

Papel del patólogo en la terapia dirigida contra rutas de señalización

Dr. Federico Rojo
Hospital Vall d'Hebron
Barcelona

En los últimos años, desde nuestro trabajo como patólogos, se ha producido una revolución con la exigencia de la incorporación en nuestros diagnósticos en el cáncer de la valoración de la expresión de determinadas moléculas susceptibles de ser utilizadas como dianas terapéuticas específicas.

Recientemente, los patólogos hemos vivido la experiencia en nuestros diagnósticos de la determinación de la oncoproteína HER2/neu en el cáncer de mama. Esta oncoproteína es un receptor transmembrana de 170 kDa con actividad tirosin-kinasa y que se ha descrito que se expresa hasta en un 25-30% de los tumores malignos infiltrantes de mama. Este receptor pertenece a la familia de receptores del receptor de factor de crecimiento epidérmico (erb-B o HER). Amplios estudios desde finales de la década de 1980, han relacionado la sobreexpresión en los tumores de mama de esta oncoproteína con un mal pronóstico, menor periodo libre de enfermedad, con resistencia a determinados tratamientos quimioterápicos basados en la administración de metotrexate y con negatividad en la expresión de receptores hormonales.

La importancia de la presencia de HER2/neu en las células tumorales también viene dada por su potencial utilización como diana terapéutica en el cáncer con el uso de anticuerpos monoclonales específicos que se unen al dominio extracelular del receptor, como Herceptin. Este tratamiento ha demostrado una tasa de respuestas de hasta 30% como tratamiento de segunda línea en cáncer de mama avanzado. Todo esto ha supuesto un nivel de exigencia nuevo y de gran importancia por nuestra parte, como patólogos, en el proceso de identificación y selección de la población susceptible de ser tratada. Inicialmente y desde los primeros estudios, la determinación se ha venido realizando mediante técnicas de inmunohistoquímica con diferentes anticuerpos sobre cortes de tejido parafinado, y de forma más reciente

mediante técnicas de hibridación con fluorescencia (FISH), que han demostrado una mejor capacidad de selección de las pacientes candidatas a ser tratadas con Herceptin por su mejor correlación con la respuesta a Herceptin, convirtiéndose de este modo en el *gold standard*. En los últimos meses, se están incorporando nuevas técnicas tan válidas como el FISH en la determinación del status de HER2/neu, como hibridación con sondas cromogénicas (CISH) o la RT-PCR.

Bien conocido es también nuestro papel en la identificación de bs pacientes que puedan ser tratados con Glivec, un inhibidor de tirosin-kinasa del receptor c-kit (CD117), que se expresa en una alta proporción de GIST y en otros tumores estromales. La sensibilidad al tratamiento se ha descrito relacionada a la presencia de determinadas mutaciones puntuales en distintos dominios del receptor, que pueden identificarse fácilmente mediante secuenciación genómica de DNA de los tumores.

Ambos ejemplos han entrado de forma rutinaria en nuestra labor como patólogos, pero el espectro de potenciales dianas terapéuticas en el cáncer, utilizando nuevos anticuerpos monoclonales o moléculas de pequeño tamaño, se está ampliando en los últimos años y debemos ser capaces de dar respuesta a los retos que se nos plantean. De esta forma, cualquier proteína que se haya descrito involucrada en los diversos procesos moleculares relacionados con la biología del cáncer, puede utilizarse como diana, y así se está ensayando multitud de nuevas drogas en diversos estudios, y nuestro objetivo debe ser identificar la población que pueda beneficiarse de este tratamiento mediante técnicas sencillas y asequibles a todos los laboratorios de Anatomía Patológica.

Por ejemplo, se están ensayando múltiples drogas que se dirigen contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La oncoproteína EGFR es también un receptor de membrana que pertenece a la misma familia que HER2/neu, de 130 kDa de peso molecular, y que estructuralmente presenta un dominio extracelular donde se unen los diferentes ligandos o sustancias circulantes que se unen al receptor y lo activan, un dominio transmembrana de anclaje a la membrana citoplasmática, y un dominio intracelular con actividad tirosin-kinasa, susceptible de fosforilarse por degradación del ATP y de transmitir una señal hacia el interior de la célula a través de las cascadas de señalización

intracelulares. Este receptor EGFR se ha descrito expresado o sobreexpresado en un gran número de tumores, tales como hasta en un 90% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, en un 70% de los adenocarcinomas colorectales, en un 65% de los carcinomas no microcíticos de pulmón, en 60% de los carcinomas de ovario o en el 40% de los tumores malignos de mama, relacionándose en todos ellos con un mal pronóstico, presencia de estadios avanzados de la enfermedad, presencia de mayor número de metástasis ganglionares, negatividad a receptores hormonales o tasa de recidivas más alta.

Se han diseñado y se están ensayando en diferentes fases de estudio multitud de drogas específicas dirigidas contra este receptor. Estas drogas incluyen tanto anticuerpos monoclonales específicos, como C225 (Cetuximab o Erbitux), o como EMD72000 (Matuzumab), o bien moléculas de pequeño tamaño, capaces de atravesar la membrana citoplasmática y con capacidad inhibitoria de la función tirosin-kinasa del receptor, como ZD1839 (Iressa o Gefitinib), EKB569, OSI774 (Tarceva o Erlotinib), o AEE788.

Se han demostrado tasas de respuesta en distintos tumores a estas drogas, administradas como tratamiento único o en combinación con otras terapias en un porcentaje variable de pacientes, alcanzando, por ejemplo, hasta un 25% de respuestas en el carcinoma colorectal avanzado al tratamiento con Cetuximab. El método inicial de selección de pacientes al tratamiento con Cetuximab en cáncer colorectal se realizó mediante la determinación por inmunohistoquímica de la expresión del receptor en el tumor primario. No se ha demostrado en los múltiples estudios publicados, sin embargo, correlación entre la tasa de respuesta y los niveles de expresión del receptor EGFR, tal y como sucede con Herceptin y HER2/neu en el cáncer de mama. Tampoco la presencia de amplificación del gen EGFR se ha podido correlacionar ni con la expresión de la proteína ni con la respuesta a C225 en este tipo de tumores.

De forma adicional, se han descrito recientemente en algunos tipos tumorales, fundamentalmente en los carcinomas no microcíticos de pulmón, una serie de mutaciones puntuales bien caracterizadas, tanto deleciones como sustituciones de algunos aminoácidos en el dominio intracitoplasmático del receptor, que son capaces de predecir la respuesta a algunos inhibidores de tirosin-kinasa, como Erlotinib o Gefitinib. Debe confirmarse en estudios más

amplios la presencia de estas mutaciones en otros tipos tumorales y demostrar la especificidad de estas alteraciones, ya que existen pacientes en los que no se ha identificado ninguna mutación conocida y han respondido a estos tratamientos, y también existen pacientes que presentan estas mutaciones mencionadas pero no responden a estas terapias.

Posiblemente, y de forma independiente a la presencia de estas mutaciones en los receptores, deben existir otros factores o mecanismos en los tumores que determinen la resistencia o sensibilidad de las células a estos tipos de tratamiento. Así, por ejemplo, se ha descrito recientemente en el cáncer de mama que sobreexpresa HER2/neu, que la susceptibilidad a la respuesta al tratamiento con Herceptin no solo está determinada por la presencia del receptor, sino que viene modulada por el *status* de la molécula PTEN en el tumor.

PTEN es una fosfolipasa con capacidad inhibitoria que regula los niveles de actividad de la vía de señalización intracelular PI3-K/Akt. Esta vía se ha descrito que está involucrada en los mecanismos de supervivencia celular por inhibición de la apoptosis, ya que inactiva por fosforilación a proteínas pro-apoptóticas, como Bad, Bax o Bcl-xl, en los mecanismos de crecimiento celular, mediante la activación de la cascada de señales ligada a mTOR, e indirectamente, en la progresión en el ciclo celular. De esta forma, los tumores de mama con pérdida de la función de PTEN presentan altos niveles de activación de esta vía PI3-K/Akt, bajos niveles de apoptosis, rápida progresión en el ciclo celular y además resistencia al tratamiento con Herceptin.

Por tanto, alteraciones en estas vías de señalización intracelular podrían determinar también la respuesta a terapias anti-EGFR. Se ha descrito en modelos de cáncer de mama *in vitro* que la inducción por diferentes mecanismos de una hiperactivación de la vía PI3-K/Akt se produce una resistencia al tratamiento con Gefitinib. Probablemente en tumores humanos, mecanismos semejantes de activación o disregulación de estas vías de señalización intracelular, estén modulando la respuesta a este tipo de tratamientos, por lo que no solo la expresión del receptor EGFR sea condición suficiente para que un paciente sea beneficiario de un tratamiento anti-EGFR.

De esta forma, se ha demostrado en un estudio fase II en pacientes con carcinomas gástricos en estadios avanzados y que habían sido tratados con

Gefitinib, que la activación de la vía PI3-K/Akt podría jugar un papel en la respuesta a este tratamiento. A estos pacientes se les habían realizado biopsias tumorales secuenciales antes de comenzar el tratamiento y tras un ciclo de administración de la droga. Aquellos tumores que presentaban altos niveles de activación de PI3-K/Akt previos a iniciar al tratamiento, a pesar de mostrar inhibición en la activación de EGFR después de 28 días de terapia, los niveles de proliferación en las células tumorales no se reducían, comparados con aquellos otros tumores con bajos niveles de expresión de la forma activada de la vía PI3-K/Akt. Por tanto, los niveles de activación de esta vía de señalización intracelular podrían jugar importante en la sensibilidad a este tipo de tratamientos.

Experiencias similares en otros tipos tumorales aportan un conocimiento fundamental necesario para la comprensión de los mecanismos de acción de este tipo de drogas. Esta información abre el campo a nuevas terapias dirigidas contra otras moléculas implicadas en los mecanismos de señalización intracelular y que se alejan de los modelos de receptores de membrana hasta ahora mencionados.

Así, una de las principales y mejor conocidas rutas de señalización intracelular está mediada en las células epiteliales por la cascada de kinasas Ras-Raf-MAPK. Esta vía se ha relacionado en muchos tumores con la proliferación, los mecanismos de migración y de diferenciación celular, y se sabe que está mediada por la activación de numerosos receptores de membrana, entre ellos los receptores de la familia erb-B.

La actividad de Ras, imprescindible para que la cascada de señales progrese, está controlada por la farnesilación o capacitación de esta molécula. Esta farnesilación se realiza por la cesión de un residuo farnesilo mediante una farnesil-transferasa. Se han diseñado y están en diversas fases de ensayo en la clínica, inhibidores específicos de esta enzima farnesil-transferasa, que han demostrado una discreta actividad en algunos tipos tumorales, pero que a nivel molecular parecen incrementar los niveles de apoptosis celular en el tumor, incremento mediado por aumento de la expresión de las caspazas en algunas células neoplásicas.

Previamente se ha citado la importancia de la vía de señalización PI3-K/Akt en la supervivencia celular. También esta vía se ha relacionado con los procesos

de crecimiento tumoral y de progresión en el ciclo celular a través de mTOR (mammalian Target of Rapamycin).

Esta proteína mTOR, con actividad kinasa, regula en las células los mecanismos de transcripción y síntesis de proteínas, incluyendo la síntesis de reguladores imprescindibles del ciclo celular, tales como ciclina D1, p27^{kip1} o c-myc. Todas estas acciones, mTOR las realiza a través de dos efectores o kinasas: la p70S6 kinasa ribosomal y 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1). La disregulación de esta vía se ha relacionado en la literatura en diversos tipos de tumores, por ejemplo en cáncer de mama o carcinoma endometriode, con un comportamiento más agresivo de los mismos y con resistencia a los tratamientos radio y quimioterápicos convencionales.

Todos estos datos hacen que mTOR sea también una diana atractiva para terapias específicas. Estos tratamientos contra mTOR se basan en el uso de drogas derivadas de la rapamicina, entre los que se encuentran CCI779 o RAD001. Ambas drogas están en avanzadas fases de ensayo clínico y han demostrado una significativa eficacia, tanto a nivel de respuesta clínica tumoral, como a nivel molecular. En concreto, en los pacientes que han recibido RAD001 en administración oral y en los que también se han podido realizar biopsias secuenciales de sus lesiones tumorales previas a comenzar al tratamiento y después de un ciclo iniciado, puede demostrarse claramente una inhibición completa de los mecanismos celulares de síntesis proteica, evidenciable por una desaparición casi completa de los niveles de expresión de la actividad de la proteína ribosomal S6, responsable última de la entrada del RNA mensajero en el ribosoma de las células.

Todo este tipo de conocimientos sobre el cáncer y estos tratamientos debe generarse y debe ser gestionado, al menos en parte, por nosotros, los patólogos, como especialistas en el estudio y manejo de los tejidos. En definitiva, los patólogos debemos ser capaces de dar algunas de las respuestas a las cuestiones que se plantean por parte de los clínicos en este nuevo tipo de estudios y de aportar información que ayude a la comprensión de los mecanismos moleculares del cáncer, de los mecanismos de acción de este tipo de drogas y en la identificación de los mejores pacientes candidatos a recibir estos tratamientos.

Bibliografía

- Weng Lp, Smith WM, Dahia PL, Zielbold U, Gil E, Lees JA, Eng C. PTEN suppresses breast cancer growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. *Cancer Res* 1999, 15:5808-14
- Zhou, B.P., Hu, M.C., Miller, S.A., Yu, Z., Xia, W., Lin, S.Y., Hung, M.C. Her-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275:8027-8031
- Page C, Huang M, Jin X, Cho K, Lilja J, Reynolds RK, Lin J. Elevated phosphorylation of AKT and Stat3 in prostate, breast, and cervical cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 2000, 17:23-28
- Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-EGF receptor treatments. J Albanell, J Codony-Servat, F Rojo, JM del Campo, S Sauleda, G Raspall, J Giralt, J Roselló, R Nicholson, J Mendelshon, J Baselga. *Cancer Research* 2001, 61, 6500-6510
- Cantley, L. and Neel, B. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway, *PNAS* 1999, 4240-4245
- Pharmacodynamic studies of the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. J Albanell, F Rojo, S Averbuch, A Feyereislova, JM Mascaró, R Herbst, P LoRusso, D Rischin, S Sauleda, J Gee, RI Nicholson, J Baselga. *J Clin Oncol* 2001, 23
- NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. MA Molina, R Saez, EE Ramsey, MJ Garcia-Barrachino, F Rojo, AJ Evans, J Albanell, EJ Keenan, A Lluch, J Garcia-Conde, J Baselga, GM Clinton. *Clin Cancer Res.* 2002, 347-53.
- PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. I Shin, FM Yakes, F Rojo, NY Shin, AV Bakin, J Baselga, CL Arteaga. *Nat Med*, 2002, 8 (1145), 1152
- Ciardiello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer.* 2003; 39:1348-54
- Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, Paish EC, Robertson JF, Ellis IO. The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol.* 2004;204(1):93-100
- Phase I study of the humanized antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody EMD72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor. Vanhoefer U, Tewes M, Rojo F, Dirsch O, Schleucher N, Rosen O, Tillner J, Kovar A, Braun AH, Trarbach T, Seeber S, Harstrick A, Baselga J. *J Clin Oncol* 2004, 1(22): 175-184
- Rowinsky EK. Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR). *Curr Opin Oncol.* 2004;16(6):564-75.

Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol*. 2004 15;22(14):2954-63.

Cesario A, Catassi A, Festi L, Imperatori A, Pericelli A, Galetta D, Margaritora S, Porziella V, Cardaci V, Granone P, Dominioni L, Russo P. Farnesyltransferase inhibitors and human malignant pleural mesothelioma: a first-step comparative translational study. *Clin Cancer Res*. 2005 1;11(5):2026-37.