



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

Alejandro Martínez Fernández

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

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

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

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

Tesis presentada por

Alejandro Martínez Fernández

para aspirar a la titulación de Doctor en Medicina

Directores de la tesis:

Dr. Joan Albanell Mestres

Dra. Clara Montagut Viladot

Tutora de Tesis

Dr. Pere Gascón Vilaplana

Programa de Oncología Molecular y Translacional

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Barcelona, 2014

I. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.I HIPÓTESIS

Este proyecto aborda dos hipótesis complementarias potencialmente relevantes para determinar posibles biomarcadores en cáncer colorrectal:

1. MMP-7 degrada la matriz extracelular favoreciendo el crecimiento tumoral y la diseminación a distancia. El valor de MMP-7 en suero puede ser un biomarcador que prediga un peor pronóstico de la enfermedad en el momento del diagnóstico. El análisis puede determinarse directamente mediante una analítica sanguínea de manera asistencial sin necesidad de utilizar muestras histológicas tumorales.
2. Los tumores sensibles al tratamiento con cetuximab sufren la aparición eventos genéticos que conllevan la adquisición de resistencias al tratamiento. La comparación entre mutaciones y amplificaciones genéticas antes y después del tratamiento con cetuximab explicaría las diferentes estrategias para desarrollar resistencias. El conocimiento de estos mecanismos podrían ofrecer algún tratamiento dirigido a revertir esta resistencia. El estudio genético puede ser también determinado en sangre periférica, permitiendo monitorizar los pacientes sin necesidad de técnicas agresivas y detectar la aparición de eventos de manera precoz.

II.II OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto de tesis es determinar nuevos biomarcadores pronósticos y predictivos de resistencia al tratamiento en el cáncer colorrectal. De manera más específica y en relación a las hipótesis planteadas, los objetivos de este proyecto serán:

1. Definir el papel pronóstico de la concentración de Matrilisina (MMP-7) plasmática en pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal previo al tratamiento quirúrgicamente con intención curativa.
2. Determinar los cambios moleculares en las vías de señalización activadas por EGFR que aparecen en los pacientes tras adquirir resistencia al tratamiento con cetuximab, en biopsias tumorales y sangre periférica.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

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

III.I.I PACIENTES

El trabajo se diseña como un estudio prospectivo con una cohorte. Los pacientes eran inicialmente reclutados para el estudio en el Servicio de Cirugía Digestiva del Hospital Clínic de Barcelona. Se valoraron los siguientes criterios de inclusión:

- Tener una edad superior a 18 años
- Diagnóstico de sospecha de adenocarcinoma colorrectal
- Tener la indicación de cirugía con curativa radical
- Firmar y aceptar el consentimiento informado

Como criterios de exclusión fueron definidos:

- Presencia de metástasis a distancia
- Contraindicación médica a la resección quirúrgica.
- Deseo personal de no ser intervenido quirúrgicamente
- Subtipo histológico diferente al de adenocarcinoma

En todos los pacientes era obligatorio realizar un estudio de extensión radiológico para confirmar la ausencia de lesiones a distancia y obtener el estadio clínico previo a la cirugía. Este estudio se realizaba mediante

radiografía de tórax o tomografía computarizada (TC) de tórax asociada a un estudio abdominal mediante ecografía o TC. Una vez que cada paciente firmaba el correspondiente consentimiento informado, se recogían los antecedentes médicos, los hallazgos de la exploración física y los valores de hemograma, función hepática y renal obtenidos previamente al acto quirúrgico.

En el caso de que el paciente estuviera diagnosticado de una neoplasia localizada en el recto, era obligatorio además disponer del resultado de un estudio ecoendoscópico sobre el tumor primario. Si se correspondían a una afectación local T3 o T4, los pacientes podían realizar tratamiento neoadyuvante con quimioterapia (225 mg/m² de 5-Fluorouracilo 5 días a la semana en infusión continua) concomitante con radioterapia (45 Grays (Gy) a dosis de 1,8 Gy por sesión).

Siguiendo los protocolos de tratamiento del Hospital Clínic, los pacientes eran intervenidos siguiendo los estándares de cada tipo de resección para obtener una resección completa, con márgenes libres y con suficientes estructuras adenopáticas para su análisis histológico. Tras el acto quirúrgico los pacientes estadio II y III fueron evaluados por un oncólogo médico para decidir la administración o no de tratamiento adyuvante con quimioterapia basado en 5-Fluorouracilo. El seguimiento clínico de los pacientes incluidos se realizaba cada tres meses los dos primeros años y cada seis meses los tres posteriores. Se realizaban determinaciones plasmáticas del Antígeno Carcinoembrionario (CEA) previo a cada control de seguimiento. En cuanto al resto de

exploraciones, cada seis meses los dos primeros años y anualmente los tres restantes se realizaban una ecografía abdominal o TC en caso de tratarse de una neoplasia localizada en colon o recto respectivamente. Asimismo, a todos los pacientes se les realizaba una radiografía de tórax anual y una fibrocolonoscopia cada dos años. El estudio recibió la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic de Barcelona, cumpliéndose la legalidad vigente en investigación biomédica y la Declaración de Helsinki.

III.I.II OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE MMP-7

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron sometidos a una extracción sanguínea en un tubo carente de anticoagulante dentro de los diez días previos a la resección quirúrgica. Tras su obtención, todas las muestras obtenidas fueron inmediatamente centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante (suero del paciente) fue almacenado a -80 grados centígrados hasta su análisis.

La concentración en sangre de MMP-7 se determinó mediante un análisis cuantitativo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un kit comercial (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, USA). Todas las muestras se analizaron por duplicado. En el caso de obtener un valor superior del rango recomendado del ensayo, las muestras se diluyeron mediante un diluyente calibrador aportado por el fabricante para obtener valores que estuvieran incluidos en el rango del ensayo.

La determinación mediante ELISA se realizó siguiendo la metodología especificada en el protocolo del fabricante. La base física fue un soporte sólido formado por pocillos en los que se encontraban unidos anticuerpos específicos contra MMP-7 humana. Se añadían 100 µl de solución diluyente a cada pozo y posteriormente 50 µl del suero obtenido de los pacientes. Se incubaba durante 2 horas en un agitador horizontal a 500 revoluciones por minuto (rpm). En dos líneas de los pocillos de cada placa se añadía una solución con MMP-7 a concentraciones determinadas como control positivo y como calibrador; y en otra línea sólo se añadió la solución diluyente como control negativo de la técnica (Figura 17).

Tras las 2 horas de incubación, se realizaban 4 lavados consistentes en la aspiración del medio de cada pozo y la adición de 400 µl de una solución administrada por el fabricante. Posteriormente se añadía 200 µl de una solución de anticuerpo anti-MMP-7 conjugada con peroxidasa y se incubaba otras 2 horas en agitación. Se realizaban lavados de los pozos siguiendo el mismo protocolo del lavado previo y posteriormente se añadían 200 µl de una solución sustrato formada por peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina. Esta última quedaba oxidada dando lugar a un residuo amarillo. Tras 30 minutos de incubación se añadía ácido sulfúrico 2N para interrumpir la reacción y el resultado del test se determinaba mediante colorimetría de cada pocillo. Para obtener los valores del test, se determinaba la densidad óptica a 450 nM, restándose el valor de 540 nM. Mediante los pozos control y las diluciones de calibrado, se obtenía la concentración de MMP-7 en cada muestra sanguínea (Figura 17).

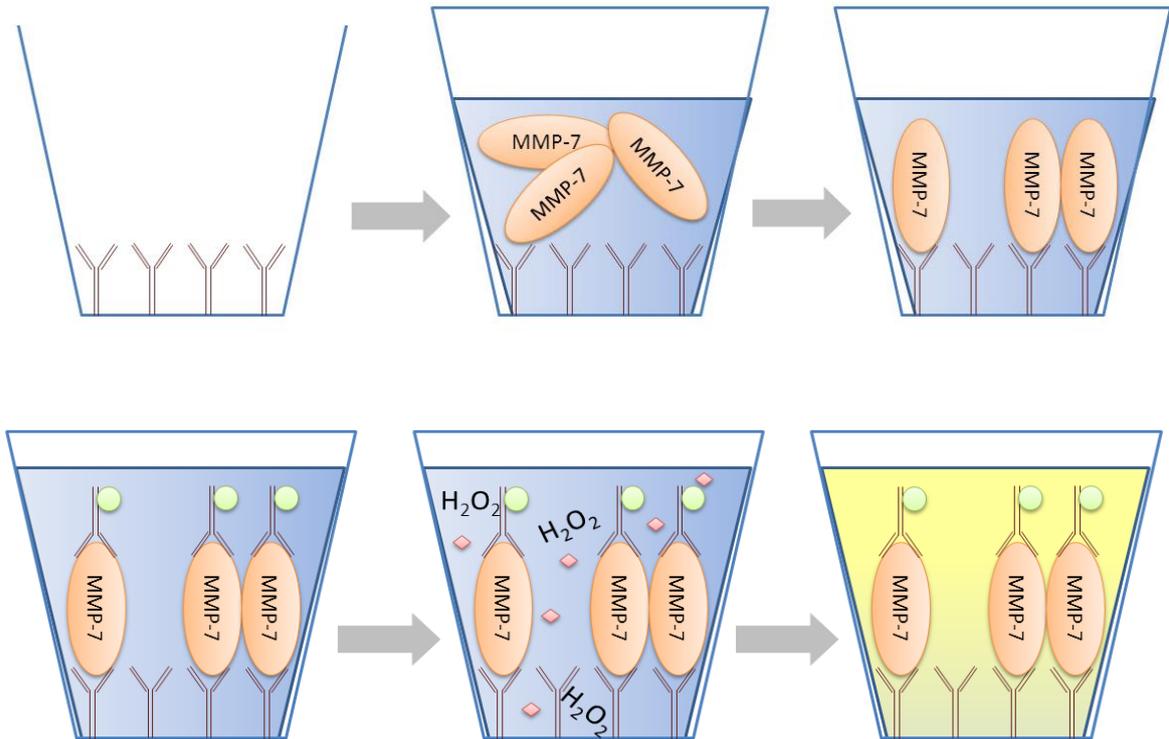


Figura 17: Técnica de ELISA para determinar la concentración de MMP-7 en sangre

III.I.III MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 14.0. Las variables clínicas finalmente incluidas en el análisis fueron: género, fecha de nacimiento, fecha de la cirugía, tipo de cirugía (asistida por laparoscopia o resección abierta), localización del tumor, estadio patológico, número de ganglios linfáticos evaluados, administración de tratamiento adyuvante, fecha y lugar de la recurrencia, tratamiento de la recurrencia, fecha de último seguimiento o de muerte y causa de la muerte. Las variables analíticas fueron: valores de MMP-7, CEA, bilirrubina, ALAT, ASAT, fosfatasa alcalina y creatinina.

Todas las variables fueron inicialmente evaluadas mediante el test Shapiro-Wilk para determinar su normalidad o no. Las variables cuantitativas fueron posteriormente comparadas mediante el test Student t (distribución normal) o el test Mann-Whitney U (distribución no normal). Las variables con características categóricas se compararon utilizando el test Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher en caso de no cumplirse los criterios para el uso de Chi-cuadrado (más de cinco casos en al menos 80% de las categorías).

La Supervivencia Global (SG) se determinó como el tiempo desde la cirugía hasta la muerte o último seguimiento del paciente. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue definido como el tiempo transcurrido desde la cirugía hasta la recidiva, muerte o último seguimiento del paciente.

El papel de MMP-7 como factor pronóstico fue evaluado mediante dos modelos Cox de medianas proporcionales, uno para cada variable dependiente (SG y SLE). Las variables independientes incluidas en el modelo Cox, además de MMP-7, fueron edad, estadio T, estadio N, CEA y tipo de cirugía. Los individuos con alguna de estas variables desconocidas fueron excluidos del análisis. Las variables cuantitativas se incluyeron como continuas para evitar puntos de cortes arbitrarios, a excepción de la afectación ganglionar (N). En este caso, se introdujo en forma de dos categorías, negativo (N0) y positivo (N1 y N2). El motivo fue que el bajo número de pacientes clasificados como N2 generaban intervalos de confianza excesivamente amplios al añadirlos al estudio multivariante.

El modelo Cox se calculó mediante métodos de eliminación consecutivos de manera automatizada (inclusión de las variables con resultado $P \leq 0.05$ y exclusión de las variables con $P \geq 0.10$). De esta manera se obtuvo el mejor modelo de dependencia. Las variables excluidas mediante este método automatizado se incluyeron nuevamente una por una en el análisis para determinar si existía algún efecto de confusión; definido como el cambio de la Hazard Ratio de MMP-7 superior al 10% al incluir la variable. Finalmente se eligió el modelo con mayor potencia de predicción según el coeficiente de determinación. Asimismo, se realizó una estimación de la probabilidad de recidiva usando diferentes patrones de variables independientes mediante el modelo Cox.

Además, se realizó una clasificación de los pacientes en dos grupos en base al valor mediana de la concentración plasmática de MMP-7. Se definió un grupo con valores inferiores a la mediana (MMP-7 reducida) y un grupo con valores igual o superiores a la mediana (MMP-7 elevada). Esta clasificación fue utilizada para expresar gráficamente la SG y la SLE mediante curvas Kaplan-Meier y determinar la dependencia de las variables de supervivencia con valores de MMP-7 mediante el uso del test log-rank. Todos los valores de P se evaluaron de manera bilateral.

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

III.II.I PACIENTES

El estudio se planteó como una prueba de concepto para caracterizar la presentación de los eventos moleculares que emergen tras el tratamiento con cetuximab en la práctica clínica. Se diseñó como un estudio prospectivo descriptivo. Se definieron como criterios de inclusión que fueran pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal metastásico, que presentaran progresión al tratamiento con cetuximab en monoterapia o combinado con quimioterapia, y que previamente a la progresión debían haber presentado una respuesta parcial o una estabilización de la enfermedad durante al menos 16 semanas según criterios radiológicos RECIST 1.1.

Todos los pacientes fueron tratados en el Servicio de Oncología Médica del Hospital del Mar (Barcelona) entre enero de 2010 y junio de 2013. Los participantes debían aceptar su inclusión mediante la firma de un consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del centro (CEIC-2012/4741/I), cumpliéndose la legalidad vigente en Investigación Biomédica y la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados de las características del estudio, de los objetivos de la realización de técnicas invasivas para la obtención de muestra tumoral y de los potenciales riesgos de

dichas técnicas mediante un consentimiento informado específico sobre cada técnica diagnóstica.

En el estudio únicamente se incluyeron aquellos pacientes en los que las muestras biológicas antes y después del tratamiento con cetuximab eran de buena calidad, y en los que se preveía disponer de material suficiente para realizar los análisis. De entre los pacientes incluidos, en 34 se recogieron dos muestras de manera prospectiva para este estudio, y en 3 casos se analizaron además otras biopsias obtenidas en el contexto de su tratamiento médico.

La biopsia tumoral obtenida durante el proceso diagnóstico de la enfermedad fue la utilizada como muestra pre-tratamiento (inicial). En la mayoría de los casos, esta muestra se obtuvo directamente del tumor primario a través de una colonoscopia. No se realizaron biopsias de las lesiones metastásicas de manera rutinaria a excepción de que fuera necesaria para confirmar el diagnóstico de extensión. Las muestras se obtuvieron del Banco de Tumores del Hospital del Mar (MarBiobank).

Este estudio incluía una nueva biopsia tras la progresión al tratamiento, que los pacientes consentían realizar. Por razones éticas, las biopsias se obtenían de la lesión más accesible para realizar el procedimiento diagnóstico y que menor riesgo pudiera tener para el paciente. Una enmienda al protocolo del estudio añadió que, en el caso de detectar mutaciones en el tejido tumoral, se ampliaba

la detección de las mismas en sangre periférica para la detección de dichas mutaciones. Por este motivo, la detección de mutaciones en sangre periférica no fue aplicada a todos los pacientes de este estudio.

III.II.II SECUENCIACIÓN GENÉTICA

El análisis de mutaciones comprendió el estudio de varios genes relacionados con las vías de señalización activadas por EGFR y de los que existía alguna evidencia publicada de su potencial efecto como posible elemento de resistencia al tratamiento con cetuximab. Se determinaron las mutaciones en *KRAS* (exones 2, 3 y 4), *BRAF* (exón 15), *NRAS* (exones 2, 3, 4), *PIK3CA* (exones 9 y 20) y *EGFR* (exón 12). Las secuencias cebadoras de la reacción PCR para cada secuenciación se obtuvieron del kit comercial OncoBasic (Seqplexing, Valencia, España) a excepción del estudio en los *KRAS* y *NRAS*, evaluados mediante el kit TheraScreen *NRAS* Pyror y TheraScreen *KRAS* Pyror (Qiagen, Venlo, Holanda). Para el gen *EGFR*, se utilizaron secuencias creadas específicamente para esta secuenciación:

- *EGFR* EXON 12:
 - F 5'-CAAAGTTTTTCAGGGATACATTGTTTTT-3'
 - R 5'-CGGTGACTTACTGCAGCTGTTTT-3'

Las muestras de sangre periférica se recogieron en tubos de extracción carentes de anticoagulante y fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos, recogándose el sobrenadante. El ADN presente en suero fue purificado mediante el kit comercial *QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit*

(Qiagen) en el que se purificó el ADN libre circulante. La extracción de ADN del tejido tumoral mediante el kit *DNAeasy* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez extraído, se analizaba la concentración y pureza del ADN mediante un test de absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nanómetros con un espectrofotómetro Nanodrop. Finalmente, las muestras fueron congeladas a -80 grados centígrados hasta su análisis. La secuenciación se realizó mediante dos técnicas diferentes: secuenciación convencional usando el método de Sanger, y ultrasecuenciación mediante la técnica de pirosecuenciación.

En este trabajo, la técnica de Sanger se realizó mediante la utilización del kit comercial *Sanger BigDye v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) y el secuenciador genético *3500DX* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada muestra analizada se añadieron 4 ng de ADN, las secuencias cebadoras de la reacción a una concentración final de 0.8 μ M y la mezcla comercial de nucleótidos, polimerasa y tampón con un volumen total de 10 μ l. De manera automatizada se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La síntesis de cada cadena era bloqueada por la unión de dideoxynucleótidos (nucleótidos sin el grupo hidroxilo del carbono 3) marcados. Tras la conclusión de la PCR, el soporte ordenó los fragmentos obtenidos a través de un proceso de electroforesis y efectuó la lectura de los resultados de manera automatizada.

Las técnicas de ultrasecuenciación (*deep-sequencing* en inglés) permiten detectar fragmentos de ADN presentes en muy pequeña proporción en la muestra analizada. Estos sistemas mejoran de manera significativa la resolución de la lectura de los fragmentos obtenidos, por lo que se pueden multiplicar el número de fragmentos a analizar. En este estudio se utiliza la plataforma *Next Generation Sequencing (NGS) 454 GS Junior* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), que utiliza la técnica de pirosecuenciación (Margulies et al., 2005). Mediante los reactivos aportados por la plataforma, las muestras fueron procesadas hasta obtener hebras únicas de ADN de una longitud comprendida entre 500 a 1000 pares de bases. Estas hebras fueron añadidas a un medio oleoso en donde eran atrapadas de manera individual por microesferas líquidas conformadas por un tampón de reacción de PCR, secuencias adaptadoras cebadoras y enzima polimerasa. Cada hebra fue amplificada y posteriormente depositada de manera individual en la base de un soporte de fibra óptica con 1.7 millones de micropozos. Tras liberar el ADN, se realizó una nueva amplificación por PCR, esta vez utilizando las secuencias cebadoras específicas para cada gen a estudio. La plataforma inducía el contacto de cada pozo con un nucleótido determinado. En caso de corresponder al complementario de la secuencia a analizar, se producía la unión del nucleótido a la cadena, liberándose una molécula de pirofosfato. El pirofosfato era reconocido por la enzima ATP sulfurilasa, sintetizándose ATP, que a su vez era degradado por una luciferasa emitiéndose una señal lumínica. Si el nucleótido no correspondía con la secuencia complementaria, no se producían estas reacciones enzimáticas y no se emitía la señal. Este proceso se iba repitiendo sucesivamente, variando cada vez los nucleótidos. La

correlación entre las señales lumínicas y el nucleótido presente en el medio en ese momento permitían conocer la secuencia del gen. La plataforma realizó todo el proceso de manera completamente automatizada. Los datos obtenidos fueron procesados y analizados mediante el programa *GS Amplicon Variant Analyzer* versión 2.5p1 (Roche).

En el caso de detectar la presencia de alguna mutación, se confirmaban mediante la técnica CAST-PCR (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante. Se realizó un PCR utilizando cebadoras capaces únicamente de reconocer las secuencias mutadas y no las nativas. Además, a la reacción se añadía un fragmento de ADN capaz de dimerizar y bloquear las secuencias no mutadas, incrementando así la sensibilidad de la técnica.

III.II.III HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

El estudio del número de copias genéticas se realizó mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en el caso de mantener suficiente material histológico tras los análisis de mutaciones descritos previamente. Se identificó la presencia de amplificaciones genéticas calculando el ratio de cada gen con su control. Se evaluaron al menos 50 núcleos para obtener el valor medio, siendo positivos si el 10% de los núcleos tenían un ratio superior a 2,2 para *KRAS* y *HER2* y 2,9 en el caso de *EGFR* (Cappuzzo et al., 2008). Para determinar el gen *EGFR* se utilizó el test LSI *EGFR/CEP7* (Abbott Molecular Inc., DesPlaines, IL), para *KRAS* el test *KRAS/CEP12* (Abnova) y para *HER2*, el test PathVysiont *HERS/CEP17* (Abbott Laboratories, Green Oaks, IL).

Para realizar la técnica de FISH, las muestras histológicas fijadas en parafina fueron inicialmente sometidas a un proceso de desparafinación e hidratación sumergiéndolas en xileno y en concentraciones decrecientes de etanol en agua. Posteriormente se desnaturalizó la doble cadena de ADN con tiocianato de sodio 1N para permitir el acceso de una sonda fluorescente con una secuencia complementaria a los genes estudio y a la secuencia control (CEP). Tras una incubación con las sondas comerciales y los respectivos lavados, el corte histológico fue analizado en un microscopio de fluorescencia para calcular el ratio entre el gen a estudio y la secuencia control localizada en el centrómero del cromosoma donde se localizaba el gen problema.