

**Descripción y Validación Pre-Clínica de Marcadores
Moleculares Dinámicos de Sensibilidad a Inhibidores de la
Aromatasa en Cáncer de Mama.**

Resumen en lengua co-oficial UB del trabajo de tesis doctoral

*Description and Pre-clinical Validation of Dynamic Molecular Determinants of
Sensitivity to Aromatase Inhibitors in Breast Cancer.*

Ander Urruticoechea Ribate

Septiembre de 2007

INDICE

	Pag.
Introducción	3
Objetivos del primer trabajo de tesis	6
Primer trabajo de tesis	7
<i>Respuesta molecular a tratamiento con inhibidores de la aromatasa en cáncer primario de mama.</i>	
Objetivos del segundo trabajo de tesis	10
Segundo trabajo de tesis	11
<i>Validación pre-clínica de marcadores precoces de sensibilidad a inhibidores de la aromatasa en un modelo murino de cáncer de mama hormonosensible en la post-menopausia.</i>	
Discusión conjunta	14
Resumen y Conclusiones	15

INTRODUCCION

El cáncer primario de mama es un problema de salud de gran magnitud con una incidencia estimada de 1 de cada 10 mujeres. En los últimos años la incidencia y mortalidad relacionada con esta enfermedad ha disminuido en base a la eficacia de los programas de detección precoz por un lado y la eficacia de los tratamientos por otra.

De entre los tratamientos sistémicos, aquel con un papel más establecido como complementario a la cirugía y con un perfil de toxicidad/eficacia más favorable es el tratamiento hormonal. El mismo es también de gran utilidad en la situación incurable de metástasis.

El cáncer de mama, originado en un epitelio glandular con alta dependencia hormonal en general y de los estrógenos en particular muestra positividad para receptores estrogénicos en alrededor de un 60-70% de los casos. La unión de estradiol al receptor nuclear de estrógeno genera la activación del complejo y la unión del mismo a zonas específicas del DNA (elementos de respuesta a estrógenos). Este proceso resulta en la potenciación o inhibición de la transcripción de múltiples genes que dirigen la biología celular. Aunque el así descrito es el principal mecanismo de acción de los estrógenos, se han descubierto recientemente múltiples lugares de interacción entre el complejo estradiol-receptor de estrógeno y vías citoplasmáticas de transmisión de señal de crecimiento originadas en receptores de membrana celular. Precisamente esta interrelación entre la señal estrogénica y las otras vías de crecimiento se invoca como una de las principales causas del fenómeno de la resistencia a tratamientos hormonales en cáncer de mama.

Los tratamientos hormonales que actualmente son considerados como de primera línea pertenecen a dos grupos. Un primero grupo es el formado por los fármacos con selectividad por el receptor de estrógeno y con actividad moduladora sobre el mismo (SERMs) de los cuales el más utilizado es el tamoxifeno o con actividad “destructora” el mismo, fulvestrant. El otro gran grupo, con actividad exclusiva en la mujer postmenopáusica y en el que se centra la presente tesis es el de los inhibidores de la

aromatasa (letrozol, anastrozol o exemestano). Este último grupo, que ha sustituido recientemente al tamoxifeno en todos los ámbitos de tratamiento hormonal de la mujer postmenopáusica, basa su actividad en la privación de sustrato al receptor de estrógeno al impedir la producción de estradiol en los diversos tejidos.

Estos fármacos resultan en una mejoría de las tasas de curación cuando se aplican como tratamiento complementario tras tratamiento local del cáncer de mama localizado así como en una prolongación de la supervivencia y mejoría en la calidad de vida en las pacientes metastásicas. La resistencia a estos tratamientos es, sin embargo, un hecho frecuente. La misma se puede presentar como la reaparición de la enfermedad tras el tratamiento endocrino adyuvante o como la no respuesta o el recidivo de la enfermedad metastásica o no resecable durante la terapia con cualquiera de los fármacos citados, hecho este último virtualmente universal.

Académicamente la resistencia a tratamientos endocrinos en cáncer de mama se puede dividir como inicial o *de novo* y tardía o adquirida. La resistencia *de novo* es la norma en tumores que no expresan el receptor de estrógeno (RE), sin embargo, incluso en tumores RE+ puede presentarse hasta casi en la mitad de los casos.

La resistencia adquirida, es decir, la que aparece en tumores que inicialmente se reducen en tamaño con el tratamiento, no suele ir habitualmente acompañada de la negativización del RE y, entre los múltiples mecanismos responsables de la misma, parece que la activación de otras vías de crecimiento que, a su vez, son capaces de activar el RE independientemente del tratamiento, parecen unos de los más importantes.

Dado este escenario dos grandes áreas se abren para la investigación con los fármacos actuales (mención aparte de la búsqueda de nuevas terapias): la búsqueda de mejores valores predictivos que la simple positividad de RE y la descripción de nuevos indicadores de beneficio tras tratamiento hormonal más allá de la mera reducción tumoral. Este último aspecto va cobrando progresivamente más importancia en la medida en que se van conociendo más íntimamente los cambios en la biología

tumoral tras tratamientos endocrinos y se va generando la convicción de que ni la falta de reducción tumoral significa siempre resistencia ni la existencia de la misma es el parámetro que mejor permite distinguir a aquellas pacientes con menos posibilidades de generar resistencia ulteriormente.

Dentro de este ámbito de investigación los múltiples diversos marcadores individuales basales (al diagnóstico, previo al inicio del tratamiento) que han demostrado en uno o varios estudios tener valor predictivo, no han conseguido cambiar el estándar de basar la indicación del tratamiento en la mera positividad o negatividad del RE. Nuevos estudios con plataformas de alto rendimiento (microarrays de expresión, test de RT-PCR múltiples) parecen representar un potencial avance en este sentido y varios estudios retrospectivos avalan su valor. Es necesario, sin embargo, esperar a la validación prospectiva de estas costosas plataformas.

Una de las áreas de mayor interés en el ámbito de la predicción de respuesta al tratamiento es el estudio de los llamados biomarcadores dinámicos. Este apelativo hace referencia a que el valor predictivo no se basa en la determinación basal del estatus del marcador en cuestión sino en la observación del cambio biológico que este marcador experimenta de modo precoz tras iniciar el tratamiento. En este sentido el marcador más estudiado es Ki-67, una proteína nucleolar universalmente asociada a proliferación.

El decremento en la expresión de KI-67 medido con técnicas de inmunohistoquímica en dos biopsias consecutivas obtenidas respectivamente antes y 10-15 días después de iniciar un tratamiento hormonal con inhibidores de la aromatasa ha demostrado, si bien no estando significativamente relacionado con la reducción del volumen tumoral, tener un valor potencial de discriminar comparativamente a aquellos tratamientos que asocian mayor beneficio a largo plazo. Este valor, en los primeros estudios, parece superar el de la respuesta tumoral es sí.

El decremento de Ki-67 presenta, sin embargo, limitaciones tanto es su valor como en la técnica necesaria para su determinación.

El objetivo del presente trabajo de tesis doctoral es la descripción y validación preclínica de nuevos biomarcadores dinámicos que mejoren la utilidad de ki-67.

Objetivos del primer trabajo

1. Estudiar, mediante tecnología de alto rendimiento, la regulación en la expresión génica que producen dos semanas de tratamiento con un inhibidor de la aromatasa en el tejido tumoral de cáncer de mama RE positivo en la mujer postmenopáusica.
2. Describir los genes que sufren una regulación más significativa en este contexto.
3. Estudiar la relación de estos genes con evidencia previa generada *in vitro*.
4. Comparar la magnitud de los cambios en la regulación génica inducida por letrozol o anastrozol respectivamente.
5. Estudiar la correlación de los cambios génicos con el decremento en KI-67 determinado mediante inmunohistoquímica.
6. Integrar los cambios génicos en un índice global de dependencia estrogénica (GIDE).
7. Estudiar la correlación de GIDE con los cambios en KI-67 y con otros factores predictivos de valor ya conocido.

Primer trabajo

Respuesta molecular a tratamiento con inhibidores de la aromatasa en cáncer primario de mama.

A Mackay, A Urruticoechea, JM Dixon, T Dexter, K Fenwick, A Asworth, S Drury, A Larionov, O Young, S White, WR Millar, DB Evans y M Dowsett.

Breast Cancer Research 2007, **9**:R37 doi:10.1186/bcr1732.

Introducción

Los inhibidores de la aromatasa, anastrozol y letrozol entre ellos, son tratamientos de alta eficacia aboliendo el estradiol circulante en la mujer postmenopáusicas. En este contexto son considerados como el tratamiento hormonal más eficaz del cáncer de mama. Sin embargo, existe muy poca evidencia de los cambios en la regulación génica que estos fármacos producen en el tejido tumoral mamario. El objetivo de este trabajo es la generación de evidencia en este ámbito.

Material y métodos.

Pacientes postmenopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama localizado, con RE positivo, y subsidiarias de tratamiento quirúrgico de entrada fueron randomizadas, dentro de ensayo clínico controlado, a recibir anastrozol (1 mg/d v.o.) o letrozol (2.5 mg/d v.o.) durante 14 días previamente a su tratamiento quirúrgico. Al diagnóstico y en el momento de la cirugía se obtuvieron sendas biopsias con aguja gruesa. Además de los estudios con inmunohistoquímica publicados aparte sobre estas biopsias se practicó un estudio de la regulación génica. A tal efecto se extrajo RNA de las biopsias (previo estudio del contenido porcentual de células tumorales en las muestras) utilizando Trizol. Tras confirmar la integridad del RNA mediante Agilent 2100 BioAnalyser se procedió a la aplicación lineal (basada en residuos T7) del RNA. Tras la misma se hibridó el RNA resultante sobre la plataforma de microarray Breakthrough

17K. La lectura e interpretación de los resultados se optimizó de cara a eliminar sesgos y resultados sin significado biológico.

A modo de estudio de validación se estudio la correlación entre los hallazgos del estudio de microarrays y los resultados en la regulación de 5 genes estudiados por RT-PCR.

Resultados

Se obtuvo RNA de suficiente calidad en muestras pareadas de 34 pacientes. El estudio demostró un alto número de genes cuya regulación cambiaba de modo significativo tras 14 días de tratamiento con ambos inhibidores de la aromatasa. No se observaron diferencias entre ambos inhibidores en ninguno de los parámetros estudiados.

El estudio de agregación no supervisada demostró que la mitad de las muestras pareadas (pre- y post-tratamiento) se co-agregaban.

En un diagrama de agregación basado en los 2418 genes que más variaban entre las 68 muestras, los “clusters” (sub-grupos de agregación) de genes que agrupados entorno a genes de conocida significación biológica; ESR1, MKI67, ERBB2 y TFF1 mostraban una correlación en el sentido esperado. De esta modo el cluster de ESR1 mostraba una correlación negativa con el de ERBB2.

Se definió un índice de dependencia de estrógenos (GIDE) como el número de genes que eran regulados en una magnitud de dos (infra- o sobre-expresados) entre cada par de biopsias. GIDE se correlacionó positivamente con el cambio

Un análisis pareado SAM con un umbral de falso positivo de 1% identificó 1395 regulados al alza y 1264 genes regulados a la baja.

Se seleccionó un sub-grupo de 421 genes que distinguían de manera óptima las biopsias pre y post-tratamiento. El análisis de agregación generado en base a este set de genes mostró que 3 de las 4 muestras Her-2 positivas tenían perfiles pre-tratamiento que se agrupaban en el grupo de post-tratamiento. La cuarta, era la que

mayor expresión de RE mostraba de las 4. Siete de las 8 biopsias pre-tratamiento incorrectamente agrupadas según este método estaban entre las 10 biopsias con expresión menos marcada de ESR1 pre-tratamiento.

Discusión y conclusiones

Este trabajo describe de manera extensa y con gran relevancia biológica los cambios en la regulación genómica provocados por inhibidores de la aromatasa en el cáncer de mama hormonosensible.

A pesar de que los conocimientos respecto a los genes co-regulados con el RE son cada vez más extensos, la relevancia de estos genes al efecto de la determinación de la dependencia estrogénica de los tumores es aún un campo poco desarrollado. Un primer abordaje, aquí presentado, al desarrollo de nuevos marcadores predictivos es la integración de los cambios génicos en un índice como el GIDE. La correlación del mismo con los marcadores individuales con demostrado poder predictivo es muy alentadora.

La identificación sistemática de los genes que sufren regulación significativa tras un breve periodo de privación estrogénica abre la puerta a futuros trabajos de validación de algunos de estos genes como potenciales marcadores dinámicos del estatus de la vía de señalización estrogénica.

Alguno de los hallazgos más novedosos corresponden a los genes sobre-expresados tras la privación estrogénica. Este subgrupo de genes tiene un correlato con los hallazgos en líneas celulares mucho menor que los infra-expresados. En gran parte, estos genes tienen relación con la interacción con el estroma circundante. De este modo, los hallazgos descritos en un escenario clínico como el presente son, muy probablemente, de mayor relevancia biológica que los descritos sobre modelos pre-clínicos.

Objetivos del segundo trabajo

1. Probar la factibilidad de la obtención seriada de muestras mínimamente invasivas para estudios de expresión génica sobre un modelo animal de cáncer de mama hormonosensible.
2. Estudiar los cambios en la expresión sufridos por un número limitado de genes candidatos, seleccionado del primer trabajo, tras el inicio de tratamiento con letrozol en un modelo animal de cáncer de mama sensible a inhibidores de la aromatasa.
3. Comparar la regulación génica sufrida por estos genes candidatos entre sí y con Ki-67 para determinar cuáles de ellos son los mejores candidatos para su futuro desarrollo en ensayos en humanos.

Segundo trabajo

Validación preclínica de marcadores moleculares precoces de sensibilidad a inhibidores de la aromatasa en un modelo murino de cáncer de mama hormona-sensible.

Ander Urruticoechea, Helena Aguilar, Xavier Sole, Gabriel Capella, Lesley-Ann Martin, Mitch Dowsett & Josep Ramón Germà-Lluch.

Breast Cancer Research and Treatment. Aceptado el 26 de Junio de 2007.

DOI 10.1007/s10549-007-9676-7

Introducción

Basados en el trabajo previamente publicado hemos elegido 10 genes con una establecida regulación por la vía del RE. Estos genes muestran una profunda regulación precoz en su expresión tras el inicio de tratamiento con inhibidores de la aromatasa y son potenciales candidatos a ser usados por su valor informativo sobre el estado de activación de la vía dependiente del RE.

Animales y métodos

Se utilizaron para este estudio células de cáncer de mama MCF-7 con el gen de la aromatasa establemente transfectado. De este modo estas células dependen para su crecimiento de la actividad aromatasa que convierte androstenediona en estradiol. Así son un modelo celular apto para el estudio del efecto terapéutico de los inhibidores de la aromatasa. 10 millones de estas células fueron implantadas en 40 ratonas ovariectomizadas. El crecimiento tumoral se permitió bajo la administración de androstenediona mediante pellets subcutáneos de dispensación mantenida.

Tras permitir el crecimiento tumoral hasta un volumen medio de 0.5 cm³ se dividieron los animales en tres grupos terapéuticos: pellet + placebo via oral, pellet + letrozol 2mg/kg v.o. (dosis subóptima), pellet + letrozol 20 mg/kg v.o.(dosis óptima).

Mediante punción aspiración con aguja fina (PAAF) se obtuvieron muestras celulares del tumor al inicio de tratamiento (T_0) y una semana después (T_1). De estas muestras se extrajo RNA mediante Trizol y se procedió a la determinación de la expresión de los siguientes genes mediante técnica de RT-PCR: Ki-67, Ciclina D1, pS2, TFF3, PDZK1, UBE2C, STAC-2, TOP2A, MAN1A1, FAS y β Glucuronidasa como gen de referencia. Se calculó la expresión diferencial de estos genes en T_0 y T_1 y se estudiaron las diferencias estadísticas entre los grupos terapéuticos y los genes respecto a la magnitud de la regulación experimentada.

Resultados

Los grupos de animales resultaron homogéneos. Las curvas de crecimiento mostraron el efecto del tratamiento con letrozol con decremento tumoral en ambos grupos terapéuticos con letrozol. La calidad del RNA obtenido de las PAAFs fue alta.

Todos los genes mostraron una expresión diferencial entre T_0 y T_1 , sin embargo, solamente pS2, TFF3, STC2 y CCND1 mostraron significación estadística en el análisis global de Anova cuando se aplicó la corrección de Bonferroni al test. En el test de comparación entre grupos individuales, pS2 mostró la significación estadística de mayor magnitud.

Discusión

El tratamiento hormonal del cáncer de mama se enfrenta, en su desarrollo, a dos retos de gran importancia: el desarrollo de biomarcadores predictivos de su utilidad más allá de la positividad del RE y la monitorización de la actividad biológica de estos tratamientos más allá de la medición del volumen tumoral.

En nuestro trabajo hemos demostrado la factibilidad de la determinación seriada en muestras mínimamente invasivas (PAAFs) de la expresión de genes candidatos mediante RT-PCR.

Los cuatro genes que mostraron regulación génica estadísticamente significativo son buenos candidatos a su desarrollo clínico como biomarcadores predictivos y de activación de la vía estrogénica. Aunque la extrapolación de un modelo preclínico a humanos tiene serias limitaciones, las condiciones altamente restrictivas de los test estadísticos dejan poco margen a la no significación biológica de la regulación de estos genes.

De los demás genes estudiados, algunos no mostraron suficiente profundidad en su regulación para ser considerados significativamente regulados (ki-67 entre ellos). Es importante resaltar que los dos genes que habían mostrado sobre-expresión en el ensayo clínico que basa el presente experimento no mostraron la misma tendencia. Esto se explica muy posiblemente porque son genes cuya expresión acontece en mayor medida en células estromales, presentes en la biopsias clínicas pero no en las PAAFs del modelo murino.

La regulación de mayor magnitud experimentada por los cuatro genes de interés comparados con Ki-67 genera expectativas del posible mayor valor de estos respecto a este marcador clásico.

Discusión global

- Una de las principales fortalezas del trabajo de tesis aquí presentado es el proceso llevado para la descripción de los potenciales biomarcadores. El hecho de que la selección se origine en un proceso de screening en muestras clínicas tras el que se procede a una validación en un modelo preclínico otorga mayor robustez y significación biológica a los marcadores descritos.
- Las principales diferencias entre los dos escenarios experimentales:
 - El escenario en sí. Frente a pequeños tumores mamarios primarios con gran heterogeneidad celular potencial (primer trabajo), se sitúa el escenario del trabajo preclínico donde se ha utilizado un modelo celular proveniente de una línea de metástasis pleural que, sin duda, ha sufrido alteraciones de importancia biológica en su devenir como línea inmortalizada. Estas células crecen como esferoides homogéneos en el tejido subcutáneo murino. Esta diversidad de escenarios, si bien obliga a ser considerada a la hora de extrapolar resultados, implica una gran consistencia de los marcadores que son coherentes entre ambos.
 - El método de muestreo. Frente a biopsias que obtienen una variedad de tumor/estroma se utilizan en el segundo trabajo PAFs alta mente enriquecidas en células epiteliales solamente.
 - El método de estudio de la expresión génica: microarrays frente a RT-PCR. Esta última tecnología con reconocida mayor sensibilidad.
- Uno de los aspectos potencialmente más conflictivos de este proceso de validación de biomarcadores es la elección, necesariamente sesgada, de 10 marcadores en base a un proceso de screening de miles de ellos. La misma, que supone una posible exclusión de otros novedoso marcadores de alto interés biológicos, se ha basado en apriorismos sobre la conocida regulación estrogénica de los candidatos.
- Al respecto de los dos marcadores regulados al alza en el primer trabajo que no mostraron un paralelismo en el segundo estudio (FAS y MAN1A1), la explicación

de este fenómeno se encuentra, muy posiblemente en la expresión de estos genes, específicamente ligada a tejido estromal no representado en las muestras obtenidas por PAAF en el modelo murino.

- Ki-67 fue incluido como parámetro de referencia por su conocido valor en otros estudios.
- Potenciales utilidades de los marcadores propuestos:
 - Identificación de la resistencia primaria en base a su ausencia de regulación tras un breve curso terapéutico.
 - Monitorización del efecto de los inhibidores de la aromatasa en situación de enfermedad estable. Esto es de utilidad en enfermedad metastásica y en hormonoterapia primaria.
 - En la investigación de nuevos tratamientos asociados al tratamiento hormonal. Serían de utilidad para monitorizar el estatus de activación de la vía estrogénica y la aportación de las nuevas terapias a la superación de la resistencia a tratamientos hormonales.

Resumen y conclusiones

- El tratamiento con inhibidores de la aromatasa produce una profunda alteración de la regulación genómica en cáncer de mama hormonosensible. La tecnología de microarrays de expresión es apta para el estudio de la misma.
- Se presenta un perfil global de los cambios transcripcionales precoces inducidos por inhibidores de la aromatasa.
- La complejidad de los cambios inducidos en múltiples aspectos de la biología celular tumoral mamaria por este tratamiento excede la capacidad de los modelos de líneas celulares par su descripción global.
- Se presenta un nuevo índice de dependencia estrogénica (GIDE) cuyos resultados preliminares de correlación garantizan su estudio ulterior.

- Los genes pS2, TFF3, Ciclina D1 y Stanniocalcina 2 son regulados de manera profunda y precoz por el tratamiento con inhibidores de la aromatasa.
- Los 4 marcadores antedichos pueden ser determinados en su expresión, de manera seriada, en base a muestras obtenidas por punción aspiración con aguja fina.
- Los cambios observados en la regulación de estos 4 genes en el escenario clínico se reproducen en el modelo animal preclínico.
- Estos 4 genes son candidatos a su desarrollo y validación en estudios clínicos como marcadores de activación de la vía de señalización celular dependiente del receptor de estrógeno.