



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA

**ASOCIACIÓN ENTRE LA MUTACION DE PI3K Y
RESISTENCIA A TRASTUZUMAB EN PACIENTES CON
CANCER DE MAMA, LOCALMENTE AVANZADO
HER2 NEU POSITIVAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

SUBESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

DRA. ROSSIO DEL PILAR MEDINA BARRIONUEVO

DRA. CLAUDIA HAYDEE ARCE SALINAS

DIRECTOR DE TESIS

DR. FERNANDO ULISES LARA MEDINA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

A Dios por estar presente en cada momento de mi vida, a mis padres y hermanos por el apoyo incondicional , a mi esposo por ser el mejor amigo y compañero de la vida , a mi hija por ser la razón de mi existencia y a mis maestros por ser partícipes de este aprendizaje.

INDICE

| | Paginas |
|--|----------------|
| 1. Resumen | 4 |
| 2. Introducción | 4 |
| 3. Marco teórico | 5 |
| 4. Objetivo General y específicos | 11 |
| 5. Planteamiento del problema y justificación | 11 |
| 6. Hipótesis | 12 |
| 7. Diseño de estudio | 12 |
| 8. Tamaño de la muestra | 12 |
| 9. Análisis y métodos estadísticos | 12 |
| 10. Procedimiento | 13 |
| 11. Resultados | 14 |
| 12. Discusión | 15 |
| 13. Conclusiones | 17 |
| 14. Bibliografía | 18 |
| 15. Anexos | 21 |

RESUMEN DE INVESTIGACION:

TITULO:

ASOCIACIÓN ENTRE LA MUTACION DE PI3K Y RESISTENCIA A TRASTUZUMAB EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA, LOCALMENTE AVANZADO HER2 NEU POSITIVAS

En el cáncer de mama, la vía de la PI3K/Akt/mTOR modula las respuestas a señales transmitidas por la familia de receptores de estrógenos y del factor de crecimiento epidérmico humano y esta vía es importante en la sensibilidad clínica del cáncer de mama al tratamiento tanto endocrino como de inhibidores de HER-2 Neu (Trastuzumab).

De las todas las pacientes con cáncer de mama en quienes se demuestra la sobreexpresión de HER2 y son tratadas respectivamente con Trastuzumab, solo un tercio demuestran regresión del tumor con esta tratamiento. Se cree que las que no presentan adecuada respuesta tienen mutaciones en las diversas vías de señalización , una de ellas, la via de la PI3K/AKT/Mtor.

Las mutaciones del gen que codifica la subunidad catalítica de PI3K P110A (PI3K CA) se encuentran presentes en un 20-40%% de los cánceres de mama. La mayoría de estas mutaciones residen en dos puntos de acceso : en el exón 9 y 20, resultando en un aumento de la vía de señalización de PI3K, con la subsiguiente inhibición de los efectos de trastuzumab.

El presente trabajo midió las mutaciones de los exones 9 y 20 de la subunidad catalítica del PI3K en 36 pacientes con cáncer de mama Her 2 Neu positivas tratadas con trastuzumab y correlacionar las mutaciones presentes con los desenlaces de las pacientes.

En el presente estudio no se encontró ninguna mutación en las muestras de DNA examinados, es posible por diversos aspectos entre ellos: insuficiente muestra, errores en la extracción de DNA o en la lectura del PCR.

Se concluye que los resultados del presente estudio no correlacionan con los evidenciados en la literatura y que existen otras causas además responsables de la resistencia a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama Her 2 Neu positivas.

INTRODUCCION

En el cáncer de mama, la vía de la PI3K/Akt/mTOR modula las respuestas a señales transmitidas por la familia de receptores de estrógenos (RE) y del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) (receptor del factor de crecimiento epidérmico [EGFR], HER-2) y esta vía es importante en la sensibilidad clínica del cáncer de mama al tratamiento tanto endocrino como de inhibidores de HER-2 Neu (Trastuzumab) (1)

De las todas las pacientes con cáncer de mama en quienes se demuestra la sobreexpresión de HER2 y son tratadas respectivamente con Trastuzumab, solo un tercio demuestran regresión del tumor con esta tratamiento. Se cree que las que no presentan adecuada respuesta tienen mutaciones en las diversas vías de señalización , una de ellas, la via de la PI3K/AKT/Mtor.(2)

Las mutaciones del gen que codifica la subunidad catalítica de PI3K P110A (PI3K CA) se encuentran presentes en un 20-40%% de los cánceres de mama. (3) La mayoría de estas mutaciones residen en dos puntos de acceso : en el exón 9 y 20, resultando en un aumento de la vía de señalización de PI3K, con la subsiguiente inhibición de los efectos de trastuzumab. (4)

En vista de un amplio porcentaje de pacientes con posibles mutaciones de PI3K que condicionen pobre respuesta a trastuzumab y que no existen mayores estudios al respecto, existe la necesidad de identificar biomarcadores tempranos que puedan seleccionar pacientes respondedoras y no respondedoras a la terapia blanco .

MARCO TEÓRICO

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA EN MÉXICO

El cáncer de mama es hoy en día una de las principales causas de muerte y discapacidad entre las mujeres de países en vías de desarrollo. En México la tasa de mortalidad global por cáncer en mujeres es de 69.2 por 100 000 habitantes [1], de éstas muertes, el cáncer de mama es ahora la causa más importante, afecta a mujeres adultas de todas las edades y niveles de ingreso. Actualmente, es la segunda causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas de 30 a 54 años de edad [2].

Las tasas de mortalidad por cáncer de mama en México muestran un aumento notorio en las últimas cinco décadas. Entre 1955 y 1960, la tasa reportada era dos a cuatro muertes por 100 000 mujeres y en la década de los 90s, se elevó a 9 por 100 000. Esta cifra se ha mantenido a la actualidad [3].

En México, a igual que otros países en vías de desarrollo como Perú o Nigeria, el diagnóstico del cáncer de mama se realiza en etapas clínicas localmente avanzadas (IIB-IIIIC) [4-5]. Una de las razones de este retraso en el diagnóstico ocurre como consecuencia de dificultades para el acceso a la detección y tratamiento [6]. En el Instituto el 60% de todos los casos nuevos, están diagnosticados en etapas IIB-IIIIC [7]. Estos

casos son candidatos a tratamiento neoadyuvante

QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN CÁNCER DE MAMA

Tratamiento neoadyuvante

La quimioterapia sistémica primaria o neoadyuvante ha demostrado ser igual de efectiva que la quimioterapia adyuvante en términos de supervivencia; es el tratamiento estándar para el cáncer de mama localmente avanzado (CMLA) y para los tumores operables. En el primer grupo de pacientes, el principal objetivo de la quimioterapia neoadyuvante es el de mejorar las opciones quirúrgicas. Para los tumores operables, se utiliza para evaluar la quimiosensibilidad y con ello mejoría en la supervivencia [8].

Esta modalidad terapéutica se ha utilizado desde hace muchos años, Bonadonna [9] fue el primer autor en demostrar que el uso de quimioterapia preoperatoria disminuía el tamaño del tumor, lo que facilitaba la realización de una cirugía conservadora. La eficacia y seguridad de esta modalidad, fue confirmada con el estudio NSABPB-18 [10], en el que se aleatorizaron 1523 mujeres con tumores T1-T3, N0-N1 a recibir 4 ciclos de AC (Adriamicina/Ciclofosfamida) de forma preoperatoria vs postoperatoria, el estudio demostró que se incrementaban los procedimientos conservadores a 67%, con respuesta global (RG) 80% y respuesta clínica completa (RCC) 36% posteriormente el estudio NSABP B-27 [11] demostró RG de 85% con la combinación de AC preoperatorio y un incremento a 91% cuando la combinación era seguida de docetaxel, lo que aumentó el porcentaje de cirugías conservadoras.

Otra ventaja de la quimioterapia de inducción es identificar a las pacientes no respondedoras, en quienes se deben buscar diferentes opciones terapéuticas.

El pronóstico de la quimioterapia esta basado en los hallazgos de la cirugía, la respuesta patológica completa confiere grandes beneficios, en términos de supervivencia [12], con un incremento en la supervivencia a 5 y 9 años de seguimiento 85% y 75% respectivamente.

Cáncer de mama HER2

Aproximadamente 15-25% de los cánceres de mama tendrán amplificación del gen HER2/neu (ErbB2). El gen codifica a un receptor de membrana, que es un miembro de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico con actividad de tirocina cinasa que se encuentra normalmente involucrado en la regulación de la proliferación celular. La amplificación del gen o sobre-expresión de la proteína, le confiere a las células un comportamiento clínico agresivo, influye en el crecimiento y proliferación celular, incremento en la capacidad de invasión y metástasis, así como la estimulación de la angiogénesis. Clínicamente, aquellas pacientes con amplificación o sobre-expresión del HER2 tienen tumores poco diferenciados con una tasa de proliferación elevada,

adenopatías axilares positivas y una disminución en la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona. Estas características se asocian con un incremento en el riesgo de recurrencia y muerte [13,14]

HER2

La familia HER, también llamada ErbB, incluye 4 diferentes tipos de receptores con capacidad oncogénica. HER2, también llamado ErbB2 o c-erb B2 o HER2/neu, es el segundo miembro de esta familia. Es una proteína transmembrana que tiene un dominio extracelular de unión, una porción transmembrana lipofílica y un dominio tirosin-cinasa intracelular. Todas las proteínas son activadas por un ligando que se une al receptor, excepto HER2, para el cual, no hay un ligando identificado. La unión del ligando con el receptor desencadena un cambio conformacional que lleva a la formación de un dímero, esta dimerización activa el dominio tirosin-cinasa intracelular y activa la traducción de señales relacionadas con el crecimiento y la supervivencia de la célula. Las proteínas HER, puede combinarse con el mismo tipo de receptor (homodímero) o con otros miembros de la familia HER (heterodimerización). Los heterodímeros de HER2 son más estables y generan una señal intracelular más fuerte en comparación con los homodímeros.

HER2 puede ser inhibido de varias maneras. La forma más conocida está mediada por un anticuerpo monoclonal (trastuzumab), que se une al dominio extracelular del receptor.

Otros fármacos que inhiben HER2 son: pertuzumab, otro anticuerpo monoclonal, lapatinib una molécula pequeña que inhibe la porción tirosin-cinasa del receptor.

Trastuzumab

Trastuzumab, es un anticuerpo monoclonal, humanizado que reduce el crecimiento celular *in vitro* e *in vivo*. El mecanismo de acción aun no ha sido clarificado, sin embargo se ha demostrado que induce degradación del receptor, inhibición de la dimerización y activación del sistema inmune.

Trastuzumab también tiene efecto sinérgico con medicamentos citotóxicos como cisplatino y docetaxel y efecto aditivo con doxorubicina y paclitaxel

Estudios fase II con trastuzumab como monoterapia demostraron respuestas globales del 25%. En combinación con agentes citotóxicos como vinorelbine han demostrado respuestas globales de 84% en primera línea y 75% en segunda línea, también se ha demostrado un mayor porcentaje de respuesta aun en pacientes que hayan recibido antraciclenos (respuesta global 88%) y taxanos (respuesta global 50%) o ambas con respuesta global 73% [78].

En el terreno neoadyuvante, trastuzumab ha sido combinado con diversos esquemas de quimioterapia, los principales estudios se resumen en la tabla 2. En términos generales se demuestra que la combinación es segura y efectiva por lo que actualmente se considera un tratamiento estándar para los tumores operables y localmente avanzados

Tabla 2: Trastuzumab neoadyuvante

| Autor | N | Tratamiento | Etapas clínicas | Respuesta Patológica / Clínica |
|--------------|----------|---------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Val Pelt | 22 | Doc + T x 4 | Inflamatorio y IV | 77% / NR |
| Wenzel | 14 | Epi + Doc qw + T x 30 | NR | 86% / NR |
| Hurley | 48 | Doc + CDDP + T x 3 | CMLA | NR / 17% |
| Buzdar | 42 | Pac x 4 FAC x 4 ±T x 24 w | II-III | NR / 25% NR / 66% |
| Arce | 86 | FACx4 Pacqw + T x 12 | IIB-IIIC | 78 / 48% |

VIA DE SEÑALIZACION PI3K

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) es crucial en numerosos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular. Esta vía es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina quinasa, por factores de crecimiento y factores reguladores. Varias alteraciones genéticas como amplificación, mutación y re-arreglos cromosómicos, pueden comprometer la vía PI3K, generando su activación permanente. (5)

En diferentes tipos de cáncer se ha encontrado evidencias de estas modificaciones genéticas deletéreas. La activación anormal de la vía PI3K resulta en alteración de los mecanismos de control de crecimiento y la supervivencia celular, lo que favorece el crecimiento competitivo, la capacidad metastásica y frecuentemente, una mayor resistencia a los tratamientos. (5)

Los estudios efectuados en líneas celulares humanas y xenoinjertos han demostrado que las vías de señalización de receptores de factores de crecimiento, sobre todo las que convergen en la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK/ERK), pueden participar en diversas resistencias, tanto a tratamiento con Trastuzumab como a tratamiento hormonal.

En el cáncer de mama, la PI3K es la vía alterada con más frecuencia, ya sea con mutaciones o amplificaciones de los genes, así por ejemplo, existen mutaciones o amplificaciones de los genes que codifican las subunidades catalíticas p110 α (PIK3CA) y p110 β (PIK3CB) de PI3K, la subunidad reguladora p85 α de PI3K (PIK3R1), tirosina kinasas con actividad receptora (TKR) como HER2 (ERBB2) y el receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos-1 (FGFR1), K-Ras, los efectores AKT1, AKT2 y PDK1 de PI3K, así como pérdida de las fosfatasa de lípidos PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina) e INPP4B.

La PI3K es activada por TKR(tirosina kinasas con actividad receptora) de factores de crecimiento y receptores acoplados a proteína G (GPCR). La PI3K fosforila el 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP2) para producir 3,4,5-trisfosfato de fosfatidilinositol (PIP3). A su vez, el PIP3 recluta diversas proteínas con dominios de homología con pleckstrina (PH) hacia la membrana plasmática, como PDK1, serina/treonina proteína kinasa y AKT, las cuales, al activarse, favorecen la progresión del ciclo celular y la supervivencia. La regulación negativa de esta vía corre a cargo de PTEN e INPP4B, que desfosforilan PIP3 y PIP2, respectivamente. AKT produce la activación de TORC1 (complejo 1 que contiene mTOR), que regula la síntesis de proteínas. (6)

Además de sus funciones pro-supervivencia y estimuladora del crecimiento, la vía de PI3K interacciona directa e indirectamente con el RE. (6)

Experimentalmente, la activación de la vía de PI3K se ha asociado causalmente a resistencia de novo y adquirida al tratamiento endocrino. La disminución mediada por ARN de PTEN y la sobreexpresión de oncogenes que activan la señalización de PI3K/AKT (por ejemplo, HER2, receptor del factor de crecimiento insulinoide de tipo 1 (IGF1R) y AKT1 mutado activado) confieren resistencia a tamoxifeno, fulvestrant y privación estrogénica en células de cáncer de mama con RE positivos.(3)

En la mayoría de estos modelos, la inhibición de PI3K ha corregido la resistencia a antiestrógenos y a los anticuerpos monoclonales. La activación de la vía de PI3K resulta necesaria para el crecimiento de las células de cáncer de mama resistentes al tratamiento endocrino. El crecimiento de cuatro líneas celulares con PELP en ausencia de estrógenos se ve inhibido por el tratamiento con el inhibidor de PI3K/mTOR BEZ235 o el inhibidor de TORC1 everolimus. Se ha demostrado que el tratamiento de ratones portadores de xenoinjertos MCF-7 independientes de estrógenos con el inhibidor pan-PI3K BKM120 o de xenoinjertos MCF-7/aromatasa resistentes a letrozol ralentiza el crecimiento tumoral (3)

Las mutaciones puntuales en PIK3CA, el gen que codifica la subunidad catalítica p110 α de PI3K, son las alteraciones genéticas más habituales de esta vía en el cáncer de mama.

Hasta el 80% de las mutaciones en PIK3CA se producen en “puntos calientes” de los dominios helicoidal (E542K y E545K) y kinasa (H1047R) de p110 α . Dichas mutaciones incrementan la actividad PI3K, estimulan la transformación celular in vitro y el poder cancerígeno in vivo cuando se sobreexpresan en células epiteliales mamarias humanas e inducen la formación de tumores de mama en ratones transgénicos(3)

El conocimiento de la relación entre mutaciones en PIK3CA y resistencia endocrina y a terapia blanco puede verse dificultado por evidencias que sugieren que estas alteraciones genéticas podrían surgir en una fase más avanzada del desarrollo tumoral.

Por ejemplo, el estado de mutación en PIK3CA es discordante entre carcinoma invasivo y carcinoma canalicular in situ en el 33% de los casos, entre tumores de mama primarios y metástasis ganglionares sincrónicas en el 13% de los casos, entre tumores primarios y metástasis asincrónicas en el 18% al 33% de los casos e incluso dentro de regiones microdisecadas del mismo tumor .(3)

Además de los análisis de mutaciones, la determinación de perfiles de expresión génica y proteínas tumorales de la activación de la vía de PI3K podría proporcionar un marcador biológico para identificar pacientes con tumores resistentes a antiestrógenos y a terapia blanco.(3)

Por ejemplo, un distintivo de expresión génica de pérdida de PTEN, derivado de una comparación de tumores con PTEN positivo y negativo mediante IHQ, fue predictivo de una baja SLR después del tratamiento con tamoxifeno, lo que no sucedió con el estado IHQ de PTEN aislado. Un distintivo de expresión génica de activación de PI3K, basado en las concentraciones de marcadores fosfoproteínicos (por ejemplo, P-AKT o P-p70S6K) en tumores con RE positivos, apareció enriquecido en cánceres de mama B luminales.(3)

Esto sugiere que los tumores B luminales tienen una mayor actividad de PI3K, lo que podría contribuir a su inferior respuesta a los antiestrógenos comparados con los tumores A luminales. De manera parecida, identificamos un distintivo de proteínas tumorales de activación de la vía de PI3K que predice un pronóstico desfavorable después del tratamiento endocrino adyuvante. Por consiguiente, los distintivos de activación de PI3K podrían complementar los análisis de mutaciones para identificar tumores estimulados por PI3K.(3)

Las mutaciones del gen que codifica la subunidad catalítica de PI3K P110A (PI3K CA) se encuentran presentes en un 20-40% % de los cánceres de mama. (7) La mayoría de estas mutaciones residen en dos puntos de acceso : en el exón 9 y 20, resultando en un aumento de la vía de señalización de PI3K, con la subsiguiente inhibición de los efectos de trastuzumab. (4)

Recientes estudios sugieren que la activación de la vía PI3K podría influir negativamente en la respuesta a la terapia con Trastuzumab. Esta observación fue descrita tanto en estudios retrospectivos como en series prospectivas. Así Jensen y cols. (2012) describió una supervivencia pobre estadísticamente significativa en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo con mutaciones de PI3K tratados con trastuzumab y quimioterapia en el campo adyuvante.(7)

Estos datos sugieren que solo las pacientes con PI3K wild-type serán claramente beneficiadas de la terapia con trastuzumab . (7)

En otras series de reportes se evidencia además que las mutaciones de las isoformas p110alfa del PI3K confieren cierta resistencia no solo a terapia blanco sino también a paclitaxel .(8)

De ahí la importancia de conocer el estado de mutación del PI3K antes del inicio del manejo con terapia blanco.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS.-

a. General: Determinar presencia de mutación de los **EXONES 9 (E545K, E542K) y 20 (H1047R) de la subunidad catalítica** de PI3K en pacientes con cáncer de mama HER-2 positivas tratadas con Trastuzumab y verificar si ésta es capaz de predecir la resistencia al Trastuzumab en la clínica; la resistencia será definida como la ausencia de respuesta patológica completa y/o recurrencia o progresión durante el tratamiento o dentro de los 6 meses al término de la misma.

b. Específicos:

- Determinar la SLP de las pacientes con CA de mama Her2 Neu positivas tratadas con Trastuzumab con mutación de PI3K.
- Determinar la SLE de las pacientes con CA de mama, Her 2 Neu positivas que recibieron tratamiento con Trastuzumab con mutación de PI3K
- Describir los lugares de metástasis más frecuentemente presentadas en las pacientes que tuvieron progresión o recurrencia de la enfermedad, que presentaron mutaciones de PI3K.
- Establecer el grupo etario y las características clínicas de pacientes con mutaciones PI3K.
- Correlacionar el estado de receptores hormonales y mutaciones de PI3K
- Describir la relación entre mutaciones PI3K y respuesta a terapia hormonal
- Describir la relación entre mutaciones PI3K y respuesta a QT con paclitaxel

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.-

De las todas las pacientes con cáncer de mama en quienes se demuestra la sobreexpresión de HER2 y son tratadas respectivamente con Trastuzumab, solo un tercio demuestran regresión del tumor con esta tratamiento. Se cree que las que no presentan adecuada respuesta tienen mutaciones en las diversas vías de señalización, una de ellas, la via de la PI3K.

En vista de un amplio porcentaje de pacientes con posibles mutaciones de PI3K que condicionen pobre respuesta a trastuzumab y que no existen mayores estudios al respecto, existe la necesidad de identificar biomarcadores tempranos que puedan seleccionar pacientes respondedoras y no respondedoras a la terapia blanco y de esta manera poder evitar costos elevados innecesarios de la terapia blanco, conociendo la población que realmente se beneficiará del tratamiento.

Determinar la existencia de mutaciones de la via PI3K en pacientes con sobreexpresión de Her 2, será una estrategia farmacológica racional para elegir los pacientes que realmente se beneficiarán de terapia blanco.

HIPÓTESIS.-

Todas las pacientes con mutaciones de PI3K, presentarán resistencia al tratamiento con terapia blanco (Trastuzumab), por ende ausencia de respuesta patológica, progresión y/o recurrencia.

DISEÑO DE ESTUDIO.-

Estudio descriptivo, observacional, ambielectivo que analiza la asociación entre estado de mutaciones de PI3K y las características biológicas en cuanto al comportamiento tumoral frente al tratamiento con Trastuzumab en pacientes con cáncer de mama con amplificación del Her 2, seguidas por consulta externa desde enero 2005 a diciembre 2013 .

TAMAÑO MUESTRAL.-

Se analizaron DNA de muestras de tumor congelado ya sea del tumor primario de mama o de las metástasis presentadas de 36 pacientes con diagnóstico de CA de Mama con amplificación del Her 2, tratadas con Trastuzumab.

ANÁLISIS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS.-

Se analizaron el DNA de muestras de tumor congelado ya sea del tumor primario de mama o de las metástasis presentadas, mediante Kit Gene TM DNA, para determinar el estado de mutaciones de PI3K.

Los datos esperados se planeaban ser analizados mediante test de K2 para análisis de datos categóricos y test de T Student para valores medios de comparación.

Para el análisis estadístico se empleó SAS software, versión 9.1.

POBLACIÓN DEL ESTUDIO.-

Criterios de inclusión:

- Mujeres mayores de 18 años con Dx de CA de Mama localmente avanzado con amplificación del Her 2 demostrada ya sea por inmunohistoquímica (score 3+) o FISH.
- Mujeres que recibieron tratamiento anti Her con Trastuzumab .
- Mujeres que fueron tratadas con Terapia blanco y que presentaron cualquier recurrencia de la enfermedad documentada por estudio de imagen y biopsia.

Criterios de exclusión:

- Pacientes menores de 18 años
- Pacientes con inmunohistoquímica de Her 2 neu 2+, sin confirmación de FISH

- Pacientes con tratamiento previo de otra terapia blanco.
- Pacientes con otro tipo de mutaciones documentadas
- Pacientes que recibieron Trastuzumab de manera inadecuada

PROCEDIMIENTO.-

1. Primero se obtuvieron las muestras de parafina del departamento de patología del INCAN , en total 4 cortes de 10 um por cada paciente.
2. Posteriormente se eliminó el exceso de parafina con un escalpelo.
3. Se colocaron las secciones en micro tubos de 1.5 ml y se añadió xileno, posteriormente se agito por el lapso de 10 segundos
4. Se centrifugo a velocidad máxima por 2 minutos a temperatura ambiente
5. Se removió el sobrenadante sin tocar el pellet
6. Añadimos 1 ml de etanol (96 a 100%) al pellet, se agito y se elimino del xileno, se centrifugo dos minutos mas a toda velocidad
7. Se remueve el sobrenadante sin tocar el pellet
8. Se mantuvo a temperatura ambiente con el tubo abierto hasta que el etanol se evaporo (10 minutos)
9. Se re suspendió el pellet en 180 ul de buffer ATL. Y se añadió 20 ul de proteinasa K y se mezcló en el vortex
10. Posteriormente después de un periodo de incubación de 1 hora a 56°C (para el lisado del tejido), se incubo nuevamente a 90°C por 1 hora (para revertir las modificaciones del formaldehido en los ácidos nucleicos)
11. Añadimos 200 ul de buffer AL y se mezcló en vortex. Posteriormente se añade 200 ul de etanol al 96 o 100% y se mezcla hasta obtener un precipitado blanco.
12. Se centrifuga rápidamente para eliminar las gotas de etanol dentro de la tapa del tubo.
13. Se coloca el homogenado a la columna, se cierra el tubo y centrifuga a 8000 rpm por 1 minuto. Posteriormente se elimina la elución y coloca en otro tubo 1.5 nuevo.
14. Añadimos 500 ul de buffer AW1 y se centrifuga a 8000 rpm
15. Colocamos 500 ul de buffer AW2 y centrifugamos a 8000 rpm y se coloca en un nuevo tubo
16. Se centrifuga a toda velocidad (14000 rpm) por 3 minutos para secar las membranas completamente y así evitar e etanol. Se retira del tubo y se coloca en un nuevo tubo.
17. Se coloca 50ul de buffer ATE (a temperatura ambiente)
18. Se cierra la tapa y mantiene a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifuga a toda velocidad a 14000 rpm. Se mantiene el DNA en buffer ATE or 5 minutos antes de centrifugar (incrementa la calidad del DNA)

Después de la extracción y purificación del DNA se procedió a amplificar en DNA para identificar las mutaciones somáticas de los **EXONES 9 (E545K, E542K) y 20 (H1047R) y analizar** su frecuencia en las muestras obtenidas.

El fundamento básico de la técnica fue la combinación de procesos que incluyen una amplificación de alelos y una sonda de detección por hidrolisis que emplea la tecnología ARMS (amplification refractory mutation system). La hibridación se lleva a cabo con una sonda complementaria a una región interna de la secuencia blanco, previo a la amplificación. La temperatura media de la sonda debe ser de $>10^{\circ}\text{C}$ que el de los cebadores, lo que permite su hibridación primaria.

Los pasos siguientes para el PCR a tiempo real utilizando el QBiomarker Somatic Mutation PCR Array son:

1. Se preparó la mezcla para PCR a partir del DNA no amplificado: 500 ng a 3 hg del DNA en 96 multipozos
2. Se removió el qBiomarker PCR array de la bolsa sellada
3. Se colocó la muestra PCR array en cada pozo
4. Se colocó el adhesivo óptico en el qBiomarker somatic array
5. Se coloca la placa de 96 en el termociclador del PCR en tiempo real
6. Se inició la corrida
7. Se exporto los valores del umbral del termociclador para todos los pozos a una hoja de excell para posterior análisis de datos.
8. Los cálculos de más mutaciones se realizan con la ayuda de portal Web (RT2 Profiler PCR array Web portal) del custom array mutation kit empleado.

RESULTADOS .-

Fueron analizadas solo 36 pacientes de las 60 planeadas, debido a escaso material de la pieza patológica para extracción del DNA.

NO se encontró ninguna mutación del exón 9 y 20 de la subunidad catalítica de PI3K en las muestras de DNA de las 36 pacientes estudiadas.

De las 36 pacientes analizadas, la mediana de edad fue de 53 años.

En cuanto al tipo histológico, el 89% es Ductal infiltrante mientras que un 8% es de tipo lobulillar infiltrante. Un 3% corresponde a otro tipo histológico.

Todas fueron etapas localmente avanzadas, el estadio clínico predominante fue EC IIIA.

El nivel de CA15.3 al inicio estaba normal en el 79% de las pacientes, un 18% se encontraba dentro de valores superiores a lo normal y en un 4% no se realizó la determinación de la misma.

En cuanto a las características patológicas: un 83% tenía SBR de 7 a 9, seguido de 11% de SBR de 4 a 6.

Un 69% no presenta receptores hormonales a diferencia de 31% con positividad para los receptores hormonales.

En cuanto al KI67%, el 29% tenía KI67 mayor a 14 , mientras que el 71% con KI67 menor a 14%.

El 100% de las pacientes fueron sometidas a cirugía, de ellas un 82% a Mastectomía Radical modificada, seguido de un 6% de Mastectomía simple y 6% de cirugía conservadora.

El 66% de las pacientes recibieron RT adyuvante, mientras que un 34% no.

Todas las pacientes recibieron Trastuzumab en la neoadyuvancia.

En cuanto al reporte histopatológico posterior al tratamiento sistémico, un 50% tuvo respuesta patológica completa, 25% con residual microscópico, 22% con residual macroscópico.

Se reportaron 66% de los casos con ganglios negativos posterior al tratamiento, 14% con menos de 4 ganglios positivos, 8% con más de 10 ganglios positivos y 4% de 4 a 9 ganglios positivos.

Un 83% de los casos no presentó PLV en la pieza patológica, mientras que solo un 17% si presentaba PLV .

La recurrencia se presentó en 10 pacientes , siendo el tiempo a la recurrencia menor a 6 meses en el 40% de las mismas; en un 30% de ellas, la recurrencia se presentó entre los 6 a 12 meses ; un 20% con recurrencia después de 4 años y 10% con recurrencia a los 25 a 36 meses.

La mayor recurrencia fue sistémica en un 22% de los casos, seguido de locoregional en un 6%.

En cuanto a la recurrencia sistémica, se reportaron 40% con recurrencias al pulmón, 30% con recurrencia hepática, 20% recurrencia ósea y 10% recurrencia al SNC.

Cuando se realizó la correlación entre RPC y recurrencia, tanto las que tenían residual microscópico y macroscópico tenían mayor recurrencia, aunque se describe también un caso de recurrencia en una paciente con RPC posterior al tratamiento sistémico.

En las pacientes con ganglios patológicos positivos, también hubo mayores recurrencias que aquellas sin ganglios positivos, hubo una recurrencia en una paciente sin ganglios positivos.

Del total de las pacientes con CA 15.3 elevado, todas ellas presentaron recurrencia posterior.

Del hubo un total de 3 fallecimientos, correspondiente al 11%, la mayoría sigue en vigilancia (66%), un 17% se encuentra en actual tratamiento sistémico para la recurrencia y un 5% perdió seguimiento, desconocemos la causa.

De las 3 pacientes fallecieron debido a la enfermedad, una con insuficiencia hepática, otra con crisis convulsiva no controlada por progresión a SNC y otra por insuficiencia respiratoria y falla multiorgánica.

DISCUSION.-

En la literatura se menciona que las mutaciones de la subunidad catalítica del PI3K se presentan en un 20 a 40% en cáncer de mama y que de estas mutaciones, el 80% se producen en puntos catalíticos de dominio E542K , E545K y H1047R. Si bien en nuestro estudio se buscó las mutaciones de los EXONES 9 (E545K, E542K) y 20 (H1044R) de la subunidad catalítica de PI3K ,que corresponden a las principales mutaciones de PI3K, en nuestro estudio NO encontramos ninguna mutación en las muestras de DNA de los pacientes examinados, lo que no correlaciona con lo descrito en la literatura.

Sin embargo esto se puede deber a varias razones:

- Insuficiente muestra. El análisis fue planeado para un total de 60 pacientes , sin embargo debido al escaso material de la pieza patológica para la extracción de DNA, tuvieron que ser descartadas del estudio.
- Es posible que hubiera errores en algunos de los pasos mencionados para la extracción de DNA y posterior análisis
- Error en la lectura del DNA por PCR a tiempo real utilizando el qBiomarker Somatic Mutation PCR Array.

En la literatura también se menciona que la via de PI3K puede estar alterada no solamente por mutaciones del PI3K sino por amplificaciones de la subunidad catalítica p110 alfa y p110 beta y de la subunidad reguladora p85 alfa. Y aunque estas mutaciones son las menos frecuentes, no se midieron en las muestras de las pacientes del estudio.

Por otro lado la literatura también menciona que las mutaciones genéticas podrían surgir en una fase más avanzada del desarrollo tumoral incluso entre regiones diferentes del mismo tumor. Por ello suponemos también que esta premisa pudo haber influido en nuestros resultados, ya que las mutaciones se realizaron en el tejido patológico de la biopsia inicial de las pacientes con cáncer de mama en su totalidad con enfermedad localmente avanzadas.

Existen también mutaciones discordantes de PI3K entre el tumor primario y la metástasis en el 18 a 33% de los casos, siendo que finalmente quien dicta la clínica y el pronóstico es la presencia de estas mutaciones en la metástasis o enfermedad recurrente. Por lo que en nuestro trabajo se valoró las mutaciones SOLO en la pieza patológica de la biopsia inicial y no así de la metástasis o sitio de recurrencia; hecho que pudo haber influido en los resultados encontrados.

Se ha descrito en la literatura que la presencia de mutaciones varía de acuerdo al genotipo del cáncer de mama, siendo los luminales B los que más frecuentemente presentan mutaciones de PI3K y por ende resistencia al tratamiento hormonal. En nuestro estudio, mas del 70% de las pacientes tuvieron receptores hormonales negativos , siendo el genotipo mas frecuente el Her 2 sobreexpresado, por lo que nos suponemos que nuestros resultados encontrados puedan también estar influenciados por este aspecto.

Por todo esto se concluye que nuestro estudio no cumplió con el objetivo de demostrar la asociación entre mutaciones de PI3K y resistencia a Trastuzumab.

CONCLUSION.-

Se concluye que los resultados del presente estudio no correlacionan con los evidenciados en la literatura y que existen otras causas además responsables de la resistencia a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama Her 2 Neu positivas y que deben ser analizados.

BIBLIOGRAFIA

1. Bosetti C, Rodriguez T, Chatenoud L, et al. Trends in cancer mortality in Mexico, 1981-2007. *Eur J Cancer Prev* 2011
2. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, et al. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Publica Mex* 2009;51 suppl 2:S335-S344.
3. Lozano R, Knaul FM, Gómez-Dantés H, et al. Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006. Observatorio de la Salud. Documento de trabajo. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud, 2008.
4. Adebamowo CA, Adekunle OO. Case controlled study of the epidemiological risk factor for breast cancer in Nigeria. *Br. J Surg* 1999;86:665-8
5. Lozano-Ascencio R, Gómez-Dantés H, Lewis S, et al. Tendencias del cáncer de mama en América Latina y El Caribe. *Salud Publica Mex* 2009;51(supl 2): S147-56
6. Schwartzmann G: Breast cancer in South America: challenges to improve early detection and medical management of a public health problem. *J Clin Oncol* 2001;(suppl18):118-124S
7. Arce C, Lara-Medina FU, Alvarado A, et al. Evaluación del tratamiento del cáncer de mama en una Institución del tercer nivel con el seguro popular. México. *Revista de Investigación Clínica* 2013;
8. Kinoshita T. Preoperative therapy: recent findings. *Breast Cancer* 2011;18:80-4
9. Gianni L, Valagussa P, Zambetti M, et al. Adjuvant and neoadjuvant treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 2001;28:13
10. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, et al. Effect of preoperative chemotherapy on outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:2672.
11. Bear HD, Anderson S, Brown A, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: Preliminary results from National Surgical Adjuvant and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2003;21:4165-74
12. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999;17:460-9
13. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human Breast Cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82
14. Menard S, Balsari A, Casalini P, et al. HER-2 positive breast carcinomas as a particular subset with clinical behavior. *Clin Cancer Res* 2003;8:520-25

15. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER 2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92.
16. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in Her-2 positive breast cancer. *N Eng J Med* 2005;353:1659-72
17. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2- positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-84
18. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen P, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354:809-20
19. Slamon DJ, Leyland Jones B, Shak S, et al Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against Her2 for metastatic breast cancer that overexpress Her2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92
20. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncology* 2007;18:977-84
21. Moy B, Goss PE, Lapatinib: Current Status and Future Directions in Breast Cancer. *The Oncologist* 2006;11:1047-57
22. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus Capecitabine for HER.-2 positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2733
23. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2001;14:672–6.
24. O'Brien NA, Browne BC, Chow L, et al. Activated Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Signaling Confers Resistance to Trastuzumab but not Lapatinib. *Mol Cancer Ther* 2011; 9(6): 1489–502
25. Sarat Chandarlapaty y cols; Frequent mutational activation of the PI3K-AKT Pathway in Trastuzumab- Resistant breast cancer; *Clin Cancer Res* 2012: 18,págs. 6784-6791
26. Jose Baselgha y cols; Estudio aleatorizado en fase II de everolimus neoadyuvante más letrozol en comparación con placebo más letrozol en pacientes con cáncer de mama con receptores de estrógenos positivos; *JCO* ; Vol.11, N°4;Octubre 2009, págs.176-184
27. Todd W Miller; Fosfatidilinositol 3-kinasa y resistencia a antiestrógenos en el cáncer de mama; *JCO* ; Vol.14, N°1, enero 2012 , págs.26-37
28. Berns y cols; A functional Genetic Approach Identifies the PI3K Pathway as a major determinant of Trastuzumab resistance in breast cancer; *Cancer cell* 12 ; october 2007 ; págs. 395-402

29. Carlos Pinzon y cols; Papel de la via fosfatidil inositol 3 kinasa en humanos; Rev. Ciencias .Salud. Bogotá(Colombia) 7(2); agosto 2009; págs.. 47-66
30. Gisela Ceballos Calcina; Moduladores de progresión en cáncer de mama;Cancerología 3 (2008); pags. 41-49
31. M. Cizkova y cols; Outcome impact of PIK3CA mutations in HER2-positive breast cancer patients treated qith trastuzumab; BJC(2013)108; págs.1807- 1809
32. Steven y cols; Breast cancer-associated PI3K mutations are oncogenic in mammary epithelial cells; Cáncer res ; 65 (23); December 1,2005; págs.10992-11000

ANEXOS

TABLAS

TABLA 1: TIPO HISTOLOGICO DE CANCER DE MAMA

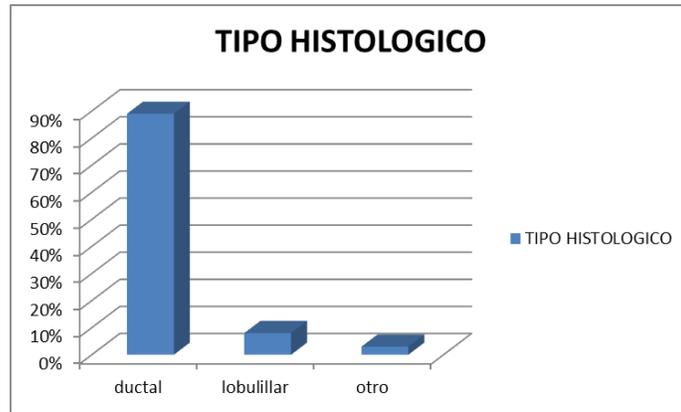


TABLA 2: PATOLOGICA SBR

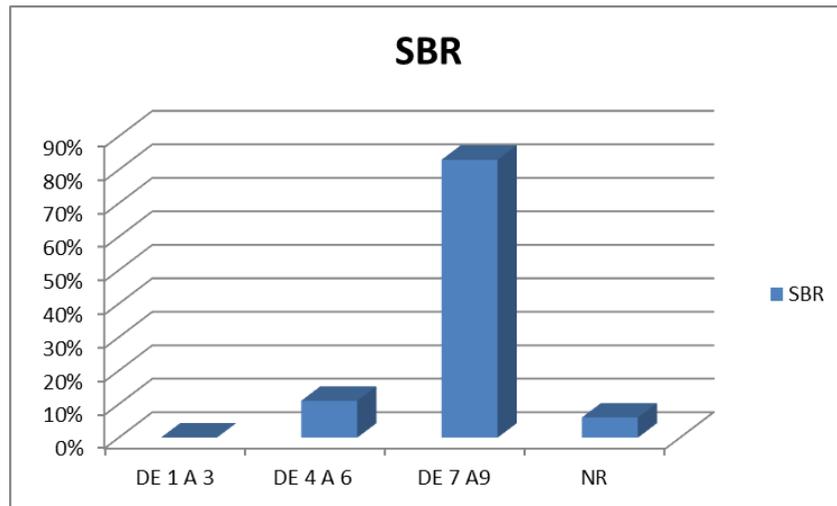


TABLA 3: RECEPTORES HORMONALES

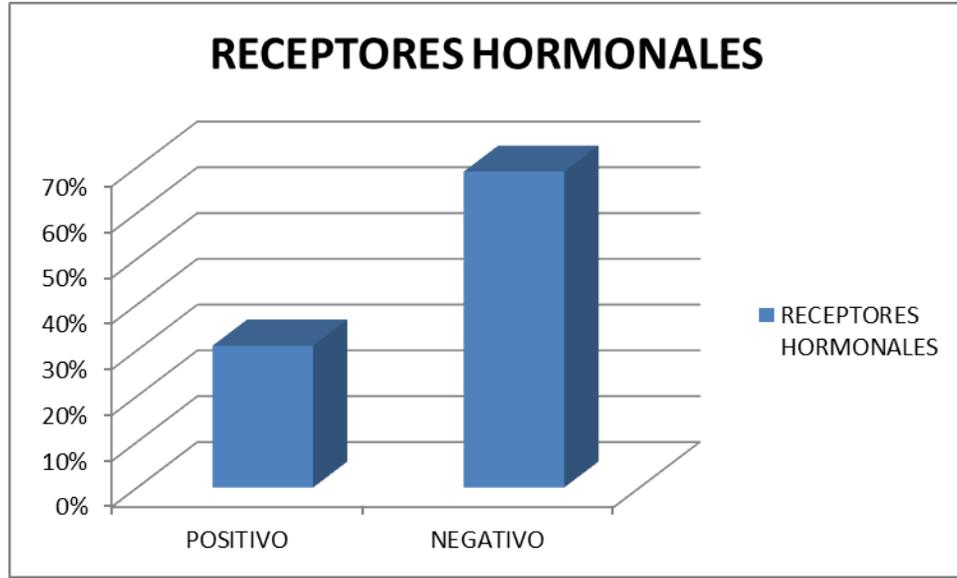


TABLA 4: RESPUESTA PATOLOGICA POSTERIOR A TRATAMIENTO NEOADYUVANTE

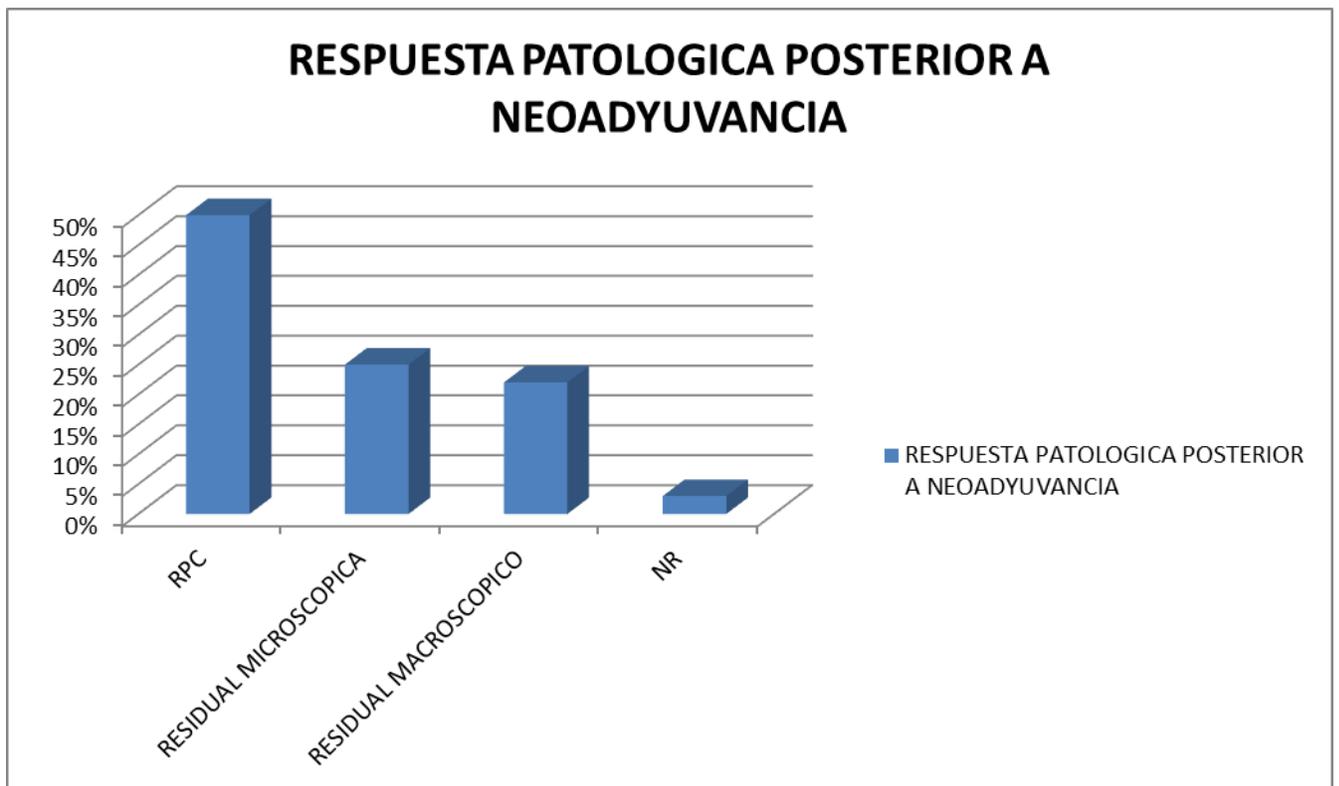


TABLA 5: NUMERO DE GANGLIOS POSITIVOS

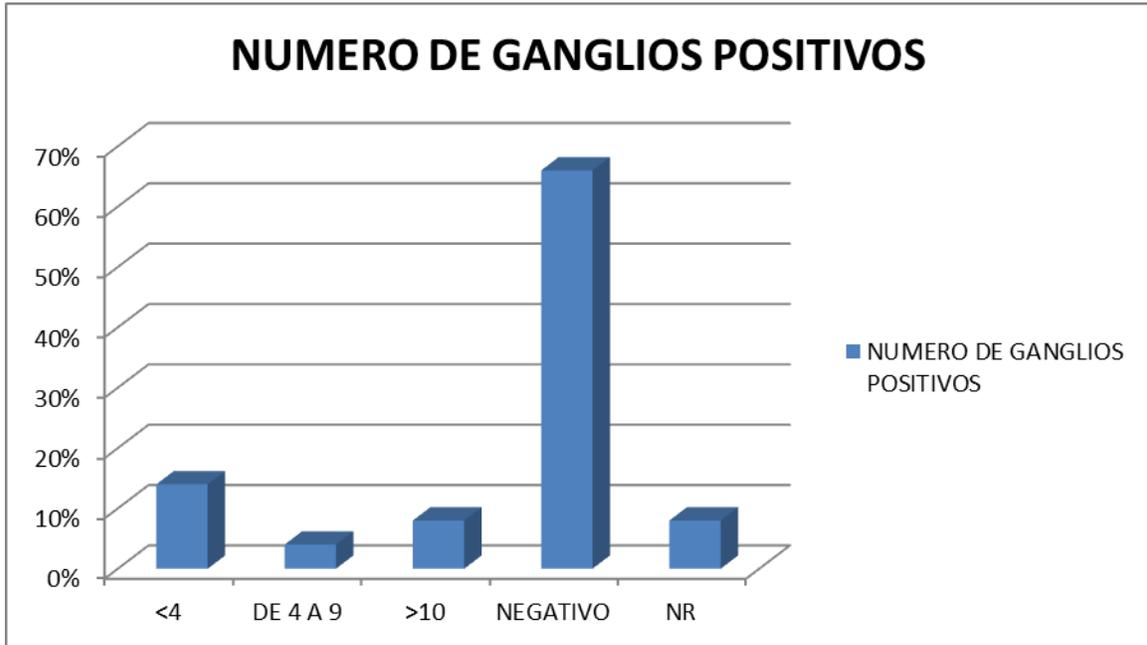


TABLA 6 : PERMEACION LINFOVASCULAR

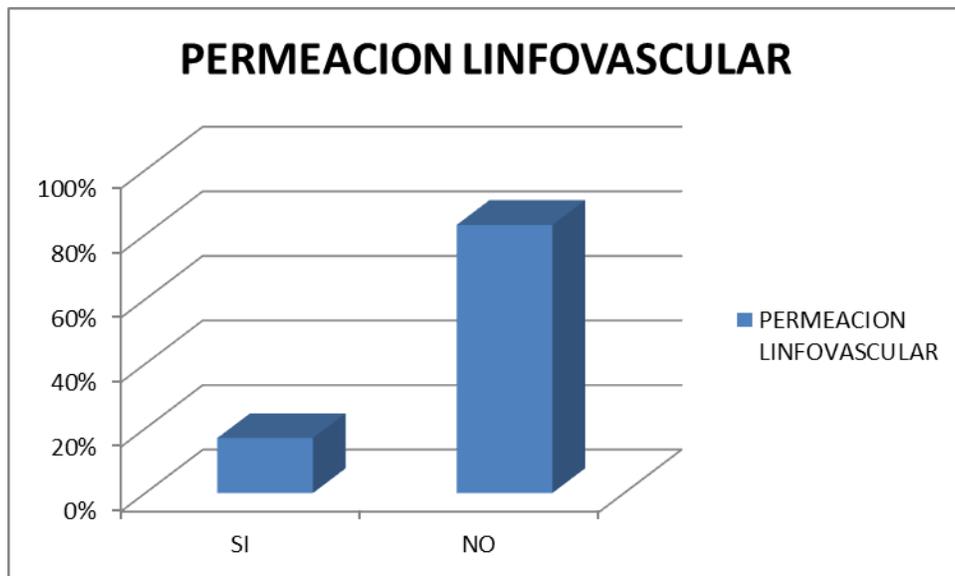


TABLA 7 : VALOR DE KI67%

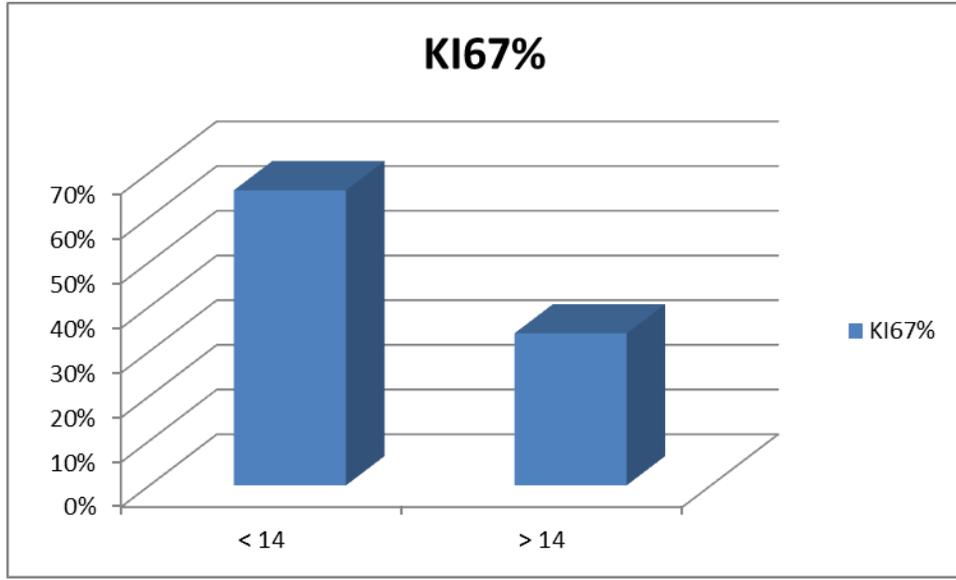


TABLA 8: TAMAÑO TUMORAL (VALOR DE 7)

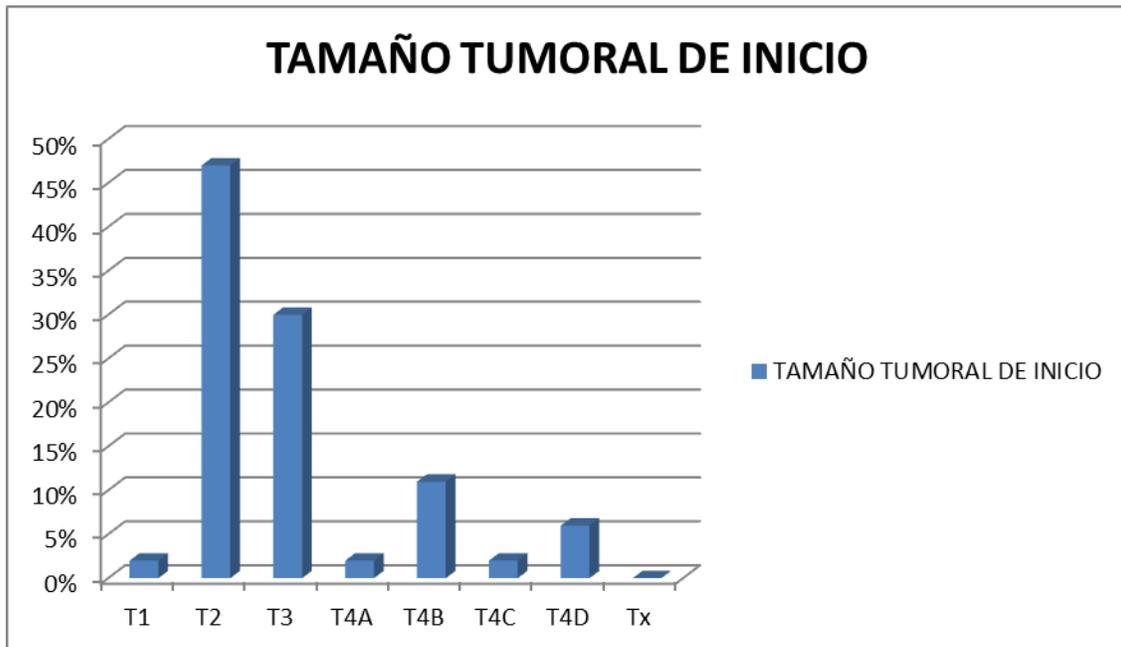


TABLA 9 : RECURRENCIA

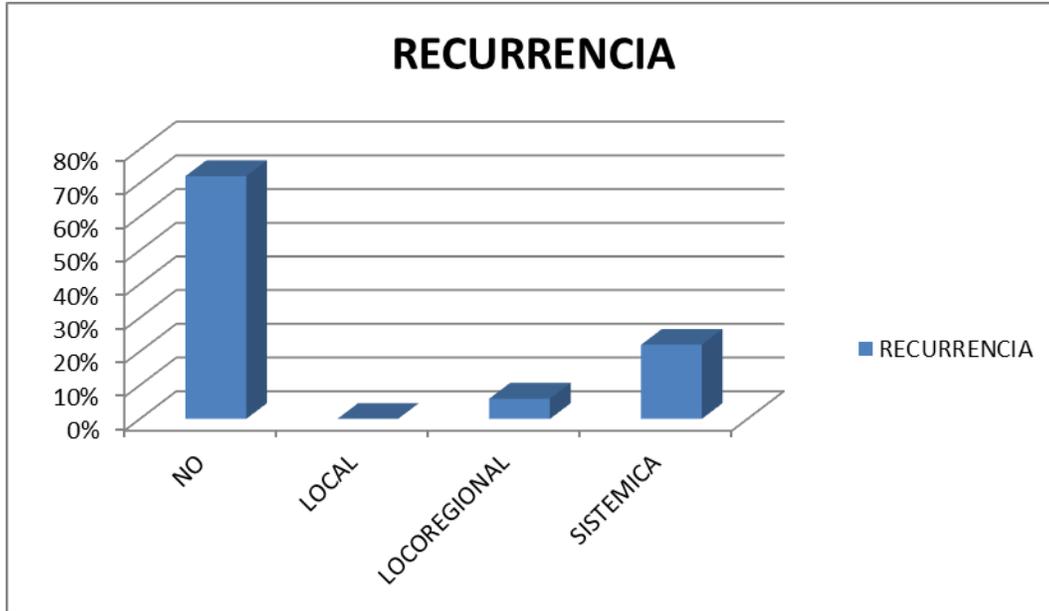


TABLA 10: TIEMPO A LA RECURRENCIA



TABLA 11: RECURRENCIA A DISTANCIA

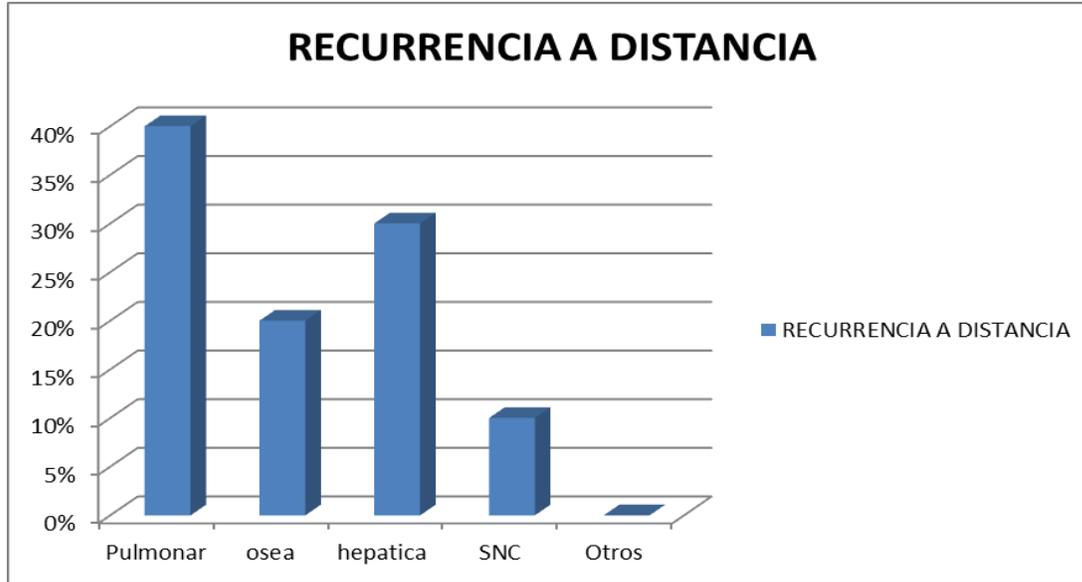


TABLA 12 : NIVEL DE CA 15.3 INICIAL

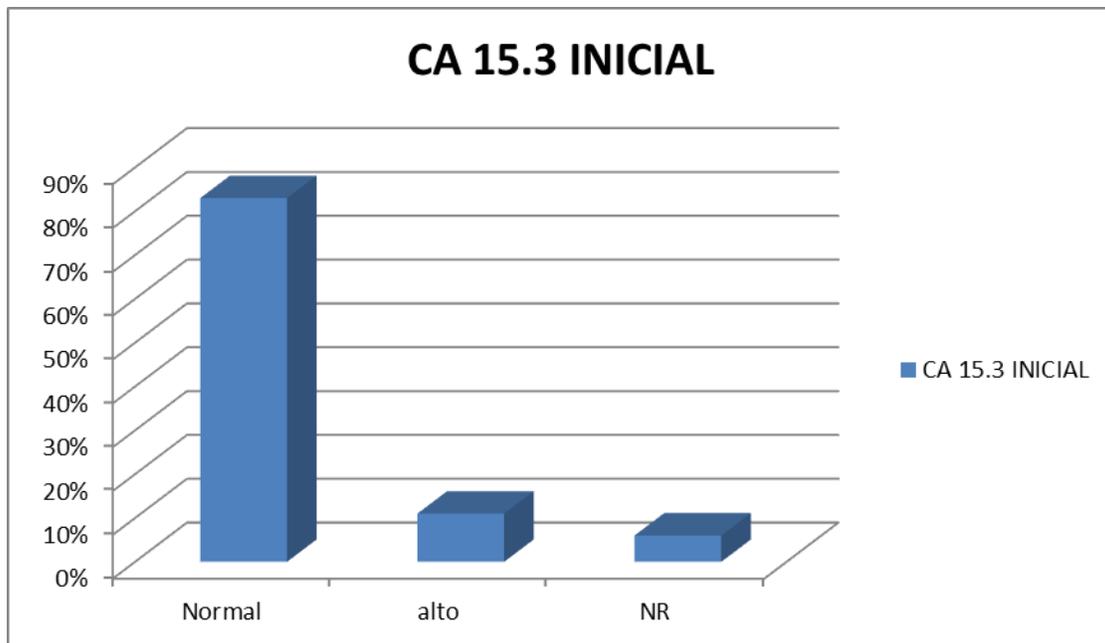


TABLA 13: RESPUESTA PATOLOGICA Y RECURRENCIA

Respuesta PATO*recurrencia tabulación cruzada

Recuento

| | | recurrencia | |
|----------------|------------------------|-------------|----|
| | | no | si |
| Respuesta PATO | COMPLETA | 15 | 1 |
| | FOCOS MICROSCOPICOS | 6 | 2 |
| | RESIDUAL -2 CM | 2 | 0 |
| | RESIDUAL +2CM | 5 | 2 |
| | no aplica | 0 | 3 |

TABLA 14 : GANGLIOS POSITIVOS Y RECURRENCIA

| | | recurrencia | |
|--------------------|-----------|-------------|----|
| | | no | si |
| Ganglios positivos | N0 | 17 | 2 |
| | 1-3 | 5 | 1 |
| | 4-9 | 0 | 1 |
| | +10 | 2 | 1 |
| | no aplica | 4 | 3 |

TABLA 15:CA 125 INICIAL Y RECURRENCIA

| | | recurrencia | |
|----------------|---------------|-------------|----|
| | | no | si |
| CA 125 inicial | normal | 24 | 6 |
| | elevado | 2 | 2 |
| | indeterminado | 2 | 0 |

TABLA 16: TAMAÑO TUMORAL Y RECURRENCIA

| | | recurrencia | |
|-------|-----|-------------|----|
| | | no | si |
| T | T2 | 14 | 2 |
| | T3 | 7 | 4 |
| | T4A | 1 | 0 |
| | T4B | 3 | 1 |
| | T4C | 1 | 0 |
| | T4D | 1 | 1 |
| | T1 | 1 | 0 |
| Total | | 28 | 8 |

ANEXO 1. CUSTOM BIOMARKER SOMATIC MUTATION PCR ARRAY



ANEXO 2: CUSTOM BIOMARKER PARA LECTURA PCR



ANEXO 3: COLOCACION DE LA MUESTRA DE DNA EN EL CUSTOM BIOMARKERANEXO 3:

