



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. DISCUSIÓN

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

Este es el segundo trabajo presente en la literatura en el que se evalúa el papel de MMP-7 en sangre periférica como factor pronóstico en cáncer colorrectal, y el primero que se realiza en pacientes tratados con intención curativa.

Previamente se había evaluado esta determinación en pacientes diagnosticados cáncer colorrectal metastásico; trabajo en el que también colaboró el doctorando (Maurel et al., 2007) y que fue la primera aplicación de la determinación de MMP-7 en sangre periférica como potencial biomarcador en cáncer.

Los resultados obtenidos lograron demostrar la hipótesis de trabajo y cumplían los objetivos del estudio. En esta serie de pacientes que se sometieron a cirugía con intención curativa, MMP-7 fue un biomarcador pronóstico independiente para la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad. De manera adicional, se objetivó que el pronóstico de los pacientes que presentaron recidiva tumoral era significativamente peor si presentaban MMP-7 elevada. Es importante destacar que la gran mayoría de recidivas sucedieron pasados varios meses, o incluso años, desde la determinación sanguínea de MMP-7.

Aunque parecía existir una asociación entre la concentración elevada de MMP-7 y el porcentaje de recidiva y el tiempo a la progresión tras la recidiva, el análisis estadístico no fue capaz de demostrar diferencias significativas en estas variables ($P=0.084$ y $P=0.065$ respectivamente). El número de pacientes analizados por presentar progresión de la enfermedad fue muy reducido (26 y 16 pacientes respectivamente), por lo que es posible que no se alcanzara la significación estadística por una falta de potencia en el análisis.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron reproducidos posteriormente por otro grupo de investigadores, mostrando nuevamente el papel de MMP-7 en sangre como factor pronóstico en cáncer colorrectal no metastásico (Pryczynicz et al., 2013). Asimismo, la metodología de este artículo ha sido aplicada en otros tipos de neoplasias, demostrando que la concentración de MMP-7 en sangre puede ser un biomarcador pronóstico en cáncer de ovario (Acar et al., 2008), próstata (Szarvas et al., 2011), vejiga (Szarvas et al., 2010) o páncreas (Fukuda et al., 2011). Además, los valores plasmáticos de MMP-7 demostraron ser útiles para monitorizar la eficacia del tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer colorrectal avanzado (Gallego et al., 2009).

La indicación de tratamiento adyuvante tras resección de tumores clasificados como estadio II (tumores que superan la capa submucosa pero no presentan afectación de nódulos linfáticos) es controvertida. El riesgo de recidiva en estos pacientes es inferior a los clasificados en estadio III, en los que la quimioterapia

ofrece un beneficio claramente definido. En este estudio, los pacientes estadio II con MMP-7 elevada y los pacientes estadio III con MMP-7 reducida presentaron una supervivencia muy similar. La concentración plasmática de MMP-7 podría ser útil para discriminar los pacientes estadio II con peor pronóstico y que, por tanto, podrían tener un mayor beneficio del tratamiento adyuvante con quimioterapia.

Este estudio se desarrolló antes de la implementación de varios avances importantes en el tratamiento del cáncer colorrectal, como la combinación de 5-fluorouracilo, oxaliplatino y ácido folínico como tratamiento adyuvante de elección o la terapia con anticuerpos monoclonales en enfermedad metastásica. Es por ello que los resultados obtenidos, incluyendo los de supervivencia tras la recidiva tumoral, deben ponerse en el contexto terapéutico del momento en el que se inició el estudio.

Los resultados de este trabajo deben ser confirmados y validados antes de definir claramente su validez y aplicabilidad a la práctica clínica habitual. Los pacientes evaluados en el trabajo cumplían unos mínimos requisitos de inclusión, por lo que existe gran heterogeneidad en posibles factores de confusión como edad, comorbilidades o terapia farmacológica habitual. Estos factores no pudieron ser controlados en su totalidad dadas las características y el diseño del estudio. Por otro lado, los valores de MMP-7 utilizados para clasificar los pacientes fue el de la mediana obtenida en nuestra cohorte de

pacientes. Por tanto, la utilización de este valor fue una aproximación experimental válida pero arbitraria para su aplicabilidad.

Para poder validar MMP-7 como factor pronóstico independiente sería necesario introducir su determinación en un ensayo clínico prospectivo, en el que los pacientes reclutados están sujetos a criterios estrictos de inclusión y la población resultante es homogénea. En este sentido, el análisis del ensayo ROTG 9074 de tratamiento adyuvante en pacientes intervenidos en cáncer de páncreas demostró que la presencia de MMP-7 elevada es un biomarcador de resistencia al quimioterápico gemcitabina; y que únicamente los pacientes que presentan MMP-7 reducida se beneficiarían de este tratamiento (Heestand et al., 2014). Esta metodología de validación se está aplicando también para confirmar el papel de MMP-7 como marcador cáncer colorrectal metastásica (Maurel et al., 2011) y es de esperar que los resultados de este proyecto puedan confirmarse en un futuro con otro estudio aleatorizado.

Las causas por las que la presencia de MMP-7 pueden conferir un peor pronóstico en estos pacientes es desconocida. En nuestro estudio, la elevación plasmática de MMP-7 definía un subgrupo de pacientes en los que la recidiva tumoral aparecía antes y, tras dicha aparición, la enfermedad presentaba mayor agresividad. Correlacionando estos datos con los efectos conocidos de MMP-7 se pueden definir algunas hipótesis sobre el mecanismo biológico: es posible que MMP-7 favorezca la transición epitelio-mesénquima en las células tumorales; truncando la E-cadherina celular o facilitando la migración celular

mediante la degradación de la matriz extracelular; o bien, otro posible mecanismo podría ser el enriquecimiento de factores de crecimiento al alcance de los receptores de membrana, tanto de las células tumorales como de las células de estroma, induciendo así la proliferación tumoral y la generación de angiogénesis.

Los datos epidemiológicos obtenidos en este trabajo y en otros sobre la expresión de MMP-7 en cáncer conllevan que pueda ser considerado una posible diana terapéutica. Se han evaluado ya algunos inhibidores de metaloproteinasas en el tratamiento del cáncer, como el marimastat, pero todos ellos no demostraron beneficio clínico y sí toxicidad grave (Sparano et al., 2004), por lo que es necesario ampliar el conocimiento del mecanismo biológico de MMP-7 en la aparición y evolución del CCR y plantear el desarrollo de nuevos fármacos. Los pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal desarrollan inmunoglobulinas G específicas contra MMP-7 (Broussard et al., 2013) y además MMP-7 es sintetizada directamente por las células tumorales. Por lo tanto, una posible estrategia terapéutica sería el desarrollo de vacunas terapéuticas usando MMP-7 como antígeno, de manera análoga a lo realizado en otras patologías tumorales (Kantoff et al., 2010).

En resumen, la determinación de MMP-7 plasmática es un biomarcador pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal localizado tributarios de tratamiento con intención curativa. Además, esta proteína podría ser de utilidad para la toma de decisiones clínicas, como la de administrar tratamiento

adyuvante tras la detección de pacientes con especial mal pronóstico.

Finalmente, MMP-7 podría ser una diana terapéutica de interés en el cáncer colorrectal.

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

Estudiar los cambios genéticos que se producen en los tumores tras la progresión a tratamientos dirigidos sobre dianas moleculares es una herramienta útil para conocer los mecanismos de resistencia y desarrollar tratamientos que sean clínicamente eficaces en esta situación clínica. En este trabajo se realiza un amplio análisis para determinar mecanismos de resistencia a cetuximab. Este análisis es el más completo y abarca mayor número de pacientes de todos los publicados hasta el momento.

Este estudio intenta reflejar la práctica rutinaria para evaluar la aplicabilidad de análisis genéticos en este contexto. Los pacientes incluidos son muy heterogéneos, tanto en características demográficas, como en las características biológicas de la enfermedad y en los tratamientos recibidos. Esta variabilidad es un reflejo de la diversidad de casos que pueden aparecer en la práctica clínica habitual. Los esquemas terapéuticos administrados se basaron en el protocolo de tratamiento de la institución y la decisión del médico responsable.

Las mutaciones en la familia de genes *RAS* han demostrado conferir resistencia primaria a los anticuerpos anti-EGFR. En este proyecto identificamos las mismas alteraciones genéticas como los eventos más

prevalentes tras la adquisición de resistencia adquirida a esta terapia. Las mutaciones de *RAS* mayoritarias en la población de cáncer colorrectal son las que se presentan en el codón 12 y 13 del gen *KRAS*. En este trabajo se describe una proporción diferente de mutaciones tras el tratamiento con cetuximab; presentando mayor prevalencia mutaciones menos frecuentes. Esto pudiera ser causado por un mecanismo de selección de la muestra dado que la mayoría de los pacientes fueron tratados cuando el análisis mutacional se restringía al exón 2 de *KRAS*. Por otro lado, en este proyecto se describe por primera vez la presencia de mutaciones en los genes *NRAS* como eventos moleculares que surgen tras la progresión a cetuximab. En base a estos resultados, se puede proponer que la adquisición de mutaciones en los genes *RAS* podría ser, al igual que en el caso de la resistencia primaria, el principal mecanismo de resistencia a cetuximab en pacientes inicialmente sensibles a este tratamiento. En la misma dirección a este trabajo, dos publicaciones previas en las que se analizaban mutaciones de *KRAS* sobre 28 y 21 pacientes respectivamente proponen también que éstas pudieran ser una causa de progresión a tratamientos contra EGFR (Diaz et al., 2012; Misale et al., 2012)

Por otro lado, es de destacar otro potencial mecanismo de resistencia basado en mutaciones del dominio extracelular o la amplificación del gen *EGFR*. En el 8% de los pacientes se detecta la mutación S492R (Montagut et al., 2012). Además, este proyecto describe la presencia de dos mutaciones previamente desconocidas en pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal: K467T y R451C. Estas mutaciones podrían inducir cambios en la conformación del receptor que evitaría su reconocimiento por cetuximab, pero mantendría intacta

su capacidad de activarse por el ligando y dimerizar con otros receptores. Al igual que lo descrito con la mutación S492R, es posible que otros tratamientos activos sobre EGFR pudieran ser eficaces contra tumores que generan estas alteraciones genéticas.

La amplificación de EGFR es otro de los posibles mecanismos de resistencia adquirida. Un 25% de pacientes que presentaban amplificación de EGFR a la progresión a cetuximab, no mostraban alteraciones en el número de copias antes del tratamiento. Esta alteración también permitiría desarrollar tratamientos específicos: al no existir alteraciones estructurales en la proteína, estos pacientes podrían ser tratados con terapias intensivas contra EGFR para intentar revertir esta sobreexpresión.

El papel de las mutaciones de *BRAF* en la resistencia primaria a cetuximab es controvertido. En este trabajo, se detecta la mutación de *BRAF* en cuatro pacientes, pero en todos los casos dichas mutaciones ya estaban presentes antes del tratamiento. Además, todos los tumores que presentaban alguna mutación en este gen presentaban otra alteración genética asociada que pudiera estar también relacionada con la resistencia a cetuximab. Por lo tanto, los datos de este estudio sugieren que las mutaciones de *BRAF* no están directamente involucradas en la resistencia adquirida al tratamiento basado en cetuximab.

En este trabajo se muestra que los eventos genéticos en el cáncer colorrectal son dinámicos. En varios pacientes se logra realizar biopsias repetidas tras las progresiones a tratamiento, objetivándose diferentes alteraciones genéticas tras cada nueva progresión. Esto pone de manifiesto la presión evolutiva que los tratamientos ejercen en el tumor, así como la capacidad adaptativa de la enfermedad.

Es remarcable que los posibles mecanismos de resistencia a cetuximab se solapan entre ellos, apareciendo más de un mecanismo simultáneamente en un tercio de los tumores analizados. La detección cuantitativa de las mutaciones ha logrado determinar que la mayoría de las que aparecen tras la resistencia a cetuximab ya estaban presentes en el tumor, pero en menor proporción, antes de iniciarse el tratamiento. Este dato sugiere que los eventos moleculares ya están presentes en el momento desde un inicio y que, por un fenómeno de selección dirigida por el tratamiento, las clonas más resistentes aumentan su proporción relativa dentro de la masa tumoral y provocan la progresión de la enfermedad.

En este proyecto, la metodología ideal habría sido obtener las muestras siempre de la misma localización anatómica, pero en ese estudio se priorizó el riesgo del paciente, y se obtuvieron de las lesiones más accesibles y siguiendo las técnicas menos agresivas. Además, algunas de las lesiones analizadas antes del tratamiento fueron resecadas quirúrgicamente, por lo que ya no fue posible obtener nuevas muestras de dichas lesiones.

El estudio de mutaciones a partir de sangre periférica es una técnica mucho menos agresiva para el paciente. Además permitiría monitorizar el estado genético de las células tumorales y detectar precozmente la adquisición de resistencias. En este proyecto se realiza un análisis exploratorio que demuestra que la determinación plasmática es un método aplicable, pero en nuestra experiencia la correlación con los datos histológicos dista de ser adecuada, dada la tasa de falsos negativos. Es necesario incrementar la sensibilidad de esta técnica para que pueda plantearse su utilización en la práctica clínica habitual de manera fiable y estandarizada. En este sentido; la aplicación de nuevas técnicas genéticas, como el estudio genético mediante *BEAMing (Beads, Emulsions, Amplification, and Magnetics)*, logra detectar mutaciones del gen *KRAS* en DNA circulante con una sensibilidad que alcanza el 87.2% de los casos (Bettegowda et al., 2014).

Los resultados de este proyecto (a excepción de la mutación S492R) no influyen directamente en el tratamiento rutinario de los pacientes, pero son la base racional para el diseño de tratamientos dirigidos a tratar estas alteraciones genéticas adquiridas o revertir la resistencia a cetuximab. Por otro lado, se puede concluir que los pacientes incluidos en ensayos clínicos tras un tratamiento con cetuximab y en los que se desea estudiar el estado mutacional de la neoplasia, deberían ser sometidos a una nueva biopsia para actualizar el estado genético tumoral.

En resumen, este estudio ofrece evidencias sobre la evolución de los eventos moleculares que emergen a la resistencia adquirida a cetuximab y ofrecen el racional sobre los posibles mecanismos biológicos relacionados con este proceso. Además, la metodología de este proyecto es aplicable en el estudio sobre la resistencia adquirida a otros tratamientos biológicos en otras patologías tumorales.

II. CONCLUSIONES

VI.I MMP-7 COMO FACTOR PRONÓSTICO EN CÁNCER

COLORRECTAL RESECABLE

- Se analiza la concentración de MMP-7 en sangre periférica como un potencial biomarcador pronóstico independiente en pacientes tratados de cáncer de colon con intención curativa.
- Se logra determinar la concentración de MMP-7 en sangre periférica en 175 pacientes en un ámbito asistencial, siendo una técnica fácilmente aplicable en la práctica clínica habitual.
- Se estudia la relación entre MMP-7 y variables que definen el curso clínico de la enfermedad:
 - Supervivencia global. MMP-7 es un factor pronóstico independiente en estos pacientes: Hazard Ratio (HR)=1.113, Intervalo Confianza (IC) 95%=1.038-1.209 P=0.004.
 - Supervivencia libre de enfermedad. MMP-7 es un factor pronóstico independiente: HR=1.119, IC 95% =1.038-1.207; P<0.001.
 - Supervivencia a 4 años. Los pacientes con MMP-7 inferior a la mediana obtuvieron una supervivencia global a 4 años del 92.6%, versus 56.9% en los pacientes con MMP-7 superior (P<0.001).

- Supervivencia tras la recidiva: 9.1 meses en pacientes con MMP-7 elevada versus 46.2 meses en pacientes con MMP-7 reducida ($P < 0.001$). La diferencia de supervivencia entre los pacientes de ambos grupos fue de 37.1 meses, más de 3 años.
- MMP-7 se complementa con la información que ofrece la presencia o no de diseminación ganglionar, pudiendo clasificar los pacientes en tres grupos pronósticos según ambas variables.
- Se confirma que la determinación de MMP-7 en sangre periférica puede ser un biomarcador pronóstico independiente. La determinación de MMP-7 puede, además, realizarse mediante técnicas accesibles para la práctica clínica habitual.

VI.II DETERMINACIÓN DE EVENTOS MOLECULARES EN PACIENTES RESISTENTES A CETUXIMAB

- Se determinan los eventos genéticos en muestras tumorales de 37 pacientes que han progresado tras tratamiento basado en cetuximab, y se compara con las muestras obtenidas previamente al inicio de dicha terapia.
- *KRAS* y *NRAS* son los genes mutados más frecuentemente en las muestras obtenidas tras adquisición de resistencia a cetuximab. Se describe por primera vez la aparición de mutaciones en *NRAS* tras progresión al tratamiento con cetuximab.
- Los eventos relacionados con el gen *EGFR* son los segundos en frecuencia. Se detecta la ya descrita mutación del dominio extracelular S492R, pero además se detectan dos mutaciones desconocidas hasta el momento en pacientes: K467T y R451C.
- En tres pacientes se logra obtener una muestra histológica tras el progreso de la enfermedad después de cetuximab y de otros tratamientos administrados con posterioridad. En ellas se objetiva que la presencia de eventos moleculares es un fenómeno dinámico, variando tras la progresión a cada tratamiento administrado.

- Las mutaciones evaluadas tras la progresión a cetuximab pueden detectarse mediante técnicas ultrasensibles en las muestras previas al tratamiento. Este dato sugiere que la resistencia al fármaco es secundaria a la presión biológica del tratamiento sobre el tumor, induciéndose una selección de las clonas más resistentes y, en parte, minoritarias.
- La determinación de mutaciones en sangre periférica podría ser una técnica alternativa a la realización de biopsias repetidas. Podría tener aplicabilidad en la monitorización de los pacientes y diagnosticar la resistencia al tratamiento antes de que su manifestación clínica o radiológica