

BIOMARCADORES DE CÁNCER DE PULMÓN Y COLON Y SU IMPORTANCIA EN TERAPIAS DIRIGIDAS

Unidad Predepartamental De Medicina



AUTOR: *Pedro José González Pedraza*
TUTOR/A: *Esther Roselló Sastre*
ASIGNATURA: *Anatomía Patológica*



TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA

EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

TÍTULO del TFG: *Biomarcadores Circulantes proteicos y colon) su importancia en Terapias dirigidas*

ALUMNO/A: *Pedro José Corral Pedraza*

DNI: *08283837 F*

PROFESOR/A TUTOR/A: *Erlin Rosello Sastre*

Fdo (Tutor/a):

COTUTOR/A INTERNO/A (Sólo en casos en que el/la Tutor/a no sea profesor/a de la Titulación de Medicina):

Fdo (CoTutor/a interno):

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
Extended summary	4
Listado de todas las abreviaturas utilizadas	6
Introducción	7
Epidemiología	7
Resistencias al tratamiento	8
Cáncer de colon	9
Cáncer de pulmón	9
Biomarcador	10
Mutaciones genéticas	11
Nuevas opciones terapéuticas	13
Objetivo	14
Objetivos secundarios:	14
Material	14
Casos	15
Criterios de inclusión:	15
Criterios de exclusión:	15
Variables de estudio	16
Métodos	17
Detección de mutaciones	17
Extracción de datos	18
Resultados	19
Variables clínicas	19
Variables histológicas	19
Diagnóstico principal	19
Grado tumoral	20
Otros diagnósticos:	21
Variables moleculares:	21
Discusión	30
Método empleado	31
Carcinoma pulmonar	32
Carcinoma colo-rectal	37
Conclusión	43
Bibliografía	44

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: En la Comunidad Valenciana, durante el año 2013, el número total de muertes producidas por cáncer de pulmón fue de 427 mujeres, y de 1895 hombres, mientras que el cáncer de colon produjo 925 muertes en hombres y 678 en mujeres, posicionándose, ambos, como los dos tipos de cáncer que presentan mayor mortalidad dentro de la Comunidad. Esta mortalidad tan elevada se debe, entre otros factores, a la ineficacia de los tratamientos convencionales, y es aquí, donde las nuevas terapias dirigidas como los inhibidores del gen EGFR o el uso de inmunoterapia, adquieren una gran relevancia.

OBJETIVOS: Conocer el estado mutacional de los cánceres de pulmón y colon diagnosticados en el Hospital General Universitario de Castellón en los últimos años, respecto a los genes que se consideran biomarcadores susceptibles de tratamiento en estos momentos, que son: EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, ALK, MLH1, MSH6, MSH2, PMS2 y la expresión de la proteína PDL1.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio transversal descriptivo retrospectivo de 150 muestras de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón y colon, sobre los que se han realizado dos tipos de pruebas de detección de mutaciones, como son, la PCR en tiempo real e Inmunohistoquímica. Se analizaron variables clínicas, histológicas y moleculares de cada una de las muestras obtenidas.

RESULTADOS: De las 150 muestras disponibles para el estudio, 88 muestras de pacientes diagnosticados de cáncer de colon fueron aptas para el estudio de los marcadores: KRAS, NRAS, BRAF e inestabilidad de microsatélites (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), mientras que, en las restantes 63 muestras, pertenecientes a pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón, se estudiaron: EGFR, ALK, y PDL1. De las 88 muestras de cáncer de colon, tenemos 36, que presentan mutación en KRAS, 5 en NRAS, 8 en BRAF y 9 para los marcadores de inestabilidad de microsatélites (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). De las 63 muestras de cáncer de pulmón, tenemos 4 que presentan mutación en EGFR, 0 en ALK y 24 muestras que expresaron PDL1.

CONCLUSIÓN: Después de analizar y comparar los resultados de nuestro trabajo, podemos concluir que el perfil mutacional en nuestra área es muy similar a los perfiles mutacionales de pacientes de otras regiones nacionales e internacionales.

ABSTRACT

BACKGROUND: In the Comunidad Valenciana, during 2013, the total number of deaths caused by lung cancer was 427 women, and 1895 men, while colon cancer produced 925 deaths in men and 678 in women, positioning themselves as the two types of cancer that present the highest mortality within the Community. This high mortality is due, among other factors, to the lack of effectiveness of conventional treatments, and this is where new targeted therapies acquire great relevance, such as EGFR gene inhibitors or the use of immunotherapy.

OBJECTIVES: To know the mutational status of lung and colon cancers diagnosed in Hospital General de Castellón in recent years, regarding the genes that are considered biomarkers susceptible to treatment at this time, which are: EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, ALK, MLH1, MSH6, MSH2, PMS2 and the expression of the PDL1 protein.

MATERIAL AND METHODS: The study carried out corresponds to a retrospective descriptive cross-sectional study of 150 samples obtained from patients diagnosed with lung and colon cancer, on which two types of mutation detection tests have been performed, such as real-time PCR and immunohistochemistry. Clinical, histological and molecular variables of each of the samples obtained were analyzed.

RESULTS: Out of the 150 samples available for the study, 88 samples from patients diagnosed with colon cancer were suitable for the study of the markers: KRAS, NRAS, BRAF and microsatellite instability (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), while, in the remaining 63 samples, belonging to patients diagnosed with lung cancer, were studied: EGFR, ALK, and PDL1. Of the 88 colon cancer samples, we have 36, which present a mutation in KRAS, 5 in NRAS, 8 in BRAF and 9 for markers of microsatellite instability (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Of the 63 samples of lung cancer, we have 4 that show mutation in EGFR, 0 in ALK and 24 samples that expressed PDL1.

CONCLUSION: After analyzing and comparing the results of our work, we can conclude that the mutational profile in our area is quite similar to the mutational profiles of patients from other national and international regions.

KEYWORDS: Colon cancer; Lung cancer; Biomarker; Gene; Mutation; Targeted treatment

EXTENDED SUMMARY

BACKGROUND: Currently, about 40,000 people die in the Comunidad Valenciana for various reasons, and death caused by cancer is responsible for 26.4% of them, with about 10,560 deaths per year. The distribution by gender shows a minimal difference, being the deaths of males responsible for 60% of the total, 6,570 deaths, while in women they are 38% 4,030 deaths. Within colon cancer we have 3 divisions or categories which we know as: hereditary nonpolyposis colorectal cancer, hereditary polyposis colorectal cancer and non-hereditary or sporadic colorectal cancer. Within the sporadic colon cancer, we find that the gene that is first mutated is the APC gene that results in the activation of the different molecular pathways, like the KRAS path. In our work we will focus on the analysis of other equally important genes in the colorectal cancer such as KRAS, NRAS or EGFR. Regarding the molecular basis of colon cancer, we can make a division into squamous cell carcinoma, small cell carcinoma and adenocarcinoma. In our study, we will mainly work with cases of adenocarcinoma. The pulmonary adenocarcinoma is based on the mutations with gain of function that works disturbing the signaling pathways like the epidermal growth factor receptor pathway, also known as EGFR.

Nowadays, we find multiple options and therapeutic lines available for the treatment of almost all the existing cancers, but also, and increasingly, we find multiple mechanisms of resistance to them. This causes that the drug does not have any clinical efficacy and even that it has harmful effects on the health of the patient, which is the opposite effect to the one we intend to achieve. These genetic mutations that we will explain later cause tumors with cellular and behavioral differences, which make the treatment to be different from one patient to another or, better said, from one type of mutation to another. In the case of lung cancer, non-small cell lung adenocarcinomas treated with tyrosine kinase inhibitors, which will be discussed later, only respond to these if they have a mutation in the EGFR gene.

In colon cancer, the biomarkers that are used routinely are: fecal occult blood, CEA embryo carcinoma antigen (postoperative follow-up of patients who have received chemotherapy or some type of surgery), germline mutations in the genes that cause instability of microsatellites (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) and the germline mutation in the APC gene. These markers are not all the markers that are known, but they are the ones that have the best cost effectiveness ratio, so they are the ones that are used routinely.

Therefore, the use of these targeted therapies allows us not only to attack the disease to try to eradicate it, but to improve the quality of life of patients as much as possible without subjecting them to treatments with a multitude of side effects harmful to them.

OBJECTIVES: The main objective is to know the mutational status of lung and colon cancers diagnosed in the Hospital General de Castellón, in recent years, regarding the genes that are considered biomarkers susceptible to treatment at this time, such as KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, ALK, MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 and the presence of the PDL1 protein.

MATERIAL AND METHODS: The patients used in the study respond to patients of any age, and of both sexes, diagnosed of primary or metastatic colon and lung adenocarcinoma, in the period

from 1 January of 2016 to 31 December of 2018, at the General Hospital of Castellón , which have been able to perform a mutational study on the neoplastic tissue of the KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, ALK, MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 genes and the expression of PD-L1.

For colon cancer, a partial resection of tissue has been used, and secondly an endoscopic biopsy (paraffin material in both cases). For lung cancer, paraffin biopsy material has been used (bronchoscopy, cylinder or resection of metastasis, and in some cases, cytology due to FNAB. For the detection of mutations, two types of tests have been used, namely: real-time PCR and IHC (immunohistochemistry). The data has been obtained from the pathological anatomy database of the Hospital General de Castellón, through a search based on the list of techniques performed in the period from 1 January of 2016 to 31 December of 2018. From there, the patient's biopsy or cytology reports have been obtained, with the content of the complete oncological report.

RESULTS: Respect to KRAS, we obtained that, out of the 36 samples that present mutation, 20 samples show a mutation in EXON 2 G12X (A, C, D, R, S, V), 6 samples in the EXON 2 G13X (A, C, D, R, S, V), 5 samples in the EXON 2 12X and 13X CODONS, 2 samples in the EXON 3 Q61X (E, Hc, Ht, K, L, P, R), 2 samples in the EXON 4 A146X (P, T, V) and 1 sample in the EXON 2 CODON 12: G12A (GCT). As for NRAS, of those 5 samples that show a mutation, 3 of them show the mutation in G12X, 1 in G13X and 1 sample in Q61X. Respect to BRAF we only found 8 samples that present a mutation in BRAF V600E, while 9 samples present a type of loss in the genes responsible for the stability of microsatellites. Of these 9 samples, 4 presented a loss of expression for MLH1 and PMS2, 3 samples showed loss of PMS2 expression in an isolated way and another 2 samples showed only loss of expression of MSH6. Regarding MSH2 we do not have any sample that shows loss of its expression. Respecting EGFR, of the 4 mutated samples, 3 samples showed a mutation in (EXÓN 19 EX19DEL) and 1 sample in (EXÓN 21 L861Q). The expression of PDL1 was present in 24 samples, but in different percentage of tumor cells. In relation to the number of cells expressing this protein, we found 10 samples in which the expression was equal to or less than 10%, 5 samples with a percentage of cells between (20-50%), 1 sample with 20%, 2 samples with 40% and 2 samples with 50%. Finally, we have 9 samples with a percentage of tumor cells between (60-100%), 4 with 60%, 1 with 70%, 1 with 80%, 3 with 90% and 1 with 100%.

CONCLUSION: We can conclude that the results obtained about the mutational profile of the patients affected by colon and lung cancer diagnosed in the Hospital General de Castellón correspond to the data obtained by other national and international studies, so that the targeted treatments proposed in these works, anti EGFR, anti ALK, inhibitors of PDL1 and others, can be a very interesting option within the therapeutic arsenal among the hospitals of the Province of Castellón.

LISTADO DE TODAS LAS ABREVIATURAS UTILIZADAS

APC	Adenomatous polyposis coli (poliposis adenomatosa coli)
ALK	Cinasa de linfoma anaplásico
EGFR	Gen que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico
PI3K	Fosfoinositida-3-quinasas
BRAF	Gen que Codifica la proteína B-Raf
NRAS	Gen que Codifica la proteína N-Ras
KRAS	Gen que Codifica la proteína K-Ras
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
MLH1	Gen que codifica la proteína MLH1
MSH2	Gen que codifica la proteína MSH2
PMS2	Gen que codifica la proteína PMS2 (Post-Meiotic Segregation Increased)
2	
MSH6	Gen que codifica la proteína (homólogo 6 MutS)
ROS	Gen que codifica la proteína ROS1
MET	Gen que codifica el receptor de crecimiento hepatocitario
RET	Gen que codifica un receptor para el factor neurotrópico glial
MAPK	Gen que codifica la proteína Mitogen-Activated Protein Kinases (proteína quinasa mitógeno activada)
PTEN	Gen codifica la proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin (diana mamalia de rapamicina)
PAAF	Punción-aspiración con aguja fina
IHQ	Inmunohistoquímica

INTRODUCCIÓN

EPIDEMIOLOGÍA

A día de hoy, en la Comunidad Valenciana, cerca de 40.000 personas mueren anualmente por diversas causas, siendo la muerte por cáncer responsable de un 26,4% de las mismas, con cerca de 10.560 fallecimientos. La distribución por género muestra un baremo ligeramente desigual, siendo las muertes de varones responsables del 60% del total, (6.570 muertes), mientras que en las mujeres son de un 38% (4.030 muertes) ⁽¹⁾.

El cáncer con más mortalidad en ambos sexos es el cáncer de pulmón, con un 37,7% del total, seguido de cerca por el cáncer de colon con un 30,3%. En mujeres el cáncer con más mortalidad es cáncer de colon y recto, luego el de mama y finalmente el de pulmón. En hombres esta proporción se invierte, pues el cáncer con más mortalidad es el de pulmón, seguido de colon y recto y finalmente próstata ⁽¹⁾.

Dentro del cáncer de colon y recto nos encontramos con que el tumor más frecuente dentro de este grupo es el adenocarcinoma de colon, el cual es responsable de cerca de 600.000 defunciones al año en todo el mundo ⁽²⁾. Fue el de mayor incidencia en el año 2007 en la provincia y se posiciona en tercer lugar en cuanto a frecuencia, después de cáncer de próstata y vejiga. Respecto a los hombres nos encontramos con una tasa de 2124 casos nuevos durante el año 2013. En cuanto a las mujeres tenemos 1462 casos nuevos. Las muertes ocurridas en hombres son de 925 casos, un 43,5%, mientras que en mujeres las muertes ocurridas fueron de 678, un 46%, un porcentaje muy similar. La distribución por edad muestra que en hombres la edad media de aparición es de 69 años, y en mujeres de 70. En cuanto a la distribución geográfica, se muestra un patrón heterogéneo y sin zonas con gran acumulación de casos. ⁽³⁾

Respecto al cáncer de pulmón podemos observar que cerca del 90% de todos los casos son carcinomas. Hoy en día el cáncer de pulmón es el cáncer con mayor mortalidad asociada a nivel mundial. A pesar de que la incidencia en mujeres haya aumentado considerablemente, son los hombres los que poseen un porcentaje mayor de años de vida perdidos, con un 30% del total ⁽⁴⁾.

Continuando con las cifras de la Comunidad Valenciana, se estima que se diagnosticaron en el año 2013 alrededor de 2061 casos de cáncer de pulmón en hombre. La edad media de aparición fue de 68 años en hombres y 62 años en mujeres. En mujeres el número de casos de cáncer de pulmón diagnosticados durante el año 2013 fueron 515, muy por debajo al número de casos diagnosticados en hombres. El número total de muertes por cáncer de pulmón en

mujeres fue de 427, un 83%, mientras que en hombre fue de 1895, un 92%. El porcentaje de años de vida perdidos para las mujeres es de un 15,4%, mientras que en hombres es de un 30%. Respecto a la distribución geográfica el patrón de incidencia es de norte a sur y de costa hacia el interior siendo ésta más alto en los primeros lugares y menores en los segundos ⁽⁴⁾.

Todos estos datos nos dan una idea bien formada de la gran importancia de estos tipos de cánceres y de su morbimortalidad dentro de la Comunidad Valenciana, por lo que todos los esfuerzos posibles para disminuir tanto la incidencia, como la mortalidad, son fundamentales.

RESISTENCIAS AL TRATAMIENTO

En la actualidad nos encontramos con múltiples opciones y líneas terapéuticas disponibles para el tratamiento de casi la gran totalidad de cánceres existentes, pero también, y cada vez más, nos encontramos con múltiples mecanismos de resistencia a los mismos. Esto provoca que el fármaco no tenga ninguna eficacia clínica e incluso que tenga efectos nocivos sobre la salud del paciente, lo cual es el efecto contrario al que pretendemos conseguir.

Llegados a este punto, sería más correcto hablar de ineficacia en vez de resistencia, pues el mecanismo no es el mismo por el cual, por ejemplo, las bacterias producen resistencias a ciertos antibióticos por un uso inadecuado de estos o por el uso de uno que no es efectivo para el tipo de manera específica. Esta ineficacia viene de la mano de multitud de procesos moleculares que se pueden reducir en diversas mutaciones genéticas. Estas mutaciones genéticas que posteriormente explicaremos provocan tumores con diferencias celulares y de comportamiento, que hacen que el tratamiento tenga que ser diferente de un paciente a otro o, mejor dicho, de un tipo de mutación a otro. En el caso de cáncer pulmón, los adenocarcinomas de pulmón de célula no pequeña tratados con inhibidores de la Tirosin kinasa que posteriormente comentaremos, sólo responden a éstos si poseen una mutación en el gen EGFR, similar a los inhibidores del gen ALK.

En el caso del cáncer de colon, en aquellos casos de adenocarcinomas de colon el tratamiento habitual con inhibidores del EGFR es solo efectivo en aquellos casos en los que el

gen KRAS no se encuentra mutado, y el uso de quimioterapia basadas en fluoruacilo es ineficaz en casos con inestabilidad de microsátélites, concepto que trataremos en el trabajo.

CÁNCER DE COLON

El cáncer de colon es el resultado de diversos cambios moleculares que asientan sobre las células epiteliales de la mucosa del colon. Esto da como resultado la aparición de diversas lesiones precancerosas denominadas pólipos, que, aunque supongan lesiones benignas pueden, a lo largo del tiempo, pueden evolucionar a lesiones malignas. En primera instancia los pólipos pueden clasificarse según su morfología en benignos o malignos, siendo los pólipos hiperplásicos los de mejor pronóstico y los pólipo sésiles o serrados los de peor pronóstico. Los pólipos más grandes, son los que mayor riesgo tienen de transformación tumoral, por eso, es necesario una estrecha vigilancia en aquellos pacientes de más de 50 años o con historia familiar de cáncer de colon o de pólipos ⁽⁶⁾.

Dentro del cáncer de colon tenemos 3 divisiones o categorías las cuales conocemos como cáncer colorrectal hereditario no polipósico, cáncer colorrectal hereditario polipósico y cáncer colorrectal no hereditario. Dentro del cáncer de colon esporádico encontramos que el gen que primero muta es el gen APC que da como resultado la activación de diversas vías moleculares, preferentemente la vía de KRAS ⁽²⁾. En nuestro trabajo nos centraremos principalmente en el análisis de otros genes igualmente importantes en el cáncer colorrectal como KRAS, NRAS o EGFR.

CÁNCER DE PULMÓN

En cuanto a la genética molecular del cáncer de pulmón podemos observar que el proceso de carcinogénesis es resultado de una acumulación progresiva de mutaciones de oncogenes conductoras que transforman las células epiteliales en células neoplásicas. El efecto de campo es un proceso que se da en aquellos pacientes fumadores y consiste en que en el epitelio bronquial benigno vecino a la zona displásica, del paciente fumador se pueden encontrar zonas con cambios genéticos asociados al cáncer, por lo que estas mutaciones se dan tras la exposición al humo del tabaco. Según sus bases moleculares podemos realizar una división del cáncer de pulmón en: carcinoma epidermoide, carcinoma de células pequeñas y el adenocarcinoma. En nuestro estudio trabajaremos principalmente con casos de adenocarcinoma por lo que daremos una breve pincelada del mismo ⁽²⁾.

La aparición del adenocarcinoma se basa en mutaciones con ganancias de función que afectan a las vías de señalización del receptor del factor de crecimiento EGFR ⁽⁷⁾. Nos encontramos con mutaciones en genes como EGFR, ALK, ROS, MET y RET y KRAS. EL adenocarcinoma constituye un tumor maligno epitelial cuya diferenciación es glandular y produce mucina por las células que lo componen.

BIOMARCADOR

Un biomarcador se puede definir como cualquier característica biológica, bioquímica o fisiológica que puede cuantificarse de manera cuantitativa o cualitativa y que puede ser identificada con un proceso fisiológico o patológico determinado. Los biomarcadores también pueden ser utilizados para medir una respuesta farmacológica o realizar un seguimiento de una intervención terapéutica determinada. Las características más importantes de éstos son la especificidad, la sensibilidad y la eficiencia. De nada vale un biomarcador muy específico y sensible si su coste es tan elevado que no puede ser financiado por el sistema público de salud, y por lo tanto su uso está muy restringido, y de nada vale un biomarcador muy barato y accesible si su especificidad y sensibilidad es muy baja ⁽⁸⁾.

En el cáncer de colon los biomarcadores que se utilizan de rutina son: sangre oculta en heces, antígeno carcinoma embrionario CEA (seguimiento postoperatorio de pacientes que han recibido quimioterapia o algún tipo de cirugía), mutaciones en línea germinal en los genes que provocan inestabilidad de microsatélites (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) y la mutación en línea germinal en el gen APC. Estos marcadores no son la totalidad de los marcadores que se conocen, pero sí que son los que mejor coste efectividad tienen, por lo que son los que se emplean de manera rutinaria.

Por otro lado, una vez establecido el tumor, podemos estudiar los cambios en línea somática. Un marcador muy importante es la mutación del gen KRAS, pues el efecto directo y más importante de su mutación, es la ineficacia hacia el tratamiento convencional, por lo que no se obtiene ninguna mejoría clínica del uso de esta terapia ⁽⁹⁾.

Respecto a los biomarcadores rutinarios empleados en el cáncer de pulmón podemos encontrar el estudio de mutaciones somáticas de los genes EGFR y el ALK. Otros biomarcadores que no se emplean de rutina pero que sí que sería recomendable su estudio son las mutaciones somáticas en los genes ROS, KRAS, BRAF o MET. El biomarcador que más nos interesa en este

tipo de tumor es el gen EGFR, pues su mutación produce una activación perpetua de vías de señalización importantes como MAPK, PI3K, AKT, PTEN y mTOR. ⁽¹⁰⁾ Las mutaciones en este gen son una importante diana terapéutica pues el empleo de agentes anti EGFR como el Gefitinib y Erlotinib ha demostrado su gran eficacia consiguiendo respuestas superiores al 65% en ciertos estudios ⁽¹³⁾.

MUTACIONES GENÉTICAS

Como ya hemos comentado en los apartados anteriores el estudio de los genes como biomarcadores es fundamental para un adecuado proceso de selección terapéutica y de filiación tumoral correcta. A continuación, explicaremos de manera concisa la importancia de cada uno de los genes que hemos nombrado anteriormente y de cómo podemos utilizar esa información para el beneficio terapéutico, mientras que en la discusión trataremos cada gen y cada vía de manera más extensa y completa para su correcto entendimiento. En primer lugar, haremos una distinción entre 4 conceptos diferentes, que son: la inestabilidad cromosómica, mecanismos epigenéticos de alteración, inestabilidad de microsatélites, y evasión del sistema inmune.

- ❖ Inestabilidad cromosómica: este mecanismo conlleva diversas mutaciones en los diferentes genes que encontramos, y que son: genes supresores de tumores y protooncogenes. Los genes supresores de tumores se encargan como su nombre indica, de eliminar todas aquellas células que, por diversos motivos, se han convertido en células tumorales y suponen un riesgo para el organismo. Los protooncogenes se encargan de la activación de múltiples vías de señalización que se encargan de funciones de crecimiento y desarrollo celular, por eso una mutación en uno de estos genes implica una ganancia de función anómala, que desemboca en mayor riesgo de surgir un tumor. Cuando un protooncogen muta se denomina oncogen. Veamos algunos de los genes que nos interesan por estar implicados en las patologías estudiadas:
 - Gen KRAS (protooncogén): este gen está formado por seis exones y se localiza en el cromosoma 12p12. Pertenece a la familia de proteínas RAS, que tienen un papel fundamental en la transducción de señales que intervienen en procedimientos de crecimiento celular y de diferenciación. Además del cáncer colorrectal esta familia ha sido asociada a otro tipo de tumores como son de páncreas, pulmón, vejiga, melanoma etc. Dentro de esta familia encontramos a KRAS, NRAS y HRAS, muy similares en su secuencia. La mutación en KRAS condiciona una falta de respuesta al tratamiento convencional utilizado en el cáncer de colon, que son los inhibidores del EGFR, condicionando un mal pronóstico de la enfermedad ⁽¹²⁾.

- Gen NRAS (protooncogén): se encuentra localizado en el cromosoma 11 en la posición 15.5 y pertenece, como ya hemos comentado, a la familia de proteínas Ras. Su función es muy similar a la de KRAS, pero la frecuencia de aparición de mutaciones es mucho menor, por lo que su implicación a nivel de biomarcador está menos estudiada. Podemos destacar que en el estudio realizado por Cicenás et al. ⁽⁷⁾, se sugiere, después de analizar los resultados, que NRAS podría ser utilizado de manera eficiente como biomarcador predictivo de la respuesta al tratamiento basado en bevacizumab, un inhibidor del factor de crecimiento del endotelio vascular ⁽¹²⁾.
 - Gen BRAF (protooncogén): este gen se encuentra en el cromosoma 7q34 y está conformado por 18 exones. Forma parte de la vía de señalización RAS-RAF-MAPK, que posteriormente explicaremos. La mutación de BRAF supone una mala respuesta al tratamiento anti EGFR que se emplea ampliamente en el cáncer de pulmón, y como tal, confiere mal pronóstico. La mutación de este gen está asociada a la aparición de inestabilidad de microsatélites, pues hasta en el 91% de casos con inestabilidad de microsatélites está presente ⁽⁷⁾.
 - Gen EGFR (protooncogén): pertenece a la familia de receptores de membrana con actividad tirosin kinasa, que se conoce como ErbB. Su activación implica el funcionamiento de vías oncogénicas como MAPK, PI3K, Akt, PTEN o mTor. Las mutaciones más frecuentes se dan en los exones 18 y 21. Este gen es una importante diana terapéutica pues el empleo de agentes anti EGFR como el Gefitinib y Erlotinib ha demostrado su gran eficacia consiguiendo respuestas superiores al 65% en ciertos estudios ⁽¹³⁾, en los pacientes con EGFR mutado.
 - Gen ALK: este gen se encuentra localizado en el cromosoma 2 y pertenece a la familia de receptores de insulina kinasa (IKR), que codifica la proteína kinasa del linfoma anaplásico (ALK). Su activación permite la transducción de señales a través de otros receptores tirosin kinasa, como la vía MAPK, STAT3, o PI3K/AKT. Estas vías moleculares están implicadas en procesos de proliferación celular, invasión, metastatizar y resistencia a la apoptosis. La importancia de este gen radica en que su estatus mutado brinda la oportunidad de disponer de un tratamiento denominado inhibidores de ALK que ofrece una eficacia mayor que los tratamientos convencionales ⁽¹⁴⁾.
- ❖ Inestabilidad de microsatélites: esta condición se da cuando ocurren errores en el sistema de reparación del ADN, que surgen como consecuencia de errores en la complementariedad de bases, lo que genera la repetición de secuencia cortas en tándem y por lo tanto un incremento en las mutaciones. Se da un fenómeno conocido como mismatch repair deficiency, (MMRD), que es un mecanismo por el cual las inserciones o deleciones erróneas producidas por la replicación y recombinación son reagrupadas y reparadas para conservar la estabilidad genómica. La pérdida de actividad de estas proteínas conduce a una falta de estabilidad del conjunto y por lo tanto a una inestabilidad de microsatélites. Esto conlleva un viraje hacia un fenotipo mutador. Esta inestabilidad nos la encontramos principalmente

en los estadios más tempranos de la enfermedad mientras que disminuye en el estadio metastásico, ⁽¹⁶⁾. En los carcinomas de colon se ha visto que la existencia de IMS en línea somática condiciona una falta de respuesta a la QT convencional con 5-FU ⁽¹⁶⁾.

- ❖ Mecanismos epigenéticos de alteración: en primer lugar, tenemos que conocer lo que se denomina como epigenética, que son todos aquellos mecanismos que ejercen algún tipo de regulación sobre la expresión de los genes sin interceder en su secuenciación del ADN. Por lo tanto, estos mecanismos, en este caso, atribuyen la capacidad de que se inactive la expresión de determinados genes incluyendo el proceso de metilación de las islas CpG, y modificaciones en proteínas como las histonas. Esta metilación produce un silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores y genes cuya función es el control del ciclo celular, y reparación del ADN. Este silenciamiento suele producirse por metilación de MLH1 ⁽¹²⁾ y condiciona también en los carcinomas de colon con metilación de MLH1 en línea somática, una falta de respuesta al 5-FU ⁽¹⁶⁾.
- ❖ Evasión del sistema inmune: dentro de este apartado, incluimos algunos de los mecanismos que tienen las células tumorales para evadir el sistema inmune para poder proliferar sin restricción alguna. En concreto trataremos con la proteína PD-L1, que se define como ligando de muerte programada 1. Cuando se une a una proteína llamada PD-1 produce una inhibición de la actividad de los linfocitos T, por lo que el tumor no encuentra la resistencia natural del propio organismo. Este ligando está codificado por el gen CD274. Además de esta función, este ligando tiene la capacidad de favorecer la supervivencia y crecimiento celular mediante la activación de la ruta metabólica mTOR. Es un biomarcador importante pues su positividad significa que el organismo no está utilizando todos los recursos disponibles para atacar el tumor, y es ahí donde entran los inhibidores del ligando PD-L1 para revertir su situación ⁽¹⁵⁾.

NUEVAS OPCIONES TERAPEUTICAS

Después de analizar brevemente los genes, las mutaciones, y los efectos que estas provocan en la respuesta al tratamiento, debemos insistir en la gran importancia del uso de los biomarcadores en medicina para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas, que sean efectivas y eficientes. Estas terapias dirigidas nos permiten, no solo atacar a la enfermedad para intentar erradicarla, sino, mejorar en todo lo posible la calidad de vida de los pacientes sin someterles a tratamientos con multitud de efectos secundarios y perjudiciales para ellos ^(17,18).

Dentro de este horizonte de expectativas nos encontramos con ciertos tratamientos novedosos que permiten cumplir las premisas ya comentadas, algunos de ellos son:

- Inhibidores de PD-L1 como el pembrolizumab y nivolumab, que actúan positivamente en los tumores con gran expresión de PD-L1.
- Inhibidores del gen EGFR mutado, como el gefitinib.
- Inhibidores de ALK mutado, como crizotinib.
- Inhibidores de BRAF mutado, como el vemurafenib y dabrafenib.

OBJETIVO

Objetivo principal: Conocer el estado mutacional de los cánceres de pulmón y colon diagnosticados en el Hospital General Universitario de Castellón en los últimos años, respecto a los genes que se consideran biomarcadores susceptibles de tratamiento en estos momentos.

Objetivos secundarios:

- Comparar nuestros resultados con los estudios nacionales e internacionales.
- Estudiar asociaciones de dichas mutaciones con diferentes variables clínicas.

MATERIAL

Nuestro trabajo se corresponde con una investigación clínico epidemiológica que hemos llevado a cabo mediante un estudio observacional denominado estudio transversal descriptivo retrospectivo.

CASOS

La selección de casos oportunos para el trabajo de investigación se ha realizado siguiendo ciertas directrices para poder ser incluidos, como son:

Criterios de inclusión:

- Pacientes de cualquier edad, y de ambos sexos diagnosticados de adenocarcinoma de colon primario o metastásico y adenocarcinoma de pulmón primario o metastásico, en el periodo 1 enero 2016 - 31 diciembre 2018, en el Hospital General de Castellón, a los que se les ha podido realiza un estudio mutacional sobre el tejido neoplásico de los genes KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, ALK, MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 y la expresión de PD-L1.

Criterios de exclusión:

- Todos aquellos casos en los que alguno de los estudios pertinentes para el trabajo se encuentra pendiente o no se ha llevado a cabo por falta de tejido neoplásico.

Después de aplicar los criterios anteriormente expuestos empezamos nuestro trabajo con:

- 89 casos de adenocarcinoma de colon, de los que el material necesario para su estudio ha sido extraído mediante:
 - Biopsia endoscópica: 23

- Resección parcial (pieza quirúrgica de colon, recto, metástasis): 59
- Cilindro hepático: 4
- 65 casos de adenocarcinoma de pulmón, de los que el material necesario para su estudio ha sido extraído mediante:

1.-CITOLOGÍA

- PAAF de ganglio linfático: 16
- PAAF de pulmón: 2
- Citología de aspirado bronquial: 2
- Citología de líquido pericárdico: 1

2.-BIOPSIA

- Biopsia endoscópica: 26
- Cilindro de pulmón: 8
- Biopsias por incisión de cerebro: 4
- Cilindro de hígado: 2
- Biopsia por incisión de hueso: 1

VARIABLES DE ESTUDIO

Variables clínicas

- Edad del paciente.
- Sexo del paciente.

Variables histológicas

- Diagnóstico principal.
- Grado y estadio tumoral.
- Otros diagnósticos.

Variables moleculares

- Gen KRAS

- Gen NRAS
- Gen EGFR
- Gen BRAF
- Gen MLH1
- Gen PMS2
- Gen MSH2
- Gen MSH6
- Gen ALK
- Expresión de PDL1

MÉTODOS

DETECCIÓN DE MUTACIONES

Para cualquier tipo de estudio molecular (EGFR, ALK, KRAS, otros) es necesario tener material tumoral suficiente, por tanto, los métodos de extracción de material han variado dependiendo de cada uno de los tres tipos principales de cáncer estudiados, colon y pulmón.

Para el cáncer de colon se ha utilizado mayoritariamente una resección parcial de tejido, y en segunda instancia una biopsia endoscópica (material parafinado en ambos casos). Para el cáncer de pulmón se ha utilizado material de biopsia parafinada (broncoscopia, cilindro o resección de metástasis, y en algunos casos, de citología por PAAF).

Para la detección de las mutaciones se han utilizado principalmente dos tipos de pruebas, que son: PCR en tiempo real e IHQ (inmunohistoquímica).

- **PCR en tiempo real:** es una variante de la PCR (polymerase chain reaction) que se emplea para amplificar y simultáneamente cuantificar en valor absoluto el resultado de la amplificación del ADN. La diferencia con la PCR estándar radica en la adición de unas sustancias llamadas fluoróforos que permiten medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. El sistema de detección utilizado ha sido el sistema Cobas 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), que está compuesto por el automático cobas X, el termociclador cobas Z y el software necesario para la realización de una PCR a tiempo real con primers para KRAS, EGFR, BRAF y NRAS, mostrando los resultados de forma automática en pantalla. La extracción del ADN se ha obtenido a partir del material parafinado (biopsias) o material fresco (citología en medio líquido). Para cada gen que

se quiere estudiar hay un kit cobas 480 diferente, centrándonos en 4 de los más importantes que son el de KRAS, EGFR y BRAF y NRAS.

- El kit cobas 480 para KRAS utiliza primers que permiten definir una secuencia de 85 pares de bases para el exón 2 de KRAS, que contiene los codones 12 y 13, muy importantes para el diagnóstico. Este kit permite detectar 7 mutaciones posibles de los exones 12 y 13, pues el 97% de mutaciones suceden en estos exones. Estas 7 mutaciones son: c.34GT, c34GA, c34GC, c35GT, c35GA, c35GC, c38GA.

- El kit cobas 480 para EGFR permite detectar hasta 42 mutaciones en los exones 18, 19 20 y 21 del gen. Este kit utiliza primers con una secuenciación adaptada a cada mutación de cada exón. Detecta las mutaciones por delección ocurridas en el exón 19.

- El kit cobas 480 para BRAF utiliza primers que permiten definir una secuencia de 116 pares de bases. Este test detecta mutaciones en el codón 600 de BRAF, y mutaciones en codones que no son V600E como V600D, V600E2 y V600K.

- El kit cobas 480 Para NRAS permite detectar mutaciones en los exones 2, 3 y 4 y en los codones G12X, G13X y Q61.

- **IHQ:** esta técnica utiliza unos anticuerpos que se unen de manera específica a la sustancia que se quiere identificar. Esta técnica se utiliza en el análisis de ALK, PDL1 y de Inestabilidad de Microsatélites (MLH1, MSH2, PMS2, MSH6)

EXTRACCIÓN DE DATOS

Los datos han sido obtenidos de la base de datos de Anatomía Patológica, mediante una búsqueda a partir del listado de técnicas efectuadas en el periodo 1 enero 2016-31 diciembre

2018. De ahí se han obtenido los informes de la biopsia o citología del paciente, con el contenido del informe oncológico completo.

Para el seguimiento del paciente, se han buscado los informes anteriores o posteriores del paciente, relacionados con su proceso oncológico.

RESULTADOS

A continuación, mostraremos y explicaremos cuáles han sido los resultados obtenidos del total de las 150 muestras sobre las que se han realizado los estudios moleculares. Los resultados se explicarán de acuerdo a cada gen que se ha analizado. Primeramente, describiremos los resultados en bruto, y a continuación veremos las posibles relaciones que se pueden establecer entre ellos.

VARIABLES CLÍNICAS

De las 150 muestras totales, 96 de ellas corresponden a hombres y 50 a mujeres. Cada una de las muestras recogidas corresponde a un paciente excepto 3 pacientes de los cuales se obtuvieron más de 1 muestra. Tanto en un paciente de 51 años con diagnóstico de adenocarcinoma, como en otro de 84 años con el mismo diagnóstico se obtuvieron 3 muestras, por lo que tenemos 146 pacientes y 151 muestras totales. La edad media de los 146 pacientes del estudio es de 67 años, siendo de 68 años para los 96 hombres y 67 para las 50 mujeres, con un rango de edad entre 42-91, siendo el valor absoluto del rango 49 años.

VARIABLES HISTOLÓGICAS

DIAGNÓSTICO PRINCIPAL

En cuanto al tipo de tumor, nos encontramos con:

- 81 tumores primarios colo-rectales, que engloban:
 - 79 adenocarcinomas de colon.
 - 1 adenocarcinoma de recto.
 - 1 adenocarcinoma mucinoso colónico con células en anillo de sello.
- 7 metástasis por adenocarcinoma de colon, de las que:
 - 3 son hepáticas.
 - 1 de pulmón.
 - 3 ganglionares.
- 55 adenocarcinomas primarios de pulmón.
- 26 metástasis por adenocarcinoma de pulmón, que se corresponden con:
 - 4 metástasis cerebrales.
 - 15 metástasis ganglionares, que se dividen en: 1 metástasis ganglionar por Carcinoma de célula clara, subtipo de adenocarcinoma pulmonar, y 14 metástasis ganglionares por adenocarcinoma.
 - 3 metástasis pleurales por adenocarcinomas, que se dividen en: 1 metástasis pleural por carcinoma de células pequeñas, 2 metástasis pleurales por adenocarcinoma pulmonar.
 - 1 metástasis en pericardio.
 - 2 metástasis óseas.
 - 2 metástasis hepáticas.

GRADO TUMORAL

En cuanto al grado tumoral tenemos:

- Adenocarcinomas pulmonares: 39 de bajo grado y 26 de alto grado, aunque el grado tumoral en los carcinomas de pulmón no ha demostrado ser útil en la predicción del pronóstico del paciente.
- Adenocarcinomas colo-rectales: 76 de bajo grado y 12 de alto grado.

OTROS DIAGNÓSTICOS:

En cuanto a otros diagnósticos vemos que la gran mayoría de pacientes muestran algún tipo de patología concomitante tumoral, como son adenocarcinomas o adenomas.

Tenemos:

- Pacientes con cáncer colorrectal: 57 pacientes asocian algún tipo de pólipo colónico, 7 pacientes asocian una hiperplasia endometrial, 3 pacientes asocian quistes odontógenos, 5 pacientes asocian una úlcera gastroduodenal, 1 paciente asocia una esofagitis crónica, 5 pacientes asocian una gastritis y 20 pacientes asocian otro tipo de neoplasias, como neoplasias de recto o de sigma.
- Pacientes con cáncer de pulmón: 6 pacientes asocian otro tipo de neoplasia, como de próstata o vejiga, 3 pacientes asocian algún tipo de pólipo de colon, 2 pacientes asocian una hiperplasia leiomiomatosa, 1 paciente asocia gastritis crónica y 1 paciente asocia una úlcera gastroduodenal.

VARIABLES MOLECULARES:

KRAS:

Hemos estudiado este gen en 88 muestras de 84 pacientes con adenocarcinoma de colon. En 52 muestras no se ha obtenido mutación para este gen, por lo que el gen se encuentra en estado nativo o wild type. En 36 muestras ha presentado las siguientes mutaciones:

Vemos que, de las 36 muestras que presentan esta mutación, 20 muestras la presentan en el exón EXON 2 G12X (A,C,D,R,S,V), 6 muestras en el EXON 2 G13X (A,C,D,R,S,V), 5 muestras en el EXON 2 CODONES 12X y 13X, 2 muestras en el EXON 3 Q61X (E, Hc, Ht, K, L, P, R), 2 muestras en el EXON 4 A146X (P, T, V) y 1 muestra en el EXON 2 CODON 12: G12A(GCT). Por lo tanto, tenemos un 31,7% de mutación del total de muestras.

NRAS:

Estudiado en 88 muestras de 84 pacientes con adenocarcinoma de colon. Con respecto a NRAS, 85 muestras tenían el gen no mutado (wild type) y encontramos solo 5 muestras mutadas del total. De esas 5 muestras, 3 de ellas presentan una mutación en G12X, 1 en G13X y 1 muestra en Q61X. Vemos que, del total de muestras que presentan esta mutación, 1 muestra pertenece a una metástasis, por un adenocarcinoma de colon, 2 muestras pertenecen a un adenocarcinoma de bajo grado y 2 muestras pertenecen a un adenocarcinoma de colon infiltrante.

EGFR:

Este gen ha sido estudiado en 63 muestras de 62 pacientes con Adenocarcinoma de pulmón, donde se incluyen 57 casos de tumores primario y 8 casos de metástasis.

Después de realizar el análisis, encontramos 59 muestras con el gen no mutado o wild type y 4 muestras con el gen EGFR mutado. De estas 4 muestras mutadas, 3 muestras presentan una mutación en (EXÓN 19 EX19DEL) y 1 muestra en (EXÓN 21 L861Q). Tres de las muestras son adenocarcinomas de pulmón primarios y un derrame pleural compatible con metástasis de adenocarcinoma de pulmón.

BRAF:

Estudiado en 88 muestras de 84 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de colon, siendo 81 de ellos primarios y 7 metástasis.

Después de realizar el análisis, encontramos 80 muestras con el gen BRAF no mutado o wild type, y 8 muestras en las que sí que está mutado. Las 8 muestras mutadas se corresponden con la mutación de BRAF en V600E.

INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MLH1, PMS2, MSH6, MSH2):

Estudiado en 88 muestras de 84 pacientes con Adenocarcinoma de colon, siendo 79 de ellos primarios y 7 metástasis. El resultado para 79 muestras es de ausencia de inestabilidad de microsatélites, con patrón normal inmunohistoquímico, basado en la expresión normal de MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6.

Encontramos 9 muestras que presentan un patrón compatible con inestabilidad de microsatélites. De estas 9 muestras, 4 presentan una pérdida de expresión para MLH1 y PMS2, 3 muestras presentan pérdida de expresión de PMS2 de forma aislada y otras 2 muestras presentan pérdida de expresión de MSH6 de forma aislada. En cuanto a MSH2 no tenemos ninguna muestra que presente pérdida de expresión.

ALK:

Este gen se ha estudiado en 63 muestras de 62 pacientes con adenocarcinoma de pulmón, siendo 55 de ellos primarios y 8 metástasis.

En la totalidad de las muestras donde se ha estudiado, 66 muestras, no se ha encontrado mutación alguna por lo que el gen se encuentra en estado wild type. Únicamente hemos obtenido un resultado donde se muestra su presencia en el tejido neuronal normal, que es el control de la técnica, por lo que el resultado no muestra mutación.

Mencionar que, en una de las muestras, correspondiente con un mínimo foco de células tumorales sugestivas de adenocarcinoma de pulmón, no se ha podido medir debido al escaso material obtenido para el estudio.

PDL1:

Estudiado en 63 muestras de 62 pacientes con adenocarcinoma de pulmón, siendo 55 de ellos primarios y 8 metástasis.

La expresión de PDL1 se presentó en 24 muestras, pero en diferente porcentaje de células tumorales. En relación con el número de células que expresaron esta proteína, encontramos 10 muestras en la que la expresión era igual o menor al 10%, 5 muestras con un porcentaje de células de entre (20-50%), 1 muestra con un 20%, 2 muestras con un 40% y 2 muestras con un 50%. Finalmente, vemos a 9 pacientes con un porcentaje de células tumorales entre (60-100%), 4 con un 60%, 1 con un 70%, 1 con un 80%, 3 con un 90% y 1 con un 100%.

En nuestro trabajo se obtuvieron 23 muestras con mutación en el marcador PDL1, correspondiendo esto a un 14,4% del total de las muestras estudiadas.

Una vez descritos los resultados de las variables de nuestro estudio, veremos que posibles asociaciones se pueden establecer entre cada uno de los resultados.

Asociaciones en KRAS

En todas las muestras que presentan mutación en este gen, sólo hay 1 que presenta una alteración concomitante con MSH6, siendo poco frecuente encontrarlo asociado a otras mutaciones. El 98% de las mutaciones en KRAS se dan en muestras de colon y sólo 2 muestras tienen una localización diferente, el hígado.

De las 36 que presentan mutación en KRAS, tenemos 21 hombres y 15 mujeres. Dentro del grupo de los 21 hombres que presentan mutación en este gen, 13 hombres presentaron la mutación en el EXÓN 2 G12X (A,C,D,R,S,V), 5 hombres en el EXÓN 2 G13X (A,C,D,R,S,V), 2 hombres en el EXÓN 2 CODONES 12X y 13X, 2 hombres en el EXÓN 4 A146X (P, T, V), 1 hombre en el EXÓN 2 CODON 12: G12A(GCT) y ningún hombre en el EXÓN 3 Q61X (E, Hc, Ht, K, L, P, R). Respecto a las 15 mujeres, tenemos 7 mujeres que presentaron la mutación en el EXÓN 2 G12X (A,C,D,R,S,V), 1 mujer en el EXÓN 2 G13X (A,C,D,R,S,V), 3 mujeres en el EXÓN 2 CODONES 12X y 13X, 2 mujeres en el EXÓN 3 Q61X (E, Hc, Ht, K, L, P, R) y ninguna mujer en el EXÓN 4 A146X (P, T, V) y EXÓN 2 CODON 12: G12A(GCT).

Respecto a la edad, tenemos que la edad media de los pacientes que presentan alguna mutación en el gen KRAS es de 71 años, que se puede desglosar como, 79 años para los hombres y 63 para las mujeres. La media de edad más alta dentro de todas las mutaciones que se han obtenido acerca de KRAS, resulta en el grupo de pacientes que presentan mutaciones en el EXON 2 CODONES 12 Y 13, con una media de 77 años, seguida por el grupo de pacientes que presentan mutación en el EXON 4 A146X con una media de 76 años y en tercera posición el grupo que presenta mutaciones en el EXON 2 G13X, con una media de 75 años. Con una media de edad más alejada se encuentra el grupo de pacientes que presenta mutaciones en el EXON 2 G12X con una media de 69 años, seguida del grupo de EXON 3 Q61X con una media de 64 años y finalmente una edad de 67 años para el único paciente que ha presentado la mutación en EXON 2 CODON 12: G12A (GCT).

De las 36 muestras que presentan mutación en KRAS, vemos que solo 2 muestras se corresponden con metástasis, más concretamente, con metástasis hepáticas, mientras que las otras 34 muestras se presentan en adenocarcinomas colo-rectales primarios. Una de las metástasis hepáticas presenta una mutación en el EXON 4 A146X, correspondiente a un hombre de 68 años, y la otra presenta una mutación en el EXON 2 G12X y se corresponde con una mujer de 46 años. 19 muestras correspondientes con adenocarcinomas colo-rectales de origen primario presentan una mutación en el EXON 2G12X, 6 adenocarcinomas presentan mutación en el EXON 2 G13X, 5 adenocarcinomas en el EXON 2 CODONES 12 y 13, 2 adenocarcinomas en el EXON 3 Q61X, 1 adenocarcinoma en el EXON 4 A146X y 1 adenocarcinoma en el EXON 2 CODON 12: G12A (GCT). En cuanto al grado de diferenciación, encontramos que, de las 36 muestras que presentan mutación en KRAS, 6 son de alto grado y 30 son de bajo grado. A continuación, desglosaremos el grado de diferenciación de cada una de las mutaciones halladas en KRAS:

- EXON 2 G12X (A,C,D,R,S,V): 5 de alto grado y 15 de bajo grado.
- EXON 2 G13X (A,C,D,R,S,V): 0 de alto grado y 6 de bajo grado.
- EXON 2 CODONES 12X y 13X: 0 de alto grado y 5 de bajo grado.
- EXON 3 Q61X (E, Hc, Ht, K, L, P, R): 0 de alto grado y 2 de bajo grado.
- EXON 4 A146X (P, T, V): 0 de alto grado y 2 de bajo grado.
- EXON 2 CODON 12: G12A(GCT): 0 de alto grado y 1 de bajo grado.

De las 36 muestras que expresaron mutación en KRAS, sólo tenemos una que presente una alteración concomitante de la estabilidad de microsatélites. Esta muestra presenta una inestabilidad de microsatélites como resultado de la pérdida de expresión del gen MSH6. Esta muestra corresponde a una mujer de 83 años de edad con un diagnóstico de adenocarcinoma de colon de bajo grado. La mutación de esta paciente en KRAS se encuentra en el EXON 2 CODONES 12 Y 13. Respecto al resto de genes no hay ninguna alteración concomitante, únicamente en MSH6 como acabamos de explicar. En el caso de BRAF es raro encontrar una mutación concomitante en KRAS, pues la mutación de estos dos genes es mutuamente excluyente, es decir, cuando uno de los dos está mutado el otro, de manera muy excepcional, también lo está. Lo mismo sucede con el gen NRAS y KRAS, ya que estos tres genes (KRAS, NRAS y BRAF) pertenecen a la misma familia de proteínas denominada familia de proteínas RAS, y raramente se presentan todos mutados.

En nuestro caso el porcentaje total de muestras mutadas corresponde a un 31,7% del total de muestras estudiadas, presentándose esta mutación de forma habitual en el 40% de todos los cánceres colorrectales según estudios actuales, mientras que en otros estudios como el realizado por Martinetti D et al. se obtuvo un 17,6% de muestras con esta mutación, 28 muestras. Vemos que 13 muestras presentan la mutación en G12D (46,4%), 4 en G12C (14,3%), 4 en G12V (14,3%) 3 en G12A codón 12 (10,7%), 2 en G13D codón 13 (7,1%), 1 en G12S codón 12 (3,6%) y 1 en A146T (3,6%).

Asociaciones en EGFR:

Del total de 63 muestras estudiadas para EGFR, solo 4 de ellas presentan la mutación en EGFR, 1 corresponde a un hombre de 72 años y 3 a mujeres de 42, 80 y 57 años, respectivamente, con una media de edad para las mismas de 60 años y una media total de edad de 63 años. En cuanto al tipo de mutación que presentan encontramos que 3 muestras presentan una mutación en el EXON 19 y 1 muestra que presenta la mutación en el EXON 21. Las 3 mutaciones en el EXON 19 pertenecen a 2 mujeres y 1 hombre, mientras que la muestra con el EXON 21 mutado pertenece a una mujer.

Las 4 muestras que presentan mutación en EGFR, se corresponden con adenocarcinomas primarios de pulmón. En cuanto al grado tumoral tenemos que 3 muestras son de bajo grado y 1 es de alto grado. Solo 1 de las muestras con la mutación en EGFR expresó PDL1 en el 4% de las células tumorales, correspondiendo ésta a un adenocarcinoma primario de pulmón bien diferenciado con delección en el EXON 19, correspondiente a un hombre de 72 años. El resto de las muestras correspondientes a mujeres no expresaron PDL1. Por otra parte, ninguna de las 4 muestras que expresan mutación en EGFR, presentó mutación en el gen ALK.

Comparando nuestro trabajo con el estudio de Lafuente et al. realizado a nivel nacional, vemos que la incidencia de mutación en EGFR es del 12%, mientras que la incidencia obtenida en las muestras de los pacientes de nuestro estudio es tan solo del 6%. En su trabajo se obtienen un 45% de mutaciones para el exón 19, 18 muestras, un 40% en el exón 21 L858R, 16 muestras, un 10% en G719S, 4 muestras, y un 5% en T790M, 2 muestras

Asociaciones en NRAS:

Del total de 88 muestras estudiadas, solo 5 de ellas presentan alguna mutación en NRAS, 3 muestras en G12X, con una media de edad de 82 años y los 2 restantes en Q61X y G13X, con una edad de 71 y 74 años respectivamente, es decir, una media de 72,5.

Todas ellas corresponden a varones con una media de edad resultante de 78 años.

En cuanto al origen de las muestras, 4 son compatibles con adenocarcinomas primarios de colon correspondientes a varones de 77, 87, 82 y 71 años, con una media de edad de 80 años. Mientras que la muestra restante corresponde a un varón de 74 años, compatible con una metástasis pulmonar de origen colo-rectal.

En cuanto al grado de las muestras positivas, encontramos que la totalidad son de bajo grado.

Ninguna de las muestras estudiadas con mutación en NRAS presentó mutación concomitante en alguno de los genes encargados de la estabilidad de microsatélites, como son, MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6.

Asociaciones en BRAF:

De las 88 muestras estudiadas, sólo 8 de ellas presentan mutación en BRAF, en el dominio (V600E/E2/D). En cuanto al sexo, vemos que 4 muestras corresponden a hombres y las otras 4 a mujeres.

Al analizar de forma conjunta la edad de las personas cuyas muestras fueron positivas para la mutación BRAF, obtenemos una edad media de 79 años. Pero al hacer el estudio de edad por sexos, la media de edad en varones fue de 77 años y en mujeres de 82 años.

En cuanto al origen de las muestras, 7 muestras corresponden a adenocarcinomas primarios de colon y 1 a un adenocarcinoma primario de ciego.

En relación con el grado tumoral, 4 de las muestras fueron de bajo grado, correspondiendo 3 de ellas a hombres y 1 a mujeres, con una media de edad total resultante de 78 años. Otra de las muestras, que fue obtenida de una paciente de 77 años presentó un 50% de células de bajo grado y un 50% de células de alto grado. Las 2 muestras restantes, pertenecientes a un varón de 77 años y a una mujer de 90 años, ambos, con un adenocarcinoma localizado en el ciego, fueron de alto grado.

Del total de muestras con mutación en BRAF, solo 3 presentaban inestabilidad de microsatélites. La primera de ellas, con mutación en MLH1 Y PMS2, corresponde a una mujer de 90 años con un adenocarcinoma primario de ciego de alto grado, la segunda, con mutación en PMS2, corresponde a una mujer de 77 años con un adenocarcinoma primario de colon con un 50% de células de alto grado y el otro 50% de bajo grado y la tercera, con mutación en MLH1 Y PSM2, corresponde a varón de 84 años con un adenocarcinoma primario de colon de bajo grado.

Según estudios actuales, como el realizado por Gonzalez Martinez et al. en el hospital de Badajoz, vemos que en el porcentaje de las muestras mutadas con respecto al total de las muestras estudiadas, 127, es de un 6,3%, obteniendo 5 muestras mutadas para BRAF, apareciendo 4, en casos de adenocarcinoma de colon, un 80% y 1 en adenocarcinoma de pulmón, un 20%, mientras que en nuestro estudio este porcentaje es de un 9%, siendo 7 muestras correspondientes con adenocarcinomas primarios de colon y 1 a un adenocarcinoma primario de ciego.

Por último, no observamos ninguna asociación entre BRAF y KRAS o NRAS en ninguna de las muestras estudiadas.

Asociaciones en PDL1

De las 63 muestras totales estudiadas, nos encontramos con 23 muestras que presentan la expresión de esta proteína, un 36,5% del total. De estas 23 muestras, 19 corresponden a hombres y 4 a mujeres.

Podemos establecer 3 grupos es base al porcentaje de células mutadas que expresan esta proteína. Tenemos en primer lugar el grupo de aquellos pacientes cuyas células que expresan esta proteína es menor al 10%. Dentro de este grupo tenemos 5 hombres y ninguna

mujer. En segundo lugar, encontramos el grupo de pacientes cuyas células que expresan esta proteína está entre (20%-50%). Aquí nos encontramos con 3 hombres y 2 mujeres. Y por último el grupo de pacientes cuyas células que expresan esta proteína está entre (60%-100%). Nos encontramos con 6 hombres y 2 mujeres.

En cuanto a la edad, obtenemos una media total de 65 años, siendo de 69 años para las mujeres y 64 para los hombres. De las 23 muestras positivas totales, 21 pertenecen a adenocarcinomas primarios pulmonares y solo 2 pertenecen a metástasis por adenocarcinoma pulmonar, una hepática y otra ganglionar.

Respecto al grado tumoral nos encontramos con 10 muestras que presentan un bajo grado y 13 que presentan un alto grado. En el grupo de muestras cuyas células que expresan esta proteína es del (60%-100%), donde vemos que hay 9 muestras, 8 de las 9 muestras se corresponden con un grado tumoral alto y solo 1 con un bajo grado. Esta proporción se invierte cuanto menor es el porcentaje de células tumorales que expresan esta proteína, pues en el grupo de igual o menor a 10%, encontramos 8 muestras que presentan un bajo grado y 2 que presentan un grado tumoral alto. De las 4 muestras que se corresponden con mujeres, 2 son de bajo grado y las otras 2 son de alto grado, mientras que, de las 19 muestras correspondientes a hombres, 8 son de bajo grado y los 11 restantes de alto grado.

Como vemos, la expresión de PDL1 parece ser más frecuente que la mutación EGFR en los adenocarcinomas de pulmón, y la incidencia en ambos casos es mayor en hombres que en mujeres, aunque debemos tener en cuenta que el pequeño tamaño muestral del que disponemos, podría estar sesgando los resultados. En cuanto a los casos en los que coinciden esta expresión, sólo disponemos de uno, y se trata de un adenocarcinoma de pulmón de bajo grado, en un hombre de 72 años. La mutación que se dio en EGFR tuvo lugar en el EXON 19 EX19DEL, mientras que el porcentaje de células que expresaban PDL1 era de un 4%.

Comparando estos datos con alguno de los estudios relacionados existentes, vemos que en el estudio realizado por D'Incecco et al. se identificó un 55% del total de muestras con expresión de esta proteína en diferente porcentaje celular, siendo esta cifra más alta que la correspondiente a la población de nuestro estudio, con un 36,5% del total.

Asociaciones respecto a la INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MLH1, PMS2, MSH6, MSH2):

De las 88 muestras en las que se ha estudiado hemos obtenido, como ya hemos dicho anteriormente, 9 muestras que muestran inestabilidad de microsatélites. De esas 9 muestras, 5

se corresponden con varones y 4 con mujeres. De las 5 muestras correspondientes a los hombres, 3 presentan una pérdida de expresión de MLH1 y PMS2 de manera conjunta, 1 presenta una pérdida aislada de MSH6 y la restante una pérdida aislada de PMS2. De las 4 muestras correspondientes a mujeres, 1 presenta una pérdida de expresión de MLH1 y PMS2 de manera conjunta, 1 presenta una pérdida de expresión de MSH6 de manera aislada, 1 presentan una pérdida de expresión de PMS2 de manera aislada y la restante presenta una pérdida de expresión de MSH2 de manera aislada.

Respecto a la edad encontramos que la media total de edad es de 72 años, siendo de 70 años para los hombres y de 76 para las mujeres. La media de edad más elevada de las diferentes pérdidas de expresión es de la pérdida de MLH1 y PMS2 de manera conjunta, con una media de edad de 79 años, seguido por la pérdida de PMS2 con una media de edad de 75 años, y más alejado se encuentran la pérdida de MSH6 con una media de 68 años y la pérdida de MSH2 con una media de 53 años, que corresponde a una única muestra.

En cuanto al grado tumoral tenemos 6 muestras que presentan un bajo grado y 3 que presentan un alto grado. De las 6 muestras que presentan un bajo grado 3 son hombres y las otras 3 mujeres, mientras que 2 de las 3 muestras de alto grado son hombres y solo 1 se corresponde con una mujer.

Tenemos, además, 1 muestra positiva que presenta una mutación concomitante en KRAS (EXÓN 2 CODONES 12 Y 13) y 3 que presentan una mutación en BRAF (V600E2). 2 de las muestras que presentan la mutación en BRAF tienen mutado MLH1 y PMS2 de manera conjunta, y la restante muestra una pérdida de expresión de PMS2 de manera aislada, mientras que la única muestra que presenta la mutación en KRAS presenta pérdida de expresión en MSH6.

Si lo relacionamos con estudios actuales como el realizado por Lucía Pérez-Carbonell et al., vemos que, de 155 casos totales, 115 presentan pérdida de MLH1 (5,5%), 29 presentan pérdida de MSH2 y MSH6 (1,4%), de los cuales 7 presentan una pérdida aislada de MSH2 y 22 una pérdida conjunta de MSH2 y MSH6 y 2 casos que muestran una pérdida aislada de PMS2 (0,1%). El total de muestras que presenta inestabilidad de microsatélites se corresponde con el 74,2% de los casos a la pérdida de MLH1, en el 18,7% a la pérdida de MSH2, en el 14,2% a la pérdida de MSH6 y un 1,3% a la pérdida de PMS2.

DISCUSIÓN

Después de analizar todos los resultados obtenidos podemos abrir varias líneas de debate para poder encuadrar de una manera más correcta y acertada los datos obtenidos.

MÉTODO EMPLEADO

En nuestro trabajo, las principales pruebas que se emplean en la búsqueda de mutaciones se corresponden con la utilización de un kit comercial denominado Kit cobas 480, de la empresa Roche Diagnostic, y la utilización de inmunohistoquímica para ciertos marcadores como ALK, PDL1 y la inestabilidad de microsatélites.

Para cada gen que se pretende estudiar encontramos un kit cobas diferente. En el estudio KRAS COMPARISON METHODS se lleva a cabo una investigación acerca de qué método de detección para KRAS es más sensible y específico. Disponer de un test con una elevada sensibilidad es esencial para minimizar el riesgo de encontrar falsos negativos en aquellas muestras que contenían pequeñas cantidades de células mutadas con su respectivo DNA mutado, diana de estos métodos.⁽¹⁹⁾

En ese estudio se observa que el Kit cobas 480 tiene utilidad con muestras donde la cantidad de DNA tumoral es muy pequeña, menos de un 5%. En la guía INC de detección de mutaciones se recomienda que la detección de las posibles mutaciones debe de estar cumplimentada en 2 o 3 semanas como máximo, siendo el tiempo empleado en la utilización del kit cobas 480 y TaqMan 23,6 días⁽¹⁹⁾. Es por eso que la utilización en nuestro estudio de la técnica Kit cobas 480 se perfila como una de las mejores pruebas posibles para realizar un primer análisis de mutaciones en KRAS, y la técnica más acertada para obtener el resultado más certero.

En otro estudio realizado por Rodón et al. se compararon dos tipos de métodos diferentes para la obtención de un perfil molecular determinado de diferentes tipos de tumores⁽²⁰⁾. En este estudio se analizaron: 19 adenocarcinomas colorrectales, 26 adenocarcinomas de pulmón, 5 adenocarcinomas de páncreas y 1 melanoma, referentes a un total de 51 pacientes. Se compararon los resultados obtenidos de un total de 263 genes que ya habían sido previamente estudiados por técnicas convencionales con aquellos obtenidos por secuenciación masiva (NGS). Dentro de estos 263 genes estudiados, nos encontramos aquellos genes que más nos interesan para la comparación con nuestro trabajo, como son: KRAS, BRAF, NRAS, EGFR y ALK. El resultado de este trabajo nos pone de manifiesto, que, la concordancia entre los dos métodos fue del 100% para todos estos genes. Por lo tanto, la utilización en nuestro trabajo de

la PCR en tiempo real es un método fiable, sensible y perfectamente válido para llevar a cabo esta tarea ⁽²⁰⁾.

Como hemos comentado más arriba, ciertos marcadores han sido estudiados mediante inmunohistoquímica (IHQ), como ALK, PDL1 o la inestabilidad de microsatélites. En el estudio realizado por Martínez et al. se comparan dos métodos diagnósticos de ALK, que son, la técnica FISH, que significa hibridación fluorescente in situ, y la inmunohistoquímica (IHQ) ⁽²¹⁾. Estos dos métodos se analizaron en pacientes diagnosticado con cáncer de pulmón no microcítico. Los pacientes incluidos en el estudio pertenecen al hospital de Barcelona Vall d'Hebron y se comprenden en un marco temporal que abarca desde mayo del año 2006, hasta enero del año 2010, con un total de 99 pacientes.

En primera instancia, se realizó la técnica FISH, si el tejido era favorable para ello, y posteriormente la IHQ. Los resultados señalan que la cantidad de muestras en las que se detectó la presencia de mutación en ALK obtenidas por FISH era similar a la cantidad de muestras con dicha mutación obtenidas por IHQ. Como hemos comentado previamente, en primera instancia se realizó el análisis por FISH y posteriormente por IHQ, teniendo 85 muestras disponibles para FISH, después de retirar las muestras donde no había suficiente material para su estudio, y 80 para IHQ, ya que hubo que retirar 5 muestras que habían sido dañadas al realizar la otra prueba. Se obtuvieron 73 muestras que no presentaban mutación en ALK mediante FISH, y en cuanto a la IHQ se obtuvieron el mismo número, mientras que por FISH se obtuvieron 6 muestras que sí que presentaban mutación, y por IHQ, se obtuvieron 5 muestras que presentaban mutación y 1 muestra que no presentaba mutación. Por ello los autores del estudio concluyeron que la utilización de la IHQ tiene la misma validez que la utilización de FISH para el estudio de ALK ⁽²¹⁾. En nuestro trabajo, a pesar de no obtener ninguna muestra con mutación en el gen ALK, vemos que la utilización de este método permite un diagnóstico válido para poder plantear alternativas terapéuticas a aquellos pacientes con un resultado positivo para alguno de estos marcadores.

CARCINOMA PULMONAR

MUTACIONES EN EGFR

En nuestra serie de la Provincia de Castellón, hemos encontrado 4 muestras que presentan mutación en EGFR, sobre un total de 63 muestras de adenocarcinoma de pulmón. Las características mutacionales de la población española frente a este gen se posicionan con un

valor de un 12% en cuanto a la variante de EGFR, observando que estas mutaciones son más frecuentes en mujeres y suelen aparecer en adenocarcinomas y en pacientes no fumadores. A continuación, veremos si esa afirmación se cumple comparando diferentes estudios ⁽²²⁾.

En el estudio llevado a cabo por Lafuente et al. donde se estudian las características clínico-patológicas de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico con mutaciones en el gen EGFR, obtuvieron un resultado de un 70% muestras que presentaban mutaciones ocurridas en mujeres, 28 mujeres, y un 30% para los hombres, 12 hombres ⁽²²⁾. Las muestras que se analizaron provienen de 40 pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón no microcítico con EGFR mutado diagnosticados entre marzo de 2012 y noviembre de 2014 procedentes del área de salud de la Ribera, en la Comunidad Valenciana. En nuestro trabajo, a pesar de tener un número de muestras, con mutaciones en EGFR, muy inferior al del estudio anterior, se respeta esa proporción, pues 3 de las 4 muestras mutadas corresponden a mujeres, un 75%. La edad media total obtenida por ellos, tanto hombres como mujeres, es de 65 años, mientras que en nuestro trabajo obtenemos una media de 63 años ⁽²²⁾.

El perfil de las mutaciones es idéntico al obtenido en nuestro trabajo, ya que obtienen un 45% de mutaciones para el exón 19, 18 muestras, siendo la mutación más frecuente, seguida de la mutación en el exón 21 L858R, con un 40% del total, 16 muestras. Más alejada se encuentra la mutación en G719S, con un 10%, 4 muestras, y en T790M, con un 5%, 2 muestras ⁽²²⁾. En nuestro trabajo 3 de las 4 muestras con mutaciones se dan en el exón 19, un 75% del total, y solo una en el exón 21 pero en L861Q, un 25% del total.

Como vemos los resultados obtenidos en nuestro estudio son muy similares a los obtenidos en el estudio realizado por Lafuente et al. realizado con pacientes de la zona de la Ribera Alta, comarca de la comunidad Valenciana, mientras que nuestro estudio emplea pacientes de la provincia de Castellón ⁽²²⁾. Esto nos lleva a que el perfil mutacional respecto a la mutación en el gen EGFR es muy similar, por lo que se enfrentan al mismo problema de resistencias terapéuticas.

Como comentamos al inicio del trabajo, para comprender cómo se producen estas resistencias, tenemos que ahondar en los procesos moleculares y líneas actuales terapéuticas disponibles, para poder ver en perspectiva el problema y poder presentar ideas para solventarlo.

En el cáncer de pulmón nos encontramos con dos variantes, el cáncer de pulmón no microcítico, y el cáncer microcítico de pulmón, entre otros. Estos dos grupos son los más importantes y prevalentes, aunque también nos encontramos con otros tipos de tumores como adenocarcinomas o linfomas. En el adenocarcinoma tiene un papel fundamental la mutación del EGFR, agrupando la mayoría de las mutaciones de este gen en los exones 19 y 21, exactamente como los resultados obtenidos ⁽²³⁾.

En el adenocarcinoma de pulmón, subtipo histológico seleccionado para nuestro trabajo, nos encontramos que esta mutación del EGFR, se relaciona estrechamente con las mutaciones de AKT y STAT 5. La relación de AKT y la consecución del cáncer se relacionan con quimio-resistencia, a la par que la aparición de mutaciones en EGFR incrementa la resistencia a los fármacos como el cisplatino, base del protocolo aplicado al cáncer de pulmón, mientras que esta misma característica le confiere una sensibilidad aumentada al fármaco Gefitinib ⁽²³⁾.

El Gefitinib es un agente que actúa inhibiendo selectivamente la tirosin quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico, inhibiendo el proceso de crecimiento celular y el desarrollo de células, tanto cancerígenas, como sanas. El Gefitinib tiene eficacia clínica demostrada en pacientes con esta mutación, mientras que en aquellos sin mutación su relevancia clínica es anodina ⁽²⁴⁾.

Es por eso que la diferencia entre el gen EGFR wild type (en estado normal, sin mutaciones) y EGFR mutado confiere una ventaja pronóstica para los segundos, pues mejoramos drásticamente el devenir de la enfermedad y aumentamos el tiempo libre de progresión hasta 12,5 meses ⁽²³⁾.

Además de la aparición de mutaciones en los exones 19 y 21, que son las más frecuentes, suele aparecer la mutación en el exón 20 en aquellos que presentan resistencia al tratamiento con inhibidores del EGFR. Esta mutación consiste en la sustitución de un residuo de metionina por uno de treonina en la posición 790 del dominio kinasa. Esta mutación aparece en cerca de un 50% de los tumores con resistencia adquirida al tratamiento anti EGFR. También nos encontramos con un mecanismo secundario de resistencia adquirida a través de la mutación de un gen denominado MET ⁽²³⁾.

La segunda línea o generación de estos fármacos que se han desarrollado, tienen como función principal responder frente a tumores que poseen una mutación del EGFR T790M, los cuales también presentan resistencia farmacológica ⁽²³⁾.

La tercera generación de fármacos contra el EGFR como el Osimertinib, pretende resolver todos estos problemas. (otros fármacos de tercera generación) Olmutinib (HM61713), ASP8273, Nazartinib (EGF816), Axitinib, PF-06747775. No profundizaremos en la farmacodinamia de estos fármacos debido a la escasez de información acerca de los mismos por el momento experimental en el que se encuentran ⁽²³⁾.

MUTACIONES EN ALK

La mutación de ALK es una mutación rara en el adenocarcinoma de pulmón, que aparece en un 4% de los casos. El perfil clínico de los pacientes que expresan este marcador se corresponde con: pacientes jóvenes, edad de presentación alrededor de 50 años, predominancia leve en el género femenino, no fumadores, del tipo histológico adenocarcinoma y ausencia de mutaciones en EGFR y KRAS. En nuestro trabajo ninguna de las muestras presentó mutación en ALK. Esto es debido, seguramente, al poco volumen de muestras que tenemos. Este marcador tiene una gran importancia debido a la posibilidad de tratamiento dirigido. El tratamiento consiste en la utilización de diversos fármacos como el Crizotinib o el Ceritinib, entre otros ⁽²⁵⁾.

A pesar de no haber obtenido ninguna muestra con dicha mutación, podemos realizar una breve comparación de dos estudios de diferentes países, para ver si el mapa mutacional coincide o se contrapone.

En primer lugar, tenemos el estudio realizado por Ross Camidge et al. en el que se analizaron las muestras provenientes de 73 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón ⁽²⁶⁾. Todos los casos incluidos proceden del hospital universitario de Colorado y se analizó el estado mutacional de KRAS, EGFR y ALK. De estos 73 pacientes, de los que se obtuvieron una muestra por cada paciente, solo se pudieron analizar correctamente 66, y de este total, 13 muestras presentaron mutación en ALK, un 20% del total. Estas 13 muestras, se corresponden con adenocarcinomas de pulmón, y solo 1 de las 13 muestras mostró una alteración concomitante en EGFR, en el exón 20, un 7,7% del total. La edad media de los pacientes que presentaron mutación en ALK, fue de 55 años, y en cuanto a distribución por género, tenemos 9 mujeres, un 69%, y 4 hombres, un 30,8% ⁽²⁶⁾.

En segundo lugar, tenemos el estudio realizado por Joana Vidal et al. en el que se analizaron 1092 muestras referentes de pacientes de 69 hospitales de toda España, en busca del estado mutacional de ALK. De todas estas muestras, 35 resultaron mutadas para ALK, un 3,2% del total y 28 de las 35 fueron adenocarcinomas, un 80% del total, siendo el subtipo histológico más frecuente. La edad media de estos pacientes con mutación en ALK es de 61 años, y en la distribución por género se obtiene que 19 de las muestras mutadas corresponden a mujeres, y 13 a hombres. Otras 3 muestras que presentaron la mutación en ALK no se pudieron identificar ⁽²⁶⁾.

El Crizotinib inhibe la actividad de ALK, de ROS1 y MET mediante un mecanismo ATP competitivo en el dominio catalítico de la enzima ⁽²⁷⁾. En el estudio realizado por Spagnuolo et al. se observa que los pacientes tratados con Crizotinib en comparación con terapia de primera línea con platino tienen un incremento significativo en la calidad de vida y una reducción de los

síntomas producidos por el cáncer. ROS1 es un receptor con actividad tirosin kinasa que suele aparecer en pacientes jóvenes, no fumadores y en adenocarcinomas, además de no presentar mutaciones concomitantes en EGFR, KRAS, BRAF, HER2 o reordenamiento en ALK ⁽²⁷⁾. Los fármacos anti ALK también tienen actividad sobre ROS1 por lo que no se recomienda hacer ninguna búsqueda de este receptor, a no ser que el perfil clínico sea muy sugestivo de presentarlo, pero tenga ALK negativo o EGFR negativo ⁽²⁷⁾.

El Ceritinib es un fármaco de segunda generación que se emplea cuando aparece resistencia a Crizotinib. Este fármaco además de inhibir la actividad ALK disminuye la actividad ROS1, pero no la kinasa dependiente de MET ⁽²⁷⁾.

Por último, veremos el Alectinib, que es un fármaco de segunda generación, posee ciertas ventajas sobre el Crizotinib y Ceritinib, evitando resistencias de ALK que estos dos fármacos anteriores no consiguen. Este fármaco destaca por su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica ampliando su rango de eficacia⁽²⁷⁾. Terapias combinadas con inhibidores MEK como el Trametinib están bajo estudio debido a la posibilidad de by pasear todos estos mecanismos de resistencia debido al conocimiento de que la vía de señalización EML4 ALK que se encuentra en ciertos adenocarcinomas está sostenida por las proteínas RAS MAPK ⁽²⁸⁾.

EXPRESIÓN DE PDL1

Otro aspecto interesante en el proceso de selección de dianas terapéuticas son los inhibidores de checkpoints inmunológicos, los anti PDL1, que se posiciona como una línea de investigación y tratamiento muy importante hoy en día. En nuestro trabajo vemos que tenemos un total de 23 muestras que expresan este marcador, un 14,4% del total de muestras.

Uno de los fármacos más estudiados es el Pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado con una alta selectividad por esta proteína. Este fármaco actúa sobre PD-L1, impidiendo su unión a PD-1. Este fármaco se propone cuando el porcentaje de células que expresan PD-L1 es mayor al 50% ⁽²⁹⁾. En nuestro trabajo tenemos 2 muestras con un porcentaje de un 50%, 4 que expresan 60%, 1 que expresa 70%, 1 que expresa 80%, 3 que expresan 90% y 1 que expresa 100%. Por lo tanto, tenemos 11 pacientes que podrían ser candidatos a tratamiento anti PD-L1. Esta proteína es de carácter transmembrana y su importancia radica en el carácter inmunoregulator que posee, pues es capaz de suprimir el sistema inmune en multitud de procesos fisiológicos como trasplantes o durante el embarazo, pero también en procesos malignos como el cáncer o enfermedades infecciosas ⁽²⁹⁾. PD-L1 se une a su ligando PD-1, localizado en la superficie de los linfocitos T y B activos. Esta unión provoca una señal negativa

que inhibe la producción de interleucina 2 (IL-2) dependiente del receptor T y su proliferación⁽²⁹⁾.

En el estudio realizado por D'Incecco et al. se estudió la presencia de expresión de PDL1 y PD-1 en un total de 125 pacientes. Además de estudiar la expresión o no de esta proteína se realiza un análisis molecular en busca de mutaciones en otros genes como son KRAS, EGFR y ALK. Estos pacientes fueron seleccionados de tres centros médicos italianos y se obtuvieron 98 muestras del tumor principal y 17 de la metástasis⁽³⁰⁾.

El análisis de PDL1 se pudo llevar a cabo en 123 muestras, hallándose un total de 68 muestras que expresan esta proteína, un 55% del total. 52 de las 68 muestras, fueron adenocarcinomas, un 76,5% del total, siendo la distribución por género bastante equitativa, 36 hombres, un 53%, y 32 mujeres, un 47%⁽³⁰⁾.

De las 68 muestras que expresaron PDL1, 40 presentaron una alteración concomitante en EGFR, 15 presentaron una alteración concomitante en KRAS y 6 presentaron una alteración concomitante en ALK. En nuestro trabajo, obtuvimos 23 muestras que expresaban PDL1, un 14,4% del total, correspondiendo 19 muestras a hombres y 4 a mujeres. En nuestro caso el 100% de muestras que expresaron PDL1 son adenocarcinomas y solo encontramos 1 muestras donde se observa mutación concomitante en EGFR⁽³⁰⁾.

Según el estudio de D'Incecco et al. la expresión de PD-L1 es más frecuente en mujeres, adenocarcinomas y en pacientes con alteración concomitante en KRAS o EGFR. Como vemos en nuestro trabajo la mayoría de pacientes son hombres, se dan en adenocarcinomas y la única alteración concomitante ha sido en EGFR, por lo que, puede ocurrir que, debido a diferencias de raza, etnia, o cualquier otro tipo de factor que desconocemos, esta relación se invierta⁽³⁰⁾.

El tratamiento con anti ALK y anti EGFR produce una disminución de los niveles PDL1⁽³¹⁾. En el estudio Gainor et al. se observa que en aquellos casos en los que se encuentra mutado el EGFR se encuentra una tasa menor de expresión de PDL1 que en casos de KRAS mutado⁽³²⁾. En nuestro trabajo no tenemos ninguna relación de KRAS con PDL1, debido en gran medida, al poco volumen de muestras.

CARCINOMA COLO-RECTAL

MUTACIONES EN KRAS

Para comprender la enorme importancia de la función de KRAS a nivel de tratamiento, debemos conocer más a fondo su función y sus interacciones farmacodinámicas.

La familia de proteínas RAS, al que pertenece el gen KRAS, es un grupo de proteínas de bajo peso molecular denominadas también como pequeñas GTPasa. Este grupo de proteínas tienen función enzimática y encontramos más de 100 proteínas diferentes. Dentro de este grupo más amplio se encuentra la familia Ras, que a su vez se subdivide en otras cinco subfamilias, que son: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran ⁽³³⁾.

Los principales efectores de las proteínas Ras pertenecen a la familia RAF. Esta subfamilia está formada por tres proteínas que son: BRAF, RAF1 y ARAF. Cuando RAS está unido a GTP se activa una de estas tres proteínas. Como consecuencia de esto, se inicia la fosforilación de unas proteínas denominadas MEK, MEK1 y MEK2 en concreto, que a su vez activan la vía MAPK. Esto conlleva a un entorno celular propicio a la proliferación celular, que está continuamente activado, por lo que al final, conlleva a la aparición de células tumorales. RAS puede interactuar directamente con la subunidad catalítica tipo 1 de PI3Ks ⁽³³⁾. Esta vía activa diferentes proteínas que acaban en la activación de una familia muy importante para la oncogénesis como es la familia AKT. Esta familia se encarga de funciones de proliferación y de acciones anti apoptóticas ⁽³⁴⁾.

Cerca del 40% de todos los cánceres colorrectales poseen mutaciones en KRAS: y el 80% de estas son en los codones 12 y 13, seguidos por el codón 61, un 5%, y el codón 146, un 2%. Las mutaciones en el codón 61 y en el 146 suponen una reducción de la progresión libre de la enfermedad y una supervivencia total menor que otro paciente con mutaciones en los otros exones o codones ⁽³³⁾.

En apoyo a los datos anteriores, encontramos el estudio realizado por Martinetti D et al. en el país de Albania, en el cual se recogieron muestras de los casos de cáncer colorrectal de 159 pacientes para el estudio del estado mutacional de KRAS y BRAF. Las mutaciones de KRAS, fueron estudiadas en los codones 12,13,61 y 146. Del total de las 156 muestras, 28 presentaron mutación en KRAS (17,6%), dándose la mutación BRAF en las 10 muestras restantes (6,3%). En cuanto a KRAS las mutaciones obtenidas fueron: 13 muestras mutadas para G12D (46,4%), 4 para G12C (14,3%), 4 para G12V (14,3%), 3 para G12A todas ellas en el codón 12 (10,7%), 2 para G13D en el codón 13 (7,1%), 1 para G12S en el codón 12 (3,6%) y 1 para A146T (3,6%) en el codón 146 ⁽³⁵⁾.

En nuestro caso, nos encontramos con 36 muestras mutadas, un 22,5% del total, de las que, 20 muestras presentan la mutación en el EXON 2 G12X (A,C,D,R,S,V), un 55,6% del total del mutaciones en KRAS, 6 muestras en el EXON 2 G13X (A,C,D,R,S,V), un 16,7% del total, 5 muestras

en el EXON 2 CODONES 12 y 13, un (13,9%), 2 muestras en el EXON 3 Q61X (E, Hc, Ht, K, L, P, R), un 5,6%, 2 en el EXON 4 A146X (P, T, V), un 5,6%, y 1 muestra en el EXON 2 CODON 12: G12A(GCT), un 2,8%. Por lo tanto, se cumplen las estadísticas anteriormente descritas. Con todo lo explicado anteriormente, vemos la gran importancia de KRAS en los procesos oncogénicos, por lo que a continuación debemos conocer las opciones terapéuticas y las posibilidades disponibles cuando ocurren resistencias frente a ciertos fármacos.

KRAS y NRAS son indicativos de un mal pronóstico de la enfermedad y los fármacos anti EGFR son eficaces en aquellos pacientes con tumores que son wild type y de localización izquierda. Dentro de los inhibidores del factor de crecimiento endotelial (VEGF) y epidermal (EGFR) tenemos el Bevacizumab y al Aflibercept.

Cuando estos fármacos se asocian a otros agentes citotóxicos representan una primera línea de tratamiento muy eficaz para casi todos los tipos de cáncer colorrectal. Los denominados anti EGFR, inhibidores del factor de crecimiento epidérmico solo son efectivos en aquellos casos en los que tenemos ausencia de mutación en KRAS. En este grupo nos encontramos con el Cetuximab y Panitumab, que son los más utilizados⁽³⁶⁾.

Por último, comentar que las mutaciones en el codón 61 y en el 146 presentan una respuesta más eficaz al tratamiento convencional que el resto de las mutaciones, pero ninguno de los tratamientos que se suelen utilizar tienen un gran impacto en cuanto a la eficacia en inhibir los efectos producidos por esta mutación⁽³⁶⁾.

La importancia del estudio de KRAS, radica en la poca o nula efectividad del tratamiento convencional cuando este se encuentra mutado. Cuando KRAS no se encuentra mutado utilizamos un tratamiento que se compone, en primera línea, de fármacos citotóxicos y biológicos, grupos constituidos por fármacos como (5FU, LV (levamisol), oxaplatino (FOLFOX)), capecitabina (CAPOX), o irinotecan (FOLFIRI)⁽³⁶⁾. A este tratamiento base se le pueden añadir otros dos fármacos como el Bevacizumab o el Aflibercept, dos fármacos anti-VEGF, que han demostrado mejorar el pronóstico de la enfermedad. El grupo de fármacos que más nos interesa es el grupo de los anti EGFR, como son el Cetuximab y Panitumab, de los que se pueden obtener beneficio, únicamente, cuando el estado de KRAS es wild type, es decir no mutado⁽³⁶⁾.

INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

En el estudio realizado por T T Seppälä et al., se examinó las muestras de 762 pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal en busca del estado mutacional de BRAF y si presentaban inestabilidad de microsatélites⁽³⁷⁾. Todas estas muestras provenían del hospital central de Finlandia. Del total de muestras analizadas, 111 presentaban pérdida de estabilidad de microsatélites (14,6%) y 94, mutación en BRAF (12,3%). En este trabajo se analizaron los

diferentes genes encargados de la estabilidad de microsatélites, MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, pero no se especifica cuál de ellos está o no ausente, considerando un tumor MSS (estable) cuando los 4 marcadores aparecen teñidos mediante inmunohistoquímica, y MSI (inestable) cuando, al menos, uno de ellos está ausente ⁽³⁷⁾.

Estas 111 muestras que presentaban inestabilidad suponen un porcentaje de un 14,6% del total de muestras estudiadas, mientras que en nuestro estudio nos encontramos con 9 muestras, un (5,6%) del total. Como comentan en las conclusiones del trabajo, la inestabilidad de microsatélites se asocia con el género femenino y con una diferenciación histológica pobre ⁽³⁷⁾. En nuestro trabajo 5 de las 9 muestras que presentan inestabilidad corresponden a mujeres, un (55,6%), y las otras 4 a hombres, un (44,4%), por lo que se cumple esta premisa. En cuanto al grado tumoral 6 de las 9 muestras con pérdida de estabilidad presentan un grado bajo, un (66,6%), y 3 presentan un alto grado, un (33,3%) ⁽³⁷⁾.

De las 94 muestras que presentan mutación en BRAF del estudio de T T Seppälä et al, 60 mostraron una pérdida de estabilidad de microsatélites concomitante (63,9%) mientras que las otras 34 no (36,1%). El porcentaje de muestras con mutación en BRAF y alteración concomitante de la estabilidad de microsatélites es de un 54% y en nuestro estudio nos encontramos con un 38%, ya que tenemos 3 muestras que presentan ambas mutaciones, siendo un porcentaje lejano, que tal vez pueda deberse al poco volumen de casos analizados en comparación ⁽³⁷⁾.

En otro estudio realizado a nivel nacional por Lucía Pérez-Carbonell et al, se estudió el perfil de estabilidad de microsatélites de 2093 pacientes con cáncer colorrectal incluidos en la cohorte 1 y 2 del estudio EPICOLON. Del total de 2093 pacientes, 155 presentaron pérdida de estabilidad de microsatélites ⁽³⁸⁾.

De esos 155 casos, 115 presentan pérdida de MLH1 (5,5%), 29 presentan pérdida de MSH2 y MSH6 (1,4%), de los cuales 7 presentan una pérdida aislada de MSH2 y 22 una pérdida conjunta de MSH2 y MSH6 y 2 casos que muestran una pérdida aislada de PMS2 (0,1%). Tenemos, entonces, que un 74,2% del total de muestras que presentan inestabilidad de microsatélites se corresponde con la pérdida de MLH1, un 18,7% se corresponde con pérdida en MSH2, un 14,2% se corresponde con pérdida de MSH6 y un 1,3% se corresponde con pérdida en PMS2 ⁽³⁸⁾.

En nuestro trabajo nos encontramos con 9 muestras con inestabilidad de microsatélites, de las que 4 corresponden con mutaciones en MLH1 y PMS2, 3 correspondientes con mutaciones exclusivamente en PMS2 y 2 en MSH6. Por lo tanto, tenemos que en nuestro trabajo la pérdida de MLH1 se corresponde con un 44,4% del total de las 9 muestras en las que hay pérdida de algún marcador, la pérdida de PMS2 se corresponde con un 66,7% del total, y la pérdida de MSH6 se corresponde con un 22,2% del total.

La detección de inestabilidad de microsatélite se recomienda en todos aquellos pacientes que han sido diagnosticados recientemente de cáncer colorrectal. La inestabilidad de microsatélites se basa en MMRD: mismatch repair deficiency ⁽³⁹⁾. Este concepto alude a un mecanismo por el cual las inserciones o deleciones erróneas producidas por la replicación y recombinación son reagrupadas y reparadas para conservar la estabilidad genómica. La pérdida de actividad de estas proteínas conduce a una pérdida de la estabilidad del conjunto y por lo tanto a una inestabilidad de microsatélites propiamente dicha. Esto conlleva un viraje hacia un fenotipo mutado ⁽⁴⁰⁾.

La mayoría de los casos esporádicos se producen por un silenciamiento génico de MLH1, que promueve la hipermetilación, que conducen a una CpG high island methylation phenotype (CIMP).

En los tumores con inestabilidad de microsatélites presente, nos encontramos con una gran cantidad de complejos mecanismos que influyen el pronóstico de la enfermedad como, por ejemplo, checkpoints inmunológicos que contraponen los efectos positivos de los linfocitos T citotóxicos frente a las células tumorales ⁽⁴⁰⁾.

Los casos con inestabilidad de microsatélites detectada en línea somática no reciben ningún tipo de beneficio del tratamiento con 5FU, tratamiento estándar, beneficiándose en gran medida de los inhibidores PDL1. Llegados a este punto encontramos una pequeña digresión pues en el estudio ACCENT se muestra que no hay efecto beneficioso del tratamiento neoadyuvante con fluorouracil en aquellos pacientes MSI High en estadio II, mientras que aquellos en estadio III sí que muestran beneficio independiente de su estatus MSI ⁽³⁹⁾. Esto está apoyado por los resultados del estudio MOSAIC que concluyó que en aquellos pacientes con un tumor de bajo riesgo en estadio 2 MSI High CRC no se recomienda el tratamiento adyuvante con quimioterápicos debido a su excelente pronóstico y la falta de efectividad demostrada de 5FU. En aquellos en estadio 3 se recomienda todo lo anterior a pesar de su estado MSI ⁽⁴¹⁾.

La mutación concomitante de BRAF en individuos MSI High no confiere un pronóstico negativo adicional, mientras que en aquellos casos MSI Estable, sí. En nuestro trabajo tenemos 8 muestras que presentan mutación en BRAF, en concreto para BRAF V600E, y esto supone ciertas diferencias a nivel de tratamiento, como veremos a continuación.

MUTACIONES EN BRAF

Esta mutación conlleva diversas sustituciones de aminoácidos en el codón 600 o codones adyacentes. La V que conforma la mutación V600 se corresponde con el aminoácido valina, que es fundamental para que BRAF se encuentre en estado inactivado y no se active la vía RAS ⁽⁴²⁾.

La mutación de BRAF se asocia en gran medida con tumores que presentan inestabilidad de microsatélites, de medio-alto grado de diferenciación histológica, en mujeres y con edades superiores a 60 años ⁽⁴²⁾. En nuestro trabajo tenemos 8 muestras que presentan mutación en este gen, un 5%, de las que, 3 son adenocarcinomas de alto grado, un 37,5%, y 5 son de bajo grado, un 62,5%. Por otro lado, tenemos que 4 de las muestras son mujeres, un 50% y las otras 4, hombres, un 50% y las edades de ambos grupos están por encima de los 60 años.

La mutación en BRAF V600E también se asocia con MSI en alrededor de un 30% de los casos esporádicos. En nuestro trabajo nos encontramos con 3 muestras que presentan inestabilidad de microsatélites, como ya hemos visto en los resultados, dos de ellas en MLH1 y PMS2 y una en PMS2 de manera aislada ⁽⁴²⁾.

En el trabajo realizado por González Ibañez et al. en el hospital de Badajoz, se analizó el estado mutacional de KRAS y BRAF de un total de 87 muestras de cáncer de colorrectal y 40 de cáncer pulmonar. Todos estos casos fueron diagnosticados en su centro, mientras que el estudio mutacional se realizó mediante PCR de tiempo real ⁽⁴³⁾. El resultado fue de 5 muestras mutadas para BRAF, un 6,3%, siendo 4 mutadas para cáncer colorrectal, un 80% y 1 para adenocarcinoma de pulmón, un 20%. De las 4 muestras mutadas de colon, 2 se corresponden con adenocarcinomas, un 50%, y las otras 2 con carcinomas pobremente diferenciados, un 20%. Por lo tanto, tenemos que un 4,5% de las muestras de carcinomas colorrectales presentan mutación en BRAF y solo un 2,5% de las muestras de cáncer de pulmón presentan esta misma mutación. En total nos encontramos con un porcentaje de mutación del total de muestras de un 4%, siendo en nuestro trabajo algo superior, un 5%. En nuestro trabajo el 100% de las mutaciones de BRAF se han dado en casos de adenocarcinomas de colon, ya que es en la única patología en la que lo hemos estudiado, y el 100% de ellas se corresponden con mutaciones en V600E.

En otro estudio realizado por Martinetti D et al. en el país de Albania, se recogieron muestras de los casos de cáncer colorrectal de 159 pacientes para el estudio del estado mutacional de KRAS y BRAF. Todos estos casos se obtuvieron de la universidad de Tirana. Se estudiaron la aparición de mutaciones en los codones 12, 13, 61 y 146 en KRAS y en el codón 600 en BRAF. De esas 159 muestras, solo 10 presentaban mutación para BRAF (6,3%), siendo todas las mutaciones en V600E ⁽³⁵⁾.

En nuestro trabajo, como ya hemos comentado anteriormente, el total de muestras mutadas para BRAF se dan en casos de carcinomas colorrectales, y el 100% de ellas se

corresponden con mutaciones en V600E. Por lo tanto, tenemos un porcentaje mutacional del total de muestras de un 6,3% para BRAF, mientras que en nuestro trabajo es de un 5%.

De estos 10 que presentaron mutación en BRAF del estudio realizado por Martinetti D et al, 3 se corresponden con hombres (30%) y 7 con mujeres (70%), mientras que en nuestro trabajo la distribución es equitativa, 4 mujeres (50%) y 4 hombres (50%) ⁽³⁵⁾.

A nivel de tratamiento, el fármaco más conocido y que ha sido aprobado por la FDA para este propósito es el Sorafenib, luego el Vemurafenib, Encorafenib y Dabrafenib, debido a que su mecanismo de acción conlleva la inhibición de enzimas importantes de la vía MAPK como B-Raf ⁽¹⁸⁾. El uso de estos fármacos ha resultado más eficaz en casos de melanoma que en casos de cáncer colorrectal. En el caso de melanoma el Vemurafenib está aprobado para el melanoma metastásico, y fue en el año 2013 cuando se aprobó el uso para Europa. En los pacientes tratados con este fármaco se desarrollaron carcinomas de células escamosas cutáneos y queratoacantomas y a nivel mutacional se incrementa la frecuencia de mutación de RAS en un 60%, siendo HRAS la mutación más frecuente. Dabrafenib fue aprobado también en 2013 como monoterapia para el tratamiento de melanoma metastásico o irreseccable ⁽¹⁸⁾.

Después de realizar este trabajo, queda más que patente, la importancia de las terapias oncológicas dirigidas y su creciente peso en el arsenal terapéutico médico, y que a pesar de haber realizado un pequeño esbozo del perfil mutacional de los biomarcadores que hemos estudiado de los pacientes de la Provincia de Castellón, se necesitan muchos más estudios e investigación, para poder plantear horizontes terapéuticos más firmes y seguros, para que la práctica clínica médica pueda avanzar en la dirección correcta para mayor beneficio del paciente.

CONCLUSIÓN

Después de analizar y comparar los resultados de nuestro trabajo podemos sacar varias conclusiones, para poder arrojar algo más de luz acerca de la importancia de los nuevos biomarcadores génicos respecto a las opciones terapéuticas disponibles.

- Podemos concluir que los resultados obtenidos acerca del perfil mutacional de los pacientes afectados de cáncer de colon y pulmón diagnosticados en el hospital General de Castellón se corresponden con los datos obtenidos por otros estudios nacionales e internacionales, por lo que los tratamientos dirigidos que se proponen en esos trabajos, anti EGFR, anti ALK, inhibidores de PDL1 y demás, pueden ser una opción muy interesante dentro del arsenal terapéutico en los hospitales de la Provincia de Castellón.

- Después de comentar y analizar la gran cantidad de fármacos que se están desarrollando gracias a diferentes líneas de trabajo, podemos concluir también que el campo de las terapias dirigidas se encuentra en constante y rápida expansión, reafirmando su gran importancia frente a tratamientos convencionales y postulándose como el futuro acerca del tratamiento del cáncer colorrectal y adenocarcinoma de pulmón.

También, como comentario final del trabajo, sería interesante que todos los protocolos de tratamiento y detección de biomarcadores acerca del cáncer colorrectal y adenocarcinoma de pulmón se consensuaran en uno solo para otorgar al paciente el mejor proceso terapéutico posible.

BIBLIOGRAFÍA

1. VIURE_EN_SALUT_103.pdf [Internet]. [citado 17 de mayo de 2019]. Disponible en: http://publicaciones.san.gva.es/publicaciones/documentos/VIURE_EN_SALUT_103.pdf
2. Patología Estructural y Funcional de Robins y Contran 9 Ed.pdf (cap 15, pag 712-717; cap 17, pag 805-811)
3. cancerColorectalCombi_2013_2017.pdf [Internet]. [citado 17 de mayo de 2019]. Disponible en: http://www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/cancerColorectalCombi_2013_2017.pdf
4. cancerTraqueaBronquisPulmoCombi_2013_2017.pdf [Internet]. [citado 17 de mayo de 2019]. Disponible en: http://www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/cancerTraqueaBronquisPulmoCombi_2013_2017.pdf
5. cancerMelanomaCombi_2013_2017.pdf [Internet]. [citado 18 de mayo de 2019]. Disponible en: http://www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/cancerMelanomaCombi_2013_2017.pdf
6. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 19 de enero de 2017;18(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28106826>

7. Cicenás J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, Tarvydas R, Staniute G, Kalyan K, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Med Oncol*. febrero de 2017;34(2):26.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28074351>
8. Torres Courchoud I, Pérez Calvo JI. Biomarcadores y práctica clínica. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. abril de 2016;39(1):5-8.
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272016000100001
9. Menéndez-Sánchez P, Villarejo-Campos P, Padilla-Valverde D, Menéndez-Rubio JM, Rodríguez-Montes JA. Marcadores tumorales en el cáncer colorrectal. *Cir Cir*. 2013;81(2):169-75.
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=40211&id2=>
10. Fundación Instituto Roche | Oncobyg | Marcadores moleculares: Cáncer de pulmón [Internet]. [citado 17 de mayo de 2019]. Disponible en: https://www.instituto-roche.es/oncobyg/marcadoresmoleculares/cancer_de_pulmon/investigacion/173/
11. Kashani-Sabet M. Molecular markers in melanoma. *British Journal of Dermatology*. 1 de enero de 2014;170(1):31-5.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/bjd.12493>
12. Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA. Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares. *Gac Med Mex*. 2014;150(2):154-64.
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=49339>
13. Cortes-Funes H, Gomez C, Rosell R, Valero P, Garcia-Giron C, Velasco A, et al. Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. julio de 2005;16(7):1081-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15851406>
14. Spagnuolo A, Maione P, Gridelli C. Evolution in the treatment landscape of non-small cell lung cancer with ALK gene alterations: from the first- to third-generation of ALK inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2018;23(3):231-41.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30251885>
15. Evaluación e interpretación de la técnica inmunohistoquímica. PD-L1 en el cáncer de pulmón: Correlación entre muestras citológicas y piezas quirúrgicas.
<https://www.academia.cat/files/425-13549-DOCUMENT/Vega6711.04.2018>
16. Battaglin F, Naseem M, Lenz H-J, Salem ME. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*. noviembre de 2018;16(11):735-45.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30543589>
17. Wu C. Systemic Therapy for Colon Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018;27(2):235-42.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29496087>

18. Mayekar MK, Bivona TG. Current Landscape of Targeted Therapy in Lung Cancer. Clin Pharmacol Ther. noviembre de 2017;102(5):757-64.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28786099>

19. Harlé A, Busser B, Rouyer M, Harter V, Genin P, Leroux A, et al. Comparison of COBAS 4800 KRAS, TaqMan PCR and high resolution melting PCR assays for the detection of KRAS somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded colorectal carcinomas. Virchows Arch. marzo de 2013;462(3):329-35.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23400679>

20. Rodón N, Díaz O, Román R, Verdú M, Garbarino YN, Trias I, et al. SECUENCIACIÓN MASIVA vs ESTUDIOS MOLECULARES GEN A GEN. RESULTADOS DE UNA SERIE DE VALIDACIÓN EN 263 GENES DE 51 PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS. :1.

<http://www.histopat.es/2017/04/secuenciacion-masiva-vs-estudios-moleculares-gen-a-gen-resultados-de-una-serie-de-validacion-en-263-genes-de-51-pacientes-con-tumores-solidos/>

21. MP et al. Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry as diagnostic methods for ALK positive non-small cell lung cancer patients. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 19 de junio de 2019]. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359795>

22. Lafuente-Sanchis A, Zúñiga Á, Galbis-Caravajal JM, Cuenca M, Cremades A. Características clinicopatológicas de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico con mutaciones en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico en el Área de Salud de La Ribera (Comunidad Valenciana). Revista Española de Patología. enero de 2016;49(1):3-6. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-patologia-297-articulo-caracteristicas-clinicopatologicas-pacientes-con-cancer-S169988551500094X>

23. Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients | Annals of Oncology | Oxford Academic [Internet]. [citado 13 de junio de 2019]. Disponible en:

<https://academic.oup.com/annonc/article/16/7/1081/167219>

24. GEFITINIB [Internet]. [citado 14 de junio de 2019]. Disponible en:

http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:7xvGOcTmaJYJ:gruposedetra.bajo.sefh.es/genesis/informes-genesis/GEFITINIB_HVA_02_11.pdf+&cd=4&hl=es&ct=clnk&gl=es

25. Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. Cancer Discov. junio de 2014;4(6):662-73. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675041>

26. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan A-C, Doebele RC, Zhou Q, et al. Optimizing the Detection of Lung Cancer Patients Harboring Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Gene Rearrangements Potentially Suitable for ALK Inhibitor Treatment. *Clinical Cancer Research*. 15 de noviembre de 2010;16(22):5581-90. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062932>
27. Spagnuolo A, Maione P, Gridelli C. Evolution in the treatment landscape of non-small cell lung cancer with ALK gene alterations: from the first- to third-generation of ALK inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2018;23(3):231-41. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30251885>
28. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 14 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7839144?dopt=Abstract>
29. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer | NEJM [Internet]. [citado 13 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1606774>
30. D’Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Landi L, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. enero de 2015;112(1):95-102. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25349974>
31. Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer: Toward Personalized Medicine and Combination Strategies [Internet]. [citado 13 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/6984948/>
32. Gainor JF, Shaw AT, Sequist LV, Fu X, Azzoli CG, Piotrowska Z, et al. EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clin Cancer Res*. 15 de septiembre de 2016;22(18):4585-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27225694>
33. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2017;18(1):197. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28106826>
34. Aoki M, Fujishita T. Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;407:153-89. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28550454>
35. Martinetti D, Costanzo R, Kadare S, Alimehmeti M, Colarossi C, Canzonieri V, et al. KRAS and BRAF mutational status in colon cancer from Albanian patients. *Diagn Pathol*. 30 de septiembre de 2014;9:187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267307>

36. Wu C. Systemic Therapy for Colon Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018;27(2):23542. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29496087>
37. Seppälä TT, Böhm JP, Friman M, Lahtinen L, Väyrynen VMJ, Liipo TKE, et al. Combination of microsatellite instability and BRAF mutation status for subtyping colorectal cancer. *Br J Cancer*. 9 de junio de 2015;112(12):1966-75. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25973534>
38. Pérez-Carbonell L, Ruiz-Ponte C, Guarinos C, Alenda C, Payá A, Brea A, et al. Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer. *Gut*. junio de 2012;61(6):865-72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868491>
39. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade | *Science* [Internet]. [citado 13 de junio de 2019]. Disponible en: <https://science.sciencemag.org/content/357/6349/409>
40. Microsatellite Instability (MSI) Testing [Internet]. [citado 13 de junio de 2019]. Disponible en: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:y7AMTyzDvfQJ:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/bin/hnpcc-msi.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=es>
41. Andre TJ, Boni C, Navarro MFJ, Tabernero JAH, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(19):3109-16. <https://pdfs.semanticscholar.org/037e/c0de81994c4e5edf94d736d025133d72badf.pdf>
42. Cicenás J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, Tarvydas R, Staniute G, Kalyan K, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Med Oncol*. febrero de 2017;34(2):26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28074351>
43. Prevalencia de la mutación KRAS-BRAF en cáncer colorrectal y pulmonar. Análisis comparativo bibliográfico. - Pósteres - Sociedad Española de Anatomía Patológica [Internet]. [citado 13 de junio de 2019]. Disponible en: https://www.seap.es/posters/-/asset_publisher/Roi3/content/id/98156?inheritRedirect=false

