NGS: *Next Generation Sequencing*
NNT: número de pacientes que es necesario tratar
OR: *odds ratio*
p-4EBP1: *4E-binding protein-1 fosforilado*
PA: ácido fosfatídico
PAkt: fosfo-Akt
PET: tomografía por emisión de positrones
PI3K: fosfatidil-inositol-3-quinasa
PI3K: fosfatidil-inositol-3-quinasa
PKC- α : proteína quinasa C- α
p-mTOR: mTOR fosforilado
PRCC: carcinoma renal papilar
p-S6: S6 fosforilado
PTEN: *phosphatase and tensin homolog, ras homolog enriched in brain*
Rheb
RM: resonancia magnética
RP: respuesta parcial
RR: *risk ratio*
S6RP: proteína S6
SG: supervivencia global o general
SGK1: *glucocorticoid-induced protein kinase 1*
SGMT: supervivencia global desde el inicio del tratamiento con imTOR
SLE/SLP: supervivencia libre de enfermedad / libre de progresión
SLR: supervivencia libre de recurrencia
SMG: genes significativamente mutados
SNC: sistema nervioso central
SNP: polimorfismos de un solo nucleótido
SREBP1/2: *sterol regulatory element binding proteins 1 and 2*
SWOG: *Southwest Oncology Group*
TC: tomografía computarizada
TCGA: *Cancer Genome Atlas*
TFE3: *transcription factor binding to IGHM enhancer 3*
TFEB: *transcription factor EB*
TKI: inhibidor tirosin-quinasa
TNM: *tumor, node, metastases*
TR: tasa de respuestas
TSC: *tuberous sclerosis complex gene*
VAF: frecuencia de la variante alélica
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial
VHIO: Instituto de Oncología de *Vall d'Hebron*
VHL: síndrome de Von Hippel-Lindau
VSG: velocidad de sedimentación globular
WES: *Whole Exome Sequencing*
WGCNA: *weighted gene co-expression network analysis*

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer renal supone el 2% de todos los nuevos casos de cáncer en el adulto. Su incidencia ha aumentado con una tasa del 2.6% anualmente desde 1997, y solo parte de este aumento puede justificarse por las mejoras en las técnicas de detección¹.

El carcinoma de células renales (CCR) constituye el 90% de todas las neoplasias malignas renales y el subtipo histológico más frecuente es el carcinoma de células claras (70-75% de los casos).

Más del 50% de los casos se diagnostican actualmente de manera incidental, mediante exploraciones complementarias solicitadas por otras causas. Aproximadamente, el 30% de los carcinomas renales sintomáticos presentan un síndrome paraneoplásico asociado, como hipertensión, caquexia, pérdida de peso, fiebre, amiloidosis, aumento de la velocidad de sedimentación globular (VSG), anemia, alteración del funcionalismo hepático, hipercalcemia o policitemia². En menos del 10% de los casos los pacientes presentan la tríada clásica de dolor en el flanco, hematuria y masa abdominal palpable^{3 4}. En algunos pacientes sintomáticos, la forma de presentación puede ser por síntomas secundarios a la enfermedad metastásica como tos persistente o dolor óseo.

A pesar de los avances diagnósticos, un 20-30% se presentarán en fase metastásica en el diagnóstico y un 20-30%, tras la nefrectomía, experimentarán recidiva y desarrollarán metástasis durante el seguimiento.

El cáncer de células renales afecta a individuos sobre todo en la quinta y sexta décadas de la vida. Cuando se presenta en edades más jóvenes (<55 años) se suele asociar a estadíos más tempranos, menor grado tumoral y menor tamaño, y es un factor pronóstico de supervivencia independiente del estadio de presentación⁵.

Los hombres tienen mayor riesgo (2:1) de desarrollar cáncer renal que las mujeres, probablemente justificado por la mayor prevalencia de hábito tabáquico y exposición ocupacional. Los hombres suelen presentar tumores de mayor tamaño (6.1cm vs 5.9cm, $p < 0.0001$) y mayor grado ($p < 0.0001$). Las mujeres con cáncer renal tienen una mejor supervivencia a 5 años: 69% vs 65% ($p < 0.0001$). No obstante, un análisis multivariado demostró que no había diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad cáncer-específica (hazard ratio [HR] = 1, $p = 0.960$)⁶.

Los pacientes de raza negra parecen tener un pronóstico más desfavorable que los caucásicos⁷.

2. GENERALIDADES DEL CÁNCER RENAL

2.1-FACTORES DE RIESGO

1- TABACO

Es un factor de riesgo establecido para CCR y es responsable de aproximadamente un 20% de los casos.

Un metaanálisis⁸ que incluyó 24 estudios, objetivó que el riesgo de desarrollar CCR es mayor en individuos que fumaron en alguna ocasión (risk ratio [RR] = 1.38). Se ha observado una relación dosis-respuesta, y así los fumadores con una DTA >20 paq/año tienen un 30% de incremento en el riesgo de desarrollar un cáncer renal frente a los no fumadores. Por otro lado, el abandono de este hábito reduce el riesgo después de al menos 10 años de no fumar.

2- OBESIDAD

Es el factor de riesgo con mayor impacto para el desarrollo de CCR, siendo responsable de un 30% de los casos. Un metaanálisis de estudios prospectivos⁹ proporciona evidencia de la asociación entre índice de masa corporal (IMC) y riesgo de cáncer renal. Altos IMC se asocian a un mayor riesgo de CCR en hombres (*odds ratio* [OR] = 2.3) y en mujeres (OR = 3.3).

3- FACTORES NUTRICIONALES Y DIETA

Un alto consumo en fibra se ha relacionado con una reducción en el riesgo de desarrollar CCR. La alta ingesta de grasas y proteínas de origen animal se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer renal.

Se ha encontrado una relación inversa entre el consumo de alcohol moderado y el CCR, estimándose una reducción del 28% entre los que consumen ≥ 15 g/d de cualquier tipo de bebida alcohólica.

4- HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y TRATAMIENTOS ANTIHIPERTENSIVOS

Tanto la HTA como su tratamiento se han relacionado con el desarrollo de CCR en varios estudios prospectivos; sin embargo, no ha llegado a dilucidarse si el factor de riesgo real es la cifra de tensión arterial o el uso de antihipertensivos, debido a que ambos factores están inevitablemente interconectados. Datos prospectivos limitados apuntan que el control de cifras tensionales disminuiría el riesgo de CCR, mientras que los antihipertensivos probablemente no sean un factor de riesgo.

5- TRATAMIENTOS CON ANALGÉSICOS

Históricamente se estableció una relación causal entre el uso de fenacetina y la incidencia de tumores transicionales de la pelvis renal, aunque esta relación no fue concluyente, con el adenocarcinoma de

células renales. La posible relación con el consumo crónico de otros analgésicos como aspirina o paracetamol no ha sido claramente establecida. No obstante, algunos registros de pacientes que consumen analgésicos de forma crónica (sin identificarse qué tipo de analgésico era) han reportado un aumento en la incidencia de cáncer renal¹⁰.

6- ENFERMEDAD RENAL Y TRASPLANTE RENAL

Se desarrolla en pacientes sometidos a hemodiálisis durante largo tiempo y podría determinar, según datos de un registro americano de más de 4.000 pacientes publicado a finales de los años 80, un mayor riesgo de desarrollar CCR. Aproximadamente un 30-50% de los pacientes sometidos a diálisis durante un tiempo prolongado desarrollan una enfermedad quística adquirida y hasta un 6% de los individuos con esta enfermedad desarrollan un cáncer renal.

7- DIABETES MELLITUS

Datos recientes no han demostrado una relación independiente de otros factores como la obesidad, e incluso la hipertensión, por lo que actualmente queda en entredicho su papel en el desarrollo de CCR.

8- INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

Una historia de infecciones del tracto urinario de repetición, puede incrementar el riesgo de cáncer renal. Un estudio americano, observó que el riesgo era mucho mayor cuando se trataba de hombres fumadores (OR = 9.7)¹¹. Estos datos no se han confirmado en estudios posteriores.

9- EXPOSICIÓN LABORAL

Se han publicado varios estudios que relacionan el cáncer renal con la exposición a asbesto, petróleo, industria del hierro y el acero, disolventes de limpieza y cadmio¹². No obstante, ninguna de estas exposiciones se ha confirmado de manera consistente en estudios epidemiológicos.

10-FACTORES HEREDITARIOS

El cáncer renal puede ser esporádico o hereditario. Como se comentará posteriormente, se han descrito distintas alteraciones genéticas asociadas a diferentes tipos de tumores renales.

2.2-CLÍNICA

La presentación clásica del cáncer renal es la tríada: dolor en flanco, masa palpable y hematuria, no obstante, muy pocos pacientes se presentan así. Lo habitual es que presenten uno solo de estos síntomas o algún síntoma secundario a las metástasis en el caso de debut metastásico (dolo óseo, disnea...).

2.3-DIAGNÓSTICO

Ante la sospecha diagnóstica de un tumor renal, se deberá realizar una historia clínica completa, seguida de pruebas de imagen y un estudio de extensión para una completa estadificación de la enfermedad.

Anamnesis y exploración física:

En la anamnesis, además de los síntomas existentes, se deberán recoger los hábitos tóxicos y los antecedentes personales y familiares del paciente.

La exploración física tiene un papel limitado, pero puede ser útil en los casos que se palpe una masa abdominal, se identifiquen adenopatías cervicales, un varicocele de aparición brusca no reducible o edema de extremidades inferiores que pueden indicar compromiso venoso.

Exploraciones complementarias y estudio de extensión:

- Analítica: incluye hemograma, bioquímica con función renal y hepática, fosfatasa alcalina, calcio, lactato deshidrogenasa, VSG y estudio de coagulación. Además, se incluirá un estudio de bioquímica en orina.
- Ecografía: permite la fácil caracterización de las lesiones como quísticas o sólidas. En los casos en que existan dudas, la administración de un contraste no nefrotóxico puede ser de ayuda.
- Tomografía computarizada (TC) abdominal: la detección de una masa renal por ecografía debe ser estudiada con TC con contraste. Ello permite verificar el diagnóstico de alta sospecha de carcinoma renal y proporciona información sobre la función y morfología del riñón contralateral, la extensión del tumor primario, el compromiso venoso, la afectación adenopática locoregional y la afectación suprarrenal o de otros órganos sólidos, si existe^{13 14}.
- Resonancia magnética (RM): se reserva para los casos que no hay posibilidad de administración de contraste intravenoso con el TC. También es útil para los casos con invasión tumoral venosa, ya que ayuda a caracterizar mejor la extensión del trombo a vena cava inferior¹⁵.
- Radiología simple del tórax: clásicamente se ha practicado radiografía para el estudio de extensión torácico, aunque actualmente ha sido desplazada por la TC de tórax.
- TC de tórax: esta técnica es más sensible que la radiología simple y debe ser considerada actualmente en todos los casos¹⁶.
- Gammagrafía ósea: realizar si existe elevación de la fosfatasa alcalina o el paciente presenta dolor óseo¹⁷.
- TC o RM craneal: no se considera de rutina si no hay sintomatología neurológica¹⁸.
- Tomografía por emisión de positrones (PET): su papel no está establecido en el diagnóstico del carcinoma renal y no se considera de forma rutinaria¹⁹.

- Renograma: útil en los casos con alteración de la función renal y en aquellos pacientes con alto riesgo de desarrollar insuficiencia renal crónica terminal tras la cirugía, para planificar cirugía conservadora o hemodiálisis inmediata.

Clasificación de Bosniak de las lesiones quísticas:

La clasificación de Bosniak permite clasificar los quistes renales en 5 grupos distintos según su apariencia mediante ecografía, TC o RM^{20 21}. Las lesiones clasificadas como Bosniak III o IV tienen indicación quirúrgica y se tratarán según el mismo protocolo que el cáncer renal.

Biopsia del tumor renal:

Se puede plantear en algunos casos la biopsia percutánea de la masa renal. Puede ser especialmente útil en los casos que se sospeche un linfoma o una metástasis renal de otro tumor primario. Debe de considerarse en todos los casos en los que se plantee un tratamiento ablativo local como la radiofrecuencia o, incluso, en algunos casos que se propongan para vigilancia activa. En todos estos casos, la biopsia con aguja gruesa es preferible sobre la punción para estudio citológico^{22 23 24}.

2.4-CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES RENALES

Se clasificaron todos los casos mediante el sistema internacional de estadificación TNM (del inglés: *tumor, node, metastases*). La última versión es la 8ª edición (<http://www.uicc.org/tnm>) publicada en 2017²⁵ (Tabla 1).

Tabla 1. Sistema de estadificación TNM de la AJCC (8ª edición, 2017).

T. Tumor primario
<p>TX: no se puede evaluar el tumor primario</p> <p>T0: no evidencia de tumor primario</p> <p>T1: tumor ≤ 7 cm en su mayor dimensión, limitado a riñón</p> <p>T1a: tumor ≤ 4 cm en su mayor dimensión, limitado al riñón</p> <p>T1b: tumor > 4 cm pero ≤ 7 cm en su mayor dimensión, limitado a riñón</p> <p>T2: tumor > 7 cm en su mayor dimensión, limitado al riñón</p> <p>T2a: tumor > 7 cm pero ≤ 10 cm en su mayor dimensión, limitado a riñón</p> <p>T2b: tumor > 10 cm limitado al riñón</p> <p>T3: tumor que se extiende a las venas mayores o segmentarias o tejidos perirrenales, pero no a la glándula suprarrenal ipsilateral o más allá de la fascia de Gerota</p> <p>T3a: el tumor se extiende macroscópicamente a la vena renal o sus ramas segmentarias (que contienen músculo), o invade la grasa perirrenal y/o del seno renal (peripélvica), pero no sobrepasa la fascia de Gerota</p> <p>T3b: el tumor se extiende macroscópicamente a la vena cava por debajo del diafragma</p> <p>T3c: el tumor se extiende macroscópicamente a la vena cava por encima del diafragma o invade la pared de la vena cava</p> <p>T4: el tumor invade más allá de la fascia de Gerota (incluyendo extensión por continuidad a la glándula suprarrenal ipsilateral)</p>
N. Ganglios linfáticos regionales
<p>NX: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales</p> <p>N0: ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales</p> <p>N1: metástasis en ganglios linfáticos regionales</p>
M. Metástasis a distancia
<p>M0: no metástasis a distancia</p> <p>M1: metástasis a distancia</p>
Agrupación por estadíos
<p>Estadio I: T1 N0 M0</p> <p>Estadio II: T2 N0 M0</p> <p>Estadio III: T1-T2 N1 M0 T3 N0-N1 M0</p> <p>Estadio IV: T4 N0-N1 M0 T1-T4 N0-N1 M1</p>

3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN CÁNCER RENAL

3.1- VÍA DE VON HIPPEL-LINDAU (VHL) Y FACTOR INDUCIBLE DE HIPOXIA (HIF)

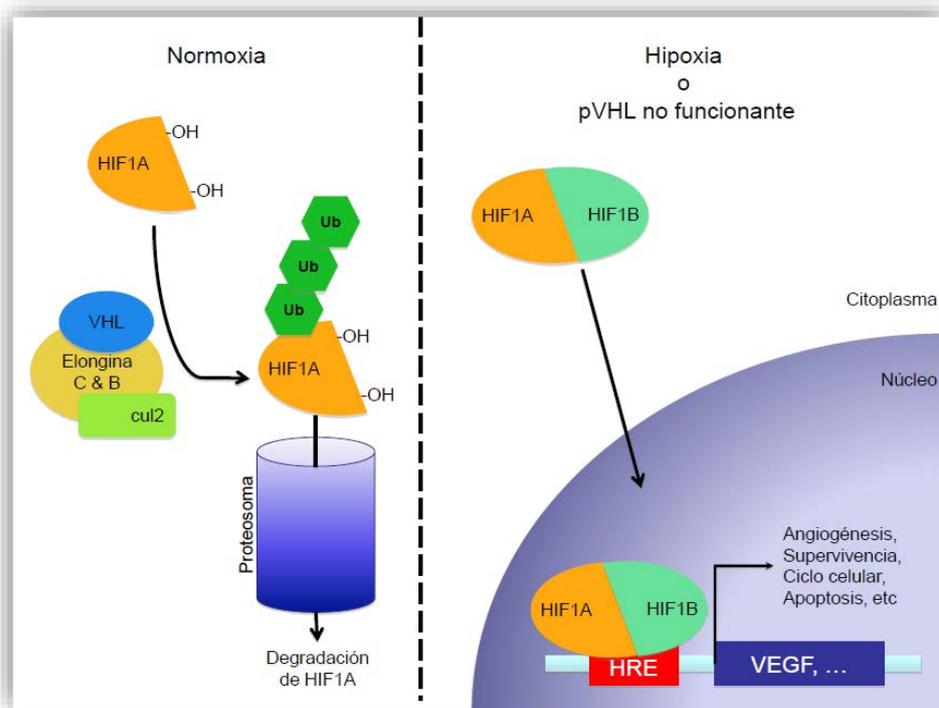
La alteración molecular del gen supresor del VHL es la más frecuentemente implicada en el carcinoma renal de células claras.

El gen Von Hippel-Lindau fue descubierto en 1993²⁶. El gen VHL codifica para una proteína de 213 aminoácidos (pVHL). La proteína del VHL forma parte de un complejo multiproteico que tiene una función de marcaje en la degradación proteica mediada por el proteosoma. Concretamente, la pVHL actúa como lugar de unión de las subunidades α del factor inducible de hipoxia (HIF), HIF-1 α y HIF-2 α . La transcripción de HIF hace de “gatillo” para la activación de distintos genes asociados con el desarrollo y el crecimiento de neoplasias. HIF es un factor de transcripción formado por dos subunidades - α estable y α inestable- y su síntesis se induce bajo condiciones de hipoxia.

En condiciones de normoxia, HIF- α es hidroxilado en dos residuos de prolina por una prolina hidroxilasa y sobre un residuo de asparagina mediante una asparagina hidroxilasa. La hidroxilación por la prolina hidroxilasa permite la unión de HIF- α a la proteína VHL. A continuación, el complejo pVHL/HIF junto con las proteínas elonginas C y B, se une a la proteína cul2 (un miembro de la familia cullin de las proteínas ubiquitina ligasa) y queda marcado para su degradación en el proteosoma y se bloquea la traslocación nuclear.

Cuando pVHL está mutado o en condiciones de hipoxia (donde HIF- α no está hidroxilado), pVHL no reconoce a HIF- α y el complejo pVHL-HIF no se forma. En consecuencia, HIF- α se escapa de la vía de la proteólisis y consigue tener acceso al núcleo donde se une a HIF- β e induce la activación de genes que van a intentar restablecer las condiciones de normoxia (Figura 1).

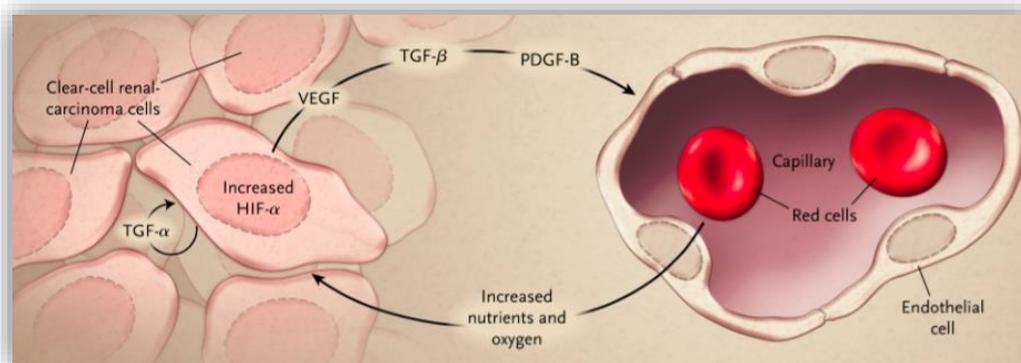
Figura 1. Vía de VHL-HIF en condiciones de normoxia e hipoxia.



(Suárez C et al. Guía KidCat. Manual de cáncer de riñón metastásico).

La activación de estos genes es la responsable de la formación de vasos (EPO, VEGF [factor de crecimiento vascular endotelial]), proliferación celular (PDGF, TGF- α) y del metabolismo de la glucosa (GLUT 1)^{27 28 29 30 31 32}. Los VEGF, PDGF- β y TGF- β sobreexpresados actúan sobre células vasculares vecinas para promover la angiogénesis tumoral. (Figura 2). La vasculatura tumoral aumentada proporciona nutrientes adicionales y oxígeno para promover el crecimiento de las células tumorales. El TGF- α actúa de manera autocrina sobre las células tumorales mediante señalización a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico, que promueve la proliferación y supervivencia de células tumorales³³.

Figura 2. Cooperación patológica entre las células de cáncer renal del tipo de células claras y la vasculatura adyacente.



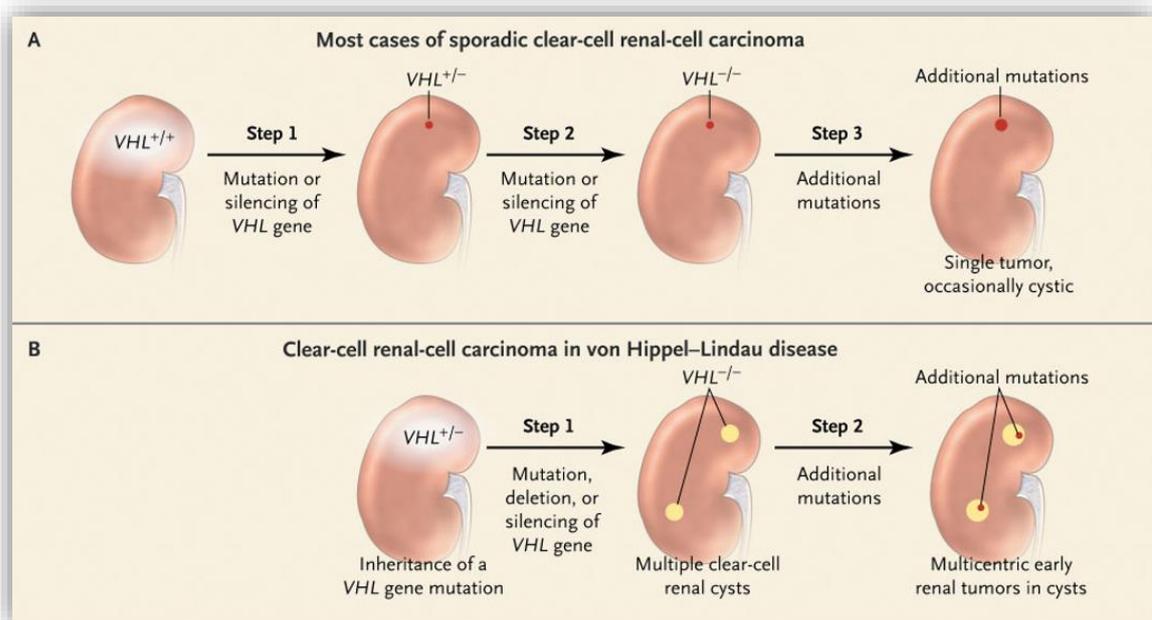
(Figura extraída de Cohen et al, NEJM 2005).

Como ya se ha comentado previamente, el síndrome de Von Hippel-Lindau es una enfermedad autosómica dominante con alta penetrancia (aproximadamente el 90%) que se caracteriza por la inactivación del gen supresor del VHL localizado en el cromosoma 3p25^{34 35}.

La alteración del VHL requiere dos “hits”, que resultan en la inactivación de ambos alelos, para la iniciación tumoral. Una copia del gen se hereda por línea germinal y la segunda copia se inactiva por una mutación somática: hipermetilación o pérdida de secuencias 3p (*Knudson’s two-hit theory*)³⁶. En el cáncer renal esporádico se observan mutaciones en el gen del VHL en el 60-70% de los casos^{37 38 39}. La inactivación del gen del VHL se ha observado tanto en tumores pequeños y poco agresivos como en tumores de gran tamaño y alto grado de agresividad, sugiriendo que la inactivación del gen es un fenómeno temprano en la tumorigénesis del carcinoma renal de células claras^{40 41}.

Tal como refleja la figura 3, en contraste con el carcinoma de células renales esporádico (A), se requieren menos pasos para el desarrollo de carcinoma de células renales en las formas hereditarias de la enfermedad (B), porque todas las células del paciente tienen una mutación que predispone al paciente a la enfermedad. Como resultado, la enfermedad asociada con los síndromes familiares se produce más temprano y, a menudo, es multifocal. En la enfermedad de VHL está implicado un mecanismo recesivo celular, ya que ambas copias del gen VHL están inactivadas. El gen VHL es un gen clásico supresor de tumores.

Figura 3. Carcinogénesis esporádica en contraste con la enfermedad de VHL



(Figura extraída de Cohen et al, NEJM 2005).

3.2- VÍA DE PI3K-AKT-mTOR

mTOR es una kinasa serina/treonina intracelular que se encuentra sobrerregulada en muchos tipos de tumores diferentes. Principalmente se activa por la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K)/Akt, a través de diferentes estímulos, incluyendo factores de crecimiento, hormonas, nutrientes, oxígeno y estrés. mTOR también puede ser activado de manera secundaria por la vía de las MAPquinasas⁴². Una vez activada interviene en la regulación de diferentes procesos celulares, como en la supervivencia celular y la regulación del ciclo celular.

Dado que es el foco de nuestro estudio, esta vía será explicada con detalle más adelante (apartado 15).

3.3- LA VÍA MET

Una tercera vía menos estudiada en cáncer renal es la vía de c-Met, el receptor de tirosina quinasa para el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que está codificado por el proto-oncogen Met ubicado en el cromosoma 7. C-Met está implicado en el crecimiento / diferenciación celular, la neovascularización y la reparación tisular en tejidos normales, pero también se ha identificado como un protooncogen. La disregulación de c-Met y su ligando, el factor de crecimiento del hepatocito (HGF), se ha implicado en el desarrollo tumoral, la invasión y la angiogénesis en varios tumores malignos, entre ellos el cáncer renal^{43 44}. La activación directa de c-Met a través de mutaciones en el gen ha sido identificada en el carcinoma renal papilar hereditario y esporádico⁴⁵.

Además, los estudios in vitro han demostrado que la pérdida de la expresión de von Hippel-Lindau (VHL) y la hipoxia conducen a la regulación positiva de la expresión de c-Met en el carcinoma renal de células claras^{46 47}.

La expresión de c-Met tiene un valor pronóstico en cáncer renal. Un metaanálisis que analizó 1724 pacientes incluidos en 12 estudios objetivó que la alta expresión de c-Met en tumores renales se relacionaba de manera significativa con un mayor grado nuclear (HR = 2.45, p = 0.001) y un mayor tamaño tumoral (HR = 2.18, p = 0.005). Además, los pacientes con alta expresión de c-Met tenían una supervivencia global (SG) significativamente peor que aquellos con baja expresión (HR = 1.32, p = 0.0009)⁴⁸.

4. SUBTIPOS HISTOLÓGICOS CÁNCER RENAL

4.1- CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS (CRCC)

Es el subtipo histológico más frecuente (70-75%). Son tumores muy vascularizados y que a menudo tienen necrosis coagulativa en su interior. La característica principal es la alteración en VHL (mutación somática o hipermetilación) que se ha descrito hasta en el 90% de los casos. Más recientemente se han descrito también mutaciones en genes remodeladores de la cromatina, como PBM1 (polibromo 1), SETD2 (*SET domain containing 2*), JARID1A y BRCA1 asociado a proteína-1 (BAP1)⁴⁹. Las alteraciones genéticas más frecuentemente observadas en el CRCC incluyen pérdidas en el 3p (90%), 14q, 8p y 9p, y ganancias en el 5q y 12q⁵⁰.

4.2- CARCINOMA RENAL PAPILAR (PRCC)

Es el segundo tipo histológico más frecuente (10-15%). Se distinguen dos tipos. Las alteraciones citogenéticas son muy comunes en los tumores papilares. Frecuentemente se pueden encontrar ganancias en los cromosomas 7, 8q, 12q, 16p, 17, 20 y pérdida del 9p. En los papilares tipo 2 es frecuente observar ganancia del 8q o pérdida del 1p y 9p^{51 52}.

4.2.1- Carcinoma renal papilar tipo 1. Pueden ser unifocales o múltiples y bilaterales, a menudo se encuentran asociados a adenomas papilares (<5mm). Suelen ser tumores de bajo grado (Führman I-II) y de buen pronóstico. Se observan mutaciones en el proto-oncogen Met (mesenchymal-epithelial transition factor) en el carcinoma renal papilar tipo 1 hereditario y ocasionalmente en el esporádico.

4.2.2- Carcinoma renal papilar tipo 2. Suelen ser tumores más grandes, de mayor grado (Führman III-IV) y con alta diseminación ganglionar y a distancia, por lo tanto mucho más agresivos y de pronóstico pobre. Se observan alteraciones en la fumarato hidratasa en la forma heredada, pero es muy raro en los tumores esporádicos.

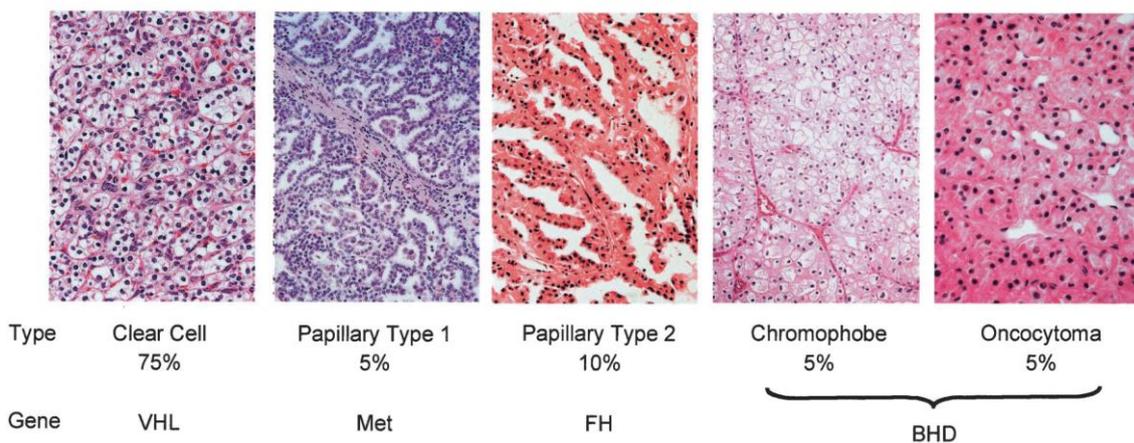
4.3- CARCINOMA RENAL CROMÓFOBO (CHRCC)

Representa el 5% de los tumores renales. Aunque en el momento de su presentación pueden ser de gran tamaño, la diseminación regional o metastásica es rara. Suelen tener un excelente pronóstico, excepto cuando presentan diferenciación sarcomatoide⁵³. Pueden tener alteraciones en el número de copias de los cromosomas 1, 2, 6, 10, 13 y 17⁵⁴.

4.4- ONCOCITOMA

Es un tumor benigno que frecuentemente se encuentra en la práctica urológica y representa el 25% de las masas renales pequeñas⁵⁵ (<3cm). Radiológicamente, pueden ser difíciles de distinguir del carcinoma renal de células claras. Se ha reportado coexistencia con carcinoma renal de células claras hasta en un tercio de los casos, de manera que se considera que una biopsia positiva para oncocitoma es insuficiente para excluir malignidad⁵⁶.

Figura 4. Subtipos histológicos más frecuentes de CCR



(Linehan WM et al. J Urol 2003)

A continuación se describen otras histologías menos frecuentes.

4.5- TUMORES RENALES CON TRANSLOCACIÓN TFE3

Los tumores llamados translocados presentan translocaciones somáticas en factores de transcripción que son miembros de la familia MiT. El *transcription factor binding to IGHM enhancer 3* (TFE3) y el *transcription factor EB* (TFEB) se localizan en el Xp11 y 6p21 respectivamente y tienen distintas funciones en los tejidos⁵⁷. El mecanismo por el cual dicha translocación causa tumorigénesis no está claro, pero probablemente tiene relación con una expresión desregulada de TFE3 que lleva a un aumento de su localización nuclear⁵⁸.

Son tumores raros (<1%), aunque es posible que estén infradiagnosticados. Son más frecuentes en adultos jóvenes y en mujeres y se cree que el hecho de haber recibido quimioterapia en la infancia puede ser un factor de riesgo⁵⁹. Igual que pasa con otros tumores poco frecuentes, tienen un comportamiento extremadamente agresivo.

4.6- CARCINOMA RENAL CON DIFERENCIACIÓN SARCOMATOIDE

Aproximadamente el 5% de los tumores renales tienen diferenciación sarcomatoide, pero en el caso de los tumores que se presentan como estadio IV o llegan a desarrollar EIV puede llegar a ser del 15%⁶⁰. La clasificación actual considera que cualquier tipo de cáncer renal puede tener diferenciación sarcomatoide y le confiere un pronóstico muy desfavorable.

4.7- CARCINOMA DE LOS TÚBULOS COLECTORES Y CARCINOMA MEDULAR

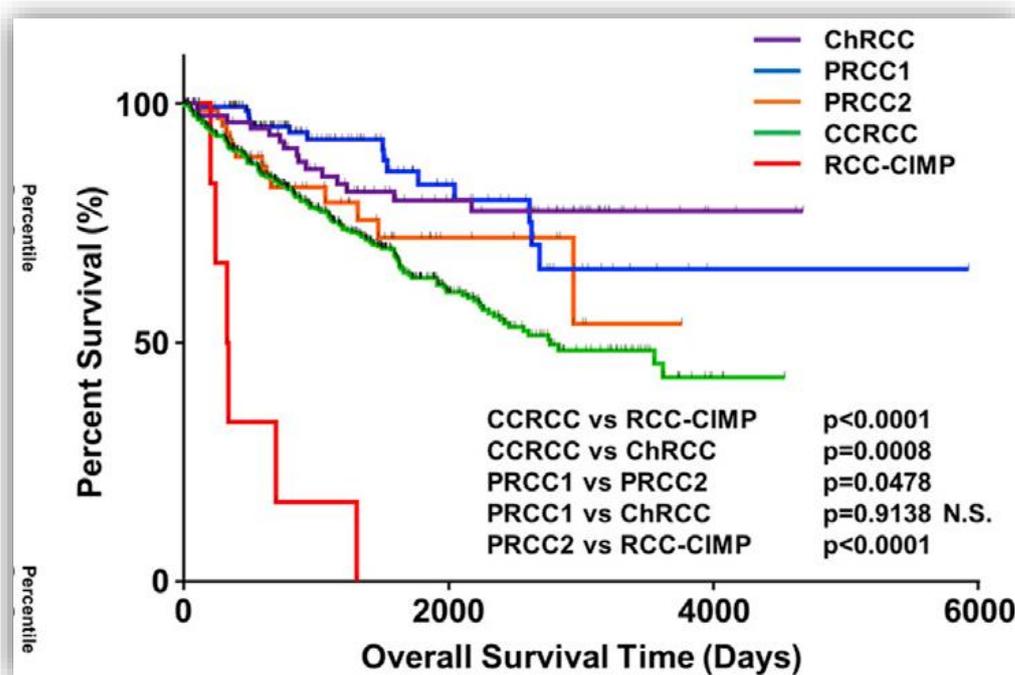
Son tumores poco frecuentes (aproximadamente el 1% de los tumores renales malignos). Metastatizan de manera precoz y suelen debutar en estadios avanzados y sintomáticos^{61 62}. Esta forma de presentación y el hecho de que no exista un tratamiento claramente definido para estos tumores, hacen que estos tumores tengan un pronóstico infausto.

5. ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS: TCGA (The Cancer Genome Atlas)

El Cancer Genome Atlas (TCGA) ha llevado a cabo una serie de caracterizaciones moleculares integrales en los distintos tipos histológicos incluidos CRCC, ChRCC y PRCC⁶³.

La variación entre los subtipos histológicos de cáncer renal se correlaciona con la supervivencia (Figura 5). Anteriormente, se descubrió que el carcinoma renal CIMP (CpG *island methylator phenotype*), un subtipo de los carcinomas papilares, tenía la peor supervivencia de este grupo, pero recientemente se ha demostrado que tiene la peor supervivencia de todos los tumores renales, incluido el de células claras ($p < 0.0001$). El carcinoma renal de células claras es el que tiene la segunda peor supervivencia, mientras el papilar tipo 1 y el cromóforo tienen las mejores supervivencias sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p = 0.9138$).

Figura 5. Correlación entre el subtipo histológico y la supervivencia



Análisis previos de cada subtipo histológico de carcinoma renal identificaron un total combinado de 16 genes significativamente mutados (SMG) incluidos 9 asociados con CRCC, 11 asociados con PRCC y 2 asociados con ChRCC⁶⁴.

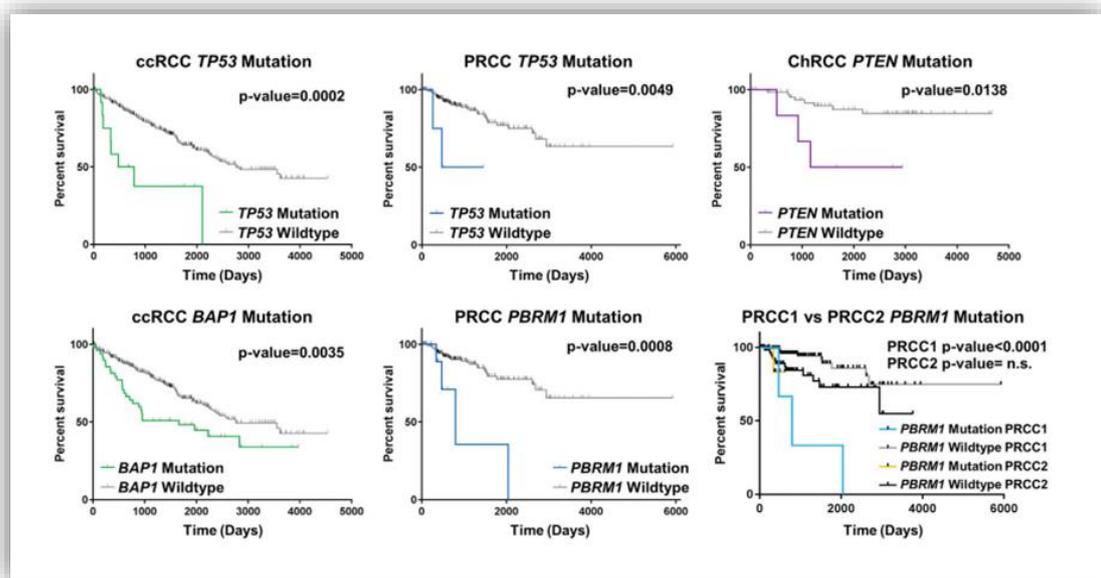
El análisis de todos los tipos carcinoma renal objetivó que TP53 y PTEN eran los únicos SMG compartidos por CRCC, PRCC y ChRCC (2.6% y 4.5%, 1.5% y 3.4%, y 31.1% y 8.1%, respectivamente). En toda la cohorte, ni TP53 ni PTEN se correlacionaron con una peor supervivencia, pero el análisis por histologías específicas demostró que la mutación TP53 se correlacionaba con una peor

supervivencia en CRCC ($p = 0.0002$) y PRCC ($p = 0.0049$), mientras que la mutación en PTEN se correlacionaba con una peor supervivencia en ChRCC ($p=0.0138$).

El CRCC y el PRCC, comparten tres SMG remodeladores de cromatina: PBRM1 (38.0% y 4.5%, respectivamente), SETD2 (13.2% y 6.4%, respectivamente) y BAP1 (11.0% y 5.6%, respectivamente). La mutación en BAP1 se correlaciona con una peor supervivencia en toda la cohorte ($p = 0.0002$) y en el grupo de CRCC ($p = 0.0035$), pero no en el grupo de PRCC o ChRCC. La mutación CDKN2A, hipermetilación o delección se encuentra en el 15.8% de los tumores renales, siendo por subtipos: 16.2% en CRCC, 5% en PRCC tipo 1, 18.6% en PRCC tipo 2, 100% en CIMPPRCC, y 19.8% en ChRCC. La alteración de CDKN2A se correlacionó con una peor supervivencia en toda la cohorte ($p < 0.0001$) y en cada subtipo histológico, CRCC ($p < 0.0001$), PRCC tipo 1 ($p = 0.0067$), PRCC tipo 2 ($p = 0.0006$) y ChRCC ($p = 0.0018$).

La figura 6 muestra las diferencias en la SG de los pacientes dentro de los subtipos histológicos en función de la mutación genética.

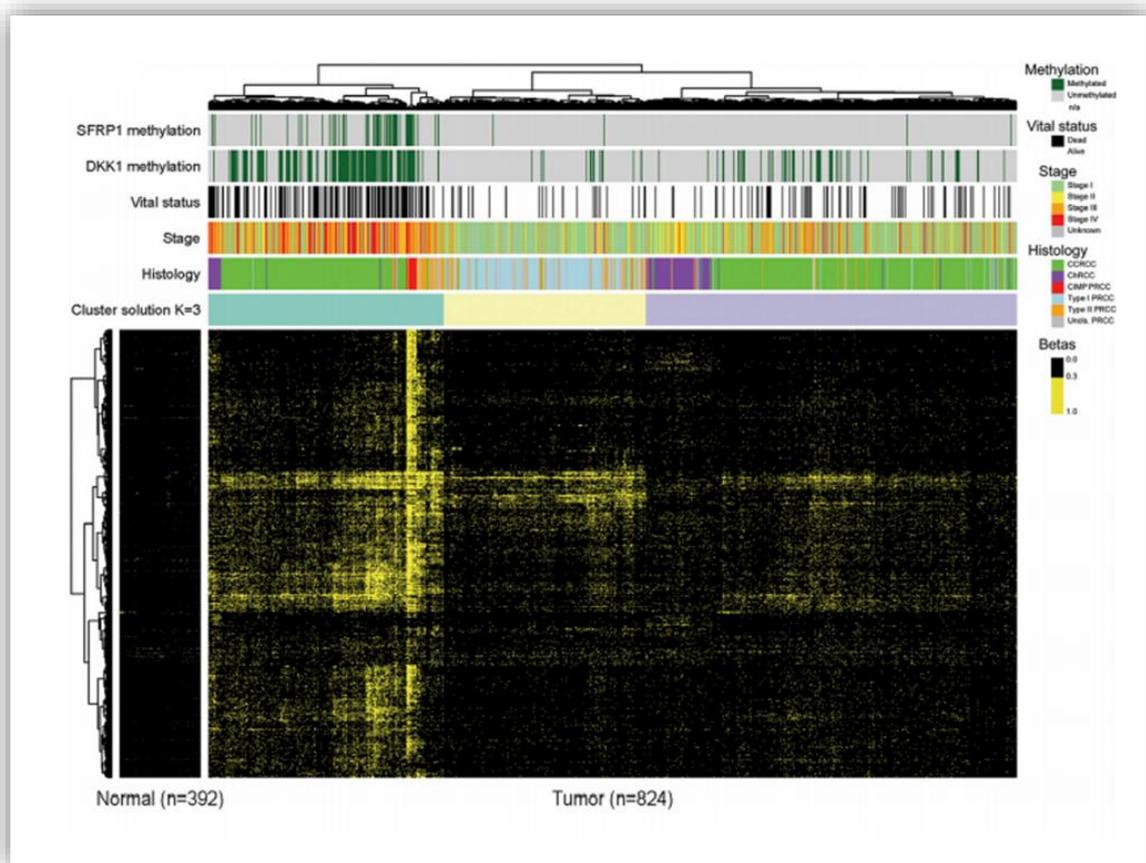
Figura 6. Diferencias en la SG de los pacientes dentro de los subtipos histológicos en función de la mutación genética



Existen 8 SMG que se encuentran mutados frecuentemente ($\geq 2.0\%$) en más de un subtipo de cáncer renal. Se halló una mutación de al menos 1 de los 16 SMG en 81% de CRCC, 39.1% de PRCC y 43.2% de ChRCC. La tasa de mutaciones global para ChRCC es significativamente menor que la de CRCC o PRCC ($p = 0.0254$ y $p < 0.0001$, respectivamente), mientras la tasa de mutaciones en PRCC es mayor que en CRCC ($p < 0.0001$).

Análisis previos de metilación⁶⁵ habían demostrado que un subconjunto de genes metilados podía discriminar las células de origen de los distintos subtipos histológicos. Este subconjunto de sondas de genes metilados se utilizó posteriormente para evaluar los patrones de hipermetilación dentro de las muestras utilizadas en el TCGA. Se identificaron muestras de CRCC y PRCC hipermetilados, pero no se observó hipermetilación en ninguna de las muestras de ChRCC. Un análisis utilizando sondas de 1532 genes que no están metilados en tejidos normales identificó un grupo de 240 tumores renales con hipermetilación de ADN aumentada (grupo de metilación 1) que se asociaba con una supervivencia significativamente peor ($p < 0.0001$) (figura 7). Este grupo estaba compuesto por 10 CIMP-RCC, 182 CRCC (37.3%), 23 PRCC tipo 2 (32.9%) 16 ChRCC (19.8%), y un pequeño número de tipo 1 y un PRCC no clasificado. Los dos grupos restantes, uno que contenía PRCC tipo 1 y 2 (grupo de metilación 2) y el otro que contenía CRCC y ChRCC (grupo de metilación 3), tuvieron una supervivencia similar.

Figura 7. Representación *heatmap* de la agrupación de 1532 sondas de metilación de ADN no metiladas en tejidos normales.



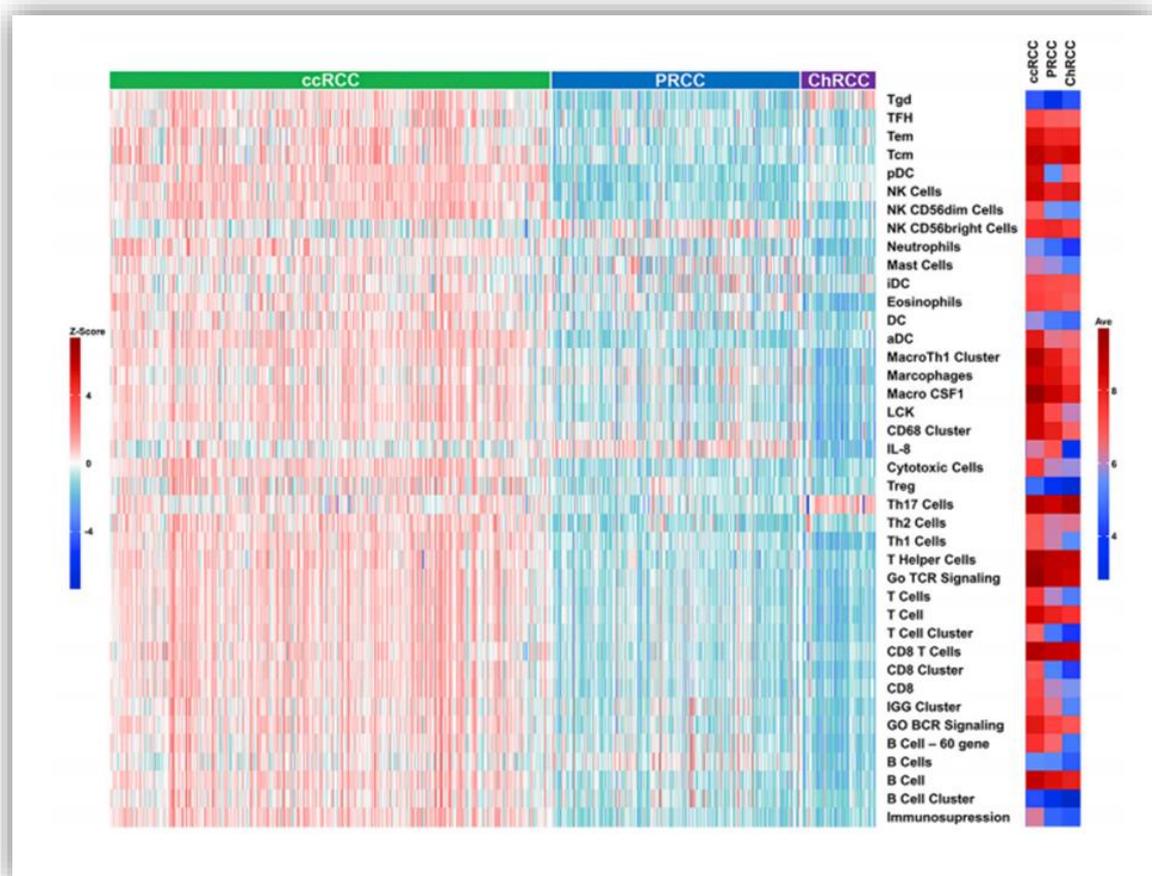
Los tumores se clasificaron por el subtipo histológico (CRCC-verde; PRCC tipo 1- azul claro; PRCC tipo 2-naranja; PRCC no clasificado-gris; CIMP- rojo; ChRCC- púrpura), estadio tumoral (EI-verde claro; EII-amarillo; EIII-naranja; EIV-rojo), estado vital (vivo-blanco; fallecido-negro), y los dos genes de metilación: DKK1 (cg07684796) y SFRP1 (cg15839448) hipermetilación (hipermetilado, verde oscuro).

Un análisis ponderado de redes de coexpresión génica (*weighted gene co-expression network analysis, WGCNA*), realizado para identificar conjuntos (módulos) de genes altamente correlacionados y evaluar su relación con variables clínicas y funciones biológicas, reveló varios módulos genéticos que diferenciaban los carcinomas renales por histología, estadio o supervivencia. El CRCC presentaba, como era previsible, un aumento en la expresión de la firma de desarrollo de la vasculatura, debido a la activación de la vía VHL / HIF, y un aumento en la firma de la respuesta inmune en comparación con PRCC y ChRCC.

La evaluación del metabolismo tumoral se realizó comparando los perfiles de expresión de 12 procesos metabólicos en todas las muestras. La expresión de genes relacionados con el ciclo de Krebs y con la cadena de transporte de electrones (ETC) proporcionaron una distinción clara entre los principales subtipos histológicos, con baja expresión en CRCC y CIMP-RCC, alta expresión en ChRCC y expresión intermedia en PRCC tipo 1 y tipo 2. El análisis por subtipos reveló que la expresión de genes glucolíticos era consistentemente más alta en CRCC y PRCC tipo 2, mientras que la expresión de los genes del ciclo de Krebs era significativamente mayor en el PRCC tipo 2 en comparación con el tipo 1 ($p < 0.0001$).

Finalmente, se ha descrito previamente aumento de la expresión génica del infiltrado de células inmunitarias en CRCC en comparación con ChRCC y PRCC, entre ellos genes individuales como PDCD1 (PD1) y CD247 (PDL1)⁶⁶. El análisis utilizando firmas específicas de genes de células inmunes confirmó que -con la excepción de las firmas de genes de células Th17, IL-8 y CD5- había una sobrerregulación casi universal de estas firmas inmunes en CRCC en comparación con la CCRP o CCPR (Figura 8).

Figura 8. Agrupamiento de la expresión de la firma génica inmune (IGS) por muestra individual (izquierda) o mediana de expresión de IGS (derecha) para los diferentes subtipos histológicos de CCR (ccRCC-verde, PRCC- azul, ChRCC-púrpura).



6. SÍNDROMES HEREDITARIOS ASOCIADOS A CÁNCER RENAL

Aunque la forma más frecuente de presentación de cáncer renal es la esporádica, en un 2-4% de los casos se asocia a un síndrome hereditario (Tabla 2). En los síndromes hereditarios, el cáncer renal suele desarrollarse en una edad temprana, en forma de enfermedad bilateral y/o multifocal, y los pacientes suelen tener antecedentes familiares de cáncer renal. Por otro lado, los casos de cáncer renal esporádico, que son la mayoría, suelen presentarse en forma de una lesión única y a una edad mayor que en los síndromes hereditarios.

6.1- SÍNDROME DE VON HIPPEL- LINDAU (VHL)

La alteración molecular del gen supresor del VHL es la más frecuentemente implicada en el carcinoma renal de células claras.

El VHL es una enfermedad autosómica dominante con alta penetrancia (aproximadamente el 90%) que se caracteriza por la inactivación del gen supresor del VHL localizado en el cromosoma 3p25⁶⁷ ⁶⁸. Tiene una incidencia de 1 de cada 36000 nacidos vivos⁶⁹. Las familias que presentan este síndrome hereditario tienen traslocaciones en el cromosoma 3 en la línea germinal⁷⁰. El VHL es un gen supresor de tumores. Los pacientes que padecen este síndrome heredan una copia del gen VHL mutada y la otra se inactiva, generalmente por delección o hipermetilación.

Las manifestaciones clínicas de este síndrome consisten en hemangioblastomas en el sistema nervioso central (SNC) – especialmente cerebelo y médula espinal-, angiomas retinales, quistes y tumores sólidos. Los tumores sólidos incluyen feocromocitomas, tumores de los islotes pancreáticos o carcinomas renales de células claras, que se caracterizan por estar altamente vascularizados⁷¹.

6.2- CARCINOMA RENAL PAPILAR HEREDITARIO TIPO I (HPRC)

El carcinoma renal papilar hereditario tipo I es una enfermedad con herencia autosómica dominante que predispone a los pacientes a desarrollar carcinomas renales papilares tipo I multifocales y bilaterales⁷². Generalmente, las neoplasias asociadas al HPRC se caracterizan por ser tumores de lento crecimiento, hipovascularizados y que raramente metastatizan. No se han descrito otras manifestaciones clínicas asociadas al HPRC.

El HPRC es causado por mutaciones activadoras en la línea germinal del proto-oncogen c-Met (*mesenchymal epithelial transcription factor*), localizado en el 7q31.1-34⁷³ ⁷⁴. El proto-oncogen c-Met codifica para el factor de crecimiento del hepatocito HGF/SF (*hepatocyte growth/scatter factor*), un receptor tirosin-kinasa

que está implicado en inhibición de apoptosis, proliferación, incremento de movilidad y formación de estructuras tubulares⁷⁵.

Distintos estudios en tumores hereditarios han observado duplicación del gen c-Met mutado, lo que resulta en una trisomía del cromosoma 7⁷⁶. Esta trisomía también se ha observado en la gran mayoría (95%) de los carcinomas renales papilares esporádicos⁷⁷. Sin embargo, solo se han observado mutaciones en un pequeño porcentaje de los tumores no heredados⁷⁸.

Mutaciones *missense* en el dominio tirosin-kinasa de Met son las responsables de la activación constitutiva de la proteína de Met en el HPRC. La vía de Met interacciona con la vía del VHL a través de HIF de la siguiente manera: la estabilización de HIF o la pérdida de función del VHL promueve un aumento de la transcripción del receptor de c-Met⁷⁹. Este cruce de vías podría explicar las histologías mixtas observadas en algunos tumores.

6.3- CARCINOMA RENAL PAPILAR HEREDITARIO TIPO II O LEIOMATOSIS HEREDITARIA

La leiomatosis hereditaria es un síndrome con herencia autosómica dominante en el que los individuos afectados tienen un riesgo aumentado de desarrollar múltiples leiomiomas en la piel y en el útero. La principal causa de muerte en estos pacientes es el desarrollo de una forma agresiva de carcinoma papilar renal tipo 2 o, en raros casos, un carcinoma de los ductos colectores⁸⁰.

El gen de la leiomatosis hereditaria, localizado en el locus 1q42-43, codifica para la fumarato hidratasa (FH)⁸¹. La FH es un enzima del ciclo de Krebs responsable de facilitar ATP a las células en condiciones de normoxia. La ausencia de este enzima tiene como consecuencia la acumulación de fumarato y su precursor, succinato. En esta situación, el succinato difunde desde la mitocondria al citosol, donde inhibe las HIF- α proil hidroxilasas, causando estabilización de HIF y su consiguiente traslocación nuclear con las consecuencias explicadas previamente^{82 83}.

6.4- SÍNDROME DE BIRT-HOGG-DUBÉ (BHD)

El síndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD) es un síndrome hereditario con un patrón autosómico dominante que se caracteriza por el desarrollo de fibrofolículos cutáneos, quistes pulmonares, neumotórax espontáneos y un riesgo aumentado de desarrollar un tumor renal. Generalmente, los tumores renales son bilaterales y multifocales. Los tipos histológicos más frecuentes son cromófbos (33%), cromófobo/oncocítico mixto (50%), oncocitoma (7%) y carcinoma renal de células claras (5%)^{84 85}.

El análisis genético, localizó el gen del BHD en el brazo corto del cromosoma 17 (17p11.2)⁸⁶. BHD, cuyo producto es la proteína foliculina, tiene características de gen supresor de tumor y está truncado como resultado de mutaciones *nonsense*, inserciones y deleciones^{87 88}.

6.5- ESCLEROSIS TUBEROSA

Es un síndrome originado por mutaciones germinales de los genes supresores de tumor TSC (*tuberous sclerosis complex gene*): TSC1 (9q34), que codifica la proteína hamartina y TSC2 (16p13), que codifica la proteína tuberina.

Los individuos afectados desarrollan angiofibromas cutáneos, linfangioleiomiomatosis pulmonar y tumores renales. El tumor renal más frecuente en este síndrome es el angiomiolipoma, aunque también se han observado otro tipo de tumores, incluyendo el carcinoma renal de células claras⁸⁹
90.

Tabla 2. Síndromes hereditarios

Síndrome	Gen/proteína	Locus	Tipo tumor renal	Manifestaciones extrarenales
VHL	VHL/pVHL	3p25	Células claras	Hemangioblastomas SNC, angiomas retinales, quistes y tumores sólidos
HPRC	c-Met/MET	7q31.1-34	Papilar tipo I	-
Leiomatosis hereditaria	Fumarato hidatasa(FH)	1q42-43	Papilar tipo II	Leiomiomas en piel y útero
BHD	BHD/Foliculina	17p11.2	Cromófobos, cromófobo/oncocítico mixto, oncocitoma, células claras	Fibrofoliculomas cutáneos, quistes pulmonares, neumotórax espontáneo
Esclerosis tuberosa	TSC1/Hamartina TSC2/Tuberina	9q34 (TSC1) 16p13 (TSC2)	Angiomiolipomas, células claras	Angiofibromas cutáneos, linfangioleiomiomatosis pulmonar

7. TRATAMIENTO DEL CÁNCER RENAL LOCALIZADO Y SEGUIMIENTO

El tratamiento quirúrgico, -ya sea nefrectomía total, nefrectomía parcial o técnicas ablativas- es curativo en los tumores localizados. Desafortunadamente, aproximadamente, el 30% de pacientes recidivarán después del tratamiento quirúrgico de un tumor renal localizado. La localización más frecuente de recidiva es la pulmonar, presente en el 50-60% de los casos. El tiempo medio de recidiva es de 1 a 2 años y la mayoría de las recidivas ocurren antes de los 3 años de seguimiento⁹¹. A pesar de que se han evaluado en diferentes ensayos clínicos distintos tratamientos dirigidos en el contexto de adyuvancia, hasta la fecha ninguno había conseguido demostrar un claro beneficio.

El estudio S-TRAC, demostró un beneficio en supervivencia libre de enfermedad (SLE) de 6,8 años vs 5,6 años (HR = 0.76 p = 0.03) en los pacientes tratados durante un año con sunitinib vs placebo tras la nefrectomía, sin objetivarse beneficio en SG⁹². En base a estos resultados la FDA aprobó sunitinib como tratamiento adyuvante, pero la EMA no, debido a la falta de beneficio en SG con una toxicidad no desdeñable.

Recientemente se ha presentado el estudio PROTECT⁹³ que analiza el beneficio de un año de pazopanib vs placebo adyuvante. Dicho estudio no objetivó diferencias en tiempo a la recaída – que era el objetivo principal- entre los dos brazos (HR = 0.862; 95% CI, 0.699, 1.063; p = 0.165).

En base a estos resultados, actualmente no existe ningún tratamiento adyuvante establecido.

No existe un consenso para el seguimiento de estos pacientes que, por regla general, será realizado por el urólogo en la mayoría de centros. Además de la ecografía, TC o radiografía de tórax debe realizarse monitorización periódica de la función renal.

Una manera de poder individualizar el seguimiento es estratificando a los pacientes por grupos de riesgo. Una herramienta útil es la definida por la Clínica Mayo^{94 95}, que tiene en cuenta el tamaño tumoral, la afectación ganglionar regional (TNM) y factores histológicos como la necrosis tumoral o el grado de diferenciación. No obstante, existen otros nomogramas para predecir el riesgo de recurrencia, que pueden ser utilizados para definir una estrategia de seguimiento.

Por regla general, el seguimiento de los pacientes de bajo riesgo es de 5 años. Por otro lado, el seguimiento de los pacientes con riesgo intermedio o alto suele prolongarse más allá de los 5 años, generalmente hasta los 10 años de la cirugía.

8. FACTORES PRONÓSTICOS EN ENFERMEDAD AVANZADA

En los pacientes con carcinoma renal metastásico (CCRm), los factores anatómicos e histológicos clásicos tienen un valor pronóstico limitado. El factor pronóstico clínico más importante en CCRm es el ECOG performance status. Varios factores pronósticos clínicos y biológicos se han descrito hasta la fecha y se han intentado elaborar distintos nomogramas pronósticos.

El sistema pronóstico más utilizado es el descrito por Motzer et al (modelo del Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) en 1999⁹⁶ (Tabla 3). Se actualizó en 2002⁹⁷ y se ha utilizado para estratificar pacientes con CCRm avanzado en ensayos de fase III de terapias dirigidas. Se identificaron cinco variables como factores de riesgo para una menor supervivencia: tiempo desde el diagnóstico hasta el tratamiento <1 año, índice de Karnofsky (KPS) <80%, lactato deshidrogenasa (LDH) sérica alta, hemoglobina sérica baja y calcio sérico corregido alto. Estos factores se combinaron para estratificar a los pacientes en tres grupos de riesgo con un pronóstico favorable (0 factores de riesgo), intermedio (1-2 factores de riesgo) o malo/pobre (3 o más factores de riesgo), con una mediana de SG de 30, 14 y 5 meses, respectivamente.

El modelo de Motzer se derivó de estudios en la era de la inmunoterapia. En 2009, Heng et al⁹⁸ realizaron un estudio retrospectivo que incluyó a 645 pacientes tratados con terapias anti-VEGF (sunitinib, sorafenib y bevacizumab). Cuatro de los 5 factores pronósticos de Motzer fueron confirmados como pronósticos independientes de supervivencia: Hb por debajo del valor normal ($p < 0.0001$), calcio sérico alto corregido, KPS por debajo del 80% ($p < 0.0001$) y tiempo desde el diagnóstico inicial hasta el inicio del tratamiento <1 año ($p = 0.0098$). Además, neutrófilos absolutos ($p < 0.0001$) o el número de plaquetas ($p = 0.0121$) por encima del nivel normal también se identificaron como factores pronósticos adversos independientes (modelo de la Cleveland Clinic). Tabla 4.

Los pacientes se clasificaron en 3 grupos de riesgo: buen pronóstico (0 factores de riesgo) con una SG mediana no alcanzada en el momento de la publicación y una SG a dos años (SG-2a) del 75%; pronóstico intermedio (1-2 factores de riesgo) en la que la mediana de SG fue de 27 meses y la SG-2a fue del 53% y uno de pronóstico pobre (≥ 3 factores de riesgo) con una mediana de SG de 8,8 meses y una SG-2a del 7% ($p < 0.0001$).

En 2013, Heng et al⁹⁹, publicaron una validación externa de su modelo y la compararon con otros cuatro modelos pronósticos. Se incluyeron 1.028 pacientes con CCRm que habían sido tratados en 13 centros. Los seis factores de riesgo predefinidos fueron validados como pronósticos independientes de supervivencia. La SG mediana en los grupos de riesgo favorable, intermedio y bajo fue de 43.2, 22.5 y 7.8 meses, respectivamente.

Tabla 3. Modelo MSKCC

Factores pronósticos (FP)	Categoría de riesgo	Mediana SG
KPS <80% LDH (>1.5 valor normal) Hb <valor normal Ca corregido >10mg/dL Tiempo desde el diagnóstico inicial hasta el inicio del o <1 año	Riesgo favorable (No FP)	30 meses
	Riesgo intermedio (1- 2 FP)	14 meses
	Riesgo pobre (≥ 3 FP)	5 meses

Tabla 4. Modelo Cleveland Clinic

Factores pronósticos (FP)	Categoría de riesgo	Mediana SG
KPS <80% Hb <valor normal Ca corregido >10mg/dL Tiempo desde el diagnóstico inicial hasta el inicio del tratamiento <1 año ófilos >vaaquetas >valor normal	Riesgo favorable (No FP)	43 meses
	Riesgo intermedio (1- 2 FP)	22 meses
	Riesgo pobre (≥ 3 FP)	7.8 meses

9. NEFRECTOMÍA CITOREDUCTORA EN PACIENTES METASTÁSICOS

La cirugía continúa teniendo un papel importante en el manejo de los pacientes con carcinoma renal metastático (CCRm), incluyendo la metastasectomía en pacientes seleccionados y la nefrectomía, ya sea paliativa en pacientes con síntomas locales severos o con una intención citoreductora. La nefrectomía citoreductora en pacientes con CCR metastásico se ha asociado con regresión espontánea de metástasis en <1% de los casos; por lo tanto, la nefrectomía sola no tiene un claro impacto de supervivencia.

Previamente a la introducción de los agentes antidiaria en cáncer renal, la nefrectomía citoreductora había demostrado un beneficio en la supervivencia de los pacientes tratados con interferón en dos ensayos randomizados^{100 101}. Tanto el estudio del Southwest Oncology Group (SWOG) como el de la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) aleatorizaron los pacientes a recibir interferón-alfa o nefrectomía seguido de interferón-alfa y objetivaron un beneficio estadísticamente significativo en términos de supervivencia favoreciendo el planteamiento de la nefrectomía en estos pacientes.

No está del todo claro si este beneficio en supervivencia es trasladable a los pacientes tratados con terapias dirigidas; no obstante, estudios no randomizados han sugerido que también existe¹⁰².

Sin embargo, la evidencia retrospectiva nos sugiere que es importante la correcta selección de los pacientes, ya que, por ejemplo, el beneficio es muy dudoso en los pacientes con factores de mal pronóstico. Está en marcha un estudio prospectivo randomizado fase III que asigna a los pacientes a tratamiento con sunitinib o bien a nefrectomía seguida de sunitinib (estudio CARMENA)¹⁰³.

10. TRATAMIENTOS ANTIGUOS DEL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES LOCALMENTE AVANZADO O METASTÁSICO

10.1- INTERLEUKINA -2 (IL-2) EN ALTAS DOSIS

El tratamiento con IL-2 se aprobó para el tratamiento del CCRm en 1992, basándose en los resultados de diversos estudios fase II que, aunque mostraron tasas de respuestas tan solo del 12%, dichas respuestas eran duraderas, con una mediana de 80 meses, en un 5% de los pacientes¹⁰⁴. Sin embargo, el perfil de seguridad, con una mortalidad elevada y la necesidad de hospitalización para la administración de la IL-2 en infusión continua y monitorización del tratamiento, hacen que la utilización de este tratamiento haya quedado muy limitada en la actualidad.

No obstante, la inmunoterapia con IL-2 en altas dosis sigue siendo utilizada en algunos centros con experiencia y capacidad para manejar las toxicidades relacionadas con el tratamiento (principalmente fuera de nuestro medio). Se restringe el tratamiento a pacientes muy seleccionados, con muy buen estado general y que previsiblemente puedan tolerar las severas toxicidades que puede conllevar. La razón por la que se sigue utilizando es que en un porcentaje muy pequeño de pacientes (<10%), puede conseguir respuestas, incluso respuestas completas, que pueden ser muy prolongadas.

10.2- INTERFERON-ALFA (IFN)

IFN fue la primera citoquina que mostró un beneficio, con tasas de respuesta del 26%, en pacientes con CCRm¹⁰⁵.

Existen diferentes ensayos comparando IFN con otras terapias no inmunológicas o con otras citoquinas, como IL-2 o con la combinación de ambos fármacos. Los resultados parecen favorecer al uso de IFN con una ligera mejoría en la SG.

Un metaanálisis que incluyó 6117 pacientes comparó los resultados de IFN o IL con respecto a otros tratamientos en pacientes con CCRm confirmando una mejoría estadísticamente significativa en cuanto a reducción de riesgo de muerte a favor de los tratamientos inmunoterápicos respecto a los controles (HR de muerte a un año de 0.74, IC 95% 0.63-0.88). La tasa de respuestas (TR) fue de 12.4% vs 2.4%. La mediana de SG con los tratamientos inmunoterápicos fue de 12.9 meses¹⁰⁶.

Un estudio fase III del grupo francés comparó acetato de medroxiprogesterona con IFN, IL-2 a bajas dosis y con la combinación de IFN e IL-2 en pacientes con pronóstico intermedio. La TR fue de 2.5% para acetato de medroxiprogesterona, 4.4% para IFN, 4.1% para IL-2 y 10.9% para la combinación. No se hallaron diferencias en la SG entre los diferentes brazos de tratamiento (15 meses, $p > 0.05$)¹⁰⁷.

11. TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES LOCALMENTE AVANZADO O METASTÁSICO DE PRIMERA LÍNEA EN EL MOMENTO ACTUAL

La introducción de nuevos fármacos, en especial aquellos cuya diana terapéutica radica en la vía del VEGF, ha modificado radicalmente el pronóstico y tratamiento del CCRm. Desde 2005 se han aprobado diez nuevos tratamientos para el CCRm. Además, recientemente estudios con nuevas inmunoterapias han revolucionado nuevamente este escenario tanto en monoterapia como en combinación. La tabla 6 muestra los estudios que han conducido a la aprobación de los fármacos en primera línea.

No existe un tratamiento estándar para los pacientes con histologías de células no claras debido a que en los estudios pivotaes no se incluyeron estas poblaciones, por lo que todo lo que explicaremos a continuación se refiere a carcinoma renal de células claras. La decisión de tratamiento de los pacientes con tumores renales de histología de células no claras se basa en la extrapolación de los estudios de células claras o en los resultados de pequeños estudios fase II, en la mayoría de los cuales se han mezclado todas estas poblaciones.

A partir de la evidencia disponible, la valoración y la decisión terapéutica en los pacientes con CCRm debe tener en cuenta, entre otros parámetros, los grupos pronósticos del MSKCC o del IMDC (*International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium*).

11.1- PACIENTES DE BUEN PRONÓSTICO Y PRONÓSTICO INTERMEDIO

11.1.1- BEVACIZUMAB

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra VEGF que se une con alta afinidad a la parte circulante de VEGF neutralizando todas las isoformas de VEGF¹⁰⁸.

Bevacizumab fue la primera terapia dirigida que demostró beneficio clínico en CCRm. *Yang et al*¹⁰⁹ reportaron los resultados de un ensayo fase II aleatorizado en el que 116 pacientes tratados previamente con IL-2 (o no candidatos para terapia con IL-2) fueron asignados a 1 de 3 brazos de tratamiento: placebo (n = 40), Bevacizumab 3 mg / kg (n = 37) o 10 mg / kg (n = 39). La mediana de tiempo hasta la progresión fue significativamente mejor para el brazo de bevacizumab 10 mg / kg que el brazo placebo (4.8 vs 2.5 meses, p <0.001). Cuatro pacientes (10%) en el brazo de dosis alta lograron una respuesta parcial, por lo que la dosis recomendada para los estudios fase III se fijó en 10 mg / kg.

Bevacizumab fue evaluado en dos estudios aleatorizados fase III (AVOREN, CALGB 90206) en combinación con Interferon-alfa-2a (IFN).

En el estudio AVOREN^{110 111} (ciego), 649 pacientes con CCRm no tratado previamente, predominantemente con histología de células claras (> 50%) y nefrectomía previa fueron aleatorizados 1:1 a recibir IFN (9 MIU subcutánea tres veces por semana) y bevacizumab (10 mg / kg cada 2 semanas) o placebo e IFN. El objetivo primario fue la SG, mientras que la supervivencia libre de progresión (SLP) y la seguridad fueron objetivos secundarios. La mediana de SG fue de 23.3 meses en el brazo de IFN / bevacizumab combinado vs 21.3 meses en el brazo de IFN más placebo ($p = 0.1291$). La SLP mediana fue de 10.4 meses en el brazo de combinación y de 5.5 meses en el brazo de control ($HR = 0.63$, $p = 0.0001$). La TR global también fue significativamente mayor en el grupo de bevacizumab (31% vs 13%), con una duración mediana más larga de la respuesta (13.5 vs 11.1 meses). Debido a la aparición de nuevos tratamientos, mientras el ensayo todavía estaba abierto que podría haber llevado a confusión en los análisis finales los datos de SG, se llegó a un acuerdo con las agencias reguladoras para aceptar los datos de SLP para aprobación del fármaco por dichas agencias. Los eventos adversos (EA) más frecuentes grado 3 y 4 en pacientes que recibieron bevacizumab fueron fatiga, astenia, proteinuria y neutropenia. Se observaron perforaciones gastrointestinales y eventos tromboembólicos grado 3 o superior en el 1% de los pacientes.

En el estudio Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 90206^{112 113}, 732 pacientes con CCRm no tratado recibieron bevacizumab (10 mg / kg cada 2 semanas hasta la progresión) más IFN (9 MIU, subcutáneo 3 veces por semana). El objetivo principal fue SG y los objetivos secundarios SLP, TR y seguridad. La SG media fue de 18.3 meses en el brazo de bevacizumab más IFN y de 17.4 meses en el de monoterapia con IFN ($p = 0.097$). La mediana de SLP fue significativamente mejor en el brazo de combinación (8.5 vs 5.2 meses, $p < 0.0001$). La TR fue mayor en el grupo bevacizumab / IFN (25.5% vs 13.1%, $p < 0.0001$). Las toxicidades más frecuentes grado 3/4 para el brazo de combinación, fueron hipertensión, anorexia, fatiga y proteinuria, coincidiendo con lo reportado en el estudio AVOREN.

La contribución del IFN a esta combinación no queda clara. Un subanálisis del estudio AVOREN¹¹⁴ de 131 pacientes cuya dosis de IFN se redujo con el fin de lograr una mejor tolerancia mostraron tasas de SLP comparables con la población total, lo que sugiere que las dosis de IFN pueden reducirse para manejar eficazmente los efectos secundarios sin comprometer la eficacia.

A partir de los resultados de eficacia de ambos estudios a favor de la combinación, con beneficio de SLP y tendencia al beneficio de la SG, bevacizumab con IFN puede considerarse uno de los tratamientos estándar en primera línea en CCRm, pero el perfil de seguridad y la vía de administración parenteral de ambos fármacos ha llevado a considerar en la actualidad la elección de otras opciones terapéuticas.

11.1.2- SUNITINIB

Sunitinib es una molécula oral inhibidor tirosin-kinasa (TKI) multidiana de VEGFR, *fetal liver tyrosine kinase receptor 3* (FLT-3), c-KIT y PDGFR¹¹⁵. Sunitinib fue el primer TKI en ser aprobado en primera línea de tratamiento del CCRm.

En estudios fase I¹¹⁶ 117 las toxicidades limitantes de dosis fueron fatiga, hipertensión y toxicidad cutánea bullosa. La dosis seleccionada para los ensayos fase II se estableció a 50 mg por vía oral una vez al día en un régimen de 4 semanas de tratamiento / 2 semanas de descanso (esquema 4/2).

Se realizaron dos ensayos fase II de un solo brazo con sunitinib en pacientes con CCRm y progresión a citoquinas de primera línea (n = 63 y n = 106). En el primer estudio¹¹⁸, la TR –que era el objetivo principal- fue de 40% y la SLP de 8.7 meses. En el segundo estudio¹¹⁹ se demostró una TR del 34% y una SLP de 8,3 meses. Ambos estudios mostraron un perfil de EA similar, siendo la fatiga el EA grado 3 más frecuente. Las alteraciones de laboratorio grado 3/4 más frecuentes fueron linfopenia y neutropenia sin infección y lipasa sérica elevada sin signos clínicos o síntomas de pancreatitis.

Como resultado de estos estudios, sunitinib recibió aprobación acelerada por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento del carcinoma avanzado de células renales en enero de 2006.

En un estudio multicéntrico fase III, se aleatorizaron 750 pacientes con CCRm e histología de células claras previamente no tratados a recibir sunitinib (ciclos de 6 semanas de 50 mg/día administrados por vía oral esquema 4/2) o IFN (9 MUI, por vía subcutánea 3 veces por semana). La mayoría de los pacientes habían sido sometidos a nefrectomía (91% en el brazo de sunitinib y 89% en el de IFN) y tenían características de riesgo favorable o intermedio del MSKCC. Solo el 6% de los pacientes en el brazo de sunitinib y el 7% en el brazo de IFN eran del subgrupo de mal pronóstico. Se objetivó un aumento estadísticamente significativo en la SLP –que era el objetivo primario- (11 vs 5 meses, $p < 0.001$), así como una mejoría en la mediana de SG a favor de sunitinib (26.4 vs 21.8 meses, $p = 0.051$)¹²⁰ 121. El beneficio en SLP de sunitinib frente a IFN se observó en todos los subgrupos de riesgo MSKCC. La TR objetiva fue de 37% con sunitinib y del 12% con IFN ($p < 0.001$). Un análisis interino pre-planeado demostró una mejora en la SLP en el brazo de sunitinib, por lo que se realizó una enmienda en el protocolo para permitir el cruce (*cross over*) de los pacientes que recibían IFN a sunitinib a la progresión de la enfermedad (7% de los pacientes). Este cruce y la administración de tratamientos posteriores al estudio podrían justificar el hecho de que el valor de p para SG roce la significación estadística. Después de excluir a los pacientes que fueron transferidos al brazo de sunitinib, la mediana de SG fue de 26.4 meses en el brazo de sunitinib versus 20.0 meses en el brazo de IFN ($p = 0.036$). La diferencia en la mediana de la SG se incrementó -28.1 meses vs 14.1 meses ($p = 0.003$)- cuando los pacientes que habían recibido tratamiento post-estudio fueron excluidos del análisis. Los EA grado 3 más frecuentemente reportados con sunitinib fueron hipertensión, fatiga, diarrea y síndrome mano-pie.

Disponemos de datos adicionales del estudio de acceso expandido¹²² de sunitinib que incluyó a 4564 pacientes. Dicho estudio confirmó una mediana de SLP de 11 meses y una SG de 18 meses, inferior a la observada en el estudio fase III, lo que es atribuible a la mayor proporción de pacientes con peor pronóstico (mal PS, metástasis cerebrales) y otras histologías no células claras incluidos en el acceso expandido.

11.1.3- PAZOPANIB

Pazopanib es un TKI multidiana de VEGFR, PDGFR y c-kit, que se administra vía oral¹²³. La seguridad, la farmacocinética y la actividad clínica de pazopanib se evaluaron en un ensayo de fase I en 63 pacientes con tumores sólidos¹²⁴. Los EA más frecuentemente relacionados con el fármaco fueron hipertensión, diarrea, despigmentación del cabello y náuseas aunque la mayoría eran de grado 1-2 y reversibles después de la interrupción del tratamiento. La hipertensión fue el EA grado 3 más frecuente. Tres pacientes -dos de ellos con carcinoma de células renales- lograron una respuesta parcial. Se observó beneficio clínico en pacientes que recibieron dosis \geq 800 mg una vez al día o 300 mg dos veces al día. El régimen de pazopanib seleccionado para los siguientes ensayos fase II fue de 800 mg una vez al día.

En un estudio fase II¹²⁵, se incluyeron 225 pacientes: 115 (69%) no habían recibido tratamiento sistémico previo y 70 (31%) habían recibido citoquinas o regímenes con bevacizumab. La TR fue del 35% (IC 95% 28-41%), sin diferencias relevantes entre el grupo no previamente tratado y el grupo con tratamiento previo, 34% vs 37%, respectivamente. La SLP observada fue de 52 semanas (IC 95% 44-60). Los efectos secundarios más frecuentes fueron diarrea (63%), fatiga (46%), náuseas (42%), hipertensión (8%) y aumento de las transaminasas (54%).

Subsecuentemente, pazopanib fue evaluado en un estudio fase III doble ciego¹²⁶. Un total de 435 pacientes con CCR localmente avanzado y/o metastásico fueron aleatorizados 2:1 a recibir pazopanib oral (n = 290) o placebo (n = 145). De estos, 233 no habían sido tratados previamente (54%) y 202 habían recibido citoquinas previamente (46%). Todos ellos tenían histología de células claras o predominantemente claras, más del 90% eran de los grupos de buen pronóstico o pronóstico intermedio del MSKCC y la mayoría de ellos (89% en el grupo de pazopanib y 88% en el grupo de placebo) se había sometido a nefrectomía previa. El objetivo principal fue la SLP y los objetivos secundarios SG, TR y seguridad. A los pacientes que progresaron dentro del grupo placebo se les ofreció la posibilidad de recibir pazopanib en un estudio abierto. En el análisis del estudio, se consiguió el objetivo primario de SLP, a favor de pazopanib, con 9.2 vs 4.2 meses, (HR = 0.46, p <0.0001). La SLP en los pacientes no tratados previamente fue de 11.1 vs 2.8 meses en el grupo que sí había recibido tratamiento (HR = 0.40, p <0.0001), con tasas de respuestas de 32% vs 4%. El análisis final de SG fue de 22.9 meses en el brazo de pazopanib frente a 20.5 meses en el brazo de placebo, sin diferencias significativas entre los dos brazos (HR = 0.91, p = 0.224)¹²⁷.

Los EA más comunes reportados en el brazo de pazopanib fueron diarrea, hipertensión, cambios en el color del cabello, náuseas, anorexia y vómitos, siendo los EA más comunes grado 3 o 4 hipertensión y diarrea. Las alteraciones de laboratorio más frecuentes observadas en el grupo de pazopanib fueron elevación de la alanino-aminotransferasa (ALT) y de la aspartato-aminotransferasa (AST); se observó toxicidad hepática grado 3 y 4 (aumento de ALT o AST) en el 17% y el 2% de los pacientes respectivamente.

La demostración de la superioridad de pazopanib frente a placebo en primera línea de tratamiento del CCRm, llevó a su aprobación condicionada (a la espera de un estudio comparativo de no inferioridad vs sunitinib) por la FDA y la EMA.

El estudio COMPARZ, fase III, aleatorizó 1100 pacientes con CCRm de células claras no tratados previamente a recibir sunitinib o pazopanib a las dosis estándar¹²⁸. El objetivo principal del estudio fue demostrar la no inferioridad de pazopanib respecto a sunitinib en SLP. Los objetivos secundarios fueron la SG, la TR, el perfil de seguridad y la calidad de vida. La mediana de SLP fue 8.3 vs 9.5 meses para pazopanib y sunitinib, respectivamente, con HR = 1.05 (IC95% 0.90-1.22), con lo que se cumplió el criterio de no inferioridad. No se demostraron diferencias significativas en la SG, que resultó de 28.4 meses en el brazo de pazopanib y 29.3 meses para sunitinib (HR = 0.91, p = 0.28). La TR fue superior en el brazo de pazopanib respecto a sunitinib (31% vs 25%, p = 0.03).

Los pacientes tratados con sunitinib, en comparación con los tratados con pazopanib, presentaron una mayor incidencia de fatiga (63% vs. 55%), síndrome mano-pie (50% vs. 29%) y trombocitopenia (78% vs. 41 %). Los pacientes tratados con pazopanib tuvieron una mayor incidencia de aumento de ALT (60%, vs 43%). El análisis en calidad de vida resultó favorable a pazopanib.

Con anterioridad a la publicación de COMPARZ se comunicaron los resultados del estudio PISCES, que pueden considerarse complementarios al primero¹²⁹. PISCES fue un estudio aleatorizado y doble-ciego, que evaluó la calidad de vida y la preferencia de los pacientes y los médicos al tratamiento con sunitinib o pazopanib. En un diseño singular, 168 pacientes con CCRm fueron aleatorizados en proporción 1:1 a recibir en primera línea pazopanib 800 mg al día durante 10 semanas seguidas de dos semanas de lavado y posteriormente sunitinib 50 mg al día durante 10 semanas (4/2 semanas *on/off*) o viceversa. El objetivo principal fue la preferencia del paciente en la semana 22 del tratamiento. Los resultados del estudio favorecieron a pazopanib. El 70% de los pacientes prefirieron pazopanib, el 22% sunitinib y el 8% restante se mostró indiferente, con una diferencia del 49%, estadísticamente significativa a favor de pazopanib (IC 90% 37.0-61.5%, p <0.001). Las preferencias de los investigadores y el análisis de calidad de vida realizado durante el estudio también favorecieron al tratamiento con pazopanib.

11.2- PACIENTES DE MAL PRONÓSTICO

Entre los pacientes con CCRm, aproximadamente un 10-15% se clasifican en el grupo de mal pronóstico (Tabla 5). En la mayoría de los ensayos este subgrupo se halla escasamente representado, por lo que es difícil evaluar la eficacia de los distintos fármacos disponibles.

Tabla 5. Resultados de los diferentes estudios entre los pacientes de mal pronóstico

Ensayo	Nº pacientes (%)	Tasa respuestas (%)	SLP (meses)	SG (meses)
Temsirolimus vs IFN	145(69) vs 156(75)	8.6 vs 4.8	5.5 vs 3.1	10.2 vs 6
Sunitinib vs IFN	22(6) vs 26(7)	ND	3 vs 1	5.3 vs 4
Bevacizumab+IFN vs IFN (AVOREN)	26(8) vs 29(9)	ND	2.1 vs 2.2	6 vs 5.1
Bevacizumab+IFN vs IFN (CALGB 90206)	38(10) vs 37(10)	ND	3.3 vs 2.6	6.6 vs 5.7

*Pacientes de mal pronóstico MSKCC. ND: no disponible

11.2.1- TEMSIROLIMUS

Temsirolimus es un inhibidor de la enzima mTOR¹³⁰ que se administra vía endovenosa. En un estudio fase I con este fármaco, los EA más frecuentemente observados fueron astenia, mucositis, náuseas y toxicidad cutánea y las toxicidades limitantes de dosis estomatitis, vómitos, diarrea, astenia y elevación de transaminasas.

En un estudio fase II¹³¹, 111 pacientes con CCRm previamente tratados, fueron aleatorizados a recibir 25, 50 o 250 mg EV de temsirolimus semanal. Se objetivó una TR objetiva del 7% (una respuesta completa y siete respuestas parciales) y respuestas menores en el 26% de estos pacientes con CCR avanzado. La mediana de tiempo a la progresión fue de 5,8 meses y la supervivencia mediana de 15,0 meses. Los EA más frecuentemente observados fueron rash maculopapular, mucositis, astenia y náuseas, siendo los EA grado 3 - 4 más frecuentes hiperglucemia, hipofosfatemia, anemia e hipertrigliceridemia. No se objetivaron diferencias significativas ni en la toxicidad ni en la eficacia en función del nivel de dosis de temsirolimus.

El estudio que condujo a la aprobación de temsirolimus en el tratamiento de primera línea en pacientes con CCRm de mal pronóstico fue el estudio ARCSS¹³². Dicho estudio aleatorizó pacientes de mal pronóstico (solo un 27% eran pacientes de riesgo intermedio) a recibir temsirolimus 25 mg cada semana, IFN a dosis de 3 a 18 MU tres veces por semana o IFN con temsirolimus. El brazo de combinación presentó un perfil de toxicidad desfavorable, lo que llevó a reducciones sustanciales de dosis y al cierre posterior de esta rama. El estudio demostró un aumento de mediana de SG favorable a temsirolimus, con 10.9 meses vs 7.3 meses con IFN (HR = 0.73, IC95% 0.59-0.92, p = 0.008), así como una mejoría de la SLP, con 5.3 vs 3.1 meses (p <0.001). La TR fue de 8.6% vs 4.6%. El brazo de IFN con temsirolimus no evidenció mejoría en la SG (mediana de 8 meses) en comparación con IFN solo y sí un aumento de la toxicidad.

11.2.2- SUNITINIB

Series retrospectivas han evaluado el papel de sunitinib en estos pacientes. Heng et al, revisaron 61 pacientes tratados con sunitinib¹³³. El 41% de los mismos habían sido nefrectomizados. Mostraron una SLP de 3.9 meses y una SG de 6.4 meses.

En el estudio de acceso expandido de sunitinib se incluyeron pacientes con características consideradas de exclusión en la mayoría de ensayos clínicos: ECOG >1, metástasis cerebrales, histología no células claras, etc. En el estudio se incluyeron 375 pacientes con criterios de mal pronóstico (9%). La SLP y la SG en este subgrupo de pacientes fueron 4.1 meses (IC95% 3.1-5.0) y 5.3 meses (IC95% 4.6-6.4), respectivamente, superiores a las comunicadas en otros estudios en pacientes de similares características¹³⁴.

Sunitinib fue bien tolerado por estos pacientes, sin observar diferencias en la incidencia de EA en comparación con el resto de pacientes del estudio, por lo que a menudo en nuestro medio se utiliza este fármaco en pacientes del grupo de mal pronóstico.

Tabla 6. Estudios que han conducido a la aprobación de los fármacos en primera línea

Estudio	Nº pacientes	TR (%)	SLP (meses)	SG (meses)
Sunitinib vs IFN	750	47 vs 12	11.0 vs 5.0 p <0.001	24.4 vs 21.8 p = 0.051
AVOREN Bevacizumab+IFN vs IFN+placebo	649	31 vs 12	10.4 vs 5.5 p <0.0001	23.3 vs 21.3 p = 0.1291
CALGB 90206 Bevacizumab+IFN vs IFN	732	25.5 vs 13.1	8.4 vs 4.9 p <0.0001	18.3 vs 17.4 p = 0.069
Pazopanib vs placebo	233	32 vs 3	11.1 vs 2.8 p <0.00001	NA
COMPARZ Pazopanib vs sunitinib	1100	31 vs 25	10.5 vs 10.2 NS	28.4 vs 29.3 NS
Temsirolimus vs IFN	626	8.6 vs 4.6	3.8 vs 1.9 p <0.0001	10.9 vs 7.3 p = 0.008

12. ESTUDIOS RECIENTES QUE CAMBIARÁN EL TRATAMIENTO DE PRIMERA LÍNEA

12.1- CABOSUN

El estudio CABOSUN¹³⁵ es un estudio fase II abierto que randomizó 1:1 pacientes que no habían recibido tratamiento previo y eran de mal pronóstico y pronóstico intermedio según los criterios del IMDC a recibir cabozantinib 60mg/día o sunitinib 50mg 4on/2off. El objetivo principal fue la SLP y se incluyeron 157 pacientes (cabozantinib, n = 79; sunitinib, n = 78). En comparación con sunitinib, el tratamiento con cabozantinib aumentó significativamente la mediana de SLP (8.2 v 5.6 meses) y se asoció con una reducción del 34% en la tasa de progresión o muerte (HR = 0.66; p = 0.012). La TR fue del 46% para cabozantinib frente al 18% para sunitinib. Los EA grado 3 o 4 fueron 67% y 68% en el brazo de cabozantinib y sunitinib respectivamente, e incluyeron diarrea (10% vs 11%), fatiga (6% vs 15%), hipertensión (28% vs 22%), eritrodisestesia palmo-plantar (8% vs 4%) y EA hematológicos (3% vs 22%).

En base a estos resultados tanto la FDA como la EMA han dado a su aprobación a cabozantinib como tratamiento de primera línea, a pesar de tratarse de un estudio fase II.

12.2- CHECKMATE-214

Ipilimumab en monoterapia a 3 mg / kg cada 3 semanas fue estudiado en CCRm en un estudio fase II, objetivando una TR del 12.5%¹³⁶. Se observó alta frecuencia de enteritis y de endocrinopatías probablemente de origen inmune. Curiosamente, los pacientes que experimentaron estas toxicidades parecían tener mejores respuestas (30% frente a 0% en los pacientes en los que no se observó ningún EA relevante). La incidencia del 33% de EA grado 3-4 inmunes hizo que no siguiera su desarrollo a estas dosis.

El ensayo fase I CheckMate-016¹³⁷ evaluó la seguridad y eficacia de nivolumab más ipilimumab en diversas dosis en 47 pacientes con CCRm seguido de nivolumab de mantenimiento a 3 mg / kg cada 2 semanas. Una quinta parte de los pacientes no habían recibido tratamiento previo. Se observaron EA relacionados con el tratamiento grado 3-4 en el 38.3% y 61.7% de los pacientes en los brazos N311 y N113, respectivamente. Con una mediana de seguimiento de 22.3 meses, la TR objetiva confirmada fue del 40.4% en ambos brazos, con respuestas del 42.1% y el 36.8% de los pacientes en los brazos N311 y N113, respectivamente. La SG a 2 años fue de 67.3% y 69.6% en los brazos N311 y N113, respectivamente.

Los hallazgos previos llevaron al desarrollo del estudio fase III CheckMate-214¹³⁸ que aleatorizó 1:1, 1096 pacientes con CCRm a recibir tratamiento de primera línea con sunitinib o nivolumab (3 mg / Kg) más ipilimumab (1 mg / kg) cada 3 semanas por cuatro dosis, seguido de nivolumab cada 2 semanas. El 61% de

los pacientes eran de riesgo intermedio / pobre del IMDC. Con una mediana de seguimiento de 25,2 meses la mediana de SG a los 18 meses fue del 75% con nivolumab más ipilimumab y 60% con sunitinib; la mediana de SG no se había alcanzado en el momento de la publicación con nivolumab más ipilimumab frente a 26.0 meses con sunitinib (HR = 0.63, p <0.001). Las tasas de respuestas fueron 42% y 27% (p <0.0001) en el brazo de combinación y sunitinib respectivamente. Se objetivaron respuestas completas en el 9% de los pacientes del grupo de inmunoterapia frente el 1% en la cohorte de sunitinib. La mediana de SLP fue de 11.6 meses y 8.4 meses, respectivamente (HR = 0.82, P = 0.03, no estadísticamente significativo por el umbral previamente especificado de 0.009). El perfil de toxicidad de la combinación fue consistente con los resultados previos. Los EA más comunes fueron fatiga, prurito, diarrea, náuseas, hipotiroidismo y disminución del apetito.

12.3- IMMOTION 151

En un estudio fase Ib se observaron respuestas en pacientes con cáncer renal tratados con la combinación de bevacizumab+atezolizumab¹³⁹

A continuación, un estudio fase II (IMMOTION 150) evaluó la eficacia de atezolizumab en monoterapia y en combinación con bevacizumab en comparación con sunitinib¹⁴⁰. Atezolizumab+bevacizumab demostró una mejoría en la SLP y TR comparado con sunitinib en el subgrupo de pacientes que expresaban PDL1 (HR = 0.64, p = 0.095).

Recientemente se han comunicado los resultados del estudio IMMOTION 151¹⁴¹. Es un estudio fase III que compara el tratamiento con atezolizumab 1200 mg cada 3 semanas + bevacizumab 15 mg/kg cada 3 semanas vs sunitinib 50 mg/d 4 semanas on/ 2off. Los pacientes se estratificaron en función del status de PD-L1 (<1% vs ≥ 1% expresión de PD-L1 en células inmunes infiltrantes). Los dos objetivos primarios eran: SLP (por el investigador por RECIST v1.1) en pacientes PD-L1 + (≥ 1% IC) y SG en los pacientes por intención de tratar (ITT). Los objetivos secundarios incluyeron PFS en la población por intención de tratar, TR y duración de la respuesta.

La HR para de la SLP en pacientes PDL1+ fue 0.74 (IC del 95%: 0.57; 0.96) y 0.83 (IC del 95%: 0.70; 0.97) en la población por intención de tratar. Dicho beneficio en SLP fue constante en todos los subgrupos analizados, incluido el grupo de riesgo de MSKCC, metástasis hepáticas e histología sarcomatoide. En el momento de la presentación los datos de SG eran inmaduros, aunque sí que se observaba una tendencia a favor del grupo de la combinación. La TR fue 43% con una duración de respuesta aún no alcanzada en el brazo de atezolizumab-bevacizumab frente a 35% y 12.9 meses para el grupo de sunitinib. El 40% de los pacientes tratados con atezolizumab-bevacizumab y el 54% de los pacientes tratados con sunitinib presentaron EA grado 3-4 relacionados con el tratamiento.

13. TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES LOCALMENTE AVANZADO O METASTÁSICO DE SEGUNDA LÍNEA Y SUCESIVAS

13.1- EVEROLIMUS

Everolimus es un inhibidor oral de m-TOR. Fue el primer fármaco que demostró eficacia en un ensayo fase III tras progresión al tratamiento con TKI, evidencia obtenida del estudio RECORD-1, de everolimus contra placebo.

Un ensayo fase I¹⁴² determinó la seguridad para la dosis semanal hasta 70 mg y la dosis diaria hasta 10 mg. Se objetivó eficacia clínica en varios pacientes con CCRm, incluyendo 1 respuesta parcial (RP) confirmada, 1 RP sin confirmar y 5 de 10 pacientes CCR sin progresión a los 6 meses. Las toxicidades limitantes de dosis fueron estomatitis, fatiga e hiperglicemia.

A continuación, 41 pacientes con CCRm que habían recibido ≥ 1 régimen previo de tratamiento fueron tratados con everolimus 10 mg/d dentro de un ensayo fase II¹⁴³ de un solo brazo. Se objetivó una mediana de SLP y de SG de 11,2 y 22,1 meses, respectivamente; la TR fue de 14%, y el 70% de los pacientes mantenían respuesta o EE durante ≥ 6 meses. Los EA más frecuentes fueron anorexia, náusea, diarrea, estomatitis y rash cutáneo. Se objetivó neumonitis grado 3 en un 19% de los pacientes

Finalmente, el estudio RECORD-1¹⁴⁴, estudio fase III doble ciego, aleatorizó 2:1, 410 pacientes con CCR irreseccable o metastásico a recibir everolimus 10 mg/día o placebo, después de la progresión a sorafenib, sunitinib o ambos. También se incluyeron pacientes que habían recibido citoquinas, bevacizumab o quimioterapia, pero siempre que en algún momento del tratamiento hubieran recibido algún TKI o ambos. El 80% de los pacientes aleatorizados a placebo realizaron cruzamiento a everolimus a la progresión; de ellos, el 80% lo hicieron en las primeras ocho semanas tras la aleatorización. Los pacientes habían recibido una media de dos tratamientos antineoplásicos previos. El 45% de los pacientes había recibido sunitinib, 29% de ellos sorafenib y el 26% habían recibido ambos fármacos. La mayoría de los pacientes presentaban un KPS igual o superior al 80% y se incluían en los grupos de pronóstico favorable o intermedio (MSKCC). Solo el 10% de los pacientes tenían un KPS del 70% y un 15% pertenecía al grupo de mal pronóstico. Se estratificó a los pacientes según el grupo pronóstico y el número de TKIs recibidos previamente. Se objetivó un beneficio en la SLP favorable a everolimus respecto a placebo: 4.9 vs 1.9 meses (HR = 0.33, $p < 0.001$), cumpliéndose el objetivo principal. El beneficio se mantenía independientemente de si el paciente había recibido sunitinib, sorafenib o ambos fármacos¹⁴⁵. La TR de everolimus fue del 1%, pero la proporción de pacientes con estabilización fue de 63% vs 32% en el brazo de placebo. La SG fue de 14.8 meses entre los pacientes aleatorizados a recibir everolimus y de 14.4 meses entre los asignados a placebo, sin objetivarse diferencias significativas (HR = 0.87, $p = 0.162$)¹⁴⁶. El perfil de seguridad fue aceptable, con una baja incidencia de EA superiores a grado 2. Los principales

EA fueron estomatitis, rash y fatiga y, aunque con escasa incidencia, la neumonitis presenta una especial relevancia como efecto de clase de los inhibidores de mTOR que se observó en 22 pacientes (8%), siendo en 8 de ellos grado 3.

A raíz de los resultados del estudio RECORD-1, everolimus recibió la aprobación como tratamiento de segunda línea tras un TKI contra el VEGFR.

13.2- AXITINIB

Axitinib es Inhibidor selectivo de VEGFR 1, 2 y 3 a nivel subnanomolar, con potencia relativa 50-450 veces mayor respecto a otros inhibidores del VEGFR comentados anteriormente. A diferencia de otros TKI de primera generación, axitinib no inhibe de manera sustancial otros receptores como PDGFR, c-KIT o RAF. Fue evaluado en un estudio fase I¹⁴⁷ en distintos tipos de tumores. Las toxicidades limitantes de dosis fueron hipertensión, hemoptisis y estomatitis. La dosis máxima tolerada fue 5mg/12horas. En dos estudios fase II axitinib demostró una actividad prometedora en pacientes con CCRm. En el primero¹⁴⁸ axitinib objetivó una SLP y SG de 15.7 y 29.9 meses respectivamente en 52 pacientes con CCRm que habían recibido citoquinas previamente. En el segundo¹⁴⁹, 62 pacientes que habían progresado a uno más tratamientos antiangiogénicos previos (siendo uno de ellos sorafenib) obtuvieron una mediana de SLP y SG de 7.4 y 13.6 meses respectivamente.

En base a estos resultados se desarrolló un estudio prospectivo, abierto, fase III, aleatorizado, estudio AXIS¹⁵⁰, que fue el primero que comparó dos TKIs en segunda línea de tratamiento del CCRm. Se incluyeron 723 pacientes con CCRm en progresión tras una línea previa de tratamiento (sunitinib, bevacizumab+interferón alfa, temsirolimus o citoquinas). Se aleatorizó a los pacientes a recibir sorafenib 400 mg cada 12 horas o axitinib 5 mg cada 12 horas, ambos por vía oral. El objetivo primario fue la SLP, siendo objetivos secundarios: SG, TR, tiempo hasta el deterioro clínico. Las proporciones de pacientes según el tratamiento previo recibido fueron: sunitinib 54%, citoquinas 35%, bevacizumab-interferón 8%, temsirolimus 3%. En este estudio no se realizó cruzamiento entre ambos brazos. Para el global de los pacientes, la SLP fue significativamente superior en el brazo de axitinib, 6.7 meses contra 4.7 meses en el brazo de sorafenib (HR = 0.665, p <0.0001). La TR también fue superior con axitinib (19% vs 9%, p = 0.001). Respecto a los análisis de subgrupos según el tratamiento de primera línea, se demostró mayor beneficio de axitinib si previamente se había administrado un tratamiento con citoquinas, con SLP de 12.1 vs 6.5 meses (HR = 0.46, p <0.0001). Sin embargo, también se observó beneficio si el tratamiento previo se había realizado con sunitinib, con SLP de 4.8 vs 3.4 meses (HR = 0.74; p = 0.0107). Axitinib presentó un perfil de toxicidad tolerable, con menor toxicidad cutánea que sorafenib, pero mayor tasa de hipertensión arterial y astenia. Finalmente, no se describieron diferencias en la mediana de SG entre ambos brazos de tratamiento: 20.1 meses para axitinib y 19.2 meses para sorafenib (HR = 0.969, p = 0.3744)¹⁵¹. Tras los resultados del estudio AXIS, axitinib recibió la indicación de tratamiento de segunda línea del CCR avanzado tras fracaso a un tratamiento previo con sunitinib o citoquinas.

Una conclusión interesante que podemos extraer del estudio es el beneficio obtenido de un segundo TKI tras una primera línea con un TKI, es decir, manteniendo el mecanismo de acción prolongando el bloqueo de la misma vía molecular.

13.3- NIVOLUMAB

Nivolumab es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado específico contra PD-1 humano. En un estudio fase I¹⁵², 39 pacientes con distintos tipos de tumores fueron tratados con distintas dosis. Un paciente con carcinoma colorectal consiguió una respuesta completa con la dosis de 3mg/kg. Se objetivaron respuestas parciales en dos pacientes, uno con carcinoma renal y otro con melanoma a la dosis de 10mg/kg. Esta TR con un perfil de EA favorable llevó a otro estudio fase I¹⁵³ con múltiples dosis de 0.1 a 10mg/kg. Se incluyeron un total de 296 pacientes, de los cuales 34 eran CCRm. En este estudio no se alcanzó la dosis máxima tolerada y solo 15 de 296 pacientes (5%) discontinuaron el tratamiento por EA. Se objetivaron respuestas en 10/34 pacientes con CCRm (29%) y estabilización de la enfermedad durante 24 semanas o más en 9/34 (27%). La mediana de supervivencia libre de enfermedad (SLP) fue 7.3 meses, con una tasa de SLP del 35% a 1 año y 12% a 2 años.

Estos datos de eficacia llevaron al desarrollo de un estudio fase II en pacientes con CCRm de células claras que habían recibido por lo menos una pero no más de 3 líneas de tratamiento antiangiogénico previas¹⁵⁴. Un total de 168 pacientes se aleatorizaron a recibir nivolumab a dosis de 0.3mg/kg (n=60), 2mg/kg (n=54) o 10mg/kg (n=54) cada dos semanas, con el objetivo principal de evaluar una relación dosis-respuesta en SLP. La mediana de SLP fue de 2.7 meses para la dosis de 0.3mg/kg, 4 meses para la dosis de 2mg/kg y 4.2 meses para la dosis de 10mg/kg respectivamente. La mediana de SG fue de 18.2 meses, 25.5 meses y 24.7 meses para las dosis de 0.3, 2 y 10mg/kg respectivamente. La tasa de repuestas fue de 20%, 22% y 20% para las dosis de 0.3, 2 y 10mg/kg respectivamente. De los pacientes que alcanzaron una repuesta objetiva, 54% tuvieron respuestas que duraron más de 12 meses. Se objetivaron toxicidades grado 3 o 4 en el 5%, 17% y 13% de los pacientes incluidos en los grupos de 0.3, 2 y 10mg/kg respectivamente. Dado que no se objetivaron claras diferencias en dosis-respuesta se eligió la dosis de 3mg/kg para el estudio fase III (coincidiendo con las dosis usadas en otros tumores).

En el estudio fase III (CHECKMATE-025)¹⁵⁵, 821 pacientes con CCRm de células claras que habían recibido 1 o 2 tratamientos antiangiogénicos previos fueron aleatorizados 1:1 a recibir nivolumab 3mg/kg endovenoso cada dos semanas o everolimus 10mg/día vía oral. El objetivo principal fue la SG. La mediana de SG fue de 25 meses en el grupo de nivolumab y de 19.6 meses en el grupo de everolimus (HR = 0.73, p = 0.002), alcanzado el criterio preespecificado de superioridad. La TR objetiva también fue mayor en el grupo de nivolumab comparado con everolimus: 25% vs 5% (OR = 5.98, p <0.001). La mediana de SLP fue de 4.6 meses con nivolumab y 4.4 meses con everolimus (HR = 0.88, p

= 0.11). Se objetivaron EA grado 3 o 4 en el 19% de los pacientes que recibieron nivolumab y en el 37% de los que recibieron everolimus, siendo el más frecuente con nivolumab la fatiga (2%) y con everolimus la anemia (8%). En este estudio la expresión de PDL-1 se confirmó como un factor pronóstico pero no predictivo de respuesta.

13.4- CABOZANTINIB

Cabozantinib es un potente inhibidor oral del receptor del VEGFR-2, Met y AXL. En un estudio fase 1¹⁵⁶ demostró actividad en 25 pacientes con CCRm tras fallo a terapia estándar. Los EA más frecuentes fueron fatiga, diarrea, náuseas, proteinuria, disminución del apetito, eritrodisestesia palmar-plantar y vómitos. Se objetivó RP en siete pacientes (28%). La mediana de SLP y SG fueron de 12,9 y 15,0 meses respectivamente.

Un estudio fase III (METEOR)¹⁵⁷ aleatorizado y abierto, evaluó la eficacia de cabozantinib en comparación con everolimus en pacientes con CCRm que habían progresado después del tratamiento dirigido con VEGFR (mínimo una línea de tratamiento). Un total de 658 pacientes fueron aleatorizados (1:1) a recibir cabozantinib 60 mg/día (n = 330) o everolimus 10 mg/día (n = 328). El objetivo principal era SLP. Los objetivos secundarios fueron SG y TR objetiva. La mediana de SLP fue de 7,4 meses con cabozantinib y 3,8 meses con everolimus (HR = 0.51, p <0.001), cumpliendo el objetivo principal del estudio. Se objetivó también beneficio en SG siendo de 21.4 y 16.5 meses para cabozantinib y everolimus respectivamente (HR = 0.66, p = 0.00026) y en la TR (17% vs 3% p <0.0001). Los EA de grado 3 o 4 más frecuentes con cabozantinib fueron hipertensión (15%), diarrea (11%) y fatiga (9%).

13.5- LENVATINIB+EVEROLIMUS

Lenvatinib es un TKI oral del receptor de VEGFR 1-3, FGFR 1-4, PDGFR- α , RET y KIT.

Como hemos visto hasta ahora, el paradigma actual de tratamiento de CCRm consiste en una secuencia de agentes tras la progresión ya que las combinaciones de fármacos no han demostrado ningún beneficio de supervivencia frente a la monoterapia. Curiosamente, los resultados de un ensayo aleatorizado fase II (HOPE)¹⁵⁸ que compara la combinación de lenvatinib y everolimus frente a ambos fármacos por separado puede hacer volver a considerar este punto. En este estudio, se objetivó una SLP significativamente mejor para la combinación lenvatinib+everolimus frente a everolimus (mediana de 14.6 vs 5.5 meses, HR = 0.40, p = 0.0005) y con una tendencia a la mejoría frente a lenvatinib en monoterapia (7.4 meses, HR = 0.66; p = 0.12). Lenvatinib también fue superior al everolimus (HR = 0.61, p = 0.048). El perfil de toxicidad, especialmente diarrea e hipertensión, fue peor para los brazos que contenían lenvatinib. En base a estos resultados arrolladores de un fase II, la FDA ha dado

su aprobación a la combinación de lenvatinib+everolimus para el tratamiento de CCRm tras fallo a terapia con anti-VEGFR previo.

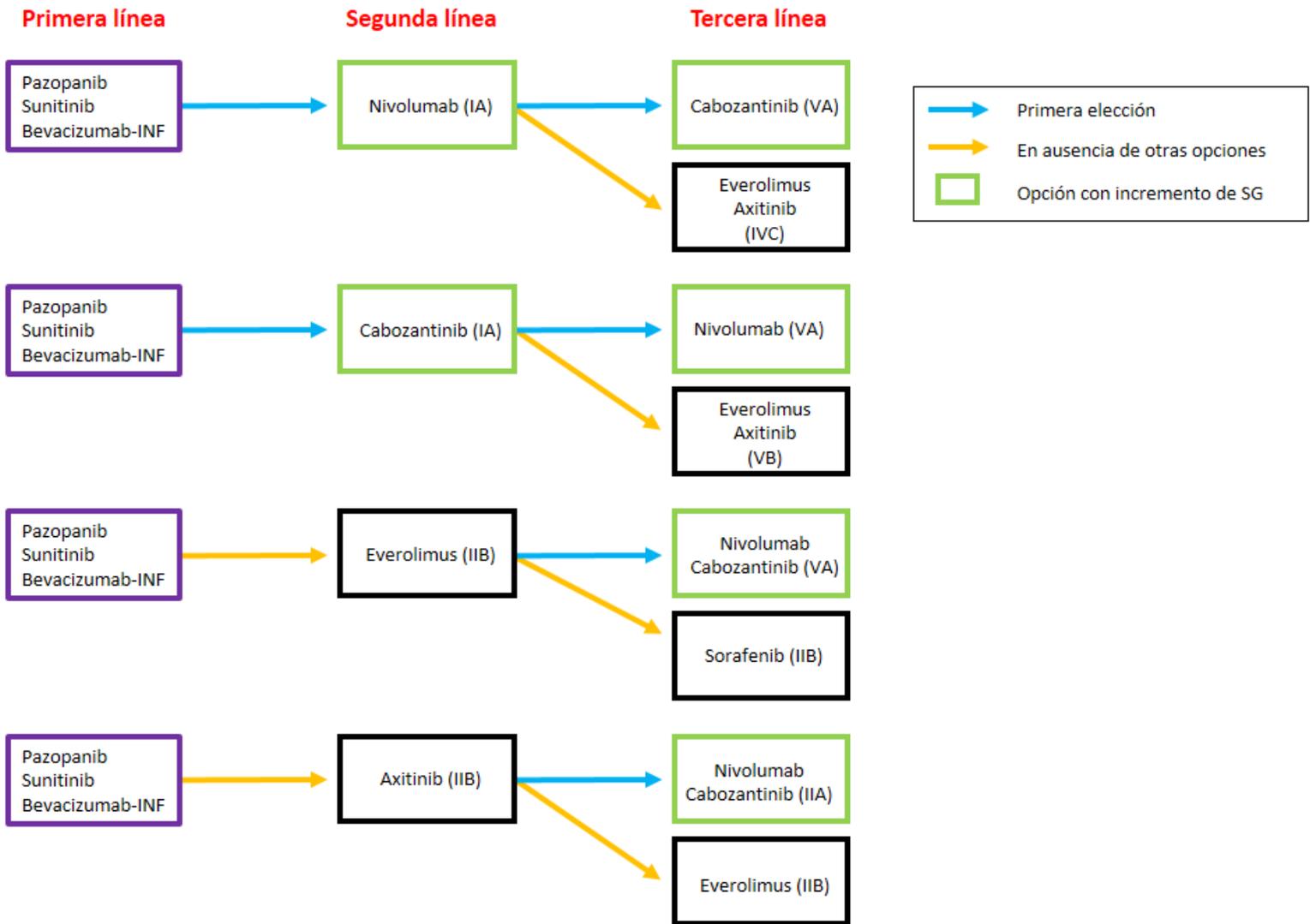
La tabla 7 muestra los tratamientos aprobados en segunda línea.

Tabla 7. Tratamientos aprobados en segunda línea.

Estudio	RECORD-1 ¹		AXIS ^{3,4}		HOPE-205 ⁵			METEOR ⁶		CHECKMATE 025 ⁷	
	E	PI	Ax	So	L/E	L	E	Cabo	E	Nivo	E
Brazos de tratamiento	E	PI	Ax	So	L/E	L	E	Cabo	E	Nivo	E
Fase	III		III		II			III		III	
Línea de tratamiento	≥ 2°		2°		2°			≥ 2°		2°-3°	
Tratamientos previos	Por lo menos Su y/o So		Su o Bev-IFN o Tem o citocinas		Anti-VEGF			Por lo menos 1 anti-VEGF		Anti-VEGF	
Histologías	Células claras		Células claras		Células claras			Células claras		Células claras	
Objetivo principal	SLP		SLP		SLP			SLP		SG	
Grupos de riesgo (B/I/M)	29/56/15		28/37/33		23/37/40			46/41/13		36/49/15	
TR (%)	1.8	0	19	9	43	27	6	17	3	25	5
SLP (m)	4.9	1.9	6.7	4.7	14.6	7.4	5.5	7.4	3.8	4.6	4.4
SLP – HR (95% CI)	0.33 (0.25-0.43)		0.67 (0.54-0.81)		0.40 (L/E vs. E), 0.66 (L/E vs. L), 0.61 (L vs. E)			0.58 (0.45-0.75)		0.88 (0.75-1.03)	
SG (m)	14.8	14.4	20.1	19.2	25.5	18.4	17.5	21.4	16.5	25.0	19.6
SG – HR (95% CI)	0.87 (0.65-1.15)		0.97 (0.80-1.17)		0.51 (L/E vs. E), 0.75 (L/E vs. L), 0.68 (L vs. E)			0.66 (0.53-0.83)		0.73 (0.57-0.93)	

14. PROPUESTA DE ALGORITMO DE TRATAMIENTO EN CCRm EN NUESTRO MEDIO (A la espera de nuevas aprobaciones en primera línea)

Figura 9. Propuesta de algoritmo de tratamiento en CCRm en nuestro medio (a la espera de nuevas aprobaciones en primera línea)



15. LA VÍA mTOR

15.1- RAPAMICINA

La rapamicina se descubrió inicialmente como un metabolito antimicótico producido por *Streptomyces hygroscopicus* a partir de una muestra de suelo de la Isla de Pascua (también conocida como Rapa Nui). Posteriormente, se descubrió que la rapamicina posee propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas en células de mamíferos, lo que produjo un interés en identificar el modo de acción de la rapamicina. Se demostró que la rapamicina es un potente inhibidor de la activación de la proteína ribosomal S6K1, una serina/treonina quinasa activada por diversos agonistas^{159 160} y un importante mediador en la señalización de *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)¹⁶¹.



Isla de Pascua (Rapa Nui)

A principios de la década de 1990, el análisis genético de células de levadura en gemación identificó los genes TOR1 y TOR2 como mediadores de los efectos tóxicos de la rapamicina en levadura^{162 163}. Posteriormente, se aisló e identificó mTOR en células animales como la diana molecular de la rapamicina¹⁶⁴. mTOR es una serina/treonina proteína quinasa atípica que pertenece a la familia de las quinastas relacionadas con la PI3K e interactúa con varias proteínas para formar dos complejos distintos denominados mTOR complejo 1 (mTORC1) y 2 (mTORC2). Los complejos que contienen mTOR tienen diferentes sensibilidades a la rapamicina, así como a los reguladores *upstream* y *downstream*. Los efectos de la rapamicina sobre la señalización de mTOR son mucho más complejos de lo que originalmente se había previsto y, sorprendentemente, casi

20 años después del descubrimiento de mTOR, su mecanismo de acción no está descrito en su totalidad. Sin embargo, se ha demostrado que la rapamicina forma un complejo de ganancia de función con la proteína intracelular 12-kDa *FK506-binding protein* (FKBP12). Este complejo interactúa e inhibe mTOR cuando es parte de mTORC1 pero no de mTORC2. Muchas funciones de mTORC1 son muy sensibles a la rapamicina, pero se desconoce exactamente cómo la unión de FKBP12-rapamicina a mTORC1 inhibe su actividad. La rapamicina puede comprometer la integridad estructural de mTORC1 así como reducir alostéricamente la actividad específica de su dominio quinasa.

15.2- REGULADORES DE mTORC1

mTORC1 es el mejor caracterizado de los dos complejos mTOR y una característica notable de esta rama de la vía es el número y la diversidad de las señales ascendentes que detecta. La vía mTORC1 integra entradas de al menos cinco señales intracelulares y extracelulares principales (factores de crecimiento, estrés, estado energético, oxígeno y aminoácidos) para controlar muchos procesos importantes, que incluyen la síntesis de proteínas y lípidos y la autofagia. El heterodímero formado por TSC1 (esclerosis tuberosa 1, también conocida como hamartina) y TSC2 (también conocida como tuberina) es un regulador clave de mTORC1 y funciona como una proteína activadora de GTPasa (GAP) sobre Rheb (*Ras homolog enriched in brain*). La forma de Rheb unida a GTP interacciona directamente con mTORC1 y estimula fuertemente su actividad quinasa. Como Rheb GAP, TSC1/2 regula negativamente mTORC1 manteniendo Rheb en su estado inactivo unido a GDP^{165 166}.

El complejo TSC1/2 transmite muchas de las señales ascendentes que afectan a mTORC1, incluidos factores de crecimiento, como la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1), que estimulan las vías de PI3K y Ras. Las quinasas efectoras de estas vías, la proteína quinasa B (Akt / PKB), la quinasa 1/2 regulada por señal extracelular (ERK1/2, extracellular-signal-regulated kinase 1/2) y la quinasa S6 ribosomal (RSK1), fosforilan directamente el complejo TSC1/TSC2 para inactivarlo y así activar mTORC1^{167 168 169}. Akt también regula la actividad de mTORC1 mediante fosforilación y de forma independiente de TSC1/2, causando la disociación de raptor de PRAS40, un inhibidor de mTORC1. Las citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), activan mTORC1 a través de un mecanismo conceptualmente similar a los factores de crecimiento: I κ B quinasa β (IKK β) fosforila TSC1, causando la inhibición de TSC1/2.

Algunos factores de estrés, como los niveles bajos de energía y oxígeno o el daño del ADN también actúan, al menos en parte, a través del TSC1/2 sobre mTORC1. De este modo, la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK), en respuesta a la hipoxia o a un estado de baja energía, fosforila TSC2 y aumenta su actividad GAP hacia Rheb. Al igual que Akt, AMPK también se comunica directamente con mTORC1; fosforila el raptor, lo que lleva a la unión de la proteína 14-3-3 y la inhibición alostérica de mTORC1¹⁷⁰. La

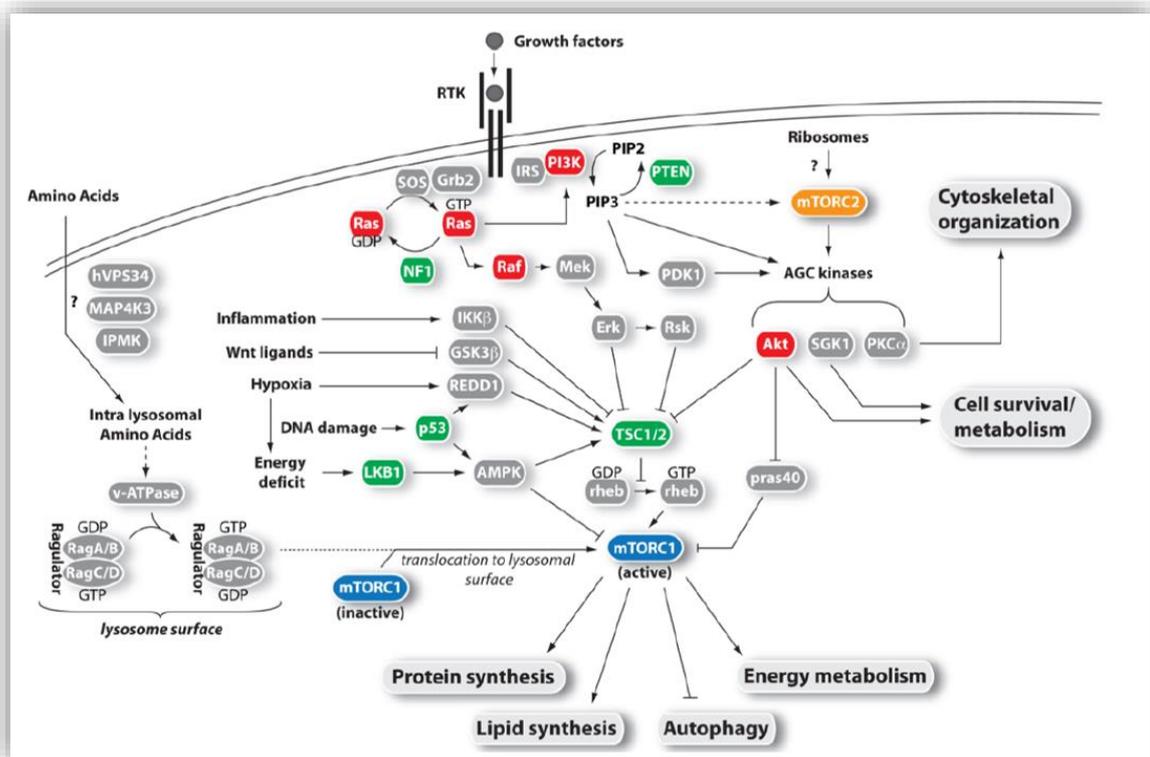
hipoxia también induce la expresión de la regulación transcripcional de REDD1 (*DNA damage 1*), que activa la función del TSC2 de una manera todavía poco conocida^{171 172}. El daño del ADN también regula mTORC1 a través de múltiples mecanismos, aunque todos ellos requieren la transcripción dependiente de p53. El daño del ADN induce la expresión de TSC2 y Pten (del inglés, *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), causando la infraregulación (*downregulation*) de todo el eje PI3K-mTORC1, y activa AMPK a través de un mecanismo que depende de la inducción de *Sestrin1/2*^{173 174}. Dado que muchas señales regulan mTORC1 a través de TSC1/2, es sorprendente que aún no sepamos cómo TSC1/2 integra, a nivel molecular, las entradas para controlar su actividad GAP sobre Rheb. Además, no está claro si ciertas entradas son dominantes sobre otras y si existen mecanismos reguladores dependientes del tipo de célula.

Los aminoácidos, en particular la leucina y la arginina, también activan mTORC1 y deben estar presentes para cualquier señal *upstream*, incluidos los factores de crecimiento, para activar mTORC1. Aunque se sabe desde hace tiempo que los aminoácidos actúan independientemente de TSC1/2, el mecanismo molecular a través del cual mTORC1 detecta los aminoácidos intracelulares sigue siendo un misterio en el campo mTOR. En 2008, dos grupos descubrieron de forma independiente que la activación de mTORC1 dependiente de aminoácidos requiere las Rag GTPasas^{175 176}. Los mamíferos tienen cuatro proteínas Rag, RagA a RagD, que forman heterodímeros que consisten en RagA o RagB con RagC o RagD. Los dos miembros del heterodímero parecen tener estados de carga de nucleótidos opuestos, de modo que cuando RagA/B se une a GTP, RagC/D se une al GDP y viceversa. A través de un mecanismo desconocido, los aminoácidos promueven la unión de RagA/B con GTP, lo que permite que el heterodímero interactúe con el componente raptor de mTORC1. Esta interacción da como resultado la translocación de mTORC1 de una ubicación citoplasmática a la superficie lisosomal, donde las Rag GTPasas se acoplan en un complejo de subunidades múltiples llamado Ragulator. Al igual que la Rag GTPasa, Ragulator es esencial para la activación de mTORC1 por aminoácidos.

Finalmente, el ácido fosfatídico (PA) también se ha identificado como un activador de mTORC1. Aunque el papel del PA en la regulación de mTOR es controvertido, varios informes muestran que el PA exógeno o la sobreexpresión de enzimas productoras de PA como la fosfolipasa D1 y D2 (PLD1 y PLD2) aumentan significativamente la actividad de mTORC1. PA activa la señalización de mTOR (al menos en parte) estabilizando los complejos de mTOR¹⁷⁷.

La figura 10 ilustra las señales clave que regulan mTORC1 y mTORC2.

Figura 10. Señales clave que regulan mTORC1 y mTORC2



(Laplante & Sabatini, Cell 2012)

15.3- DOWNSTREAM mTORC1

La síntesis de proteínas es el proceso controlado por mTORC1 mejor caracterizado. mTORC1 fosforila directamente los reguladores de la traducción eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*), 4E-BP1 (*binding protein 1*) y S6K1 (*S6 kinase 1*), que, a su vez, promueven la síntesis de proteínas. La fosforilación de 4E-BP1 impide su unión a la proteína eIF4E, lo que le permite participar en la formación del complejo eIF4F que es necesario para la iniciación de la traducción. La activación de S6K1 conduce, a través de una variedad de efectores, a un aumento en la biogénesis de ARNm, así como a la iniciación de la traducción y la elongación. Aunque mTOR en sí mismo es clave para el control de la traducción de 5'TOP mRNAs, S6K1 y su sustrato de proteína ribosomal S6 no son necesarios para este proceso y todavía no se conoce cómo mTORC1 controla la traducción de estos mRNAs. mTORC1 también regula al alza la maquinaria de síntesis de proteínas de otras maneras: (1) activa TIF-1A (*regulatory element tripartite motif-containing protein-24*), que promueve su interacción con la ARN polimerasa I (Pol I) y la expresión de ARN ribosómico (ARNr)¹⁷⁸; y (2) mTORC1 fosforila e inhibe Maf1, un represor Pol III, y por lo tanto induce 5S ARNr y la transcripción del ARN de transferencia (ARNt). El papel de mTORC1 en la regulación de la traducción de ARNm es fundamental, de hecho, los inhibidores específicos de mTOR que inhiben completamente la función de mTORC1 reducen significativamente la síntesis de proteínas cultivos celulares¹⁷⁹.

Además de regular la producción de proteínas, mTORC1 también controla la síntesis de lípidos necesarios para que las células en proliferación generen membranas. En gran medida, mTORC1 actúa a través de los factores de transcripción *sterol regulatory element binding proteins 1 and 2* (SREBP1/2), que controlan la expresión de numerosos genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Los SREBP inactivos residen en el retículo endoplasmático (ER) y su procesamiento proteolítico en respuesta a la depleción de insulina o esterol libera su forma activa que viaja al núcleo para activar la transcripción. La inhibición de mTORC1 reduce los niveles de SREBP1/2 así como su procesamiento y disminuye marcadamente la expresión de genes lipogénicos. mTORC1 parece regular la función de SREBP a través de varios mecanismos, que incluyen S6K1. Además, mTORC1 fosforila Lipin-1, lo que impide que entre en el núcleo y suprime la función y los niveles de SREBP1 / 2^{180 181 182}.

Como cualquier vía que cuando se activa impulsa el consumo de energía, mTORC1 también regula positivamente el metabolismo celular y la producción de ATP. mTORC1 aumenta el flujo glucolítico al activar la transcripción y la traducción de HIF1 α , que es un regulador positivo de muchos genes glucolíticos y, como sabemos, muy relevante en cáncer renal.

Hasta ahora hemos comentado los efectos positivos de mTORC1 en los procesos anabólicos, pero mTORC1 también promueve el crecimiento regulando negativamente la autofagia, el proceso de degradación central en las células. La autofagia es necesaria para el reciclaje de orgánulos dañados y para la adaptación orgánica y celular a la deprivación de nutrientes. Tras la inhibición de mTORC1, se forman autofagosomas que engullen las proteínas citoplasmáticas y los orgánulos y se fusionan con los lisosomas, lo que conduce a la degradación de los componentes celulares. En mamíferos, mTORC1 fosforila y suprime directamente ULK1 / Atg13 / FIP200 (*unc-51-like kinase 1 / mammalian autophagy-related gene 13 / focal adhesion kinase family-interacting protein of 200kDa*), un complejo quinasa requerido para iniciar la autofagia. Al igual que con el control de la síntesis de proteínas y lípidos, es probable que mTORC1 regule la autofagia a través de varios mecanismos. Por ejemplo, mTORC1 regula la proteína *death associated protein 1* (DAP1), un supresor de la autofagia y WIPI2, un ortólogo de mamífero del regulador de la formación inicial del autofagosoma en levadura Atg18, como potencial efector de mTOR que se descubrió en un análisis reciente del fosfoproteoma mTOR-dependiente¹⁸³.

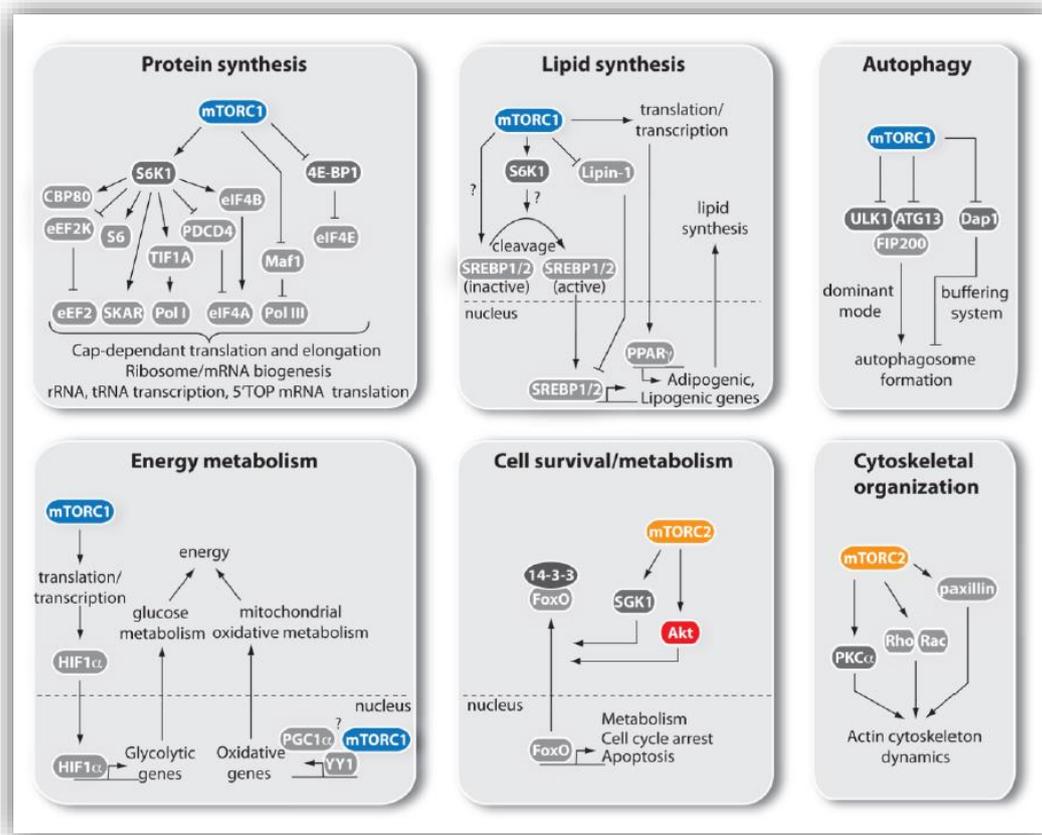
15.4- RED DE SEÑALIZACIÓN DE mTORC2

Debido a que el tratamiento agudo con rapamicina no altera la señalización de mTORC2 y la FKBP12-rapamicina no puede unirse a mTORC2 intacto, originalmente se pensó que este complejo era insensible a la rapamicina. Sin embargo, la situación resulta ser mucho más compleja ya que el tratamiento a largo plazo con rapamicina reduce la señalización de mTORC2 en algunos, pero no en todos los tipos de células, y lo hace al suprimir el ensamblaje de mTORC2.

El por qué existe especificidad para el tipo celular para la sensibilidad a la rapamicina del ensamblaje de mTORC2 aún no está claro.

Comparado con mTORC1, se sabe mucho menos sobre la vía mTORC2. La señalización de mTORC2 es insensible a los nutrientes, pero responde a factores de crecimiento como la insulina a través de mecanismos mal definidos que requieren PI3K. mTORC2 controla varios miembros de la subfamilia de quinasas AGC, incluyendo Akt, *serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1* (SGK1) y proteína quinasa C- α (PKC- α). Akt regula procesos celulares como el metabolismo, la supervivencia, la apoptosis, el crecimiento y la proliferación a través de la fosforilación de varios efectores. mTORC2 activa Akt directamente al fosforilar su dominio hidrofóbico (Ser473). La fosforilación defectuosa de Akt-Ser473 causada por la depleción de mTORC2 disminuye la fosforilación de algunas dianas de Akt, incluida la *forkhead box O1/3a* (FoxO1/3a), mientras otras dianas de Akt como TSC2 y GSK3- β no se ven afectadas. El hecho de que la actividad de Akt no esté completamente abolida en las células que carecen de mTORC2 probablemente explica estos resultados. mTORC2 también activa directamente SGK1, una quinasa que controla el transporte de iones y el crecimiento. En contraste con Akt, la actividad SGK-1 queda completamente bloqueada por la pérdida de mTORC2. Debido a que SGK1 controla la fosforilación de FoxO1/3a en los residuos también fosforilados por Akt, la pérdida de la actividad de SGK1 es probablemente responsable de la reducción en la fosforilación de FoxO1/3a en células deficientes en mTORC2. PKC- α es la tercera AGC quinasa activada por mTORC2. Junto con otros efectores como paxilin y GTPasas Rho, la activación de PKC- α por mTORC2 regula la forma celular en la forma específica del tipo de célula al afectar el citoesqueleto de actina^{184 185}.

Figura 11. Procesos regulados por mTORC1 y mTOR



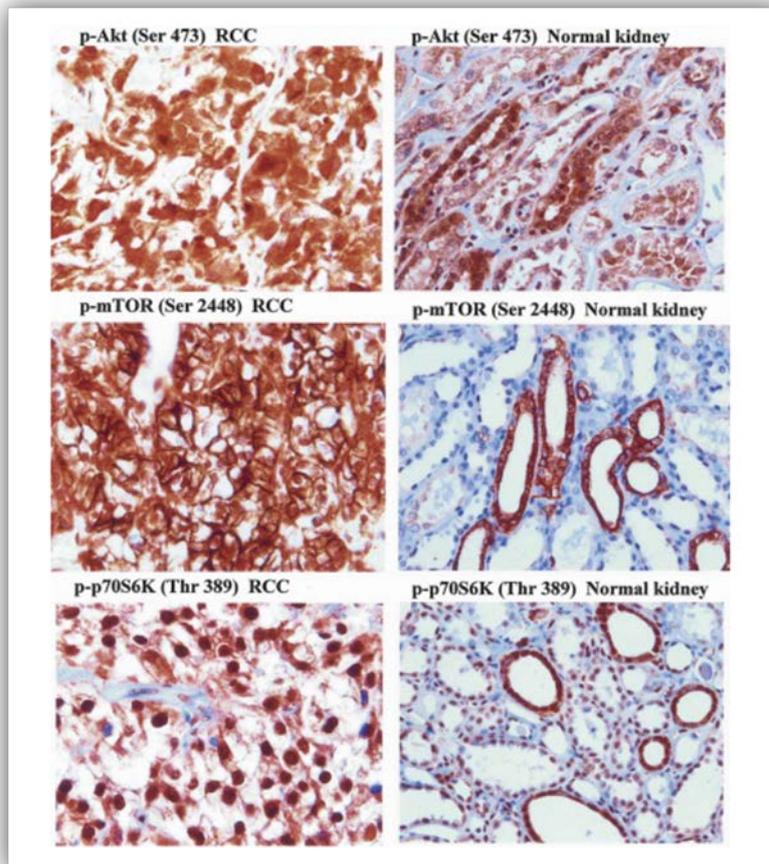
(Laplante & Sabatini, Cell 2012)

16- RELEVANCIA DE LA VÍA PI3K/AKT/mTOR EN CÁNCER RENAL

Varios análisis de tumores renales han puesto de manifiesto la existencia de alteraciones en distintos puntos de esta vía. Un estudio examinó 128 tumores renales primarios, 22 tumores renales metastásicos y 24 riñones normales (no neoplásicos), y encontró que los niveles de expresión de p70S6K, p-mTOR y pAkt eran significativamente más altos en los tumores que en riñones normales, tanto por inmunohistoquímica (intensidad y localización nuclear, $p > 0.05$) como por niveles de proteína determinados por western-blot ($p > 0.05$)¹⁸⁶ (Figura 12).

Estos hallazgos indican que la sobre-expresión y la activación de p-Akt, p-mTOR y p-70S6K se observan comúnmente en cáncer renal, lo que proporciona un buen racional para utilizar fármacos dirigidos a esta vía.

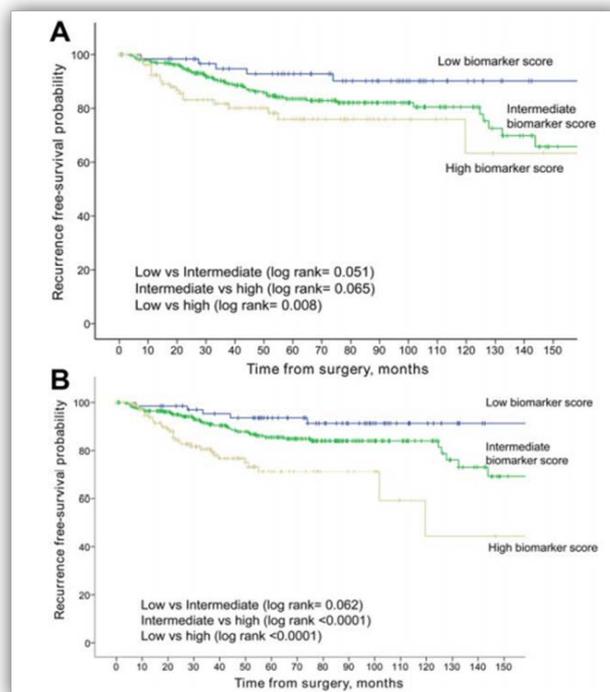
Figura 12. Inmunohistoquímica de la expresión de p-Akt, p-mTOR y p70S6K en tumores renales (izquierda) y tejido normal (derecha).



De manera similar, otro grupo observó niveles aumentados de p-S6 (Ser235/236) y p-mTOR (Ser2448) en 29 tumores renales¹⁸⁷. Se encontró inmunorreactividad p-S6 moderada o fuerte en 17 de 29 carcinomas de células claras (59%), de los cuales 14 también presentaban tinción moderada/fuerte para fosfo-mTOR.

Un estudio americano analizó el riesgo de recaída en pacientes no metastásicos tras la nefrectomía en función de la expresión de 5 genes de la vía mTOR¹⁸⁸. Los biomarcadores analizados fueron *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K), mTOR fosforilado (p-mTOR), S6 fosforilado (p-S6), y *4E-binding protein-1* fosforilado (p-4EBP1). Se incluyeron 528 pacientes y objetivaron sobreexpresión de PI3K, PTEN, p-mTOR, p-4EBP1 y p-S6 en el 52%, 78%, 25%, 86% y 30% de los pacientes, respectivamente. El número de biomarcadores alterados sirvió para predecir la supervivencia libre de recurrencia (SLR) en el análisis multivariado ajustado por estadio, grado y afectación ganglionar (HR = 3.20; p = 0.02 para los pacientes con 4-5 biomarcadores alterados en comparación con 0-1 marcadores alterados). La alteración de dos biomarcadores combinados (p-S6 y p-4EBP1) servía como predictor independiente para una peor SLR (HR = 4.38; p = 0.003 para los pacientes con 2 marcadores alterados en comparación con los pacientes con 0 marcadores alterados) (Figura 13).

Figura 13. (A): SLR estratificado por la puntuación de 5-biomarcadores en función del número de marcadores alterados. (B): SLR estratificado por la puntuación de 2-biomarcadores.

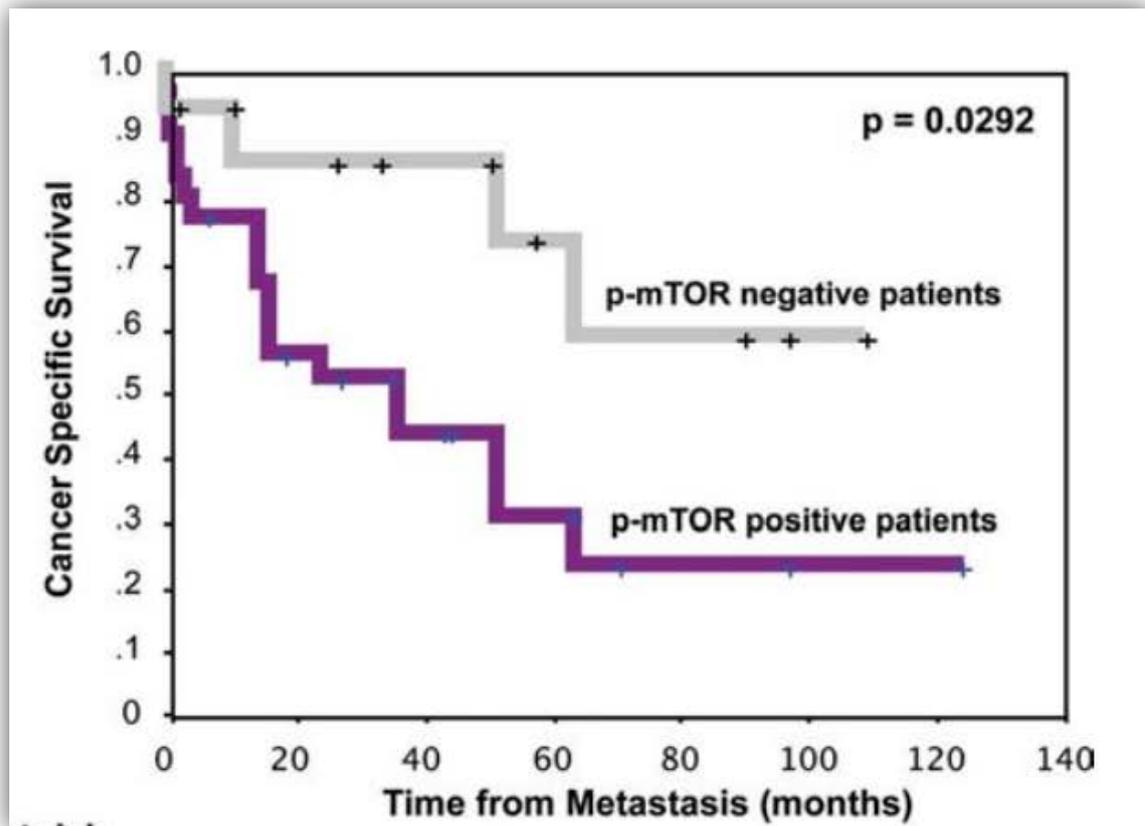


(A) SLR estratificado por la puntuación de 5-biomarcadores en función del número de marcadores alterados: bajo (0-1) vs intermedio (2-3) vs alto (4-5). Se observa una diferencia estadísticamente significativa en supervivencia para los pacientes con una puntuación de 5-biomarcadores baja o alta ($p = 0.008$).

(B) SLR estratificado por la puntuación de 2-biomarcadores alterados: bajo (0) vs intermedio (1) vs alto (2 biomarcadores alterados). Se observa una diferencia estadísticamente significativa en supervivencia para los pacientes con una puntuación de 2-biomarcadores baja versus alta ($p < 0.0001$), y una puntuación de 2-biomarcadores intermedia versus alta ($p < 0.0001$).

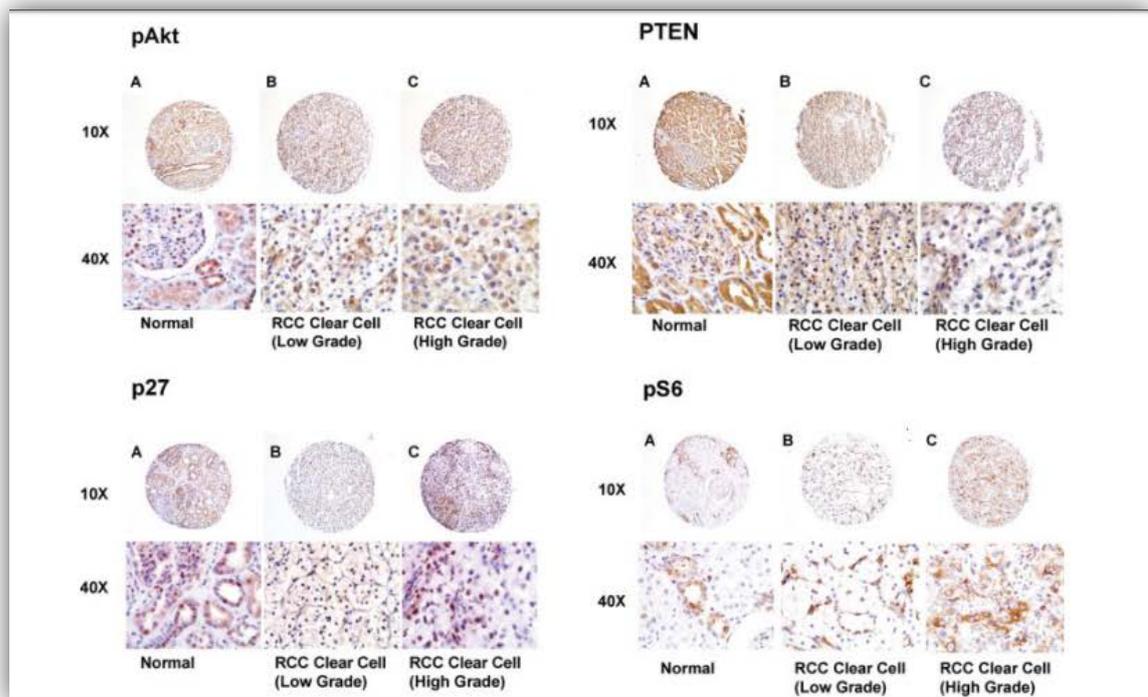
Un estudio canadiense analizó 132 muestras metastásicas de cáncer renal, con un subgrupo de 25 tumores primarios pareados y 10 secciones adicionales de tejido renal sano¹⁸⁹. Se observaron *scores* significativamente más altos de las proteínas de la vía mTOR en las lesiones metastásicas estudiadas en comparación con los tumores primarios (figura 14). En esta serie, prácticamente no se observaron casos con delección de genes PTEN. Los índices de inmunoreactividad de las células epiteliales tubulares proximales no neoplásicas, que son las células de origen del RCC de células claras, fueron significativamente más bajos que en las lesiones metastásicas para PI3K ($p < 0.00001$), pmTOR ($p = 0.0056$), p-Akt ($p = 0.10$), y p70S6 ($p < 0.00001$). La expresión media de los marcadores citoplasmáticos PI3K, p-mTOR, p-Akt y p70/S6 quinasa se correlacionó significativamente entre sí ($p < 0.0001$); p-Akt nuclear se correlacionó solamente con p-Akt citoplasmático ($p = 0.005$), pero no con la expresión citoplasmática de PI3K, p-mTOR y p70S6. Solamente p-mTOR citoplasmático demostró significación pronóstica independiente ($p = 0.029$) y fidelidad entre los tumores primarios y sus metástasis pareadas ($p = 0.004$). Los pacientes con intervalos libres de enfermedad más cortos mostraron una expresión significativamente mayor de PI3K ($p = 0.035$).

Figura 14. Kaplan-Meier que muestra la correlación entre la expresión p-mTOR citoplásmica y la supervivencia en el carcinoma renal metastásico.



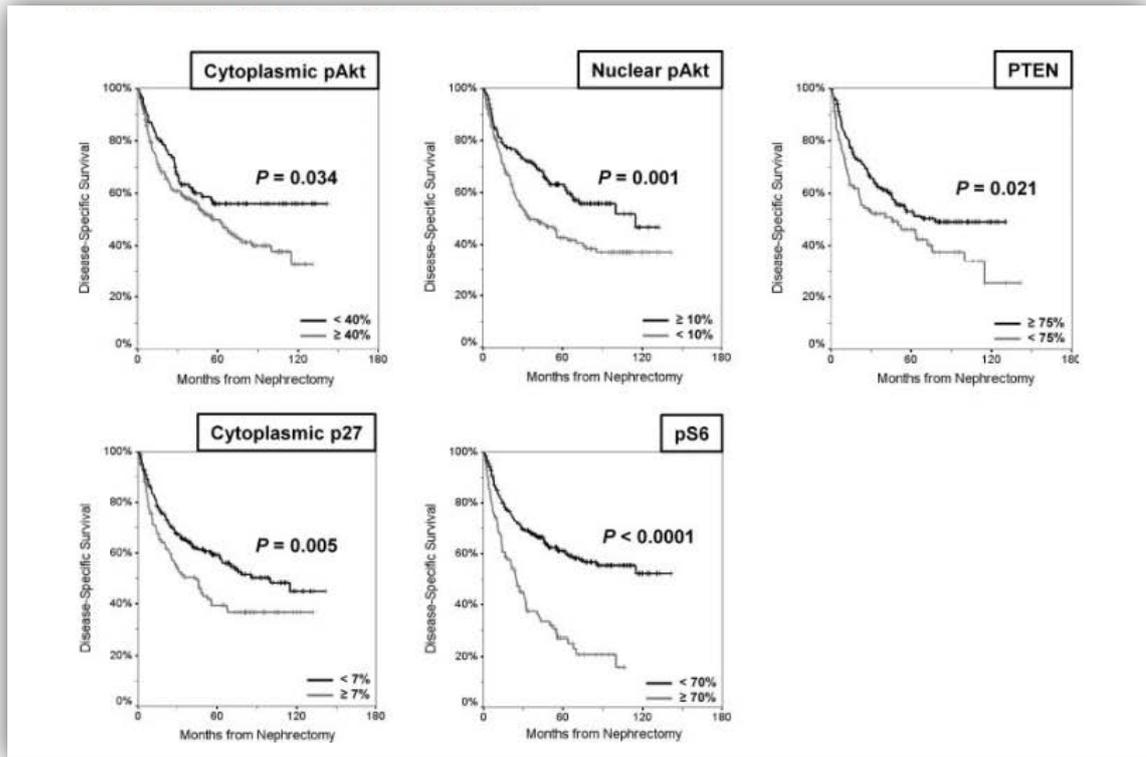
En otro estudio, Pantuck et al¹⁹⁰ analizaron mediante inmunohistoquímica la expresión de pAkt, PTEN, p27 y pS6 375 muestras de pacientes con cáncer renal sometido a nefrectomía. Este grupo observó aumento significativo de alteraciones de la vía mTOR en tumores de histología células claras, tumores de alto grado y tumores con características de mal pronóstico (figura 15). Se observó una correlación inversa entre la expresión de pAKT y el tejido renal normal. La expresión de PTEN, además, fue mayor en tumores de menor tamaño (T1 / 2), subtipos de células no claras y en tumores localizados. La expresión nuclear p27 fue mayor en tumores de histología células claras y se correlacionó inversamente con el tamaño del tumor ($R = -0.12$, $p = 0.02$). Se observó una expresión significativamente mayor de p27 en los tumores de mayor tamaño, mayor grado Fuhrman, enfermedad metastásica, y de histología células claras.

Figura 15. Patrón inmunohistoquímico de pAkt, PTEN, p27 y pS6 en (A) tejido renal normal, (B) carcinoma de células renales de células claras de bajo grado (CCR) y (C) CCR de células claras de alto grado.



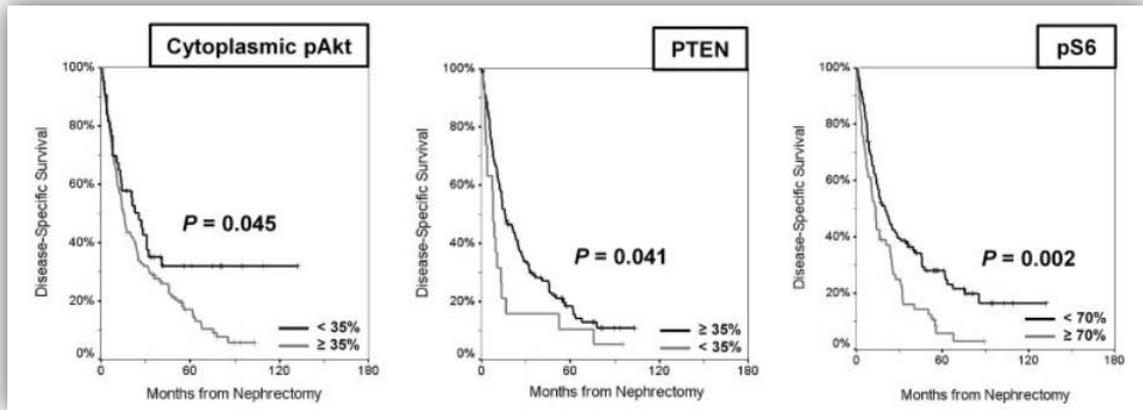
El análisis de supervivencia con respecto a la expresión de pAkt citoplasmático, pAkt nuclear, PTEN, p27 y pS6 citoplásmico identificó porcentajes de tinción de 40%, 10%, 75%, 7% y 70%, respectivamente, como los valores de corte ideales para la estratificación, con valores de p de 0.03, 0.001, 0.02, 0.005 y <0001, respectivamente (Figura 16).

Figura 16. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia según la expresión de proteína para todos los pacientes.



En pacientes metastásicos, la expresión de pAkt citoplasmático, PTEN y pS6 proporcionó información pronóstica adicional (Figura 17). Para pS6 (punto de corte = 70%), la tinción más baja predijo una mejor supervivencia respecto a la más alta; mediana de supervivencia de 20.2 meses vs 13.6 meses, respectivamente ($p = 0.002$). Además, una mayor expresión de PTEN (punto de corte = 35%) predijo una mejor mediana de supervivencia; 16.0 meses vs 8.0 meses ($p = 0.041$). La expresión de pAkt citoplasmática más baja (punto de corte=35%) también predijo un pronóstico más favorable, con una supervivencia media de 25,5 meses frente a 15.1 meses para una mayor expresión ($p = 0.045$). En contraste, la expresión de p27 y pAkt nuclear no se asoció con la supervivencia.

Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia según la expresión de proteína en pacientes metastásicos.



Todos estos estudios ponen de manifiesto la relevancia de la vía PI3K/AKT/mTOR en la carcinogénesis y diseminación del cáncer renal. No solo eso, sino que, en la mayoría de estos estudios la activación de la vía mTOR demuestra tener un valor pronóstico, aunque desafortunadamente ninguno ha sido validado en la práctica clínica.

17. INHIBIDORES mTOR EN CÁNCER RENAL

Como se ha comentado previamente existen dos inhibidores de mTOR aprobados en el tratamiento de cáncer renal:

- Temsirolimus (apartado 11.2.1): indicado en el tratamiento de primera línea de pacientes que presentan carcinoma renal avanzado que presenten como mínimo tres de seis factores de riesgo pronósticos.
- Everolimus (apartado 13.1): indicado para el tratamiento de pacientes con carcinoma renal avanzado, en los que la enfermedad ha progresado durante o después del tratamiento con una terapia dirigida al VEGF.

18. FACTORES PREDICTORES DE RESPUESTA A INHIBIDORES DE mTOR

Varios predictores de respuesta a inhibidores mTOR han sido evaluados, pero a día de hoy ninguno ha sido validado clínicamente. De este modo, sigue siendo necesario desentrañar los mecanismos de acción de la rapamicina, así como identificar marcadores predictivos de respuesta con el fin de emplearlos en la selección prospectiva de aquellos pacientes que se pueden beneficiar más de los rapálogos.

Por otro lado, los esfuerzos dirigidos a investigar perfiles de expresión mediante técnicas de inmunohistoquímica no han obtenido resultados clínicamente significativos¹⁹¹.

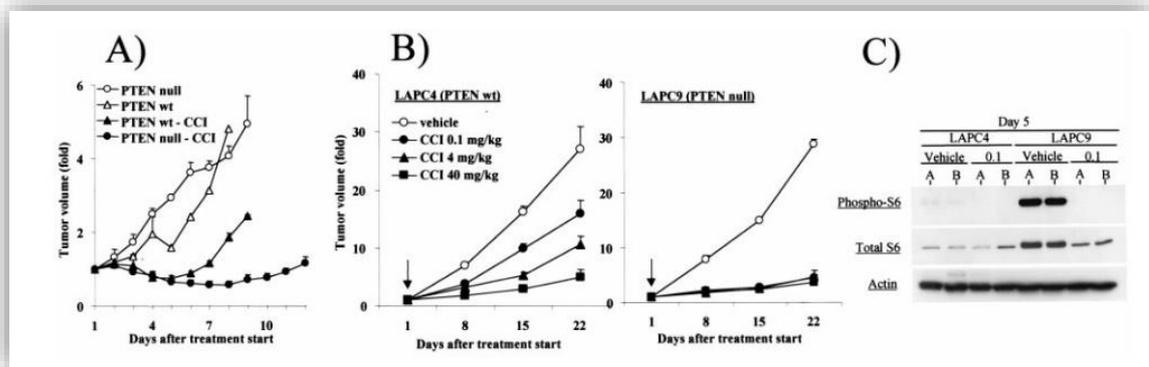
18.1- ESTUDIOS PRECLÍNICOS

Datos preclínicos^{192 193 194 195} han puesto de manifiesto que los componentes de la vía PI3K y MAPK podrían ser buenos biomarcadores para fármacos que tienen como diana inhibir el eje PI3K/mTOR.

Ciertos eventos genéticos que activan mTORC1 incluyen mutaciones inactivadoras en PIK3CA, el gen que codifica la subunidad catalítica de PI3K; la mutación o delección de PTEN; la activación de AKT mediante la mutación o la amplificación de una de sus tres isoformas AKT1, AKT2, AKT3; y la inactivación mediante la mutación o eliminación de TSC1 o TSC2¹⁹⁶.

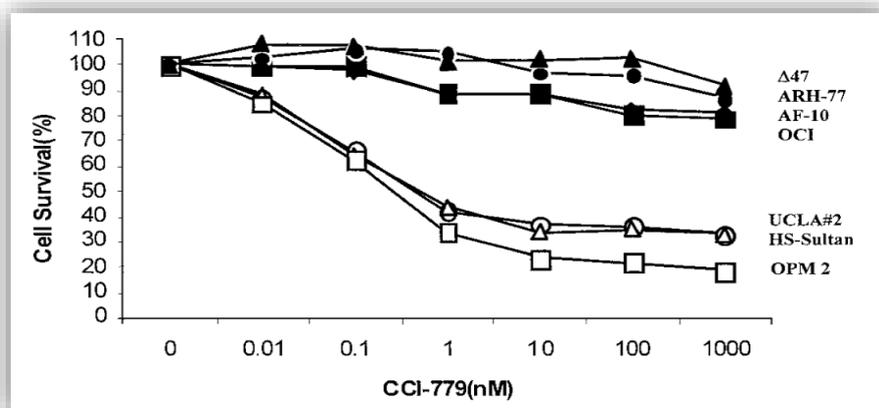
Los primeros trabajos del grupo de Sawyers et al¹⁹⁷ revelaron que las células deficientes en PTEN tanto de ratón como de líneas celulares tumorales humanas mostraban una mayor sensibilidad a inhibidores de mTOR, tanto *in vitro* como *in vivo*. En estos trabajos, se realizaron análisis para determinar si las células tumorales deficientes en PTEN eran sensibles a la inhibición farmacológica de mTOR utilizando CCI-779, un derivado de la rapamicina (temsirolimus). Los estudios *in vitro* e *in vivo* de líneas celulares humanas y de células de ratón inyectadas en ratones inmunodeprimidos con las formas isogénicas PTEN+/+ y PTEN-/- objetivaron que las células con PTEN nulo obtenían una mayor inhibición de la vía mTOR. El tratamiento con CCI-779 también revirtió el aumento del crecimiento tumoral causado por la activación constitutiva de Akt en células PTEN+/+, demostrando así la función de mTOR por debajo de Akt en la vía de la tumorigénesis. La pérdida de PTEN se correlacionó con el aumento de la actividad de la quinasa S6 y la fosforilación de la proteína ribosomal S6, lo cual pone de evidencia la activación de la vía mTOR en estas células. La diferencia de sensibilidad a CCI-779 en estas células no puede ser explicada por las diferencias en el bloqueo bioquímico de la vía mTOR, ya que la fosforilación de S6 se inhibió en ambas líneas celulares sensibles y resistentes. Estos resultados, sirven de racional para testar inhibidores de mTOR en tumores que presenten PTEN nulo (Figura 18).

Figura 18. A: Crecimiento tumoral en ratones en función del estado de PTEN con y sin tratamiento con CCI-779. Claramente los ratones con tumores PTEN nulo tratados con CCI-779 son los que presentan menor tamaño tumoral. B: Inhibición del crecimiento en líneas celulares con PTEN WT o PTEN nulo con distintas dosis de CCI-779. C: Inhibición de la fosforilación de S6 con el tratamiento tanto en líneas celulares con PTEN WT como PTEN nulo.



En otro estudio, se observaron resultados similares en líneas celulares de mieloma múltiple¹⁹⁸ (Figura 19). Con la premisa de que las células de mieloma deficientes en PTEN pueden tener una hiperactivación de la vía mTOR y esto las podía hacer especialmente sensibles a fármacos inhibidores de esta vía, trataron distintas líneas celulares con CCI-779. Tres de las cuatro líneas celulares deficientes PTEN que tenían AKT constitutivamente activado eran notablemente más sensibles a la citorreducción y detención en G1 inducida por CCI-779 con concentraciones de IC₅₀ <1 nM. Por el contrario, las células de mieloma que presentaban PTEN WT eran >1000 veces más resistentes.

Figura 19. Inhibición del crecimiento celular con distintas dosis de CCI-779 en función del estado de PTEN.

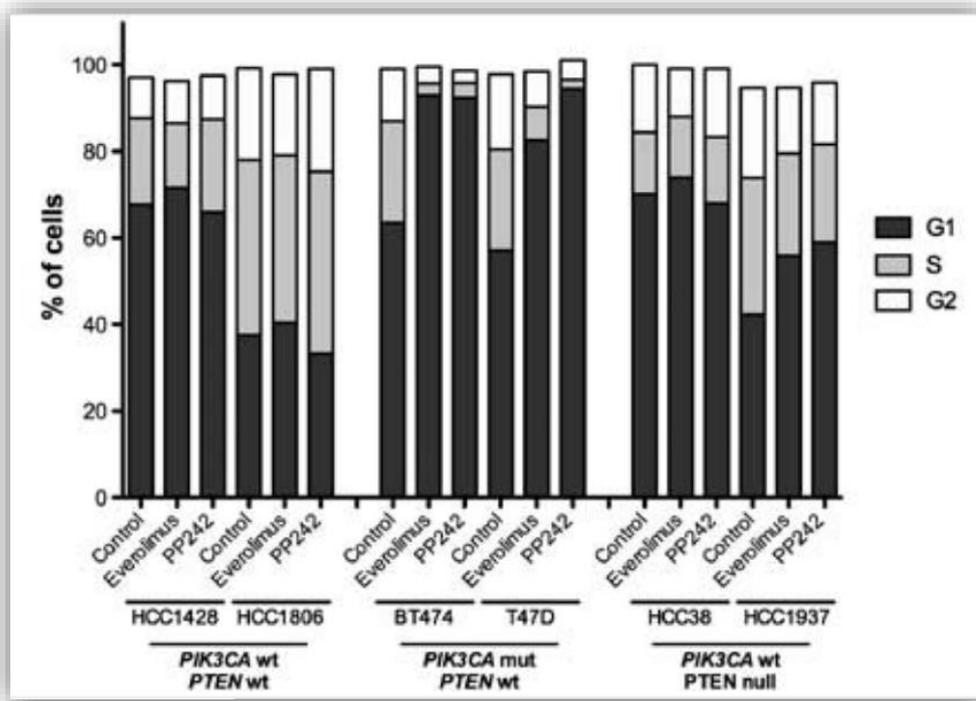


La fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) es una quinasa heterodimérica compuesta por dos subunidades p110 y p85 codificadas por genes separados y splicing alternativo. En ciertos tipos de tumores, como cáncer de mama, se

producen mutaciones en la subunidad catalítica p110 que conducen a la activación de la vía PI3K/Akt¹⁹⁹.

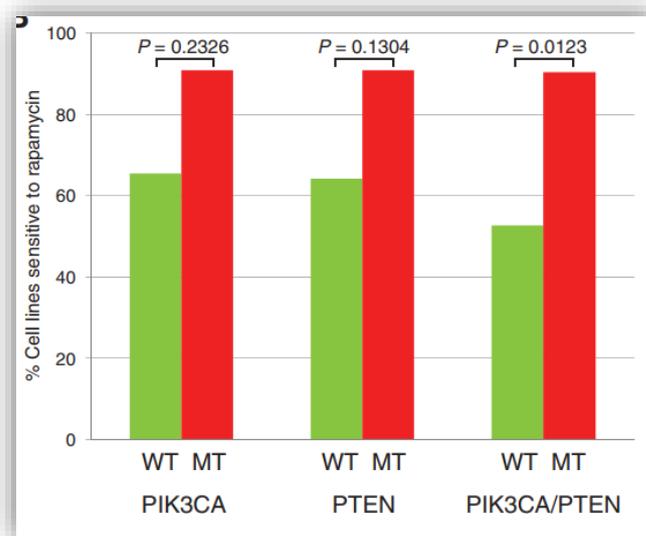
En un estudio con líneas celulares de cáncer de mama, Weigelt et al²⁰⁰ demostraron que las células de cáncer de mama que presentaban mutaciones en PI3K, pero no las que presentaban pérdida de PTEN, eran selectivamente sensibles a RAD001 (everolimus) y a PP242 (otro inhibidor mTOR) (Figura 20).

Figura 20. Contenido de ADN medido por citometría de flujo en células con PIK3CA/PTEN WT, células con mutaciones en PIK3CA y células con pérdida PTEN incubadas durante 48 h con 10 mM Everolimus o 1 mM PP242 para determinar el porcentaje de células en fases G1, S y G2 del ciclo celular.



Sin embargo, en otro estudio²⁰¹ con 31 líneas celulares de cáncer de mama y tumores neuroendocrinos, demostraron que tanto las mutaciones en PTEN como en PIK3CA conferían una mayor sensibilidad a rapamicina (Figura 21) y everolimus.

Figura 21. Sensibilidad a la rapamicina en función del status de PIK3CA y PTEN.



Por su parte, Di Nicolantonio *et al* objetivaron que las líneas celulares que presentaban alteraciones en la vía PI3K respondían a RAD001, tanto *in vitro* como *in vivo*, excepto cuando presentaban mutaciones concomitantes en KRAS o estas eran introducidas. En estas células portadoras de ambas mutaciones, la ablación de KRAS restablecía la sensibilidad a everolimus.

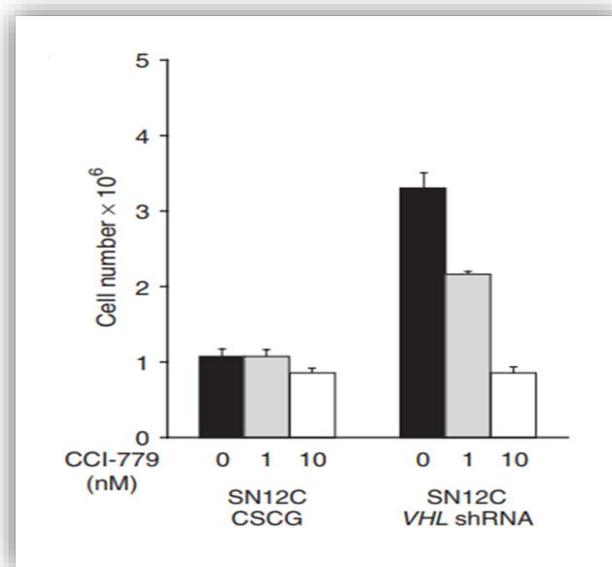
La expresión de la proteína HIF depende de mTOR en ciertos contextos celulares. Las regiones 5' no traducidas de los ARNm que codifican tanto HIF-1 α como HIF-2 α contienen tramos de oligopolipirimidina (TOP) 5' terminales que pueden regular la traducción en respuesta a la activación de la quinasa S6²⁰². La traducción de ARNm's que llevan secuencias 5' -TOP depende de mTOR ya que mTOR regula una cascada de quinasas, que incluye a la quinasa S6 y a su sustrato, la proteína ribosómica S6, que se requiere para una traducción eficaz de estos mensajes. Esta conexión entre la traducción de HIF y mTOR planteó la posibilidad de que la actividad clínica de los inhibidores de mTOR en un subconjunto de carcinoma de células renales pueda explicarse, en parte, por la pérdida de VHL.

Para evaluar esta posibilidad, el grupo de Sawyers construyó pares isogénicos de líneas celulares de carcinoma renal humano, que diferían solo en los niveles de expresión de VHL, mediante el silenciamiento de ARN utilizando shARN y un vector lentiviral específico de VHL (SN12C y SN12C-VHL shRNA; ACHN y ACHNVHL shRNA)²⁰³. Como era de esperar, los niveles de proteína VHL se redujeron y los niveles de HIF-1 α y HIF-2 α aumentaron en las células transfectadas con el ARN silenciador, mientras que no se observó ningún efecto en aquellas transfectadas con un vector control. Las células que contenían el shRNA específico de VHL proliferaron más rápidamente que sus parentales isogénicas. Los niveles de las proteínas de los genes diana de HIF, SLC2A1 (que codifica el transportador de glucosa-1), CA9 (anhidrasa carbónica-9) y VEGF

aumentaron en las células VHL knockeadas, incluso en condiciones de normoxia.

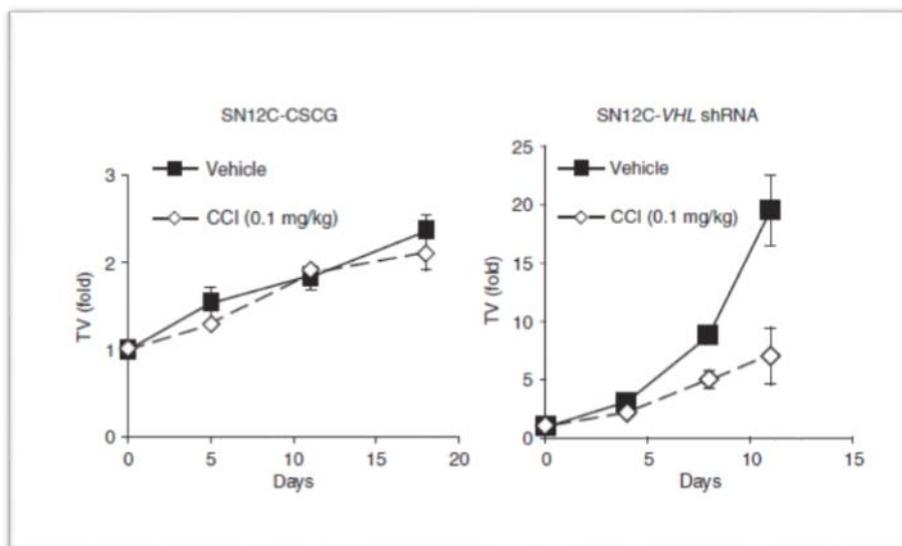
Para evaluar el papel de mTOR en la proliferación mediada por el bloqueo de VHL, se cultivaron ambos pares de líneas de células isogénicas con el inhibidor de mTOR CCI-779. El crecimiento de las células parentales no se vio afectado por CCI-779 a 10nM, mientras que el crecimiento de las células tratadas con shARN de SN12C-VHL se redujo en un 70% de una manera dosis-dependiente (Figura 22).

Figura 22. Las células shRNA SN12C-CSCG y SN12C-VHL se cultivaron con 1 o 10 nM de CCI-779 durante 5 días. El crecimiento celular se midió mediante recuento de células.



Cuando las líneas isogénicas se implantaron como xenoinjertos subcutáneos en ratones, el bloqueo de VHL confirió nuevamente una ventaja en el crecimiento y una mayor sensibilidad a la inhibición de mTOR a pesar de demostrarse un bloqueo bioquímico eficaz de mTOR en ambos xenoinjertos (parentales y VHL knockeados) (Figura 23).

Figura 23. Se inyectaron células shRNA SN12C-CSCG y SN12C-VHL en ratones. Cuando el volumen tumoral alcanzó 150 mm³, los ratones se randomizaron a un tratamiento diario con vehículo o 0.1 mg / kg de CCI-779. En esta gráfica se muestra el cambio en el volumen tumoral.



Además de los efectos celulares ya conocidos, los inhibidores de mTOR tienen actividad antiangiogénica, ya que el crecimiento de células endoteliales depende de mTOR en ciertos contextos. Debido a que la angiogénesis es una característica histológica central del carcinoma renal, los inhibidores de mTOR también podrían alterar el crecimiento del tumor a través de los efectos en la vasculatura del tumor. Los xenoinjertos de las líneas celulares VHL knockeado fueron más vasculares en comparación con los tumores parentales ($p = 0.0033$), y el tratamiento con CCI-779 condujo a una disminución del 50% en la densidad de microvasos. Dado que el gen VEGF es un *target* de HIF, las propiedades antiangiogénicas de CCI-779 también podrían ser una consecuencia de los efectos directos del fármaco sobre las células tumorales. De hecho, los niveles de VEGF se incrementaron en células VHL knockeadas y se redujeron mediante el tratamiento con CCI-779 *in vitro* e *in vivo*.

En conjunto, estos experimentos establecen que la pérdida de VHL sensibiliza las células de carcinoma renal a la inhibición del crecimiento por inhibidores de mTOR.

18.2- ESTUDIOS EN MUESTRA TUMORAL

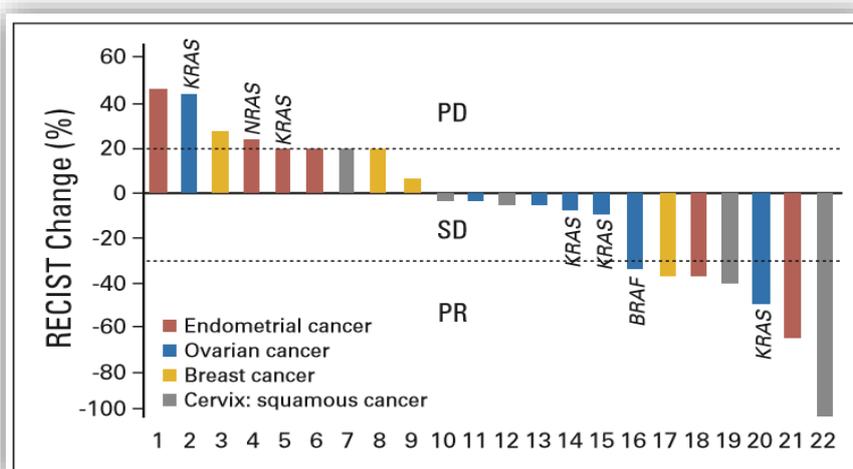
Hasta la fecha, pocos estudios clínicos han investigado el impacto de las alteraciones genéticas en el beneficio de fármacos dirigidos a la vía mTOR. No obstante, como describiremos a continuación, algunas alteraciones en dicha vía han demostrado estar asociadas con la respuesta al tratamiento con análogos de la rapamicina en distintos tumores, incluido en cáncer renal.

18.2.1- OTROS TUMORES

El grupo de la University of Texas MD Anderson Cancer Center (Houston) analizó los tumores de pacientes con cáncer de mama, cervix, endometrio y ovario para las mutaciones PIK3CA, KRAS, NRAS y BRAF²⁰⁴ (Figura 24). Las pacientes con

mutaciones PIK3CA fueron tratadas, siempre que fue posible, con agentes dirigidos a la vía PI3K/AKT/mTOR dentro de un programa de fases I. De las 140 pacientes analizadas, 25 (18%) presentaban mutaciones PIK3CA, incluyendo 5/14 pacientes con cáncer cervical de células escamosas, 7/29 pacientes con endometrio, 6/29 pacientes con cáncer de mama y 7/60 pacientes con cáncer de ovario. De las 25 pacientes con mutaciones PIK3CA, 23 fueron tratadas dentro de un ensayo que incluía un inhibidor de la vía PI3K/AKT/mTOR. Dos de las 23 pacientes (9%) presentaron enfermedad estable durante más de 6 meses, y siete (30%) tuvieron una respuesta parcial. En comparación, solo siete de las 70 pacientes (10%) con los mismos tipos de enfermedad, pero con PIK3CA WT tratadas en los mismos protocolos respondieron ($p = 0.04$). Siete pacientes (30%) con mutaciones de PIK3CA presentaban mutaciones coexistentes en las vías de las MAPK (KRAS, NRAS, BRAF) (cáncer de ovario, $n = 5$, cáncer de endometrio, $n = 2$) y dos de estas pacientes (cáncer de ovario) obtuvieron respuesta. En global, se detectaron mutaciones en PIK3CA en el 18% de las pacientes examinadas. Las pacientes con mutaciones PIK3CA tratadas con inhibidores PI3K/AKT/mTOR obtuvieron una mayor TR que las pacientes sin mutaciones. Además, como se ha comentado, un grupo de pacientes con mutaciones simultáneas de PIK3CA y MAPK respondió a inhibidores de PI3K/AKT/mTOR, lo que sugiere que no todos los pacientes muestran resistencia cuando la vía MAPK está activada concomitantemente.

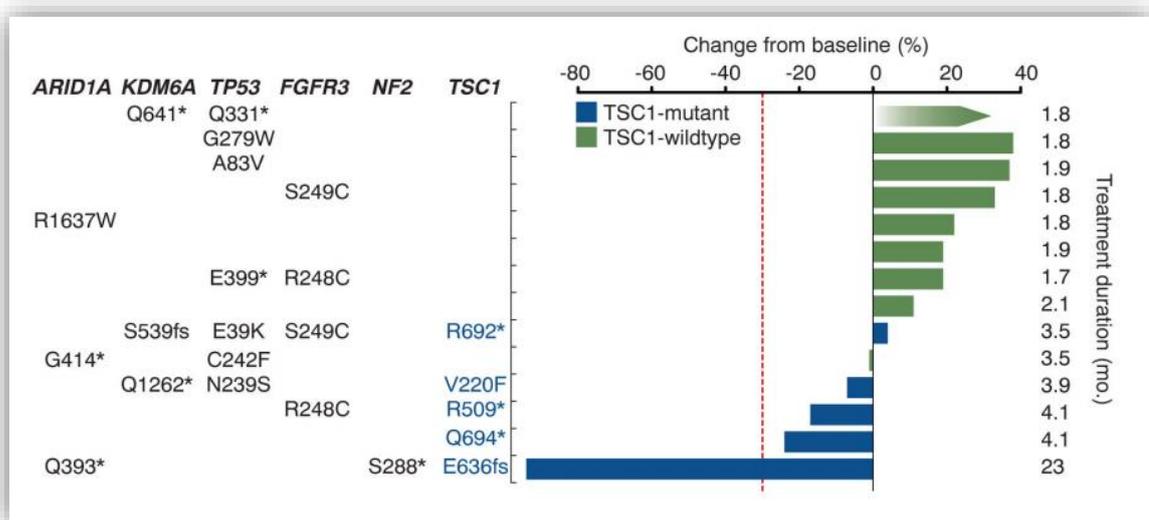
Figura 24. Waterfall plot de pacientes con mutaciones de PIK3CA tratadas con inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR. La TR global fue del 30%. Cinco pacientes con cáncer de ovario y dos pacientes con cáncer de endometrio presentaron mutaciones simultáneas de PIK3CA y MAPK (KRAS, NRAS, o BRAF)



El análisis del genoma de un tumor de vejiga con respuesta completa y duradera (>2años) a everolimus reveló una delección de dos pares de bases en TSC1 (c.1907_1908del, p.Glu636fs), resultando en un desplazamiento del marco de lectura genético²⁰⁵. Posteriormente secuenciaron dicho gen en una cohorte de

96 tumores de vejiga de alto grado, hallando cinco mutaciones somáticas en TSC1 adicionales. A continuación, con la intención de analizar las mutaciones en TSC1 como predictoras de respuesta a everolimus en cáncer de vejiga, seleccionaron y analizaron 13 tumores de pacientes que habían obtenido buena respuesta a everolimus (figura 25). Este análisis reveló mutaciones *nonsense* en TSC1 en tres pacientes, dos de los cuales habían presentado respuestas menores a everolimus (reducción tumoral del 17 y 24%). Un cuarto paciente con 7% de respuesta presentaba una variante somática *missense* de TSC1 de significado funcional incierto. Por el contrario, 8 de 9 pacientes que habían presentado progresión como mejor respuesta presentaban *TSC1 wild type*. Los pacientes que presentaban mutaciones en TSC1, permanecieron más tiempo en tratamiento con everolimus que aquellos con TSC1 WT (7.7 vs 2.0 meses, $p = 0.004$) con una mejoría en tiempo a recurrencia estadísticamente significativa (4.1 vs 1.8 meses, HR = 18.5, $p = 0.001$).

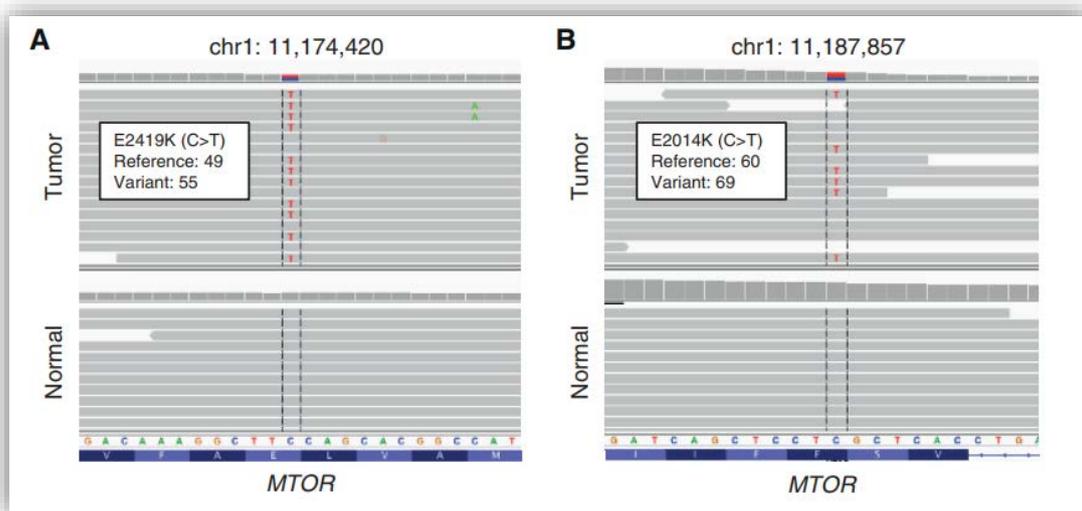
Figura 25. Mutaciones halladas en función de la respuesta tumoral de 14 pacientes.



Wagle *et al* reportaron en un estudio fase I que estudiaba la combinación de everolimus con pazopanib²⁰⁶, un paciente afectado de carcinoma urotelial metastásico que presentó una respuesta completa durante 14 meses. El análisis mediante *whole-exome-sequencing* del tumor de este paciente reveló dos mutaciones en mTOR (Figura 26). Una de ellas, mTOR E2419K, es una mutación activadora bien descrita en el dominio quinasa de mTOR, aunque no había sido identificada en el cáncer humano hasta ese momento. El homólogo de esta mutación se había identificado en una levadura. Allí, una sola mutación en Tor2, E2221K, se identificó que confería la activación constitutiva de TOR. La mutación homóloga en mTOR humano, E2419K, se generó posteriormente en líneas celulares humanas y se objetivó que se activaba constitutivamente a través de la actividad incrementada de quinasa y la hiperactivación de la vía mTOR. La señalización mediada por mTOR permaneció sensible a la rapamicina en células que expresaban mTOR E2419K. La segunda mutación que identificaron, mTOR

E2014K, ocurre en el dominio FKBP rapamycin-binding (FRB) de mTOR. Dicha mutación no se había descrito previamente en muestras tumorales, aunque está presente en la línea celular de cáncer urotelial U-BLC1. En otro estudio de posibles mutaciones hiperactivadoras en mTOR, dos mutaciones en FRB, I2017T y A2020V, mostraron que aumentaban la actividad quinasa y causaban la hiperactivación de la vía mTOR. Por otra parte, una variable con ambas mutaciones mTOR (E2419K e I2017T) demostró tener una mayor actividad de la vía mTOR en comparación con cada mutación de manera individual.

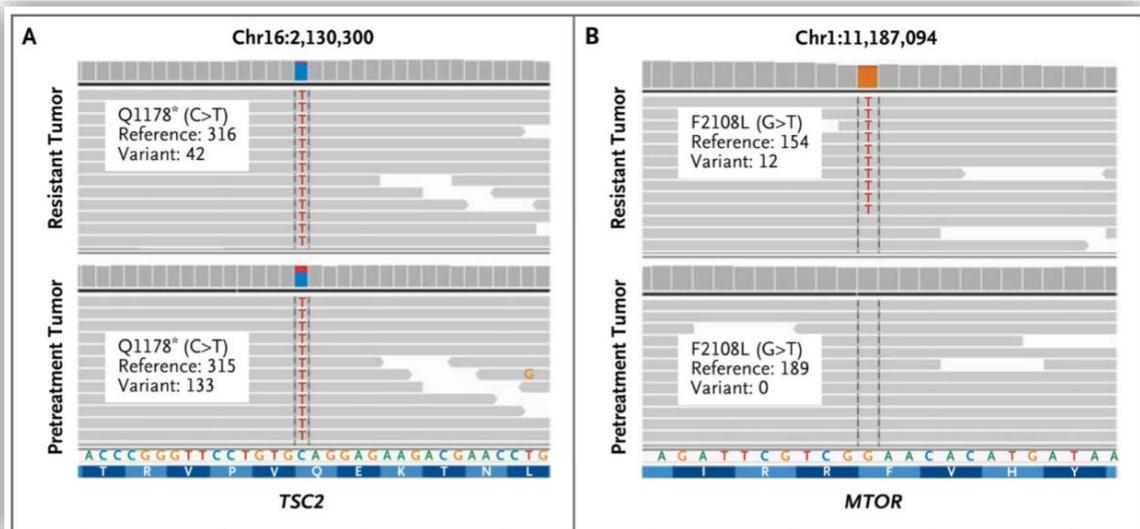
Figura 26. Imágenes del Integrated Genome Viewer (IGV) para las dos alteraciones en mTOR encontradas en el paciente con cáncer urotelial que presentó respuesta completa a everolimus y pazopanib. El número de lecturas para el alelo de referencia y el alelo variante se muestran para cada alteración.



Este mismo grupo²⁰⁷ reportó el caso de una paciente afecta de carcinoma anaplásico de tiroides metastásico (cuya mediana de supervivencia fue de 5 meses) que presentó respuesta casi completa a everolimus durante 18 meses, y posteriormente progresó. Para intentar entender los posibles mecanismos de resistencia analizaron mediante *whole-exome-sequencing* el tumor tanto previo al tratamiento como en el momento de la resistencia (figura 27). El análisis del tumor pre-tratamiento contenía una mutación *nonsense* somática en el gen supresor de tumores TSC2 que inactivaba el gen, permitiendo la activación de la vía mTOR y dando como resultado una sensibilidad a la inhibición de mTOR. Se sabe que esta mutación truncada (Q1178*) inactiva TSC2 mediante la eliminación de una guanósina del dominio proteico activador de trifosfatasa cerca del C-terminal, un dominio esencial para inhibir el complejo mTOR1. Además de la mutación TSC2, se identificaron 317 variantes somáticas de un solo nucleótido y 44 indeles codificantes. Estos incluyeron una mutación común en TP53 (C135Y) y un cambio en el N-terminal de FLCN (R17fs), un gen supresor de tumor que codifica la foliculina. La mutación *nonsense* TSC2 persistió en el tumor resistente. El análisis inmunohistoquímico de tejido del tumor resistente reveló la ausencia de TSC2 y la presencia de pS6, una diana *downstream* de mTOR.

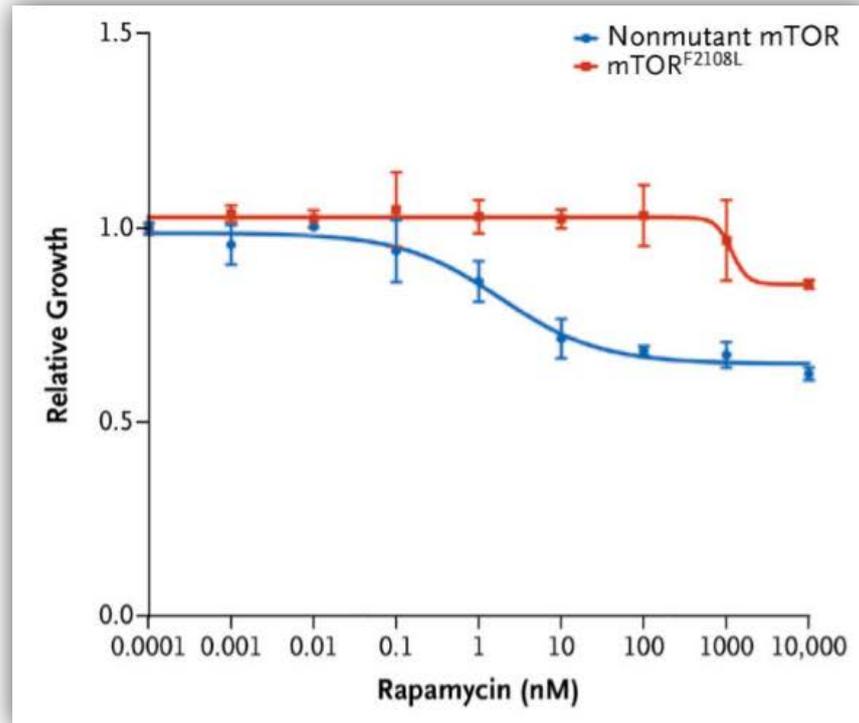
Estos hallazgos son indicativos de la actividad persistente mTOR. Las mutaciones en TP53 y FLCN también persistían en el tumor resistente. El tumor resistente también presentaba una mutación somática en mTOR (mTORF2108L). Esta mutación no se había detectado en el tumor pretratamiento. Para identificar el cambio relativo en la frecuencia de cada alteración genómica desde el tumor pretratamiento al tumor resistente, se estimó la fracción de células tumorales que presentaban una alteración dada en cada par de muestras. Aunque se objetivó que las alteraciones de TSC2, TP53 y FLCN estaban presentes en el 98 al 100% de las células tumorales tanto en las muestras pretratamiento como resistentes, la proporción estimada de células tumorales con mTORF2108L fue de 0% en el tumor pretratamiento en comparación con 96 % en el tumor resistente. Esta mutación de nueva aparición en mTOR, justificaría la resistencia adquirida a everolimus.

Figura 27. El whole-exome-sequencing del tejido tumoral antes del tratamiento y después del desarrollo de resistencia a everolimus reveló una mutación nonsense TSC2 en ambos tumores (Panel A) y una mutación F2108L en mTOR en el tumor resistente que era indetectable en el tumor pretratamiento (Panel B).



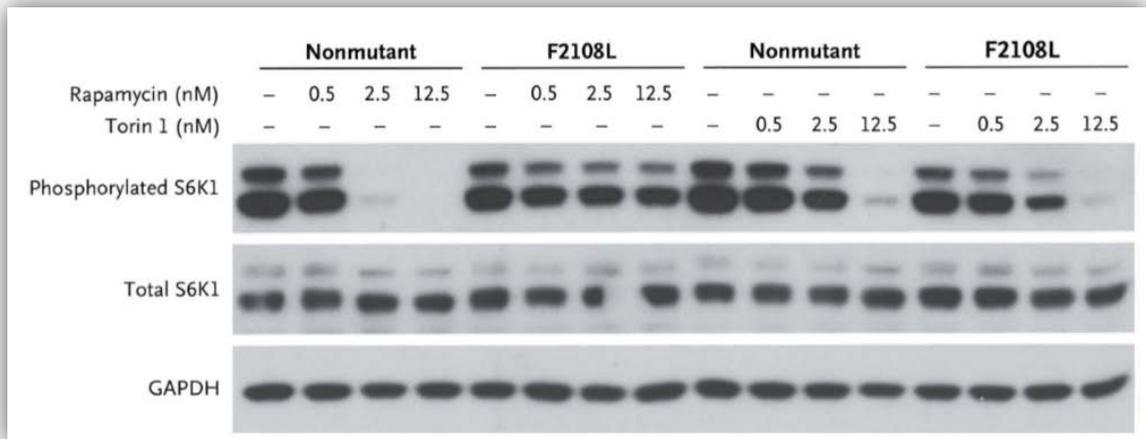
Para confirmar que mTORF2108L confiere resistencia a la inhibición alostérica de mTOR, la mutación F2108L se introdujo en líneas celulares 293T de riñón embrionario humano (HEK). Las células que expresaban mTORF2108L eran significativamente más resistentes a la inhibición con rapamicina que las células que expresaban mTOR no mutado (Figura 28).

Figura 28. Curvas de inhibición de crecimiento con rapamicina en las líneas celulares sin mutación de mTOR y con mutación de mTOR.



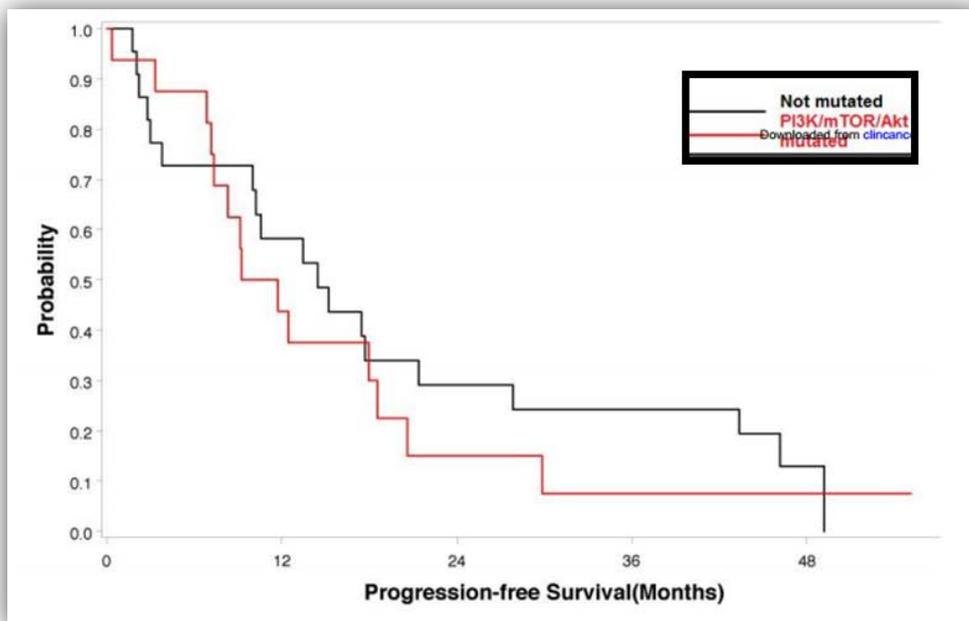
A continuación, se examinó el efecto de la mutación sobre la fosforilación de S6 kinase 1 endógeno (S6K1), como ya se ha comentado una diana *downtream* de mTOR. Al inicio, las células que expresaban mTORF2108L y aquellas que expresaban mTOR no mutado tenían niveles similares de S6K1 fosforilado. El tratamiento con rapamicina, sin embargo, inhibió completamente la fosforilación de S6K1 en células que expresaban mTOR no mutado, pero prácticamente no tuvo efecto en las células que expresaban mTORF2108L. En contraste con las células tratadas con rapamicina, las células que expresan mTORF2108L y aquellas que expresan mTOR no mutado eran igualmente sensibles al tratamiento con torin1 (un inhibidor directo de mTOR). Estos datos demuestran que las células que presentan la mutación mTORF2108L siguen siendo sensibles a la inhibición directa del dominio tirosin-quinasa de Mtor (Figura 29).

Figura 29. Niveles de S6 kinasa 1 (S6K1) total y fosforilados, diana downstream de mTOR, se muestran para las células HEK 293T después del tratamiento con 0.5 nM, 0.5 nM, 2.5 nM, o 12.5 nM de rapamicina o torin1, como se indica. GAPDH significa gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (sirve como control).



El análisis genómico de 33 pacientes con cáncer de tiroides de distintas histologías que habían sido incluidos en un estudio fase II con everolimus reveló que los pacientes que tenían alteraciones en la vía PI3K/AKT/mTOR - 43% de los pacientes analizados, siendo del 60% en los tumores papilares- presentaban mejor respuesta a everolimus²⁰⁸ (Figura 30).

Figura 30. Curva de SLP de pacientes con mutaciones en la vía PI3K/mTOR/AKT vs los que no presentaban ninguna mutación.



18.2.2- CÁNCER RENAL

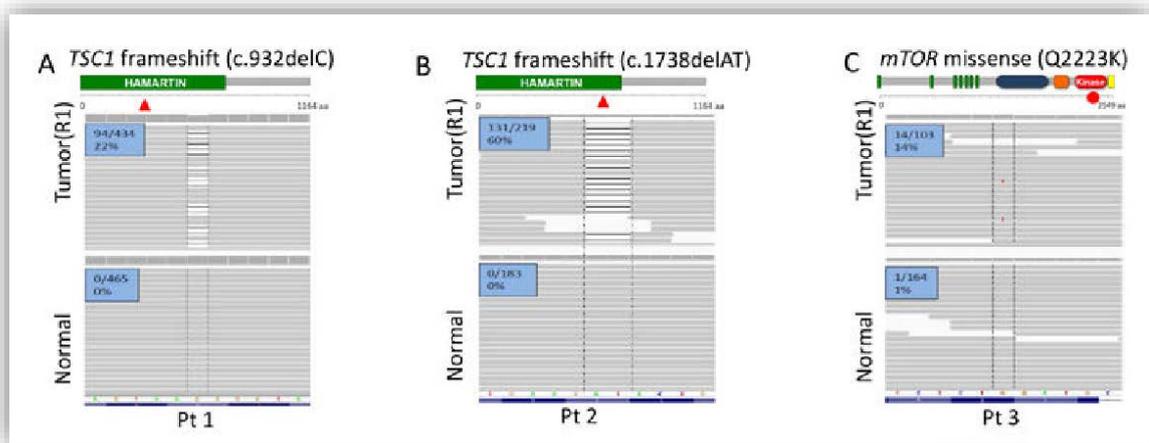
Voss et al²⁰⁹ analizaron el perfil genómico de 5 pacientes afectados de CCRm que fueron largos respondedores a rapálogos (4 con temsirolimus y 1 con everolimus) con una mediana de duración de respuesta de 28 meses, los denominados “*outliers*”. De estos, 4 pacientes presentaban histología de células claras y 1 de células no claras (variante inclasificada).

La técnica utilizada fue IMPACT assay (*Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets*) que analiza los exones codificantes de 230 oncogenes, genes supresores de tumor y genes implicados en vías de señalización sobre las que actúan las terapias dirigidas (Figura 31).

En dos de estos pacientes se observaron mutaciones somáticas en TSC1 (c.932delC y c.1738delAT): delección de un nucleótido y mutación *frameshit* respectivamente, lo que resulta en una hiperactivación de mTORC1. En ambos casos, el análisis del número de copias mostró una sola copia del cromosoma 9, donde reside el gen TSC1. La pérdida de heterocigosidad (LOH) en concurrencia con una mutación *frameshit* en el alelo restante resulta en una falta de funcionalidad completa de TSC1, un regulador negativo *upstream* de mTOR. La falta de estos efectos inhibitorios resultaría en la hiperactivación de mTORC1 y proporciona una explicación plausible para la sensibilidad a los inhibidores de mTOR.

En el tercer paciente, se objetivó una mutación somática *missense* en mTOR, concretamente una sustitución de una glutamina por lisina (Q2223K). El residuo afectado se localiza en el dominio quinasa de la proteína mTOR, lo que sugiere un efecto funcional. Tras realizar un modelo tridimensional de PI3K se observó que el residuo de glutamina 2223 está situado adyacente al sitio de unión de ATP del dominio catalítico, lo que puede afectar la señalización de mTOR. No obstante, los rapálogos se unen al dominio FRB regulador, que se encuentra fuera del dominio quinasa, argumentando que es improbable que esta sustitución Q2223K interfiera en la sensibilidad a dichos fármacos. Para investigar más a fondo estas hipótesis, se realizaron experimentos *in vitro* introduciendo la mutación Q2223K en líneas celulares de riñón humanas HEK293T. La expresión de mTOR Q2223K condujo a una mayor fosforilación de S6K (uno de los principales efectores *downstream* de mTORC1) que la de mTOR *WT*.

Figura 31. Alteraciones genómicas halladas en los tres pacientes con respuesta excepcional a rapálogos mediante la técnica IMPACT.



En los otros dos pacientes *outliers*, no se detectó ninguna alteración molecular que justificara esa respuesta al tratamiento con inhibidores de mTOR.

Se realizó un *whole-exome sequencing* para analizar otros genes más allá de los 230 incluidos en IMPACT. Dicho análisis confirmó las alteraciones halladas en los pacientes 1,2 y 3, pero no reveló ningún evento genómico adicional para los pacientes 4 y 5 que justificara la respuesta a inhibidores de mTOR.

El grupo de *Dana-Farber Cancer Institute (Boston, MA, US)* publicó un trabajo en el que analizaba la asociación de mutaciones de genes implicados en la vía mTOR y la respuesta al tratamiento con análogos de la rapamicina en pacientes diagnosticados de CCRm²¹⁰. Se analizó el ADN de 79 pacientes tratados con estos fármacos mediante la técnica de *next generation sequencing* (NGS) que analizan mutaciones en 560 genes de los cuales 18 están implicados en la señalización PI3K-mTOR (PIK3C2B, PIK3CA, PIK3CG, PIK3R1, PTEN, TSC1, TSC2, mTOR, RHEB, RPTOR, NPRL2, NPRL3, NF1, NF2, FLCN, RICTOR, DEPDC5 y STK11) y otros 8 genes frecuentemente mutados en cáncer renal (VHL, PBRM1, SETD2, KDM5C, BAP1, TP53, ATM y ARID1A)²¹¹. Cuarenta y tres (54%) de los 79 pacientes eran respondedores, aunque ninguno presentaba respuesta completa. Treinta y ocho (48%) habían sido tratados con everolimus y 41 (52%) recibieron temsirolimus. Los subtipos histológicos incluyeron CCR de células claras (n = 69, 87%) y CCR de células no claras (n = 10, 13%). Cuarenta y nueve de 79 (62%) habían sido tratados previamente, la mayoría (44 de los 49, 89%) con terapia antiangiogénica.

Se evaluó en primer lugar la hipótesis principal que mutaciones inactivadoras en TSC1 o TSC2 y mutaciones activadoras en mTOR podían estar asociadas con la respuesta. Se encontraron mutaciones en estos 3 genes en 12 (28%) de 43 respondedores y en 4 (11%) de 36 no respondedores (p = 0.06). Las mutaciones en TSC1 y TSC2 consideradas aisladamente también demostraron estar asociadas con la respuesta (21% de respondedores frente a un 6% de los no respondedores; p = 0.05). Al incluir todas las mutaciones activadoras de mTOR o PIK3CA, y todas las mutaciones que inactivan TSC1 o TSC2, o PTEN, se

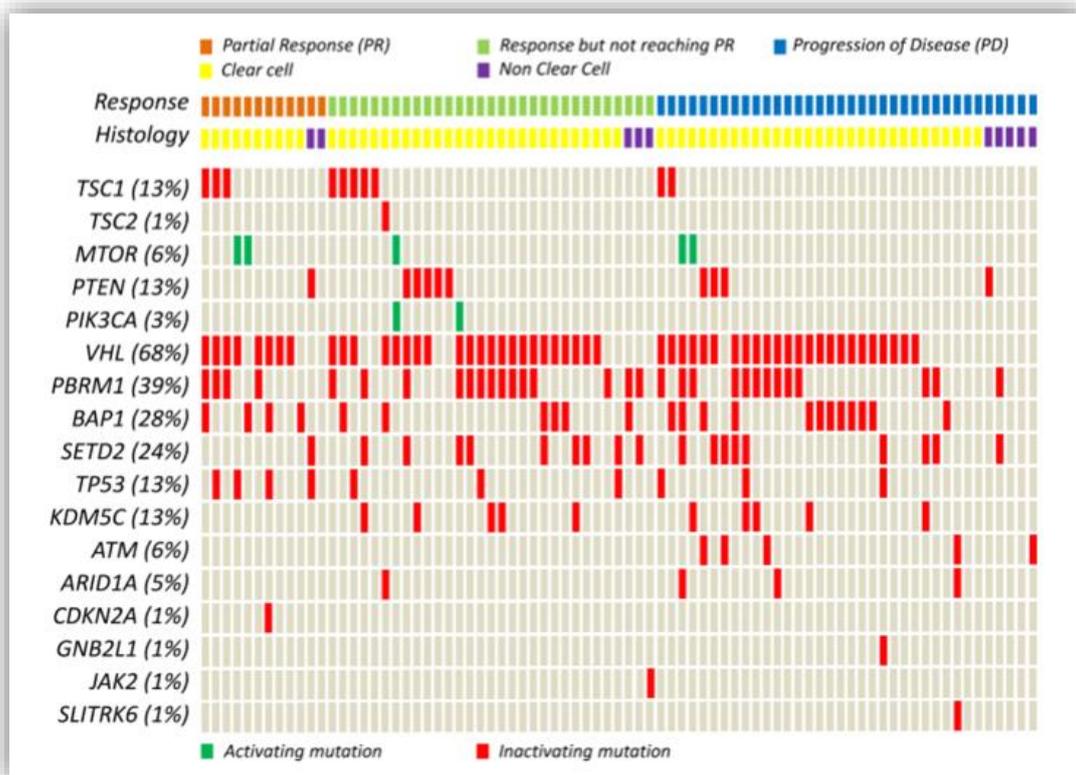
objetivó una asociación estadísticamente significativa entre la respuesta y la mutación; 19 (44%) respondedores tenían mutaciones en al menos uno de estos 5 genes, mientras que 8 (22%) no respondedores tenían tales mutaciones ($p = 0.03$, $OR = 2.73$). Cuando restringieron el análisis al subgrupo de pacientes con RP o progresión de la enfermedad (PE), se objetivó que las mutaciones en cualquiera de los genes TSC1, TSC2 o mTOR eran más comunes en el grupo RP (5/12 RP frente a 4/36 PE, $p = 0.03$) (Tabla 8).

Tabla 8. Asociación de respuestas tumorales en función de las mutaciones halladas.

Mutation category	Mutations	Best response group		Fisher's exact p-value ^a
		PD (n=36) n(%)	PR (n=12) n(%)	
MTOR, TSC1, TSC2	No(ref)	32(89)	7(58)	0.03
	yes	4(11)	5(42)	
MTOR, TSC1, TSC2, PTEN	No(ref)	28(78)	6(50)	0.07
	yes	8(22)	6(50)	
TSC1, TSC2	No(ref)	34(94)	9(75)	0.09
	yes	2(6)	3(25)	
TSC1, TSC2, MTOR, PTEN, PIK3CA	No(ref)	28(78)	6(50)	0.07
	yes	8(22)	6(50)	

Asimismo se realizó un análisis exploratorio para evaluar la asociación entre la respuesta y el estado mutacional de genes que se encuentran frecuentemente mutados en cáncer renal. Se observó una frecuencia de mutación muy baja, 4 de 79 pacientes (5%). De los 8 genes analizados, solo ATM mostró una posible asociación con la respuesta. Se observaron mutaciones ATM en 5 de los pacientes no respondedores y ninguno de los respondedores, lo que sugiere una asociación negativa con la respuesta ($p = 0.02$) (Figura 32).

Figura 32. Mutaciones halladas en función de la respuesta tumoral.



Se analizó también la frecuencia y la asociación entre la pérdida del número de copias de 7 genes que son reguladores negativos de la señalización de mTOR (PTEN, TSC1, TSC2, DEPDC5, NPRL2, STK11, NPRL3) con la respuesta. No se observó asociación entre la pérdida de número de copias y la respuesta a rapálogos para cualquiera de estos genes ($p > 0.30$ para todos), con la excepción de DEPDC5 para el que la pérdida de número de copia única se asoció con la falta de respuesta a rapálogos ($p = 0.02$).

Todos estos hallazgos indican que el estado mutacional de los genes de la vía mTOR (principalmente TSC1, TSC2 and mTOR) podría ser utilizado en el futuro como biomarcador predictivo respuesta a everolimus/temsirolimus en el cáncer de células renales metastásico convirtiéndolo en una herramienta útil a la hora de elegir el tratamiento en pacientes afectados de CCRm.

En un estudio se examinaron por inmunohistoquímica los niveles de expresión de AKT fosforilado, mTOR, *eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E) *binding protein-1* (4EBP1) y proteína S6 (S6RP) ribosomal 40S de 18 pacientes chinos con CCRm que habían participado en un ensayo fase 1b con everolimus²¹². El nivel de expresión de estas moléculas asociadas a mTOR se correlacionó con el beneficio clínico – definido como respuesta completa, RP o enfermedad estable ≥ 6 meses- y el tiempo de SLP. La tasa de beneficio clínico fue del 55.6% (10/18), y el tiempo medio de SLP fue de 8.4 meses. Los pacientes con expresión positiva de fosfo-mTOR mostraron un mayor beneficio clínico (71.4% versus 0%, $p = 0.023$) y SLP (11.3 frente a 3.7 meses, $p = 0.001$) que los pacientes con expresión negativa. La mediana de SLP de pacientes con expresión positiva de

fosfo-S6RP fue mayor (11.3 frente a 3.7 meses, $p = 0.002$) que la de los pacientes que no presentaban expresión de fosfo-S6RP. Sin embargo, los niveles de expresión de fosfo-4EBP1 y fosfo-AKT no se asociaron a la eficacia del tratamiento con everolimus en términos de beneficio clínico ni de SLP (Tabla 9).

Tabla 9. Asociación de la expresión de las distintas moléculas analizadas y el beneficio clínico (CBR) y la SLP.

Phosphorylated targets	Clinical response						Survival		
	CR	PR	SD \geq 6 months	SD < 6 months	PD	CBR	P value	Median PFS (95% CI), months	P value
AKT							0.367		0.597
Negative	0	0	5	2	0	71.4%		11.3 (3.858-18.742)	
Positive	0	1	4	4	2	45.5%		5.6 (0.313-10.887)	
mTOR							0.023		0.001
Negative	0	0	0	3	1	0%		3.7 (2.003-5.397)	
Positive	0	1	9	3	1	71.4%		11.3 (5.250-17.350)	
S6RP							0.069		0.002
Negative	0	0	0	2	1	0%		3.7 (0.499-6.901)	
Positive	0	1	9	4	1	66.7%		11.3 (6.882-15.718)	
4EBP1							0.617		0.160
Negative	0	0	1	2	0	40.0%		3.8 (3.640-3.960)	
Positive	0	1	8	4	2	60.0%		8.6 (0.647-16.553)	

En otro estudio se analizaron las muestras parafinadas de 20 pacientes con carcinoma renal que habían recibido temsirolimus²¹³. Se analizó la anhidrasa carbónica IX (CAIX), fosfo-S6, fosfo-Akt (pAkt) y homólogo de la tensina. Los niveles de expresión se correlacionaron con la respuesta objetiva (RP, respuesta menor [mR]) y beneficio clínico (RP, mR, EE $>$ o = 4 ciclos) al temsirolimus. Además, se realizó un análisis mutacional VHL y también se correlacionó con la respuesta. Se observó una asociación positiva de la respuesta temsirolimus con la expresión de fosfo-S6 ($p = 0.02$) y una tendencia con la expresión de pAkt ($p = 0.07$). No se objetivó respuesta objetiva en ningún paciente sin alta expresión de fosfo-S6 o pAkt. No se objetivó ninguna correlación entre la respuesta y el resto de parámetros analizados.

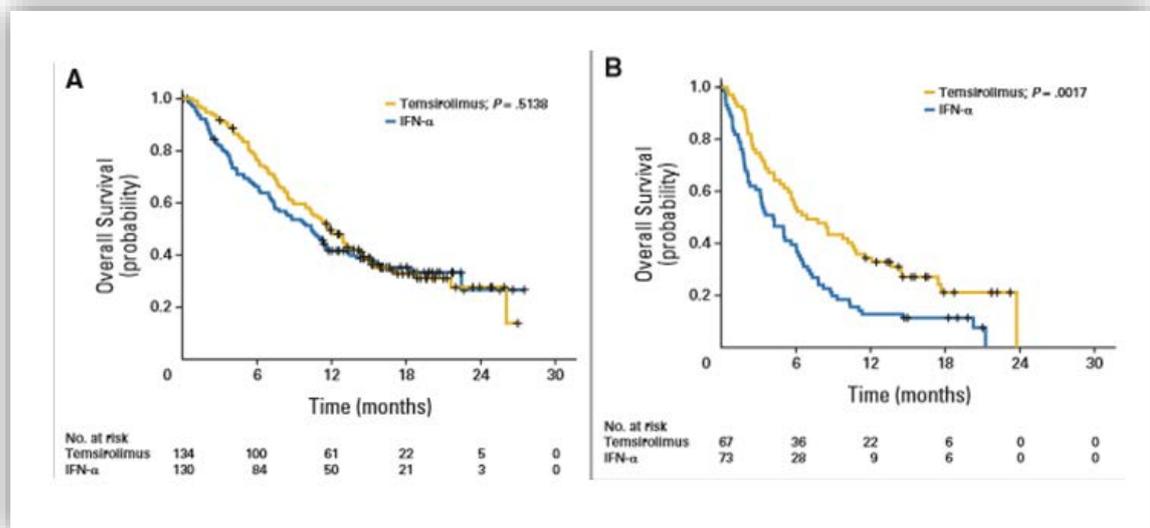
18.3- FACTORES CLÍNICOS

18.3.1- LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

El único marcador sérico que ha demostrado tener valor predictivo de respuesta es la enzima LDH²¹⁴. Se evaluó el valor de LDH sérica pretratamiento y posttratamiento en 404 pacientes de mal pronóstico tratados con temsirolimus o interferón alfa, en un estudio fase III aleatorizado. La mediana de LDH fue de 1.23 veces el límite superior de la normalidad (LSN). La HR para el riesgo de muerte fue 2.81 (IC del 95%, 2.01 a 3.94, $p < 0.001$) para los pacientes con LDH más de $1 \times$ LSN frente a los pacientes con $LDH \leq 1 \times$ LSN. El test de interacción LDH-tratamiento fue estadísticamente significativo para SG ($p = 0.016$). Entre los 140 pacientes con LDH por encima del LSN, la SG fue significativamente mayor

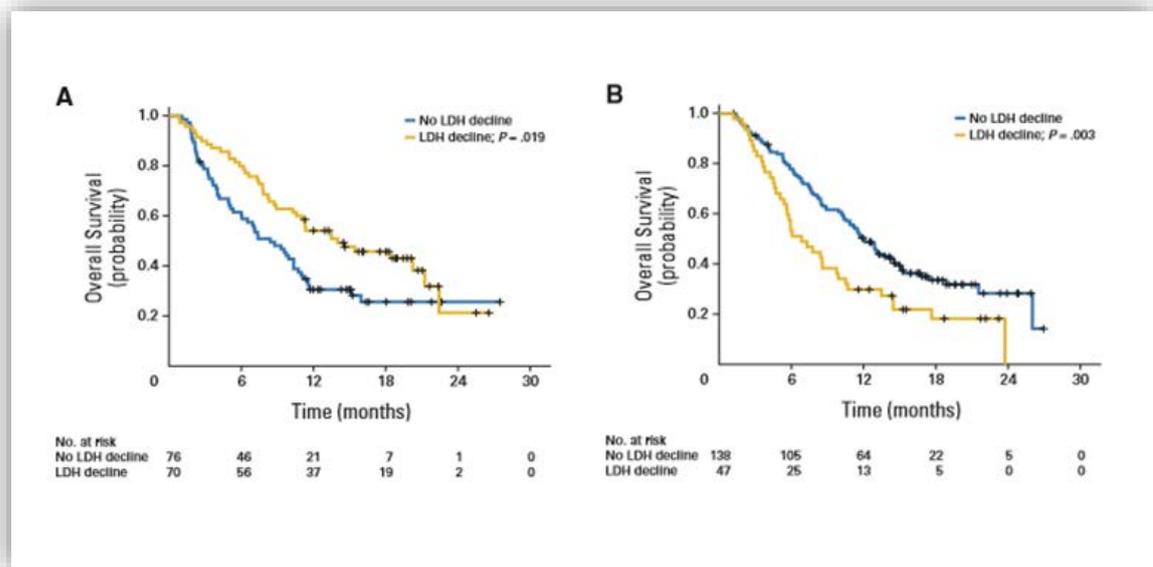
con temsirolimus (6.9 v 4.2 meses, $p < 0.002$). En cambio, entre 264 pacientes con LDH normal, la SG no mejoró significativamente con temsirolimus en comparación con interferón (11.7 v 10.4 meses, $p = 0.514$) (Figura 33).

Figura 33. Kaplan-Meier para de la supervivencia por grupo de tratamiento y niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), para (A) LDH normal y (B) LDH aumentada.



Cualquier disminución en la LDH a los 2 meses fue un pronóstico de SG en 70 de 146 pacientes tratados con IFN (HR = 0.60; $p = 0.02$). La mediana del tiempo de supervivencia en pacientes que no experimentaron ningún descenso de LDH a los 2 meses desde el inicio fue de 7.74 meses en comparación con 13.46 meses en pacientes que experimentaron un descenso de LDH (HR = 0.60, $p = 0.02$). En el grupo de temsirolimus, en cambio, se objetivó una disminución en LDH en 59 de 186 pacientes y, curiosamente, se asoció con una peor SG. En este grupo, la mediana del tiempo de supervivencia en pacientes que no experimentaron ningún descenso de LDH a los 2 meses del inicio fue de 10.93 meses en comparación con 5.30 meses en los pacientes que experimentaron un descenso de LDH con temsirolimus (HR = 1.80; $p = 0.003$). Este estudio demuestra el valor pronóstico y predictivo de los valores elevados de LDH en cáncer renal (Figura 34).

Figura 34. Kaplan-Meier de la supervivencia en pacientes tratados con (A) interferón alfa y (B) temsirolimus en base a la disminución de la lactato deshidrogenasa (LDH) a los 2 meses desde el inicio del tratamiento



18.3.2- NEUMONITIS

Dabydeen et al²¹⁵ evaluaron la incidencia de neumonitis radiográfica y clínica asociada con los inhibidores de mTOR en CCRm, y su correlación con el beneficio clínico de estos fármacos. Para ello, revisaron de manera retrospectiva los datos clínicos y los TACs de 46 pacientes con CCRm tratados con temsirolimus (21 pacientes) o everolimus (25 pacientes). Se evidenció neumonitis por TC (revisada por dos radiólogos independientes) en 14/46 pacientes (30%), con una mediana de aparición de 56 días desde el inicio del tratamiento con inhibidor de mTOR. Se objetivaron síntomas respiratorios en el momento de la neumonitis detectada radiográficamente en 7 pacientes. En 12/14 pts (86%) que desarrollaron neumonitis radiográfica, se observó enfermedad estable en comparación con 14/32 (44%) sin neumonitis ($p = 0.01$). El cambio medio del tamaño de las lesiones diana por RECIST, normalizado durante 30 días en terapia fue de -2.9% en el grupo de neumonitis y de + 4.3% en el grupo de no neumonitis ($p = 0.002$). Estos datos sugieren que la neumonitis puede ser un marcador de enfermedad estable por RECIST y por lo tanto, de beneficio terapéutico y que se debe realizar una cuidadosa evaluación del paciente antes de suspender el fármaco.

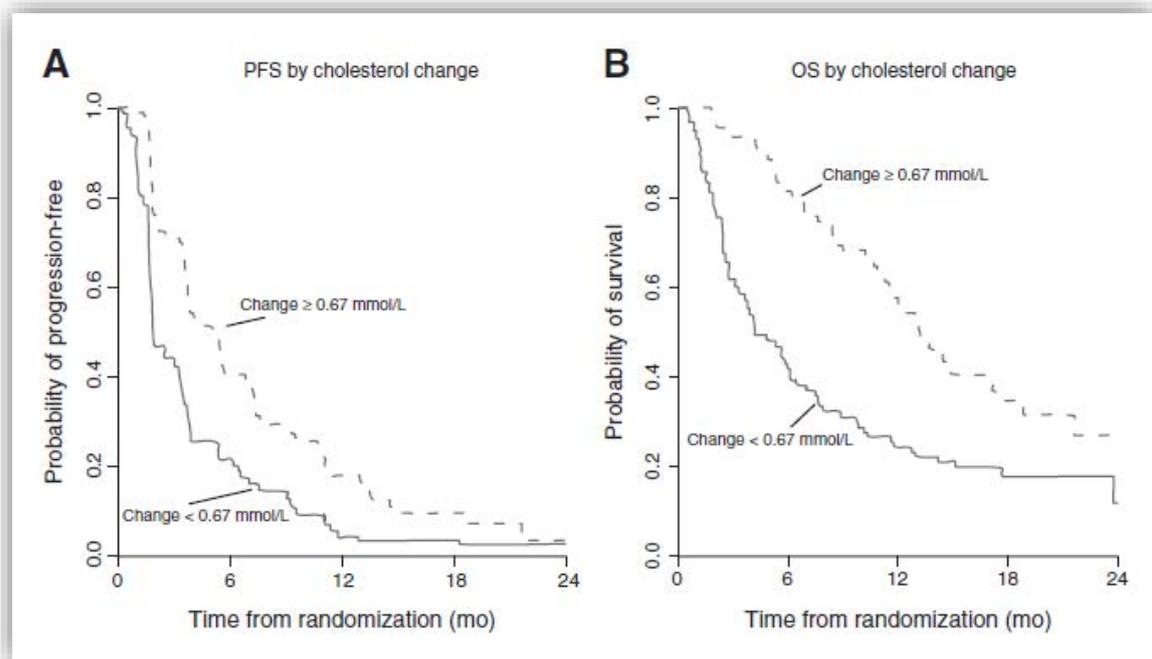
18.3.3- HIPERCOLESTEROLEMIA

El aumento de colesterol sérico, triglicéridos y glucosa con inhibidores de mTOR se ha observado comúnmente en ensayos clínicos y representan EA que podrían reflejar el mecanismo de acción de esta clase de fármacos.

Bajo condiciones de exceso de energía, la insulina se une a su receptor, dando como resultado lipogénesis mediada por la vía Akt/mTOR, aumento en la captación de glucosa, glucólisis y síntesis de lípidos y colesterol^{216 217}. La activación constitutiva de Akt/mTOR, como sucede en muchos tumores, incluyendo el cáncer renal, también resulta en la estimulación de esta vía, lo que en última instancia causa expresión de enzimas lipogénicas, tales como acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintasa, mediada por la proteína de unión a *element-binding protein-1* (SREBP-1), un regulador transcripcional para lípidos. Además, el complejo mTOR 1, regula la biosíntesis del colesterol a través de su sustrato, 4E-BP1, sobre SREBP-2. El bloqueo de la función mTOR reduce estas funciones celulares, dando lugar a apoptosis y autofagia, reduciendo así los requisitos metabólicos a nivel celular.

Chee Khoon Lee et al²¹⁸ examinaron mediciones seriadas de colesterol, triglicéridos y glucosa en pacientes asignados al brazo IFN o temsirolimus en el estudio pivotal. El tratamiento con temsirolimus se asoció con mayores aumentos en la mediana de colesterol (1.02 mmol / l; p <0.0001), triglicéridos (0.32 mmol / l, p = 0.0008) y glucosa (1.28 mmol / l; p <0.0001) en comparación con el IFN. El aumento de colesterol durante el estudio se asoció con una mayor supervivencia (SG: HR = 0.77 por mmol / L, p <0.0001; PFS: HR = 0.81 por mmol/L; p <0.0001). El efecto de temsirolimus sobre el colesterol predijo, por tanto, su efecto sobre la supervivencia sin observar una ventaja de supervivencia adicional después de ajustar por el cambio de colesterol a lo largo del estudio (SG: HR = 1.14, p = 0.37; PFS: HR = 0.88, p = 0.35). El efecto del temsirolimus sobre los triglicéridos o la glucosa no predijo su efecto sobre la supervivencia (Figura 35).

Figura 35. Estimación de Kaplan-Meier de PFS (A) y OS (B) en función del cambio de los niveles de colesterol (>0.67 frente a <0.67 mmol / L) para el grupo de pacientes tratados con temsirolimus.



Estos dos últimos factores predictores, a pesar de ser muy interesantes y sencillos de evaluar, no son útiles a la hora de seleccionar pacientes, pues aparecen una vez se ha iniciado el tratamiento con inhibidores de mTOR.

19. JUSTIFICACIÓN

El CCR se ha caracterizado por su resistencia a la quimioterapia, la radioterapia y la terapia hormonal convencional. El descubrimiento de vías moleculares clave implicadas en la tumorigénesis ha llevado a la identificación de ciertas dianas moleculares y al desarrollo de fármacos dirigidos contra ellas.

En los últimos años, el uso de las terapias dirigidas ha aumentado las opciones de tratamiento de los pacientes con CCRm, mejorando sus perspectivas, gracias a la actividad antitumoral de dos grupos de agentes dirigidos, esto es, agentes que inhiben las vías de señalización del factor de crecimiento endotélico vascular y que inhiben la diana de la rapamicina en células de mamíferos. Recientemente, los nuevos tratamientos inmunoterápicos se han añadido al arsenal terapéutico.

La señalización de PI3K / Akt / mTOR está desregulada en muchos tipos de cáncer, incluido el CCR, y se ha sugerido que la activación de esta ruta se correlaciona con el comportamiento agresivo y el mal pronóstico en los tumores CCR.

Diversos estudios clínicos, parecen corroborar que la activación de la vía mTOR podría conferir un peor pronóstico a los pacientes con cáncer renal.

Un estudio de 528 pacientes nefrectomizados, analizó la relación entre la expresión de *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K), mTOR fosforilado (p-mTOR), S6 fosforilado (p-S6), y *4E-binding protein-1* fosforilado (p-4EBP1) y el riesgo de recaída tras la nefrectomía¹⁸⁸. El número de biomarcadores alterados se asoció con un mayor riesgo de recurrencia en el análisis multivariado una vez ajustado por estadio, grado y afectación ganglionar (HR = 3.20; p = 0.02 para pacientes con 4-5 marcadores alterados vs aquellos con 1-2 marcadores alterados). Es más, la alteración de dos biomarcadores combinados (p-S6 y p-4EBP1) demostró ser un predictor independiente para una peor SLR (HR = 4.38; p = 0.003 para los pacientes con 2 marcadores alterados en comparación con los pacientes con 0 marcadores alterados). Los autores de este trabajo, concluyeron que el análisis de las alteraciones en la vía mTOR añadía una información pronóstica importante a las características clínico-patológicas.

El análisis mediante IHQ de PI3K, PTEN, p-Akt, p-mTOR y p70S6 en 132 muestras metastásicas de cáncer renal, de las cuales 25 tenía tumor primario pareado, objetivó que las alteraciones en la vía mTOR son más frecuentes en lesiones metastásicas que en tumores primarios¹⁸⁹. Los pacientes con intervalos libres de enfermedad más cortos mostraron una expresión significativamente mayor de PI3K (p=0,035). En este estudio, además, la sobreexpresión de mTOR citoplasmático se asoció con una peor supervivencia cáncer-específica (HR = 3.06, p = 0.022).

El análisis de la expresión de pAkt, PTEN, p27 y pS6 en 375 muestras de pacientes con cáncer renal metastásicos y no metastásicos reveló un aumento

significativo de alteraciones de la vía mTOR en tumores de histología células claras, tumores de alto grado y tumores con características de mal pronóstico¹⁹⁰. Además, se observó una expresión significativamente mayor de p27 en los tumores de mayor tamaño, mayor grado Fuhrman, enfermedad metastásica, y de histología células claras. En un análisis multivariado, el ECOG PS, la clasificación TNM, el grado de Furhman, la expresión citoplasmática y nuclear de pAKT, PTEN y pS6 fueron factores pronósticos independientes. En pacientes metastásicos la expresión de pAKT, PTEN y pS6 proporcionó información pronóstica adicional. Para pS6, la tinción más baja predijo una mejor supervivencia respecto a la más alta; mediana de supervivencia de 20.2 meses vs 13.6 meses, respectivamente ($p = 0.002$). Una mayor expresión de PTEN predijo una mejor mediana de supervivencia; 16.0 meses vs 8.0 meses ($p = 0.041$). La expresión de pAkt citoplasmática más baja también predijo un pronóstico más favorable, con una supervivencia media de 25.5 meses frente a 15.1 meses para una mayor expresión ($p = 0.045$). En contraste, la expresión de p27 y pAkt nuclear no se asoció con la supervivencia.

En conjunto estos datos demuestran que los pacientes afectos de carcinoma renal que presentan una mayor activación de la vía mTOR podrían tener un peor pronóstico que se traduce en una mayor tasa de recaídas en pacientes intervenidos y una peor supervivencia en pacientes metastásicos.

Gracias al conocimiento de estas alteraciones moleculares, se han desarrollado fármacos inhibidores de mTOR en cáncer renal.

Hasta la fecha, se han aprobado dos inhibidores de mTOR para el tratamiento del CCRm: temsirolimus¹³² y everolimus¹⁴⁴, basados en dos ensayos clínicos aleatorizados.

Temsirolimus es un inhibidor de mTOR aprobado para el tratamiento de primera línea en pacientes con carcinoma renal metastásico con factores de mal pronóstico (mínimo 3). La SG, SLP y TR en el estudio pivotal fueron 8.4 meses, 3.7 meses y 3.1% respectivamente¹³². Everolimus está indicado para el tratamiento de pacientes con carcinoma de células renales avanzado, en los que la enfermedad ha progresado durante o después del tratamiento con una terapia dirigida al VEGF. La SG, SLP y TR en el estudio fase III fueron de 14.8 meses, 4.9 meses y 1.8% respectivamente¹⁴⁴.

En estos pacientes con alteraciones en la vía mTOR, el tratamiento con inhibidores de la vía mTOR (imTOR) podrían compensar este pero pronóstico que le confieren dichas alteraciones.

En esta tesis doctoral presentamos un estudio de investigación analítico para profundizar en el conocimiento de la biología molecular de los pacientes con carcinoma renal tratados con rapálogos y analizar el efecto de estos fármacos en pacientes que presentan alteraciones moleculares en la vía mTOR u otras vías de señalización.

20. HIPÓTESIS

Se pretende aquí analizar si existe asociación entre la presencia de mutaciones en la vía mTOR y la SLP y SG de los pacientes, no en una muestra de pacientes con CCRm, sino en una cohorte de pacientes que han recibido tratamiento con inhibidores de mTOR. Asumiendo que son ciertos los datos de la literatura que indican que la presencia de estas mutaciones se asocia con un peor pronóstico, la demostración de que el tratamiento mTOR iguala el pronóstico de pacientes con y sin mutaciones de la vía mTOR, servirá de argumento indirecto sobre la eficacia de estos fármacos en CCRm con mutaciones de la mTOR.

20.1- HIPÓTESIS CONCEPTUAL

“En pacientes tratados con inhibidores de mTOR, la presencia de mutaciones en la vía mTOR no se asocia con un peor pronóstico de los pacientes”.

20.2- HIPÓTESIS NULA

De acuerdo con el estado actual del conocimiento:

“En pacientes con carcinoma de células renales metastásico, la presencia de mutaciones en la vía mTOR se asocia con un peor pronóstico en términos de incremento supervivencia libre de progresión al tratamiento y supervivencia global, que es independiente del tratamiento administrado.”

20.3- HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Como alternativa a lo aceptado como estado actual del conocimiento:

“En los pacientes con carcinoma de células renales metastásico, tratados con inhibidores de mTOR, la presencia de mutaciones en la vía mTOR no se asocia con un peor pronóstico en términos de supervivencia libre de progresión al tratamiento y supervivencia global.”

20.4- HIPÓTESIS OPERATIVA

De forma operativa, esta ausencia de peor pronóstico en los pacientes tratados con inhibidores de mTOR debería traducirse en que los pacientes con mutaciones en esta vía tratados con imTOR, deberían tener un menor riesgo de recaída y/o muerte que el de los pacientes no tratados con imTOR.

Si consideramos la hipótesis nula de que la presencia de mutaciones implica un mayor riesgo de recaída (variable SLP) y/o muerte (variable SG) en los pacientes con mutaciones, y eligiendo como medida del efecto la razón de tasas instantáneas de riesgo (HR) entre ambos grupos de pacientes (sin mutaciones y con mutaciones), podemos formular matemáticamente la hipótesis nula (H0) e hipótesis alternativa (H1) de la siguiente manera:

- H0 = HR (mutación / no mutación) > 1, para SLP y/o SG.
- H1 = HR (mutación / no mutación) ≤ 1, para SLP y/o SG.

Ante la dificultad de establecer diseños que proporcionan un mayor nivel de evidencia sobre este tema, la ausencia de un pronóstico desfavorable en términos de SLP o SG, se considera como un dato indirecto de la utilidad del tratamiento en pacientes con mutaciones en la vía mTOR.

Para ello, esta pérdida efecto desfavorable de las mutaciones sobre el pronóstico de los pacientes, deberá ser independiente del resto de factores conocidos que potencialmente pudieran influir en el resultado de estos parámetros, bien como factores de confusión, o como factores modificadores del efecto.

21. OBJETIVOS

21.1- OBJETIVO PRINCIPAL

Definimos 2 objetivos principales en este estudio, con dos variables principales asociadas:

1. Estimar la razón de tasas instantáneas de riesgo de progresión (HR) tras iniciar un tratamiento con imTOR en cualquier línea, entre pacientes con CCRm con y sin mutaciones de la vía mTOR, ajustando su efecto por el de los potenciales factores de confusión e incorporando las variables modificadoras del efecto, mediante un análisis multivariante de regresión múltiple de Cox (modelo de riesgos proporcionales) de tipo explicativo.

↳ VARIABLE PRINCIPAL ASOCIADA: SLP, definida como el tiempo transcurrido desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la aparición de progresión tumoral, o hasta la fecha de último contacto con el paciente.

2. Estimar la razón de tasas instantáneas de riesgo de muerte (HR) tras iniciar un tratamiento con imTOR en cualquier línea, entre pacientes con CCRm con y sin mutaciones de la vía mTOR, ajustando su efecto por el de los potenciales factores de confusión e incorporando las variables modificadoras del efecto, mediante un análisis multivariante de regresión múltiple de Cox (modelo de riesgos proporcionales) de tipo explicativo.

↳ VARIABLE PRINCIPAL ASOCIADA: SG, definida como el tiempo transcurrido desde la fecha de diagnóstico de enfermedad metastásica o desde el inicio del tratamiento con imTOR (según se explica más abajo hasta la fecha de muerte por cualquier causa con tumor en actividad, o hasta la fecha de último contacto con el paciente.

Debido a que los pacientes podían haber recibido imTOR en diferentes líneas de tratamiento, las hipótesis se contrastaron desde dos puntos de vista:

1. Considerando la serie desde el inicio del tratamiento de enfermedad metastásica, independientemente del momento en que recibieran el tratamiento del imTOR. Con ello se analizará el efecto de las mutaciones en toda la historia de la enfermedad metastásica.

2. Considerando la serie desde el inicio del tratamiento con imTOR. Con ello se analizará el efecto de las mutaciones desde la introducción del tratamiento específico.

21.2- OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Describir las características de una serie de pacientes con carcinoma renal metastático tratados con imTOR en práctica clínica habitual (*real world*).
2. Estimar el porcentaje de pacientes con mutaciones de la vía mTOR en dicha serie.
3. Estimar la SLP y SG en dicha serie, tanto de forma bruta, como ajustada de acuerdo con los subgrupos definidos por la IMDC.
4. Estimar el porcentaje de pacientes con otras mutaciones en dicha serie:
 - Mutaciones en la vía del gen VHL.
 - Mutaciones en la vía del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR).
 - Otras mutaciones en vías relacionadas con el ciclo celular y la proliferación celular: APC TP53 CDKN2A KRAS MAG MET MSH6 NF2.

22. TIPO DE ESTUDIO

Para estos objetivos e hipótesis, se diseñó un estudio observacional longitudinal multicéntrico retrospectivo de cohorte única, de pacientes tratados en condiciones de práctica clínica habitual.

De acuerdo con el RD 1090/2015 este diseño cumple criterios de "Estudio Clínico" al tratarse de una investigación en seres humanos destinada a analizar un efecto clínico de uno o más medicamentos.

El tipo de diseño permite clasificarlo como un estudio observacional con medicamentos. Al tratarse de un estudio retrospectivo, los fármacos se prescribieron según indicación de ficha técnica y en práctica habitual, esto es, sin seguir una estrategia previa de asignación de tratamiento a los pacientes. Tampoco se realizaron nuevas biopsias ni ninguna otra intervención diagnóstica ni terapéutica a los pacientes. Por todo ello, el diseño en su conjunto permite clasificarlo como un Estudio Posautorización sin intervención.

La legislación española exige que estos estudios sean autorizados por las Autoridades Sanitarias y evaluados por un Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC). En este sentido, el estudio fue presentado a la Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) para su clasificación, y considerado como un "Estudio Posautorización con otros diseños diferentes al de seguimiento prospectivo (EPA-OD)" (Se adjunta documento en apartado 33 anexo).

Como es preceptivo, el estudio fue presentado al CEIC del *Hospital Universitari Vall d'Hebron* de Barcelona, quien tras su evaluación emitió un dictamen favorable con fecha 24 de Julio de 2015, autorizando su realización por la Dra. Cristina Suárez Rodríguez como investigadora principal, y la Fundación Privada *Institut d'Investigació Oncològica del Vall d'Hebron* (VHIO) como promotor del mismo (Se adjunta documento en apartado 33 anexo).

Como parte de los requisitos de aprobación, y dado que además el estudio implicaba el manejo de muestras biológicas, se recogió un Consentimiento Informado en los pacientes vivos, y se aplicó la normativa relativa al manejo de muestras biológicas (Se adjunta documento en apartado 33 anexo). Para aquellos pacientes fallecidos en el momento de la inclusión en el estudio, el CEIC dio autorización para el uso de sus muestras tumorales, así como para la recogida de su información clínica, eximiendo de la obtención del consentimiento informado, de acuerdo con el artículo 24 del RD 1716/2011.

23. SELECCIÓN DE LA MUESTRA: POBLACION DIANA, POBLACION ACCESIBLE Y MUESTRA ANALIZADA.

23.1- POBLACIÓN DIANA

Pacientes adultos diagnosticados de carcinoma avanzado de células renales (metastásico o irresecable), tratados con inhibidores de la vía mTOR (temsirolimus o everolimus) en cualquier línea en práctica clínica asistencial. Se establecieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

1. Edad \geq 18 años.
2. Carcinoma de célula renales metastásico (CCR) o no resecable, de cualquier subtipo histológico.
3. Tratamiento con inhibidores de la vía mTOR (everolimus o temsirolimus) para el CCR, en primera línea o subsiguientes.
4. Paciente capaz de entender y firmar un consentimiento informado (pacientes vivos)

Criterios de exclusión

1. Pacientes de los que no se disponga de información clínica. Se requería el seguimiento clínico del paciente durante el tratamiento onco-específico así como la evaluación de los pacientes mediante los criterios de evaluación de respuesta de tumores sólidos en práctica clínica habitual.
2. Tumores renales de otro tipo histológico no encuadrables en el concepto de "carcinoma de células renales", como por ejemplo tumores de origen urotelial o sarcomas.

23.2- POBLACIÓN ACCESIBLE:

Pacientes con las características anteriores, tratados en 8 hospitales españoles, enero/2003 y octubre/2015. Los hospitales participantes y sus investigadores se detallan en la tabla a continuación:

Hospital	Investigador/a
HGU Gregorio Marañón	Jose Ángel Arranz
H Central de Asturias	Emilio Esteban
H Clínic de Barcelona	Begoña Mellado / Óscar Reig
H Parc Taulí	Enrique Gallardo
H Son Espases	M ^a Aranzazu González del Alba
H Virgen del Rocío	Begoña Pérez-Valderrama
H Clínico San Carlos	Javier Puente
VHIO	Cristina Suárez

Para identificar los casos y evitar sesgos de selección, se solicitó a cada centro un listado de los pacientes que cumplieran el criterio de tratamiento con imTOR (temsirolimus o everolimus), en carcinoma renal metastático, de acuerdo con los registros del servicio de Farmacia de cada hospital, e independientemente de que tuvieran o no muestra tumoral disponible para el análisis mutacional. Este listado constituye la POBLACION DE ESTUDIO, en cuyos pacientes se recogieron las variables clínicas y evolutivas descritas en el apartado correspondiente, necesarias para el análisis de los objetivos del estudio.

23.3- MUESTRA ANALIZADA

De forma paralela se solicitó una muestra de tumor primario de estos pacientes (o en su defecto de una biopsia de enfermedad metastásica) al Servicio de Anatomía Patológica (AP) de cada hospital, y se realizó un análisis mutacional de las mismas. En ningún caso se realizó una nueva biopsia a los pacientes.

Debido a que no todos los pacientes incluidos en el estudio y cuyos datos clínicos fueron recogidos, tuvieron muestra disponible, válida o suficiente para realizar el análisis, se generaron 2 tipos de pacientes:

- Pacientes con muestra tumoral disponible y válida, que constituyen la MUESTRA DE PACIENTES ANALIZADA.

- Los pacientes sin muestra tumoral disponible o válida, se utilizaron para comparar sus características con las de la población con muestra tumoral disponible, con intención de identificar o descartar posibles diferencias que impidieran la generalización de los resultados obtenidos en la muestra de pacientes analizada.

24. MÉTODOS

24.1- FACTOR DE EXPOSICION O FACTOR DE ESTUDIO

El factor de estudio considerado como de exposición o riesgo fue la presencia de mutaciones en la vía mTOR, definida por mutaciones en alguno de estos genes: mTOR, PIK3CA, AKT, PTEN, TSC1 o TSC2.

24.2- EFECTO O VARIABLE RESULTADO

El efecto a analizar fue la progresión tumoral o muerte por cualquier causa con tumor en actividad, tal y como se ha definido en el apartado de objetivos.

24.3- TAMAÑO MUESTRAL Y HORIZONTE TEMPORAL.

Al tratarse de un estudio observacional, el tamaño muestral fue dependiente de la población de pacientes disponibles, y no se fijó un tamaño muestral *a priori*, ni tampoco un error alfa y beta para los contrastes de hipótesis. Por ese motivo, las estimaciones poblacionales y los diferentes contrastes y comparaciones de hipótesis se harán incluyendo los intervalos de confianza de las estimaciones o parámetros calculados.

Con estos criterios se registraron 133 pacientes tratados en 8 centros españoles entre enero/2013 y octubre/2017, de acuerdo con los registros del Servicio de Farmacia de cada centro. De estos 133, 90 tuvieron muestra disponible para el análisis mutacional.

24.4- RECOGIDA DE DATOS CLINICOS Y EVOLUTIVOS

Los datos fueron recogidos a partir de las historias clínicas de los pacientes, por los diferentes investigadores de cada centro. Se puso especial interés en evitar los valores desconocidos, especialmente en las variables consideradas principales, y en los potenciales factores de confusión o modificadoras del efecto.

24.4.1- VARIABLES DE ESTUDIO

Se recogieron variables relativas a:

- Características demográficas de los pacientes en el momento del tratamiento con imTOR.
- Características del tumor en el momento del diagnóstico tumoral.
 - ↳ Variedad histológica
 - ↳ Grado histológico de Furhman
 - ↳ Estadio
- Tipo de tratamiento inicial.

- Línea de tratamiento en la que se administró el imTOR.
- Para cada línea de tratamiento sistémico en enfermedad metastática, se recogieron:
 - ↳ Localizaciones metastáticas
 - ↳ Datos clínicos y analíticos necesarios para aplicar los criterios de la IMDC: cifra de hemoglobina (mg/dl), plaquetas /mm³, neutrófilos/mm³, calcio corregido (mg/dL).
 - ↳ Tipo de tratamiento sistémico, y fechas de inicio y fin del mismo.
 - ↳ Tolerancia al tratamiento.
 - ↳ Necesidad de ajuste de dosis durante el tratamiento,
 - ↳ Mejor respuesta observada.
 - ↳ Fecha de progresión al tratamiento.
- Fecha de muerte y último seguimiento.
- Causa de muerte.

Los ítems de estas variables se concretan en la hoja de recogida de datos adjunta (apartado 33 en anexo).

Debido a que los pacientes habían recibido imTOR en diferentes líneas de tratamiento, a partir de las variables anteriores se construyeron nuevas variables para identificar la línea de tratamiento en la que recibieron el imTOR, así como las características de los pacientes específicamente durante dicho periodo tratamiento (incluyendo el cálculo del subgrupo pronóstico de acuerdo con la clasificación internacional IMDC), la tolerancia al mismo, la necesidad de ajuste de dosis, la respuesta observada, la supervivencia libre de progresión y supervivencia global de cada paciente desde ese momento.

25. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR

Se han analizado muestras de tumor primario (en su mayoría) o de localizaciones metastásicas (según disponibilidad) previas al tratamiento.

Las 90 muestras se han analizado mediante Amplicon-seq, una técnica basada en *Next Generation Sequencing* (NGS) que utiliza un panel de amplicones elaborada por el Instituto de Oncología de *Vall d'Hebron* (VHIO) y que analiza mutaciones bien establecidas en diversos genes. Los genes *MTOR*, *TSC1* y *TSC2* no estaban incluidos inicialmente en este panel, y se añadieron para este estudio dada la relevancia en cáncer renal de los mismos.

25.1- AMPLICON-SEQ (M&M)

Inicialmente, un patólogo analiza el contenido del área tumoral de tejido fijado con formol y embebido en parafina para asegurar que el análisis posterior se realizará sobre tejido tumoral. Para el procesamiento posterior, se aplica un mínimo de contenido tumoral del 20%. Posteriormente, se extrae ADN del tejido mediante el kit Tissue LEV Maxwell (Promega), y se evalúa la calidad del mismo mediante un método basado en tecnología qPCR.

La búsqueda de mutaciones se realiza mediante secuenciación de amplicones. Para ello se dispone de un grupo de 809 pares de cebadores dirigidos contra regiones críticas en 63 oncogenes y genes supresores tumorales (tabla 10). Esta técnica tiene sensibilidad de un mínimo de 3% de frecuencia de la variante alélica (VAF). Posteriormente se realizan dos análisis químicos independientes (que ayudan a identificar las variantes verdaderas y filtrar los falsos positivos) y se generan dos librerías para cada muestra. Las librerías se secuencian empleando un instrumento MiSeq (Illumina) en lecturas de 2X100. Posteriormente, se alinean las lecturas y las variantes reciben una designación que es correspondientemente anotada. Por último, se realizará manualmente una última comprobación de cada variante de forma individual y validada de acuerdo con la doble determinación de dos librerías independientes. La duplicación de ensayos también ayuda a detectar mutaciones con baja frecuencia alélica.

Las mutaciones *missense* y *nonsense* en los genes *MTOR*, *TSC1* and *TSC2* identificadas se han priorizado como patogénicas o probablemente patogénicas en base a una serie de criterios: su supuesto efecto funcional a nivel proteico (poliphen-2, SIFT), su ubicación en dominios de proteínas relevantes en dichos genes, su presencia en los catálogos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) humanos (1000 genomas, dvSNP) y prevalencia de alelo de mínima frecuencia >0.005 , así como en el hecho de que hayan sido detectados anteriormente en tumores (bases de datos COSMIC, TCGA).

Tabla 10. Genes en la VHIO-Carta V2

ABL1	ERBB3	IDH1	MYC	RNF43
AKT1	ESR1	IDH2	NF2	RUNX1
AKT2	FBXW7	JAK1	NOTCH1	SMAD4
AKT3	FGFR1	JAK3	NOTCH4	SMARCB1
ALK	FGFR2	KIT	NRAS	SRC
APC	FGFR3	KRAS	PDGFRA	STK11
BRAF	FGFR4	MAG	PIK3CA	TSC1
CDH1	FLT3	MAP2K1	PIK3R1	TSC2
CDKN2A	GATA1	MET	PIK3R5	TP53
CSF1R	GNA11	MLH1	PTCH1	VHL
CTNNB1	GNAQ	MPL	PTEN	ZNRF3
EGFR	GNAS	MSH6	RB1	
ERBB2	HRAS	MTOR	RET	

Para los genes *MTOR*, *TSC1* y *TSC2*, las regiones que quedan cubiertas por el amplicon seq son:

MTOR	NM_004958	L1476-L1487	H1791-Q1807	M1879-1896	A1971-*2550
TSC1	NM_000368	Complete CDS			
TSC2	NM_000548	Complete CDS			

En las muestras tumorales de una paciente de la cual se disponía de muestra inicial y muestra a la progresión de temsirolimus se realizaron análisis adicionales. La muestra inicial se analizó además de por amplicon-seq, mediante *Whole Exome Sequencing* (WES) y el panel de 'los 300'.

25.2- WHOLE-EXOME SEQUENCING (WES)

La técnica de WES es una técnica genómica que secuenciar todas las regiones codificantes del genoma (conocido también como exoma). Estas regiones son el conjunto de exones en genes que hay en el genoma humano alrededor de 180.000, constituyendo alrededor del 1% del genoma humano o, lo que es lo mismo, 30 millones de pares de bases. El WES consiste en un primer paso de captura específica de dichas regiones (mediante hibridación complementaria) seguido de un segundo paso consistente en secuenciar el DNA exónico capturado mediante técnicas de alto rendimiento NGS. En el caso de realizar un WES, siempre se incluyen dos muestras en el análisis: la tumoral y la normal o línea germinal, con el objetivo de identificar las variantes somáticas en el tumor.

Un primer paso de evaluación por parte del patólogo aseguró el contenido de mínimo un 50% de área tumoral en la muestra. El DNA se extrajo de la muestra tumoral embebidas en parafina mediante el kit Tissue LEV Maxwell (Promega) según las instrucciones del protocolo del fabricante. Las librerías de ADN se prepararon usando el kit SureSelect XT Library Prep Kit (Agilent) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El enriquecimiento de las regiones exónicas se realiza utilizando el kit de captura SureSelect XT Human All Exon v5 (Agilent). La

secuenciación con lecturas de 100 pares de extremos apareados (2X100) de bibliotecas de enriquecimiento específicas se realiza en el secuenciador HiSeq 2500 (Illumina). Se realiza una verificación de calidad de los datos en bruto mediante la herramienta FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas se alinearon al genoma humano (hg19) mediante el software bwa (v. 0.6.2) con la configuración predeterminada²¹⁹. Los archivos BAM resultantes se procesaron mediante SAMtools (v. 0.1.19)^{220 221} y Genome Analysis ToolKit (GATK) versión 3.2.0²²². En resumen, los archivos BAM se comprimieron, clasificaron e indexaron mediante SAMtools (herramientas samtools view, sort e index). La función SAMtools rmdup elimina las lecturas duplicadas, y la recalibración de la puntuación de calidad básica y la realineación local alrededor de *indels* siguen las recomendaciones flujo de trabajo del kit de herramientas GATK (RealignerTargetCreator, IndelRealigner, BaseRecalibrator y PrintReads)^{223 224}. Usando archivos de *pileup* de las muestras emparejadas tumor-normal, las variantes somáticas son llamadas por VarScan2 (v2.3.7) función "somática"²²⁵ con los siguientes parámetros: variante mínima de frecuencia de alelos (VAF) del 5%, una cobertura mínima de 10 lecturas, al menos 5 lecturas que confirman la mutación y un valor p por debajo de 0.05. La anotación de los archivos *vcf* se realiza con ANNOVAR²²⁶. Las variantes son filtradas del siguiente modo: la posición de la variante se anota como exonic por RefSeq (Release 45); y también se realizan llamadas sinónimas / no sinónimas y se excluyen de análisis posteriores. Todo el filtrado se realiza usando analizadores internos.

Las variaciones en el número de copias (CNV, *copy number variations*) se identifican con la herramienta SeqGene²²⁷. Esta interfaz del paquete R Biconductor DNACopy²²⁸ se usa para detectar CNV a partir de datos del exoma-Seq comparando una muestra tumoral con su muestra normal.

25.3- ONCO CARTA “LOS 300”

La técnica es la misma que la descrita en el punto 2, pero analiza 300 genes y no utiliza DNA germinal

Se trata de una captura con enriquecimiento de regiones específicas (tabla 11). La diferencia básica con el WES es que esta técnica no requiere el uso de una muestra de tejido normal.

Se obtuvo ADN de muestra tumoral embebida en parafina (kit de purificación de ADN Maxwell® 16 FFPE Tissue LEVPromega) y se realizó un enfoque de captura de genes personalizados (véase a continuación) (kit de enriquecimiento: SureSelect XT, Agilent). La resultante biblioteca se ejecutó en un instrumento Illumina HiSeq 2500 (ejecución 2X100 PE).

Línea de análisis: las lecturas de secuenciación se alinearon (BWA, Samtools), se recalibró la base, se realineó Indel (GATK) y se invocó la variante (VarScan2). Los SNP frecuentes en la población se filtraron con la base de datos de 1000 g

(MAF > 0,005) (www.1000genomes.org/). El tratamiento de los datos se realizó de forma manual.

Las mutaciones *missense* y *nonsense* en los genes *MTOR*, *TSC1* and *TSC2* identificadas se han priorizado como patogénicas o probablemente patogénicas en base a una serie de criterios: su supuesto efecto funcional a nivel proteico (poliphen-2, SIFT) y en su ubicación en dominios de proteínas relevantes en dichos genes, su presentes en los catálogos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) humanos (1000 genomas, dvSNP) y prevalencia de alelo mínimo >0.005, así como en el hecho de que hayan sido detectados anteriormente en tumores (bases de datos COSMIC, TCGA).

Tabla 11. Genes en VHIO-Card_300 v1

ABL1	CARD11	DOT1L	FLT4	JAK2	MTOR	POLE	SMARCB1
ABL2	CBFB	EGFR	FOXL2	JAK3	MUTYH	PPP2R1A	SMO
ACVR1B	CBL	EP300	FOXP1	JUN	MYC	PRDM1	SNCAIP
AKT1	CCND1	EPHA3	FRS2	KAT6A	MYCL	PREX2	SOCS1
AKT2	CCND2	EPHA5	FUBP1	KDM5A	MYCN	PRKAR1A	SOX10
AKT3	CCND3	EPHA7	GABRA6	KDM5C	MYD88	PRKCI	SOX2
ALK	CCNE1	EPHB1	GATA1	KDM6A	NF1	PRKDC	SOX9
AMER1	CD274	ERBB2	GATA2	KDR	NF2	PRSS8	SPEN
APC	CD79A	ERBB3	GATA3	KEAP1	NFE2L2	PTCH1	SPOP
AR	CD79B	ERBB4	GATA4	KEL	NFKBIA	PTEN	SPTA1
ARAF	CDC73	ERG	GATA6	KIT	NKX2-1	PTPN11	SRC
ARFRP1	CDH1	ERRFI1	GID4	KLHL6	NOTCH1	QKI	STAG2
ARID1A	CDK12	ESR1	GLI1	KMT2A	NOTCH2	RAC1	STAT3
ARID1B	CDK4	EZH2	GNA11	KMT2C	NOTCH3	RAD50	STAT4
ARID2	CDK6	FAM46C	GNA13	KMT2D	NOTCH4	RAD51	STK11
ASXL1	CDK8	FANCA	GNAQ	KRAS	NPM1	RAF1	SUFU
ATM	CDKN1A	FANCC	GNAS	LMO1	NRAS	RANBP2	SYK
ATR	CDKN1B	FANCD2	GPR124	LRP1B	NSD1	RARA	TAF1
ATRX	CDKN2A	FANCE	GRIN2A	LYN	NTRK1	RB1	TBX3
AURKA	CDKN2B	FANCF	GRM3	LZTR1	NTRK2	RBM10	TERT
AURKB	CDKN2C	FANCG	GSK3B	MAGI2	NTRK3	RET	TET2
AXIN1	CEBPA	FANCL	H3F3A	MAP2K1	NUP93	RICTOR	TGFBR2
AXL	CHD2	FAS	HGF	MAP2K2	PAK3	RNF43	TNFAIP3
BAP1	CHD4	FAT1	HNF1A	MAP2K4	PALB2	ROS1	TNFRSF14
BARD1	CHEK1	FBXW7	HRAS	MAP3K1	PARK2	RPTOR	TOP1
BCL2	CHEK2	FGF10	HSD3B1	MAP3K5	PAX5	RSPO2	TOP2A
BCL2L1	CIC	FGF14	HSP90AA1	MAPK7	PBRM1	RUNX1	TP53
BCL2L2	CREBBP	FGF19	IDH1	MCL1	PDCD1LG2	RUNX1T1	TSC1
BCL6	CRKL	FGF23	IDH2	MDM2	PDGFRA	SDHA	TSC2

26. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se construyó una base de datos con el programa SPSS (versión 21), que sirvió de base para el análisis. La estadística descriptiva se realizó mediante cálculo de proporciones para las variables cualitativas, y medias para las cuantitativas. La comparación entre proporciones se realizó utilizando la distribución X^2 (chi cuadrado) y el test exacto de Fisher para variables cualitativas, y la t de Student para variables cuantitativas. El análisis crudo de SLP, SGE y SG se realizó mediante el método de Kaplan-Meier, y las comparaciones entre ambos grupos con el log-rank test.

El objetivo fue analizar el efecto de la presencia de mutaciones sobre la SLP y SG de los pacientes con CCRm tratados con imTOR en cualquier línea.

Debido a que la presencia de mutaciones se asocia con un mal pronóstico en términos de SLP y SG, la intención del análisis fue generar evidencia a favor de que este mal pronóstico se anula cuando los pacientes reciben tratamiento con imTOR. Dado que solo disponíamos de una cohorte de pacientes tratados con imTOR, el análisis se centró en demostrar que el HR de la SLP y SG de los pacientes con mutaciones versus los pacientes sin mutaciones no era superior a 1.

En investigación no experimental, para estudiar el efecto de una variable independiente (en este caso presencia de mutaciones) sobre la tasa de riesgo de recaída o muerte, es necesario corregir los posibles desajustes debidos a la presencia de fenómenos de confusión e interacción.

Por ello, para cada uno de los dos objetivos principales del estudio se construyó un modelo multivariante explicativo mediante el método de regresión de Cox, para estimar la HR entre ambos grupos, después de controlar las variables de confusión y de modelizar las interacciones con las variables modificadoras del efecto. Este modelo multivariante debía cumplir 3 objetivos:

- Controlar el efecto de las variables de confusión que puedan estar presentes debido a la ausencia de aleatorización.
- Incluir las variables modificadoras del efecto (interacciones).
- Y lo más importante, estimar el riesgo de recaída y muerte asociada a la presencia de mutaciones, con el mínimo error posible y con la máxima precisión.

La construcción de este modelo exige los siguientes pasos:

1. Identificación de la variable objetivo cuyo efecto se quiere determinar (en nuestro caso presencia de mutaciones en la vía mTOR), así como de las

potenciales variables de confusión, y variables modificadoras del efecto a incluir en el modelo.

2. Identificación si hubiera, de las posibles variables dependientes del tiempo, que requieren un tratamiento estadístico diferente dentro del modelo multivariante.
3. Construcción de un modelo explicativo máximo inicial, que incluyera el factor de exposición (presencia de mutaciones), todas las variables de confusión seleccionadas, y todas las posibles interacciones de estas variables con la variable de exposición objeto del estudio, elaboradas de acuerdo con un proceso jerárquico.
4. Selección de un modelo explicativo de referencia que mantuviese solo las variables modificadoras del efecto con significación estadística, sus interacciones con la variable de estudio, y todas las posibles variables de confusión con relevancia clínica.
5. Selección de un modelo reducido final más simple y que estimase con mayor precisión los coeficientes del modelo respecto a la variable presencia de mutaciones, excluyendo las variables de confusión irrelevantes y que provocasen una menor precisión en la estimación del riesgo asociado a dicha variable.
6. Comprobación de los supuestos de riesgos proporcionales y relación loglineal del modelo.
7. Estimación de la HR, y de sus intervalos de confianza del 95%.
8. Cálculo del número de pacientes que es necesario tratar (NNT), para evitar una recaída, muerte por tumor o muerte por cualquier causa a 5 años en cada subgrupo.
9. Realización de análisis adicionales de subgrupos si se estimasen oportunos.

Debido a que los pacientes habían recibido imTOR en diferentes líneas de tratamiento, el análisis se realizó para cada uno de los objetivos y enfoques descritos en la descripción del objetivo principal.

27. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

27.1- POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron 133 pacientes tratados con inhibidores de la vía mTOR (temsirolimus o everolimus) en práctica clínica habitual en 8 centros españoles entre enero/2003 y octubre/2015. De todos ellos, solo se pudo obtener muestra para el análisis de mutaciones en 90 pacientes.

Tabla 12. Pacientes aportados por cada centro participante

Hospital	Muestra AP disponible		Total
	No	Sí	
HGU Gregorio Marañón	7 (16,3%)	15 (16,7%)	22 (16,5%)
H Central de Asturias	6 (14,0%)	11 (12,2%)	17 (12,8%)
H Clínic de Barcelona	6 (14,0%)	13 (14,4%)	19 (14,3%)
H Parc Taulí	4 (9,3%)	4 (4,4%)	8 (6,0%)
H Son Espases	5 (11,6%)	12 (13,3%)	17 (12,8%)
H Virdeg del Rocío	4 (9,3%)	7 (7,8%)	11 (8,3%)
H Clínico San Carlos	9 (20,9%)	14 (15,6%)	23 (17,3%)
VHIO	2 (4,7%)	14 (15,6%)	16 (12,0%)
Total	43 (100,0%)	90 (100,0%)	133 (100,0%)

27.2- CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE COMPLETA COMPARANDO LA POBLACIÓN SIN MUESTRA DISPONIBLE CON LA POBLACIÓN ANALIZADA

En las tablas que siguen:

- La estadística descriptiva de la población total (práctica clínica habitual, “real world”, N= 133). Se describe en la columna “Total”.
- La estadística descriptiva de la población analizada (N= 90). Se describe en la columna “Muestra disponible: Sí”.

- La comparación entre la población analizada y no analizada para establecer si la muestra analizada es representativa de la población tratada en práctica clínica habitual se ha realizado mediante:
 - ↳ El test exacto de Fisher para variables binarias, Chi cuadrado para variables cualitativas, T de Student para variables cuantitativas.
- Salvo que se especifique lo contrario, no hay diferencias estadísticamente significativas entre la población con muestra analizada y no analizada.

A continuación se detallan los resultados del análisis descriptivo de las variables clínicas y moleculares.

27.2.1- CARACTERÍSTICAS BASALES

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Un 67% de los pacientes eran hombres y un 33% mujeres.

Tabla 13. Distribución por sexos de la población incluida.

Sexo	Muestra AP disponible		Total (n=133)
	No (n=43)	Sí (n=90)	
Hombre	25 (58,1%)	64 (71,1%)	89 (66,9%)
Mujer	18 (41,9%)	26 (28,9%)	44 (33,1%)

La edad media de debut metastásico es de 62 años y la mayoría de los pacientes tenían 70 años o menos (73.7%).

Tabla 14. Distribución por edades de la población incluida.

Edad	Muestra AP disponible		
	No (n=43)	Sí (n=90)	Total (n=133)
Media	63,35	61,76	62,27
65 años o menos	25 (58,1%)	51 (56,7%)	76 (57,1%)
Mayor de 65 años	18 (41,9%)	39 (43,3%)	57 (42,9%)
70 años o menos	33 (76,7%)	65 (72,2%)	98 (73,7%)
Mayor de 70 años	10 (23,3%)	25 (27,8%)	35 (26,3%)
75 años o menos	36 (83,7%)	78 (86,7%)	114 (85,7%)
Mayor de 75 años	7 (16,3%)	12 (13,3%)	19 (14,3%)

SUBTIPOS HISTOLÓGICOS

La mayoría de los pacientes presentaban tumores de histología células claras (66.9%). El resto de histologías se distribuyen de la siguiente manera: papilar no especificado (1.5%), papilar tipo I (3%), papilar tipo II (6.8%), cromóforo (5.3%), sarcomatoide (0.8%) e histologías mixtas (14.3%). Un 9% de los pacientes tienen componente sarcomatoide independientemente de la histología asociada.

Tabla 15. Subtipos histológicos de la población incluida.

		Muestra AP disponible		
		No (n=43)	Sí (n=90)	Total (n=133)
Tipo Histológico	Desconocida	1 (2,3%)	1 (1,1%)	2 (1,5%)
	Células claras	32 (74,4%)	57 (63,3%)	89 (66,9%)
	Papilar no especificado	0 (0,0%)	2 (2,2%)	2 (1,5%)
	Papilar tipo I	2 (4,7%)	2 (2,2%)	4 (3,0%)
	Papilar tipo II	2 (4,7%)	7 (7,8%)	9 (6,8%)
	Cromóforo	1 (2,3%)	6 (6,7%)	7 (5,3%)
	Sarcomatoide	0 (0,0%)	1 (1,1%)	1 (0,8%)
	Mixtos (especificar)	5 (11,6%)	14 (15,6%)	19 (14,3%)
Histología agrupada	Cels. claras o no especificadas	37 (86%)	68 (75,6%)	105 (78,9%)
	No cels. Claras o mixtos	6 (14,0%)	22 (24,4%)	28 (21,1%)
Componente sarcomatoide	No	40 (93,0%)	81 (90,0%)	121 (91,0%)
	Sí	3 (7,0%)	9 (10,0%)	12 (9,0%)

CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR AL INICIO

Más de la mitad de los pacientes presentaban tumores con Furhman G3 (31.3%) y G4 (27.5%).

La mayoría de los pacientes presentaban tumores grandes, el 60% eran \geq T3 y un 33.5% tenían afectación ganglionar.

Un 43% de los pacientes eran metastásicos de inicio frente un 57% que desarrollaron metástasis después de un tiempo de la nefrectomía.

Tabla 16. Características del tumor inicial de la población incluida.

Características del tumor al diagnóstico		Muestra AP disponible		
		No (n=43)	Sí (n=90)	Total (n=133)
Grado histológico FURHMAN	Desconocido	7 (16,3%)	15 (16,7%)	22 (16,5%)
	G1	0 (0,0%)	8 (8,9%)	8 (6,0%)
	G2	14 (32,6%)	12 (13,3%)	26 (19,5%)
	G3	13 (30,2%)	28 (31,1%)	41 (30,8%)
	G4	9 (20,9%)	27 (30,0%)	36 (27,1%)
T	T0	1 (2,3%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)
	T1a	5 (11,6%)	4 (4,4%)	9 (6,8%)
	T1b	9 (20,9%)	11 (12,2%)	20 (15,0%)
	T2a	5 (11,6%)	9 (10,0%)	14 (10,5%)
	T2b	1 (2,3%)	9 (10,0%)	10 (7,5%)
	T3a	15 (34,9%)	37,80%	49 (36,8%)
	T3b	4 (9,3%)	13 (14,4%)	17 (12,8%)
	T3c	1 (2,3%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)
	T4	2 (4,7%)	10 (11,1%)	12 (9,0%)
N	N0	33 (76,7%)	69 (76,7%)	102 (76,7%)
	N1	10 (23,3%)	21 (23,3%)	31 (23,3%)
M	M0	26 (60,5%)	49 (54,4%)	75 (56,4%)
	M1	17 (39,5%)	41 (45,6%)	58 (43,6%)

LOCALIZACIONES METASTÁSICAS

Las localizaciones metastásicas fueron por orden de frecuencia: pulmonares (65.4%), ganglionares (50.4%), óseas (27%), hepáticas (18%), en partes blandas (13.5%), suprarrenales (7.5%), en sistema nervioso central (4.5%), pancreáticas

(5.3%), renales (5.3%), serosas (pleura, peritoneo y pericardio) (5.3%), locales o retroperitoneales (2.3%) y cutáneas (1.5%). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de localizaciones metastásicas entre la población diana y la población accesible, excepto en la afectación de partes blandas (23.3% vs 8.9%, $p=0.023$). No obstante, no consideramos esta diferencia sea relevante.

Tabla 17. Localizaciones metastásicas de la población incluida.

Localizaciones metastásicas al diagnóstico	Muestra AP disponible			
		No (n=43)	Sí (n=90)	Total (n=133)
Pulmón	No	16 (37,2%)	30 (33,3%)	46 (34,6%)
	Sí	27 (62,8%)	60 (66,7%)	87 (65,4%)
Higado	No	37 (86,0%)	72 (80,0%)	109 (82,0%)
	Sí	6 (14,0%)	18 (20,0%)	24 (18,0%)
Hueso	No	34 (79,1%)	63 (70,0%)	97 (72,9%)
	Sí	9 (20,9%)	27 (30,0%)	36 (27,1%)
Ganglios linfáticos	No	24 (55,8%)	42 (46,7%)	66 (49,6%)
	Sí	19 (44,2%)	48 (53,3%)	67 (50,4%)
Partes blandas	No	33 (76,7%)	82 (91,1%)	115 (86,5%)
	Sí	10 (23,3%)	8 (8,9%)	18 (13,5%)
Piel	No	42 (97,7%)	89 (98,9%)	131 (98,5%)
	Sí	1 (2,3%)	1 (1,1%)	2 (1,5%)
SNC	No	41 (95,3%)	86 (95,6%)	127 (95,5%)
	Sí	2 (4,7%)	4 (4,4%)	6 (4,5%)

SUBGRUPOS PRONÓSTICOS DEL IMDC

El 23.3% fue clasificado dentro del grupo de pronóstico favorable, el 56.4% de pronóstico intermedio y el 20.3% de mal pronóstico.

Tabla 18. Subgrupos pronósticos del IMDC de la población incluida.

Subgrupos IMDC	Muestra AP disponible		
	No (n=43)	Sí (n=90)	Total (n=133)
P. Favorable	12 (27,9%)	19 (21,1%)	31 (23,3%)
P. Intermedio	27 (62,8%)	48 (53,3%)	75 (56,4%)
Mal Pronóstico	4 (9,3%)	23 (25,6%)	27 (20,3%)

27.2.2- CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON EL TRATAMIENTO

NEFRECTOMÍA

En alrededor del 70% de los casos se realizó nefrectomía.

Tabla 19. Porcentaje de nefrectomías en la población incluida.

Nefrectomía	Muestra AP disponible		
	No (n=43)	Sí (n=90)	Total (n=133)
Sí	32 (74,4%)	60 (66,7%)	92 (69,2%)
No	11 (25,6%)	29 (32,2%)	40 (30,1%)

LÍNEA EN LA QUE RECIBIERON EL INHIBIDOR DE MTOR

La mayoría de los pacientes recibieron el inhibidor de mTOR en segunda línea de tratamiento (61.7%) seguidos de aquellos que lo recibieron en tercera línea (21.1%). Solo un 12% de los pacientes fueron tratados con el inhibidor de mTOR en primera línea y un 6% en cuarta línea o posteriores.

Tabla 20. Línea de tratamiento en la que recibieron el imTOR.

Línea en la que reciben el imTOR	Muestra AP disponible		
	No (n=43)	Sí (n=90)	Total (n=133)
1 ^a	3 (7,0%)	12 (13,3%)	15 (11,3%)
2 ^a	29 (67,4%)	53 (58,9%)	82 (61,7%)
3 ^a	10 (23,3%)	18 (20,0%)	28 (21,1%)
4 ^a	1 (2,3%)	7 (7,8%)	8 (6,0%)

CAUSA DE FINALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO

La principal causa de finalización de tratamiento en cualquier línea fue la progresión de la enfermedad seguida de la toxicidad. Ningún paciente finalizó el tratamiento por toxicidad en 4^a línea o sucesivas. En el momento del análisis, un total de 8 (6.0%) pacientes seguían en tratamiento.

Tabla 21. Causa de finalización de tratamiento en cada línea.

Causa fin de tto imTOR	Muestra AP disponible			Total	p = 0,011
	No	Sí	Total		
1ª Línea	Progresión	26 (60,5%)	74 (82,2%)	100 (75,2%)	
	Toxicidad	16 (37,2%)	11 (12,2%)	27 (20,3%)	
	Sigue en tratamiento	0 (0,0%)	2 (2,2%)	2 (1,5%)	
	Otros	1 (2,3%)	3 (3,3%)	4 (3,0%)	
	Total	43 (100,0%)	90 (100,0%)	133 (100,0%)	
2ª Línea	Progresión	35 (81,4%)	67 (82,7%)	102 (82,3%)	
	Toxicidad	7 (16,3%)	8 (9,9%)	15 (12,1%)	
	Sigue en tratamiento	0 (0,0%)	5 (6,2%)	5 (4,0%)	
	Otros	1 (2,3%)	1 (1,2%)	2 (1,6%)	
	Total	43 (100,0%)	81 (100,0%)	124 (100,0%)	
3ª Línea	Progresión	20 (71,4%)	35 (85,4%)	55 (79,7%)	
	Toxicidad	6 (21,4%)	4 (9,8%)	10 (14,5%)	
	Sigue en tratamiento	0 (0,0%)	1 (2,4%)	1 (1,4%)	
	Otros	2 (7,1%)	1 (2,4%)	3 (4,3%)	
	Total	28 (100,0%)	41 (100,0%)	69 (100,0%)	
4ª Línea	Progresión	1 (100,0%)	7 (87,5%)	8 (88,9%)	
	Sigue en tratamiento	0 (0,0%)	1 (12,5%)	1 (11,1%)	
	Total	1 (100,0%)	8 (100,0%)	9 (100,0%)	

27.3- RESPUESTA GLOBAL AL TRATAMIENTO CON IMTOR

La respuesta global a los inhibidores de mTOR en cualquier línea de tratamiento fue: 0.8% respuestas completas, 15.8% respuestas parciales, 39.8% enfermedad estable y 43.6% progresiones.

Tabla 22. Respuesta global al tratamiento con imTOR.

RG tras inicio iMTOs en cualquier línea	Muestra AP disponible		
	No (n=43)	Sí (n=90)	Total (n=133)
RC	0 (0,0%)	1 (1,1%)	1 (0,8%)
RP	6 (14,0%)	15 (16,7%)	21 (15,8%)
EE	23 (53,5%)	30 (33,3%)	53 (39,8%)
PD	14 (32,6%)	44 (48,9%)	58 (43,6%)

27.4- SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL PRIMER TRATAMIENTO EN ENFERMEDAD METASTÁSICA

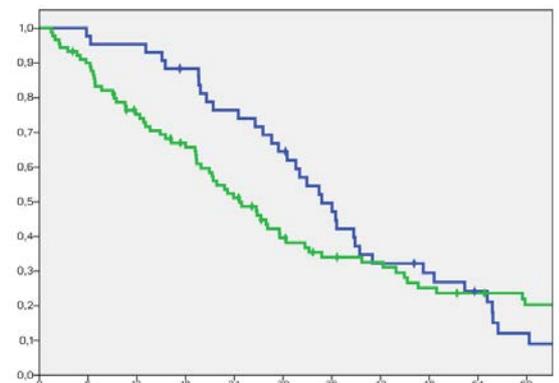
La mediana de supervivencia global desde el inicio del tratamiento de enfermedad metastásica para toda la población fue 29.43 meses (IC 95%, 25.19-33.67 meses).

En el grupo sin muestra disponible la mediana de SG fue 34.76 meses (IC 95%, 29.31-40.21 meses) y para los pacientes con muestra disponible 24.63 meses (IC 95%, 19.05-30.21 meses).

Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas (log-rank test), las curvas parecen separarse al principio a favor de la población cuya muestra no ha sido analizada.

S el mismo análisis de SG para cada grupo pronóstico de la clasificación IMDC según los factores pronósticos presentes en el momento del diagnóstico de enfermedad metastásica.

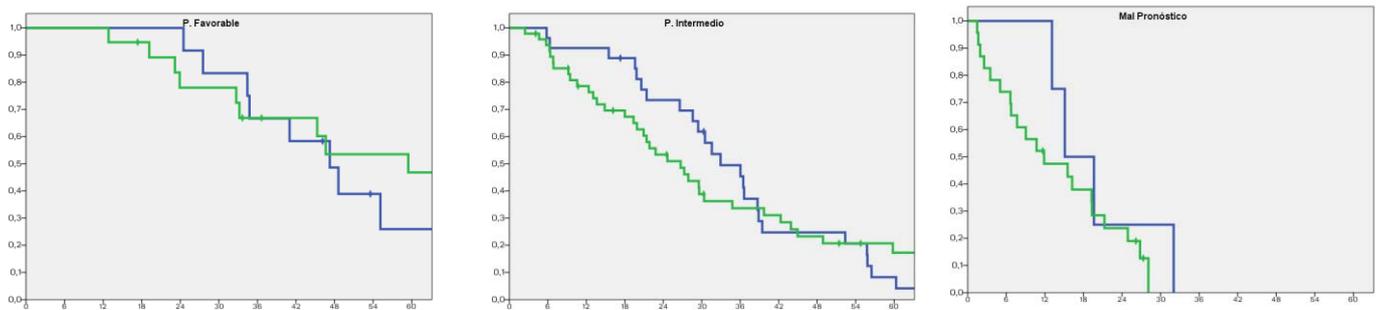
Figura 36. SG desde el inicio del tratamiento para enfermedad metastásica (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra)



En el análisis multivariante no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en SG entre la población analizada y no analizada (HR: 1.11, IC 95%: 0.74 – 1.65) ajustado por el grupo pronóstico.

La SG para los grupos de riesgo favorable, intermedio y mal pronóstico del IMDC fueron de 43.7, 22.2 y 8.7 meses respectivamente.

Figura 37. SG desde el inicio del tratamiento para enfermedad metastásica en los grupos de riesgo favorable, intermedio y mal pronóstico (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra).



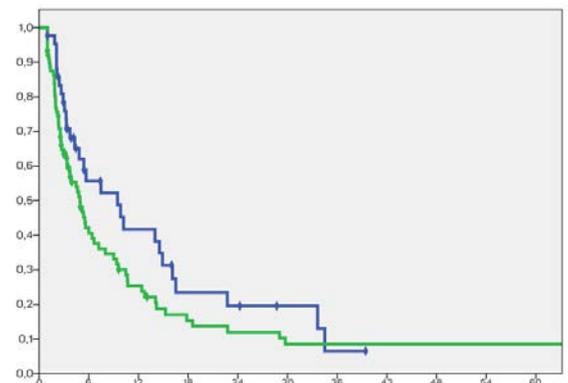
27.5- SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL INICIO DE TRATAMIENTO CON IMTOR

La mediana de supervivencia global desde el inicio del imTOR para toda la población fue 15.13 meses. (IC 95%, 10.65-19.61 meses).

En el grupo sin muestra disponible la mediana de SG desde el inicio del imTOR fue 17.80 meses (IC 95%, 15.55-20.04 meses) y para los pacientes con muestra disponible 10.83 meses (IC 95%, 3.27-18.39 meses).

Igual que pasaba con la SG desde el inicio de tratamiento para enfermedad metastásica, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas (log-rank test), las curvas parecen separarse al principio a favor de la población cuya muestra no ha sido analizada.

Figura 38. SG desde el inicio del tratamiento para enfermedad metastásica (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra).



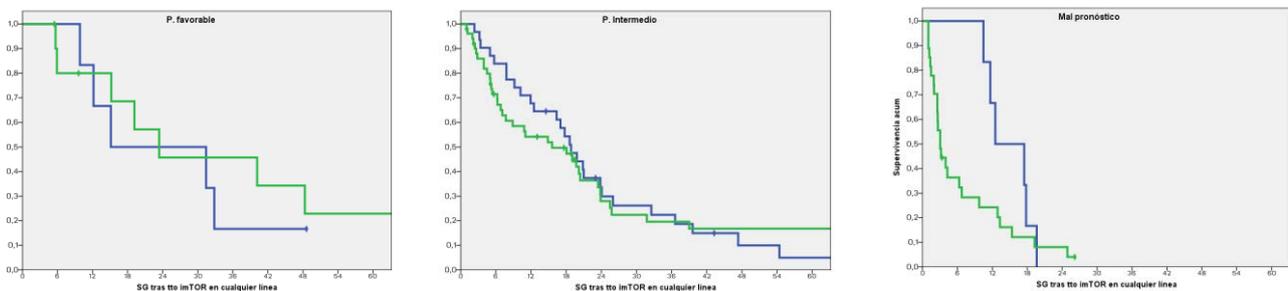
Por ese motivo hacemos el análisis de SG desde el inicio de imTOR, para cada grupo pronóstico de la clasificación IMDC según los factores pronósticos presentes en el momento de administración de imTOR.

Ninguna de estas comparaciones muestra diferencias estadísticamente significativas (log-rank test), aunque las aparentes diferencias parecen deberse al subgrupo de mal pronóstico.

En el análisis multivariante no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en SG entre la población analizada y no analizada (HR: 1.16, IC 95%: 0.77 – 1.73) ajustado por el grupo pronóstico.

Las medianas de SG desde el inicio del imTOR para los grupos pronósticos favorable, intermedio y mal pronóstico fueron 23.4, 18 y 4.3 meses respectivamente, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre la población con o sin muestra disponible.

Figura 39. SG desde el inicio de tratamiento con imTOR en los grupos de riesgo favorable, intermedio y mal pronóstico (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra).



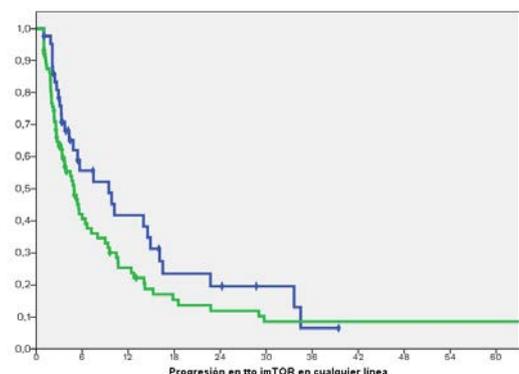
27.6- SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESION DESDE EL INICIO DE IMTOR

Se hace la comparación agrupada por cualquier línea de tratamiento, porque por líneas de tratamiento separadas, no hay eventos suficientes para hacer comparaciones.

La mediana de SLP desde el inicio del imTOR para toda la población fue 5.4 meses (IC 95%, 4.08-6.31 meses) sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre la población con y sin muestra disponible.

En el grupo sin muestra disponible la mediana de SLP desde el inicio del imTOR fue 9.46 meses (IC 95%, 4.00-14.92 meses) y para los pacientes con muestra disponible 4.93 meses (IC 95%, 3.33-6.53 meses).

Figura 40. SLP desde el inicio del tratamiento para enfermedad metastásica (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra).



Por lo tanto, del análisis descriptivo, y de las comparaciones entre el subgrupo de pacientes con y sin muestra disponible para el análisis mutacional, se puede concluir que no existen diferencias significativas entre ambos subgrupos, ni en características clínicas, ni en respuesta ni evolución posterior.

Estos resultados permitirán extrapolar las conclusiones posteriores a la población general de pacientes tratados con imTOR en vida real.

27.7- DESCRIPCIÓN VARIABLES MOLECULARES

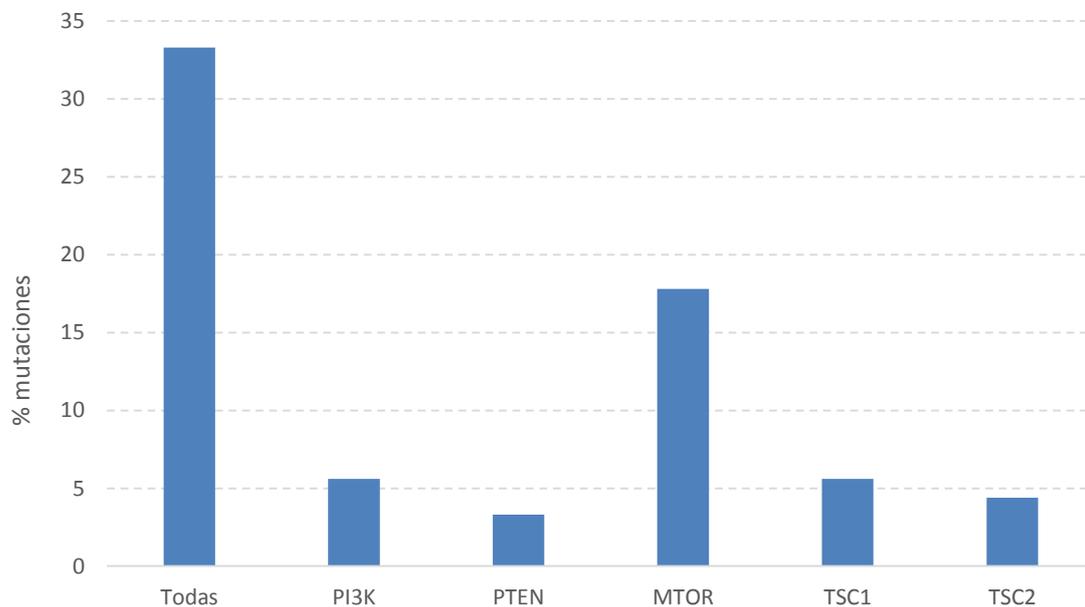
A continuación se describe la frecuencia de mutaciones en los 90 pacientes cuya muestra estuvo disponible para el análisis.

27.7.1- MUTACIONES EN GENES DE LA VÍA mTOR

Dentro de estas alteraciones se incluyen PI3CA (gen de la proteína PI3K), AKT, PTEN, mTOR, TSC1 y TSC2.

En la muestra analizada se identificaron mutaciones en esta vía en el 33% de los pacientes. El 17.8% de las muestras analizadas presentaban una mutación en mTOR, el 5.6% en PIK3CA, el 3.3% en PTEN, 5.6% en TSC1 y 4.4% en TSC2. No se objetivó ninguna mutación en AKT (AKT1, AKT2, AKT3).

Figura 41. Gráfica de frecuencia de mutaciones en genes de la vía mTOR.



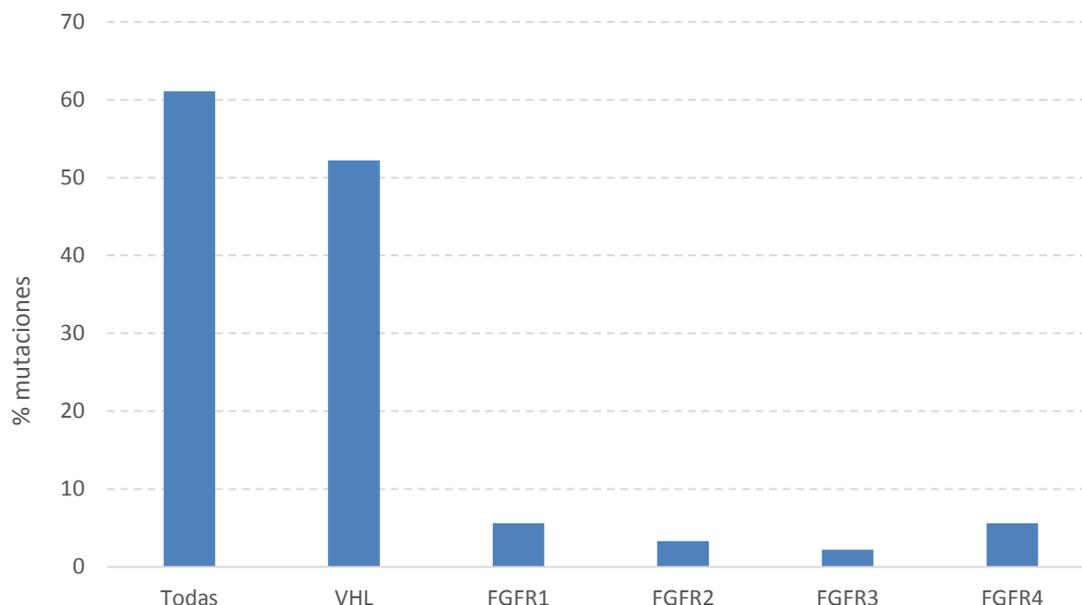
27.7.2- MUTACIONES EN LA VÍA DE LA ANGIOGÉNESIS

Se incluyen en este análisis las mutaciones en VHL, FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4.

De manera global el 61.1% de los pacientes presentaban alguna mutación. La más frecuente fue la mutación en VHL, hallada en el 52.2% de los pacientes.

La frecuencia de mutaciones en FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 fue 5.6%, 3.3%, 2.2% y 5.6% respectivamente.

Figura 42. Frecuencia de mutaciones en genes de la vía de la angiogénesis.



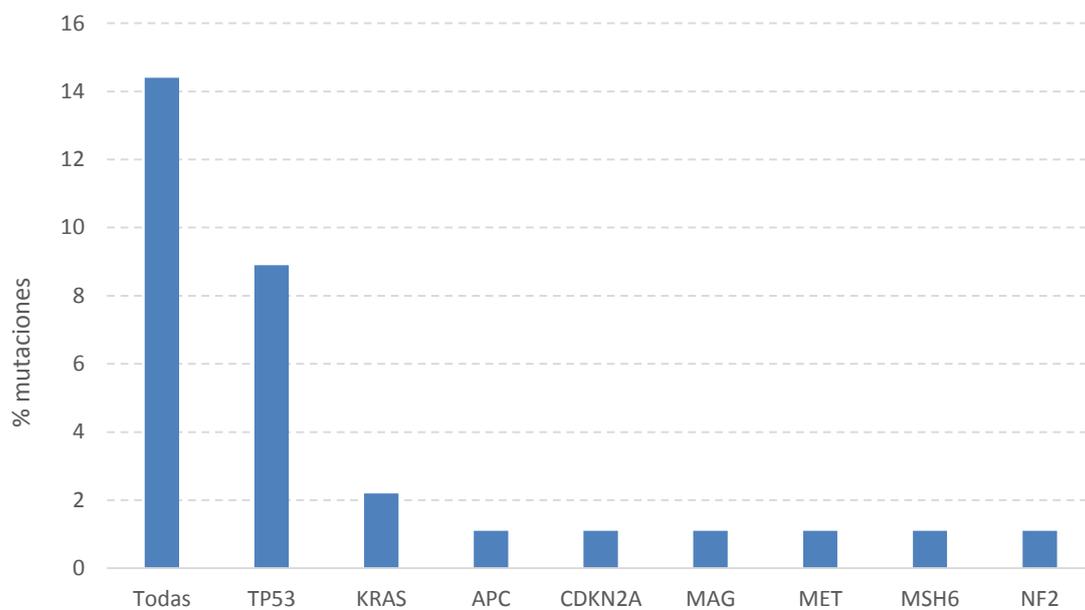
27.7.3- MUTACIONES EN OTROS GENES

Finalmente, se han agrupado el resto de genes que no propiamente de la vía PI3K/AKT/MTOR ni de la vía de la angiogénesis para su análisis.

Se incluyen en este análisis las mutaciones en APC, TP53, CDKN2A, KRAS, MAG, MET, MSH6 y NF2, que se han agrupado de manera artificial como genes de proliferación o ciclo celular.

De manera global se objetivaron mutaciones en el 14.4%, siendo la más prevalente, la mutación en TP53 (8.9%). El resto de mutaciones se observaron cada una solo en un paciente de los 90 analizados (1.1%), excepto KRAS que se observó en dos pacientes (2.2%).

Figura 43. Frecuencia de mutaciones en otros genes.



28. EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA (SGM1)

En este análisis se testa la hipótesis de si la presencia de mutaciones de la vía mTOR (mTOR, TSC1, TSC2, PI3K o PTEN), se asoció con una peor supervivencia global definida como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta la muerte por cualquier causa en presencia de enfermedad tumoral, o fecha del último contacto, en pacientes que recibieron un imTOR en algún momento de su evolución desde este diagnóstico. Se denomina a esta variable SGM1.

Se seleccionan los 90 pacientes en los que se disponía de muestra para el análisis, y se denominan pacientes NOMUT a los pacientes sin mutaciones en esta vía (60 pacientes, 66.5%), y MUT a los pacientes con mutación (30 pacientes, 33.3%).

28.1- SEGUIMIENTO Y RESULTADOS GLOBALES

La estimación de la mediana de seguimiento de la serie completa para esta variable fue de 86.9 meses (IC95%: 34 – 138 meses), 86 m en los pacientes NOMUT (IC95%: 55 – 118), y 86.9 meses en los pacientes MUT (IC95%: 26 – 149). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.891$, log-rank).

En el momento del análisis, habían fallecido 69 pacientes (76.7%), 47 pacientes NOMUT (78.3%) y 22 pacientes MUT (73.3%).

Figura 44. Mediana de seguimiento desde el diagnóstico de enf. metastásica

Mutaciones en mTOR, TSC1, TSC2, PI3K o PTEN	Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
No	86,033	26,735	33,632	138,434
Sí	86,867	30,934	26,236	147,497
Global	86,867	16,978	53,589	120,144

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

28.2- SUPERVIVENCIA GLOBAL (SGM1) NO AJUSTADA

Las medianas de SGM1 (meses) en el grupo con y sin mutaciones, y en la serie global se expresan en la tabla adjunta.

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.946$, log-rank). El Hazard Ratio no ajustado para SGM1 (MUT/NOMUT) fue de 1.02 (IC95%: 0.61 – 1.69).

Ambos resultados contradicen lo esperado de acuerdo con la hipótesis nula H_0 , que se estableció como un HR SGM1 (MUT/NOMUT) > 1 .

Sin embargo, este resultado puede estar artefactado por la existencia de potenciales factores de confusión o de variables modificadoras del efecto que pudieran enmascarar una diferencia entre ambos grupos de estudio.

Para estimar el valor del HR ajustado por la presencia de estos potenciales factores, se construyó un modelo multivariante de regresión de Cox de tipo explicativo.

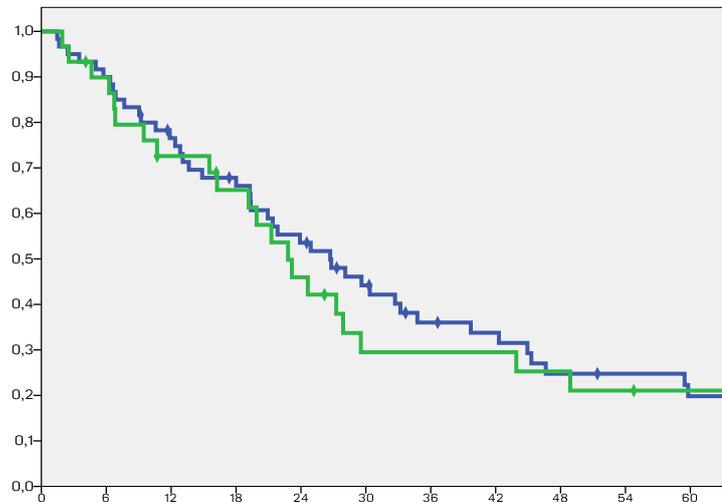
Cabe destacar la presencia de 4 pacientes largos respondedores a los imTOR que tuvieron SGM1 de 8 años o superiores. Uno de estos 4 pacientes presentaba una mutación en mTOR y los otros 3 en p53, dos de los cuales también presentaban mutación en PTEN.

Tabla 23. Mediana de SGM1.

Mutaciones en mTOR, TSC1, TSC2, PI3K o PTEN	Mediana de SGM1			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
No	26,700	4,606	17,673	35,727
Sí	22,800	2,958	17,003	28,597
Global	24,633	2,847	19,052	30,214

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Figura 45. SGM1 para el grupo con mutaciones (verde) y sin mutaciones (azul) en genes de la vía mTOR.



28.3- MODELO AJUSTADO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE SGM1

IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES VARIABLES DE CONFUSIÓN

A continuación se describe la distribución de las principales potenciales variables de confusión entre ambos grupos.

VARIABLES CLÍNICAS

Figura 46. Tablas de contingencia para todas las variables clínicas analizadas como potenciales variables de confusión.

Tabla de contingencia

Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		No	Sí	Total
Sexo	Hombre	41	23	64
		68,3%	76,7%	71,1%
Mujer		19	7	26
		31,7%	23,3%	28,9%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		No	Sí	Total
Edad65	65 años o menos	33	18	51
		55,0%	60,0%	56,7%
Mayor de 65 años		27	12	39
		45,0%	40,0%	43,3%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		No	Sí	Total
Edad70	70 años o menos	44	21	65
		73,3%	70,0%	72,2%
Mayor de 70 años		16	9	25
		26,7%	30,0%	27,8%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		No	Sí	Total
Edad75	75 años o menos	54	24	78
		90,0%	80,0%	86,7%
Mayor de 75 años		6	6	12
		10,0%	20,0%	13,3%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		No	Sí	Total
Histología agrupada	Cels. claras o no especificada	48	20	68
		80,0%	66,7%	75,6%
	No Cels. claras o mixtos	12	10	22
	20,0%	33,3%	24,4%	
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		No	Sí	Total
Componente sarcomatoide	No	54	27	81
		90,0%	90,0%	90,0%
Sí		6	3	9
		10,0%	10,0%	10,0%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		No	Sí	Total
Grado histologico-FURHMAN	No	9	4	13
		15,3%	13,3%	14,6%
	G1	6	2	8
		10,2%	6,7%	9,0%
	G2	9	3	12
		15,3%	10,0%	13,5%
	G3	17	11	28
		28,8%	36,7%	31,5%
	G4	18	9	27
		30,5%	30,0%	30,3%
desconocido		0	1	1
		0,0%	3,3%	1,1%
	Total	59	30	89
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		No	Sí	Total
T del tumor 1º al dco inicial	T1a	4	0	4
		6,7%	0,0%	4,4%
	T1b	8	3	11
		13,3%	10,0%	12,2%
	T2a	6	3	9
		10,0%	10,0%	10,0%
	T2b	5	4	9
		8,3%	13,3%	10,0%
	T3a	22	12	34
		36,7%	40,0%	37,8%
T3b		9	4	13
		15,0%	13,3%	14,4%
T4		6	4	10
		10,0%	13,3%	11,1%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia N del tumor 1º al dco inicial * Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
N del tumor 1º al dco inicial	N0	47 78,3%	22 73,3%	69 76,7%
	N1	12 20,0%	3 10,0%	15 16,7%
	N2	1 1,7%	4 13,3%	5 5,6%
	N3	0 0,0%	1 3,3%	1 1,1%
Total		60 100,0%	30 100,0%	90 100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
M al dco inicial	M0	34 56,7%	15 50,0%	49 54,4%
	M1	26 43,3%	15 50,0%	41 45,6%
Total		60 100,0%	30 100,0%	90 100,0%

(p = 0.043, Chi-cuadrado de Pearson)

Tabla de contingencia Nefrectomía * Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Nefrectomía	Sí	39 66,1%	21 70,0%	60 67,4%
	No	20 33,9%	9 30,0%	29 32,6%
Total		59 100,0%	30 100,0%	89 100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Pulmón L1	No	20 33,3%	10 33,3%	30 33,3%
	Sí	40 66,7%	20 66,7%	60 66,7%
Total		60 100,0%	30 100,0%	90 100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Hígado L1	No	48 80,0%	24 80,0%	72 80,0%
	Sí	12 20,0%	6 20,0%	18 20,0%
Total		60 100,0%	30 100,0%	90 100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Hueso L1	No	46 76,7%	17 56,7%	63 70,0%
	Sí	14 23,3%	13 43,3%	27 30,0%
Total		60 100,0%	30 100,0%	90 100,0%

(p = 0.051)

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Ganglios Linfáticos L1	No	31 51,7%	11 36,7%	42 46,7%
	Sí	29 48,3%	19 63,3%	48 53,3%
Total		60 100,0%	30 100,0%	90 100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Partes blandas L1	No	55 91,7%	27 90,0%	82 91,1%
	Sí	5 8,3%	3 10,0%	8 8,9%
Total		60 100,0%	30 100,0%	90 100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Piel o TCS L1	No	60 100,0%	29 96,7%	89 98,9%
	Sí	0 0,0%	1 3,3%	1 1,1%
Total		60 100,0%	30 100,0%	90 100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
SNC L1	No	57 95,0%	29 96,7%	86 95,6%
	Sí	3 5,0%	1 3,3%	4 4,4%
Total		60 100,0%	30 100,0%	90 100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Mets suprarrenales 1ºL	No	55	29	84
		91,7%	96,7%	93,3%
	Sí	5	1	6
		8,3%	3,3%	6,7%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Mets pancreáticas 1ºL	No	57	30	87
		95,0%	100,0%	96,7%
	Sí	3	0	3
		5,0%	0,0%	3,3%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Mets renales u otras vísceras 1ºL	No	57	30	87
		95,0%	100,0%	96,7%
	Sí	3	0	3
		5,0%	0,0%	3,3%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Recaida local o retroperitoneo 1ºL	No	59	28	87
		98,3%	93,3%	96,7%
	Sí	1	2	3
		1,7%	6,7%	3,3%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Mets en pleura, peritoneo o pericardio 1ºL	No	57	27	84
		95,0%	90,0%	93,3%
	Sí	3	3	6
		5,0%	10,0%	6,7%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Mets viscerales no pulmonares en L1	No	35	16	51
		58,3%	53,3%	56,7%
	Sí	25	14	39
		41,7%	46,7%	43,3%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Subgrupos IMDC	P. Favorable	15	4	19
		25,0%	13,3%	21,1%
	P. Intermedio	30	18	48
		50,0%	60,0%	53,3%
	Mal Pronóstico	15	8	23
		25,0%	26,7%	25,6%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

DISTRIBUCIÓN DE OTRAS MUTACIONES

Figura 47. Tablas de contingencia para la variable otras mutaciones analizadas como potenciales variables de confusión

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Mutaciones VHL o FGFR	No	22	13	35
		36,7%	43,3%	38,9%
	Sí	38	17	55
		63,3%	56,7%	61,1%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Mutaciones en FGFR1, FGFR2, FGFR3 o FGFR4	No	50	26	76
		83,3%	86,7%	84,4%
	Sí	10	4	14
		16,7%	13,3%	15,6%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia

		Mutaciones en mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN		
		No	Sí	Total
Otras mutaciones relacionadas con el ciclo celular	No	51	26	77
		85,0%	86,7%	85,6%
	Sí	9	4	13
		15,0%	13,3%	14,4%
Total		60	30	90
		100,0%	100,0%	100,0%

28.4- MODELO MULTIVARIANTE EXPLICATIVO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VIA MTOR SOBRE SGM1

Se construyó un modelo multivariante de regresión de Cox de tipo explicativo para ajustar el valor del HR de SGM1 (MUT/NOMUT).

Ante la ausencia de desajustes relevantes entre ambos grupos, se construyó un MODELO INICIAL que incluyó las siguientes variables consideradas clínicamente relevantes en el momento del diagnóstico de enfermedad metastásica, y potenciales factores de confusión o modificadoras del efecto:

- Variables demográficas: sexo y edad > 75 años.
- Variables histológicas: subtipo histológico y presencia de componente sarcomatoide.
- Presencia de metástasis viscerales no pulmonares.
- Grupo pronóstico de la clasificación internacional IMDC en el momento del diagnóstico. Esta clasificación está validada internacionalmente e incorpora características del estado general del paciente (ECOG), intervalo desde el diagnóstico hasta el desarrollo de metástasis, y valores de calcio, hemoglobina, plaquetas y neutrófilos en el momento de diagnóstico de enfermedad metastásica.
- Administración o no de antiangiogénicos en primera línea.
- Línea en la que se administró el imTOR que se incluirán como 4 variables independientes para analizar el efecto de recibir imTOR en primera, segunda, tercera o sucesivas líneas, ya que algunas de ellas tienen distribución desigual entre ambos grupos, de forma estadísticamente significativa.
- Necesidad de ajuste dosis durante el tratamiento.
- Progresión de la enfermedad como mejor respuesta obtenida con el tratamiento.
- Presencia de otras mutaciones en la vía angiogénica, y relacionadas con la proliferación celular.

Tal como muestra la figura 49, la incorporación de estas variables mejora de forma estadísticamente significativa la verosimilitud del modelo respecto a un modelo sin variables de control.

Figura 49. Gráfica del modelo inicial con todas las variables de ajuste para SGM1.

Modelo inicial con todas las variables de ajuste ^a											
Modelo no ajustado	-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior			
		Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	
	513,347	463,000	57,059	17	,000	50,405	17	,000	50,405	17	,000
a. Bloque inicial número 1. Método = Introducir											
Modelo inicial ^b											
	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)				
							Inferior	Superior			
Mutaciones en vía mTOR	-.254	,340	,568	1	,455	,776	,399	1,510			
Sexo	-.406	,334	1,479	1	,224	,666	,346	1,282			
Edad > 75 años	1,016	,391	6,754	1	,009	2,763	1,284	5,945			
Células claras vs no claras	-.325	,465	,487	1	,485	,723	,290	1,799			
Componente sarcomatoide	1,091	,496	4,835	1	,028	2,978	1,126	7,877			
Met. viscerales no pulmonares	,273	,313	,762	1	,383	1,314	,712	2,424			
Grupo pronóstico IMDC			11,998	2	,002						
Intermedio vs Bueno	,402	,453	,786	1	,375	1,494	,615	3,631			
Malo vs Bueno	1,504	,505	8,859	1	,003	4,501	1,671	12,120			
Antiangiogenico en 1º línea	-.070	,570	,015	1	,902	,932	,305	2,849			
imTOR en 1º línea	2,843	,906	9,836	1	,002	17,160	2,904	101,391			
imTOR en 2º línea	2,103	,702	8,972	1	,003	8,195	2,069	32,455			
imTOR en 3º línea	1,365	,703	3,772	1	,052	3,917	,988	15,537			
imTOR en 4º línea				0 ^a							
Reduccion de dosis imTOR	,127	,324	,152	1	,696	1,135	,601	2,143			
Progresión como mejor respuesta	1,820	,385	22,292	1	,000	6,170	2,899	13,132			
Mutación en VHL	-.404	,286	1,989	1	,158	,668	,381	1,170			
Mutación en FGFR	,349	,371	,880	1	,348	1,417	,684	2,935			
Mutación en genes de proliferación	-1,006	,434	5,370	1	,020	,366	,156	,856			

a. Se redujo un grado de libertad debido a que las covariables son constantes o linealmente dependientes
b. Covariables linealmente dependientes o constantes IMTOR4L = 1 - IMTOR1L - IMTOR2L - IMTOR3L ;

En esta primera aproximación, el coeficiente B negativo de la variable “Mutaciones en la vía mTOR” indica que, en pacientes tratados con imTOR, la presencia de mutaciones ejerce un efecto de reducción de la tasa instantánea de muerte, (HR MUT/NOMUT = 0.78), aunque de forma no estadísticamente significativa (IC95%: 0.40 – 1.51, p = 0.455). Este resultado no permite descartar la H0 del estudio, pero aporta argumentos consistentes en contra de ella (H0 = HR mutación / no mutación > 1).

En la tabla se reflejan en verde las variables de confusión con influencia estadísticamente significativa en la creación del modelo explicativo del comportamiento de SGM1 en función de la presencia de imTOR.

Para estimar con mayor exactitud y precisión el valor del HR, se construyó un modelo explicativo ajustado y jerárquico que tuviera en cuenta las posibles interacciones de otras variables en la estimación del efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre el HR de SGM1.

Para ello, se construyó un MODELO MÁXIMO INICIAL incorporando los términos de interacción de primer orden con la variable mutaciones de mTOR. La incorporación de los términos de interacción mejoró aún más la verosimilitud del modelo:

Figura 50. Modelo inicial con términos de interacción de primer orden para SGM1.

-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior		
	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.
418,279	109,614	33	,000	95,068	33	,000	95,068	33	,000

A continuación se realizó un análisis de estas posibles interacciones de primer orden mediante la realización de un “chunk test”. Se detectaron así tres variables con interacciones significativas en presencia de mutaciones en la vía mTOR:

Figura 51. Interacciones significativas con mutaciones de mTOR para SGM1.

Variable de interacción	Chi-cuadrado de la pérdida	gl	Sig.
Sexo	9,568	1	,002
imTOR en 1ª línea	4,932	1	,026
Mutación en FGFR	5,479	1	,019

Con estos resultados se construyó el siguiente MODELO DE REFERENCIA para valorar el efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre SGM1, que incorpora los términos de interacción significativos, y prescinde de las variables de confusión no relevantes, y cuya verosimilitud sigue siendo estadísticamente significativa:

Figura 52. Modelo de referencia para valorar el efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre SGM1.

Verosimilitud del modelo de referencia ^a										
-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)				Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior		
	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	
447,293	79,986	17	,000	66,054	17	,000	66,054	17	,000	

a. Bloque inicial número 1. Método = Introducir

Modelo de referencia para estudio del efecto de mutaciones mTOR sobre SGM1										
	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)			
							Inferior	Superior		
Mutación en vía mTOR	-.029	,361	,006	1	,937	,972	,479	1,970		
Sexo	-.031	,374	,007	1	,934	,970	,466	2,019		
Edad > 75 años	1,071	,402	7,076	1	,008	2,917	1,325	6,420		
Componente sarcomatoide	1,090	,522	4,370	1	,037	2,975	1,070	8,269		
Grupo pronóstico IMDC			21,903	2	,000					
Intermedio vs Bueno	,951	,380	6,263	1	,012	2,589	1,229	5,453		
Malo vs Bueno	2,129	,459	21,487	1	,000	8,404	3,416	20,671		
im TOR en 1ª línea	,751	,736	1,042	1	,307	2,119	,501	8,958		
Progresión como mejor respuesta	1,074	,333	10,411	1	,001	2,928	1,525	5,622		
Mutación en VHL	-.489	,281	3,025	1	,082	,613	,353	1,064		
Mutación en FGFR	1,095	,427	6,557	1	,010	2,988	1,293	6,906		
Mutación en genes de proliferación	-.470	,367	1,643	1	,200	,625	,305	1,282		
Mutación imTOR * sexo	-1,756	,919	3,651	1	,056	,173	,028	1,046		
Mutación imTOR * imTOR en 1ª línea	1,906	,860	4,908	1	,027	6,723	1,246	36,286		
Mutación imTOR * Mutación en FGFR	-1,793	1,056	2,886	1	,089	,166	,021	1,317		
Sexo * imTOR en 1ª línea	-.755	1,006	,563	1	,453	,470	,065	3,376		
Sexo * Mutación en FGFR	-.429	1,015	,178	1	,673	,651	,089	4,764		
imTOR en 1ª línea * Mutación en FGFR	,301	1,679	,032	1	,858	1,351	,050	36,304		

Este modelo de referencia es el que mejor ajusta el efecto de las mutaciones en la vía mTOR sobre la SGM1, e incorpora todos los términos de confusión y modificadores del efecto posibles. Se intentaron ajustar otros MODELOS DE REFERENCIA REDUCIDOS, pero ninguno estimaba el valor de HR con mayor precisión que el modelo de referencia, que será, por tanto, el MODELO EXPLICATIVO FINAL.

De nuevo se observa en este modelo explicativo final un coeficiente B negativo de la variable “Mutaciones en la vía mTOR”, que indica que, en pacientes tratados con imTOR, la presencia de mutaciones ejerce un efecto de reducción de la tasa instantánea de muerte, (HR MUT/NOMUT = 0.972), aunque de forma no estadísticamente significativa (IC95%: 0.48 – 1.97, p = 0.937. Este resultado

no permite descartar la H0 del estudio, pero aporta argumentos consistentes en contra de ella ($H_0 = HR \text{ mutación} / \text{no mutación} > 1$).

Cuando se sustituye en este modelo la variable general “Mutación en la vía mTOR” por las mutaciones específicas, solo la presencia de mutación en TSC2 alcanza significación por sí sola, pero este dato debe considerarse solo informativo, pues el modelo se ha construido con las mutaciones de forma conjunta.

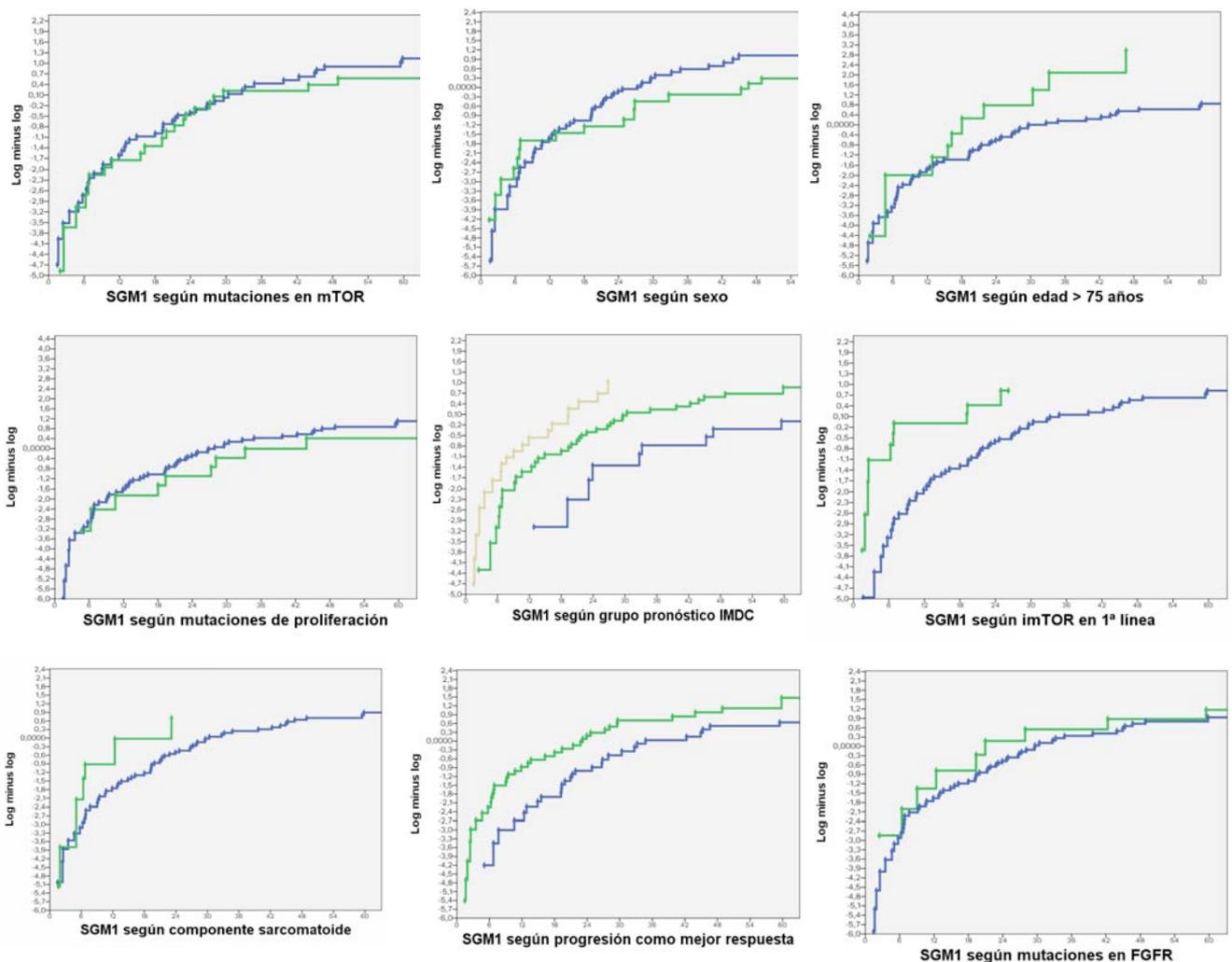
Figura 53. Significación estadística de cada mutación específica.

Mutación en vía mTOR	significación
MTOR	,234
PIK3CA	,809
PTEN	,563
TSC1	,809
TSC2	,037

28.4.1- COMPROBACIÓN DEL SUPUESTO DE RIESGOS PROPORCIONALES

La representación gráfica de las curvas LML (log minus log): $\text{Ln} [-\text{LnSGM1}(t)]$, no demostró vulneración del principio de riesgos proporcionales de forma importante en las variables incluidas en el modelo.

Figura 54 Curvas LML de riesgos proporcionales de las variables incluidas para SGM1.



28.4.2- CONCLUSIÓN

A la vista de los resultados anteriores, podemos concluir que, en pacientes tratados con imTOR, utilizando un modelo multivariante explicativo, que incluye todas las variables de confusión y modificadoras del efecto relevantes desde el punto de vista clínico y molecular, no se ha podido demostrar un incremento significativo del riesgo de muerte desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica asociado a la presencia de mutaciones en la vía mTOR, como presuponía la H0, pero tampoco descartarlo de forma definitiva (HR MUT/NOMUT = 0.972, IC95%: 0.48 – 1.97, p = 0.937).

Sin embargo, los datos sugieren que el riesgo de muerte desde el diagnóstico de M1 es muy similar entre ambos grupos de pacientes, con un HR próximo a 1. Este resultado contradice el estado actual del conocimiento previo (H0), de que las mutaciones mTOR se asocian con un incremento del riesgo de muerte, y podría ser explicado porque todos los pacientes del estudio habían recibido inhibidores de mTOR, lo que podría interpretarse a su vez como un dato indirecto de eficacia de esos fármacos en pacientes con mutaciones en esta vía.

Estos datos no son extrapolables a la población de pacientes con carcinoma renal metastásico que no han recibido tratamiento con imTOR.

29. EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL INICIO DEL TRATAMIENTO CON imTOR (SGMT)

Debido a que los pacientes recibieron tratamiento con imTOR en diferentes líneas, se decidió analizar también la supervivencia de los pacientes desde el momento en que empezaron el tratamiento con imTOR, que es cuando se producirá teóricamente el efecto beneficioso del fármaco sobre el riesgo asociado a las mutaciones.

En este análisis se testó la hipótesis de si la presencia de mutaciones de la vía mTOR (mTOR, TSC1, TSC2, PI3K o PTEN), se asociaba con una peor supervivencia global, definida como el tiempo transcurrido desde el inicio de un tratamiento con imTOR hasta la muerte por cualquier causa en presencia de enfermedad tumoral o fecha del último contacto, en pacientes que recibieron un imTOR en algún momento de su evolución desde este diagnóstico. Se denomina a esta variable SGMT.

29.1- SEGUIMIENTO Y RESULTADOS GLOBALES

La estimación de la mediana de seguimiento de la serie para esta variable fue de 85.2 meses (IC95%: 65 – 105 meses), 85 m en los pacientes NOMUT, y 73 meses en los pacientes MUT. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.638$, log-rank).

En el momento del análisis, habían fallecido 69 pacientes (76.7%), 47 pacientes NOMUT (78.3%) y 22 pacientes MUT (73.3%).

29.2- SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL INICIO DEL TRATAMIENTO CON imTOR (SGMT) NO AJUSTADA

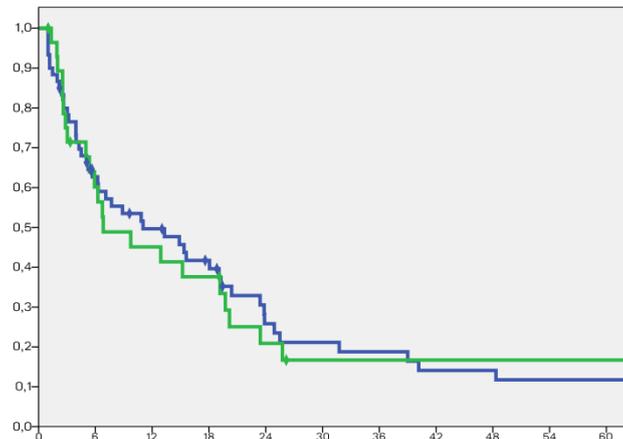
Las medianas de SGMT (meses) en el grupo con y sin mutaciones, y en la serie global se expresan en la tabla adjunta.

Tabla 24. SGMT mediana en función de la presencia o no de mutaciones en la vía mTOR.

Mediana se SGimTOR				
VIAMTOR	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
No	11,033	4,389	2,431	19,635
Sí	6,833	4,234	,000	15,133
Global	10,833	3,857	3,274	18,392

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Figura 55. Gráfica de SGMT para el grupo con mutaciones (verde) y sin mutaciones (azul) en genes de la vía mTOR



No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.996$, log-rank).

El HR no ajustado para SGMT (MUT/NOMUT) fue de 1.01 (IC95%: 0.60 – 1.66).

Ambos resultados contradicen lo esperado de acuerdo con la hipótesis nula H_0 , que establecimos como un HR SGMT (MUT/NOMUT) > 1 .

Sin embargo, este resultado puede estar artefactado por la existencia de potenciales factores de confusión o de variables modificadoras del efecto que pudieran enmascarar una diferencia entre ambos grupos de estudio.

Para estimar el valor del HR ajustado por la presencia de estos potenciales factores, se construyó un modelo multivariante de regresión de Cox de tipo explicativo, de modo similar a como se hizo en el apartado anterior.

29.3- MODELO AJUSTADO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE SGMT

IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES VARIABLES DE CONFUSIÓN

Se usaron las mismas variables empleadas en el análisis anterior.

Para la variable de pertenencia al grupo pronóstico de la clasificación IMDC se usaron en cada paciente los factores presentes en el momento del inicio del tratamiento con imTOR.

29.4- MODELO MULTIVARIANTE EXPLICATIVO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE SGMT

Se construyó un modelo multivariante de regresión de Cox de tipo explicativo para ajustar el valor del HR de SGMT (MUT/NOMUT).

Ante la ausencia de desajustes relevantes entre ambos grupos, se construyó un MODELO INICIAL que incluyó las mismas variables consideradas clínicamente relevantes que se usaron en el modelo previo desde el momento del diagnóstico de enfermedad metastásica, y potenciales factores de confusión o modificadoras del efecto.

También aquí, la incorporación de estas variables mejora de forma estadísticamente significativa la verosimilitud del modelo respecto a un modelo sin variables de control:

Figura 56. Gráfica del modelo inicial con todas las variables de ajuste para SGMT

Modelo no ajustado		Modelo inicial con todas las variables de ajuste ^a									
-2 log de la verosimilitud		Overall (score)		Change From Previous Step			Change From Previous Block				
513,404		-2 Log Likelihood	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
		451,234	69,908	17	,000	62,171	17	,000	62,171	17	,000

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Modelo inicial para SGMT ^b										
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	IC 95% para Exp(B)		Lower	Upper
Mutaciones de mTOR	-,127	,303	,177	1	,674	,880	,486	1,595		
Sexo	-,419	,319	1,724	1	,189	,657	,352	1,230		
Edad > 75 aos	1,037	,396	6,863	1	,009	2,821	1,299	6,130		
Cles. claras vs no claras	-,275	,397	,479	1	,489	,760	,349	1,654		
Componente sarcomatoide	,682	,518	1,732	1	,188	1,978	,716	5,465		
Mets viscerales no pulmonares	-,050	,312	,026	1	,872	,951	,516	1,752		
Grupo pronóstico IMDC			16,487	2	,000					
Intermedio vs Bueno	-,060	,484	,015	1	,901	,942	,365	2,430		
Malo vs Bueno	1,303	,531	6,015	1	,014	3,681	1,299	10,432		
Antiangiogénico en 1ª línea	,450	,589	,585	1	,444	1,569	,495	4,977		
imTOR en 1ª línea	1,842	,835	4,863	1	,027	6,309	1,227	32,429		
imTOR en 2ª línea	1,644	,718	5,247	1	,022	5,177	1,268	21,141		
imTOR en 3ª línea	1,838	,716	6,597	1	,010	6,283	1,546	25,545		
imTOR en 4ª línea				0 ^a						
Reducción de dosis de imTOR	,003	,320	,000	1	,993	1,003	,536	1,876		
Progresión como mejor respuesta	1,894	,381	24,699	1	,000	6,646	3,149	14,028		
Mutación VHL	,026	,294	,008	1	,929	1,027	,577	1,826		
Mutación FGFR	,360	,368	,956	1	,328	1,433	,697	2,948		
Mutación en genes de proliferación	-,939	,401	5,489	1	,019	,391	,178	,858		

a. Se redujo un grado de libertad porque las variables son constantes o linealmente independientes

b. Covariables linealmente independientes: IMTOR4L = 1 - IMTOR1L - IMTOR2L - IMTOR3L;

(Se reflejan en verde las variables de confusión con influencia estadísticamente significativa en la creación del modelo explicativo del comportamiento de SGMT en función de la presencia de imTOR.)

De nuevo en este enfoque de SGMT, el coeficiente B negativo de la variable “Mutaciones en la vía mTOR”, indica que, en pacientes tratados con imTOR, la presencia de mutaciones ejerce un efecto de reducción de la tasa instantánea de muerte, (HR MUT/NOMUT = 0.88), aunque de forma no estadísticamente significativa (IC95%: 0.49 – 1.6, p = 0.674). Este resultado no permite descartar la H0 del estudio, pero aporta un nuevo argumento empírico en contra de ella (H0 = HR mutación / no mutación > 1).

Para estimar con mayor exactitud y precisión el valor del HR, se construyó un modelo explicativo ajustado y jerárquico que tuviera en cuenta las posibles interacciones de otras variables en la estimación del efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre el HR de SGM1.

Para ello, se construyó un MODELO MÁXIMO INICIAL incorporando los términos de interacción de primer orden con la variable mutaciones de mTOR. La incorporación de los términos de interacción mejoró aún más la verosimilitud del modelo:

Figura 57. Modelo inicial con términos de interacción de primer orden para SGMT.

-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior		
	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.
439,062	89,229	32	,000	74,342	32	,000	74,342	32	,000

a. Bloque inicial número 1. Método = Introducir

A continuación se realizó un análisis de estas posibles interacciones de primer orden mediante la realización de un “chunk test”. Únicamente se detectó interacción significativa de la presencia de mutaciones en la vía mTOR con la variable sexo:

Figura 58. Interacciones significativas con mutaciones de mTOR para SGMT

Interacciones significativas con imTOR			
Variable de interacción	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 16 VIAMTOR*Sexo	5,289	1	,021

Con estos resultados se construyó el siguiente MODELO DE REFERENCIA para valorar el efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre SGMT, que incorpora los términos de interacción significativos, prescinde de las variables de confusión no relevantes, y cuya verosimilitud sigue siendo estadísticamente significativa:

Figura 59. Modelo de referencia para valorar el efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre SGMT.

Verosimilitud del modelo de referencia^a

-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior		
	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.
449,979	71,499	13	,000	63,426	13	,000	63,426	13	,000

a. Bloque inicial número 1. Método = Introducir

Modelo de referencia

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
Mutación en vía mTOR	,165	,321	,264	1	,607	1,179	,629	2,211
Sexo	,148	,341	,187	1	,665	1,159	,594	2,261
Edad > 75 años	1,053	,385	7,490	1	,006	2,866	1,348	6,092
Grupo pronóstico IMDC			23,422	2	,000			
Intermedio vs Bueno	,454	,480	,896	1	,344	1,575	,615	4,036
Malo vs Bueno	1,859	,517	12,948	1	,000	6,419	2,332	17,671
imTOR en 1ª L	1,664	,753	4,885	1	,027	5,281	1,207	23,096
imTOR en 2ª L	1,670	,643	6,733	1	,009	5,310	1,505	18,741
imTOR en 3ª L	1,901	,693	7,530	1	,006	6,695	1,722	26,033
Progresión como mejor respuesta	1,802	,348	26,795	1	,000	6,060	3,063	11,989
Mutación en VHL	-,086	,296	,084	1	,772	,918	,513	1,640
Mutación en FGFR	,433	,354	1,497	1	,221	1,541	,771	3,082
Mutación en genes de proliferación	-1,088	,392	7,692	1	,006	,337	,156	,727
Interacción mutación vía mTOR y sexo	-1,641	,757	4,704	1	,030	,194	,044	,854

Este modelo de referencia es el que mejor ajusta el efecto de las mutaciones en la vía mTOR sobre la SGMT, e incorpora todos los términos de confusión y modificadores del efecto posibles. Se intentaron ajustar otros MODELOS DE REFERENCIA REDUCIDOS, pero ninguno estimaba el valor de HR con mayor precisión que el modelo de referencia, que será por tanto nuestro MODELO EXPLICATIVO FINAL.

En este modelo se obtiene un coeficiente B positivo de la variable “Mutaciones en la vía mTOR”, que indica que, en este grupo de pacientes tratados con imTOR, la ausencia de mutaciones aumenta el riesgo de muerte, (HR MUT/NOMUT = 1.18), pero de forma no estadísticamente significativa (IC95%: 0.63 – 2.21, p = 0.607), lo que también contradice la H0 del estudio.

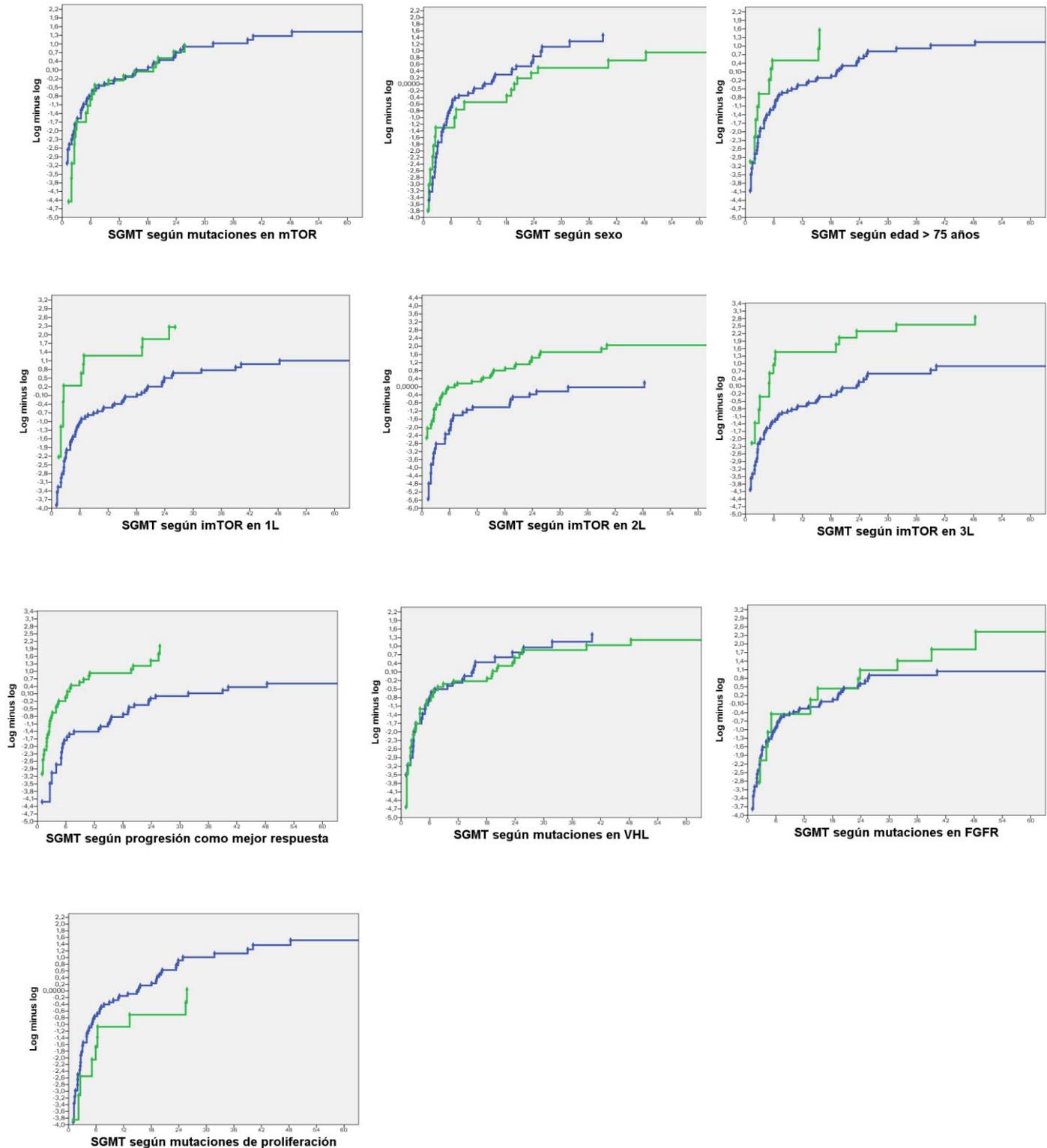
Cuando se sustituye en este modelo la variable general “Mutación en la vía mTOR” por las mutaciones específicas, solo la presencia de mutación en mTOR alcanza significación por sí sola, pero este dato debe considerarse solo informativo, pues el modelo se ha construido con las mutaciones de forma conjunta.

Mutación en vía mTOR	
	Sig.
MTOR	,036
PIK3CA	,219
PTEN	,766
TSC1	,653
TSC2	,139

29.5- COMPROBACIÓN DEL SUPUESTO DE RIESGOS PROPORCIONALES

La representación gráfica de las curvas LML (log-minus-log): $\text{Ln} [-\text{LnSGMT}(t)]$, no demostró vulneración del principio de riesgos proporcionales de forma importante en las variables incluidas en el modelo.

Figura 60. Curvas LML de riesgos proporcionales de las variables incluidas para SGMT.



29.6- CONCLUSIONES

A la vista de los resultados anteriores, podemos concluir que, en pacientes tratados con imTOR, utilizando un modelo multivariante explicativo, que incluye todas las variables de confusión y modificadoras del efecto relevantes desde el punto de vista clínico y molecular, no se ha podido demostrar un incremento significativo del riesgo de muerte desde el inicio de tratamiento con imTOR, asociado a la presencia de mutaciones en la vía mTOR.

Este resultado contradice el estado actual del conocimiento previo (H0), de que las mutaciones mTOR se asocian con un incremento del riesgo de muerte, y podría ser explicado porque todos los pacientes del estudio habían recibido inhibidores de mTOR, lo que podría interpretarse a su vez como un dato indirecto de eficacia de esos fármacos en pacientes con mutaciones en esta vía. Estos datos no son extrapolables a la población de pacientes con carcinoma renal metastásico que no han recibido tratamiento con imTOR.

30. EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN DESDE EL INICIO CON imTOR (SLPT)

En este análisis se contrasta la hipótesis de si la presencia de mutaciones de la vía mTOR (mTOR, TSC1, TCS2, PI3K o PTEN), se asoció con una peor supervivencia libre de progresión (SLPT), definida como el tiempo transcurrido desde el inicio de tratamiento con imTOR, independientemente de la línea de tratamiento (SLPT), hasta la progresión clínica de la enfermedad (según criterios de práctica clínica habitual), muerte por cualquier causa en presencia de enfermedad tumoral, o fecha del último contacto.

Esta variable analiza solamente si presencia de mutaciones influye en la duración de la eficacia de los imTOR.

30.1- SEGUIMIENTO Y RESULTADOS GLOBALES

La estimación de la mediana de seguimiento de la serie para esta variable fue de 86.9 meses (IC95%: 17 – 156 meses), 89 m en los pacientes NOMUT, y 87 meses en los pacientes MUT. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.540$, log-rank).

En el momento del análisis, habían progresado 69 pacientes (76.7%), 47 pacientes NOMUT (78.3%) y 22 pacientes MUT (73.3%).

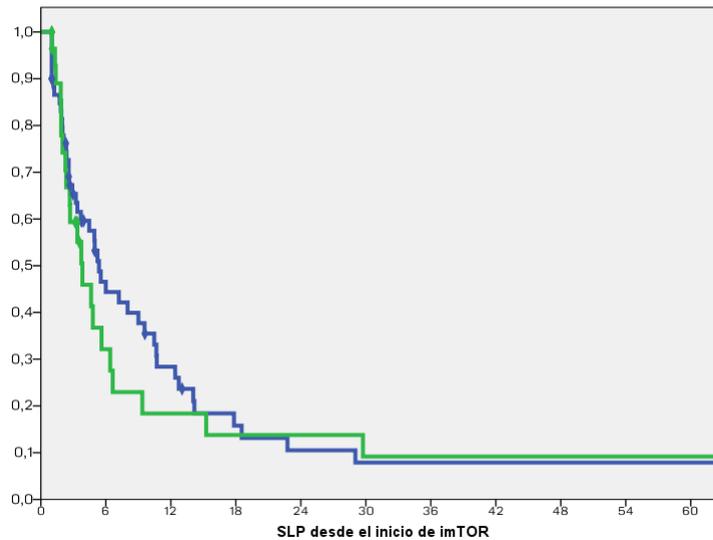
Las medianas de SLPT (meses) en el grupo con y sin mutaciones, y en la serie global se expresan en la tabla adjunta.

Tabla 25. SLPT mediana en función de la presencia o no de mutaciones en la vía mTOR

Mutación en vía mTOR	Mediana de SLPT en función de mutaciones mTOR			
	Estimación	Error típico	Mediana Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
No	5,367	,672	4,050	6,683
Si	3,833	,920	2,029	5,637
Global	4,933	,815	3,337	6,530

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Figura 61. Gráfica de SLPT para el grupo con mutaciones (verde) y sin mutaciones (azul) en genes de la vía mTOR



No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.653$, log-rank).

El HR no ajustado para SLPT (MUT/NOMUT) fue de 1.12 (IC95%: 0.67 – 1.87).

Ambos resultados contradicen lo esperado de acuerdo con la hipótesis nula H_0 , que establecimos como un HR SLPT (MUT/NOMUT) > 1 .

Sin embargo, este resultado puede estar artefactado por la existencia de potenciales factores de confusión o de variables modificadoras del efecto que pudieran enmascarar una diferencia entre ambos grupos de estudio.

Para estimar el valor del HR ajustado por la presencia de estos potenciales factores, se construyó un modelo multivariante de regresión de Cox de tipo explicativo, de modo similar a como se hizo en los apartados anteriores.

30.2- MODELO AJUSTADO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE SLPT

IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES VARIABLES DE CONFUSIÓN

Se usaron las mismas variables empleadas en los análisis anteriores, excepto la variable “progresión como mejor respuesta”, que forma parte del concepto del análisis.

Para la variable de pertenencia al grupo pronóstico de la clasificación IMDC se usaron en cada paciente los factores presentes en el momento del inicio del tratamiento con imTOR.

30.3- MODELO MULTIVARIANTE EXPLICATIVO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE SLPT.

Se construyó un modelo multivariante de regresión de Cox de tipo explicativo para ajustar el valor del HR de SLPT (MUT/NOMUT).

Ante la ausencia de desajustes relevantes entre ambos grupos, se construyó un MODELO INICIAL que incluyó las mismas variables consideradas clínicamente relevantes que se usaron en el modelo previo desde el momento del diagnóstico de enfermedad metastásica, y potenciales factores de confusión o modificadoras del efecto.

También aquí, la incorporación de estas variables mejora de forma estadísticamente significativa la verosimilitud del modelo respecto a un modelo sin variables de control.

Figura 62. Gráfica del modelo inicial con todas las variables de ajuste para SLPT

Modelo no ajustado		Modelo inicial con las variables de ajuste ^a									
-2 log de la verosimilitud		Global (puntuación)				Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior		
490,559	-2 log de la verosimilitud	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	
	462,967	24,105	16	,087	27,591	16	,035	27,591	16	,035	

a. Bloque inicial número 1. Método = Introducir

Modelo Inicial para PFST									
	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)		
							Inferior	Superior	
Mutaciones de vía mTOR	,342	,296	1,336	1	,248	1,408	,788	2,514	
Sexo	-,782	,328	5,702	1	,017	,457	,241	,869	
Edad > 75 años	,114	,395	,084	1	,772	1,121	,517	2,430	
Cels claras vs no claras	,460	,481	,917	1	,338	1,585	,618	4,066	
Componente sarcomatoide	,215	,484	,198	1	,656	1,240	,480	3,205	
Mets. pulmonares no viscerales	,320	,294	1,185	1	,276	1,378	,774	2,453	
Grupo IMDC			7,764	2	,021				
Intermedio vs Bueno	,690	,471	2,147	1	,143	1,994	,792	5,022	
Malo vs Bueno	1,359	,503	7,308	1	,007	3,891	1,453	10,421	
Antiangiogénicos en 1ª L	1,319	,825	2,557	1	,110	3,740	,742	18,839	
imTOR en 1ª L	9,624	54,899	,031	1	,861	15119,205	,000	8,120E+050	
imTOR en 2ª L	8,914	54,894	,026	1	,871	7436,520	,000	3,959E+050	
imTOR en 3ª L	9,060	54,895	,027	1	,869	8603,271	,000	4,584E+050	
imTOR en 4ª L				0 ^a					
Reducción de dosis	,020	,301	,004	1	,948	1,020	,565	1,840	
Mutación en VHL	,174	,289	,365	1	,546	1,191	,676	2,097	
Mutación en FGFR	-,574	,354	2,618	1	,106	,564	,281	1,129	
Mutación en genes de proliferación	,166	,368	,204	1	,651	1,181	,574	2,430	

a. Se redujo un grado de libertad debido a que las covariables son constantes o linealmente dependientes

(Se reflejan en verde las variables de confusión con influencia estadísticamente significativa en la creación del modelo explicativo del comportamiento de SLPT en función de la presencia de imTOR).

El coeficiente B positivo de la variable “Mutaciones en la vía mTOR” indica que la presencia de mutaciones aumenta el riesgo de progresión al tratamiento (HR MUT/NOMUT = 1.41), pero de forma no estadísticamente significativa (IC95%: 0.79 – 2.51, p = 0.248). Este resultado no permite descartar la H0 del estudio, pero también aporta un argumento empírico en contra de ella (H0 = HR mutación / no mutación > 1).

Para estimar con mayor exactitud y precisión el valor del HR, se construyó un modelo explicativo ajustado y jerárquico que tuviera en cuenta las posibles interacciones de otras variables en la estimación del efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre el HR de SGM1.

Para ello se construyó un MODELO MÁXIMO INICIAL incorporando los términos de interacción de primer orden con la variable mutaciones de mTOR. La incorporación de los términos de interacción mejoró aún más la verosimilitud del modelo, aunque de forma estadísticamente no significativa:

Figura 63. Modelo inicial con términos de interacción de primer orden para SLPT

Verosimilitud del modelo inicial con términos de interacción de 1er orden ^a										
-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	
446,658	48,941	31	,021	43,900	31	,062	43,900	31	,062	

a. Bloque inicial número 1. Método = Introducir

A continuación se realizó un análisis de estas posibles interacciones de primer orden mediante la realización de un “chunk test”. En este caso no se detectaron interacciones significativas con la presencia de mutaciones en la vía mTOR con la variable sexo.

Con estos resultados se construyó el siguiente MODELO DE REFERENCIA para valorar el efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre SLPT, que incorpora los términos de interacción significativos, prescinde de las variables de confusión no relevantes, y cuya verosimilitud sigue siendo estadísticamente significativa:

Figura 64. Modelo de referencia para valorar el efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre SLPT

Verosimilitud del modelo de referencia ^a										
-2 log de la verosimilitud	Global (puntuación)			Cambio desde el paso anterior			Cambio desde el bloque anterior			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	Chi-cuadrado	gl	Sig.	
472,885	17,106	7	,017	17,673	7	,014	17,673	7	,014	

a. Bloque inicial número 1. Método = Introducir

Modelo de referencia

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
Mutaciones en la vía mTOR	,216	,271	,635	1	,425	1,242	,729	2,113
Sexo	-,628	,299	4,409	1	,036	,533	,297	,959
Grupo pronóstico IMDC			10,984	2	,004			
Intermedio vs Bueno	,859	,449	3,664	1	,056	2,361	,980	5,692
Malo vs Bueno	1,469	,470	9,779	1	,002	4,346	1,730	10,913
Mutaciones VHL	,097	,259	,141	1	,707	1,102	,664	1,830
Mutaciones FGFR	-,602	,352	2,931	1	,087	,548	,275	1,091
Mutaciones en genes de proliferación	,267	,355	,565	1	,452	1,306	,651	2,620

Figura 65. Modelo explicativo final para SLPT

Modelo explicativo final							95,0% IC para Exp(B)	
	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	Inferior	Superior
Mutaciones en MTOR	,117	,266	,194	1	,660	1,124	,667	1,895
Grupo pronóstico IMDC			10,020	2	,007			
Intermedio vs Bueno	,660	,420	2,464	1	,116	1,935	,849	4,411
Malo vs Bueno	1,292	,444	8,480	1	,004	3,638	1,525	8,678
Mutación en VHL	-,016	,250	,004	1	,950	,984	,603	1,608
Mutación en FGFR	-,437	,340	1,649	1	,199	,646	,332	1,258

Este modelo de referencia es el que mejor ajusta el efecto de las mutaciones en la vía mTOR sobre la SLPT, e incorpora todos los términos de confusión y modificadores del efecto posibles. Se intentaron ajustar otros MODELOS DE REFERENCIA REDUCIDOS, encontrando varios más simples que estimaban el valor de HR con mayor precisión que el modelo de referencia. De entre ellos elegimos el siguiente como nuestro MODELO EXPLICATIVO FINAL.

De nuevo se observa en este modelo un coeficiente B positivo de la variable “Mutaciones en la vía mTOR”, que indica que, en este grupo de pacientes tratados con imTOR, la presencia de mutaciones aumenta el riesgo de progresión al tratamiento (HR MUT/NOMUT = 1.12), pero de forma no estadísticamente significativa (IC95%: 0.67 – 1.89, p = 0.660). Este resultado no permite descartar la H0 del estudio, pero también aporta evidencia en contra de ella (H0 = HR mutación / no mutación > 1).

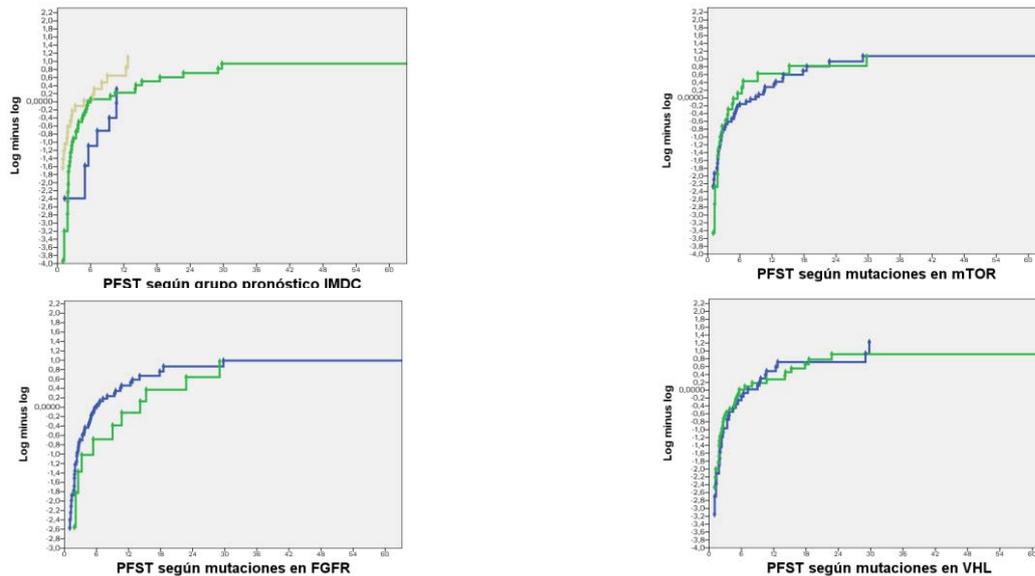
Cuando se sustituye en este modelo la variable general “Mutación en la vía mTOR” por las mutaciones específicas, ninguna mutación concreta de la vía en mTOR alcanza significación por sí sola, pero este dato debe considerarse solo informativo, pues el modelo se ha construido con las mutaciones de forma conjunta.

Mutaciones en la vía mTOR				
	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
			Inferior	Superior
MTOR	,115	1,700	,879	3,291
PIK3CA	,091	2,295	,875	6,021
PTEN	,024	4,061	1,201	13,734
TSC1	,242	,473	,135	1,658
TSC2	,971	,000	,000	2,267E+305

30.4- COMPROBACIÓN DEL SUPUESTO DE RIESGOS PROPORCIONALES

La representación gráfica de las curvas LML: $\text{Ln} [-\text{LnSLPT}(t)]$, no demostró vulneración del principio de riesgos proporcionales de forma importante en las variables incluidas en el modelo.

Figura 66. Curvas LML de riesgos proporcionales de las variables incluidas para SLPT



30.5- CONCLUSIÓN

A la vista de los resultados anteriores, se puede concluir que, en pacientes tratados con imTOR, utilizando un modelo multivariante explicativo, que incluye todas las variables de confusión y modificadoras del efecto relevantes desde el punto de vista clínico y molecular, no se ha podido demostrar un incremento significativo del riesgo de progresión desde el inicio de tratamiento con imTOR, asociado a la presencia de mutaciones en la vía mTOR.

Este resultado contradice el estado actual del conocimiento previo (H_0), de que las mutaciones mTOR se asocian con un incremento del riesgo de progresión al tratamiento, y podría ser explicado porque todos los pacientes del estudio habían recibido inhibidores de mTOR, lo que podría interpretarse a su vez como un dato indirecto de eficacia de esos fármacos en pacientes con mutaciones en esta vía. Estos datos no son extrapolables a la población de pacientes con carcinoma renal metastásico que no han recibido tratamiento con imTOR.

A la vista de los resultados anteriores, se puede concluir que, en pacientes tratados con imTOR, utilizando un modelo multivariante explicativo, que incluye

todas las variables de confusión y modificadoras del efecto relevantes desde el punto de vista clínico y molecular, no se ha podido demostrar un incremento significativo del riesgo de progresión desde el inicio del tratamiento con imTOR, asociado a la presencia de mutaciones en la vía mTOR, como suponía nuestra H0, pero tampoco descartarlo de forma definitiva (HR MUT/NOMUT = 1.12, IC95%: 0.67 – 1.89, p = 0.660).

Sin embargo, al igual que lo observado con SGM1 y SGMT, los datos sugieren que el riesgo de progresión desde el inicio del tratamiento con imTOR es muy similar entre ambos grupos de pacientes, con un HR próximo a 1. Este resultado contradice el estado actual del conocimiento previo (H0), de que las mutaciones mTOR se asocian con un incremento del riesgo de progresión, y podría ser explicado porque todos los pacientes del estudio habían recibido inhibidores de mTOR, lo que podría interpretarse a su vez como un dato indirecto de eficacia de esos fármacos en pacientes con mutaciones en esta vía.

Al igual que en el análisis de SGM1 y SGMT, estos datos no son extrapolables a la población de pacientes con carcinoma renal metastásico que no han recibido tratamiento con imTOR.

31. DISCUSIÓN

El cáncer renal supone el 2% de todos los nuevos casos de cáncer en el adulto y su incidencia va en aumento una tasa del 2.6% de incremento anual¹.

A pesar de los avances diagnósticos, un 20-30% se presentarán en fase metastásica en el diagnóstico y un 20-30%, tras la nefrectomía, experimentarán recidiva y desarrollarán metástasis durante el seguimiento (CCRm).

Hasta hace relativamente poco tiempo, las opciones terapéuticas para los pacientes con cáncer renal metastásico eran escasas y las medianas de supervivencia estaban entorno a los 13 meses.

Avances en la biología molecular del cáncer renal, en concreto el mejor conocimiento de la vía de la angiogénesis, de la vía de mTOR y más recientemente la inmunidad tumoral, han llevado a la introducción de nuevos fármacos dirigidos a estas dianas que han modificado radicalmente el pronóstico y tratamiento del cáncer renal metastásico.

Desde 2005 se han aprobado diez nuevos tratamientos para el CCRm, dos de los cuales, temsirolimus y everolimus, son inhibidores alostéricos de mTOR.

La vía PI3K/AKT/MTOR se encuentra activada de forma constitutiva debido a mutaciones genéticas y alteraciones en el número de copias de sus componentes con mucha más frecuencia que cualquier otra vía de señalización involucrada en el cáncer²²⁹, lo que se traduce en la hiperactivación de esta vía.

Diversos estudios han analizado el valor pronóstico de esta activación, y su incidencia en la evolución de la enfermedad, mediante análisis genómicos o la repercusión en el control postranscripcional de la expresión de ciertas proteínas.

Un estudio que analizó 128 tumores renales primarios objetivó una mayor expresión proteica de p70S6K, y el aumento en la en la zona tumoral en comparación a la zona de tejido renal normal, demostrando así la importancia de la activación de esta vía en la patogénesis del cáncer renal¹⁸⁶. Otro estudio similar, también demostró niveles aumentados de la fosforilación de S6 (p-S6) y p-mTOR en 17 de 29 tumores renales primarios¹⁸⁷.

Haddad y colaboradores¹⁸⁸ demostraron, tras analizar 528 tumores renales no metastásicos, que la alteración en la expresión de PI3K, PTEN, p-mTOR, p-4EBP1 y p-S6 se relacionaba con una peor supervivencia libre de recurrencia.

Un estudio de muestras pareadas metastásicas y de tumores primarios demostró una mayor frecuencia de alteraciones en la vía mTOR en las lesiones metastásicas estudiadas²²⁰. En este estudio, además, la sobreexpresión de PI3K se correlacionó con una peor SLP y la de p-mTOR con una peor SG, poniendo así de manifiesto su valor pronóstico en enfermedad metastásica.

En este mismo sentido, en otro estudio se observó un aumento significativo de alteraciones de la vía mTOR en tumores de alto grado y tumores con características de mal pronóstico¹⁹⁰. En concreto, la presencia de pS6 y pAKT se correlacionaron con una peor supervivencia, mientras niveles más altos de

expresión de PTEN, supresor tumoral e inhibidor de la vía, se correlacionaron con una mejor supervivencia.

Todos estos datos ponen de manifiesto la relevancia de la vía PI3K/AKT/mTOR en la carcinogénesis y diseminación del cáncer renal. No solo eso, sino que, en la mayoría de estos estudios la activación de la vía mTOR demuestra tener un valor pronóstico tanto en enfermedad localizada (aumentando el riesgo de recaída) como en enfermedad metastásica (aumentando el riesgo de muerte).

No obstante, en ninguno de ellos se ha analizado el potencial efecto de los fármacos de los que disponemos hoy en día, en concreto los inhibidores de mTOR, sobre estas alteraciones y si alguno de ellos podría revertir este peor pronóstico relacionado con estas alteraciones.

En este trabajo se pretende analizar el valor pronóstico de las mutaciones en los genes de la vía mTOR en pacientes que han sido tratados con inhibidores de esta vía.

Una de las principales dificultades de este estudio ha sido poder encontrar pacientes tratados con inhibidores de mTOR, pues son fármacos poco utilizados en la práctica clínica habitual, ya que la mayoría de estos pacientes se tratan con fármacos antiangiogénicos. Este problema ha sido minimizado con la realización de un estudio multicéntrico. Es entendible que no existe ningún centro que pueda disponer de una muestra suficientemente grande de pacientes de estas características para realizar este tipo de estudio.

Se han analizado datos clínicos de 133 pacientes totales (población total), 90 de los cuales se disponía de muestra (población analizada) y 43 de los que no. Se han comparado entre ellos con la intención de demostrar que los datos obtenidos en los 90 pacientes serían extrapolables a la población total.

Esto representa la mayor cohorte analizada en este tipo de pacientes y la primera que analiza el impacto de dichas alteraciones moleculares sobre el pronóstico de los pacientes cuando estos se tratan con inhibidores de mTOR.

31.1 VARIABLES CLÍNICAS

Se ha analizado una muestra de 133 pacientes afectados de carcinoma renal metastásico o localmente avanzado que habían sido tratados en algún momento de su enfermedad con un inhibidor de mTOR (temsirolimus o everolimus) entre enero/2003 y octubre/2015.

Por las características clínicas descritas, se considera que se trata de una muestra representativa de este tipo de población.

CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES

Existe una mayor representación de hombres que de mujeres (67% vs 33%), que concuerda con el dato conocido de una proporción de riesgo 2:1 entre los dos sexos⁶.

La edad media de debut metastásico (62 años) también es representativa de esta población, pues es un tumor de predominio en la sexta década de la vida⁵.

SUBTIPOS HISTOLÓGICOS

La mayoría de los pacientes presentan tumores de histología células claras (66.9%). El resto de histologías se distribuyen de la siguiente manera: papilar no especificado (1.5%), papilar tipo I (3%), papilar tipo II (6.8%), cromóforo (5.3%), sarcomatoide (0.8%) e histologías mixtas (14.3%). La frecuencia de tumores con histologías no células claras en esta población es algo mayor de lo que es habitual en práctica clínica (20-25%). Esta mayor representación puede ser debida a que se han seleccionado pacientes tratados con inhibidores de mTOR y temsirolimus que se usan frecuentemente en el tratamiento de primera línea (y a veces por extrapolación en líneas sucesivas) de histología no célula clara.

Un 9% de los pacientes tienen componente sarcomatoide independientemente de la histología asociada. No queda clara en la literatura la frecuencia de componente sarcomatoide en pacientes con carcinoma renal, pues se cree que puede estar infradiagnosticado, pero se considera que está entre un 5%-10%.

FURHMAN Y TNM

Más de la mitad de los pacientes presentaban tumores con Furhman G3 (31.3%) y G4 (27.5%). La mayoría de los pacientes presentaban tumores grandes, el 60% eran \geq T3 y un 33.5% tenían afectación ganglionar.

Un 43% de los pacientes eran metastásicos de inicio, lo que supone una frecuencia algo mayor a lo reportado en la literatura de alrededor del 30%.

Los pacientes de esta serie presentan unas características más desfavorables que los pacientes diagnosticados de carcinoma renal en general, pero se debe tener en cuenta que esta muestra está sesgada hacia pacientes de peor pronóstico, pues el 100% de ellos son metastásicos en algún momento de la enfermedad. La muestra, en cambio, sí que es representativa de los pacientes incluidos en los estudios fase III de enfermedad metastásica.

NEFRECTOMÍA

En alrededor del 70% de los casos se realizó nefrectomía. Esta cifra es algo menor que la reportada en los estudios fase III con esta población, que suele ser de 85-90%. Estas diferencias podrían ser debidas al mayor porcentaje de pacientes metastásicos de debut en los que no siempre se realiza nefrectomía y a que los pacientes incluidos en ensayos clínicos tienen por definición un PS 0-1 (en algunos casos hasta PS2), hecho que no se cumple en la población general y que puede haber hecho disminuir el porcentaje de pacientes sometidos a cirugía.

LOCALIZACIONES METASTÁSICAS

La frecuencia de las localizaciones metastásicas es comparable a la conocida en este tipo de población, siendo las más frecuentes a nivel pulmonar (65.4%) y ganglionar (50.4%), seguido de las metástasis óseas (27%), hepáticas (18%), en partes blandas (13.5%), suprarrenales (7.5%), en sistema nervioso central (4.5%), pancreáticas (5.3%), renales (5.3%), serosas (pleura, peritoneo y pericardio) (5.3%), locales o retroperitoneales (2.3%) y cutáneas (1.5%). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de localizaciones metastásicas entre la población diana y la población accesible, excepto en la afectación de partes blandas (23.3% vs 8.9%, $p = 0.023$). No obstante, esta diferencia no se considera relevante.

SUBGRUPOS PRONÓSTICOS DEL IMDC

En esta serie, el 23.3% de los pacientes fueron clasificados dentro del grupo de pronóstico favorable, el 56.4% de pronóstico intermedio y el 20.3% de mal pronóstico. Esta distribución es bastante fiel a lo publicado por Heng⁹⁸ (excepto por una leve menor representación de los de mal pronóstico), en el que el 18%, 52% y 30% eran de pronóstico bueno, intermedio y pobre respectivamente.

LÍNEA EN LA QUE RECIBIERON EL INHIBIDOR DE mTOR

La mayoría de los pacientes recibieron el inhibidor de mTOR en segunda línea de tratamiento (61.7%) seguidos de aquellos que lo recibieron en tercera línea (21.1%). Solo un 12% de los pacientes fueron tratados con el inhibidor de mTOR en primera línea y un 6% en cuarta línea o posteriores. Esto concuerda con la práctica clínica habitual, en la que la primera línea de tratamiento en estos pacientes suele ser un inhibidor de la vía VEGF. Aunque hoy en día, las segundas líneas de tratamiento más frecuentemente utilizadas son nivolumab y cabozantinib, en el momento en que se trataron los pacientes recogidos en este estudio, la práctica clínica habitual era administrar un imTOR en segunda línea o un anti-VEGF en segunda línea y un imTOR en tercera.

CAUSA DE FINALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO

La principal causa de finalización de tratamiento en cualquier línea fue la progresión de la enfermedad seguida de la toxicidad. Ningún paciente finalizó el tratamiento por toxicidad en 4ª línea o sucesivas. En el momento del análisis, un total de 8 (6.0%) pacientes seguían en tratamiento.

RESPUESTA AL TRATAMIENTO

La respuesta global a los imTOR en cualquier línea de tratamiento es: 0.8% respuestas completas, 15.8% respuestas parciales, 39.8% enfermedad estable y 43.6% progresiones.

La tasa de respuestas parciales es considerablemente mayor que la reportada con los imTOR en los distintos estudios (8% y 1% reportados en los respectivos estudios fase III de temsirolimus y everolimus).

Esto es, probablemente, debido al hecho de que al tratarse de un estudio retrospectivo, no se realizaron medidas exactas mediante los criterios RECIST²³⁰ y seguramente los investigadores consideraron como respuestas parciales reducciones tumorales inferiores al 30%.

SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN DESDE EL INICIO DEL imTOR

La SLP durante el tratamiento con imTOR se ha presentado de manera agrupada independientemente de la línea de tratamiento en la que se utilizó debido a que no hay suficientes eventos en cada subgrupo.

La media de SLP global durante dicho tratamiento fue de 5.4 meses sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre la población con y sin muestra disponible. Esta SLP es similar a la reportada en los fases III de temsirolimus (4.8 meses) y everolimus (4.9 meses).

SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL INICIO DEL imTOR

La mediana de SG desde el inicio del imTOR para toda la población fue 19.61 meses. Las medianas de SG desde el inicio del imTOR para los grupos pronósticos favorable, intermedio y mal pronóstico fueron 23.4, 18 y 4.3 meses respectivamente sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre la población con o sin muestra disponible.

Dado que los pacientes recibieron el imTOR en distinta línea de tratamiento no se pueden extraer conclusiones de este dato.

SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL PRIMER TRATAMIENTO EN ENFERMEDAD METASTÁSICA

La media de supervivencia global desde el inicio del tratamiento de enfermedad metastásica para toda la población fue 29.43 meses. La SG para los grupos de riesgo favorable, intermedio y mal pronóstico del IMDC fueron de 43.7, 22.2 y 8.7 meses respectivamente. Estas cifras coinciden exactamente con las SG observadas en el estudio de Heng⁹⁸ de 43.2, 22.5 y 7.8 meses para los respectivos subgrupos.

31.2- VARIABLES MOLECULARES

En este trabajo se ha analizado la frecuencia de alteraciones moleculares de manera global y no por subtipos histológicos debido al reducido número de pacientes del que se dispone en algunos de estos grupos y a que se considera que el efecto de dichas mutaciones es independiente del tipo histológico en el que se presenten.

MUTACIONES EN GENES DE LA VÍA MTOR

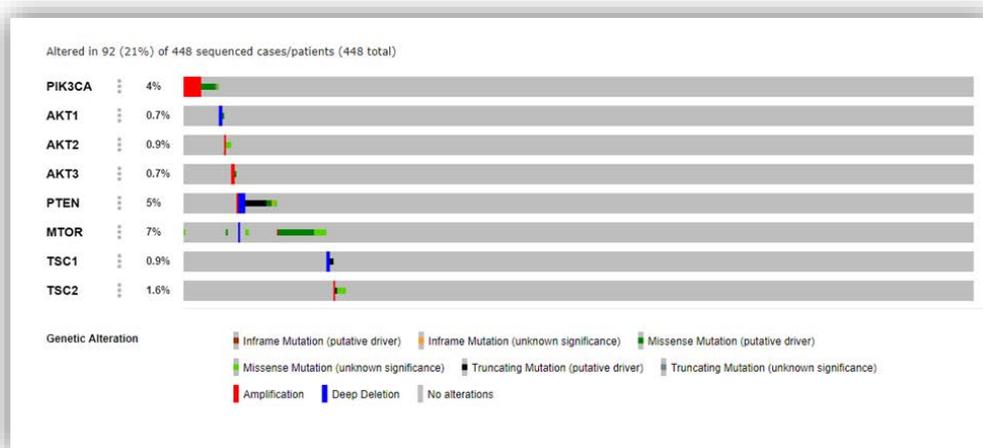
mTOR es una kinasa serina/treonina intracelular que se encuentra sobrerregulada en muchos tipos de tumores diferentes. Principalmente se activa por la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) que a su vez fosforila AKT, a través de diferentes estímulos, incluyendo factores de crecimiento, hormonas, nutrientes, oxígeno y estrés. mTOR también puede ser activado de manera secundaria por la vía de las MAPquinasas. AKT está controlada por dos genes supresores tumorales: PTEN, que actúa como un freno *upstream* de AKT, y el heterodímero TSC1 / TSC2, que actúa como un freno *downstream* de AKT y *upstream* de mTOR. En ausencia del freno TSC1 / TSC2, mTOR se activa para inhibir AKT a través de un mecanismo de retroalimentación inhibitoria⁴². Una vez activada interviene en la regulación de diferentes procesos celulares, como en la supervivencia celular y la regulación del ciclo celular.

Dentro de estas alteraciones se incluyen PIK3CA (gen de la proteína PI3K), AKT, PTEN, mTOR, TSC1 y TSC2.

En la muestra analizada se identificaron mutaciones en esta vía en el 33% de los pacientes. El 17.8% de las muestras analizadas presentaban una mutación en mTOR, el 5.6% en PIK3CA, el 3.3% en PTEN, 5.6% en TSC1 y 4.4% en TSC2. No se objetivó ninguna mutación en AKT (AKT1, AKT2, AKT3).

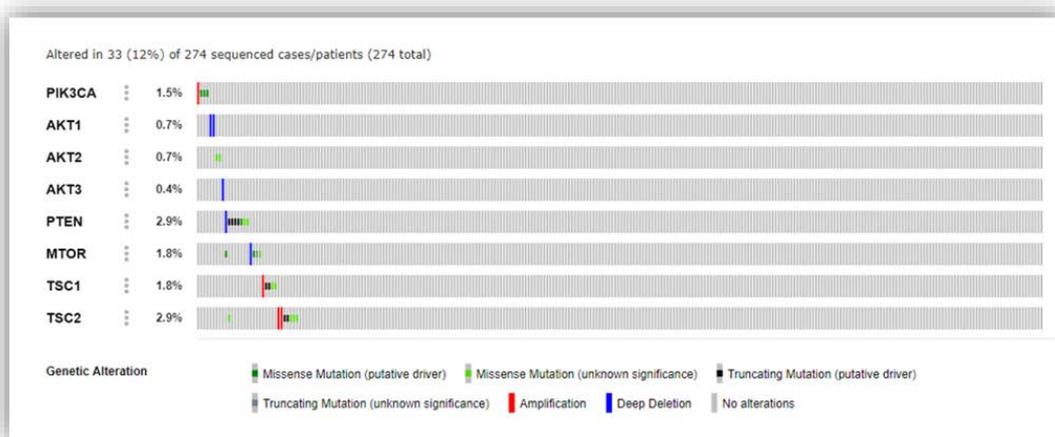
A continuación se detallan la frecuencia de dichas mutaciones según el TCGA en CRCC²³¹, ChRCC²³² y en los carcinomas papilares²³³.

Figura 67. Frecuencia de mutaciones en la vía mTOR en CRCC según TCGA.



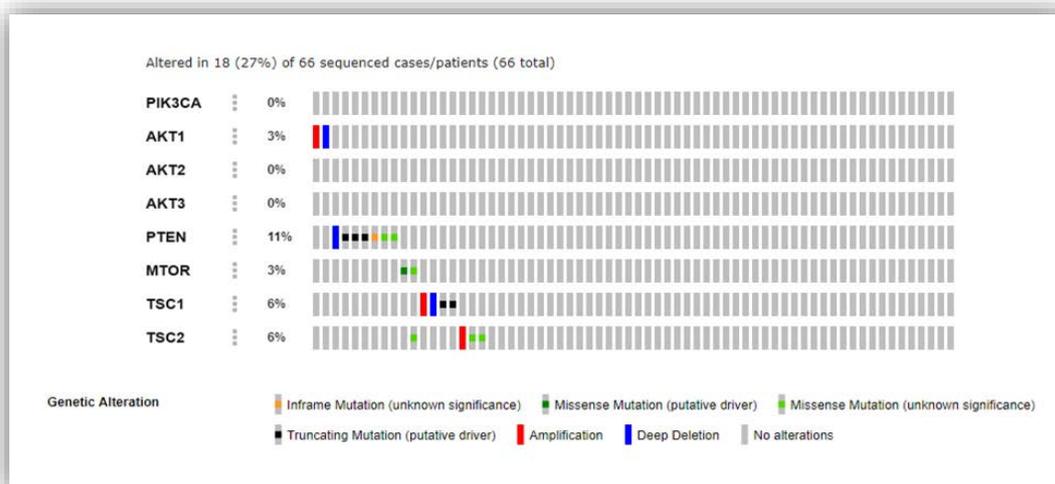
. (Imagen extraída de <http://www.cbioportal.org>)

Figura 68. Frecuencia de mutaciones en la vía mTOR en los PRCC según TCGA.



(Imagen extraída de <http://www.cbioportal.org>)

Figura 69. Frecuencia de mutaciones en la vía mTOR en los ChrCC según TCGA.



(Imagen extraída de <http://www.cbioportal.org>)

En el TCGA se objetivan mutaciones en esta vía en el 21% de los pacientes con CRCC, el 27% de los de ChrCC y el 12% de los PRCC, es decir, una frecuencia de mutaciones claramente inferior a las que hemos hallado en el estudio del 33%. En concreto, en este estudio un 17.8% presentaban mutaciones en mTOR en comparación con lo reportado en el TCGA de 7%, 1.8% y 3% en los CRCC, PRCC y ChrCC. Los otros genes con mayor incidencia de mutaciones en comparación con lo publicado han sido TSC1 y TSC2, alterados en el 5.6 y 4.4% en comparación con el 0.9 y 1.6% en CRCC, 1.8 y 2.9% en PRCC.

Una explicación plausible para estas diferencias es que en el TCGA se seleccionan tumores primarios independientemente de su evolución posterior

(presentaran metástasis o no), en cambio en este estudio el 100% de los pacientes fueron metastásicos en algún momento de la enfermedad. Como se ha comentado anteriormente, las mutaciones en mTOR confieren un peor pronóstico en cuanto a riesgo de recaída tras la nefrectomía y en cuanto a supervivencia global. Al haber seleccionado una muestra de pacientes metastásicos, se ha sesgado la muestra hacia pacientes que tienen una peor evolución y por lo tanto con mayor frecuencia de mutaciones.

MUTACIONES EN LA VÍA DE LA ANGIOGÉNESIS

Se incluyen en este análisis las mutaciones en VHL, FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4.

La alteración molecular del gen supresor del VHL es la más frecuentemente implicada en el CRCC, aunque parece irrelevante en otras histologías. Este gen es clave en CRCC, pues su activación es la responsable de la formación de vasos (EPO, VEGF), proliferación celular (PDGF, TGF α) y del metabolismo de la glucosa (GLUT 1)^{27 30 31 234} y por lo tanto del desarrollo y progresión de este tipo de tumores.

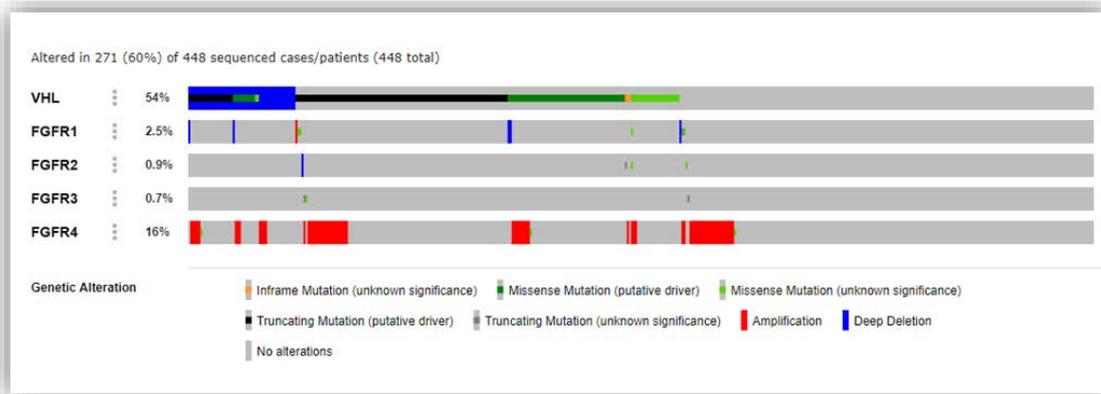
Por su parte, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor receptor, FGFR) promueve la vascularización (formación, ensamblaje y crecimiento de vasos), linfangiogénesis y crecimiento celular en diversos tumores^{235 236 237}, entre ellos carcinoma renal²³⁸. La presencia de altas concentraciones en plasma de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) se ha asociado con tumores de mayor tamaño y grado²³⁹, mayor riesgo de metástasis²⁴⁰ y peor supervivencia²⁴¹. Además se ha demostrado un aumento de los niveles de FGF durante el tratamiento con sunitinib, lo que demuestra que FGF juega un papel importante en la resistencia a los antiangiogénicos^{242 243}.

De manera global el 61.1% de los pacientes presentaban alguna mutación. La más frecuente fue la mutación en VHL, hallada en el 52.2% de los pacientes.

La frecuencia de mutaciones en FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 fueron 5.6%, 3.3%, 2.2% y 5.6% respectivamente.

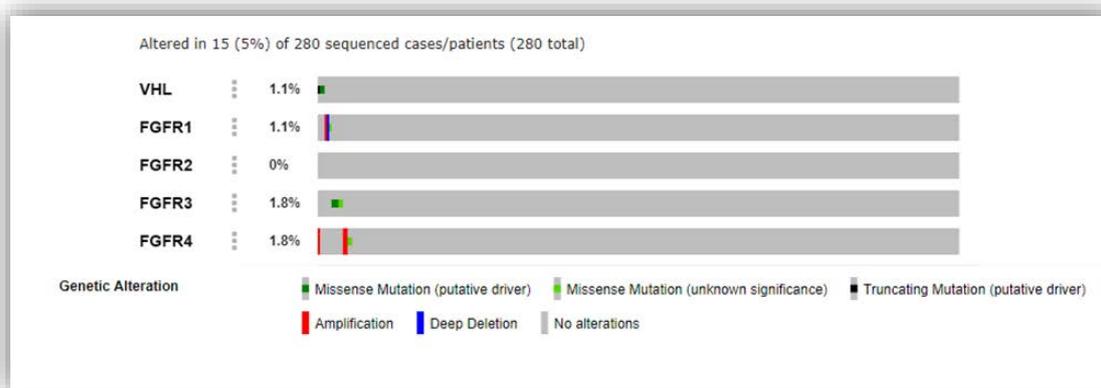
A continuación se detallan la frecuencia de dichas mutaciones según el TCGA en CRCC⁵⁰, ChRCC²³⁹ y en los carcinomas papilares²⁴⁰.

Figura 70. Frecuencia de mutaciones en la vía de la angiogénesis en CRCC según TCGA.



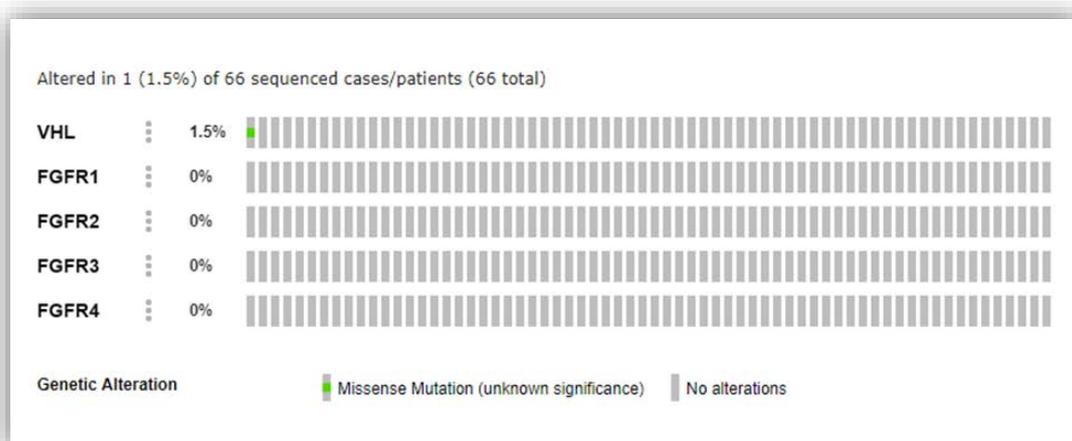
(Imagen extraída de <http://www.cbioportal.org>)

Figura 71. Frecuencia de mutaciones en la vía de la angiogénesis en PRCC según TCGA.



(Imagen extraída de <http://www.cbioportal.org>)

Figura 72. Frecuencia de mutaciones en la vía de la angiogénesis en ChRCC según TCGA.



(Imagen extraída de <http://www.cbioportal.org>)

Si bien es cierto que la frecuencia de mutaciones en esta serie es similar a la descrita en CRCC, probablemente el número ha quedado diluido por la ausencia de mutaciones en estos genes en PRCC y ChRCC. Por lo tanto, probablemente la frecuencia de mutaciones en los genes de esta vía en el subgrupo de CRCC sea algo superior a la reportada en el TCGA.

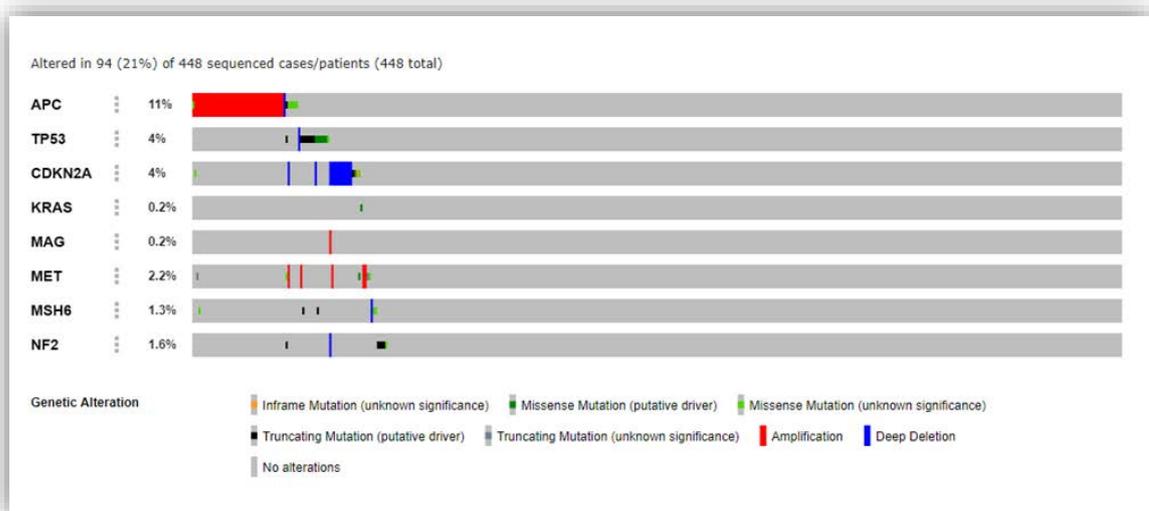
MUTACIONES EN OTROS GENES

Finalmente, se han agrupado el resto de genes que no son propiamente de la vía PI3K/AKT/MTOR ni de la vía de la angiogénesis para su análisis.

Se incluyen en este análisis las mutaciones en APC, TP53, CDKN2A, KRAS, MAG, MET, MSH6 y NF2.

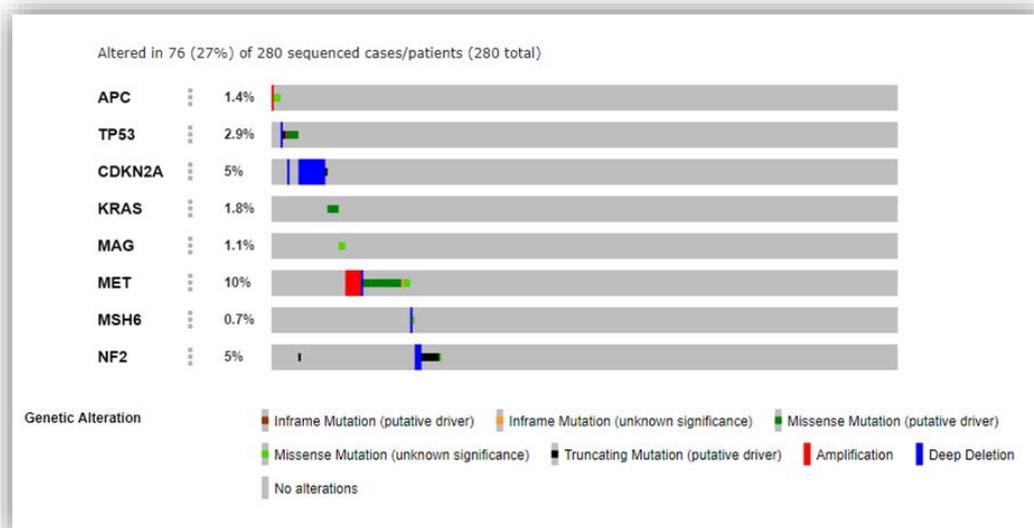
De manera global se objetivaron mutaciones en el 14.4%, siendo la más prevalente, la mutación en TP53 (8.9%). El resto de mutaciones se observaron cada una solo en un paciente de los 90 analizados (1.1%), excepto KRAS que se observó en dos pacientes (2.2%).

Figura 73. Frecuencia de mutaciones en otros genes (APC, TP53, CDKN2A, KRAS, MAG, MET, MSH6, NF2) en CRCC según TCGA.



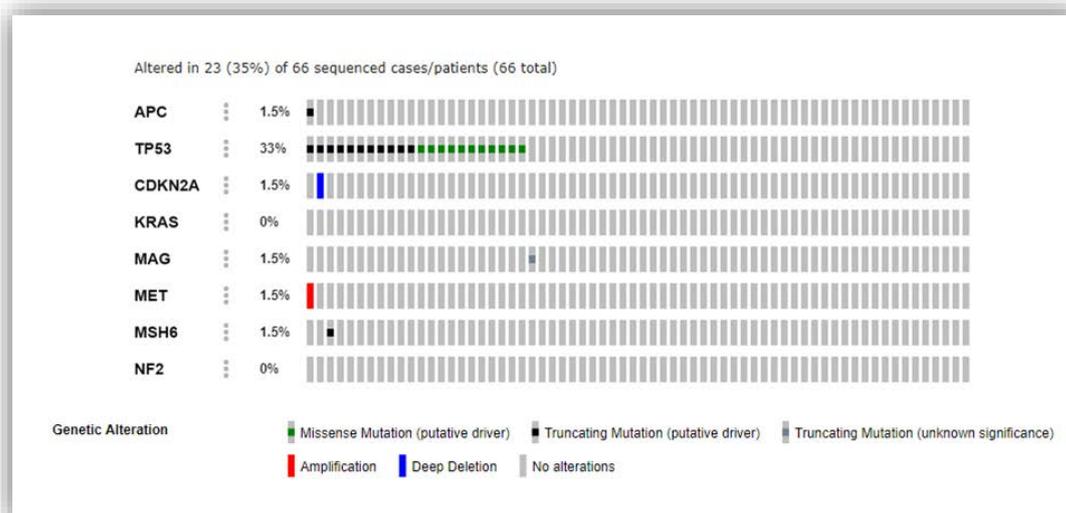
(Imagen extraída de <http://www.cbioportal.org>)

Figura 74. Frecuencia de mutaciones en otros genes (APC, TP53, CDKN2A, KRAS, MAG, MET, MSH6, NF2) en PRCC según TCGA.



(Imagen extraída de <http://www.cbioportal.org>)

Figura 75. Frecuencia de mutaciones en otros genes (APC, TP53, CDKN2A, KRAS, MAG, MET, MSH6, NF2) en ChrCC según TCGA.



(Imagen extraída de <http://www.cbioportal.org>)

La baja incidencia de mutaciones en estos genes coincide con lo reportado previamente. Dada la baja frecuencia de estas alteraciones en esta serie, no se puede extraer ninguna conclusión.

Merece mención especial TP53 que presenta mutación en el 8.9% de las muestras analizadas. La mutación en TP53 es poco frecuente en CRCC (4%) y PRCC (2.9%) y altamente prevalente en ChrCC (33%).

TP53 es el supresor tumoral mutado con mayor frecuencia entre todos los cánceres humanos. La mayoría de las formas mutantes de p53 son causadas

por una sola sustitución de aminoácido en el dominio de unión al ADN²⁴⁴. La alta prevalencia de sustituciones *missense*, en particular ciertas mutaciones "hotspots", sugiere una ventaja selectiva durante la progresión del cáncer que conduce a la quimiorresistencia, invasión y metástasis²⁴⁵.

En diversos estudios se han investigado los mecanismos subyacentes de la ventaja evolutiva de los tumores con proteína p53 mutada, demostrando que muchas de estas funciones son el resultado de la interacción de p53 con otras proteínas o factores de transcripción²⁴⁶. De hecho, además de la pérdida de la función de supresión tumoral WTP53, las variantes de p53 determinan importantes alteraciones de varias vías celulares que influyen profundamente en la homeostasis y el metabolismo celular²⁴⁷.

Igual que ocurría con las mutaciones en la vía de mTOR, es posible que el hecho de haber seleccionado una población de peor pronóstico que la del TCGA pueda justificar. Además, p53 regula mTOR a través de la activación de AMPK (AMP-activated kinase) que regula positivamente el complejo TSC1/TSC2. Esta regulación es independiente de la regulación del ciclo celular²⁴⁸.

31.3- EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE SGM1, SGMT Y SLPT

EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR DESDE EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD METASTÁSICA

Las medianas de SGM1 (meses) en el grupo con y sin mutaciones fueron 22.8 y 26.7 meses respectivamente sin objetivarse diferencias significativas entre ambos grupos (HR = 1.02, IC95%: 0.61 – 1.69, p = 0.946).

En el análisis multivariante las variables con influencia estadísticamente significativa sobre la SGM1 fueron la edad >75 años, la presencia de componente sarcomatoide, el grupo pronóstico del IMDC, haber recibido imTOR en 2^a, 3^a o 4^a línea, progresión de la enfermedad como mejor respuesta y mutaciones en genes de proliferación.

Esta significación estadística no permite atribuirles ni un efecto causal ni la condición de factores predictivos o pronósticos, puesto que en la construcción de un modelo explicativo la significación estadística solo indica la necesidad de que estas variables permanezcan en el modelo para estimar con mayor exactitud y precisión el parámetro que se pretende modelizar, en este caso el HR.

No obstante, no llama la atención que tengan una influencia estadísticamente significativa; de hecho, la mayoría de ellas son variables conocidas relacionadas con la supervivencia. La edad, el componente sarcomatoide y la progresión como mejor respuesta son factores de mal pronóstico reconocidos en cáncer renal. Por su parte los grupos pronósticos del IMDC están validados y se usan tanto en la práctica clínica habitual como en los ensayos clínicos.

En este análisis los pacientes que no presentaban alteraciones en la vía mTOR tenían una tendencia (no estadísticamente significativa) a una mejor supervivencia (HR = 0.78; IC95%: 0.40 – 1.51, p = 0.455).

Tras realizar el análisis eliminando las posibles variables de confusión no se observan diferencias estadísticamente significativas en supervivencia global entre los pacientes que presentan mutaciones en la vía mTOR y los que no (HR = 0.972; IC95%: 0.48 – 1.97, p = 0.937).

Al analizar cada mutación de esta vía de manera individual, solo la presencia de mutación en TCS2 alcanza significación por sí sola (p = 0.037), pero este dato debe considerarse solo informativo, pues el modelo se ha construido con las mutaciones de forma conjunta.

EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA mTOR SOBRE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL DESDE EL INICIO DEL TRATAMIENTO CON imTOR (SGMT)

El análisis de la SGMT de los pacientes con mutaciones en la vía mTOR respecto aquellos que no las tienen demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (HR= 1.18; IC95%: 0.63 – 2.21, p = 0.607).

En el análisis multivariante las variables con influencia estadísticamente significativa sobre la SGMT fueron la edad >75 años, el grupo pronóstico del IMDC, haber recibido imTOR en 2ª, 3ª o 4ª línea, progresión de la enfermedad como mejor respuesta y mutaciones en genes de proliferación. Es decir, las mismas que para SGM1, excepto el componente sarcomatoide.

Al analizar cada mutación de esta vía de manera individual, solo la presencia de mutación en mTOR (p = 0.036) alcanza significación por sí sola, pero este dato debe considerarse solo informativo, pues el modelo se ha construido con las mutaciones de forma conjunta.

EFFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA MTOR SOBRE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN DESDE EL INICIO CON imTOR (SLPT)

De nuevo, el análisis de la SLPT de los pacientes que no presentan mutaciones en la vía mTOR respecto los que sí que las presentan revela que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (HR = 1.12; IC95%: 0.67 – 1.89, p = 0.660).

En el análisis multivariante solo el sexo y el grupo pronóstico del IMDC demostraron tener influencia estadísticamente significativa en sobre la SLPT.

El hecho de que la mutación en TSC2 y mTOR alcancen significación estadística cuando se analizan de manera individual respecto a SGM1 y SGMT respectivamente deben considerarse solamente generadores de hipótesis, pues el análisis de este estudio no estaba diseñado para descubrir mutaciones concretas debido al pequeño número de mutaciones. No obstante, los resultados

de este análisis exploratorio pueden abrir una puerta a la investigación que valore si unas mutaciones de esta vía pueden tener más relevancia que otras.

En base a todos los resultados comentados se concluye que en este trabajo no se ha podido demostrar un peor pronóstico en pacientes que presentan alteraciones en la vía mTOR en términos de riesgo de muerte desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica, riesgo de muerte desde el inicio de tratamiento con imTOR o incremento significativo del riesgo de progresión desde el inicio de tratamiento con imTOR.

Estos datos contradicen los resultados publicados en diversos estudios y lo aceptado en esta enfermedad conforme las alteraciones moleculares en esta vía confieren un peor pronóstico en términos de supervivencia global a estos pacientes.

En el trabajo de Pantuck¹⁹⁰ se observó una peor supervivencia en los pacientes que tenían niveles altos de pS6 (20.2 vs 13.6 meses, $p = 0.002$) y de pAKT (25.5 vs 15.5, $p = 0.045$). La mediana de supervivencia de los pacientes que tenían una expresión de PTEN por debajo del corte establecido era la mitad que la de aquellos que estaba por encima (16 vs 8 meses, $p = 0.045$).

Por otra parte *Youssif et al*¹⁸⁹ determinaron que la expresión de p-mTOR citoplasmática confería una peor supervivencia con una HR = 3.06 (IC95%: 1.03-9.08, $p = 0.044$) en pacientes con enfermedad metastásica.

En este estudio no se han objetivado esas diferencias entre pacientes con mutaciones y sin ellas, dado que las HR para SGM1, SGMT y SLPT son 0.972, 1.18 y 1.12 respectivamente, y los intervalos de confianza contienen el 1. De hecho el IC para SGM1 es 0.48 – 1.97, por lo tanto no incluye el valor de HR = 3.06 encontrado en el trabajo de *Youssif*.

Este resultado podría interpretarse de dos maneras. La primera es que, en contra de lo publicado hasta ahora, las alteraciones moleculares en la vía de mTOR no conllevan a una peor de la evolución de la enfermedad en pacientes con cáncer renal metastásico.

Se realizó una revisión exhaustiva de la literatura y se objetivó que prácticamente todas las alteraciones encontradas en esta serie en mTOR y PIK3CA están descritas como mutaciones hiperactivadoras, y las de TSC1 y TSC2 como inactivadoras, por lo tanto patogénicas. Alguna de las mutaciones encontradas no está descrita en la literatura, pero no se halló ninguna que estuviera descrita como no patogénica. Por su parte, prácticamente todas las alteraciones en PTEN eran mutaciones *frameshift* que inactivan PTEN y por tanto, permiten una hiperactivación de la vía.

Una de las principales diferencias de este estudio con los comentados anteriormente es que se han determinado alteraciones genéticas y no expresión de proteínas por IHQ. La IHQ tiene varios inconvenientes, el primero es la evidente subjetividad a la hora de baremar un score como positivo o negativo. En el caso de pS6, el hecho de observar la proteína fosforilada y por lo tanto indicadora de la actividad de mTOR, no necesariamente significa que exista una

hiperactivación de los componentes de upstream de la vía de PI3K/AKT/mTOR, pues mTOR se puede activar también por la vía de las MAPkinasas a partir del *crosstalk* de RSK/TSC2, donde la inhibición de TSC2 a través de RSK (controlado por la MAP kinasa) conllevaría a la activación de mTOR. En esta situación la vía principal alterada es la de ERK que además de la activación de mTOR, conlleva la desregulación de sus muchos efectores *downstream*, mayoritariamente factores de transcripción relacionados con la proliferación y ciclo celular. Es de entender que en esta situación un imTOR no aportaría el beneficio esperado como en el caso de tener la vía de mTOR activada por mutaciones propiamente de su vía (como PTEN, PIK3CA, AKT, TSC2 o el propio mTOR). Además, no hay que olvidar que los inhibidores de mTOR tienen un efecto rebote positivo sobre la propia vía. En una situación donde mTOR se encuentra activo, este fosforila tanto a 4EBP1 como a la p70S6 kinasa (kinasa de la proteína ribosomal S6 y de IRS1). Cuando p70S6 kinasa fosforila determinados residuos de IRS1 la inhibe inhibiéndolo. Este *feedback* negativo es clave para re-sensibilizar la vía a futuros estímulos. El uso de inhibidores de mTOR en una situación donde la vía de las MAP kinasas sea la responsable de la activación de mTOR puede tener un efecto no deseado ya que, además de no ser efectivo, el hecho de apagar la vía de las MAPkinasas (el insulto oncogénico real) puede conllevar a la activación de PI3K, por inhibición de la p70S6K. La activación del eje PI3K-AKT podría actuar inhibiendo FOXO e impidiendo su efecto antiproliferativo, de manera que podría ser muy contraproducente. En conclusión, es esencial saber de donde proviene el estímulo que provoca la fosforilación de S6 a la hora de seleccionar una terapia u otra.

En el caso de PTEN, cuando se realiza una IHQ se está determinando la presencia o no de proteína, pero no si esta está activada. Si un paciente, presenta una mutación en PTEN que produzca una proteína más corta e inactiva, la IHQ seguirá mostrándola siempre y cuando el péptido resultante contenga el epítipo donde va dirigido el anticuerpo. Tendríamos un resultado artefactual porque no miraríamos la cualidad de la proteína sino que simplemente estaríamos viendo su cantidad que no tiene porque variar.

Por todas estas razones se propone que la determinación de la alteración a nivel molecular es más fiable que la IHQ o, como mínimo, complementaria. No obstante, dada la solidez y el número de pacientes incluidos en los estudios publicados y que todos los estudios van en la misma dirección, se considera cierta la premisa que las alteraciones en la vía mTOR confieren un peor pronóstico.

La otra interpretación sería considerarlo como un dato indirecto de eficacia de esos fármacos en pacientes con mutaciones en esta vía, de manera que ese peor pronóstico que le confiere una mutación en la vía mTOR queda anulado o mitigado cuando utilizamos dicha alteración como diana terapéutica. En los estudios publicados no se analiza el efecto de los tratamientos administrados en enfermedad metastásica. Algunos de ellos son antiguos y probablemente los pacientes no recibieron terapias dirigidas. De hecho, Pantuck et al en sus

conclusiones comentan que los imTOR serían los fármacos ideales para estos pacientes.

Las células tumorales tienen múltiples anormalidades genéticas y epigenéticas. En los pacientes con alteraciones en la vía mTOR, dicha vía puede ser el principal o uno de los principales *drivers* de la enfermedad. Este fenómeno se conoce como adicción oncogénica y es el principal racional para las terapias dirigidas. Las células tumorales para poder resistir el insulto oncogénico producido por mutaciones, en oncogenes o supresores tumorales, desarrollan mecanismos de *feedback* negativos para contrarrestar dicho hiperestímulo. Cuando se inhibe esa vía hiperactivada, son los propios mecanismos de *feedback* negativos lo que hacen que esa célula tumoral no lo pueda resistir a diferencia del resto de células sanas del tejido.

Un ejemplo de este concepto sería el cáncer de mama HER2+. La sobreexpresión de HER2 en cáncer de mama confiere un peor pronóstico a las pacientes aumentando el riesgo de recaída y de muerte. La aparición de trastuzumab cambió absolutamente este escenario, haciendo que el pronóstico de las pacientes con HER2+ sea incluso mejor que el de las pacientes con HER2- tras la administración de trastuzumab²⁴⁹.

Sería razonable pensar que cuando se administra imTOR a pacientes que tienen esta vía hiperactivada se está inhibiendo una vía crucial de estas células tumorales de manera que se anula la ventaja cualitativa que les confiere esta activación. De todas maneras, en estos tumores, la vía mTOR no es el único *driver* y por ello las células tumorales pueden sobrevivir a través de otras vías de escape.

Se propone que, tal vez en este subgrupo de pacientes concretos, el tratamiento ideal sería la combinación de un imTOR con otro fármaco, pero para ello deberíamos conocer mucho mejor la biología del tumor e identificar su talón de Aquiles. Actualmente la única combinación de este tipo aprobada en el tratamiento de cáncer renal es everolimus+lenvatinib en base al estudio HOPE¹⁵⁸.

En un futuro, el análisis “ómico” (genómico, epigenómico, transcriptómico, proteómico) nos dará una visión mucho más completa para conocer el estado real de la célula tumoral y poder escoger con mayor precisión dianas terapéuticas e incluso anticiparnos a mecanismos de resistencia a estas.

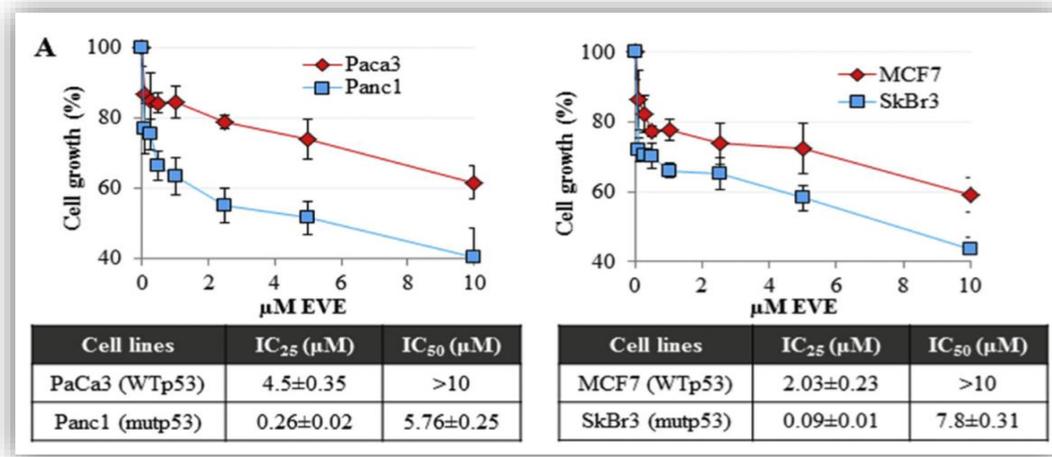
31.4- OTROS ASPECTOS

Como se ha comentado previamente, se han objetivado respuestas duraderas (más de 7 años y siguen en tratamiento) en 3 pacientes que presentaban mutaciones *frameshift* en p53 y dos de ellos además presentaban mutaciones en PTEN.

Algunos datos que demuestran que las mutaciones de p53 pueden activar la vía mTOR²⁵⁰. Un estudio realizado en distintas líneas celulares demostró que las variantes de p53 mutado aumentan la fosforilación de p706SK, un *target* directo

de la vía mTOR y en consecuencia activan esta vía, haciendo estas células más sensibles a inhibidores de mTOR. Para demostrarlo, incubaron líneas celulares con y sin mutación en p53 con everolimus y demostraron una mayor sensibilidad a dicho fármaco en las células que presentaban mutación en p53.

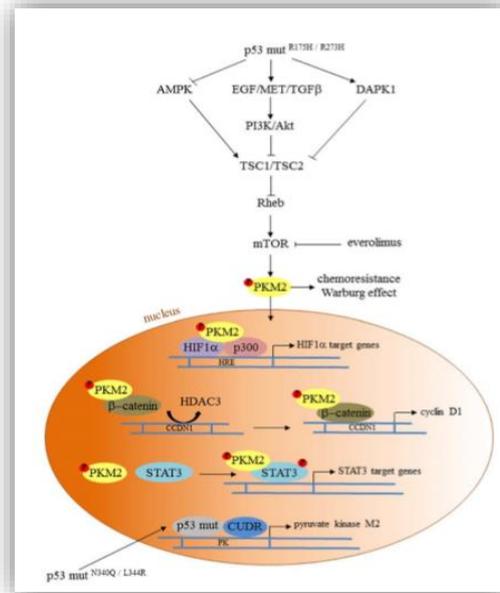
Figura 76. Crecimiento celular de células tratadas durante 48 h con concentraciones crecientes de everolimus.



(El crecimiento celular se midió usando el ensayo colorimétrico de cristal violeta y se calcularon los valores de IC₂₅ e IC₅₀ para cada línea celular testada.)

Dando et al²⁵¹ demostraron en líneas celulares que la ganancia de función que le confieren a p53 dos mutaciones concretas (R175H y R273H) desencadenan la fosforilación de PKM2 (pyruvate kinase isoform M2) en Tyr 105 mediante la participación de la señalización de mTOR.

Figura 77. Representación esquemática de la regulación del eje mTOR / PKM2 en células tumorales con mutación en p53.



Estos datos, junto con la conexión recientemente descubierta entre p53 mutado y la estimulación mTOR, plantean importantes implicaciones para el posible uso terapéutico de drogas sintéticas que inhiben el eje mTOR / PKM2 en células tumorales portadoras de mutaciones en TP53.

Curiosamente, en un estudio que analizó mediante WES pacientes con respuestas extremas a fármacos anti-VEGF (refractarios o largos respondedores)²⁵² se objetivaron mutaciones en p53 en 4 de 14 pacientes refractarios al tratamiento, postulando que las mutaciones de p53 podrían ser un posible mecanismo de resistencia a los antiangiogénicos.

Estos datos podrían justificar la frecuencia de mutaciones en p53 halladas en varios de los pacientes con respuestas duraderas. Si los pacientes con mutaciones en p53 deberían ser tratados con imTOR y no con anti-VEGF es una hipótesis que requeriría estudios adicionales.

En un trabajo publicado recientemente en el que se analizan mutaciones en el DNA circulante de 73 pacientes con CCRm en tratamiento, la mutación de p53 se objetivó en el 24% de los pacientes en primera línea y aumentó hasta el 49% en segunda línea²⁵³.

Dado que en este estudio se han analizado en la mayoría de los casos tumores primarios, es posible que las alteraciones en p53 en el momento de recibir el inhibidor de mTOR sean más frecuentes que las que hemos reportado.

La muestra inicial de otra paciente que tuvo una respuesta a temsirolimus durante 7 años fue analizada mediante WES y la onco-carta de “Los 300”. En dichos análisis iniciales se objetivó una mutación en MTOR y PBMR1. La

mutación en MTOR (MTOR:NM_004958:exon30:c.T4379C:p.L1460P) identificada al inicio en esta paciente, ha sido descrita en la literatura como una mutación activadora de MTOR que activa mTORC1 haciendo las células más sensibles a la rapamicina²⁵⁴. Dado que la paciente fue tratada con temsirolimus, que es un inhibidor alostérico de mTORC1, este hecho justificaría la buena respuesta objetivada a este fármaco.

Posteriormente, se realizó una biopsia a la progresión de la enfermedad. Dicha lesión fue analizada mediante la onco-carta de “Los 300”. Dicho análisis reveló las mismas mutaciones que presentaba al inicio, pero además una mutación de nueva aparición en LRP1B.

LRP1B (*Low-density lipoprotein receptor related protein-1*) es un miembro de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que regula la composición de la membrana plasmática y en consecuencia regula indirectamente la actividad de otros receptores de señalización celular. LRP1 es un regulador de la inflamación en arteriosclerosis, cáncer y daño en el sistema nervioso²⁵⁵. Ha sido identificado como un supuesto supresor tumoral. La baja expresión de LRP1B se observó en múltiples tumores primarios. Estudios iniciales, principalmente en cultivos celulares, sugerían que la transformación maligna podía estar asociada a la pérdida de la expresión de LRP1B^{256 257 258}.

No obstante, los efectos de la expresión de LRP1 en la progresión tumoral no están claros. En cáncer de próstata²⁵⁹ la expresión de LRP1 se observa principalmente en los tumores con Gleason alto, que son los más agresivos, mientras que en carcinoma hepatocelular, la pérdida de la expresión de LRP1 se asocia a progresión tumoral²⁶⁰.

Liu et al²⁶¹ publicaron por primera vez que LRP1B estaba frecuentemente inactivado en carcinoma no microcítico de pulmón mediante deleciones homocigóticas de la parte N terminal y transcripciones anormales de LRP1B.

Posteriormente, se descubrió que la pérdida homocigótica y la metilación aberrante del ADN contribuían al silenciamiento de LRP1B en carcinoma urotelial, carcinoma escamoso esofágico, el carcinoma escamoso oral y el cáncer gástrico^{262 263 264 265}.

Su expresión y función en la carcinogénesis del cáncer renal siguen sin estar claras. Un estudio analizó la expresión de LRP1B en 64 pacientes afectados de cáncer renal²⁶⁶ mediante hibridación *in situ* en la muestra tumoral y tejido normal adyacente de manera pareada. Dichos estudios objetivaron que LRP1B se expresaba frecuentemente en células epiteliales de túbulo renal normal y en el tejido sano, pero a niveles muy bajos en el tejido tumoral. Cuarenta y ocho de 64 (75.5%) muestras tenían una menor expresión de LRP1B en el tumor en comparación con el tejido sano. Esta baja expresión de LRP1B se objetivó tanto en tumores avanzados como en tumores de pequeño tamaño, sugiriendo que se trata de un evento temprano en la carcinogénesis de los tumores renales. Esta baja expresión era debida tanto a eventos epigenéticos (metilación de DNA y deacetilación de histonas) como a deleción del N-terminal de LRP1B.

En este mismo estudio también se realizó un experimento en líneas celulares de cáncer renal HEK293. Demostraron que cuando se silenciaba LRP1B mediante un shRNA, aumentaba el crecimiento, la migración y la invasión celular. Estos resultados indican que LRP1B podría funcionar como supresor tumoral en cáncer renal y su disminución puede estar implicada en la progresión tumoral.

La mutación en LRP1B (LRP1B:NM_018557:exon8:c.A1169G:p.Y390C) hallada en la paciente no está descrita en la literatura, pero basándose en el papel que parece jugar LRP1B en cáncer renal, se plantea que podría tratarse de una mutación que le confiriera una pérdida de funcionalidad y ser un posible mecanismo de resistencia a los inhibidores de mTOR. Esta teoría requiere un estudio más extenso, pero abre la puerta a una posible vía de investigación.

El grupo de *Dana-Farber Cancer Institute (Boston, MA, US)* publicó un trabajo en el que analizaba la asociación de mutaciones de genes implicados en la vía mTOR y la respuesta al tratamiento con análogos de la rapamicina en 79 pacientes diagnosticados de CCRm²¹⁰.

Al incluir todas las mutaciones activadoras de mTOR o PIK3CA, y todas las mutaciones que inactivan TSC1 o TSC2, o PTEN, se objetivó una asociación estadísticamente significativa entre la respuesta y la presencia de mutación. En este estudio, 19 pacientes respondedores (44%) tuvieron mutaciones en al menos uno de estos 5 genes, mientras que solo 8 pacientes (22%) no respondedores tuvieron tales mutaciones ($p = 0.03$, OR = 2.73). Cuando restringieron el análisis al subgrupo de pacientes con respuesta parcial o progresión de la enfermedad, se objetivó que las mutaciones en cualquiera de los genes TSC1, TSC2 o mTOR fueron más comunes en el grupo RP (5/12 RP frente a 4/36 PE, $p = 0.03$).

Estos datos apoyan de forma indirecta los resultados de este estudio, en el sentido de que con pacientes tratados con imTOR, no parece que haya diferencias en pronóstico debido a la presencia de mutaciones, cuyo efecto sobre las variables de resultados podría perderse cuando los pacientes reciben un tratamiento específico para inhibir esta vía y sus posibles consecuencias.

Sin embargo, en este estudio se han analizado las mutaciones de la vía mTOR en su conjunto, por lo que no se puede excluir que un análisis específico del efecto asociado a cada mutación particular pudiera detectar algún comportamiento discordante de alguna de ellas respecto a nuestra conclusión global.

En cualquier caso, el modelo de análisis multivariante no ha buscado encontrar un modelo "predictivo" de respuesta ni "pronóstico", sino que simplemente se ha construido un modelo "explicativo" del posible efecto sobre la SLP y SG de los pacientes asociado a la presencia de mutaciones mTOR, corrigiendo por los posibles desajustes debidos a otras variables de confusión o modificadoras del efecto, y en pacientes tratados con imTOR. Por este motivo, las comparaciones con la serie del Dana Farber deben ser solo a título especulativo, con la intención de generar posibles hipótesis futuras.

Para concluir, este es el primer trabajo que analiza el valor pronóstico de la presencia o no de mutaciones en la vía mTOR en pacientes tratados con inhibidores de mTOR. Los resultados de este estudio indican que en pacientes tratados con inhibidores de mTOR la presencia de mutaciones en esta vía no parece tener un efecto significativo sobre la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, como se demuestra con la estimación de HR ajustada de riesgo de recaída y muerte. Estos datos contradicen el estado actual del conocimiento que indica un peor pronóstico asociado a la presencia de estas mutaciones. Dado que todos los pacientes de este estudio habían sido tratados con imTOR, esto podría ser un signo indirecto de la eficacia de estos fármacos en este tipo de pacientes.

31.5- LÍNEAS DE FUTURO

De la lectura de los resultados obtenidos surgen algunas hipótesis que pueden generar futuras líneas de trabajo.

En primer lugar, sería interesante analizar el efecto sobre la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión de cada una de las mutaciones por separado. En este trabajo el análisis se ha hecho de forma global con una variable que incluía cualquier tipo de mutación en la vía mTOR. Es posible que exista cierta jerarquización de manera que alguna tenga más impacto que otra.

Otra área de interés sería determinar si alguna mutación concreta tiene valor predictor de una mejor respuesta a los imTOR. De hecho, en nuestro estudio hemos observado 3 pacientes con respuestas duraderas que presentaban mutación en p53. En otro trabajo se observó que las mutaciones en p53 parecían conferir resistencia a los fármacos anti-VEGF. Si los pacientes con mutaciones en p53 deberían tratarse con imTOR y no con anti-VEGF es algo que se podría ser analizado.

Además, debe tenerse en cuenta la complejidad e interacción de las diferentes vías de señalización intracelular. Desde este punto de vista, en el futuro las mutaciones en mTOR deberían ponerse en contexto con mutaciones en otras vías de señalización para identificar posibles interacciones entre ellas.

Para finalizar, debido a la gran variedad de posibles mutaciones que dificulta su análisis por separado, cualquiera de las iniciativas anteriores requeriría un elevado tamaño muestral para testar las hipótesis sugeridas. Por lo tanto, debemos seguir confiando en estudios retrospectivos bien diseñados y analizados de forma estadísticamente adecuada para responder a estas preguntas.

32. CONCLUSIONES

RESPECTO A LOS OBJETIVOS PRINCIPALES

- 1- En pacientes con cáncer renal tratados con inhibidores mTOR, la razón ajustada de tasas instantáneas de riesgo de muerte desde el diagnóstico de enfermedad metastásica, en pacientes con mutaciones en esta vía, respecto a los que no la tienen, es HR = 0.78 (IC95%: 0.40 – 1.51, p = 0.455).
- 2- En pacientes con cáncer renal tratados con inhibidores mTOR, la razón ajustada de tasas instantáneas de riesgo de muerte desde el inicio del tratamiento con imTOR, en pacientes con mutaciones en esta vía, respecto a los que no la tienen, es HR= 1.18 (IC95%: 0.63 – 2.21, p = 0.607).
- 3- En pacientes con cáncer renal tratados con inhibidores mTOR, la razón ajustada de tasas instantáneas de riesgo de progresión en cualquier línea desde el inicio del tratamiento con imTOR, en pacientes con mutaciones en esta vía, respecto a los que no la tienen, es HR= 1.12 (IC95%: 0.67 – 1.89, p = 0.660).
- 4- Estos resultados contradicen la hipótesis nula de un mayor riesgo de progresión y muerte asociado a la presencia de estas mutaciones, y podrían ser atribuidos al efecto del tratamiento con inhibidores de mTOR, pero el diseño del estudio no permite establecer una relación de causalidad.

RESPECTO A LOS OBJETIVOS SECUNDARIOS

- 1- Los 133 pacientes analizados en este estudio constituyen una muestra representativa de la población con este tipo de tumor.
- 2- En este estudio, el 33% de los pacientes presentaban al menos una alteración en algún gen de la vía PI3K/AKT/MTOR. El 17.8% de los pacientes presentaban una mutación en mTOR. El 5.6% de los pacientes presentaban mutación en PIK3CA. El 3.3% de los pacientes presentaban mutación en PTEN. El 5.6% y el 4.4% de los pacientes presentaban mutaciones en TSC1 y TSC2 respectivamente.
- 3- La SG para los grupos de riesgo favorable, intermedio y mal pronóstico del IMDC fueron de 43.7, 22.2 y 8.7 meses respectivamente.
- 4- La mediana de SLP durante el tratamiento con imTOR fue 5.4 meses.

- 5- La frecuencia de mutaciones en genes de la vía de la angiogénesis fue del 61.1%. La mutación más frecuente fue en VHL, hallada en el 52.2% de los pacientes. La frecuencia de mutaciones en FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 fueron 5.6%, 3.3%, 2.2% y 5.6% respectivamente.

- 6- La frecuencia de mutaciones en genes de la vía de la proliferación o ciclo celular fue del 14.4%. El gen más frecuentemente mutado fue p53, en un 8.9% de los pacientes.

33. ANEXOS

33.1- DOCUMENTO DE LA AEMPS



DEPARTAMENTO
DE MEDICAMENTOS
DE USO HUMANO

DESTINATARIO:

Pº VALL D'HEBRON, 119-129
EDIF. MATERNOINFANTIL. PLANTA 14
08035 - BARCELONA

Fecha: 29 de junio de 2015

REFERENCIA: ESTUDIO mTOR Inhibitors

ASUNTO: NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DE CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO CLÍNICO O EPIDEMIOLÓGICO

Adjunto se remite resolución de clasificación sobre el estudio titulado "Gene mutation profiling of patients with Metastatic renal cell carcinoma treated with mTOR inhibitors", con código VHI-EVE-2015-01

CORREO ELECTRÓNICO

farmacoepi@aemps.es



MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS
SOCIALES E IGUALDAD
REGISTRO AUXILIAR
AGENCIA E. DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS
SANTARIOS

SALIDA

N. de Registro: 15208 / RG 29936
Fecha: 30/06/2015 10:26:55

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8
28022 MADRID

ASUNTO: RESOLUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO CLÍNICO O EPIDEMIOLÓGICO

DESTINATARIO:

Vista la solicitud-propuesta formulada con fecha **22 de junio de 2015**, por para la clasificación del estudio titulado **"Gene mutation profiling of patients with Metastatic renal cell carcinoma treated with mTOR inhibitors"**, con código **VHI-EVE-2015-01** y cuyo promotor es **"Fundació Privada Institut d' Investigació Oncològica de Vall d'Hebron (VHIO)"**, se emite resolución.

El Departamento de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), de conformidad con los preceptos aplicables, ⁽¹⁾ **RESUELVE** clasificar el estudio citado anteriormente como **"Estudio Posautorización con Otros Diseños diferentes al de seguimiento prospectivo"** (abreviado como EPA-OD).

Para el inicio del estudio no se requiere la autorización previa de ninguna autoridad competente (AEMPS o CCAA)⁽²⁾. No obstante, salvo que haya sido presentada para la clasificación del estudio, el promotor deberá remitir a la AEMPS ⁽³⁾ la siguiente documentación antes del inicio del estudio:

- Protocolo completo (una copia en papel y otra en formato electrónico), incluidos los anexos, y donde conste el número de pacientes que se pretenden incluir en España, desglosado por Comunidad Autónoma.
- Dictamen favorable del estudio por un CEIC acreditado en España.

CORREO ELECTRÓNICO

farmacoepi@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8
28022 MADRID



Contra la presente resolución que pone fin a la vía administrativa podrá interponerse Recurso Potestativo de Reposición, ante la Directora de la Agencia, en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente a aquel en que tenga lugar la notificación de la presente resolución. ⁽⁴⁾

Madrid, a **29 de junio de 2015**

EL JEFE DE DEPARTAMENTO DE
MEDICAMENTOS DE USO HUMANO

am
agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios
Departamento de Medicamentos de Uso Humano
División de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia

César Hernández García

¹ Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común; la Ley 12/2000, de 29 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y de orden social; la Ley 29/2006, de 26 de julio, de Garantías y Uso Racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios; el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos; el Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal "Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios" y se aprueba su estatuto; el Real Decreto 577/2013, de 26 de julio, por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios posautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano.

² De acuerdo con la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre

³ Los documentos se enviarán a la siguiente dirección postal: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. División de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia. Parque Empresarial "Las Mercedes", Edificio 8. C/ Campezo, 1. 28022 Madrid.

⁴ De conformidad con lo dispuesto en los artículos 116 y 117 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, o Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses contados desde el día siguiente al de la notificación de la presente resolución, de conformidad con la Ley 29/1998, de 13 de Julio, reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa, sin perjuicio de poder ejercitar cualquier otro recurso que se estime oportuno. En caso de interponerse recurso de reposición no podrá interponerse recurso contencioso-administrativo hasta la resolución expresa o presunta del primero.

CORREO ELECTRÓNICO

farmacoepi@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8
28022 MADRID

33.2- DOCUMENTO DEL CEIC



Pg. Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona
Tel. +34 93 489 40 10
Fax +34 93 489 41 02

ID-RTF038

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Doña Mireia Navarro Sebastián, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón, de Barcelona,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su reunión del día 24 de julio de 2015 la propuesta del promotor:

Fundació Privada Institut d'Investigació Oncològica de Vall d'Hebrón (VHIO)

para que sea realizado en este Centro, el Estudio Post Autorización código **VHI-EVE-2015-01** / EudraCTnº: --, titulado:

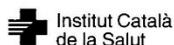
Gene mutation profiling of patients with Metastatic renal cell carcinoma treated with mTOR inhibitors

Y que tras emitir un Informe favorable condicionado en dicha reunión y evaluar la documentación recibida posteriormente por el promotor en respuesta a este informe con las siguientes versiones:

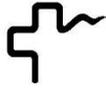
Protocolo en español.
HIP/CI

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Son adecuados tanto el texto de la hoja de información al paciente, como el procedimiento para obtener el consentimiento informado así como también la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio
- Y que este Comité acepta que dicho Estudio Post Autorización sea realizado por la Dra. Cristina Suárez Rodríguez como investigadora principal.

Que el Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 223/2004, y su composición actual es la siguiente:



Hospital Universitari Vall d'Hebron
Universitat Autònoma de Barcelona



Presidenta: Gallego Melcón, Soledad. Médico
Vicepresidente: Segarra Sarries, Joan. Abogado
Secretaria: Navarro Sebastián, Mireia. Química
Vocales : Armadans Gil, Lluís. Médico
Azpiroz Vidaur, Fernando. Médico
Cucurull Folguera, Esther. Médico Farmacóloga
Latorre Arteche, Francisco. Médico
De Torres Ramírez, Inés M. Médico
Fernández Liz, Eladio. Farmacéutico de Atención Primaria
Ferreira González, Ignacio. Médico
Fuentelsaz Gallego, Carmen. Diplomada Enfermería
Fuentes Camps, Inmaculada. Médico Farmacóloga
Guardia Massó, Jaume. Médico
Joshi Jubert, Nayana. Médico
Hortal Ibarra, Juan Carlos. Profesor de Universidad de Derecho
Montoro Ronsano, J. Bruno. Farmacéutico Hospital
Rodríguez Gallego, Alexis. Médico Farmacólogo
Sánchez Raya, Judith. Médico
Solé Orsola, Marta. Diplomada Enfermería
Suñé Martín, Pilar. Farmacéutica Hospital
Vargas Blasco, Víctor, Médico
Vilca Yengle, Luz M^a. Médico

Que en dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

Que en el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Lo firmo en Barcelona, a 16 de octubre de 2015.

**MIREIA
NAVARRO
SEBASTIAN**

Firmado digitalmente por MIREIA NAVARRO
SEBASTIAN
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
ou=Vegeu <https://www.catcert.cat/veridCAT>
(c)03, ou=Serveis Publics de Certificacio
CPIXSA-2, sn=NAVARRO SEBASTIAN,
givenName=MIREIA, serialNumber=38121226Z,
cn=MIREIA NAVARRO SEBASTIAN
Fecha: 2015.10.16 12:35:36 +02'00'

Firmado: Sra. Mireia Navarro
Secretaria CEIC

33.3- DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



PERFIL GENÉTICO MUTACIONAL EN PACIENTES CON CÁNCER RENAL METASTÁSICO TRATADOS CON INHIBIDORES DE MTOR

Yo, D/Dña.....

He recibido información clara sobre este estudio de investigación y he tenido la ocasión de preguntar libremente sobre el mismo. Entiendo su objetivo, sus procedimientos y sus posibles inconvenientes. Acepto voluntariamente participar y autorizo al equipo investigador a obtener las muestras y a estudiarlas. En caso de que existiera material sobrante de las muestras tras realizar este estudio, doy mi consentimiento para que se emplee en otros estudios dentro de la misma línea de investigación, en los términos establecidos por la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007, del 3 de julio).

En el caso de que en este estudio se obtengan datos relevantes para mi salud

- Deseo ser contactado e informado.
 No deseo ser contactado e informado

En el caso de que se precise información adicional para llevar a cabo el estudio:

- Deseo ser contactado e informado.
 No deseo ser contactado e informado

Respecto a la utilización de las biopsias previas, siempre que esto no interfiera con los procesos diagnósticos que pudieran ser precisos para el tratamiento de mi enfermedad.

- Doy mi conformidad para que se estudien mis biopsias.
 No doy mi conformidad para que se estudien mis biopsias.

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Persona que ha informado al paciente:

El participante:

Firma

Fecha:

Firma

Fecha:

33.4- HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

MOLECULAR PROFILING IN mTOR INHIBITORS-TREATED PATIENTS

Nº DE CASO:
[no rellenar]

CENTRO: **Presencia de metástasis:**
0. M0
1. M1

Dr/Dra:

Iniciales del paciente: **NEFRECTOMÍA**
0. Sí 1. No

Nº historia local: **INTERVALO entre la nefrectomía y la aparición de metástasis: meses**

Nº muestra local:

SEXO 0. Hombre 1. Mujer **FECHA DE ÚLTIMO CONTACTO**
[DD/MM/AAAA]:

Fecha de nacimiento: **ESTADO DEL PACIENTE EN EL ÚLTIMO CONTACTO:**
0. Vivo sin enfermedad
1. Vivo con enfermedad
2. Muerto sin enfermedad
3. Muerto con enfermedad

VARIEDAD HISTOLÓGICA:

0. Desconocida
1. Células claras
2. Papilar no especificado
3. Papilar tipo I
4. Papilar tipo II
5. Cromóforo
6. T. de los conductos de Bellini
7. Translocación
8. Sarcomatoide
9. Mixtos [especificar]:

GRADO HISTOLÓGICO [FÜHRMAN]

0. No 1. G1 2. G2 3. G3 4. G4

DIAGNÓSTICO INICIAL

Tumor primario:

0. T0
1. T1a
2. T1b
3. T2a
4. T2b
5. T3a
6. T3b
7. T3c
8. T4
9. Tx

Afectación ganglionar:

0. N0
1. N1
2. N2

A continuación se recogen datos de las sucesivas líneas terapéuticas que ha recibido el paciente.

NOTAS:

- Consideramos como **1ª línea** la primera vez que el paciente recibe terapias dirigidas. No se considera por tanto como líneas de tratamiento la resección previa de metástasis localizadas.
- Cada línea de tratamiento se recogerá en una de las siguientes páginas. La tercera y sucesivas se recogerán en una única página.
- Cuando se sustituye un fármaco por otro debido a toxicidad, a efectos de este estudio se considerará el nuevo fármaco como si fuera una línea diferente, y se rellenará una hoja diferente del CRD.
- Hay que rellenar todas las hojas, aunque el paciente no haya recibido segundas o tercera líneas (en este caso solo será necesario rellenar el primer ítem en cada línea de tratamiento).
- La persona que recoge los datos debe firmar Al final de la última página.

Primera línea

FECHA DE INICIO (dd-mm-aa):

LOCALIZACIONES METASTATICAS

Pulmón
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Hígado
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Hueso
0. No 1. Sí 2. Desconocido
G Linfáticos
0. No 1. Sí 2. Desconocido
P. blandas
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Piel-TCS
0. No 1. Sí 2. Desconocido
SNC
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Otras (especificar):

ECOG

0. ECOG 0 1. ECOG 1
2. ECOG 2 3. ECOG 3 4. ECOG 4

Hb: gr/dl
Plaquetas: /mm3
Leucocitos: /mm3
Neutrófilos: /mm3
Calcio: mg/dL
LDH (Nº de veces por LSN): x LSN
Nadir de LDH (Nº de veces por LSN): x LSN
F. alcalina: U/L
Albúmina: gr/dl
Proteínas totales: gr/dl

TIPO DE TRATAMIENTO:

0. Desconocido 1. Sunitinib
2. Pazopanib 3. Sorafenib
4. Axitinib 5. Dovitinib
6. Tivozanib 7. Beva - INF
8. Temsirolimus 9. Everolimus
10. Inmunoterapia (especificar):
11. Quimioterapia (especificar):
12. Cirugía (especificar):
13. Otros (especificar):

TOLERANCIA GLOBAL AL TTO:

0. Recibe tto completo 1. ↓ de dosis
2. Retrasos 3. 1+2
4. Suspensión del tto por toxicidad

MEJOR RESPUESTA OBSERVADA [RECIST 1.1.]

0. No evaluable 1. RC 2. RP 3. EE 4. PD

FECHA FIN 1ª LINEA (dd-mm-aa):

CAUSA DE FIN DE TTO DE 1ª LINEA

0. Progresión 1. Toxicidad
2. Otra (especificar) 3. Sigue en tratamiento

SEGUNDA LÍNEA

0. No 1. Sí 2. Desconocido

FECHA DE INICIO (dd-mm-aa):

LOCALIZACIONES METASTATICAS

Pulmón
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Hígado
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Hueso
0. No 1. Sí 2. Desconocido
G Linfáticos
0. No 1. Sí 2. Desconocido
P. blandas
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Piel-TCS
0. No 1. Sí 2. Desconocido
SNC
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Otras (especificar):

ECOG

0. ECOG 0 1. ECOG 1
2. ECOG 2 3. ECOG 3 4. ECOG 4

Hb: gr/dl
Plaquetas: /mm3
Leucocitos: /mm3
Neutrófilos: /mm3
Calcio: mg/dL
LDH (Nº de veces por LSN): x LSN
Nadir de LDH (Nº de veces por LSN): x LSN
F. alcalina: U/L
Albúmina: gr/dl
Proteínas totales: gr/dl

TIPO DE TRATAMIENTO:

0. Desconocido 1. Sunitinib
2. Pazopanib 3. Sorafenib
4. Axitinib 5. Dovitinib
6. Tivozanib 7. Beva - INF
8. Temsirolimus 9. Everolimus
10. Inmunoterapia (especificar):
11. Quimioterapia (especificar):
12. Cirugía (especificar):
13. Otros (especificar):

TOLERANCIA GLOBAL AL TTO:

0. Recibe tto completo 1. ↓ de dosis
2. Retrasos 3. 1+2
4. Suspensión del tto por toxicidad

MEJOR RESPUESTA OBSERVADA [RECIST 1.1.]

0. No evaluable 1. RC 2. RP 3. EE 4. PD

FECHA FIN 2ª LINEA (dd-mm-aa):

CAUSA DE FIN DE TTO DE 2ª LINEA

0. Progresión 1. Toxicidad
2. Otra (especificar) 3. Sigue en tratamiento

TERCERA LÍNEA

0. No 1. Sí 2. Desconocido

FECHA DE INICIO (dd-mm-aa):

LOCALIZACIONES METASTATICAS

Pulmón
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Hígado
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Hueso
0. No 1. Sí 2. Desconocido
G Linfáticos
0. No 1. Sí 2. Desconocido
P. blandas
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Piel-TCS
0. No 1. Sí 2. Desconocido
SNC
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Otras (especificar):

ECOG0. ECOG 0 1. ECOG 1
2. ECOG 2 3. ECOG 3 4. ECOG 4

Hb: gr/dl
Plaquetas: /mm3
Leucocitos: /mm3
Neutrófilos: /mm3
Calcio: mg/dL
LDH (Nº de veces por LSN): x LSN
Nadir de LDH (Nº de veces por LSN): x LSN
F. alcalina: U/L
Albúmina: gr/dl
Proteínas totales: gr/dl

TIPO DE TRATAMIENTO:

0. Desconocido 1. Sunitinib
2. Pazopanib 3. Sorafenib
4. Axitinib 5. Dovitinib
6. Tivozanib 7. Beva - INF
8. Temsirolimus 9. Everolimus
10. Inmunoterapia (especificar):
11. Quimioterapia (especificar):
12. Cirugía (especificar):
13. Otros (especificar):

TOLERANCIA GLOBAL AL TTO:0. Recibe tto completo 1. ↓ de dosis
2. Retrasos 3. 1+2
4. Suspensión del tto por toxicidad**MEJOR RESPUESTA OBSERVADA (RECIST 1.1.)**

0. No evaluable 1. RC 2. RP 3. EE 4. PD

FECHA FIN 3ª LINEA (dd-mm-aa):

CAUSA DE FIN DE TTO DE 3ª LINEA0. Progresión 1. Toxicidad
2. Otra (especificar) 3. Sigue en tratamiento**EN CASO DE RECIBIR INHIBIDOR DE MTOR > 3ª LÍNEA, ESPECIFICAR:**

Nº línea:

FECHA DE INICIO (dd-mm-aa):

LOCALIZACIONES METASTATICAS

Pulmón
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Hígado
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Hueso
0. No 1. Sí 2. Desconocido
G Linfáticos
0. No 1. Sí 2. Desconocido
P. blandas
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Piel-TCS
0. No 1. Sí 2. Desconocido
SNC
0. No 1. Sí 2. Desconocido
Otras (especificar):

ECOG0. ECOG 0 1. ECOG 1
2. ECOG 2 3. ECOG 3 4. ECOG 4

Hb: gr/dl
Plaquetas: /mm3
Leucocitos: /mm3
Neutrófilos: /mm3
Calcio: mg/dL
LDH (Nº de veces por LSN): x LSN
Nadir de LDH (Nº de veces por LSN): x LSN
F. alcalina: U/L
Albúmina: gr/dl
Proteínas totales: gr/dl

TIPO DE TRATAMIENTO:

8. Temsirolimus 9. Everolimus

TOLERANCIA GLOBAL AL TTO:0. Recibe tto completo 1. ↓ de dosis
2. Retrasos 3. 1+2
4. Suspensión del tto por toxicidad**MEJOR RESPUESTA OBSERVADA (RECIST 1.1.)**

0. No evaluable 1. RC 2. RP 3. EE 4. PD

FECHA FIN DE TTO (dd-mm-aa):

CAUSA DE FIN DE TTO:0. Progresión 1. Toxicidad
2. Otra (especificar) 3. Sigue en tratamiento**DATOS RECOGIDOS POR:**

NOMBRE:

FIRMA Y FECHA:

34. RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Vía de VHL-HIF en condiciones de normoxia e hipoxia.	20
Figura 2. Cooperación patológica entre las células de cáncer renal del tipo de células claras y la vasculatura adyacente.	20
Figura 3. Carcinogénesis esporádica en contraste con la enfermedad de VHL	21
Figura 4. Subtipos histológicos más frecuentes de CCR.....	24
Figura 5. Correlación entre el subtipo histológico y la supervivencia.....	26
Figura 6. Diferencias en la SG de los pacientes dentro de los subtipos histológicos en función de la mutación genética.....	27
Figura 7. Representación <i>heatmap</i> de la agrupación de 1532 sondas de metilación de ADN no metiladas en tejidos normales.	28
Figura 8. Agrupamiento de la expresión de la firma génica inmune (IGS) por muestra individual (izquierda) o mediana de expresión de IGS (derecha) para los diferentes subtipos histológicos de CCR (CRCC-verde, CCRP- azul, ChRCC-púrpura).	30
Figura 9. Propuesta de algoritmo de tratamiento en CCRm en nuestro medio (a la espera de nuevas aprobaciones en primera línea).....	54
Figura 10. Señales clave que regulan mTORC1 y mTORC2	58
Figura 11. Procesos regulados por mTORC1 y mTORC2	61
Figura 12. Inmunohistoquímica de la expresión de p-Akt, p-mTOR y p70S6K en tumores renales (izquierda) y tejido normal (derecha).	62
Figura 13. (A): SLR estratificado por la puntuación de 5-biomarcadores en función del número de marcadores alterados. (B): SLR estratificado por la puntuación de 2-biomarcadores.	63
Figura 14. Kaplan-Meier que muestra la correlación entre la expresión p-mTOR citoplásmica y la supervivencia en el carcinoma renal metastásico.....	65
Figura 15. Patrón inmunohistoquímico de pAkt, PTEN, p27 y pS6 en (A) tejido renal normal, (B) carcinoma de células renales de células claras de bajo grado (CCR) y (C) CCR de células claras de alto grado.	66
Figura 16. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia según la expresión de proteína para todos los pacientes.....	67
Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia según la expresión de proteína en pacientes metastásicos.	68
Figura 18. A: Crecimiento tumoral en ratones en función del estado de PTEN con y sin tratamiento con CCI-779. Claramente los ratones con tumores PTEN nulo tratados con CCI-779 son los que presentan menor tamaño tumoral. B: Inhibición del crecimiento en líneas celulares con PTEN WT o PTEN nulo con distintas dosis de CCI-779. C: Inhibición de la fosforilación de S6 con el tratamiento tanto en líneas celulares con PTEN WT como PTEN nulo.	71
Figura 19. Inhibición del crecimiento celular con distintas dosis de CCI-779 en función del estado de PTEN.	71
Figura 20. Contenido de ADN medido por citometría de flujo en células con PIK3CA/PTEN WT, células con mutaciones en PIK3CA y células con pérdida PTEN incubadas durante 48 h con 10 mM Everolimus o 1 mM PP242 para determinar el porcentaje de células en fases G1, S y G2 del ciclo celular.....	72
Figura 21. Sensibilidad a la rapamicina en función del status de PIK3CA y PTEN.....	73

Figura 22. Las células shRNA SN12C-CSCG y SN12C-VHL se cultivaron con 1 o 10 nM de CCI-779 durante 5 días. El crecimiento celular se midió mediante recuento de células.	74
Figura 23. Se inyectaron células shRNA SN12C-CSCG y SN12C-VHL en ratones. Cuando el volumen tumoral alcanzó 150 mm ³ , los ratones se randomizaron a un tratamiento diario con vehículo o 0.1 mg / kg de CCI-779. En esta gráfica se muestra el cambio en el volumen tumoral.	74
Figura 24. Waterfall plot de pacientes con mutaciones de PIK3CA tratadas con inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR. La TR global fue del 30%. Cinco pacientes con cáncer de ovario y dos pacientes con cáncer de endometrio presentaron mutaciones simultáneas de PIK3CA y MAPK (KRAS, NRAS, o BRAF).....	76
Figura 25. Mutaciones halladas en función de la respuesta tumoral de 14 pacientes.....	77
Figura 26. Imágenes del Integrated Genome Viewer (IGV) para las dos alteraciones en mTOR encontradas en el paciente con cáncer urotelial que presentó respuesta completa a everolimus y pazopanib. El número de lecturas para el alelo de referencia y el alelo variante se muestran para cada alteración.....	78
Figura 27. El whole-exome-sequencing del tejido tumoral antes del tratamiento y después del desarrollo de resistencia a everolimus reveló una mutación nonsense TSC2 en ambos tumores (Panel A) y una mutación F2108L en mTOR en el tumor resistente que era indetectable en el tumor pretratamiento (Panel B).	79
Figura 28. Curvas de inhibición de crecimiento con rapamicina en las líneas celulares sin mutación de mTOR y con mutación de mTOR.	80
Figura 29. Niveles de S6 kinasa 1 (S6K1) total y fosforilados, diana downstream de mTOR, se muestran para las células HEK 293T después del tratamiento con 0.5 nM, 0.5 nM, 2.5 nM, o 12.5 nM de rapamicina o torin1, como se indica. GAPDH significa gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (sirve como control).....	80
Figura 30. Curva de SLP de pacientes con mutaciones en la vía PI3K/mTOR/AKT vs los que no presentaban ninguna mutación.	81
Figura 31. Alteraciones genómicas halladas en los tres pacientes con respuesta excepcional a rapálogos mediante la técnica IMPACT.	83
Figura 32. Mutaciones halladas en función de la respuesta tumoral.	85
Figura 33. Kaplan-Meier para de la supervivencia por grupo de tratamiento y niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), para (A) LDH normal y (B) LDH aumentada.	87
Figura 34. Kaplan-Meier de la supervivencia en pacientes tratados con (A) interferón alfa y (B) temsirolimus en base a la disminución de la lactato deshidrogenasa (LDH) a los 2 meses desde el inicio del tratamiento	88
Figura 35. Estimación de Kaplan-Meier de PFS (A) y OS (B) en función del cambio de los niveles de colesterol (>0.67 frente a <0.67 mmol / L) para el grupo de pacientes tratados con temsirolimus.....	90
Figura 36. SG desde el inicio del tratamiento para enfermedad metastásica (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra)	117
Figura 37. SG desde el inicio del tratamiento para enfermedad metastásica en los grupos de riesgo favorable, intermedio y mal pronóstico (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra).....	118
Figura 38. SG desde el inicio del tratamiento para enfermedad metastásica (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra).	118
Figura 39. SG desde el inicio de tratamiento con imTOR en los grupos de riesgo favorable, intermedio y mal pronóstico (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra).	119

Figura 40. SLP desde el inicio del tratamiento para enfermedad metastásica (en azul pacientes sin muestra y en verde pacientes con muestra).	119
Figura 41. Gráfica de frecuencia de mutaciones en genes de la vía mTOR.	120
Figura 42. Frecuencia de mutaciones en genes de la vía de la angiogénesis.	121
Figura 43. Frecuencia de mutaciones en otros genes.	122
Figura 44. Mediana de seguimiento desde el diagnóstico de enf. metastásica	123
Figura 45. SGM1 para el grupo con mutaciones (verde) y sin mutaciones (azul) en genes de la vía mTOR.	124
Figura 46. Tablas de contingencia para todas las variables clínicas analizadas como potenciales variables de confusión.	125
Figura 47. Tablas de contingencia para la variable otras mutaciones analizadas como potenciales variables de confusión	127
Figura 48. Tablas de contingencia para todas las variables relacionadas con el tratamiento analizadas como potenciales variables de confusión.	127
Figura 49. Gráfica del modelo inicial con todas las variables de ajuste para SGM1.	129
Figura 50. Modelo inicial con términos de interacción de primer orden para SGM1.	130
Figura 51. interacciones significativas con mutaciones de mTOR para SGM1.	130
Figura 52. Modelo de referencia para valorar el efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre SGM1.	131
Figura 53. Significación estadística de cada mutación específica.	132
Figura 54. Curvas LML de riesgos proporcionales de las variables incluidas para SGM1.	132
Figura 55. gráfica de SGMT para el grupo con mutaciones (verde) y sin mutaciones (azul) en genes de la vía mTOR	135
Figura 56. Gráfica del modelo inicial con todas las variables de ajuste para SGMT	136
Figura 57. Modelo inicial con términos de interacción de primer orden para SGMT.....	137
Figura 58. interacciones significativas con mutaciones de mTOR para SGMT.....	137
Figura 59. Modelo de referencia para valorar el efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre SGMT.	138
Figura 60. Curvas LML de riesgos proporcionales de las variables incluidas para SGMT.	139
Figura 61. gráfica de SLPT para el grupo con mutaciones (verde) y sin mutaciones (azul) en genes de la vía mTOR	142
Figura 62. Gráfica del modelo inicial con todas las variables de ajuste para SLPT	143
Figura 63. Modelo inicial con términos de interacción de primer orden para SLPT.....	144
Figura 64. Modelo de referencia para valorar el efecto de la presencia de mutaciones en la vía mTOR sobre SLPT	144
Figura 65. Modelo explicativo final para SLPT	145
Figura 66. Curvas LML de riesgos proporcionales de las variables incluidas para SLPT	146
Figura 67. Frecuencia de mutaciones en la vía mTOR en CRCC según TCGA.	153
Figura 68. Frecuencia de mutaciones en la vía mTOR en los PRCC según TCGA.	154
Figura 69. Frecuencia de mutaciones en la vía mTOR en los ChRCC según TCGA.	154
Figura 70. Frecuencia de mutaciones en la vía de la angiogénesis en CRCC según TCGA.	156
Figura 71. Frecuencia de mutaciones en la vía de la angiogénesis en PRCC según TCGA.	156
Figura 72. Frecuencia de mutaciones en la vía de la angiogénesis en ChRCC según TCGA.	156
Figura 73. Frecuencia de mutaciones en otros genes (APC, TP53, CDKN2A, KRAS, MAG, MET, MSH6, NF2) en CRCC según TCGA.....	157
Figura 74. Frecuencia de mutaciones en otros genes (APC, TP53, CDKN2A, KRAS, MAG, MET, MSH6, NF2) en PRCC según TCGA.....	158

Figura 75. Frecuencia de mutaciones en otros genes (APC, TP53, CDKN2A, KRAS, MAG, MET, MSH6, NF2) en ChRCC según TCGA.....	158
Figura 76. Crecimiento celular de células tratadas durante 48 h con concentraciones crecientes de everolimus.....	164
Figura 77. Representación esquemática de la regulación del eje mTOR / PKM2 en células tumorales con mutación en p53.	165

TABLAS

Tabla 1. Sistema de estadificación TNM de la AJCC (8ª edición, 2017).	18
Tabla 2. Síndromes hereditarios	33
Tabla 3. Modelo MSKCC	36
Tabla 4. Modelo Cleveland Clinic	36
Tabla 5. Resultados de los diferentes estudios entre los pacientes de mal pronóstico	44
Tabla 6. Estudios que han conducido a la aprobación de los fármacos en primera línea	46
Tabla 7. Tratamientos aprobados en segunda línea.	53
Tabla 8. Asociación de respuestas tumorales en función de las mutaciones halladas.....	84
Tabla 9. Asociación de la expresión de las distintas moléculas analizadas y el beneficio clínico (CBR) y la SLP.....	86
Tabla 10. Genes en la VHIO-Carta V2.....	103
Tabla 11. Genes en VHIO-Card_300 v1	105
Tabla 12. Pacientes aportados por cada centro participante	108
Tabla 13. Distribución por sexos de la población incluida.	109
Tabla 14. Distribución por edades de la población incluida.	110
Tabla 15. Subtipos histológicos de la población incluida.	111
Tabla 16. Características del tumor inicial de la población incluida.	112
Tabla 17. Localizaciones metastásicas de la población incluida.	113
Tabla 18. Subgrupos pronósticos del IMDC de la población incluida.	114
Tabla 19. Porcentaje de nefrectomías en la población incluida.	114
Tabla 20. Línea de tratamiento en la que recibieron el imTOR.	115
Tabla 21. Causa de finalización de tratamiento en cada línea.....	116
Tabla 22. Respuesta global al tratamiento con imTOR.....	117
Tabla 23. Mediana de SGM1.	124
Tabla 24. SGMT mediana en función de la presencia o no de mutaciones en la vía mTOR.	135
Tabla 25. Tabla X. SLPT mediana en función de la presencia o no de mutaciones en la vía mTOR	141

35. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11-30.
- ² Gold PJ, Fefer A, Thompson JA. Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol*. 1996;14(4):216-22.
- ³ Skinner DG, Colvin RB, Vermillion CD et al. Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer*. 1971;28(5):1165-77.
- ⁴ Gudbjartsson T, Thoroddsen A, Petursdottir V et al. Effect of incidental detection for survival of patients with renal cell carcinoma: results of population-based study of 701 patients. *Urology*. 2005;66(6):1186-91.
- ⁵ Jung EJ, Lee HJ, Kwak C et al. Young age is independent prognostic factor for cancer-specific survival of low-stage clear cell renal cell carcinoma. *Urology* 2009;73(1):137-41.
- ⁶ Aron M, Nguyen MM, Stein RJ et al. Impact of gender in renal cell carcinoma: an analysis of the SEER database. *Eur Urol* 2008;54(1):133-40.
- ⁷ Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2011;60(4):615-21.
- ⁸ Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP et al. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* 2005;114:101-8.
- ⁹ Renehan AG, Tyson M, Egger M et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and metaanalysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371:569-78.
- ¹⁰ Mellemgaard A, Møller H, Jensen OM et al. Risk of kidney cancer in analgesics users. *J Clin Epidemiol* 1992;45(9):1021-4.
- ¹¹ Parker AS, Cerhan JR, Lynch CF et al. History of urinary tract infection and risk of renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol* 2004;159(1):42-8.
- ¹² Schlehofer B, Pommer W, Mellemgaard A et al. International renal-cell-cancer study. VI. the role of medical and family history. *Int J Cancer* 1996; 11;66(6):723-6.
- ¹³ Israel GM, Bosniak MA. How I do it: evaluating renal masses. *Radiology*. 2005;236(2):441-50.
- ¹⁴ Mitterberger M, Pelzer A, Colleselli D et al. Contrast-enhanced ultrasound for diagnosis of prostate cancer and kidney lesions. *Eur J Radiol*. 2007;64(2):231-8.
- ¹⁵ Mueller-Lisse UG, Mueller-Lisse UL. Imaging of advanced renal cell carcinoma. *World J Urol*. 2010;28(3):253-61.
- ¹⁶ Heidenreich A, Ravery V, European Society of Oncological U. Preoperative imaging in renal cell cancer. *World J Urol*. 2004;22(5):307-15.
- ¹⁷ Koga S, Tsuda S, Nishikido M et al. The diagnostic value of bone scan in patients with renal cell carcinoma. *J Urol*. 2001;166(6):2126-8.
- ¹⁸ Marshall ME, Pearson T, Simpson W et al. Low incidence of asymptomatic brain metastases in patients with renal cell carcinoma. *Urology*. 1990;36(4):300-2.
- ¹⁹ Park JW, Jo MK, Lee HM. Significance of 18F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography for the postoperative surveillance of advanced renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2009;103(5):615-9.
- ²⁰ Warren KS, McFarlane J. The Bosniak classification of renal cystic masses. *BJU Int*. 2005;95(7):939-42.
- ²¹ Bosniak MA. The use of the Bosniak classification system for renal cysts and cystic tumors. *The Journal of urology*. 1997;157(5):1852-3.
- ²² Maturen KE, Nghiem HV, Caoili EM et al. Renal mass core biopsy: accuracy and impact on clinical management. *AJR Am J Roentgenol*. 2007;188(2):563-70.

-
- ²³ Volpe A, Mattar K, Finelli A et al. Contemporary results of percutaneous biopsy of 100 small renal masses: a single center experience. *J Urol*. 2008;180(6):2333-7.
- ²⁴ Veltri A, Garetto I, Tosetti I et al. Diagnostic accuracy and clinical impact of imaging-guided needle biopsy of renal masses. Retrospective analysis on 150 cases. *European radiology*. 2011;21(2):393-401.
- ²⁵ Brierley JD, Gospodarowicz MK and Wittekind C (eds). *TNM classification of malignant tumors*. UICC International Union Against Cancer. 8th edn. Wiley-Blackwell, 2017. 194.
- ²⁶ Latif F, Duh FM, Gnarr J et al. von Hippel-Lindau syndrome: cloning and identification of the plasma membrane Ca(++)-transporting ATPase isoform 2 gene that resides in the von Hippel-Lindau gene region. *Cancer Res* 1993;53(4):861-7.
- ²⁷ Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4304-4308.
- ²⁸ Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10595-10599.
- ²⁹ Kourembanas S, Hannan RL, Faller DV. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1990;86:670-674.
- ³⁰ de Paulsen N, Brychzy A, Fournier MC et al. Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel-Lindau (VHL) (-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1387-1392.
- ³¹ Harris AL. Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47
- ³² Kaelin WG Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2002;2:673-682.
- ³³ Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005;353(23):2477-90.
- ³⁴ Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4991-5004.
- ³⁵ Latif F, Tory K, Gnarr J et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317-1320.
- ³⁶ Knudson AG Jr. Genetics of human cancer. *Annu Rev Genet* 1996;20:231-251.
- ³⁷ Shuin T, Kondo K, Torigoe S et al. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1994;54:2852-2855.
- ³⁸ Herman JG, Latif F, Weng Y et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9700-9704.
- ³⁹ Maer ER. VHL disease. *Curr Mol Med* 2004;4:833.
- ⁴⁰ Brauch H, Weirich G, Brieger J et al. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 2000;60:1942-1948.
- ⁴¹ Schraml P, Struckmann K, Hatz F et al. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 2002;196:186-193.
- ⁴² Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini M. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(6):596-603.
- ⁴³ Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 915-925.
- ⁴⁴ Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, LoRusso PM. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2207-2214.

-
- ⁴⁵ Giubellino A, Linehan WM, Bottaro DP. Targeting the Met signaling pathway in renal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9: 785–793.
- ⁴⁶ Nakaigawa N, Yao M, Baba M et al. Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 3699–3705.
- ⁴⁷ Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003; 3: 347–361.
- ⁴⁸ Kim JH, Kim BJ, Kim HS. Clinicopathological impacts of high c-Met expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis and review. *Oncotarget* 2017; 8(43):75478-75487.
- ⁴⁹ Shuch B, Amin A, Armstrong AJ et al. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *Eur Urol* 2015 ;67(1):85-97.
- ⁵⁰ Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499(7456):43-9.
- ⁵¹ Klatte T, Pantuck AJ, Said JW et al. Cytogenetic and molecular tumor profiling for type 1 and type 2 papillary renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(4):1162-9.
- ⁵² Furge KA, Chen J, Koeman J et al. Detection of DNA copy number changes and oncogenic signaling abnormalities from gene expression data reveals MYC activation in high-grade papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2007;67(7):3171-6.
- ⁵³ Nagy A, Zoubakov D, Stupar Z et al. Lack of mutation of the folliculin gene in sporadic chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Int J Cancer* 2004;10;109(3):472-5.
- ⁵⁴ Tan MH, Wong CF, Tan HL et al. Genomic expression and single-nucleotide polymorphism profiling discriminates chromophobe renal cell carcinoma and oncocytoma. *BMC Cancer* 2010;10:196.
- ⁵⁵ Frank I, Blute ML, Cheville JC et al. Solid renal tumors: an analysis of pathological features related to tumor size. *J Urol* 2003;170(6 Pt 1):2217-20.
- ⁵⁶ Lane BR, Samplaski MK, Herts BR et al. Renal mass biopsy--a renaissance? *J Urol* 2008;179(1):20-7.
- ⁵⁷ Green WM, Yonescu R, Morsberger L et al. Utilization of a TFE3 break-apart FISH assay in a renal tumor consultation service. *Am J Surg Pathol* 2013;37(8):1150-63.
- ⁵⁸ Weterman MJ, van Groningen JJ, Jansen A et al.. Nuclear localization and transactivating capacities of the papillary renal cell carcinoma-associated TFE3 and PRCC (fusion) proteins. *Oncogene* 2000;19(1):69-74.
- ⁵⁹ Argani P, Laé M, Ballard ET et al. Translocation carcinomas of the kidney after chemotherapy in childhood. *J Clin Oncol* 2006;24(10):1529-34.
- ⁶⁰ Shuch B, Said J, LaRochelle JC et al. Histologic evaluation of metastases in renal cell carcinoma with sarcomatoid transformation and its implications for systemic therapy. *Cancer* 2010;116(3):616-24.
- ⁶¹ Srigley JR, Eble JN. Collecting duct carcinoma of kidney. *Semin Diagn Pathol* 1998;15(1):54-67.
- ⁶² Srigley JR, Delahunt B. Uncommon and recently described renal carcinomas. *Mod Pathol* 2009;22 Suppl 2:S2-S23.
- ⁶³ Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H et al. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep* 2018;23(1):313-326.
- ⁶⁴ Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499, 43–49.
- ⁶⁵ Chen, F., Zhang, Y., Sxenbabaoglu, Y et al. Multilevel genomics based taxonomy of renal cell carcinoma. *Cell Rep* 2016, 2476–2489.
- ⁶⁶ Geissler, K., Fornara, P., Lautenschläger, C et al. Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. *Oncol Immunology* 2015; 4, e985082.

-
- ⁶⁷ Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4991–5004.
- ⁶⁸ Latif F, Tory K, Gnarra J et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317–1320.
- ⁶⁹ Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 2003;170:2163–2172.
- ⁷⁰ Bodmer D, Eleveld MJ, Ligtenberg MJ et al. An alternative route for multistep tumorigenesis in a novel case of hereditary renal cell cancer and a t(2;3)(q35;q21) chromosome translocation. *Am J Hum Genet* 1998;62(6):1475–83.
- ⁷¹ Lonser RR, Glenn GM, Walther M et al. von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003;361:2059–2067.
- ⁷² Zbar B, Tory K, Merino M et al. Hereditary papillary renal cell carcinoma. *J Urol* 1984;151:561–566.
- ⁷³ Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N et al. Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 1999;18:2343–2350.
- ⁷⁴ Schmidt L, Junker K, Weirich G et al. Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer Res* 1998;58:1719–1722.
- ⁷⁵ Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6:637–645.
- ⁷⁶ Zhuang Z, Park WS, Pack S et al. Trisomy 7: harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Gen* 1998;20:66–69.
- ⁷⁷ Kovacs G. Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv Cancer Res* 1993;62:89–124.
- ⁷⁸ Schimdt L, Junker K, Nakaigawa N et al. Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 1999;18:2343–2350.
- ⁷⁹ Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003;3:347–361.
- ⁸⁰ Kiuru M, Launonen V. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC). *Curr Mol Med* 2004;4:869–875.
- ⁸¹ Toro JR, Nickerson ML, Wei MH et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am J Hum Genet* 2003;73:95–106.
- ⁸² Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2005;7:77–85.
- ⁸³ Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR et al. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 2005;8:143–153.
- ⁸⁴ Birt AR, Hogg GR, Dubé WJ (1997). Hereditary multiple fibrofolliculomas with trichodiscomas and acrochordons. *Arch Dermatol* 1997;133:1674–1677.
- ⁸⁵ Pavlovich CP, Walther MM, Eyler RA et al. Renal tumors in the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1542–1552.
- ⁸⁶ Nickerson ML, Warren MB, Toro JR et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Cancer Cell* 2002;2:157–164.
- ⁸⁷ Vocke CD, Yang Y, Pavlovich CP et al. High frequency of somatic frameshift BHD gene mutations in Birt-Hogg-Dubé-associated renal tumors. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:931–935.
- ⁸⁸ Schmidt LS, Nickerson ML, Warren MB et al. Germline BHD-mutation spectrum and phenotype analysis of a large cohort of families with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;76:1023–1033.

-
- ⁸⁹ Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med* 2006;355(13):1345-56.
- ⁹⁰ Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski DJ et al. Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *Am J Pathol* 1996;149(4):1201-8.
- ⁹¹ Eggener SE, Yossepowitch O, Pettus JA, et al. Renal cell carcinoma recurrence after nephrectomy for localized disease: predicting survival from time of recurrence. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(19):3101-6.
- ⁹² Ravaud A, Motzer RJ, Pandha HS, et al; S-TRAC Investigators. Adjuvant Sunitinib in High-Risk Renal-Cell Carcinoma after Nephrectomy. *N Engl J Med* 2016;375(23):2246-2254.
- ⁹³ Motzer RJ, Haas NB, Donskov F et al. Randomized phase III trial of adjuvant pazopanib versus placebo after nephrectomy in patients with locally advanced renal cell carcinoma (RCC) (PROTECT). *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 4507).
- ⁹⁴ Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer* 2003;97(7):1663-71.
- ⁹⁵ Leibovich BC, Han KR, Bui MH, et al. Scoring algorithm to predict survival after nephrectomy and immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer* 2003;98(12):2566-75.
- ⁹⁶ Motzer, R. J., Mazumdar, M., Bacik, J., et al. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999;17(8), 2530-2540.
- ⁹⁷ Motzer, R. J., Bacik, J., Murphy, B. et al. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002; 20(1), 289-296.
- ⁹⁸ Heng, D. Y., Xie, W., Regan, M. M., et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol* 2009; 27(34), 5794-5799.
- ⁹⁹ Heng, D. Y., Xie, W., Regan, M, et al. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *Lancet Oncol* 2013; 14(2), 141-148.
- ¹⁰⁰ Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, et al. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N Engl J Med*. 2001;345(23):1655-9.
- ¹⁰¹ Mickisch GH, Garin A, van Poppel H, et al. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9286):966-70.
- ¹⁰² Choueiri TK, Xie W, Kollmannsberger C, et al. The impact of cytoreductive nephrectomy on survival of patients with metastatic renal cell carcinoma receiving vascular endothelial growth factor targeted therapy. *The Journal of urology*. 2011;185(1):60-6.
- ¹⁰³ (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=carmena&Search=Search>) (11/05/2018).
- ¹⁰⁴ Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA et al. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 1995;139: 688-96.
- ¹⁰⁵ Quesada JR, Swanson DA, Trindade A et al. Renal cell carcinoma antitumor effects of leukocyte interferon. *Cancer Res* 1983;43:940-7.
- ¹⁰⁶ Coppin C, Porzolt F, Awa A et al. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(1):CD001425. Review. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;12:CD001425.
- ¹⁰⁷ Negrier S, Perol D, Ravaud A et al. Medroxyprogesterone, interferon alfa-2a, Interleukin 2, or combination of both cytokines in patients with metastatic renal carcinoma of intermediate prognosis: results of a randomized controlled trial. *Cancer* 2007;110:2468-77.

-
- ¹⁰⁸ Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3(5):391-400.
- ¹⁰⁹ Yang JC, Haworth L, Sherry RM et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003;349(5):427-34.
- ¹¹⁰ Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007;370:2103–2111.
- ¹¹¹ Escudier B, Bellmunt J, Négrier S et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol* 2010;28(13):2144-50.
- ¹¹² Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE et al. Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *J Clin Oncol* 2008;26:5422–5428.
- ¹¹³ Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206. *J Clin Oncol* 2010;28(13):2137-43.
- ¹¹⁴ Melichar B, Koralewski P, Ravaud A et al. First-line bevacizumab combined with reduced dose interferon-alpha2a is active in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2008;19(8):1470-6.
- ¹¹⁵ Mendel DB, Laird AD, Xin X et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003;9:327–337.
- ¹¹⁶ Rosen L, Mulay M, Long J et al. Phase I trial of SU011248, a novel tyrosine kinase inhibitor in advanced solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 2003 (abstr 765).
- ¹¹⁷ Faivre S, Delbaldo C, Vera K et al. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(1):25-35.
- ¹¹⁸ Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(1):16-24.
- ¹¹⁹ Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* 2006;295(21):2516-24.
- ¹²⁰ Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356(2):115-24.
- ¹²¹ Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27(22):3584-90.
- ¹²² Gore ME, Szczylik C, Porta C et al. Safety and efficacy of sunitinib for metastatic renal-cell carcinoma: an expanded-access trial. *Lancet Oncol* 2009;10(8):757-63.
- ¹²³ Sonpavde G, Hutson TE. Pazopanib: a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor. *Curr Oncol Rep* 2007;9:115–119.
- ¹²⁴ Hurwitz HI, Dowlati A, Saini S et al. Phase I trial of pazopanib in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(12):4220-7.
- ¹²⁵ Hutson TE, Davis ID, Machiels JP et al. Efficacy and safety of pazopanib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2010;28(3):475-80.
- ¹²⁶ Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2010;28(6):1061-8.

-
- ¹²⁷ Sternberg CN, Hawkins RE, Wagstaff J et al. A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: Final overall survival results and safety update. *Eur J Cancer* 2013;49:1287-96.
- ¹²⁸ Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2013;369(8):722-31.
- ¹²⁹ Escudier B, Porta C, Bono P, et al. Patient preference between pazopanib (Paz) and sunitinib (Sun): Results of a randomized double-blind, placebo-controlled, cross-over study in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC)—PISCES study. *J Clin Oncol*. 2014;32(14):1412-8.
- ¹³⁰ Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, et al. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004 ;22(5):909-18.
- ¹³¹ Hidalgo M, Buckner JC, Erlichman C, et al. A phase I and pharmacokinetic study of temsirolimus (CCI-779) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(19):5755-63.
- ¹³² Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(22):2271-81.
- ¹³³ Heng DY, Elson P, Golshayan AR et al, A retrospective multicenter study of MSKCC poor-prognosis patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) treated with sunitinib. *J Clin Oncol* 2008;26:15S (May 20 Supplement): 16057.
- ¹³⁴ Gore ME, Szczylik C, Porta C et al. Final results from the large sunitinib global expanded-access trial in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2015;113(1):12-9.
- ¹³⁵ Choueiri TK, Halabi S, Sanford BL et al. Cabozantinib Versus Sunitinib As Initial Targeted Therapy for Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma of Poor or Intermediate Risk: The Alliance A031203 CABOSUN Trial. *J Clin Oncol* 2017;35(6):591-597.
- ¹³⁶ Yang JC, Hughes M, Kammula U, et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell Cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* 2007;30:825–3.
- ¹³⁷ Hammers HJ, Plimack ER J, Infante JR et al. Safety and Efficacy of Nivolumab in Combination With Ipilimumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma: The CheckMate 016 Study. *J Clin Oncol* 2017;35(34):3851-3858.
- ¹³⁸ Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2018 ;378(14):1277-1290.
- ¹³⁹ Wallin JJ, Bendell JC, Funke R et al. Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma. *Nat Commun* 2016;7:12624.
- ¹⁴⁰ McDermott DF, Atkins MB, Motzer RJ et al. A phase II study of atezolizumab (atezo) with or without bevacizumab (bev) versus sunitinib (sun) in untreated metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients (pts). *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl 6S; abstract 431).
- ¹⁴¹ Motzer RJ, Powles T, Atkins MB et al. IMmotion151: A Randomized Phase III Study of Atezolizumab Plus Bevacizumab vs Sunitinib in Untreated Metastatic Renal Cell Carcinoma (mRCC). *Journal of Clinical Oncology* 36, no.6 suppl (February 2018) 578-578.
- ¹⁴² O'Donnell A, Faivre S, Burris HA 3rd, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*; 2008 26(10):1588–1595.
- ¹⁴³ Amato RJ, Jac J, Giessinger S, Saxena S, Willis JP. A phase 2 study with a daily regimen of the oral mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in patients with metastatic clear cell renal cell cancer. *Cancer*; 2009 115(11):2438–2446.
- ¹⁴⁴ Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008;372(9637):449-56.
- ¹⁴⁵ Calvo E, Escudier B, Motzer RJ, et al. Everolimus in metastatic renal cell carcinoma: Subgroup analysis of patients with 1 or 2 previous vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine

kinase inhibitor therapies enrolled in the phase III RECORD-1 study. *Eur J Cancer* 2012;48:333-9.

¹⁴⁶ Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: final results and analysis of prognostic factors. *Cancer* 2010;116(18):4256-65.

¹⁴⁷ Rugo HS, Herbst RS, Liu G, et al. Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. *J Clin Oncol*. 2005;23(24): 5474–5483.

¹⁴⁸ Rixe O, Bukowski RM, Michaelson MD, et al. Axitinib treatment in patients with cytokine-refractory metastatic renal-cell cancer: a phase II study. *Lancet Oncol*. 2007;8(11):975–984.

¹⁴⁹ Rini BI, Wilding G, Hudes G, et al. Phase II study of axitinib in sorafenib-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(27):4462–4468.

¹⁵⁰ Rini BI, Escudier B, Tomczak P, et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet* 2011;378(9807):1931-9.

¹⁵¹ Motzer RJ, et al. Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:552–62.

¹⁵² Brahmer, J., Drake, C., Wollner, I. et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010;28: 3167–3175.

¹⁵³ Topalian, S., Hodi, F., Brahmer, J et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2443–2454.

¹⁵⁴ Motzer, R., Rini, B., McDermott, D et al. (2014) Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2014;33:1430-7.

¹⁵⁵ Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2015;373(19):1803-13.

¹⁵⁶ Choueiri TK, Pal SK, McDermott DF, et al. A phase I study of cabozantinib (XL184) in patients with renal cell cancer. *Ann Oncol* 2014;25:1603-1608.

¹⁵⁷ Choueiri TK, Escudier B, Powles T, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2015;373:1814-1823.

¹⁵⁸ Motzer RJ, Hutson TE, Glen H, et al. Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: A randomised, phase 2, open-label, multicentre trial. *Lancet Oncol* 2015;16:1473-1482.

¹⁵⁹ Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 1992; 69:1227–1236.

¹⁶⁰ Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF et al. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 1992; 358:70–73.

¹⁶¹ Chung J, Grammer TC, Lemon KP et al. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 1994; 370:71–75.

¹⁶² Cafferkey R, Young PR, McLaughlin MM et al. Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 1993; 13:6012–6023.

¹⁶³ Kunz J, Henriquez R, Schneider U et al. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*. 1993; 73:585–596.

¹⁶⁴ Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149:274–293.

¹⁶⁵ Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 2003; 17:1829–1834.

-
- ¹⁶⁶ Tee AR, Manning BD, Roux PP et al. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 2003; 13:1259–1268.
- ¹⁶⁷ Manning BD, Tee AR, Logsdon MN et al.. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*. 2002; 10:151–162.
- ¹⁶⁸ Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H et al. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; 121:179–193.
- ¹⁶⁹ Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 2002; 4:658–665.
- ¹⁷⁰ Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30:214–226.
- ¹⁷¹ Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A et al. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer cell* 2003; 4:147–158.
- ¹⁷² DeYoung MP, Horak P, Sofer A et al. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 2008; 22:239–251.
- ¹⁷³ Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:8204–8209.
- ¹⁷⁴ Stambolic V, MacPherson D, Sas D et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*. 2001; 8:317–325.
- ¹⁷⁵ Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM et al, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrientsensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 2003; 11:895–904.
- ¹⁷⁶ Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008; 320:1496– 1501.
- ¹⁷⁷ Toschi A, Lee E, Xu L et al. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol* 2009; 29:1411–1420.
- ¹⁷⁸ Mayer C, Zhao J, Yan X, Grummt I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* 2004; 18:423–434.
- ¹⁷⁹ Thoreen CC, Kang SA, Chang JW et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 2009; 284:8023–8032.
- ¹⁸⁰ Duvel K, Yecies JL, Menon S et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 2010; 39:171–183.
- ¹⁸¹ Li S, Ogawa W, Emi A et al. Role of S6K1 in regulation of SREBP1c expression in the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412:197–202.
- ¹⁸² Wang BT, Ducker GS, Barczak AJ et al. The mammalian target of rapamycin regulates cholesterol biosynthetic gene expression and exhibits a rapamycin-resistant transcriptional profile. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:15201–15206.
- ¹⁸³ Hsu PP, Kang SA, Rameseder J et al. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* 2011; 332:1317–1322.
- ¹⁸⁴ Jacinto E, Facchinetti V, Liu D et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006; 127:125–137.
- ¹⁸⁵ Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005; 307:1098–1101.
- ¹⁸⁶ Lin F, Zhang PL, Yang XJ et al. Morphoproteomic and molecular concomitants of an overexpressed and activated mTOR pathway in renal cell carcinomas. *Ann Clin Lab Sci* 2006 36(3):283–293.

-
- ¹⁸⁷ Robb VA, Karbowniczek M, Klein-Szanto AJ, Henske EP. Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2007 177(1):346–352.
- ¹⁸⁸ Haddad AQ, Kapur P, Singla N et al. Validation of mammalian target of rapamycin biomarker panel in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2015;121(1):43-5.
- ¹⁸⁹ Abou Youssif T, Fahmy MA, Koumakpayi IH, et al. The mammalian target of rapamycin pathway is widely activated without PTEN deletion in renal cell carcinoma metastases. *Cancer* 2011; 117(2):290–300.
- ¹⁹⁰ Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer* 2007;109(11):2257–2267.
- ¹⁹¹ Figlin RA, de Souza P, McDermott D et al. Analysis of PTEN and HIF-1alpha and correlation with efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma treated with temsirolimus versus interferon-alpha. *Cancer* 2009; 115:3651–60.
- ¹⁹² Di Nicolantonio F, Arena S, Tabernero J, Grosso S, Molinari F, Macarulla T, et al. Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus. *J Clin Invest* 2010; 120:2858–66.
- ¹⁹³ Ihle NT, Lemos R Jr, Wipf P, Yacoub A, Mitchell C, Siwak D, et al. Mutations in the phosphatidylinositol-3-kinase pathway predict for antitumor activity of the inhibitor PX-866 whereas oncogenic Ras is a dominant predictor for resistance. *Cancer research* 2009; 69:143–50. [PubMed: 19117997].
- ¹⁹⁴ Tanaka H, Yoshida M, Tanimura H, Fujii T, Sakata K, Tachibana Y, et al. The selective class I PI3K inhibitor CH5132799 targets human cancers harboring oncogenic PIK3CA mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011; 17:3272–81.
- ¹⁹⁵ Hanrahan AJ, Schultz N, Westfal ML, Sakr RA, Giri DD, Scarperi S, et al. Genomic complexity and AKT dependence in serous ovarian cancer. *Cancer discovery* 2012; 2:56–67.
- ¹⁹⁶ Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene* 2008;27 Suppl 2:S43-51.
- ¹⁹⁷ Neshat MS, Mellinshoff IK, Tran C, et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10314-10319.
- ¹⁹⁸ Shi Y, Gera J, Hu L, et al. Enhanced sensitivity of multiple myeloma cells containing PTEN mutations to CCI-779. *Cancer Res* 2002;62:5027-5034.
- ¹⁹⁹ Paradiso A, Mangia A, Azzariti A, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase in breast cancer: where from here? *Clin Cancer Res*, 2007,13:5988-5990.
- ²⁰⁰ Weigelt B, Warne PH, Downward J. PIK3CA mutation, but not PTEN loss of function, determines the sensitivity of breast cancer cells to mTOR inhibitory drugs. *Oncogene*, 2011,30:3222-3233.
- ²⁰¹ Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, et al. PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin Cancer Res*, 2012,18:1777 - 1789.
- ²⁰² Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C. & Semenza, G.L. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol* 2001; 3995–4004 (2001).
- ²⁰³ Thomas GV, Tran C, Mellinshoff IK et al. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med* 2006; 12:122–127.
- ²⁰⁴ Janku F, Wheeler JJ, Westin SN et al. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations. *J Clin Oncol* 2012; 30:777–82.
- ²⁰⁵ Iyer G, Hanrahan AJ, Milowsky MI, Al-Ahmadie H, Scott SN, Janakiraman M, et al. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. *Science* 2012;338:221.

-
- ²⁰⁶ Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM et al. Activating mTOR mutations in a patient with an extraordinary response on a phase I trial of everolimus and pazopanib. *Cancer Discov* 2014;4(5):546-53.
- ²⁰⁷ Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM et al. Response and acquired resistance to everolimus in anaplastic thyroid cancer. *N Engl J Med* 2014;371(15):1426-33.
- ²⁰⁸ Hanna GJ, Busaidy NL, Chau NG et al. Genomic correlates of response to everolimus in aggressive radioiodine-refractory thyroid cancer: a phase II study. *Clin Cancer Res*. 2018;24(7):1546-1553.
- ²⁰⁹ Voss MH, Hakimi AA, Pham CG et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic renal cell carcinoma and extended benefit from mTOR inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* 2014;20:1955-64.
- ²¹⁰ Kwiatkowski DJ, Choueiri TK, Fay AP et al. Mutations in TSC1, TSC2, and MTOR are associated with response to rapalogs in patients with metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2016;22(10):2445-2452.
- ²¹¹ Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499:43-9.
- ²¹² Li S, Kong Y, Si L et al. Phosphorylation of mTOR and S6RP predicts the efficacy of everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2014;14:376.
- ²¹³ Cho D, Signoretti S, Dabora S et al. Potential histologic and molecular predictors of response to temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clinical genitourinary cancer* 2007; 5:379–85.
- ²¹⁴ Armstrong AJ, George DJ, Halabi S. Serum lactate dehydrogenase predicts for overall survival benefit in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with inhibition of mammalian target of rapamycin. *J Clin Oncol* 2012;30(27):3402-7.
- ²¹⁵ Dabydeen A, Jagannathan JP, Ramaiya NH et al. Pneumonitis associated with mTOR therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: Incidence, radiographic findings, and correlation with clinical outcome. *Eur J Cancer* 2012;48(10):1519-24.
- ²¹⁶ Wang BT, Ducker GS, Barczak AJ, Barbeau R, Erle DJ, Shokat KM. The mammalian target of rapamycin regulates cholesterol biosynthetic gene expression and exhibits a rapamycin-resistant transcriptional profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:15201–6.
- ²¹⁷ Xu J, Dang Y, Ren YR, Liu JO. Cholesterol trafficking is required for mTOR activation in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4764–9.
- ²¹⁸ Chee Khoon Lee, Ian C. Marschner, R. et al. Increase in Cholesterol Predicts Survival Advantage in Renal Cell Carcinoma Patients Treated with Temsirolimus. *Clin Cancer Res* 2012; 18(11); 3188–96.
- ²¹⁹ Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010; 26: 589-595.
- ²²⁰ Li H, Handsaker B, Wysoker A et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; 25: 2078-2079.
- ²²¹ Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 2011; 27: 2987-2993.
- ²²² McKenna A, Hanna M, Banks E et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010; 20: 1297-1303.
- ²²³ DePristo MA, Banks E, Poplin R et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011; 43: 491-498.
- ²²⁴ Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* 2013; 43: 11 10 11-33.

-
- ²²⁵ Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012; 22: 568-576.
- ²²⁶ Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: e164.
- ²²⁷ Deng X. SeqGene: a comprehensive software solution for mining exome- and transcriptome-sequencing data. *BMC Bioinformatics* 2011; 12: 267.
- ²²⁸ Venkatraman ES, Olshen AB. A faster circular binary segmentation algorithm for the analysis of array CGH data. *Bioinformatics* 2007; 23: 657-663.
- ²²⁹ Brugge J, Hung M-C, Mills GB. A new mutational AKTivation in the PI3K Pathway. *Cancer Cell* 2007; 12:104–107.
- ²³⁰ Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228-47.
- ²³¹ Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499(7456):43-9.
- ²³² Davis CF, Ricketts CJ, Wang M et al. The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2014;26(3):319-330.
- ²³³ TCGA Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma; raw data at the NCI; source mutation data from GDAC Firehose.
- ²³⁴ Kaelin WG Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2002;2:673–682
- ²³⁵ Auguste P, Javerzat S, Bikfalvi A. Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* 2003;314(1):157–166.
- ²³⁶ Korc M, Friesel RE. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9(5):639–651.
- ²³⁷ Presta M, Dell’Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(2):159–178.
- ²³⁸ Tsimafeyeu I, Demidov L, Stepanova E, et al. Overexpression of fibroblast growth factor receptors FGFR1 and FGFR2 in renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2011;45(3):190–195.
- ²³⁹ Rasmuson T, Grankvist K, Jacobsen J, et al. Impact of serum basic fibroblast growth factor on prognosis in human renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2001;37(17):2199–2203.
- ²⁴⁰ Fukata S, Inoue K, Kamada M, et al. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma. *Cancer* 2005;103(5):931–942.
- ²⁴¹ Horstmann M, Merseburger AS, von der Heyde E, et al. Correlation of bFGF expression in renal cell cancer with clinical and histopathological features by tissue microarray analysis and measurement of serum levels. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131(11):715–722.
- ²⁴² Porta C, Paglino C, Imarisio I, et al. Changes in circulating pro-angiogenic cytokines, other than VEGF, before progression to sunitinib therapy in advanced renal cell carcinoma patients. *Oncology* 2013;84(2):115–122.
- ²⁴³ Welti JC, Gourlaouen M, Powles T, et al. Fibroblast growth factor 2 regulates endothelial cell sensitivity to sunitinib. *Oncogene* 2011;30(10):1183–1193.
- ²⁴⁴ Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 2014; 505 (7484): 495–501.
- ²⁴⁵ Lang GA, Iwakuma T, Suh YA et al. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*. 2004;17;119(6):861-72
- ²⁴⁶ Aschauer L, Muller PA. Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function. *Biochem Soc Trans*. 2016; 15;44(2):460-6.

-
- 247 Haupt S, Raghu D, Haupt Y. Mutant p53 drives cancer by subverting multiple tumor suppression pathways. *Front Oncol* 2016;27;6:12.
- 248 Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(23):8204-9.
- 249 Kast K, Schoffer O, Link T et al. Trastuzumab and survival of patients with metastatic breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2017;296(2):303-312.
- 250 Cordani M, Oppici E, Dando I et al. Mutant p53 proteins counteract autophagic mechanism sensitizing cancer cells to mTOR inhibition. *Mol Oncol* 2016;10(7):1008-29.
- 251 Dando I, Cordani M, Donadelli M. Mutant p53 and mTOR/PKM2 regulation in cancer cells. *IUBMB Life* 2016;68(9):722-6.
- 252 Fay AP, de Velasco G, Ho TH et al. Whole-Exome Sequencing in Two Extreme Phenotypes of Response to VEGF-Targeted Therapies in Patients With Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;14(7):820-4.
- 253 Pal SK, Sonpavde G, Agarwal N et al. Evolution of Circulating Tumor DNA Profile from First-line to Subsequent Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2017;72(4):557-564.
- 254 Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K et al. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov* 2014;4(5):554-63.
- 255 Gonias SL and Campana WM. LDL Receptor-Related Protein-1. A Regulator of Inflammation in Atherosclerosis, Cancer, and Injury to the Nervous System. *Am J Pathol* 2014 ;184(1):18-27.
- 256 Van Leuven F, Cassiman JJ, Van Den Berghe H. Demonstration of an alpha2-macroglobulin receptor in human fibroblasts, absent in tumor-derived cell lines. *J Biol Chem* 1979;254:5155-5160.
- 257 Gonias SL, LaMarre J, Crookston KP et al. Alpha 2-macroglobulin and the alpha 2-macroglobulin receptor/LRP: a growth regulatory axis. *Ann N Y Acad Sci* 199;737:273-290.
- 258 Li Y, Wood N, Parsons PG et al. Expression of alpha2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein on surfaces of tumour cells: a study using flow cytometry. *Cancer Lett* 1997; 111:199-205.
- 259 McGarvey T, Hussain MM, Stearns ME. In situ hybridization studies of alpha 2-macroglobulin receptor and receptor-associated protein in human prostate carcinoma. *Prostate* 1996, 28:311-317.
- 260 Huang XY, Shi GM, Devbhandari RP et al. Low level of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 predicts an unfavorable prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *PLoS One* 2012, 7:e32775.
- 261 Liu CX, Musco S, Lisitsina NM et al. LRP-DIT, a putative endocytic receptor gene, is frequently inactivated in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2000; 60: 1961-7
- 262 Langbein S, Szakacs O, Wilhelm M et al. Alteration of the LRP1B gene region is associated with high grade of urothelial cancer. *Lab Invest* 2002; 82: 639-43.
- 263 Sonoda I, Imoto I, Inoue J et al. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 3741-7.
- 264 Nakagawa T, Pimkhaokham A, Suzuki E et al. Genetic or epigenetic silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2006; 97: 1070-4.
- 265 Lu YJ, Wu CS, Li HP et al. Aberrant methylation impairs low density lipoprotein receptor-related protein 1B tumor suppressor function in gastric cancer. *Genes Chromosom Cancer* 2010; 49: 412-24.
- 266 Ni S, Hu J, Duan Y et al. Down expression of LRP1B promotes cell migration via RhoA/Cdc42 pathway and actin cytoskeleton remodeling in renal cell cancer. *Cancer Sci* 2013;104(7):817-25.



TESIS DOCTORAL

**VALOR PRONÓSTICO DE LAS ALTERACIONES
GENÉTICAS DE LA VÍA MTOR EN PACIENTES
CON CÁNCER RENAL METASTÁSICO TRATADOS
CON INHIBIDORES DE MTOR**



Universitat Autònoma de Barcelona