

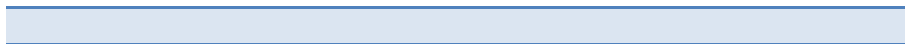


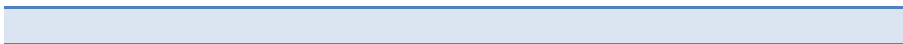
Universidad de Oviedo
Programa de Doctorado “Biomedicina y Oncología
Molecular”

**“Análisis de los receptores tirosina
quinasa ALK, RET y ROS en los
adenocarcinomas nasosinusales”**

TESIS DOCTORAL

Esteban Reinaldo Pacheco Coronel
20/02/2017







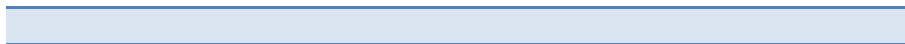
Universidad de Oviedo
Programa de Doctorado “Biomedicina y Oncología
Molecular”

TESIS DOCTORAL

**“Análisis de los receptores tirosina
quinasa ALK, RET y ROS en los
adenocarcinomas nasosinusales”**

Autor:
Esteban Reinaldo
Pacheco Coronel

Directores:
José Luís Llorente Pendás
Mario Hermsen





proteica en ninguno de los casos. Se realizaron 80 **inmunotinciones** para RET de las que 57 (71%) fueron positivas y 23 (29%) fueron negativas para la expresión de la proteína. Por último, al estudiar ROS se obtuvieron 96 casos útiles, de los cuales ninguno fue positivo para la **inmunotinción**.

En cuanto a la secuenciación, de las 150 muestras de ACNS se pudieron analizar 48 con técnicas de secuenciación de nueva generación. Encontramos mutaciones no sinónimas recurrentes, 5 de ALK, 3 de RET y 6 de ROS 1. En un caso observamos una translocación de ALK con EHP1 y una amplificación de ALK.

Conclusiones: Las características de nuestra serie son similares a otras ya publicadas. La supervivencia global de los pacientes fue del 48% a los 5 años. Los resultados obtenidos en la IHQ y FISH sugieren que ALK y ROS no desempeña un papel relevante en la oncogénesis de los ACNS. La ausencia de RET se asoció con marcadores clínicos adversos en pacientes con ACNS. Mediante la secuenciación se identificó una nueva translocación de ALK-EHBP1. No se observó disminución en la proliferación tumoral con **crizotinib**. Pero si se observó una disminución de más del 50% de la proliferación tumoral con **vandetanib** a las 72h. Utilizando concentraciones entre 0,1 y 1 μ m. Por lo que en ACNS se debería realizar más estudios de los inhibidores de la tirosina quinasa.

RESUMEN (en Inglés)

Introduction/Aims. Chromosomal translocations at 2p23 cause overexpression of *ALK*, other translocations cause overexpression of RET and ROS. These are tyrosine kinase receptors involved in signaling pathways that regulate cell proliferation. These translocations occur in 1-5% of lung adenocarcinoma and have been demonstrated to be useful as a therapeutic target for **crizotinib** and **vandetanib**. Intestinal type adenocarcinomas (ITAC) are histologically similar to lung adenocarcinomas; therefore, the aim of this study was to evaluate if there are alterations in ALK, RET and ROS in these tumors.

Method: We studied 150 cases of ITAC. The presence of *ALK*, RET and ROS



was analyzed in 96 tumor samples by IHC and FISH using 'break apart' probes for ALK. In addition, ALK, RET and ROS genes were studied by next generation sequencing (NGS).

Results: The samples of ACNS didn't shown *ALK* translocation. Moreover, ALK protein expression was absent in all cases. RET was analyzed in 80 cases with IHQ. 57 (71%) were positive and 23 (29%) were negative for protein expression. Finally, we studied ROS in 96 useful cases, none of which was positive in IHQ.

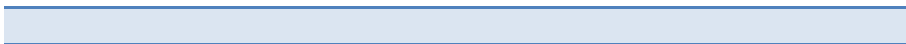
Of the 150 samples we analyzed 48 cases with NGS techniques. We found recurrent non-synonymous mutations, 5 of ALK, 3 of RET and 6 of ROS 1. In one case we observed a translocation of ALK with EHP1. And we observed amplification of ALK in 1 case.

Conclusions: The characteristics of ITACs in our series are similar to other published series. The overall survival of patients in our series was 48% at 5 years. These results suggest that *ALK and ROS* are not involved mainly in ACNS. The absence of RET was associated with adverse clinical markers in patients with ITACs. Using NGS we observed a new translocation of ALK-EHBP1. No response was observed in tumor proliferation with *crizotinib*. And a decrease of more than 50% of tumor proliferation was observed with 0.1 and 1 μ concentrations of *vandetanib* at 72 h. More research in tyrosine kinase inhibitors in ITACs its necessary.



Dedicatoria

A mi familia y amigos, por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada momento.





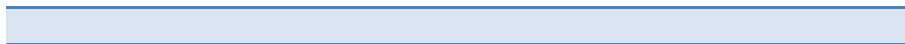
Agradecimientos

A José Luis por brindarme la oportunidad de trabajar en un tema ambicioso y muy interesante, por los buenos consejos y el tiempo invertido para que este proyecto salga adelante.

A Mario, por su valiosa colaboración en el laboratorio, en el análisis de muestras e interpretación de resultados, sus enseñanzas de las diferentes técnicas aplicadas y manejo en el laboratorio; sus consejos sobre la metodología, resultados y conclusiones del proyecto.

A mis compañeros del servicio de Otorrinolaringología del Hospital Central de Asturias por sus enseñanzas y el trabajo en equipo.

A los compañeros del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias. Por que gracias a su trabajo hemos aprendido y desarrollado técnicas importantes para la elaboración de este proyecto.





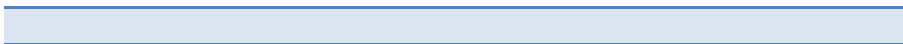
1 ANTECEDENTES	1
1.1 Introducción	2
1.2 Adenocarcinoma nasosinusal.....	4
1.2.1 Epidemiología.....	4
1.2.2 Factores etiológicos	4
1.2.3 Histopatología	5
1.2.4 Clínica.....	5
1.2.5 Diagnóstico	6
1.2.6 Estadificación.....	6
1.2.7 Tratamiento.....	7
1.2.8 Pronóstico	10
1.3 Alteraciones genéticas en adenocarcinomas nasosinuales.....	11
1.4 Aspectos Generales de las tirosina quinasas.....	13
1.4.1 Concepto	13
1.4.2 Función.....	13
1.4.3 Regulación.....	14
1.4.4 Familias	14
1.4.5 Significación clínica.....	15
1.4.6 Tumores estromales gastrointestinales (GIST).....	16
1.4.7 Otros	16
1.5 Aspectos Generales de ALK	17
1.5.1 ALK y tumores de cabeza y cuello	25
1.5.2 Métodos de detección	28
1.5.3 Aplicaciones terapéuticas.....	32
1.6 Aspectos Generales de RET	35
1.6.1 RET y tumores de cabeza y cuello	36
1.6.2 Métodos de detección	37
1.6.3 Aplicaciones terapéuticas.....	38
1.7 Aspectos Generales de ROS	39
1.7.1 ROS y tumores de cabeza y cuello.....	41
1.7.2 Métodos de detección	42
1.7.3 Aplicaciones terapéuticas.....	42
2 HIPÓTESIS	44
3 OBJETIVOS.....	45
4 MATERIAL Y MÉTODO	46
4.1 Selección de pacientes. Diseño del estudio.....	46
4.2 Inmunohistoquímica (IHQ)	47
4.2.1 Fundamentos de la técnica	47



4.2.2	Pasos de la técnica	48
4.2.3	Tipos de reactivos.....	50
4.2.4	Interpretación de datos	50
4.3	Técnica de FISH	51
4.3.1	Preparación de la muestra	51
4.3.2	Pretratamiento.....	52
4.3.3	Hibridación	53
4.3.4	Análisis por microscopía	54
4.4	Línea celular	57
4.4.1	Características del paciente y del tumor de la línea celular	57
4.4.2	Establecimiento de la línea celular.....	57
4.4.3	Extracción de ADN.....	58
4.4.4	Ensayos de proliferación celular	59
4.5	Secuenciación.....	59
4.6	Definición de variables	60
4.7	Estudio estadístico	61
5	RESULTADOS.....	62
4.8	Aspectos clínico patológicos	62
4.9	Relaciones de las variables con las características clínico patológicas de los ACNS.....	66
4.9.1	Supervivencia específica y variables clínico-patológicas	66
4.9.2	Supervivencia libre de enfermedad y características clínico patológicas.....	70
4.10	FISH y expresión proteica de ALK.....	72
4.11	Expresión proteica de RET.....	75
4.12	Expresión proteica de ROS.....	77
4.13	Relaciones de la expresión proteica de RET con otras variables	77
4.14	Línea celular e Inhibidores de la tirosina quinasa	87
4.14.1	Morfología de la línea celular.....	87
4.14.2	Características de crecimiento	88
4.14.3	Perfil genético	88
4.14.4	Crecimiento celular e inhibidores de la tirosina quinasa.	88
4.15	Secuenciación	91
5	DISCUSIÓN.....	94
5.1	Justificación	94



5.2 Aspectos clínico patológicos	95
5.3 Aspectos genéticos-moleculares	97
6 CONCLUSIONES	112
7 BIBLIOGRAFÍA	114
8 ANEXOS	137
8.1 Mutaciones de ALK, RET y ROS susceptibles de tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa	137
8.2 Abreviaturas.....	140
8.3 Artículo.....	142



1 ANTECEDENTES

1.1 Introducción

La supervivencia de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello (CCC) no ha tenido cambios sustanciales a pesar del avance en los procedimientos diagnósticos y en los protocolos terapéuticos. Se ha mejorado la técnica quirúrgica y la radioquimioterapia, pero lo que ha supuesto un avance importante en la estrategia ha sido el diagnóstico molecular y el tratamiento biológico frente a la expresión de determinados genes. En este sentido los anticuerpos monoclonales como el cetuximab frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa (ITQ), como gefitinib o erlotinib, han aumentado las expectativas y contribuido a mejorar la calidad de vida, sobre todo en pacientes con carcinomas escamosos avanzados. Sin embargo, dentro de los CCC hay localizaciones y extirpes tumorales, como son los adenocarcinomas nasosinusales (ACNS), que apenas se han beneficiado de estas nuevas terapias. Los ACNS presentan diversas características que los hacen particularmente interesantes en el estudio de las nuevas dianas terapéuticas. Una de ellas es la mortalidad, globalmente elevada y apenas modificada en los últimos años, por lo que desarrollar dianas moleculares sería interesante para mejorar la supervivencia. Además, la estrecha relación etiológica con el polvo de la madera y el dilatado tiempo de exposición para desarrollar el tumor hace que el estudio molecular tenga interés en el diagnóstico precoz.

No obstante, la baja incidencia de los ACNS es un inconveniente ya que los estudios publicados son escasos y poco concluyentes al contar con series limitadas.

Algunos de los genes tirosina quinasa que se han estudiado recientemente son el gen *ALK*, *RET* y *ROS* y su expresión en el cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), su variante más común es el adenocarcinoma (96% aproximadamente) [1].

Los adenocarcinomas de pulmón tienen una histología similar pero una incidencia muy superior al ACNS y, por tanto, cuenta con series más amplias. Concretamente estos estudios se han centrado en la expresión de *ALK* fusionado con otro gen, el *EML4*, al producirse una translocación cromosómica en el cromosoma 2. Se origina así una proteína de fusión entre *ALK* y *EML4* que es la diana terapéutica de un nuevo fármaco el crizotinib, otro inhibidor de la tirosina quinasa. Este inhibidor ha sido recientemente aprobado por la FDA ya que obtiene tasas de respuesta elevadas en los NSCLC, controlando la enfermedad y mejorando la supervivencia a los 6 meses.

Posteriormente, en los adenocarcinomas de pulmón, se han estudiado translocaciones en otros tirosina quinasa como *RET* y *ROS* con una acción y respuesta similar a *ALK* frente a los ITQ. Estos resultados tan prometedores respecto al uso de ITQ en el adenocarcinoma de pulmón nos han llevado a trasladar el estudio de la expresión de *ALK*, *RET* y *ROS* a los ACNS.

1.2 Adenocarcinoma nasosinusal

Es una lesión tumoral maligna de naturaleza epitelial, con formación de estructuras glandulares originadas a partir de un epitelio glandular.

Al igual que el adenoma (benigno) existen diferentes tipos dependiendo de la estructura dominante.

1.2.1 Epidemiología

Los tumores nasosinuales representan el 5% de todos los tumores de cabeza y cuello y su incidencia es de 1 caso por 100.000 habitantes por año [2, 3]. La edad promedio de aparición es entre los 50 y 60 años [4]. Del 50 al 80% son tumores escamosos mientras que del 10 al 20% son ACNS [3, 5]. Los ACNS son más frecuentes en hombres 6:1 [6], y se considera una enfermedad ocupacional relacionada con los trabajadores del polvo de madera. Su incidencia es de 0.19 casos por 100.000 habitantes [7].

1.2.2 Factores etiológicos

El factor de riesgo principal es la exposición al polvo de madera. Los trabajadores con exposición profesional tiene 500 veces más riesgo de desarrollar un cáncer que la población masculina y 900 veces más riesgo que la población general [8].

Las partículas de más de 5 μm se quedan en la mucosa nasosinusal y enlentecen el movimiento mucociliar provocando la liberación de sustancias inflamatorias que provocarían a

largo plazo primero una displasia de las células y después una metaplasia [9].

1.2.3 Histopatología

La cavidad nasosinusal está formada por dos epitelios: la mayor parte es epitelio respiratorio pseudoestratificado constituido por células ciliadas y caliciformes que producen una capa de moco y que ayuda en la defensa y en el aclaramiento de sustancias extrínsecas inhaladas. En el techo de la cavidad nasal existe un epitelio olfatorio pseudoestratificado constituido por células de soporte y neuronas olfatorias cuyos axones atraviesan la lámina cribiforme y conectan con el bulbo olfatorio. La diferenciación anormal de estas células da como resultado tumores escamosos, adenocarcinomas o esteseoneuroblastomas [10].

Los ACNS se dividen en 2 grupos: Los de tipo “intestinal” (ITAC) que son los más importantes por su frecuencia y los ACNS tipo “no intestinal”. Los ITAC a su vez se subdividen en 4 tipos histológicos: colónico (40%), mucinoso (22%), sólido (20%) y papilar (18%), y además en algunos casos se puede observar una mezcla de estos tipos (mixto) [11].

1.2.4 Clínica

La presentación clínica es inespecífica y el diagnóstico diferencial incluye patología más frecuente y benigna. Los signos y síntomas más frecuentes son obstrucción nasal, dolor facial, rinorrea, epistaxis. Cuando la extensión tumoral es mayor

puede afectar estructuras dentro de las orbitas y la fosa craneal anterior produciendo proptosis, diplopia o signos neurológicos.

1.2.5 Diagnóstico

La anamnesis y la exploración física deben ser completas, realizaremos una rinoscopia anterior, utilizaremos endoscopios con ópticas de 0 y 45º y nasofibroskopios. La localización más frecuente de estos tumores es el seno etmoidal aunque se han descrito ocasionalmente localizaciones en el seno maxilar y esfenoidal [10]. Estudios complementarios como la tomografía (TC) y la resonancia magnética (RM) ayudan en la localización y la extensión de los tumores. La tomografía con emisión de positrones (PET-TC) aporta información en relación a las metástasis y recurrencia loco-regional.

1.2.6 Estadificación

Gracias a la exploración física y a las pruebas complementarias podemos realizar la estadificación de los tumores nasosinusales. Se basa en la localización y extensión de los mismos, el TNM, de acuerdo al sistema de clasificación de la unión internacional para el control del cáncer, por sus siglas en inglés, UICC [12].

1.2.7 Tratamiento

El tratamiento fundamental de los tumores nasosinusales es la resección quirúrgica completa del tumor y la radioterapia complementaria, aunque el plan terapéutico se debe individualizar en base a las características del tumor: extensión, histología, mapa genético-molecular. Además en base a las características del paciente: la edad y los tratamientos previos[10].

1.2.7.1 Cirugía

Los abordajes endoscópicos mínimamente invasivos se han aplicado y popularizado progresivamente por su menor morbilidad y menor número de complicaciones comparado con los abordajes abiertos [13]. Además, los abordajes abiertos cada vez son menos agresivos y con mejores opciones de reconstrucción con colgajos regionales o colgajos libres [14].

La resección de los tumores nasosinusales muchas veces está condicionada por las estructuras que rodean su localización, haciendo que en ocasiones sea imposible dejar un margen amplio. Intentos de realizar una resección amplia podrían ocasionar lesiones en los pares craneales, órbita, carótida interna o sistema nervioso central generando comorbilidades inaceptables.

1.2.7.2 Radioterapia

La radioterapia con intensidad modulada, la radioterapia volumétrica, la tomoterapia o la terapia con haz de protones, han mejorado la precisión de la radioterapia. Esto es fundamental, ya que cerca de la localización de los tumores nasosinusales tenemos estructuras radiosensibles como el nervio óptico y la cóclea; glándulas: Lacrimales, parótida, pituitaria; estructuras del cerebro: lóbulo frontal, lóbulo temporal, y del troncoencéfalo y la médula espinal; y estructuras de la cavidad oral. Con estas nuevas técnicas se reduce la toxicidad y se aumenta la eficiencia [15].

1.2.7.3 Quimioterapia

Existen pocos ensayos clínicos debido a la baja incidencia de este tipo de tumores, y los protocolos de quimioterapia o quimioradioterapia que se utilizan, muchas veces son protocolos utilizados en tumores más frecuentes como lo son los tumores de laringe [10], de pulmón o colon.

Se indica quimioterapia cuando esta contraindicada la cirugía o la radioterapia ya sea porque el tumor está muy avanzado o porque el beneficio de estos tratamientos no es superior a la morbilidad que generan. Actualmente la quimioterapia ha tomado protagonismo gracias a las técnicas de detección genético-moleculares y gracias al avance en la radioterapia. La quimioterapia concomitante o la quimioterapia adyuvante podrían ser útiles dependiendo de las características del tumor.

Por ejemplo, en los carcinomas escamosos nasosinuales la buena respuesta a la quimioterapia neoadyuvante podría ser predictivo de una buena respuesta al tratamiento y un buen pronóstico [16]. En estos casos, existe evidencia de un aumento en la supervivencia y de control loco regional con la radioterapia y la quimioterapia concomitante [17, 18]. De todas formas no existen estudios comparativos que demuestren una diferencia significativa en la supervivencia de pacientes tratados con quimioradioterapia concomitante o pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante.

La elección de la quimioterapia debe ser individualizada. Entre los fármacos más utilizados para la quimioterapia de inducción están: el docetaxel, el cisplatino y el 5-fluorouracilo. Y tras la inducción se utiliza el carboplatino semanalmente en ciertos protocolos de quimioradioterapia [16, 19, 20]. Otra opción para los tumores que sobreexpresan EGFR, es la terapia dirigida con cetuximab cada 2 semanas después de la quimioterapia de inducción [21].

Otra alternativa es combinar la citoreducción quirúrgica y la quimioterapia tópica repetida con 5-fluorouracilo, esto ha demostrado buenos resultados en los ACNS [22]. De todas formas parece claro que hace falta una quimioterapia más segura y más eficaz.

El uso de marcadores moleculares también ha representado un avance importante en este campo, por ejemplo: la quimioterapia ha demostrado ser altamente efectiva en los ITAC con PT53 de tipo salvaje, pero inefectivo en ITAC con

mutaciones en PT53[23]; también en los tumores escamosos nasosinusales con niveles bajos de proteína reparadora de la escisión del ADN, ERCC1, ha demostrado una respuesta favorable a la quimioterapia [24].

1.2.8 Pronóstico

Independientemente del tipo de terapia que utilicemos, el pronóstico no es bueno, aproximadamente la supervivencia es de 30-50% en 5 años. La supervivencia a los 5 años depende fundamentalmente del estadio tumoral y puede disminuir desde un 80% en tumores T1 hasta un 30% en estadios T4 [2, 4, 6]. La supervivencia no depende tanto del grado histológico en pacientes con carcinomas escamosos nasosinusales [25], sin embargo en ITAC los tipos papilar y colónico están asociados a mejores resultados en comparación a los tipos sólido y mucinoso [11].

La recurrencia local ocurre frecuentemente después de 2 años y es el factor más importante relacionado con la mortalidad [26, 27]. La extensión a los nódulos linfáticos y metástasis a distancia son poco frecuentes pero se recomienda un estudio completo de estos tumores con pruebas complementarias como el PET-TC para valorar la extensión [10].

1.3 Alteraciones genéticas en adenocarcinomas nasosinusales

Existen varios genes y proteínas que intervienen en rutas de señalización encargadas del control de la proliferación celular. Dentro de este marco general se han estudiado en los ITAC: TP 53, un supresor tumoral para controlar alteraciones en el ADN; la vía WNT que actúa en procesos de diferenciación y movilidad celular; EGFR una tirosina quinasa que interviene en la síntesis de ADN y proliferación celular; entre otros.

Existen pocos estudios de la caracterización genética de los ITAC. Primero se estudiaron 21 casos mediante hibridación genética comparativa (CGH) [28] y después 37 casos mediante Microarray CGH. Se han identificado las siguientes aberraciones recurrentes , en orden descendente: ganancias en 5p15 (60%), 8q24 (57%), 20q13 (54%), 20q11 y 8q21 (51%) , 20p13 , 7p11 y (43%), y pérdidas en 5q11 - qter , 8p12 - pter y 18q12-23 (40%), y 17p13 y 19p13 (35%) . El análisis MLPA (amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples) ha confirmado este patrón global de ganancias y pérdidas . La pérdida cromosómica en 4q32 -ter y ganancias en 1q22, 6p22 y 3q29, así como la supresión de TIMP2 y CRK se han correlacionado con un resultado clínico desfavorable [29].

Se han observado mutaciones de TP 53 en el 86% de ITAC y está en relación con la exposición de polvo de madera [23, 30-

32]. Además, se ha publicado la sobreexpresión de p53 en el 72% de los ITAC, y que dicha expresión es menor en el subtipo mucinoso comparado con los otros subtipos [33].

Alteraciones en la ruta WNT se han descrito en el 31-53% de los ITAC. La activación de esta ruta produce expresión nuclear de β -catenina. El estudio de los marcadores de esta vía sugiere que existe similitud en la carcinogénesis de los ITAC con algunos tipos de adenocarcinomas colorectales en pacientes con enfermedad inflamatoria crónica [34, 35].

Algunos estudios han demostrado la sobreexpresión de EGFR en el 20-33% de los ITAC. Ciertas mutaciones de EGFR descritas en adenocarcinomas de pulmón no han sido encontradas en ITAC [36, 37]. La sobreexpresión de EGFR podría ser utilizado como diana terapéutica con fármacos como el cetuximab e inhibidores de las tirosina quinasas [10].

Mutaciones en KRAS y HRAS que codifican proteínas en la vía de señalización de EGF han sido descritas en 15% de ITAC [38]. La deltarasina es un fármaco que inhibe la señalización de RAS y ha demostrado in vitro y en ensayos clínicos, suprimir el crecimiento de células del adenocarcinoma ductal de páncreas [39]. Este podría ser un fármaco candidato a estudio en pacientes con ITAC que tengan estas mutaciones que por otro lado son poco frecuentes.

Por último, algunos estudios han demostrado sobreexpresión de NFκB y COX2 en ITAC sugiriendo la inflamación crónica como carcinogénesis [40]. Posibles agentes terapéuticos que actúan inhibiendo NFκB y COX2 y la respuesta inflamatoria son la solitromicina o los AINES [10, 41].

1.4 Aspectos Generales de las tirosina quinasas.

1.4.1 Concepto

Las proteínas quinasas son enzimas con una subunidad catalítica que transfiere el fosfato, usualmente del ATP, a otras proteínas para producir un cambio conformacional y de actividad. Existen 2 clases: las que tienen como sustrato la serina/treonina y las que tienen como sustrato la tirosina [42].

1.4.2 Función

Las tirosina quinasas catalizan la fosforilación de los residuos de tirosina en las proteínas. La fosforilación de estos residuos influye en 3 aspectos fundamentales a las proteínas: su actividad, su localización y sus interacciones.

Estas enzimas se encuentran en diferentes cascadas de señalización que van desde la membrana celular hasta el ADN en el núcleo y la alteración de las tirosina quinasas puede contribuir en la iniciación o en la progresión del cáncer [43].

Los que se encuentran en la membrana citoplasmática actúan como receptores y transmiten señales a través de la misma, las que se encuentran en el citoplasma transmiten señales al núcleo [44], y dentro del núcleo se encargan del control del ciclo celular y ciertas propiedades como factores de transcripción [43].

1.4.3 Regulación

La mayoría de los receptores tirosina quinasa están activados por ligandos. Los inhibidores de las tirosina quinasa actúan a este nivel y se unen de manera no covalente a la enzima, al sustrato o los dos [45]. Después de la interacción con los inhibidores muchos de los receptores se internalizan y son digeridos por los lisosomas para ser reciclados [46]. Cuando interaccionan con el ligando son activados y envían diferentes señales por el citosol hacia el núcleo.

1.4.4 Familias

Existen 2 familias principales: las transmembrana (receptores) y las citoplasmáticas.

Dentro de los receptores tirosina quinasa (RTQ) tenemos 20 subfamilias que juegan un rol esencial en diversas actividades celulares como: el crecimiento, la diferenciación, el metabolismo, la adhesión, la motilidad y la muerte.

Los receptores están compuestos de 3 partes: una porción extracelular, que se une al ligando, una porción transmembrana y una porción intracelular, con su dominio catalítico que es capaz de unirse y fosforilar un sustrato determinado.

Cuando el ligando se une al receptor se producen cambios estructurales que permiten el contacto del ATP con el sustrato y la activación del mismo. Después de la activación de los RTQ, una cascada de señales a través del citoplasma causa una respuesta en la expresión génica a nivel nuclear. Muchos RTQ están involucrados en la oncogénesis ya sea por mutación genética, translocación cromosómica o simplemente una sobreexpresión [47]. En cualquier caso el resultado es una hiperactividad quinasa, que produce crecimiento de células tumorales sin regulación e independiente de la activación por el ligando.

1.4.5 Significación clínica

Actualmente las tirosina quinasas son importantes por su implicación en el tratamiento del cáncer.

Además de su participación en el cáncer, la moléculas tirosina quinasa modifican su función en enfermedades inflamatorias como arteriosclerosis, psoriasis, sepsis o shock séptico [44].

En los NSCLC se demostró una respuesta favorable en ensayos clínicos con gefitinib, un inhibidor del EGFR. Este inhibidor de la tirosina quinasa mejoró algunos de los síntomas en el 43% de

los pacientes y en algunos casos produjo una regresión tumoral en estudios de imágenes [48]. Otros inhibidores de la tirosina quinasa son utilizados en este tipo de tumor, por ejemplo el erlotinib, el afatinib y el crizotinib.

La leucemia mieloide crónica está asociada a la translocación BCR-ABL otro tirosina quinasa. El imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib y el ponatinib son inhibidores de la tirosina quinasa que se están utilizando en la actualidad para esta enfermedad.

1.4.6 Tumores estromales gastrointestinales (GIST)

Son tumores resistentes a la quimioterapia, sin embargo el imatinib puede ser efectivo en el tratamiento de esta enfermedad en ciertos pacientes [49]. Las células de estos tumores tienen un receptor de un factor de crecimiento de la familia tirosina quinasa llamado c-Kit, producido por un proto oncogén *c-Kit*. Incluso el imatinib demostró una reducción del 65% del tamaño de este tumor y la reducción de las metástasis hepáticas en un caso[49].

1.4.7 Otros

El sunitinib es un inhibidor de la tirosina quinasa que actúa en el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), en el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), en el receptor del factor de células madre y en el receptor del factor 1 de estimuladores de colonias [50].

El gefitinib y el erlotinib actúan en el dominio quinasa del EGFR, y puede ser usados para el tratamiento de tumores de pulmón y páncreas que presentan una sobreexpresión del EGFR.

1.5 Aspectos Generales de ALK

ALK está localizado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p23). El gen codifica un receptor transmembrana (ALK), homólogo a los receptores de insulina. Su secuencia de aminoácidos indica que es un receptor tirosina quinasa [51]. El receptor ALK es una proteína que comprende un dominio extracelular, un tramo hidrofóbico que corresponde a una región transmembrana, y un dominio quinasa intracelular. Se ha descrito una homología del 40% entre la porción extracelular del receptor y la tirosina quinasa del leucocito (LTK). La porción intracelular tiene también un 50% de homología con el receptor de insulina y sus vías de señalización e incluso con las moléculas adaptadoras de esas vías, como son el substrato del receptor de insulina (IRS-1) y el factor de crecimiento asociado al receptor GRB-2 (Figura 1). ALK desempeña un papel importante en el desarrollo del cerebro y ejerce sus efectos en las neuronas del SNC. Se expresa durante el desarrollo de tejido nervioso, central y periférico, pero no en el tejido adulto, salvo algunas neuronas, células gliales y endoteliales [52].

La actividad de los receptores tirosina quinasa depende de su expresión génica y de la unión de sus ligandos, las alteraciones

del gen pueden inhibir o estimular su acción. Uno de los principales ligandos de ALK es el factor de crecimiento pleiotropina (PTN), el cual se une al dominio extracelular del receptor interactuando con él. Existe un homólogo de PTN, la midkina (MK), que es otro ligando de ALK, aunque posee menor afinidad [53]. El patrón normal de expresión PTN y MK en el desarrollo de diferentes tejidos se superpone en cierta medida con el del receptor de ALK. Como ya se ha comentado los niveles más altos de ALK se encuentran en el SNC y periférico durante la embriogénesis, en la mitad y final de la gestación [54]. Sin embargo, en tejidos adultos normales la expresión del receptor de ALK, PTN y MK está limitada.

Es un hecho bien establecido que las vías de señalización para el desarrollo y mantenimiento de un tejido se relacionan con las vías que favorecen la progresión tumoral. Así, se ha visto aumento de expresión de ALK, PTN y MK tanto en el desarrollo normal del sistema nervioso como en cánceres de origen glial. Sin embargo, no se ha podido demostrar que el bloqueo de su expresión altere la supervivencia de embriones, aunque se producen alteraciones sutiles en la conducta, memoria y fertilidad de ratones “knockout” [55].

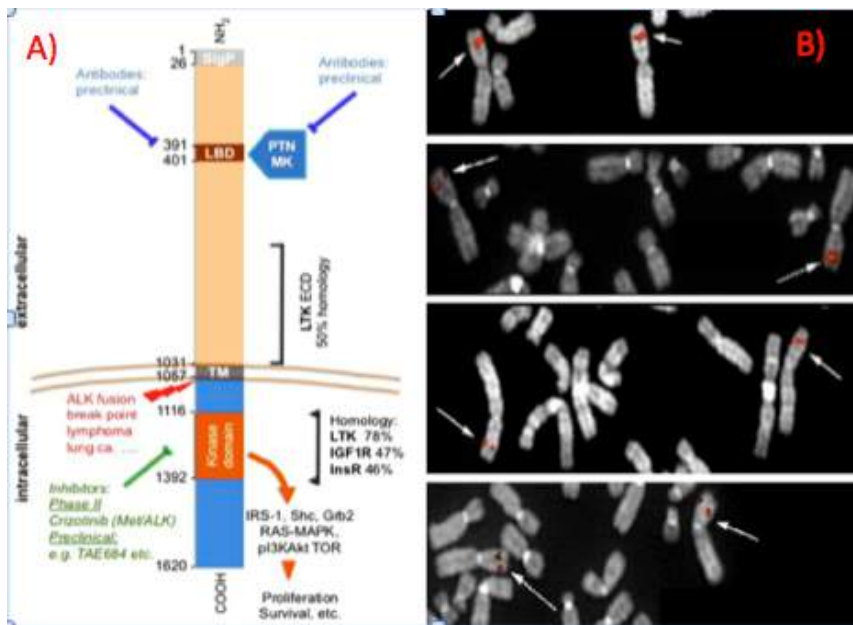


Figura 1: A) Esquema de la proteína quimérica de ALK y EML4. Se observan los dominios extracelular, transmembrana e intracelular. La homología del dominio extracelular con LTK es del 50%; para el dominio quinasa es del 78% para LTK, 47% para IGF-1R y 46% para InsR. Se muestran también las vías de señalización (RAS y PI3K/Akt) encargadas de la proliferación y supervivencia celular. En azul aparecen los anticuerpos frente a los ligandos de ALK, PTN y MK que se encuentran en estudios preclínicos. En verde los inhibidores tirosina quinasa que actúan en el dominio quinasa, como el crizotinib. B) Cariograma: la localización del gen *ALK* en el brazo corto del cromosoma 2. Imagen modificada de Wellstein [51].

Relación con el cáncer

ALK se ha encontrado reorganizado, mutado, o amplificado en una serie de tumores, incluyendo el linfoma anaplásico de células grandes (“anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase”), de ahí el acrónimo que lo define; el neuroblastoma; el tumor miofibroblástico inflamatorio (IMT)[56] y,

recientemente, el adenocarcinoma de pulmón [57, 58]. Refiriéndonos a esta última localización, se debe recordar que el cáncer del pulmón es uno de los tumores más frecuentes, con una supervivencia que no supera el 10-15%, siendo casi todos los supervivientes estadios precoces. La alta incidencia y la baja supervivencia han hecho del cáncer pulmonar un candidato estratégico al diagnóstico molecular y al ensayo de dianas moleculares terapéuticas. En este sentido una de las mutaciones con más impacto en los tratamientos biológicos fue la del gen *EGFR* y la del inhibidor de su receptor tirosina quinasa, el cetuximab. Otras alteraciones moleculares demostradas en el cáncer de pulmón se han detectado en los genes *MET*, *VEGF* (factor del crecimiento del endotelio vascular), *VEGFR* (receptor del VEGF), *KRAS*, *HER 2*, *ROS* y *RET* entre otros, todos ellos conocidos oncogenes [59]. En la actualidad se ha descrito la fusión de *ALK/EML4* por reordenamiento cromosómico en los adenocarcinomas de pulmón [60].

Los reordenamientos cromosómicos (translocaciones o inversiones) son las alteraciones genéticas más comunes demostradas en el gen *ALK*, dando como resultado la formación de múltiples genes de fusión entre los que se encuentran: *ALK/EML4* (cromosoma 2/2), *ALK/RANBP2* (cromosoma 2/2), *ALK/ATIC* (cromosoma 2/2), *ALK/TFG* (cromosoma 2/3), *ALK/NPM1* (cromosoma 2/5), *ALK/SQSTM1* (cromosoma 2/5), *ALK/KIF5B* (cromosoma 2/10), *ALK/CLTC* (cromosoma 2/17), *ALK/TPM4* (cromosoma 2/19) y *ALK/MSN* (cromosoma 2/X), (Figura 2).

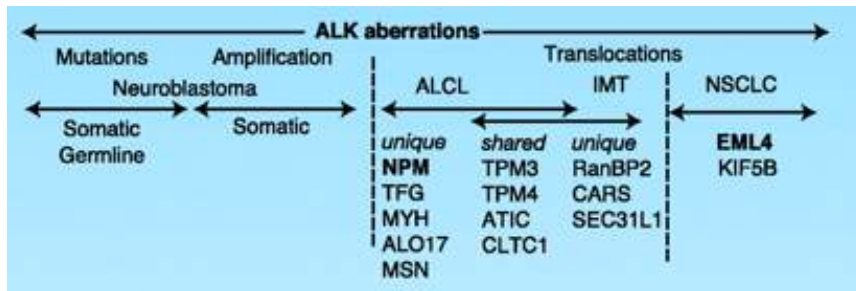


Figura 2: Representación de las diferentes aberraciones de *ALK*. Las mutaciones y amplificaciones de *ALK* son únicas en los neuroblastomas, pero se encuentran de manera muy excepcional; las translocaciones en estos tumores todavía no han sido detectadas. Imagen modificada de Mosse et al [61].

El motivo por el que *ALK* puede comportarse como oncogén y participar en la génesis tumoral se ha explicado por tres mecanismos: formando un gen fusionado con otros genes como ya se ha comentado, ganando copias adicionales del gen y por mutaciones del ADN.

Vamos a referirnos, por su mayor trascendencia, al mecanismo de fusión. La inversión del brazo corto del cromosoma 2 da como resultado la fusión de *ALK* y *EML4* que codifica una proteína involucrada en el ensamblaje de los microtúbulos. La proteína de fusión *ALK/EML4* aparece en el 3-5 % de los NSCLC, siendo la aberración cromosómica más común en el cáncer de pulmón. El gen fusionado *ALK/EML4* se observa en los NSCLC en los que se excluyen mutaciones de *EGFR* y *KRAS*, siendo la mayoría adenocarcinomas en pacientes jóvenes y no

fumadores [62]. La fusión de *ALK/EML4* se ha detectado en todos los subtipos histológicos de adenocarcinoma pulmonar, pero especialmente en los sólidos con células en anillo de sello y patrón mucinoso cribiforme [63].

El 60% de los linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL) presentan también una translocación entre el cromosoma 2 y el 5, con un gen fusionado, *ALK/NPM* (nucleofosmina).

Además, la expresión de ALK de longitud completa ha sido observada en algunos tumores de origen ectodérmico como neuroblastomas, glioblastomas, cánceres de mama y melanoma. Se evaluó la expresión de ARNm de *ALK* y *PTN* en el cerebro normal y en tumores gliales por medio de hibridación in situ, observando que los tumores de alto grado y más agresivos (glioblastoma multiforme, oligodendroglioma anaplásico) tenían mayor expresión que el tejido cerebral normal y los tumores de bajo grado [64]. Se demostró también una correlación directa entre la expresión del ARNm y ambos genes. Muchas vías celulares que intervienen en el crecimiento, proliferación celular, reestructuración de túbulos citoplasmáticos, migración celular, y por tanto, también en la oncogénesis son activadas por *ALK* [65]. Entre ellas están: RAS/ERK (quinasa regulada por señales extracelulares), JAK/STAT, PI3K/Akt y PLC gamma (fosfolipasa C gamma). La acción proliferativa de la proteína quimérica *ALK/EML4* viene determinada por la vía RAS/ERK, la supervivencia celular y los cambios en el fenotipo están mediados por JAK/STAT y PI3K/Akt y PLC gamma interviene en la señalización mitógena.

Introducción

Otras proteínas actúan también durante la señal mitógena de ALK y ejercen su acción al unirse específicamente al residuo tirosina de la porción intracitoplasmática de ALK. En este grupo se incluye IRS-1 (substrato del receptor de insulina 1), SHC y GRB2 [66].

En la oncogénesis es muy importante la activación de la vía del PI3K ya que genera una acción antiapoptótica al activar Akt, que a su vez activa y fosforila FOXO3a. Esta última proteína queda secuestrada en el citoplasma y no puede ejercer su acción de transcripción, induciendo la supervivencia celular y estimulando el ciclo celular gracias a la sobreexpresión de la ciclina D2 y al bloqueo de Bim1 y p27[67] (Figuras 3 y 4).

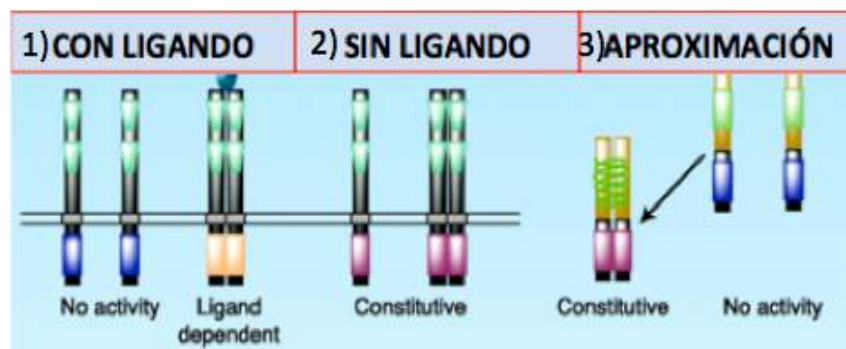


Figura 3: 1.-La unión de los ligandos al dominio extracelular y su dimerización producen la fosforilación del dominio tirosina quinasa (TQ) y a su vez activan las vías de señalización de ALK. 2.- La señalización independiente de ligandos es inducida por mutaciones que activan el dominio TQ o amplificación de ALK mediante sobreexpresión, dimerización espontánea o transactivación (incremento en la frecuencia de la expresión génica) de TK. 3.- ALK también se puede activar gracias a la fusión de los dominios TK mediante aproximación y dominios enrollados. Imagen modificada de Mosse et al [61].

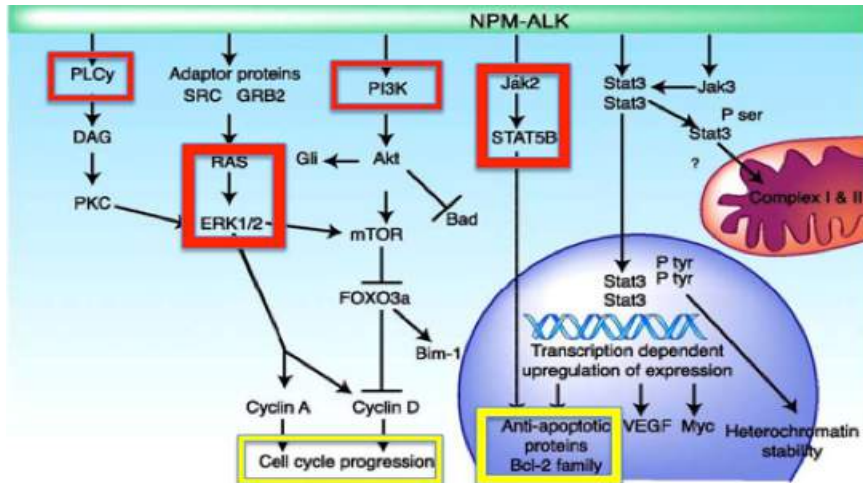


Figura 4: *ALK* induce transformación mediante sus vías y redes de señalización. Los efectos más importantes de *ALK-NPM* se producen por la activación de *JAK/STAT*, *PI3K/Akt*, *RAS/ERK* y *PLC gamma*, cuyas vías controlan la proliferación, supervivencia y el ciclo celular. Se observa la fosforilación e inactivación de *FOXO3a* y la subsiguiente activación de la ciclina *D2*. En *ALK-EML4* las vías más importantes, estudiadas hasta el momento, son *RAS/ERK* y *PI3K/Akt*. A la derecha se muestra la vía de *STAT 3* que incrementa la fosforilación oxidativa de residuos de tirosina y serina, contribuyendo así en el proceso oncogénico. Imagen modificada de Mosse et al [61].

La intercomunicación entre las células cancerosas y las células del estroma es crucial en la progresión maligna, siendo necesaria para la migración de las células tumorales, la invasión vascular, el reclutamiento de células inflamatorias y la creación y expansión metastásica en los órganos. En este sentido se estudió la expresión génica de la ruta *ALK/PTN* en los tejidos estromales, analizando el transcriptoma tumoral y el estroma normal en el adenocarcinoma de mama. Se observó un aumento significativo de la expresión de *ALK*, *LTK* y *PTN* en tejidos tumorales con relación al estroma de tejidos mamarios

sin tumor [68]. Otro estudio demostró también la sobreexpresión de LTK y PTN en el estroma del adenocarcinoma pancreático con relación a los tejidos pancreáticos normales. Todo ello parece indicar el papel importante de ALK en la progresión e invasión del cáncer.

Finalmente se ha descrito que la sobreexpresión de PTN y ALK se relacionan con peor pronóstico en tumores cerebrales a los 3 y 5 años [64, 69].

1.5.1 ALK y tumores de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello (CCC), si agrupamos todas las localizaciones, es el sexto en frecuencia a nivel mundial. En EE.UU la incidencia en el 2012 fue de 52.610 nuevos casos con 11.500 muertes. Incluye tumores malignos de diferentes localizaciones: nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, laringe y senos paranasales. El tipo histopatológico predominantemente es el carcinoma de células escamosas que se caracteriza por su agresividad local y la tendencia a las metástasis ganglionares, con una supervivencia intermedia debido a las recidivas locorregionales. En las fosas nasales y en los senos paranasales se han descrito el 3-6 % de todos los CCC de los que el 8-25% son ACNS. En estos últimos la supervivencia es baja y las recidivas frecuentes, sobre todo a nivel local (órbita, cerebro). Muchos factores como el tabaco, el alcohol, infecciones virales y predisposición genética están asociados con la etiología del CCC,

pero en los ACNS el factor predominante es la exposición al polvo de la madera.

En los últimos años han surgido muchas expectativas en referencia a la biología molecular y a las terapias biológicas dirigidas, especialmente con los inhibidores de la tirosina quinasa [70]. El ejemplo más significativo es el del *EGFR* uno de los oncogenes más estudiados en el CCC. Este gen codifica un receptor miembro de la familia de proteínas ErbB, con múltiples acciones a través de diversas vías de señalización. El cetuximab es un inhibidor biológico específico de la proteína EGFR y en la actualidad ha demostrado su utilidad clínica. Otros oncogenes también implicados en el CCC son *RAS*, *MYC*, *VEGF*, *PIK3C/Akt*, etc. Con cada nuevo descubrimiento la complejidad del cáncer se va desvelando progresivamente. Así, ha surgido una tupida red de vías metabólicas interconectadas en funciones que hasta hace pocos años se creían poco relacionadas. Esta gran cantidad de datos hace que cada vez sea más difícil atribuir a una única proteína o vía metabólica un papel preponderante en el desarrollo de esta compleja enfermedad. Las vías de señalización y los oncogenes citados, entre los que podemos incluir también *ALK*, están siendo investigados además para determinar nuevas dianas terapéuticas. Estos tratamientos dirigidos tendrían como ventajas su especificidad y escasa toxicidad [71].

Por tanto, a nivel molecular, el diagnóstico precoz y los avances terapéuticos, aunque con resultados limitados, se consideran en la actualidad más importantes que el conocimiento detallado de

todos los mecanismos de transformación y progresión. La estrategia actual frente al CCC es la de incorporar lo antes posible a la clínica aquellos marcadores biológicos que hayan probado alguna utilidad diagnóstica y terapéutica. En este contexto es en el que debemos considerar *ALK* y su inhibidor crizotinib, revisando lo hasta ahora publicado en CCC y extrapolando los resultados obtenidos en los adenocarcinomas de pulmón a los ACNS.

Sin embargo, en el CCC hay pocos trabajos que estudien el comportamiento de *ALK*.

De todos los tipos histopatológicos que integran el CCC sólo se ha podido relacionar *ALK* con dos extirpes tumorales poco frecuentes como son el pseudotumor inflamatorio y el rhabdomyosarcoma, donde se ha descrito la sobreexpresión simultánea de *ALK* y Ki 67 [72] [73].

Hasta el momento no se ha descrito expresión de *ALK* ni en tumores de células escamosas ni en adenocarcinomas, menos aún en ACNS, aunque como ya hemos comentado sí se ha demostrado su positividad en adenocarcinomas de pulmón.

El ***pseudotumor inflamatorio*** de cabeza y cuello o tumor miofibroblástico inflamatorio (IMT) es una neoplasia constituida por células fusiformes mesenquimatosas miofibroblásticas, infiltrados plasmocíticos, linfocitos y eosinófilos. Se desarrollan sobre todo en pulmón, tejido blando y vísceras de niños y jóvenes. En su evolución se caracterizan por recidivar frecuentemente aunque son muy raras las metástasis. En cabeza y cuello se han descrito

aproximadamente el 8% de todas las localizaciones de IMT [74], con un peor pronóstico cuando ALK está sobreexpresado a nivel citoplasmático, hecho que ocurre en el 56% de los pacientes [72]. En los IMT se ha encontrado una aberración clonal citogenética en el gen *ALK* localizada en el brazo corto del cromosoma 2 (2p23) que podría tener relación con el pronóstico y la evolución de la neoplasia.

El tratamiento principal del IMT es la cirugía, pero se ha visto la utilidad de la terapia biológica con anticuerpos frente al factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), además de corticoides, antiinflamatorios, radioterapia a bajas dosis o quimioterapia. Recientemente los pacientes que expresaban *ALK* fueron tratados con crizotinib con respuesta parcial durante 6 meses al disminuir el tamaño de la lesiones entre el 40-53% [75].

El otro tumor donde se estudio *ALK* en la región de cabeza y cuello es el ***rabdomiosarcoma***, que es el sarcoma más frecuente en niños menores de 15 años. La clasificación internacional más utilizada lo divide en embrionario, alveolar y pleomórfico. Se ha demostrado la expresión de *ALK* en los rabdomiosarcomas es del 19%, siendo el 67% de ellos del subtipo alveolar [73, 76].

1.5.2 Métodos de detección

Para detectar la reestructuración del gen *ALK* en muestras celulares o histopatológicas, en cualquiera de las variedades de genes de fusión descritos anteriormente, los procedimientos

que se pueden utilizar son: inmunohistoquímica (IHQ), hibridación fluorescente in situ (FISH) y reacción de la cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). El manejo del tejido, su procesamiento y sección deberían estar estandarizados para optimizar su utilidad, especialmente en estudios moleculares de tinción y basados en PCR.

La **IHQ** tiene algunas ventajas frente a FISH y RT-PCR entre las que destacan su costo, rapidez y el que se trata de una técnica habitual, fácil de integrar en un protocolo de diagnóstico clínico. Las limitaciones de la IHQ son las propias de la técnica ya que precisa preparar el tejido, elegir un anticuerpo válido, mejorar la señal obtenida y medir los valores de tinción por un procedimiento cualitativo o semicuantitativo.

La **FISH** es una técnica relativamente antigua que nos informa sobre zonas específicas de un determinado cromosoma. Consiste en utilizar una sonda de ADN normal de secuencia conocida, marcada con fluorescencia, que hibrida sobre la muestra problema, revelando la posición de dicha zona en el cromosoma. Las sondas pueden marcar cromosomas completos, centrómeros, telómeros, regiones específicas e incluso genes. Es posible realizar la técnica sobre metafases o sobre núcleos en interfase, evitando los cultivos celulares y la preparación de las metafases. Así, se puede identificar una situación normal con dos señales de hibridación (eusomía) o una señal alterada (aneusomía), que podrá tener una única

señal de hibridación (monosomía) o varias señales (polisomía)[28].

En la actualidad el único test validado clínicamente es Vysis/Abbott ALK FISH, que está diseñado para tejido fijado con formalina y embebido en parafina [77]. Para que el test tenga mayor rendimiento debería disponerse de una muestra tumoral de tamaño suficiente, seleccionando en ella las zonas con mayor celularidad, para evitar falsas interpretaciones por la heterogeneidad tumoral [77].

La mayoría de estudios clínicos publicados para detectar las reestructuraciones de *ALK* han utilizado FISH. En EE.UU la prescripción de crizotinib como terapéutica se hace dependiendo de la positividad de esta prueba. Existen ciertos desafíos en cuanto a la técnica, como por ejemplo las separaciones sutiles de los fragmentos con tinciones fluorescentes de color rojo de los de color verde, que indican la reestructuración del gen *ALK/EML4* positivo, que en estos casos puede ser difícil de determinar [63].

La **RT-PCR** es una técnica con mucha sensibilidad que detecta un número pequeño de copias de ARN. Su especificidad es alta para *EML4/ALK* utilizando ARNm o ADNc. No tiene los problemas de interpretación de los otros métodos y por tanto se utiliza como prueba objetiva para comprobar tanto FISH como IHQ [78].

Sin embargo, tiene algunas desventajas por lo que no puede ser considerada como prueba estándar. Necesita una muestra con buena calidad y con preservación criogénica. Son necesarios

además múltiples sistemas de detección de las variantes del gen y, además, la PCR solo puede cuantificar alteraciones conocidas [79].

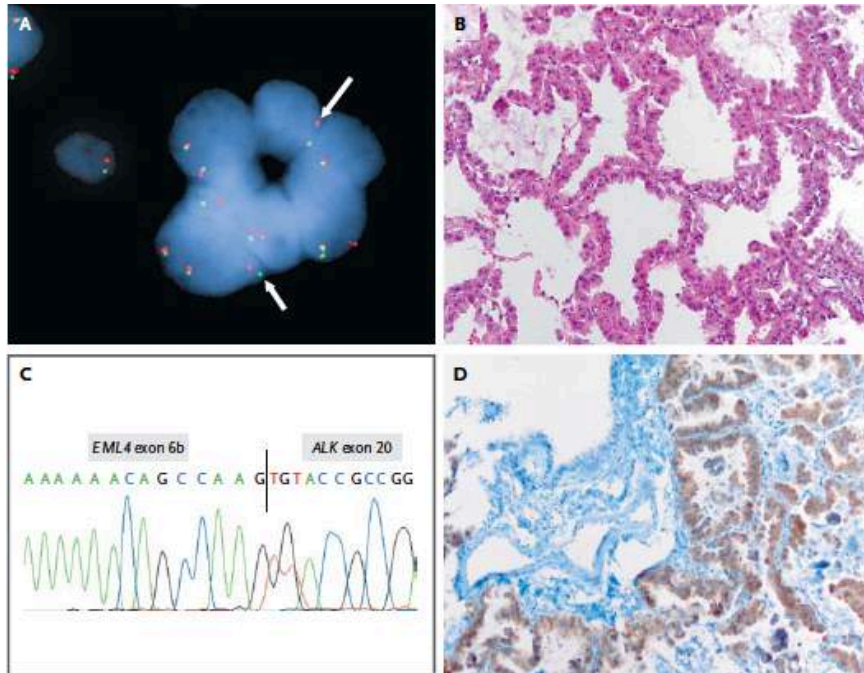


Figura 5: Estudio diagnóstico en un paciente con adenocarcinoma pulmonar *EML4-ALK* positivo. A) Técnica de FISH donde se observa el reordenamiento de gen *ALK*. La sonda verde hibrida hasta la región 5' y la sonda roja hasta la región 3'. La separación de las señales roja y verde marcadas con la flecha indica el reordenamiento cromosómico. Una superposición de las dos señales indica una copia intacta de *ALK*. B) El mismo tumor observado con microscopio de luz (hematoxilina-eosina). C) Secuencia representativa de *EML4-ALK* en un electroferograma de RT-PCR. Se especifica la secuencia de unión del exón 6b de *EML4* y el exón 20 de *ALK*. D) Estudio inmunohistoquímico de la expresión de la proteína quimérica *ALK* en células tumorales (color pardo) sin expresión en el epitelio bronquial normal (diaminobenzidina, azul). Imagen tomada de Kwak et al [1].

Por último, en este apartado referente a las técnicas de detección es importante hacer una referencia al coste económico de los procedimientos mencionados. El coste estimado para el estudio de *ALK* sería de 1400\$ por cada test de FISH, 875\$ para RT-PCR y 600\$ para la IHQ, esto teniendo en cuenta los diferentes seguros médicos, costos del personal y costo de la técnica, no se incluye el costo de la adquisición del tejido. [80].

1.5.3 Aplicaciones terapéuticas

En el 2007 se describió *ALK* como diana terapéutica para un subtipo de NSCLC. El crizotinib es un inhibidor específico de *ALK*, al bloquear el receptor tirosina quinasa. Este fármaco fue aprobado por la FDA de EE.UU en agosto de 2011 de manera simultánea a la aceptación de la técnica de detección del gen por FISH [81].

El crizotinib (PF-02341066) fue descubierto y presentado como un inhibidor de la quinasa c-Met. Su mecanismo de acción consiste en ser un inhibidor de quinasa competitivo con el ATP. Se describió que inhibía otras quinasas, demostrando su efectividad frente a *ALK* por medio de líneas celulares que sobreexpresaban ese receptor [82].

Se realizaron estudios preclínicos que mostraban la efectividad de crizotinib en pacientes con NSCLC. Estos estudios se realizaron en más de 600 líneas celulares derivadas de cánceres humanos y demostraron una disminución en la proliferación en

aquellas células que contenía alteraciones genéticas en *ALK*, promoviendo de esta manera el uso del crizotinib como un fármaco diana contra *ALK* [83].

Subsiguientemente se seleccionaron los pacientes *ALK*-FISH positivos para un estudio clínico en fase 1, obteniendo unos datos preliminares muy prometedores [84]. El estudio clínico completó las fases 1 y 2, seleccionando sólo a pacientes con NSCLC que eran *ALK*-FISH positivos. Se estudiaron unos 1.500 pacientes con FISH, identificando 82 (*ALK* positivos) de los cuales 79 (96%) fueron adenocarcinomas, todos ellos, idóneos para el estudio de cohorte. La mayoría de los pacientes habían recibido tratamiento previo, más de la mitad de manera intensiva. Los resultados obtenidos mostraron que 46 pacientes (56%) tenían respuesta parcial, 1 paciente tenía respuesta completa y 27 (33%) estabilizaban la progresión de la enfermedad. Por tanto, podemos decir que se producía control de la enfermedad en aproximadamente el 90% de los pacientes (Figura 6). El cálculo de la supervivencia libre de progresión a los 6 meses se estableció en el 72% [1].

En este estudio la administración de crizotinib se hizo por vía oral a una dosis estándar 250 mg dos veces al día, en ciclos de 28 días. El coste aproximado de un tratamiento mensual estaría entre 1000\$ y 5000\$ dependiendo del seguro de salud de cada paciente.

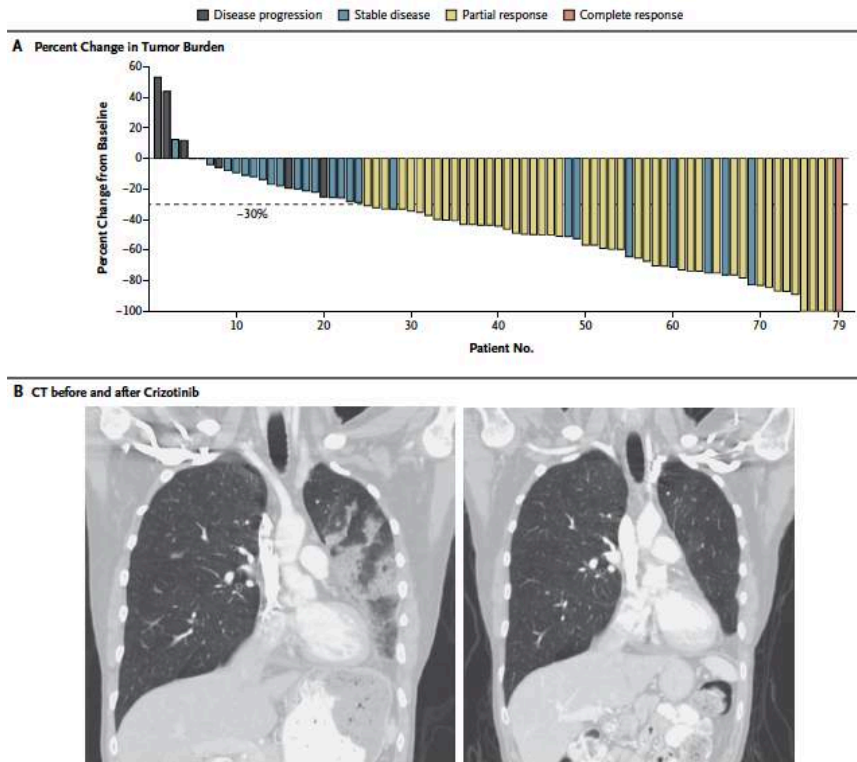


Figura 6: Respuesta con crizotinib. A) Se compara la respuesta de los pacientes *ALK* positivos tratados con crizotinib. En el eje x se indica el número de los 79 casos estudiados. Cada histograma representa sobre el eje y el cambio del tamaño del tumor tras el tratamiento. En la leyenda se diferencian por colores los tipos de respuesta (parcial, completa), la enfermedad estabilizada o en progresión. B) En una TAC coronal se muestran los resultados del paciente 79 (respuesta completa), antes del tratamiento (izquierda) y tras 2 ciclos de crizotinib (derecha). Previamente el paciente había sido tratado con una lobectomía inferior izquierda. Imagen tomada de Kwak et al. [1].

Desafortunadamente, la resistencia a este fármaco se desarrolla después de un beneficio inicial, a través de una variedad de mecanismos que preservan o no el dominio de *ALK* en la carcinogénesis. La distinción entre los pacientes que conservan el dominio *ALK* (mutaciones secundarias únicas o en combinación con amplificaciones de *ALK*) con los pacientes que han disminuido el dominio de *ALK* (otros drivers oncogénicos,

con o sin persistencia de la señal de ALK) es importante con el fin de superar la resistencia. Inhibidores de ALK de segunda generación están actualmente en desarrollo con resultados clínicos prometedores [85].

Además, se están investigando otros fármacos dirigidos a diferentes dianas terapéuticas (Figura 7).

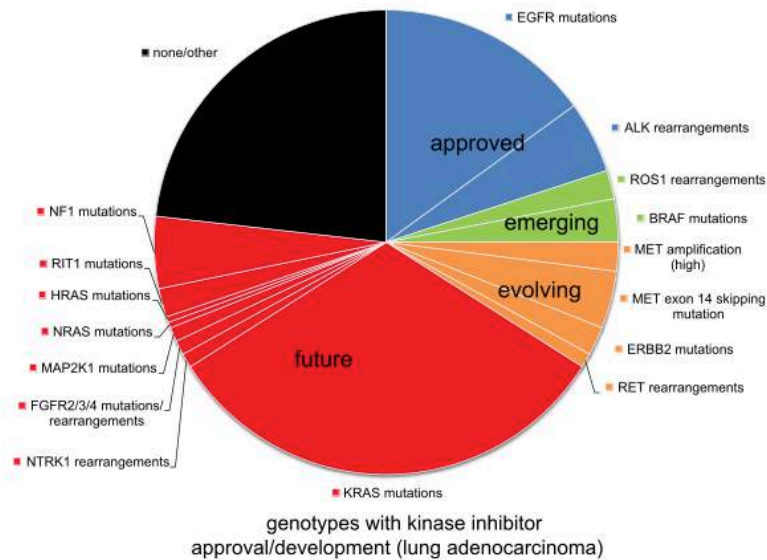


Figura 7: Dianas terapéuticas e inhibidores de la tirosina quinasa en adenocarcinomas de pulmón. Imagen tomada de Shea et al. [86]

1.6 Aspectos Generales de RET

El Gen

El proto oncogén *RET* codifica el RTQ, que es miembro de una familia de proteínas de señalización extracelular [87]. La mutación y pérdida de función de este gen está asociada al desarrollo de la enfermedad de Hirschsprung mientras que las mutaciones que producen el aumento de función de este gen

están relacionadas con algunos tumores incluyendo: el carcinoma medular de tiroides, las neoplasias endócrinas múltiples (MEN) 2A y 2B y el feocromocitoma. Se encuentra localizado en el cromosoma 10 y contiene 21 exones. Cumple una actividad fundamental en el desarrollo de los riñones y del sistema nervioso gastrointestinal.

El receptor tirosina quinasa

El receptor tirosina quinasa es una estructura dimérica que pertenece a la familia del factor neurotrópico derivado de la línea celular glial (GDNF) [87]. Es un receptor de la familia de ligandos asociados a GDNF, (GFL) [88].

Para la activación de RET, GFL se une activamente con un co-receptor y estos co-receptores son específicos para esta familia de RTQ [89]. Después de esta unión se forma un complejo que une las moléculas de RET y produce la fosforilación de los residuos de tirosina en cada una de las moléculas.

1.6.1 RET y tumores de cabeza y cuello

Dentro de los tumores de cabeza y cuello se ha estudiado RET en tumores de tiroides. La activación de mutaciones puntuales en *RET* puede dar lugar al síndrome de cáncer hereditario conocido como neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2)

[11] Hay tres subtipos basados en la presentación clínica: MEN 2A, MEN 2B y carcinoma medular de tiroides familiar (FMTC) [90]. No existe un alto grado de correlación entre la posición del punto de mutación y el fenotipo de la enfermedad.

Reordenamientos cromosómicos que generan un gen de fusión y como resultado la reestructuración del receptor RET también pueden conducir a la activación constitutiva del dominio quinasa. Estos tipos de mutaciones se asocian con carcinoma papilar de tiroides (PTC), y las oncoproteínas de fusión generadas se denominan proteínas RET / PTC. Últimamente se han asociado translocaciones en RET con los adenocarcinomas de pulmón y cánceres colorectales [91].

1.6.2 Métodos de detección

Con el descubrimiento de que MEN 2A, MEN 2B y FMTC son causados por mutaciones en el protooncogén *RET*, el análisis directo de ADN se convirtió en el método de elección para su identificación. Aunque en estudios experimentales se sigue utilizando la IHQ.

Casi todos los laboratorios utilizan análisis de la secuencia directa para evaluar las mutaciones en los exones 10, 11, 13, 14, 15, y 16, y algunos laboratorios incluyen exón 8. Si no se encuentran mutaciones en estos exones, la región codificante entera de *RET* puede ser secuenciada [92].

1.6.3 Aplicaciones terapéuticas

Como un ejemplo de la importancia de los oncogenes y las tirosina quinasas, las alteraciones en *RET* en el cáncer medular de tiroides están asociadas a la activación constitutiva del dominio quinasa independiente de ligando.

La inhibición del oncogén *RET* por un ITQ previene la proliferación y la tumorigenicidad de células de cáncer de tiroides [93].

Todavía no se determina con precisión si el beneficio se da por la acción directa en *RET* o en múltiples RTQ, por lo que actualmente la inhibición de múltiples quinasas es el primer enfoque terapéutico [94] (figura 8).

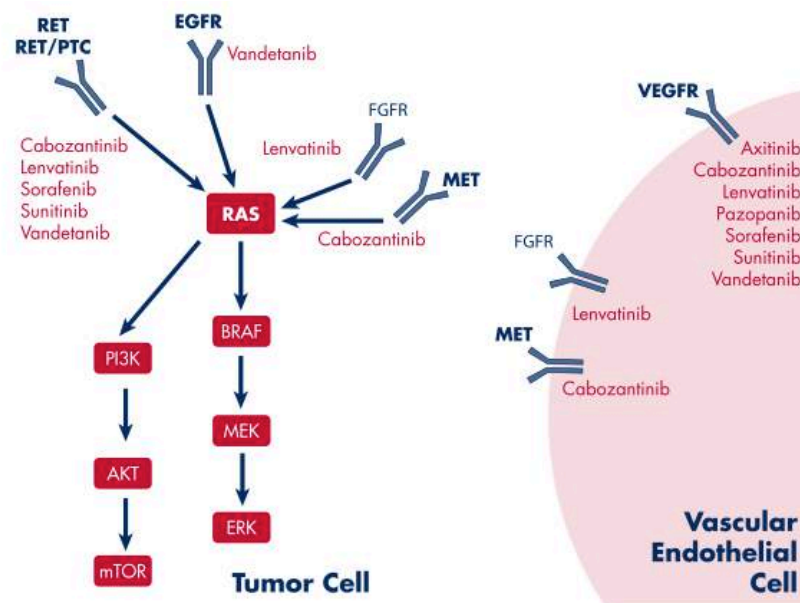


Figura 8: Vías de acción de los inhibidores de los receptores tirosina quinasas. Imagen tomada de Haugen et al [95].

1.7 Aspectos Generales de ROS

El gen *ROS* fue descubierto por primera vez en 1986, cuando un clon de ADN recombinante del virus del sarcoma aviar (UR2) fue aislado de un ADN genómico de pollo [96]. El virus del sarcoma aviar es un retrovirus que codifica una proteína de fusión, P68gag-ROS, que tiene actividad quinasa específica [97]. El oncogén, v-ROS, de UR2, lleva un dominio quinasa que es homóloga a las presentes en los oncogenes de la familia src (una familia tirosina quinasa) [98].

Los primeros informes han indicado que la secuencia de aminoácidos deducida del dominio quinasa de ROS es altamente homóloga a la del dominio de quinasa del receptor de insulina humana (HIR) similar a ALK [99]. Sin embargo, se demostró más adelante, que las secuencias de aminoácidos en los dominios quinasa de estos dos RTQ son muy diferentes. El nivel de homología en la secuencia de aminoácidos en los dominios quinasa de ROS y HIR se encontró que era solamente de un 48% [100]. Por otra parte, la estructura general del gen *c-ROS* mostró que la proteína codificada lleva un dominio extracelular con un potencial sitio de glicosilación, un tramo hidrófobo, y un dominio tirosina quinasa. Estas organizaciones estructurales son similares a las de la *c-ErbB* (el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico), el *c-Fms* (el gen del receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos) y el gen HIR

[100]. Estos resultados sugieren fuertemente que el gen *ROS* humano codifica para una molécula transmembrana que puede funcionar como un receptor para el crecimiento celular o la diferenciación celular. El análisis de la secuencia del gen *c-ROS* indicó una homología entre el dominio extracelular *ROS* y del dominio extracelular del producto del gen *sevenless* de la *Drosophila melanogaster*. *Sevenless* es un gen requerido para el desarrollo normal del ojo en la mosca de la fruta la *Drosophila melanogaster* [101].

Expresión y Función

El RTQ *ROS* muestra un perfil de expresión específico en distintas células epiteliales durante el desarrollo embriológico [102].

Cuando *c-ROS* fue primero aislada del genoma de pollo, se analizaron los tejidos en diferentes fases de desarrollo, pero sólo en los riñones se encontró un nivel significativo [103]. Poco después del primer aislamiento de *c-ROS* en el pollo, la expresión del gen *c-ROS* se examinó en ratas y se encontró que se expresa en el tejido de los pulmones, los riñones, el corazón y testículos [104].

También se determinó el patrón in vivo de la expresión de *ROS* en ratones observándose expresión durante el desarrollo en 3 tejidos: los riñones, los pulmones y el intestino [105].

Un reciente análisis en diversos órganos humanos demostró que la expresión más alta de *ROS* se encontraba en los

pulmones. También fue detectado en la placenta y en el músculo esquelético [106].

El patrón de expresión de *ROS* en diferentes órganos sugiere que puede jugar un papel en las funciones de maduración de estos órganos más allá de la función de desarrollo.

El proceso de conversión de un proto-oncogén normal a un oncogén implica reorganización ya sea por mutación o degradación [100].

El gen *c-ROS* humano se correlaciona con el cromosoma humano 6q16- 6q22 [107].

Los reordenamientos cromosómicos ocurren en neoplasias específicas, incluyendo la leucemia linfoblástica aguda, el melanoma maligno y en carcinomas de ovario.

Mutaciones y sobreexpresión del gen *c-ROS* se encontraron principalmente en los cánceres de cerebro y de pulmón, además de cáncer de estómago, fibroadenomas de mama, cáncer de hígado, colon y cánceres de riñón [100]. Últimamente se determinó, al igual que ALK y RET, translocaciones de ROS en adenocarcinomas de pulmón.

1.7.1 ROS y tumores de cabeza y cuello

Se han demostrado reordenamientos de *ROS* en líneas celulares humanas de glioblastoma [108] y en IMT. Según nuestro conocimiento no existen otras publicaciones en la bibliografía de alteraciones en ROS en los tumores de cabeza y cuello.

1.7.2 Métodos de detección

Los métodos de detección son el análisis genético de ADN, especialmente técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS), secuenciación de ARN e inmunohistoquímica [109].

1.7.3 Aplicaciones terapéuticas

En 2007 se identificó un reordenamiento de *ROS* en una línea celular derivada de un paciente con adenocarcinoma de pulmón [110]. Desde este descubrimiento, múltiples estudios han demostrado: una incidencia de aproximadamente 1% en los cánceres de pulmón y que la inhibición de las células tumorales que llevan reordenamientos de *ROS* por crizotinib y otros inhibidores de tirosina quinasa *ROS1* son eficaces in vitro [111]. Estudios preclínicos y ensayos clínicos de crizotinib sugieren múltiples mecanismos potenciales de resistencia a los medicamentos en el cáncer de pulmón *ROS* +, incluyendo mutaciones en el dominio quinasa y la derivación de señalización a través de *RAS* y *EGFR* [112-114]. Aunque los ensayos preclínicos y clínicos de fusiones de *ROS* se han realizado en el cáncer de pulmón, otras fusiones de *ROS* se han detectado en varias histologías tumorales, incluyendo el carcinoma de ovario, el sarcoma, los colangiocarcinomas y otros[115].

En base a los datos, el crizotinib y otros inhibidores de *ROS* podrían ser eficaces en otras histologías de tumor, más allá del

cáncer de pulmón, como se ha demostrado en un paciente con un tumor miofibroblástico inflamatorio que alberga una fusión de *ROS* y que presentó una respuesta excelente al crizotinib [109].

2 HIPÓTESIS

Partimos de la siguiente hipótesis:

“Los inhibidores de la tirosina quinasa han obtenido buenos resultados en el tratamiento de los adenocarcinomas de pulmón avanzado que albergan translocaciones en ALK, RET y ROS.

La similitud histopatológica de estos tumores con los adenocarcinomas nasosinuales sugiere que se podría aplicar la misma estrategia diagnóstica y terapéutica para mejorar la supervivencia y controlar la enfermedad en los pacientes con ACNS”.

3 OBJETIVOS

General:

- Estudiar la expresión proteica y las mutaciones de los genes y proteínas tirosina quinasa en los ACNS.

Específicos:

1. Estudiar las características clínico patológicas de los ACNS de nuestra serie.
2. Identificar la expresión de ALK y de la proteína quimérica ALK-EML4 en los ACNS.
3. Identificar la expresión de RET en los ACNS.
4. Identificar la expresión de ROS en los ACNS.
5. Estudiar las mutaciones en los genes *ALK*, *RET* y *ROS*.
6. Estudiar los inhibidores de la tirosina quinasa en líneas celulares de ACNS.

4 MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Selección de pacientes. Diseño del estudio.

Se estudiaron las muestras de un total de 150 pacientes con ACNS tratados en nuestro servicio entre 1990 y 2015. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes, siendo aprobado el estudio por el comité ético del hospital.

Todos los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente. Los criterios de inclusión para la composición de la muestra fueron los siguientes: 1) No haber recibido radio o quimioterapia preoperatoria antes de obtener las muestras tisulares. 2) Tener un historial clínico completo así como un estudio histopatológico que confirme el diagnóstico de ACNS. 3) Disponer de material tisular suficiente para realizar estudios genéticos o de expresión.

Todos los pacientes mantenían un historial clínico completo en los archivos y documentación del HUCA, así como un estudio histopatológico que confirmaba el diagnóstico de ACNS tipo ITAC. Se analizaron las características clínico patológicas de 150 casos, en 96 casos se disponía de material anatomopatológico suficiente para realizar FISH e IHQ, en 48 casos se disponía de material anatomopatológico suficiente para realizar la

secuenciación y 34 casos fueron descartados de los TMA y el panel de secuenciación por no cumplir los criterios de inclusión.

Además en la línea celular de ITAC desarrollada en el laboratorio de IUOPA se estudiaron los inhibidores de la tirosina quinasa, crizotinib y vandetanib.

El estudio realizado es de tipo experimental, retrospectivo.

4.2 Inmunohistoquímica (IHQ)

4.2.1 Fundamentos de la técnica

La IHQ es un procedimiento histopatológico que se basa en la unión antígeno anticuerpo. El anticuerpo utilizado es marcado con una enzima. Aplicado a un tejido orgánico, el anticuerpo se une al sustrato y se aprovecha de la actividad enzimática para visualizar esta unión. Se aplica en tejido orgánico, correctamente fijado e incluido en parafina, mediante la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa antiperoxidas, fluoresceína, etc).

Esta técnica permite identificar la localización tisular o citológica de una sustancia específica como por ejemplo: marcadores antigénicos, receptores de membrana y proteínas secretadas por la estimulación celular.

4.2.2 Pasos de la técnica

Se dispusieron las muestras tumorales obtenidas en los 96 casos de ACNS (ITAC) sobre 4 bloques de parafina con 2 ó 3 cilindros de 1 mm² por caso (“tissue-array”).

El tejido se coloca en un bloque de parafina denominado “receptor” en el que se disponen de forma matricial un gran número de cilindros. La técnica permite realizar, además de IHQ, otros procedimientos como ISH y FISH. Su principal ventaja es la reducción del tiempo total empleado así como su menor consumo de tejido y coste de material. Los inconvenientes incluyen el tamaño reducido de la muestra de estudio, la rotura del bloque, su tinción heterogénea, la pérdida de cilindros, la ausencia de tinción en algún cilindro y la selección incorrecta del tejido [34].

Los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina se cortan en secciones de 3 µm que son adheridas a portas siliconizados (Dako® S2024), dejando en estufa a 56-58 °C al menos 2 horas y hasta 18 horas como máximo.

Después, se realiza el desparafinado de las muestras con Xilol, hidratando con alcoholes de graduación decreciente. A continuación, se efectúa el desenmascaramiento antigénico con una solución recuperadora de antígenos en el Ptlik de Dako® a

95 C° durante 20 minutos, manteniendo las preparaciones dentro de la solución recuperadora de antígenos hasta que baje la temperatura a 60 C°. Posteriormente, se colocan las preparaciones en un recipiente que contenga un buffer de lavado.

A partir de este paso, la técnica se realiza en el inmunoteñidor “Autostainer plus” (Dako®). En primer lugar se introducen las muestras en un buffer de lavado y en una solución bloqueante de peroxidasa durante 5 minutos. Se añade el anticuerpo monoclonal primario dirigido hacia la proteína que deseamos detectar durante un tiempo variable, según el tipo de anticuerpo utilizado.

La inmunodetección fue realizada con el sistema “EnVision Plus anti- mouse” empleando como substrato el cromógeno diaminobenzidina (DakoCytomation).

Un paso clave para que los resultados sean reproducibles, comparables y de una calidad óptima, es la elección del método de detección. En nuestro estudio, se ha utilizado el sistema de polímeros de dextrano “EnVision™ Plus (PDE)” (Dako®). El sistema EnVision™ Plus es una técnica de tinción desarrollada en dos pasos en la que al anticuerpo primario le sigue un polímero conjugado. Este polímero de alto peso molecular es el dextrano, al que se conjugan de manera covalente un gran número de moléculas de la enzima (por ejemplo la peroxidasa de rábano) y del anticuerpo secundario. Este sistema aumenta la sensibilidad, lo que permite incrementar las diluciones del

anticuerpo primario y produce menos fondo que las técnicas tradicionales de avidina-biotina.

En el siguiente y último paso se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante un minuto. Tras la tinción, las preparaciones se deshidratan mediante alcoholes de graduación ascendente y se montan con un cubreobjetos.

4.2.3 Tipos de reactivos

Como se ha comentado anteriormente nuestro estudio se dirigió a la detección de los receptores de membrana ALK, RET y ROS por lo que se utilizaron en cada caso los siguientes reactivos:

- ALK: (anti-CD246): Clon ALK 1 (Ratón monoclonal). Sistema: DAKO, pretratamiento: pH 6, prediluido, tiempo de incubación 20 minutos.
- RET: clon HPA008356 (Conejo policlonal). Sistema: Sigma, pretratamiento: pH9, dilución 1:500. Tiempo de incubación 10 minutos.
- ROS: clon D4D6 (Conejo monoclonal). Sistema: Cell Signaling Technology, pretratamiento: pH 9, dilución 1:500. Tiempo de incubación 10 minutos.

4.2.4 Interpretación de datos

Después de una selección de casos óptimos para la IHQ, se realizó este estudio en 96 casos. Los resultados de la IHQ fueron

valorados por dos patólogos familiarizados con la morfología de los ITACs, sin el conocimiento de datos clínico-patológicos.

Las tinciones fueron clasificadas de forma separada, discutiendo aquellos casos en que la valoración fue discordante para llegar a un consenso.

Se utilizó una escala de medida semicuantitativa de 0, (+), (++) y hasta (+++). Se valoró el porcentaje de células teñidas, en la membrana citoplasmática. 0 0%, (+) de < de 25% , (++) de 25% a 50% y (+++) > de 50%.

Agrupamos 0 y (+) como un resultado negativo de expresividad y (++) y (+++) como resultado positivo de expresividad.

4.3 Técnica de FISH

Al igual que en la IHQ se utilizaron muestras de tejido tumoral colocadas en un "tissue-array", cuya preparación se describió previamente.

4.3.1 Preparación de la muestra

Las muestras habían sido fijadas previamente en formol al 10%, embebidas en parafina, cortadas en secciones de 4 µm y dispuestas en portaobjetos (Dako K8020). Los cortes se adhirieron al cristal mediante calentamiento en estufa a 56-58°C. Los cortes se desparafinaron mediante inmersión en xylol a temperatura ambiente durante 10 minutos y dos lavados posteriores de 5 minutos en etanol al 100%. Posteriormente se introdujeron las muestras en concentraciones decrecientes de

etanol al 80% y al 70%, durante 5 minutos cada una, para seguidamente lavarlas con agua destilada durante 40 a 60 minutos. A continuación se sumergen las preparaciones en una jarra Coplin con ácido clorhídrico 0,2N durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se lavan con agua destilada durante 3 minutos.

4.3.2 Pretratamiento

Consiste en adecuar las muestras para poder llevar a cabo una buena hibridación. Está basado en la digestión proteica de las secciones para facilitar tanto la desnaturalización del ADN como el acceso de la sonda al núcleo celular. Se utilizó el Kit de pretratamiento de DakoCytomation, Glostrup, Denmark.

- **Preparación del tejido.** Se colocan los portas con las muestras desparafinadas y lavadas con etanol en una solución de tiocianato de sodio al 8% a 80°C durante 30 minutos manteniendo la temperatura. A continuación se lavan los portas con el tampón 2xSSC durante 3 minutos a temperatura ambiente.

- **Digestión.** Se prepara en una jarra Coplin una solución de trabajo de pepsina al 10% y se calienta a 37°C durante al menos 30 minutos antes de meter las muestras. Inmediatamente después, se sumergen las preparaciones en la solución de pepsina, calentándola a 37°C, durante 10 minutos. Tras la digestión, las preparaciones se lavan en 2xSSC durante 5 minutos, se deshidratan en 70%, 80% y 100% de etanol a

temperatura ambiente durante 3 minutos cada vez y, finalmente, se dejan secar al aire.

4.3.3 Hibridación

Para la técnica específica de FISH se utilizó la sonda LSI ALK Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (ref. nº 30-190069), Vysis, Abbott Científica SA, Madrid, España. La sonda llamada “break apart” está diseñada para detectar una rotura cromosómica en 2p23 donde se localiza el gen *ALK* como se indica en la figura 9. Esta rotura puede indicar la inversión (2;2) o la translocación t(2;5) por ejemplo.

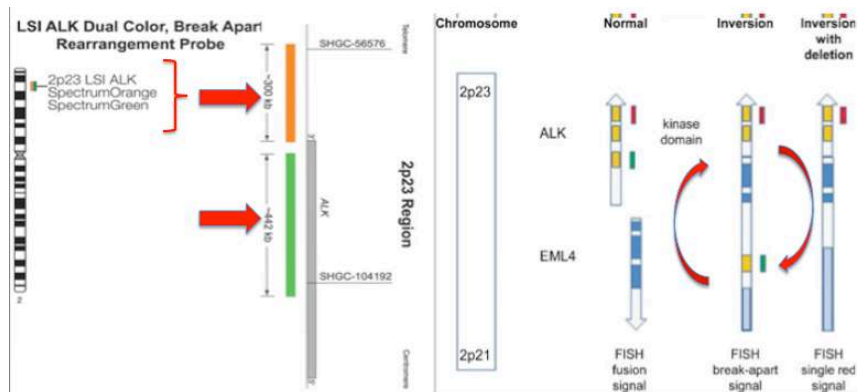


Figura 9: Se observa el cromosoma 2 (izquierda) y luego de manera ampliada el brazo corto del cromosoma 2, con la región 2p23. La sonda naranja, con una longitud de 300 Kb. que se dirige hacia la porción 3' de *ALK* y la sonda verde con 442 Kb. que va hacia la región 5' de *ALK*. A la derecha se objetiva el proceso de separación de las dos señales tanto por inversión como por inversión y delección en 2p23 [77].

La sonda se precalienta a 37°C durante 5 minutos. Se colocan 10 µl de la sonda en un tubo dependiendo de la superficie a hibridar.

La sonda se dispone sobre la muestra del tejido y se cubre con un cubreobjetos de cristal. El conjunto se coloca en una placa térmica a 75°C durante 10 minutos. De ahí, tras envolver el porta en parafilm, se pasa a una cámara húmeda donde se incuban a 37°C durante 16 horas. Se retiran los cubreobjetos sumergiendo los portas en una solución de lavado posthibridación a temperatura ambiente y, posteriormente se lava a 75°C en la solución de lavado precalentada durante 2 minutos. Finalmente se lava sumergiendo en un Coplin las preparaciones en agua destilada, a temperatura ambiente y se deja secar a oscuras.

4.3.4 Análisis por microscopía

Las preparaciones se tiñen con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, 350ng/mL) disuelto en AntiFade (Vectashield, Vector Laboratories) y se observan al microscopio óptico equipado con luz fluorescente y dotado de los filtros adecuados. Se utilizó un Olympus BX-61, con filtros para DAPI, SpectrumGreen (verde) y SpectrumOrange (rojo).

Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de ORL del IUOPA. Durante el análisis se observaron los núcleos de cada una de las muestras utilizando el microscopio de fluorescencia, equipado con DAPI, espectro verde, espectro naranja y un filtro

doble, empleando lentes de aumento entre 60 y 100x y aceite de inmersión. El espectro naranja es la llamada sonda o señal roja, terminología utilizada en la mayoría de las publicaciones.

Se hizo un análisis detallado de los núcleos con buena calidad de hibridación, de manera consecutiva, ajustando el enfoque del microscopio a cada núcleo para identificar correctamente todas las señales presentes.

Siguiendo las recomendaciones empleadas en otras publicaciones consideramos que las células son *ALK*-FISH positivas cuando una señal verde y una roja tienen por lo menos una distancia de 2 diámetros de la señal más grande, sea ésta roja o verde. La separación de las sondas de diferente color indica fusión por inversión. También se considera *ALK*-FISH positivo cuando hay sólo una señal roja sin su correspondiente señal verde, lo que indica fusión del gen por inversión y delección.

Hay que tener en cuenta que una señal verde sin su correspondiente señal roja es indicativa de *ALK*-FISH negativo, por lo que la señal roja es la que localiza el dominio tirosina quinasa.

Además, un incremento en el número de copias de *ALK*, con señales fusionadas, concuerda con una polisomía del cromosoma 2 ó una amplificación de *ALK* pero no con una reorganización del gen.

La muestra será positiva, si más de 25 células o más del 50% de células, del total de la muestra, son positivas. Una muestra se considera negativa, si menos de 5 células o menos del 10% de

células, del total de la muestra, son positivas. La muestra se considera no valorable cuando hay entre 5 y 25 células positivas por cada muestra, en este caso un segundo lector estudia la muestra y si el promedio de los dos lectores es de 15% o más de células positivas indicaría *ALK*-FISH positivo (Figura 10)[77].

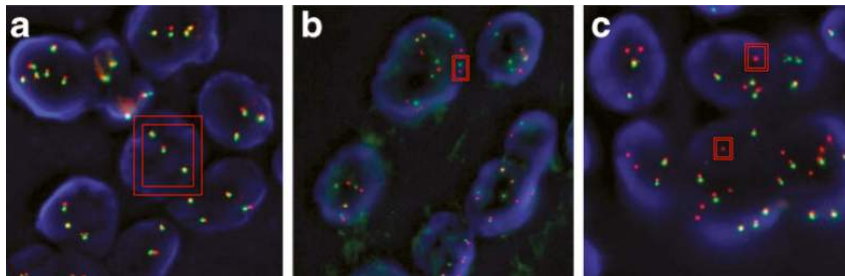


Figura 10: *ALK*-FISH de 3 adenocarcinomas pulmonares. Se observa en los tres casos un incremento en el número de copias de *ALK*. a) Señales normales sin reordenamientos (en recuadro), b) 1 ó 2 señales separadas por núcleo, indicativo de inversión, c) Señales rojas únicas indicativas de inversión y delección. Nótese que las células cancerosas en b y c contienen tanto señales de *ALK* normal como de *ALK* reorganizado [77].

Durante la interpretación se tuvo especial cuidado en valorar la distribución espacial entre las dos señales. Cuando había una única señal se hizo un ajuste del enfoque por planos, además de digitalizar las imágenes para que las señales se obtuvieran en el plano horizontal, lo que facilita su revisión y valoración.

4.4 Línea celular

4.4.1 Características del paciente y del tumor de la línea celular

La muestra del tumor primario se obtuvo de un paciente de sexo masculino sin tratamiento previo, de 74 años de edad, que había trabajado durante 12 años como carpintero 30 años antes del momento del diagnóstico. Al momento del diagnóstico el tumor se originaba en el seno etmoidal izquierdo, ocupando la totalidad de la cavidad nasal izquierda con invasión etmoidal bilateral y afectación de la lámina cribosa y de la duramadre. No hubo invasión en el cerebro. El diagnóstico fue de adenocarcinoma de tipo intestinal nasosinusal del tipo colónico, T4bN0M0. El tumor fue resecado quirúrgicamente con márgenes libres y en el postoperatorio fue tratado con radioterapia.

4.4.2 Establecimiento de la línea celular

Se obtuvo una muestra de tumor fresco en el quirófano. Ya en el laboratorio se cortó en varios fragmentos pequeños, después se transfirió a frascos de cultivo secos de 25 cm² y se cubrió con una gota de suero libre (medio de cultivo HuMEC (Invitrogen, Barcelona, España) y se incubó en CO₂ al 5% a 37 ° C. Después de 7 días se observó un crecimiento inicial de las células tumorales y fibroblastos. Se controló el sobrecrecimiento de fibroblastos con tripsinizaciones repetidas.

Después de un período de 2 meses se intentó un primer subcultivo y después de 4 meses las células comenzaron a crecer a un ritmo más rápido y se realizaron subcultivos semanalmente.

La tasa de crecimiento se evaluó mediante la siembra de 3×10^5 células en matraces de cultivo de 25 cm², en intervalos de 24 horas las células se tripsinizaron, se resuspendieron en medio y se contaron usando un hemocitómetro. Este experimento se realizó por triplicado.

La invasión celular se evaluó mediante el estudio de la capacidad de las células para invadir las membranas, matrigel (BioCoat Matrigel Invasion Chambers; BD Biosciences, San Jose CA, USA). Se utilizó una suspensión que contiene 20×10^3 células del medio de cultivo sin suplementos y se colocaron en el compartimento superior mientras que el compartimento inferior se llenó con células del medio de cultivo completo, y se incubaron por 24 h. Posteriormente, las membranas se tiñeron con 0,5 % de cristal violeta en metanol y la invasión de las células se evaluó usando un microscopio de luz con un objetivo 10 X [116].

4.4.3 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de la línea celular, del tumor primario y de los linfocitos de sangre normales del mismo paciente. Se utilizaron kits de extracción de Qiagen (Qiagen GmbH , Hilden, Alemania).

4.4.4 Ensayos de proliferación celular

Las líneas celulares se colocaron en placas de cultivo planas que contenían 96 pocillos (Corning, Massachusetts, USA). La densidad fue de 5000 células en cada pocillo. Después de 24 horas las células fueron tratadas con dosis ascendentes de crizotinib y vandetanib. En cada caso las líneas celulares fueron incubadas por 24, 48 y 72 horas. Los datos fueron analizados mediante quimiorresistencia utilizando el ensayo de proliferación MTS (Promega Wiscconsin, USA) y siguiendo el protocolo de la casa comercial. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

4.5 Secuenciación

La secuenciación de última generación se realizó con la empresa DREAM genics, Oviedo, Asturias, España. Se enviaron las librerías de 48 casos de ACN a este servicio externo de secuenciación masiva. Se utilizaron estos casos por su adecuada calidad para el estudio de secuenciación. Este servicio utilizó el sistema MiSeq de Illumina, ya que es más rápido, ágil y permite el análisis de números de muestras más pequeñas, por lo cual se adaptó mejor a la prevista aplicación en la práctica clínica. Se obtuvieron ficheros informáticos con todas las lecturas de secuencia del panel de genes.

Se estudiaron 48 muestras de tumor, se realizó la extracción y se comprobó la calidad del ADN. El siguiente paso fue el fragmentar/ligar adaptadores. Después se utilizaron reactivos,

sondas kit para crear una librería (PCR) y por último la secuenciación (MiSeq).

Secuenciación de ARN.

Las librerías de ARN mensajero (RNA-seq) y ADN complementario se prepararon de 1 µg de ARN según el protocolo de Illumina. Los fragmentos fueron amplificados con PCR y secuenciados utilizando el analizador de Illumina.

Análisis de datos.

Se realizó el análisis de todo el genoma y se realizó la evaluación fijándose en variantes que ocurren en menos del 5% de la población general.

4.6 Definición de variables

Para el estudio tendremos en cuenta las siguientes variables:

-Clínico-patológicas: **edad sexo, hábitos tóxicos y exposición a la madera, subtipo histopatológico, tratamientos recibidos, evolución y supervivencia.**

-Expresión (IHQ): para **ALK y la proteína quimérica ALK/EML4. Expresión de RET Y ROS.**

-Génicas (FISH): **presencia de la translocación ALK/EML4 y número de copias. Secuenciación: Mutaciones en ALK, RET y ROS.**

4.7 Estudio estadístico

En la **búsqueda bibliográfica** se utilizó la base de datos de la *National Library of Medicine* (<http://www.nlm.nih.gov>) haciendo la selección de artículos por medio de términos científicos relacionados con CCC, ACNS, FISH, adenocarcinoma de pulmón, crizotinib, *ALK*, *EML4*, *RET* y *ROS*. Se recurrió a la base de datos *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), *Entrez gene*, *Entrez nucleotide*, *Entrez protein* para la búsqueda de los genes y proteínas alteradas en estos tumores (*ALK*, *EML4*, *c-MET*).

En el **estudio estadístico** los resultados de las variables descriptivas y numéricas fueron tratados mediante el paquete informático Statistical Package for the Social Science, SPSS versión 20 para MAC (SPSS© Inc. Illinois, EE.UU). La asociación de caracteres cualitativos se llevó a cabo mediante la prueba de correlación χ^2 de Pearson o la prueba del estadístico exacto de Fisher. El nivel de significación se fijó para una $p \leq 0,05$. Las diferencias de caracteres cualitativos se calcularon mediante la comparación de medias aplicando la prueba T de Student o ANOVA. El nivel de significación se fijó para una $p \leq 0,05$.

Para estimar la supervivencia se utilizaron las curvas Kaplan-Meier, comparando las distribuciones de supervivencia mediante la Prueba del Logaritmo del Rango "Log-Rank Test". Los valores con una $p \leq 0,05$ fueron considerados significativos.

5 RESULTADOS

4.8 Aspectos clínico patológicos

La serie estuvo formada por 148 varones y 2 mujeres con una media de edad de 66 años (rango 28-92). En 133 pacientes (89%) se objetivó como antecedente la exposición al polvo de madera, el 50% eran consumidores habituales de alcohol y el 53% eran fumadores (figura 11).

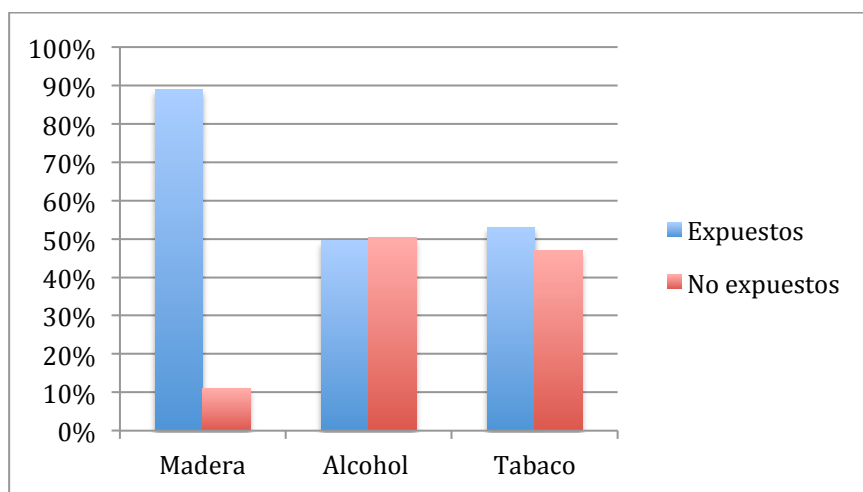


Figura 11: Factores externos de riesgo en los ACNS (n=150)

En relación con el estadio tumoral T [12], 32 pacientes tenían un tumor T1 (21%), 18 pacientes T2 (12%), 54 pacientes T3 (36%) y 46 pacientes T4 (31%) (Figura 12). En relación con la histología [11], 90 ACNS eran de tipo colónico (60%); 36 de tipo

mucinoso (24%); 13 de tipo papilar (9%) y 11 de tipo sólido (7%) (Figura 13).

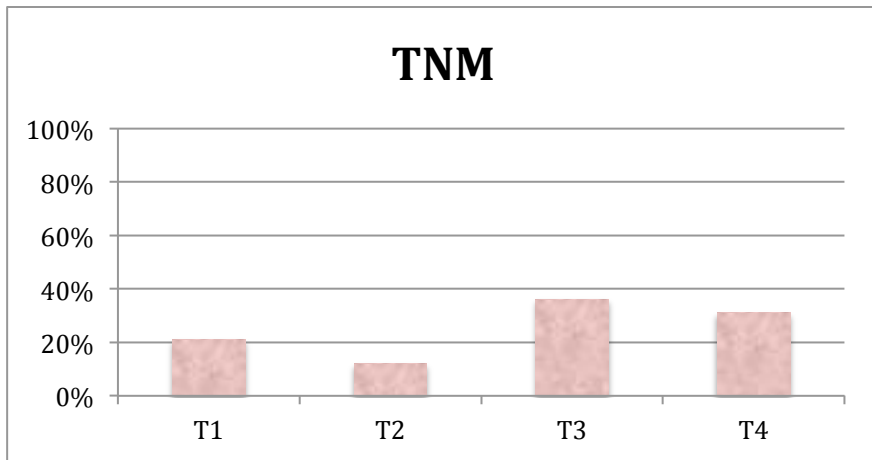


Figura 12: Clasificación de los ACNS según el estadio.

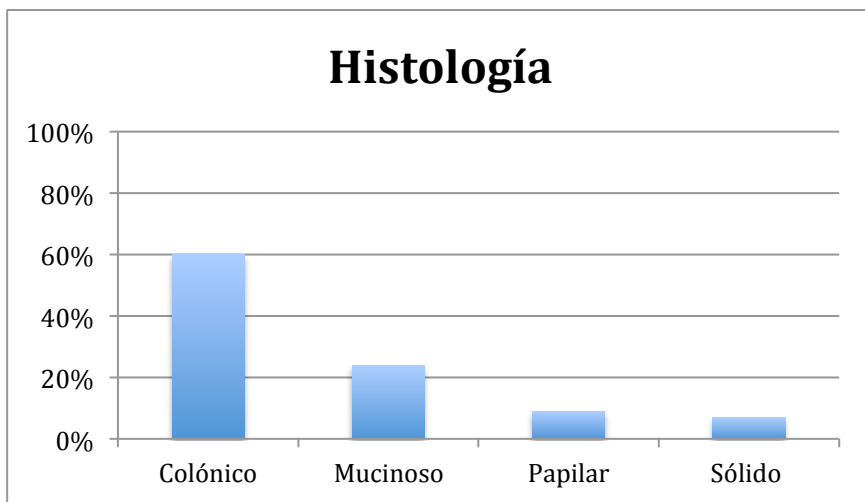


Figura 13: Clasificación de los ACNS según el subtipo histológico.

Resultados

Después de la cirugía, 88 pacientes recibieron tratamiento complementario con radioterapia (59%).

El seguimiento medio de los pacientes fue de 53 meses (1 a 264 meses). Durante el mismo, 71 casos (47%) desarrollaron una recidiva locorregional y 17 casos (11%) una metástasis a distancia. El tiempo medio libre de enfermedad fue de 10 meses (rango entre 0 y 96 meses). La supervivencia global a 5 años fue del 48% (Figura 14).

Y la supervivencia específica de la enfermedad fue del 55% a los 5 años de seguimiento (figura 15)

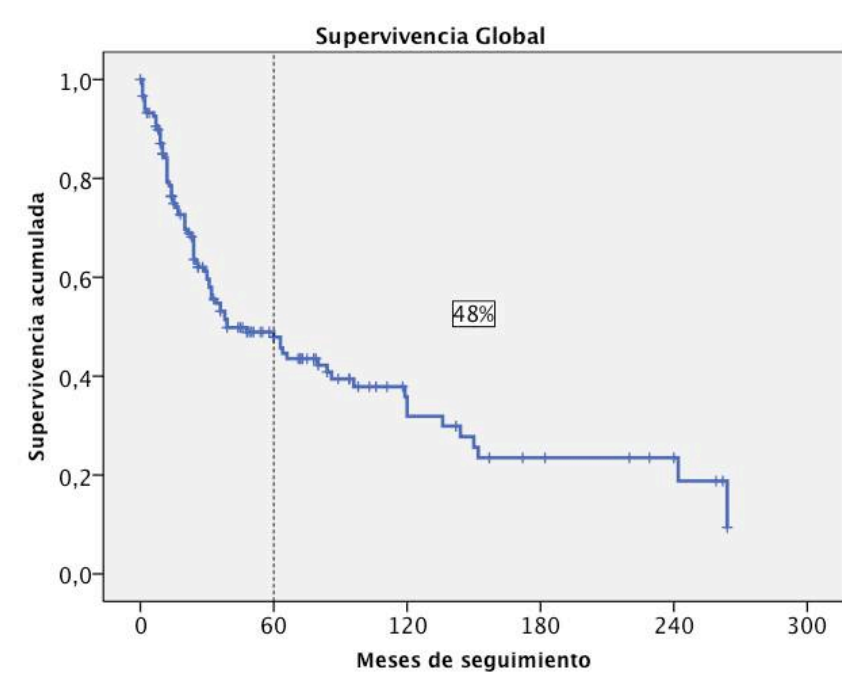


Figura 14: Supervivencia global a 5 años de los pacientes con ACNS

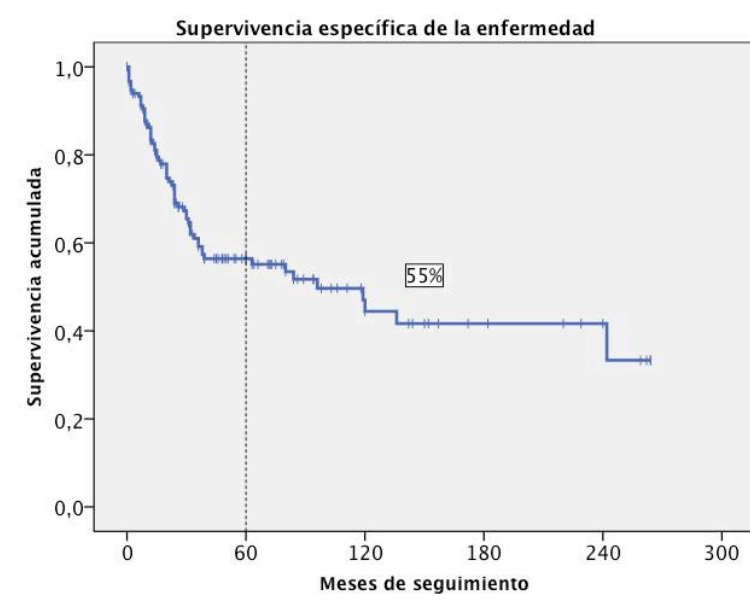


Figura 15: Supervivencia específica para la enfermedad en pacientes con ACNS.

Además, la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años es de 6,6% (figura 16).

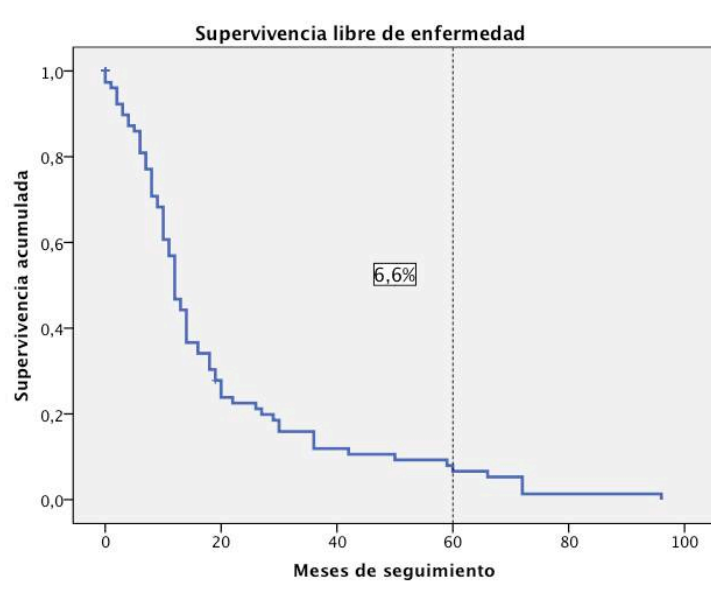


Figura 16: Supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con ACNS.

4.9 Relaciones de las variables con las características clínico patológicas de los ACNS.

4.9.1 Supervivencia específica y variables clínico-patológicas

Por la trascendencia clínica se estudió la relación de la supervivencia con las variables clínico-patológicas: 1.- la histología, 2.- el estadio, 3.- la invasión intracraneal, 4.- las metástasis y 5.- las recidivas.

Al analizar la supervivencia específica según el subtipo histológico, observamos mayor supervivencia para los subtipos papilar y colónico y menor supervivencia con los subtipos sólidos y mucinosos, con una significación estadística de $p=0,003$ (figura 17).

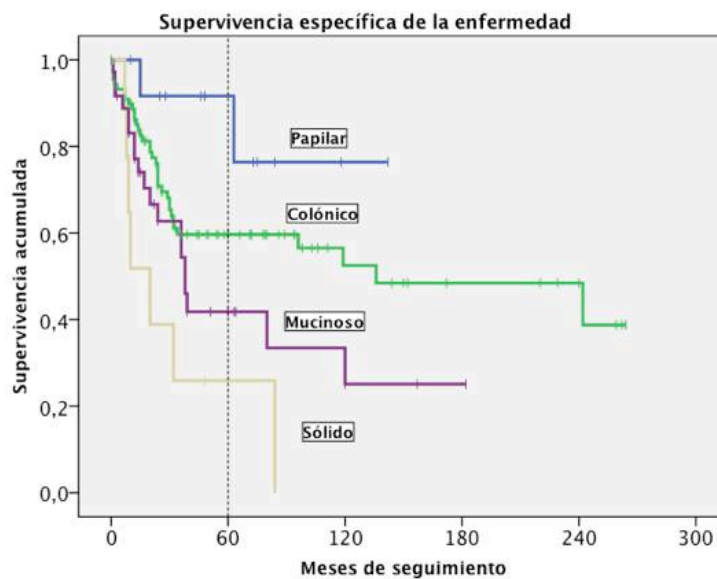


Figura 17: Supervivencia específica para la enfermedad y relación con el subtipo histológico.

Al estudiar la supervivencia en relación con el estadio TNM, observamos que evidentemente existe mejor supervivencia en los estadios tempranos I y II en comparación a los estadios avanzados III y IV ($p= 0,000$) (Figura 18).

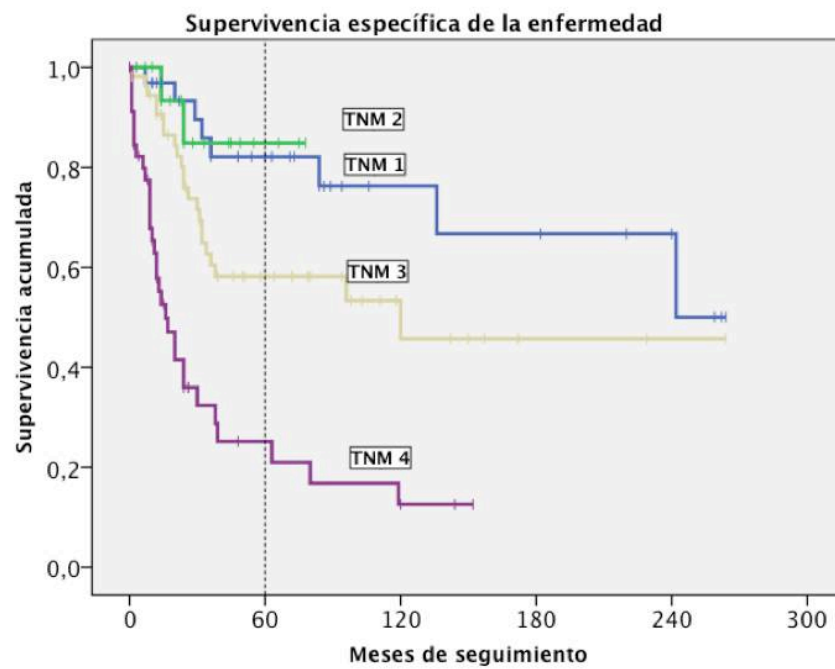


Figura 18: Supervivencia específica en relación al estadio.

Encontramos una peor supervivencia en los pacientes con invasión intracraneal, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,000$) (Figura 19).

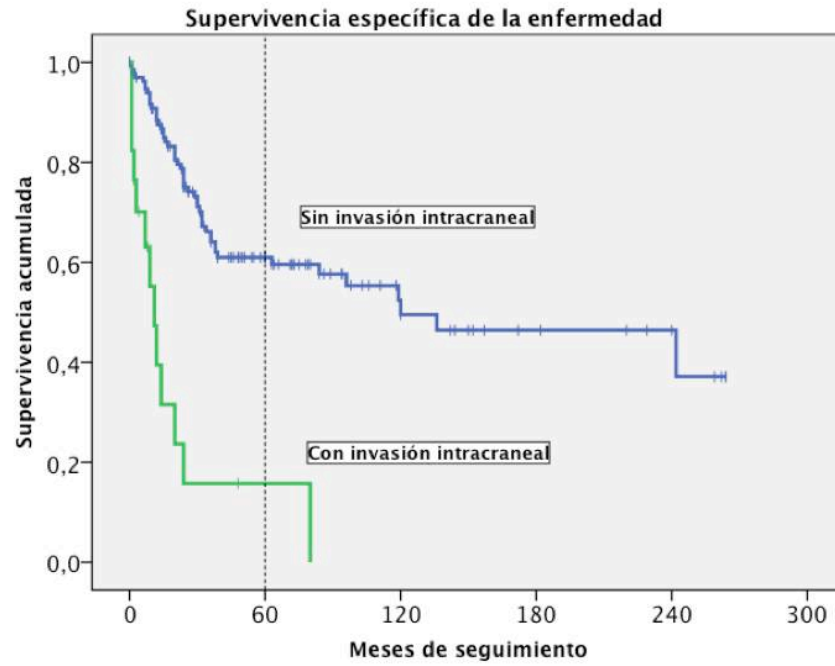


Figura 19 Supervivencia específica en relación a la invasión intracraneal.

Al estudiar la supervivencia específica en los pacientes con recidiva y metástasis, encontramos una peor supervivencia en los pacientes que las presentaban, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,002$ y $0,000$ respectivamente); (Figuras 20 y 21).

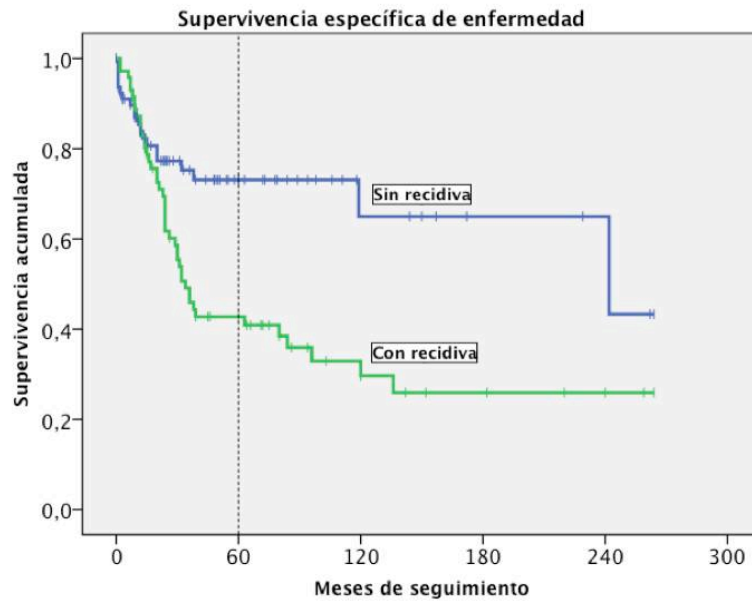


Figura 20 Supervivencia específica en relación a pacientes que presentaron recidivas.

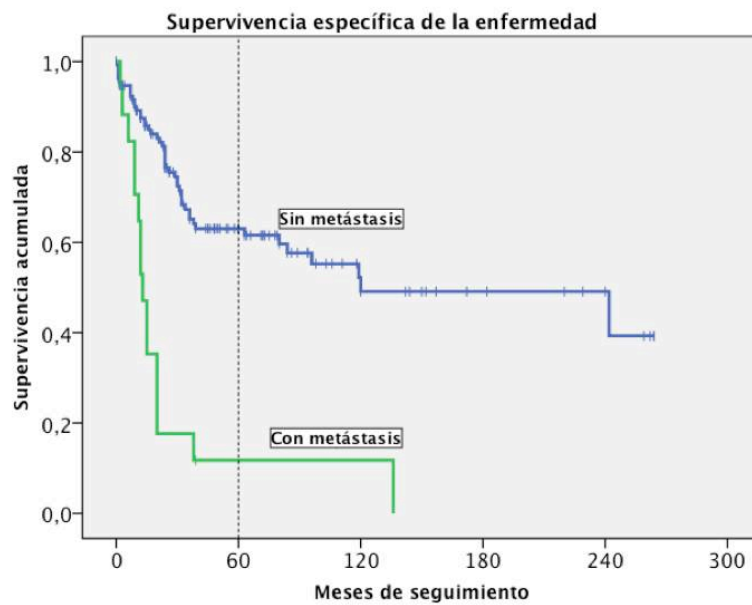


Figura 21 Supervivencia específica en relación a los pacientes que presentaron metástasis.

4.9.2 Supervivencia libre de enfermedad y características clínico patológicas.

También analizamos la supervivencia libre de enfermedad en relación con el subtipo histológico y clasificación TNM. La supervivencia a los 5 años es mejor en los subtipos colónico y mucinoso en comparación a los subtipos papilar y el sólido ($p=0,021$).

En cuanto al estadio, la supervivencia a los 5 años es mayor en estadios TNM 1 y TNM 3 y peor en estadios TNM 2 y TNM 4 ($p=0,007$) (Figuras 22 y 23).

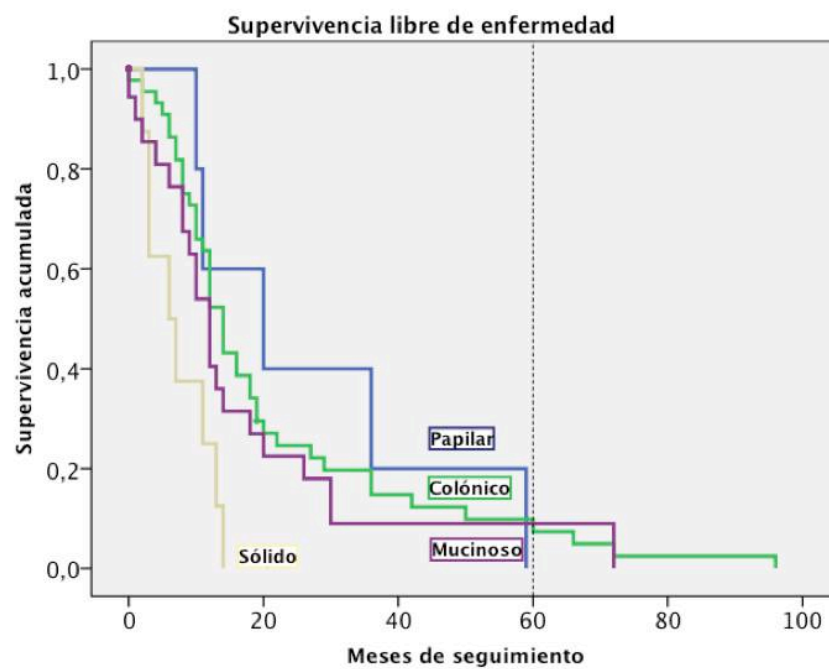


Figura 22: Supervivencia libre de enfermedad en relación con la histología de pacientes con ACNS.

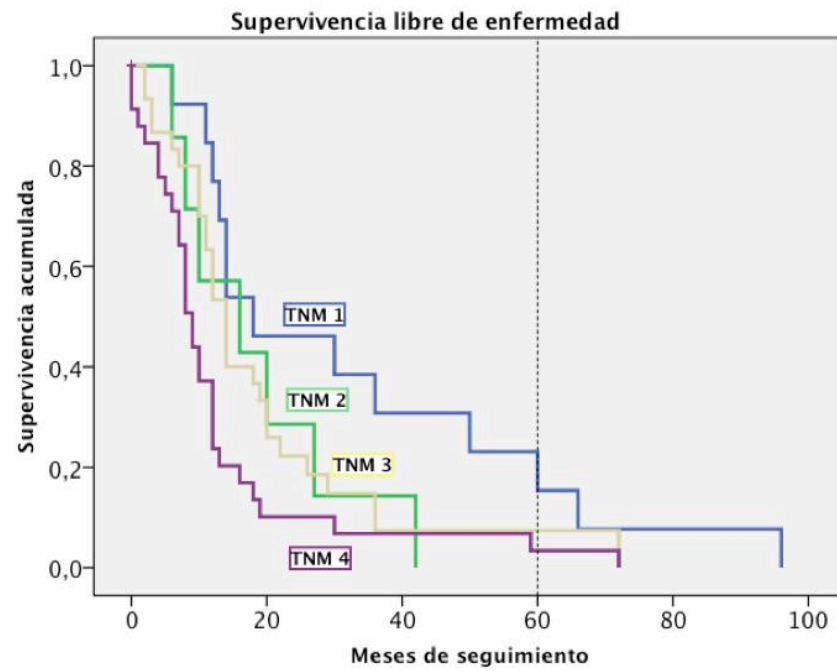


Figura 23: Supervivencia libre de enfermedad en relación con la clasificación TNM en pacientes con ACNS.

Encontramos una peor supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con invasión intracraneal, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,000$) (Figura 24).

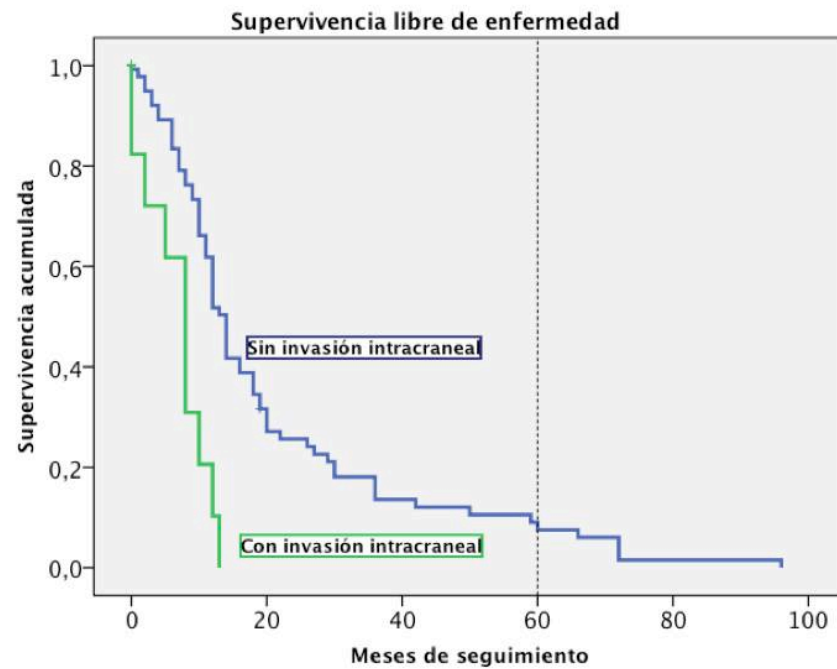


Figura 24 Supervivencia libre de enfermedad en relación a la invasión intracraneal.

4.10 FISH y expresión proteica de ALK

El estudio mediante FISH no fue valorable en 36 de los 96 casos del estudio debido a la falta de suficiente representación tumoral en la muestra y por un elevado nivel de señal de fondo (Figura 25). En los 60 casos restantes analizados no se observó en ningún caso la presencia de una separación ('break apart') de las dos señales y sólo se han visto parejas de señales rojo y

Resultados

verde (Figura 26a). El número de señales por núcleo (siempre parejas rojo y verde) observadas fue 1-2 en 50 casos. En 10 casos mostraron 2-3 o más señales, indicando ganancias en de este segmento de cromosoma 2 (Figura 26b), incluyendo un caso mostrando núcleos con 5-6 señales (Figura 26c).

El estudio de la expresión proteica de ALK con IHQ dio resultados analizables en 86 de los 96 casos, pero ningún caso se objetivó positividad, mientras la muestra control mostró una fuerte positividad en la membrana (Figura 27).

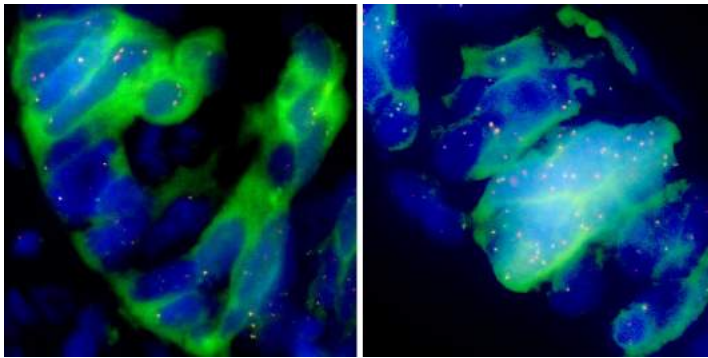


Figura 25: Dos muestras que presentan señales FISH con mucho fondo, haciendo una evaluación de las señales 'break apart' poco fiable.

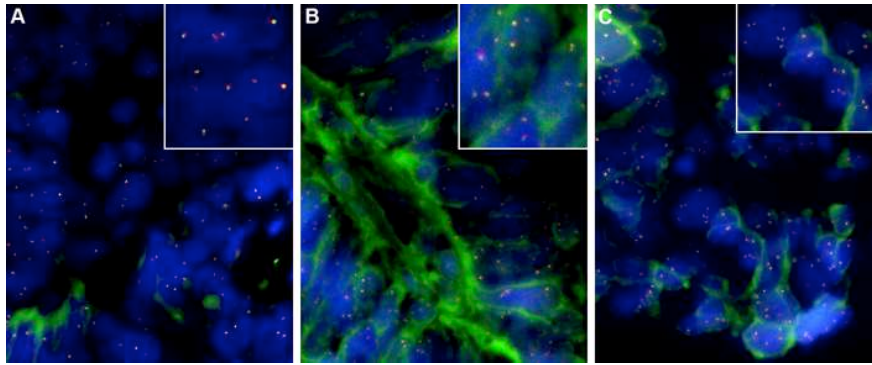


Figura 26: (A) Ejemplo de un resultado FISH en que se observan 1-2 parejas de señales rojo y verde adyacentes. (B) Ejemplo de un resultado FISH en que se observan 2-3 parejas de señales rojo y verde adyacentes. (C) Ejemplo de un resultado FISH en que se observan 3-6 parejas de señales rojo y verde adyacentes.

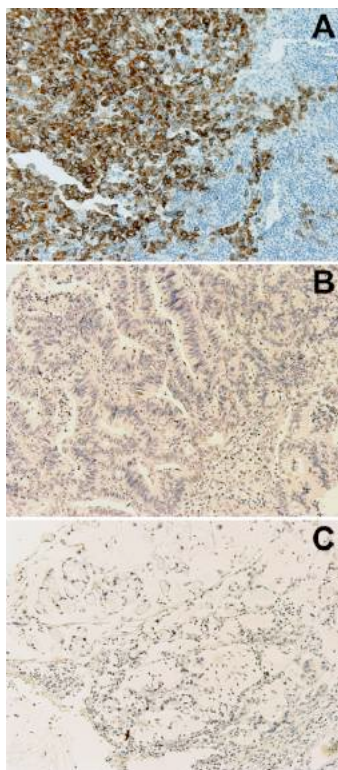


Figura 27: Tinción inmunohistoquímica. (A) Positividad de ALK en la membrana citoplasmática en el control positivo, una muestra de linfoma de células anaplásicas grandes con translocación t(2;5). (B) Ausencia de ALK en una muestra tumoral de ACNS de tipo colónico. (C) Ausencia de ALK en una muestra tumoral de ACNS de tipo mucinoso.

4.11 Expresión proteica de RET

Se realizaron un total de 96 estudios de IHQ (el total de las muestras parafinadas), el porcentaje de tinciones útiles varió, debido a que algunos cores se perdieron, otros no tenían tumor o los TMA estaban plegados y su valoración no era fiable.

Para determinar la expresión de RET se realizó un análisis semicuantitativo de la IHQ de 80 casos de ACNS (Figura 34) y se comparó estas tinciones con un caso control que expresaba RET (Figura 35). 0 y + fue considerado como RET negativo y ++ y +++ como RET positivo.

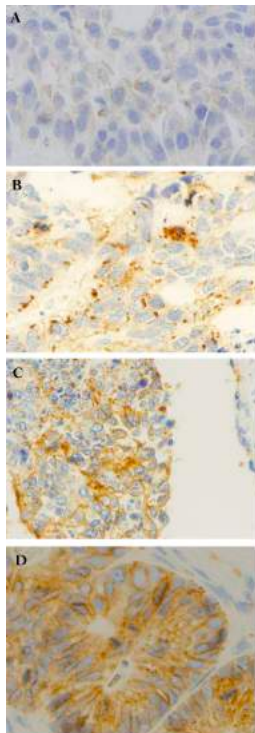


Figura 34 Inmunohistoquímica de RET: A) Tinción negativa. B) Tinción negativa (+). C) Tinción positiva (++) D) Tinción positiva (+++)

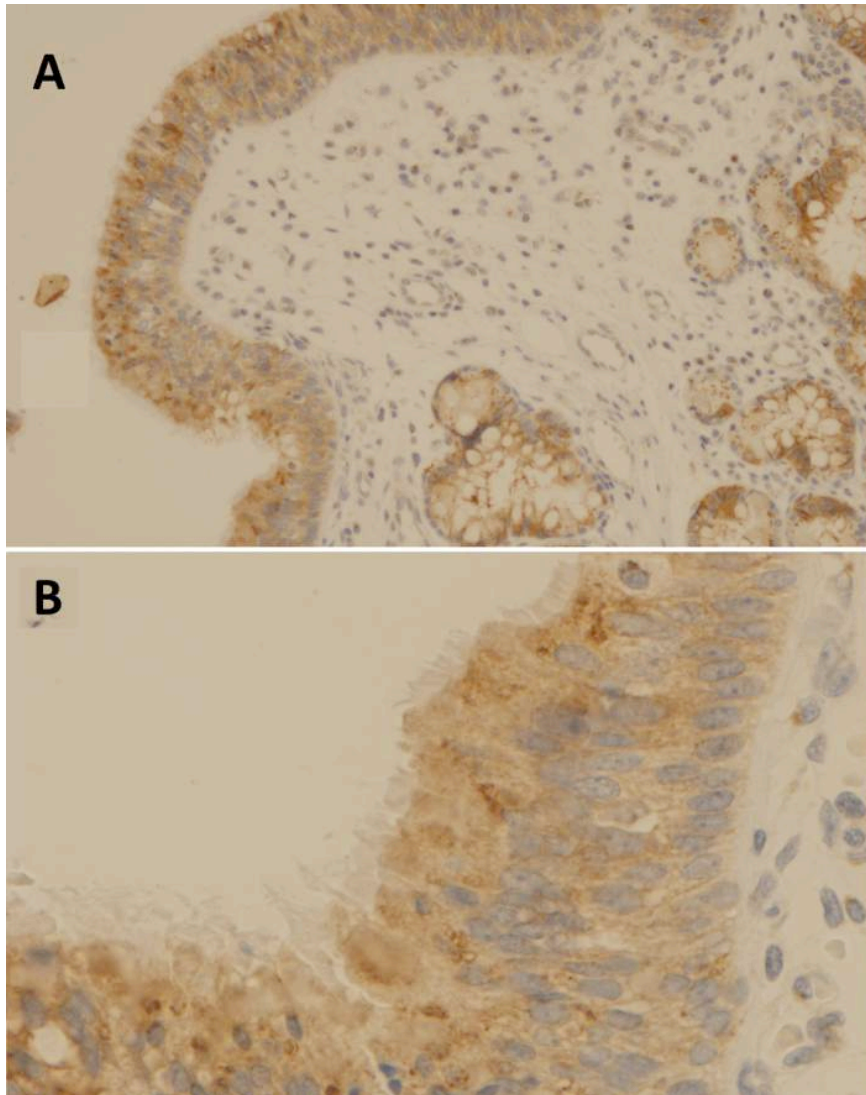


Figura 35 A) Mucosa normal, con tinción de RET 10x. B) Mucosa normal, con tinción de RET 40x. Tinción RET positivo.

Se realizaron 80 inmunotinciones para RET de las que 57 (71,25%) fueron positivas y 23 (28,75%) fueron negativas para la expresión de la proteína. Se observó en la IHQ que 21 (26,3%) presentaron (+++), 36 (45%) presentaron (++)

mientras que 13 (16,3%) presentaron (+) y 10 (12,5%) presentaron (0) (Figura 28).

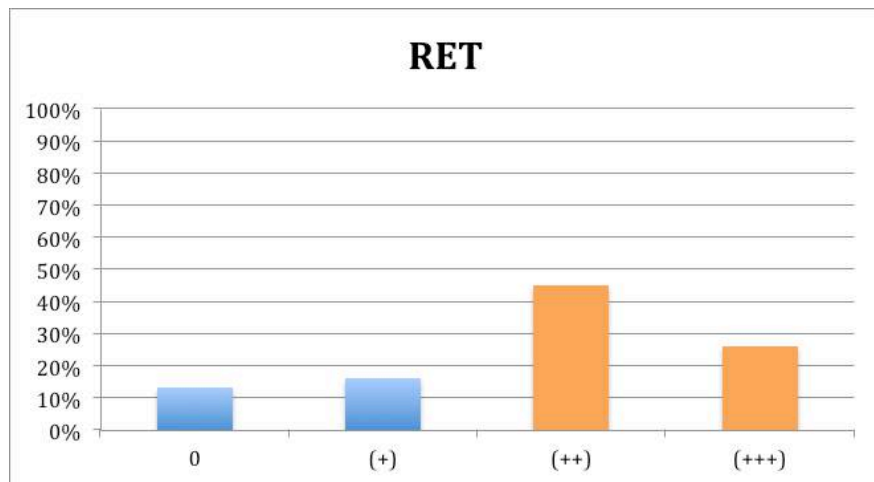


Figura 28 Expresión de RET en ITAC, en naranja los casos positivos (71,25%) y en azul los casos negativos (28,75%).

4.12 Expresión proteica de ROS

Por último, al estudiar ROS se obtuvieron 96 casos útiles, de los cuales ninguno fue positivo para la inmunotinción.

4.13 Relaciones de la expresión proteica de RET con otras variables

Se establecieron relaciones entre las variables de expresión proteica de RET y el resto de variables estudiadas. Iremos describiendo las relaciones más importantes observadas entre los diversos grupos estudiados.

Resultados

En la relación entre la expresión de RET con los subtipos histológicos se observa que esta proteína se expresa con mayor frecuencia en el subtipo papilar (n=5) con 5 casos (100%), seguido por el subtipo colónico (n=50) con 37 casos (74%), después el subtipo mucinoso (n=16) con 11 casos (68,75%) y en último lugar en el sólido (n=9) con 4 casos (44,4%). Se observa ausencia de expresión de RET con mayor frecuencia en los subtipos menos diferenciados: en el subtipo sólido se observa en 5 casos (55,5%) y en el subtipo mucinosos en 5 casos (31,25%). Se observa ausencia de expresión de RET con menor frecuencia en los subtipos diferenciados: en el subtipo colónico se observa en 13 casos (26%) y en el subtipo papilar en ningún caso (Figura 29-33).

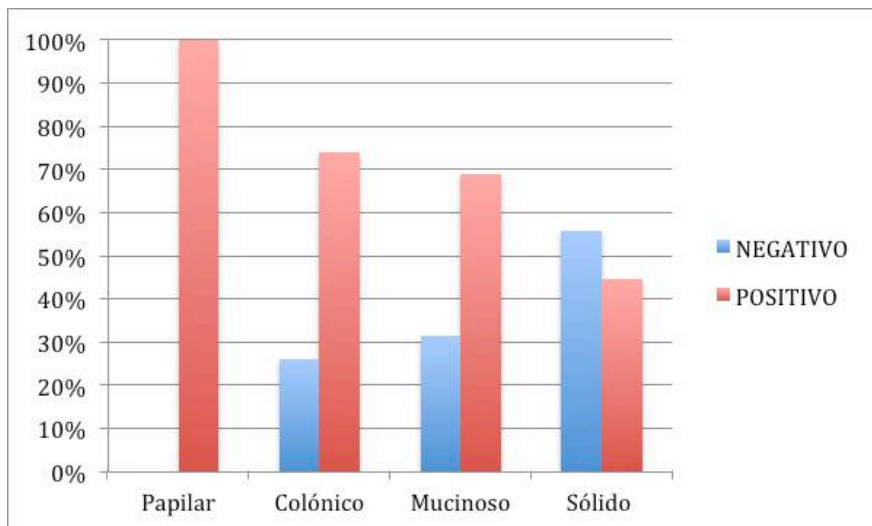


Figura 29 Expresión de RET y el subtipo histológico.

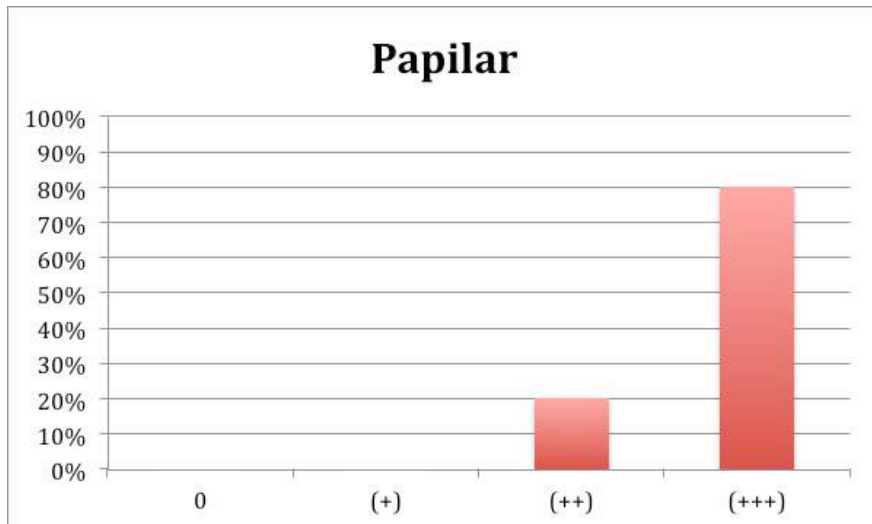


Figura 30: Expresión de RET en el subtipo papilar.

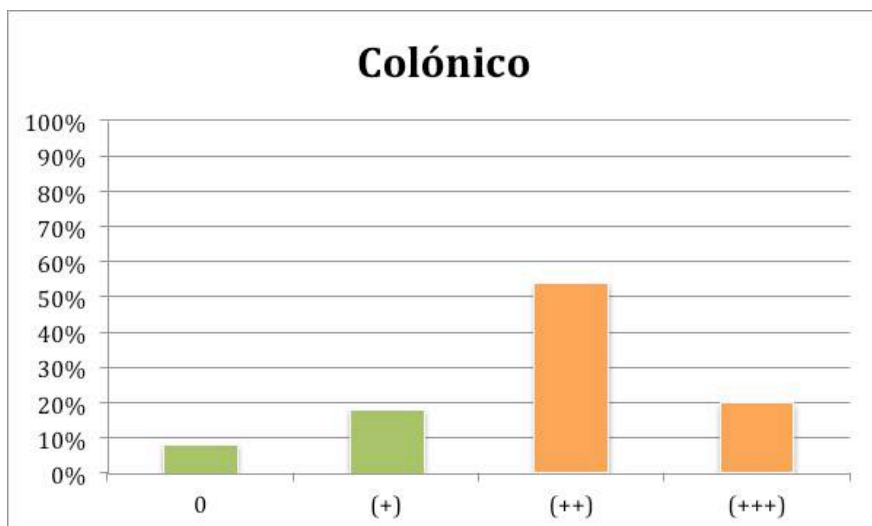


Figura 31 Expresión de RET en el subtipo colónico. Verde: casos negativos, naranja: casos positivos.

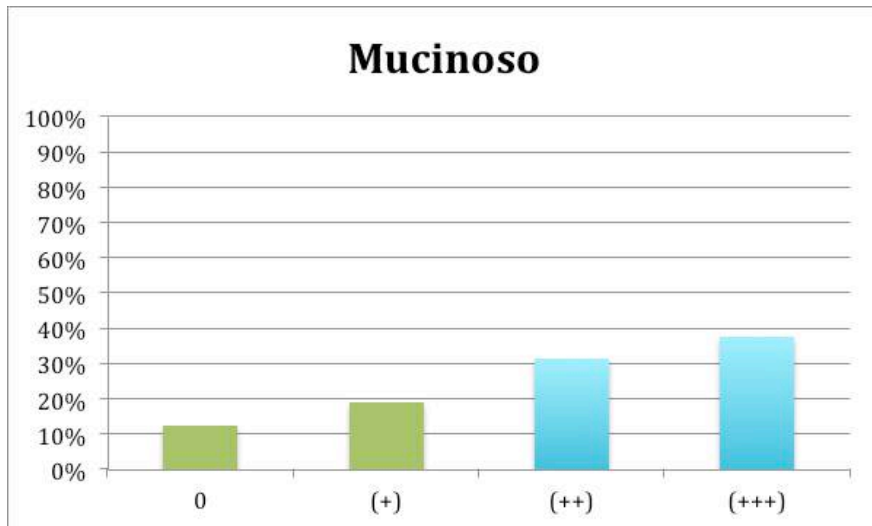


Figura 32 Expresión de RET en el subtipo mucinoso. Verde: casos negativos, azul: casos positivos.

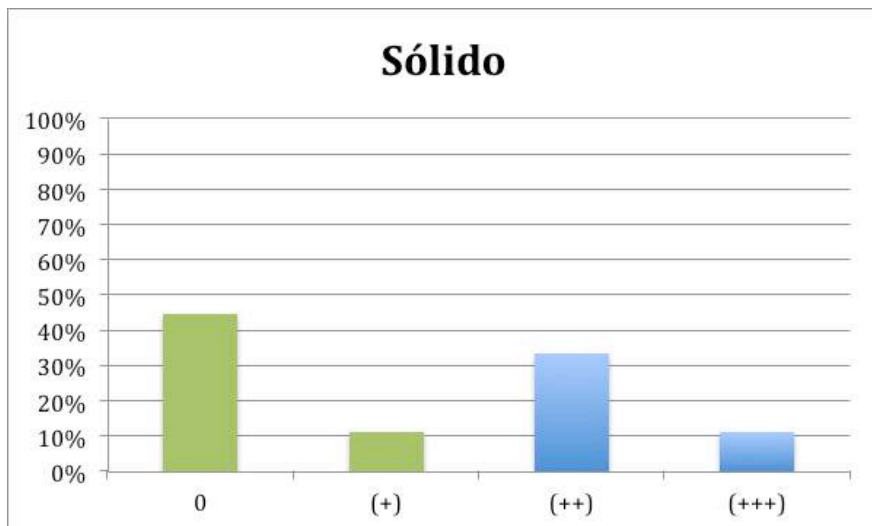


Figura 33 Expresión de RET en el subtipo sólido. Verde: casos negativos, azul: casos positivos.

Resultados

Los pacientes que expresaban RET se distribuían de la siguiente manera en los diferentes estadios TNM. Presentaban tinción positiva el 81%; 40%; 75%; y 63,6% en los estadios I-II-III y IV respectivamente. Mientras que eran RET negativos el 19%; 60%; 25%; y 36,4% los estadios I-II-III y IV respectivamente. Sin diferencias significativas. (Figura 36).

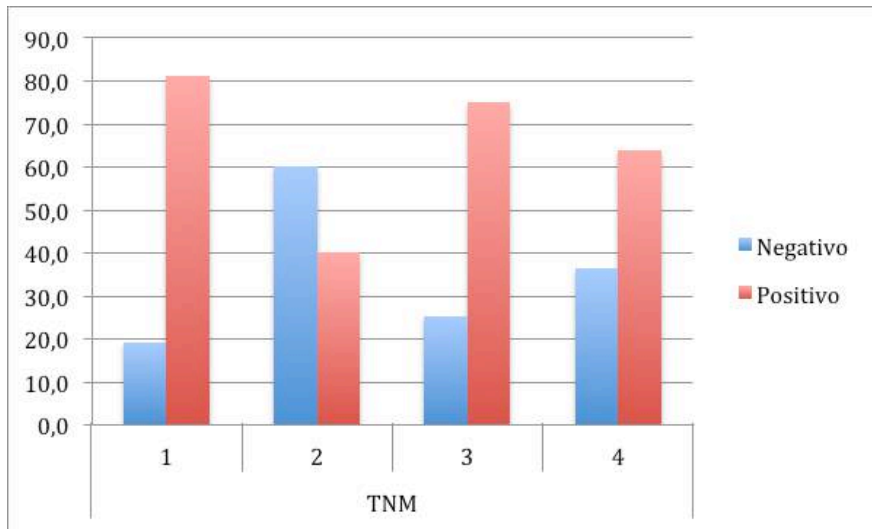


Figura 36 Expresión de RET y el TNM

Observamos de manera significativa ($p= 0,042$) un mayor porcentaje de RET negativo (26%) frente a RET positivo (8%) en pacientes con invasión intracraneal. Tanto en los pacientes con recidivas tumorales como en los pacientes que presentan metástasis no se encontraron diferencias significativas. Observamos que los pacientes que tuvieron recidivas presentan un 60,8% de tinción RET negativa y 43,5% de tinción RET positiva mientras que los pacientes con metástasis presentan

8,6% de tinción RET negativa y 15,7% de tinción RET positiva (Figuras 37-39) .

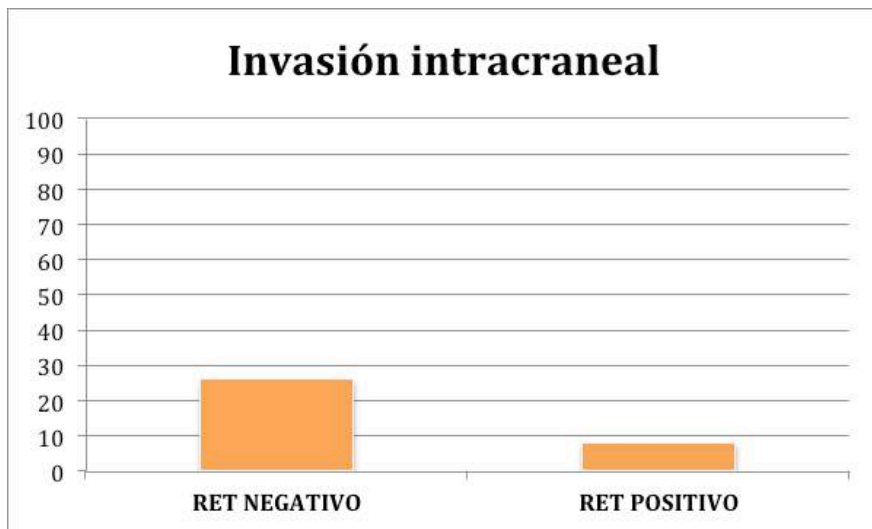


Figura 37: Invasión intracraneal y porcentaje de expresión de RET (p= 0,042).

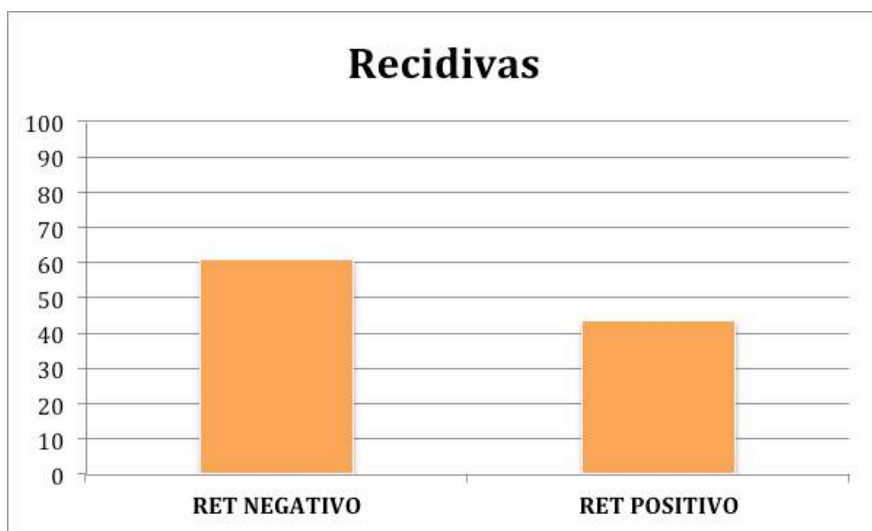


Figura 38: Recidivas tumorales y porcentaje de expresión de RET (p= 0,16).

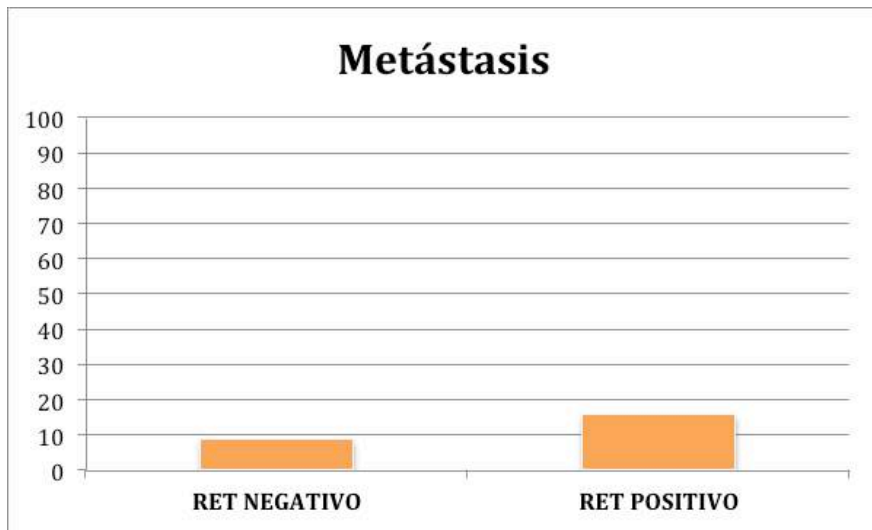


Figura 39: Metástasis y porcentaje de expresión de RET (p= 0,40).

En cuanto a la supervivencia, parece ser que los pacientes que presentaron mayor expresión de RET tienen mejor supervivencia global (p 0,102), mejor supervivencia específica para la enfermedad (p 0,256) y mejor supervivencia libre de enfermedad (p 0,905); aunque no se encontró significancia estadística (Figuras 40-45).

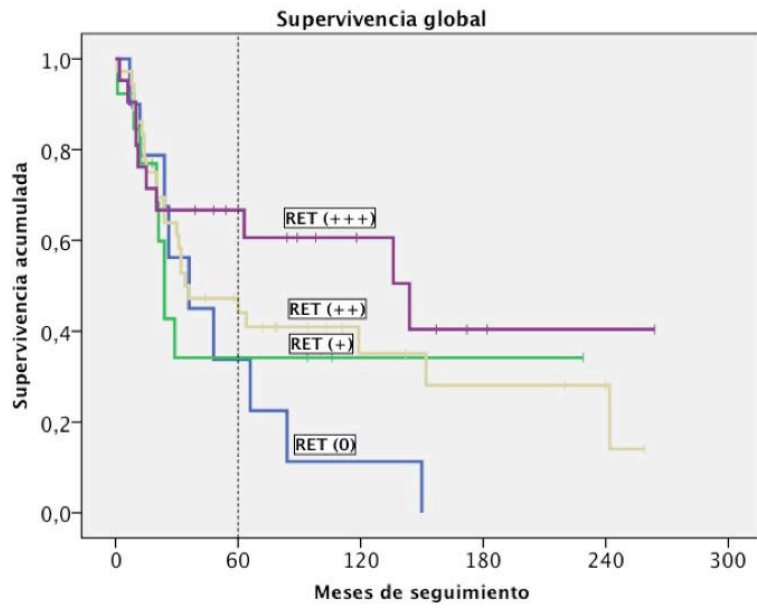


Figura 40: Supervivencia global y expresión de RET. Según los grados de tinción de RET.

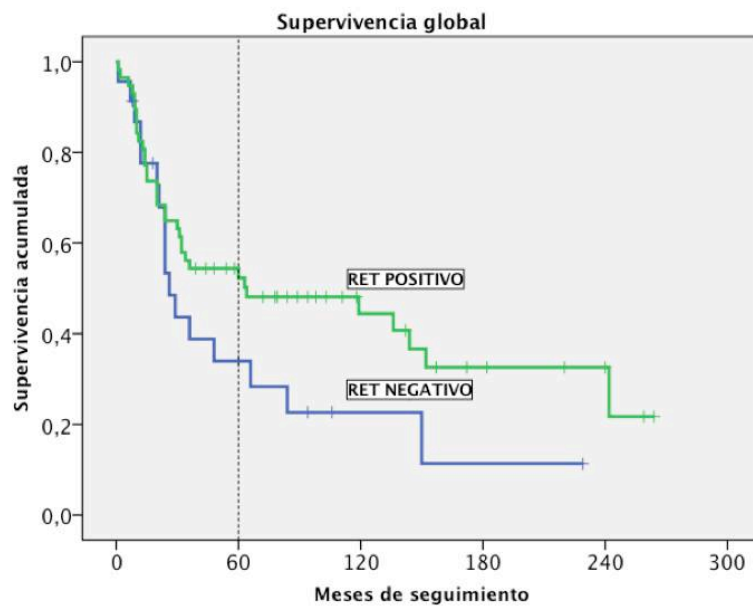


Figura 41 Supervivencia global y expresión de RET, casos positivos vs. casos negativos ($p=0,117$).

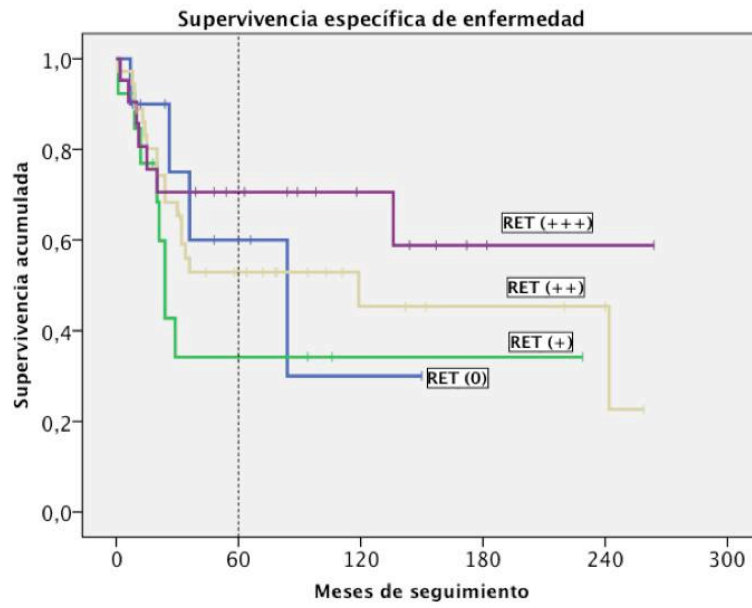


Figura 42: Supervivencia específica de la enfermedad y expresión de RET. Según los grados de tinción de RET.

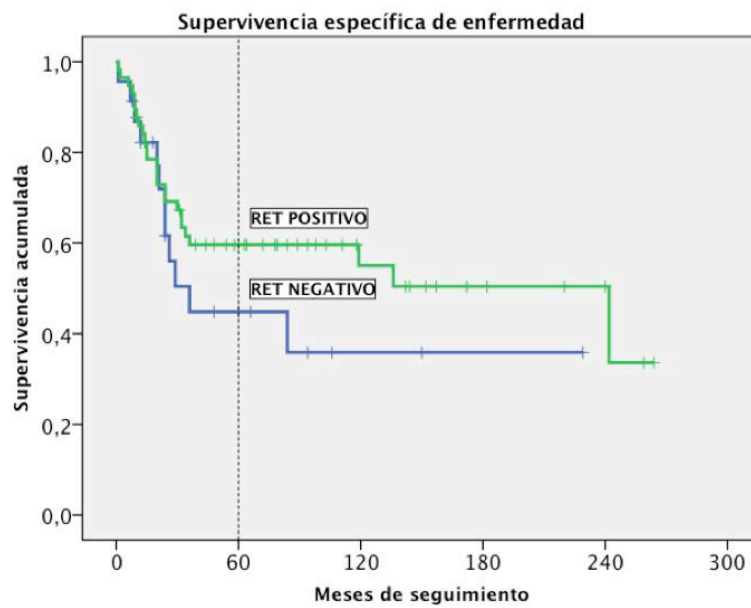


Figura 43: Supervivencia específica de la enfermedad y expresión de RET. Casos positivos vs. casos negativos ($p=0,924$).

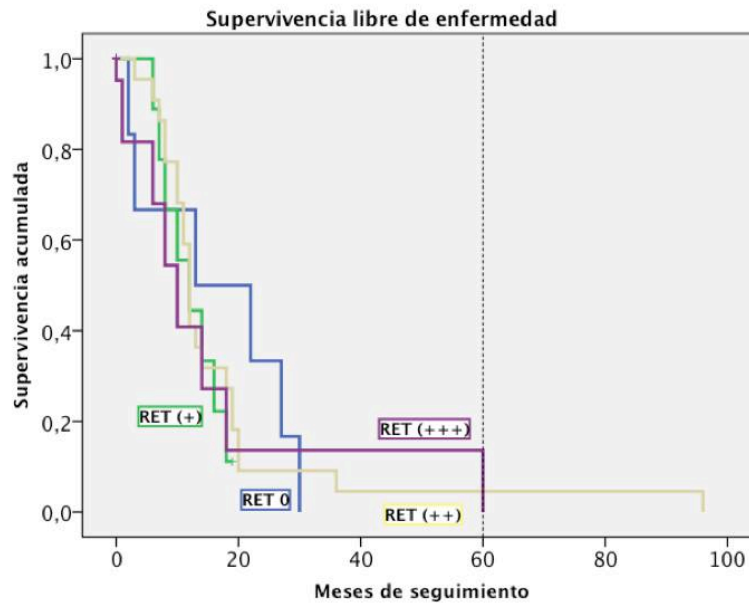


Figura 44: Supervivencia libre de enfermedad y expresión de RET. Según los grados de tinción de RET.

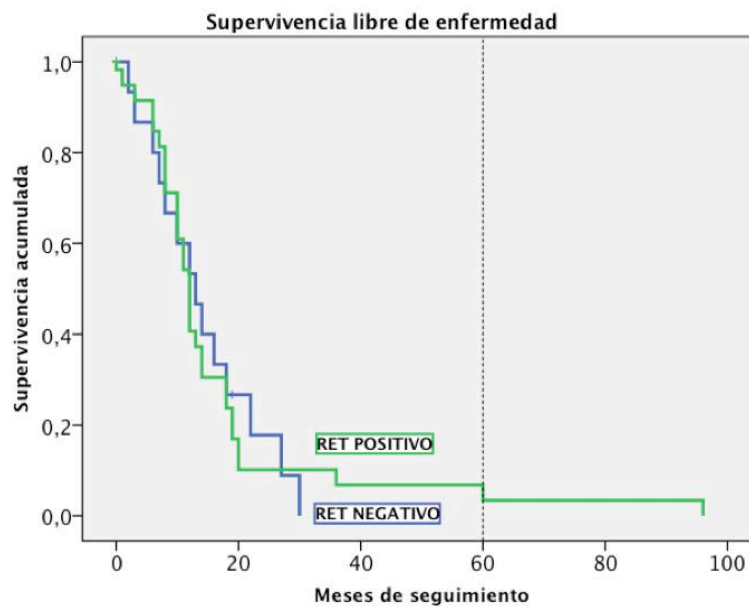


Figura 45 Supervivencia libre de enfermedad y expresión de RET. Casos positivos vs. casos negativos (p= 0,411).

Todos estos datos nos indican una asociación entre una mejor diferenciación y mayor supervivencia de los tumores con la expresión positiva de RET.

4.14 Línea celular e Inhibidores de la tirosina quinasa

4.14.1 Morfología de la línea celular

La línea celular de ITAC creció como una monocapa células pequeñas en forma de adoquín con nucléolos bien marcados y visibles en el núcleo, no muy diferente de la morfología de las células que se pueden ver en una sección H & E del tumor primario del paciente (Figura 46).

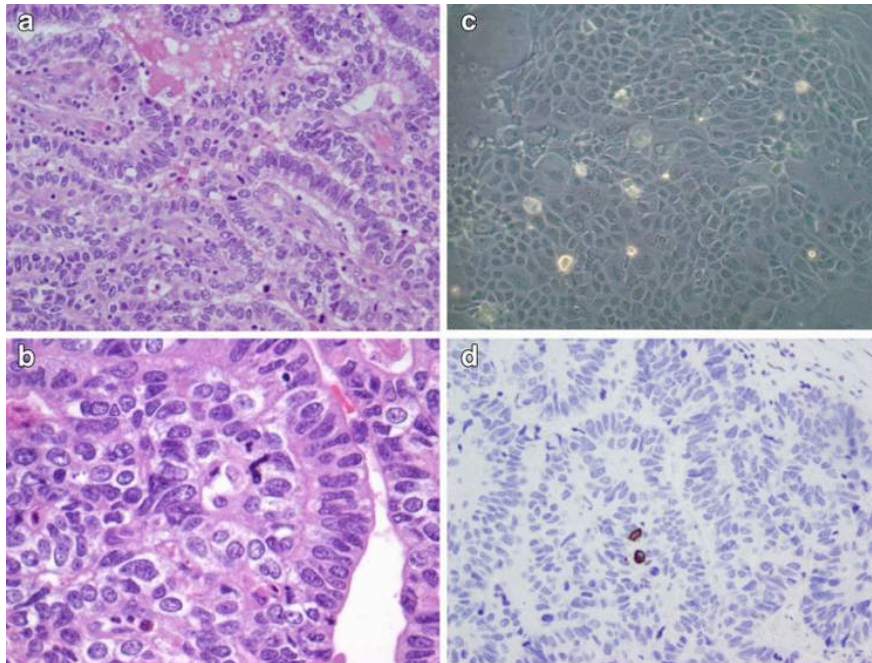


Figura 46: Microfotografía de un corte representativo de ITAC tipo colónico con una tinción de H & E (a) . Un aumento mayor de las células tumorales primarias (b). Apariencia morfológica similar con la línea celular de ITAC 3 (c). La IHQ para la expresión de CK20 era prácticamente negativa (d). Magnificación original: 200x (A, C , D) y 400x (B). Figura tomada de Perez-Escuredo et al [116].

4.14.2 Características de crecimiento

La curva de crecimiento de ITAC mostró un comienzo lento después de la siembra, incluso se observó una disminución de las células después de 24 h. En la fase logarítmica, entre 24 h y 96 h, se observó una duplicación de población en aproximadamente 18 h. Después del subcultivo 10, este crecimiento se ha mantenido estable hasta la actualidad (subcultivo 60). Usando el ensayo de invasión de Matrigel, se encontró que la línea celular de ITAC tenía un alto potencial de invasión con un gran número de células presentes en la matriz.

4.14.3 Perfil genético

Mediante secuenciación de nueva generación se determinó una mutación no sinónima de *RET* en el cromosoma 10, exón 5 de la línea celular. Sin encontrarse mutaciones en *ALK* y *ROS*.

4.14.4 Crecimiento celular e inhibidores de la tirosina quinasa.

En la línea celular de ACNS, desarrollada en nuestro laboratorio, se probaron 2 inhibidores de la tirosina quinasa aprobados para su uso frente a los receptores *ALK* en adenocarcinomas de pulmón y en *RET* de los carcinomas medulares de tiroides. Utilizamos el crizotinib y el vandetanib respectivamente,

Resultados

desafortunadamente ninguno de estos fármacos produjo respuesta significativa en el crecimiento de las células tumorales del ACNS in vitro. El crizotinib no produjo disminución celular en ninguna de las fases. Se probaron concentraciones de manera ascendente y se incubaron la líneas celulares durante 24, 48 y 72 horas (Figuras 47-49).

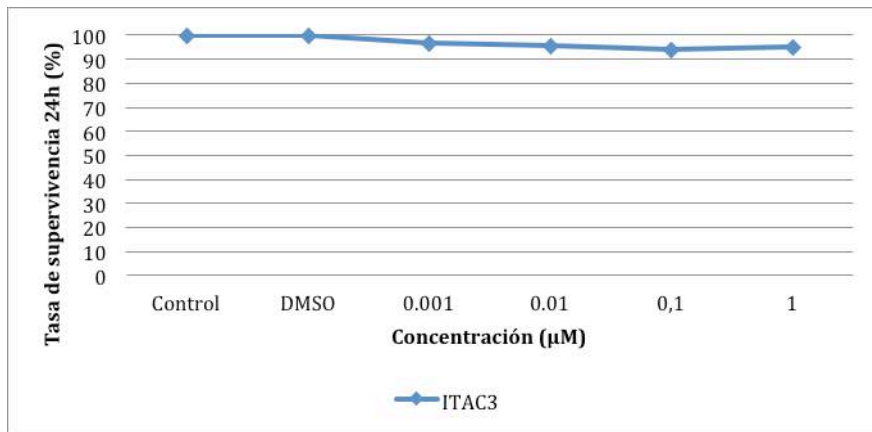


Figura 47 Crizotinib y tasa de supervivencia a las 24 h.

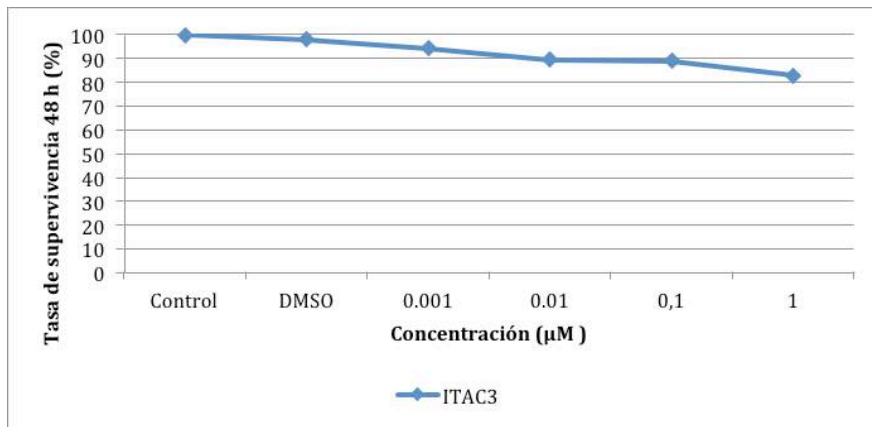


Figura 48 Crizotinib y tasa de supervivencia a las 48 h.

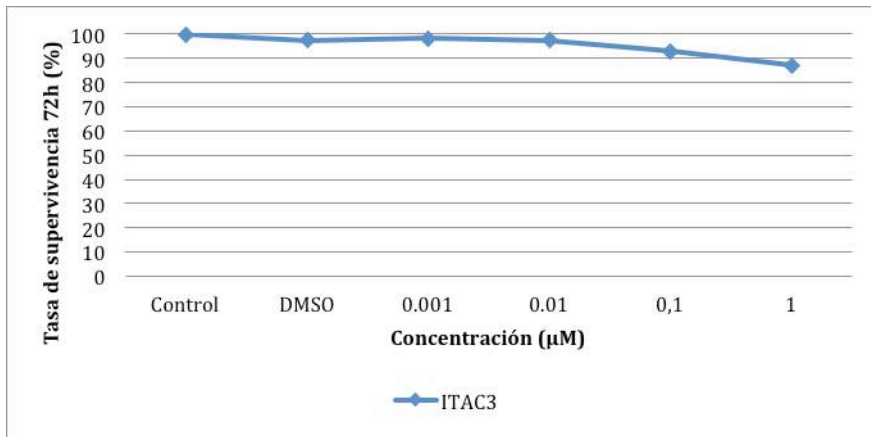


Figura 49 Crizotinib y tasa de supervivencia a las 72 h.

Se probaron concentraciones de vandetanib de manera ascendente y se incubaron la líneas celulares durante 24, 48 y 72 horas. Este fármaco produjo una disminución celular de más del 50 % a las 72h después de aumentar la concentración a 1 µM (Figuras 50-52).

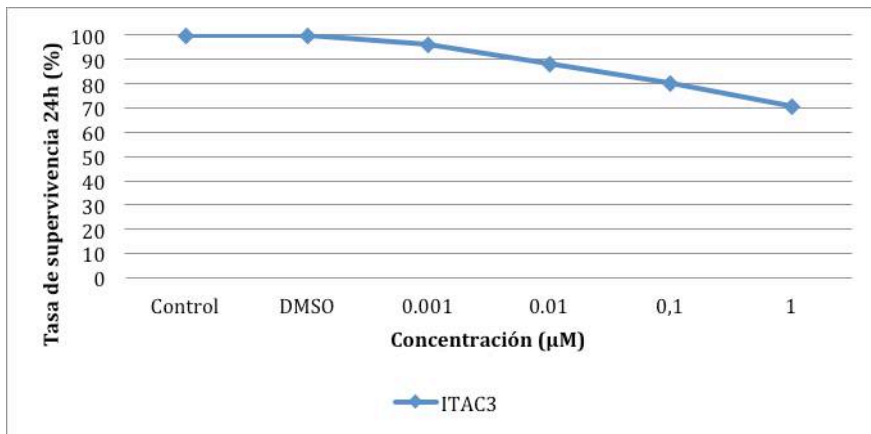


Figura 50 Vandetanib y tasa de supervivencia a las 24 h.

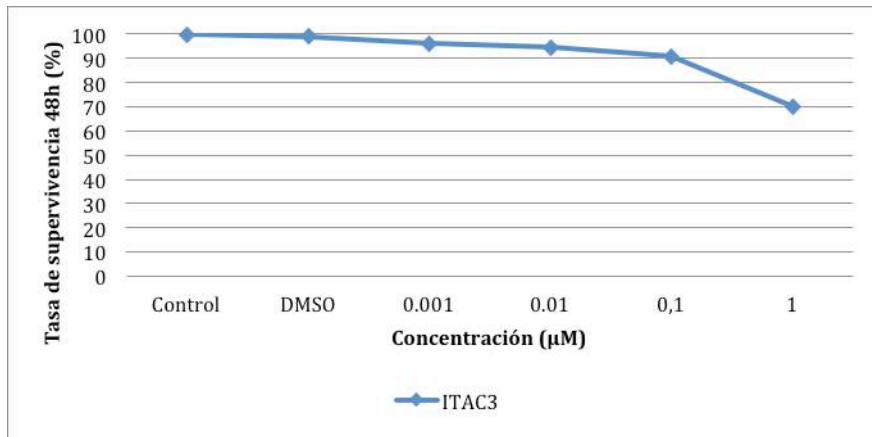


Figura 51 Vandetanib y tasa de supervivencia a las 48 h.

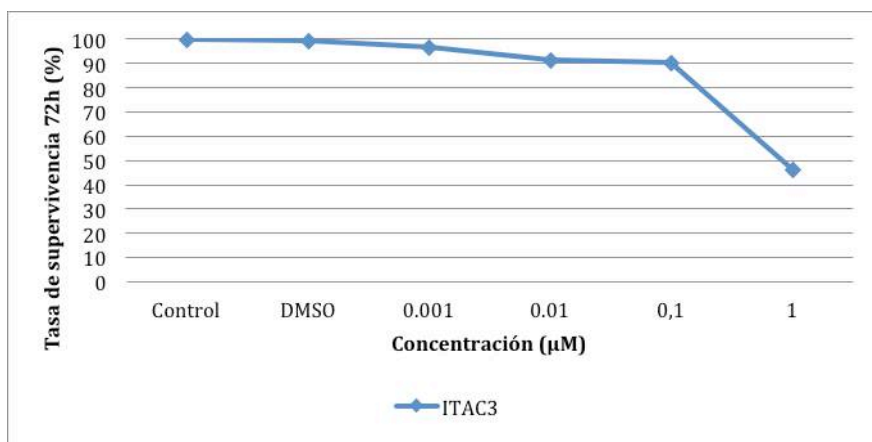


Figura 52 Vandetanib y tasa de supervivencia a las 72 h.

4.15 Secuenciación

De las 150 muestras de ITAC se pudieron analizar 48 con técnicas de secuenciación de nueva generación. Encontramos mutaciones no sinónimas recurrentes, 5 de ALK, 3 de RET y 6

de ROS 1. En un caso observamos una translocación de ALK con EHP1 y una amplificación de ALK. (Tabla 1).

Tabla 1: Mutaciones de ALK, RET, y ROS encontradas con técnicas de secuenciación.

Mutación	N=48
ALK	5
RET	3
ROS1	6
Translocación	
ALK-EHBP1	1
Amplificación	
ALK	1

El número de transiciones de C > T fue significativamente mayor que otras sustituciones de nucleótidos (Tabla 2). Y aunque la mutaciones no sinónimas alteran la secuencia de la proteína, no hemos demostrado que afectan la expresión y función de las mismas.

Además se encontró 10 mutaciones transicionales es decir sustitución de una base púrica por otra base púrica ($A \Leftrightarrow G$), o una base pirimidínica por otra base pirimidínica ($C \Leftrightarrow T$) y 3 mutaciones transversionales es decir las sustituciones de una purina por una pirimidina o viceversa, las consecuencias de la transversión tienden a ser más drásticas que las de la transición y pueden ser causadas por la radiación ionizante y por agentes alquilantes.

Resultados

Tabla 2: Mutaciones transicionales y transversionales de ALK, RET y ROS.

Gen	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Frecuencia
ALK	T 1427 C	V 476 A	0,48
ALK	C 2039 T	T 680 I	0,47
ALK	C 2039 T	T 680 I	0,07
ALK	C 2039 T	T 680 I	0,71
ALK	G 661 C	G 221 R	0,52
RET	C 2944 T	R 982 C	0,19
RET	C 2944 T	R 982 C	0,71
RET	C 2944 T	R 982 C	0,56
ROS1	T 1144 C	Y 382 H	0,51
ROS1	C 1958 T	S 653 F	0,37
ROS1	A 229-94 C		0,50
ROS1	C 2411 A	T 804 N	0,42
ROS1	G 5704 A	E 1902 K	0,40
ROS1	C 6061 T	P 2021 S	0,49
ROS1	G 6116 A	R 2039 H	0,23

5 DISCUSIÓN

5.1 Justificación

En nuestra especialidad el CCC tiene una alta relevancia ya que se trata de la 6ª neoplasia más común en el mundo, un porcentaje reducido de los tumores de esta localización corresponden a los ACNS. La supervivencia varía dependiendo de la localización y el estadio, pero en general la mortalidad es elevada y hay escasas opciones de tratamiento.

En relación al CCC son pocos los trabajos que demuestran la expresión de *ALK*, *RET* y *ROS*. Sólo se ha estudiado *ALK* y *ROS* en algunos tipos de tumores poco frecuentes como son el pseudotumor inflamatorio (IMT) y el rabdomiosarcoma de cabeza y cuello [72, 73]. Y la expresión de *RET* se ha estudiado en los tumores medulares de tiroides.

Por la importancia de estas alteraciones genéticas en el adenocarcinoma de pulmón. Y la importancia los inhibidores de la tirosina quinasa, fármacos seguros para los pacientes y que han mostrado una buena respuesta en estos casos, creemos conveniente estudiar dichas proteínas en los ACNS ya que ambos tumores comparten similitudes clínicas e histológicas.

Aunque la presencia de estas alteraciones es poco frecuente en los adenocarcinomas de pulmón y la incidencia de ACNS es mucho menor a la de pulmón, poseemos una muestra representativa de 150 casos, para analizar estas alteraciones de las tirosina quinasas.

5.2 Aspectos clínico patológicos

Los datos obtenidos de las variables clínico-patológicas estudiadas en los 150 pacientes son similares a datos descritos en otras series publicadas de ACNS [117] La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados de un ACNS alrededor de la sexta década de la vida, como se ha reportado en la literatura [10].

La exposición laboral al polvo de la madera fue el principal factor de riesgo y se observó en 88% de los pacientes, dato similar a otros estudios [118, 119]. La exposición laboral fue de forma prolongada, con una media de 32 años, también un dato similar a otros estudios ya publicados [7, 120].

Los antecedentes de tabaco y alcohol no se relacionan de manera causal, aunque sí se asocian epidemiológicamente como se observa en otros estudios [121]. En nuestra serie estas variables se presentaron en el 47% y 49% de pacientes, respectivamente.

En cuanto a la histopatología, el subtipo colónico es el más frecuente (58%) seguido en frecuencia por los mucinosos, solidos y papilares, similar a otras series publicadas [7, 117].

La mayoría de los casos fueron diagnosticados en estadios tumorales avanzados III y IV (69%) siendo un dato común con la mayoría de series [117, 122, 123] y que se explica por la clínica inespecífica y muchas veces silente en estadios precoces.

La radioterapia postoperatoria fue indicada en la mayor parte de los pacientes (63,5%), como se realiza en otros hospitales y se recoge en otras publicaciones [120, 124].

Las recidivas locales se presentaron en 47% de los casos y se observaron metástasis en 11% de los casos.

La supervivencia global de los pacientes de nuestra serie fue del 48% a los 5 años cifras similares a las recogidas en la mayoría de las series publicadas [5, 117, 123].

La supervivencia es mayor en los estadios precoces, observando, una caída en la supervivencia desde el 70% en el estadio I a menos del 19% en el estadio IV, similar a otras publicaciones [5, 117, 123].

Otro dato que influyó de manera negativa en la supervivencia fue la invasión intracraneal, como también habían publicado otros autores [123, 125]. De los pacientes que presentaron invasión intracraneal al momento del diagnóstico solo el 7% seguían vivos a los 5 años, estos resultados fueron estadísticamente significativos.

Las principales causas de fallo en el tratamiento de los ACNS fueron las recidivas locales y las metástasis como ya se había

publicado [5, 126]. Ambas situaciones se relacionan en nuestro estudio, de forma significativa, con una menor supervivencia ($p= 0,002$ y $p=0,000$ respectivamente).

5.3 Aspectos genéticos-moleculares

En los últimos años han surgido muchas expectativas en referencia a la genética molecular y a las terapias biológicas dirigidas, especialmente con los inhibidores de las tirosina quinasa [1]. En los adenocarcinomas de colon, mama y especialmente de pulmón, se han descrito dianas moleculares en relación con alteraciones en proteínas con actividad tirosina quinasa como EGFR, ALK, HER2 (human epidermal growth receptor-2 factor) o cMET (hepatocyte growth factor receptor) [61], lo cual ha permitido el desarrollo y aplicación de terapias biológicas.

Estas alteraciones moleculares pueden ser mutaciones, amplificaciones génicas y translocaciones cromosómicas, conllevando en la mayor parte de los casos a la sobreexpresión de la proteína y la activación de una ruta de señalización que dará lugar al crecimiento celular descontrolado.

Por su similitud histológica con los adenocarcinomas de colon y de pulmón [127] se ha intentado identificar en los ACNS las alteraciones más frecuentes observadas en estos tumores. En particular, se han hecho estudios dirigidos a buscar alteraciones en los genes EGFR, FGFR1(fibroblast growth factor receptor 1)

y cMET. La amplificación génica y la sobreexpresión proteica de EGFR ocurre en un 40% y 20-32% de los ACNS respectivamente, sin observarse mutaciones [36, 128, 129]. La sobreexpresión de HER2 ha sido descrita en sólo un 8% de los ACNS [130]. Progetti et al. [131] detectaron mediante FISH amplificaciones de FGFR1 en tumores nasosinusales, pero sólo en los carcinomas epidermoides y no en los ACNS. No se han encontrado amplificaciones del gen cMET, pero sí ganancias en el 52% y sobreexpresión proteica en el 64% de los ACNS [132].

Hasta el momento no existen estudios sobre el papel de ALK, RET y ROS en los ACNS. Este estudio fue dirigido al estudio de estas proteínas tirosina quinasas, la identificación de la translocación ALK/EML4 y alteraciones en su expresión, con vista a una posible aplicación de nuevas terapias biológicas para los ACNS.

Expresión de ALK

La detección de la fusión génica entre *ALK/EML4* por una translocación en el cromosoma 2, en adenocarcinomas de pulmón y la posterior utilización del crizotinib como nueva diana terapéutica específica frente a esta alteración, ha supuesto un gran avance en la estrategia terapéutica frente a ese tipo de tumores. Se estima que del 3 al 5% de pacientes con cáncer de pulmón tienen esa alteración génica [62]. En nuestro

estudio, no encontramos una translocación de ALK utilizando la técnica de FISH. Y aunque la incidencia de ACNS es mucho menor que los adenocarcinomas de pulmón, contamos con un número representativo de 150 casos. De estos sólo se pudo analizar 60 casos con FISH, de los cuales el 5% representarían 3 casos.

A pesar de nuestros resultados negativos con respecto a la reorganización de ALK con FISH y resultados negativos con IHQ no podemos decir que no existe este tipo de alteración en los ACNS, pero sí a que hay una probabilidad muy baja de que esta mutación esté involucrada en su desarrollo, similar a otras series de adenocarcinoma de pulmón [133]. Ante esta probabilidad analizamos también estas mutaciones con técnicas de secuenciación de nueva generación, en 48 pacientes con esta patología.

La detección de la translocación de ALK debe ser realizada por FISH de acuerdo a la técnica validada para NSCLC [134]. Es importante señalar que para la interpretación del FISH, se debe tener una experiencia contrastada, ya que su análisis puede servir como un marcador de respuesta terapéutica. Las sondas 'break-apart' empleadas en este estudio tienen la ventaja de poder indicar diferentes translocaciones involucrando un sólo gen, en nuestro caso el gen ALK, pero la evaluación de las señales es más difícil. Al contrario, las sondas 'fusión' producen una conjunción de las señales verde y roja fácil de detectar, pero sólo pueden identificar una translocación particular.

Con respecto a los ACNS de nuestro proyecto hemos analizado 60 muestras. Hemos observado que la técnica de la *ALK/FISH* presenta una mayor dificultad que la FISH utilizada de forma habitual en nuestro laboratorio. Hasta ahora sólo se había propuesto como método estandarizado y específico en adenocarcinomas de pulmón, pero no se había desarrollado hasta nuestro proyecto en ACNS [77, 78]. Hemos comprobado, en las muestras estudiadas, que realizar la técnica es muy trabajosa, sobre todo en la interpretación de los resultados. Los problemas se deben principalmente a la detección clara de las señales de fluorescencia, por la consistencia mucosa del tejido y por la absorción de la luz en estructuras adyacentes a los cromosomas estudiados. Además ha sido difícil interpretar los resultados debido a la distribución tridimensional de los genes y por las características histológicas de las muestras. Otros autores han observado problemas similares a los detectados por nosotros, no encontrando relación completa entre el número de copias de *ALK* y las células *ALK-FISH* positivas, hecho que atribuyen a dificultades técnicas y no biológicas [79, 135]. En otro trabajo se hace una revisión detallada de *ALK-FISH* en casos con *ALK/EML4*, destacando la dificultad para interpretar los resultados debido a que la fusión génica ocurre en el mismo cromosoma y no en cromosomas diferentes, como en *BCR/ABL* de la leucemia mielocítica crónica o el *SYT/SSX* del sarcoma sinovial [63, 77].

Desafortunadamente, en el presente estudio no se ha hallado la translocación ALK/EML4 en ninguno de los 60 casos analizables con FISH. Dato similar a otros estudios en carcinomas colorectales, en los que no encontraron la translocación de ALK, mediante FISH, en 12 casos [136] y en 756 casos estudiados [137]. En otro estudio similar al nuestro en adenocarcinomas colorectales, se identificó 1 caso (0,4%) con una translocación de ALK mediante FISH [138]. Esto demuestra la baja incidencia de translocaciones de ALK en tumores sólidos.

Lo que si observamos es un número mayor de copias de *ALK*, lo que indica la inestabilidad génica de los ACNS [28, 139].

Encontramos ganancias en el número de copias de la región cromosómica 2p23 en 10 casos (16,6%), observado como 3 ó más señales FISH por núcleo. Parecido a otros estudios en CRC que fueron FISH ALK (-) y presentaron amplificaciones de ALK en 20 casos (2,6%) [137]. Aunque en nuestro estudio tampoco fueron acompañadas por una sobreexpresión de la proteína de ALK en la IHQ.

El incremento en el número de copias de gen *ALK* es producido principalmente por una polisomía de cromosoma 2, y ha sido demostrada en un 80% de los cánceres de pulmón de células no pequeñas [140]. En los casos de polisomía es necesario que al menos una de las copias por núcleo esté fusionada para que sea *ALK*-FISH positivo. Un alto número de copias del gen no alterado (sin fusión) no se relaciona con la respuesta al crizotinib.

Para complementar los resultados de la FISH realizamos la IHQ. Como hemos mencionado esta técnica es más barata y rápida que la FISH, y mejora la sensibilidad para la detección de alteraciones de *ALK* en los ACNS. Como esperábamos, al realizar la IHQ se confirmó los datos de la FISH, en los 86 casos analizables de ACNS no encontramos sobreexpresión de *ALK*.

Por último complementamos el estudio realizando la secuenciación de 48 casos de ACNS. Se realizaron los estudios de secuenciación en 24 casos en los que se había realizado previamente la IHQ y la FISH y en otros 24 casos en los que no se pudo realizar la FISH ni la IHQ por criterios de inclusión. Se analizaron los resultados y se compararon con otros estudios, tomando como referencia la mutaciones de *ALK* ya publicadas tanto translocaciones en IMT, adenocarcinomas de pulmón [75, 141, 142], linfoma [143] y tumores anaplásicos de tiroides [144] como mutaciones sin sentido de *ALK* en cerebro [145] y en pulmón [146].

De los casos analizados mediante secuenciación encontramos 5 con mutaciones no sinónimas de *ALK* y 1 caso con una translocación *ALK-EHBP1* que no se ha publicado todavía. El caso que presentó la translocación también presentó amplificaciones del gen. Salvo por la translocación los datos encontrados estarían en relación con mutaciones que aparecen en una población normal, esta información es difícil de relacionar con las características clínico patológicas por su excepcional frecuencia. Además, estas mutaciones no

produjeron sobreexpresión de ALK cuando se revisó los mismos casos mediante IHQ y FISH. En comparación con tumores colorectales encontramos datos parecidos a nuestro estudio. En los que a pesar de obtener resultados negativos con FISH, gracias a las técnicas de secuenciación de nueva generación se han demostrado translocaciones como PRKAR1A-ALK [147], o C2orf44-ALK (1 de 40 casos).

En cuanto a las terapias dirigidas hacia ALK existen una serie de estudios que han demostrado una buena respuesta de los pacientes con adenocarcinomas pulmonares al crizotinib [82], también se ha observado una buena respuesta en pacientes que presentan otros tumores con la translocación en ALK [75]. Este medicamento produce el control de la enfermedad en aproximadamente el 90% de los pacientes con la translocación ALK/EML4 y la supervivencia libre de progresión a los 6 meses es de más del 70% [1]. La supervivencia global no varía significativamente debido a la resistencia a estos fármacos.

Los mecanismos de resistencia frente al crizotinib son variados y es por eso que en la actualidad se están estudiando nuevos medicamentos, algunos dirigidos contra múltiples dianas tirosina quinasa, y otros de nueva generación con una actividad mayor frente a ALK como lo es el brigatinib. Este fármaco ha demostrado eficacia en pacientes con NSCLC ALK (+) y actualmente se encuentran realizando ensayos clínicos en fase 3 [148].

Al realizar el estudio de sensibilidad en nuestra línea celular no observamos respuesta de las células del ACNS a diferentes concentraciones de crizotinib. Este resultado era esperable ya que no encontramos alteraciones de ALK en la línea celular. En un futuro sería interesante realizar un estudio con una línea celular que presente la nueva translocación identificada, ALK-EHBP1 .

Expresión de RET

En cuanto a RET, 1 a 2% de los cánceres de pulmón tienen reordenamientos en este gen, que codifican el receptor de la tirosina quinasa RET [149]. Los reordenamientos de RET se encuentran principalmente en los adenocarcinomas de pulmón. Se han publicado translocaciones como KIB5B-RET [150] y CCDC6-RET [151]. Estas translocaciones se presentan más comúnmente en los pacientes no fumadores, y son mutuamente excluyentes con otras mutaciones, tales como EGFR, ALK, o KRAS[91]. En nuestra serie no encontramos reordenamientos de RET posiblemente en relación con la baja proporción en la que se presentan en los tumores pulmonares.

El gen *RET* y su receptor de superficie regulan un amplio número de vías moleculares que contribuyen al desarrollo del cáncer, y han sido estudiados en profundidad en los cánceres de tiroides [152].

En el cáncer medular de tiroides (CMT) hereditario, las mutaciones de RET se han descrito en 88% de los casos [153].

Las mutaciones RAS han sido descritos en el 69% de los casos que expresan RET del tipo salvaje y en 2,5% de los casos de CMT esporádicos, RET-positivas [154].

Al realizar la IHQ en 80 pacientes con ACNS observamos una tinción positiva para RET en la membrana celular en el 71% de los casos y ausencia de tinción en 29% de los casos. Comparamos estos casos con la IHQ de una muestra control y observamos que en el tejido sano encontramos una tinción positiva para RET. De los resultados que hemos obtenido en nuestro estudio observamos que la falta de expresión de RET está asociada con un peor pronóstico mientras que la tinción positiva se asocia a un mejor pronóstico. Datos parecidos se han encontrado en el cáncer colorectal [155] de histología similar a la mayoría de nuestros casos de ITAC (colónico) .

Con estos datos nos planteamos que RET podría funcionar como un gen supresor. Se ha demostrado el mismo efecto en un estudio de cáncer colorectal [155]. Pero necesitamos más estudios para confirmar esta teoría.

También realizamos la secuenciación de 48 casos tomando como referencia la mutaciones de RET ya publicadas tanto translocaciones en adenocarcinomas de pulmón (TRIM33-RET; KIF5B-RET; CCDC6-RET; NCOA4-RET) [91, 156-158] y translocaciones en tumores de tiroides (RET/PTC) [159, 160] como mutaciones sin sentido en tumores medulares de tiroides [161, 162]. Al realizar la secuenciación encontramos 3 casos con mutaciones no sinónimas de RET. No se pudo realizar

correlaciones con la IHQ ya que los casos que presentaron la mutaciones fueron diferentes a los que se pudieron analizar con la IHQ. Estos resultados, por su frecuencia, estarían en relación con mutaciones que aparecen en una población normal. Y al ser pocos casos, la relaciones clínico patológicas son difíciles de analizar.

En cuanto al tratamiento dirigido hacia RET. Existen una serie de inhibidores de la tirosina quinasa multidirigidos que actúan en pacientes con alteraciones en RET. Estos fármacos han sido aprobados por la FDA para su uso en ciertos tumores malignos. Estos incluyen el vandetanib, sorafenib, sunitinib, cabozantinib y levatinib. In vitro se ha observado la inhibición de RET y la inhibición del crecimiento tumoral con fármacos como el vandetanib, sunitinib y sorafenib [91, 150, 158]. El sorafenib y lenvatinib están aprobados por la FDA para el tratamiento de los tumores diferenciados de tiroides refractarios al radio yodo [163] y este último, el lenvatinib, además ha demostrado inhibición del crecimiento tumoral en ensayos preclínicos en adenocarcinomas pulmonares [164]. También se han reportado casos clínicos en los que se observa una buena respuesta al utilizar vandetanib (300 mg al día) en pacientes con reorganización de RET en tumores de pulmón refractarios a la quimioterapia [157].

En general los fármacos han sido aprobados por su seguridad y presentan toxicidades en un porcentaje pequeño. Las

toxicidades incluyen diarrea, eritema palmo-plantar, la fatiga, elevación de las transaminasas, y trombocitopenia [162, 165].

En nuestra línea celular de ITAC probamos el vandetanib por ser uno de los inhibidores más utilizados para los ensayos preclínicos y por estar aprobado para su uso en CMT y NSCLC. Probamos con concentraciones ascendentes del fármaco, observando respuesta e inhibición en el crecimiento tumoral a las 72 horas. Observamos esta disminución del crecimiento celular a partir de una concentración de 0,1 μM de vandetanib, hasta llegar a la disminución del 50% del crecimiento celular (IC 50) con una concentración de 1 μM de vandetanib. Otros artículos que han publicado ensayos preclínicos en líneas celulares, muestran una disminución del crecimiento celular con concentraciones de vandetanib similares a nuestros resultados. Samadi AK. et al [166], presentaron un IC 50 con concentraciones entre 0,250 a 1,380 μM en líneas celulares de carcinoma medular de tiroides. Taguchi F. et al [167], demostró un IC 50 con concentraciones de 0.14 μM y 5.92 μM de vandetanib en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Y Yoshikawa et al [168], alcanzó un IC 50 con concentraciones de 0,22 μM con el uso de vandetanib en un estudio de líneas celulares de conlangiocarcinoma. En todos estos estudios se continuó la investigación en líneas celulares implantadas en ratones, con resultados satisfactorios en la mayoría de casos.

La importancia de RET como un mediador central de los procesos que conducen al desarrollo y progresión del cáncer de tiroides proporciona el fundamento para el estudio de los inhibidores de la tirosina quinasa y los inhibidores multiquinasa (específicamente, aquellos que se dirigen a RET) [153]. Todavía no está claro si la inhibición dirigida a RET frente a otros receptores celulares, particularmente VEGFR, es el principal mecanismo por el cual los inhibidores de la multiquinasa conducen las respuestas clínicas. Mientras que los inhibidores específicos, tales como inhibidores de RAS, BRAF, MEK, PI3K, mTOR, y Akt, son terapias potenciales, estos agentes aún no están aprobados para su uso, y la inhibición multiquinasa es el enfoque terapéutico primario [95, 153].

Aunque en nuestro estudio no hemos encontrado resultados claros con respecto a las mutaciones de RET, si hemos encontrado asociaciones con respecto a la supervivencia y al tratamiento. En nuestra serie observamos que una mejor diferenciación tumoral y a una mejor supervivencia se asocian a una expresión de RET en la membrana. A su vez la falta de expresión de RET se asocia a menor diferenciación celular y un peor pronóstico. En cuanto al tratamiento hemos demostrado una inhibición del crecimiento tumoral con concentraciones altas de vandetanib a las 72 horas. Como ya lo hemos mencionado previamente la concentración de fármaco que logró la inhibición del crecimiento celular fue alta y aunque su respuesta aumentó progresivamente con las horas y produjo

disminución celular del 50% no consideramos que tuvo un efecto significativo en el crecimiento tumoral. De todas formas, con estos datos y en base a otros estudios publicados se podría realizar estudios en ratones con el vandetanib.

Expresión de ROS

Al igual que ALK y RET los reordenamientos de ROS1 producen una activación de su dominio quinasa que favorecen la proliferación tumoral. Las diferentes proteínas de fusión pueden tener diferentes propiedades oncológicas [115]. Los reordenamientos de ROS1 ocurren en aproximadamente el 1% de los pacientes con NSCLC [169]. Un porcentaje bajo inclusive para los tumores de pulmón que son muchos más prevalentes que los ACNS.

15.000 casos de los aproximadamente 1,5 millones de nuevos casos de NSCLC en todo el mundo, puede ser producido por fusiones de ROS1 [170], en nuestra serie representarían 1,5 casos de 150. Al igual que con reordenamientos ALK y RET, los reordenamientos ROS1 son más comunes en pacientes que nunca han fumado. A nivel genético las mutaciones de ALK y ROS1 rara vez se producen en el mismo tumor[171]. En nuestro estudio al realizar la IHQ no encontramos en ningún caso la expresión de ROS1. En un estudio similar al nuestro, realizado en pacientes con cáncer colorectal, se observó fusiones de ROS

en 2 casos (0,8%), y en un caso se confirmó la translocación SLC34A2-ROS con RT-PCR [138].

Al analizar los 48 casos con técnicas de SNG observamos 3 casos con mutaciones no sinónimas de ROS1. 1 caso presentaba mutaciones no sinónimos de ALK Y ROS1. 1 caso presentaba mutaciones no sinónimos de ALK, RET y ROS1. Y en 1 caso se observó que coincidía la translocación de ALK-EHBP1 y una mutación no sinónima de ROS1.

Salvo por la translocación los datos estarían en relación con mutaciones que aparecen en una población normal.

No encontramos similitudes con otros estudios que, aunque muy poco frecuente, si han demostrado la translocación de ROS1 (CD74-ROS1) en adenocarcinomas de pulmón y CRC [112, 138, 172].

En varias líneas celulares se evidencia que ROS1 representa una diana terapéutica del inhibidor de ALK el crizotinib. ALK y ROS1 comparten una identidad de aminoácidos similar especialmente en los sitios de unión al ATP. El crizotinib se une con alta afinidad tanto a ALK y ROS1 y en ensayos en líneas celulares se ha demostrado que tanto ALK como ROS1 son sensibles a este fármaco. Presentando una inhibición del 50% a una concentración máxima de 40 a 60 nM [170]. En nuestra línea celular no se observó disminución de la proliferación celular con el crizotinib. Resultado esperable debido a la ausencia de translocaciones de ROS1.

Discusión

Debido a los resultados obtenidos en nuestra investigación y debido a la incidencia de los ACNS, cada caso debería ser valorado de forma individual y se debería analizar ALK, RET y ROS en los estudios de secuenciación. Faltan estudios para demostrar la efectividad del crizotinib o el vandetanib en estos tumores.

6 CONCLUSIONES

1. Estudiamos una muestra de 150 casos de ACNS, la mayoría diagnosticados en sexta década de la vida y en estadios tumorales avanzados. La radioterapia postoperatoria fue indicada en el 63,5% de los pacientes. La exposición laboral al polvo de la madera fue el principal factor de riesgo y se observó en el 88%. La supervivencia global de los pacientes de nuestra serie fue del 48% a los 5 años.
2. No se identificó expresión proteica de ALK en los ACNS de nuestra serie, tampoco identificamos la translocación ALK-EML4 con FISH.
3. Se identificó expresión de RET en el 71% de los ACNS estudiados y ausencia de la misma en 29% de los ACNS. La ausencia de RET se asoció con marcadores clínicos adversos en pacientes con ACNS.
4. No se identificó expresión de ROS en los ACNS de nuestra serie.
5. Se estudiaron 48 casos con técnicas de secuenciación de nueva generación y se observó 11 casos con mutaciones en ALK, RET y ROS. Observamos 3 mutaciones no sinónimas en *ALK*, 2 mutaciones no sinónimas en *RET*, 3 mutaciones no sinónimas en *ROS1*, 1 caso con mutaciones no sinónimos de ALK y ROS1, 1 caso con mutaciones no sinónimos de ALK, RET y ROS1, y 1 caso

Conclusiones

se observó la translocación de ALK-EHBP1 y una mutación no sinónima de ROS1.

6. En la línea celular desarrollada en nuestro laboratorio se estudió la respuesta de crizotinib y vandetanib.

No se observó disminución en la proliferación tumoral con crizotinib.

Se observó una disminución de más del 50% de la proliferación tumoral con concentraciones de entre 0,1 y 1 μm . y después de 72h.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB, Varellagarcía M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ: **Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer.** *N Engl J Med* 2010, **363**(18):1693-1703.
2. Ansa B, Goodman M, Ward K, Kono SA, Owonikoko TK, Higgins K, Beitler JJ, Grist W, Wadsworth T, El-Deiry M, Chen AY, Khuri FR, Shin DM, Saba NF: **Paranasal sinus squamous cell carcinoma incidence and survival based on Surveillance, Epidemiology, and End Results data, 1973 to 2009.** *Cancer* 2013, **119**(14):2602-2610.
3. Kuijpers JH, Louwman MW, Peters R, Janssens GO, Burdorf AL, Coebergh JW: **Trends in sinonasal cancer in The Netherlands: more squamous cell cancer, less adenocarcinoma. A population-based study 1973-2009.** *Eur J Cancer* 2012, **48**(15):2369-2374.
4. Youlden DR, Cramb SM, Peters S, Porceddu SV, Moller H, Fritschi L, Baade PD: **International comparisons of the incidence and mortality of sinonasal cancer.** *Cancer Epidemiol* 2013, **37**(6):770-779.
5. Choussy O, Ferron C, Vedrine PO, Toussaint B, Lietin B, Marandas P, Babin E, De Raucourt D, Reyt E, Cosmidis A, Makeiff M, Dehesdin D, Group GS: **Adenocarcinoma of Ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases.** *Laryngoscope* 2008, **118**(3):437-443.
6. Turner JH, Reh DD: **Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data.** *Head Neck* 2012, **34**(6):877-885.
7. Nuñez F Suárez C, Álvarez I, Losa JL, Barthe P, Fresno M: **Sino-nasal adenocarcinoma: epidemiological and**

- clinicopathological study of 34 cases.** *J Otolaryngol* 1993, **22**:86-90.
8. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: **Arsenic, metals, fibres, and dusts.** . *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 2012, **100**:11-465.
 9. Wilhelmsson B, Lundh B: **Nasal epithelium in woodworkers in the furniture industry. A histological and cytological study.** *Acta Otolaryngol* 1984, **98**(3-4):321-334.
 10. Llorente JL, Lopez F, Suarez C, Hermsen MA: **Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances.** *Nat Rev Clin Oncol* 2014, **11**(8):460-472.
 11. Barnes L, Eveson, J. W., Reichart, P. & Sidransky, D. (eds): **World Health Organization Classification of Tumours Vol. 9: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours** *IARC Press.*
 12. Sobin LH, Gospodarowicz, M. K. & Wittekind CHE: **International Union Against Cancer (UICC) TNM Classification of Malignant Tumors 7th edn** *Wiley-Blackwell* 2009.
 13. Lund VJ, Stammberger H, Nicolai P, Castelnuovo P, Beal T, Beham A, Bernal-Sprekelsen M, Braun H, Cappabianca P, Carrau R, Cavallo L, Clarici G, Draf W, Esposito F, Fernandez-Miranda J, Fokkens W, Gardner P, Gellner V, Hellquist H, Hermann P, Hosemann W, Howard D, Jones N, Jorissen M, Kassam A, Kelly D, Kurschel-Lackner S, Leong S, McLaughlin N, Maroldi R, Minovi A, Mokry M, Onerci M, Ong YK, Prevedello D, Saleh H, Sehti DS, Simmen D, Snyderman C, Solares A, Spittle M, Stamm A, Tomazic P, Trimarchi M, Unger F, Wormald PJ, Zanation A, European Rhinologic Society Advisory Board on Endoscopic Techniques in the Management of Nose PS, Skull Base T: **European position paper on endoscopic management of tumours of the nose, paranasal sinuses and skull base.** *Rhinol Suppl* 2010(22):1-143.
 14. Llorente JL, Lopez F, Camporro D, Fueyo A, Rial JC, de Leon RF, Suarez C: **Outcomes following Microvascular**

- Free Tissue Transfer in Reconstructing Skull Base Defects.** *J Neurol Surg B Skull Base* 2013, **74**(5):324-330.
15. Duprez F, Madani I, Morbee L, Bonte K, Deron P, Domjan V, Boterberg T, De Gerssem W, De Neve W: **IMRT for sinonasal tumors minimizes severe late ocular toxicity and preserves disease control and survival.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012, **83**(1):252-259.
 16. Hanna EY, Cardenas AD, DeMonte F, Roberts D, Kupferman M, Weber R, Rosenthal D, Kies M: **Induction chemotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the paranasal sinuses.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2011, **137**(1):78-81.
 17. Homma A, Oridate N, Suzuki F, Taki S, Asano T, Yoshida D, Onimaru R, Nishioka T, Shirato H, Fukuda S: **Superselective high-dose cisplatin infusion with concomitant radiotherapy in patients with advanced cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses: a single institution experience.** *Cancer* 2009, **115**(20):4705-4714.
 18. Papadimitrakopoulou VA, Ginsberg LE, Garden AS, Kies MS, Glisson BS, Diaz EM, Jr., Clayman G, Morrison WH, Liu DD, Blumenschein G, Jr., Lippman SM, Schommer D, Gillenwater A, Goepfert H, Hong WK: **Intraarterial cisplatin with intravenous paclitaxel and ifosfamide as an organ-preservation approach in patients with paranasal sinus carcinoma.** *Cancer* 2003, **98**(10):2214-2223.
 19. Hoppe BS, Nelson CJ, Gomez DR, Stegman LD, Wu AJ, Wolden SL, Pfister DG, Zelefsky MJ, Shah JP, Kraus DH, Lee NY: **Unresectable carcinoma of the paranasal sinuses: outcomes and toxicities.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008, **72**(3):763-769.
 20. Lee MM, Vokes EE, Rosen A, Witt ME, Weichselbaum RR, Haraf DJ: **Multimodality therapy in advanced paranasal sinus carcinoma: superior long-term results.** *Cancer J Sci Am* 1999, **5**(4):219-223.
 21. Kies MS, Holsinger FC, Lee JJ, William WN, Jr., Glisson BS, Lin HY, Lewin JS, Ginsberg LE, Gillaspay KA, Massarelli E, Byers L, Lippman SM, Hong WK, El-Naggar AK, Garden AS, Papadimitrakopoulou V: **Induction chemotherapy**

- and cetuximab for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: results from a phase II prospective trial. *J Clin Oncol* 2010, **28**(1):8-14.
22. Knecht PP, Ah-See KW, vd Velden LA, Kerrebijn J: **Adenocarcinoma of the ethmoidal sinus complex: surgical debulking and topical fluorouracil may be the optimal treatment.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001, **127**(2):141-146.
23. Bossi P, Perrone F, Miceli R, Cantu G, Mariani L, Orlandi E, Fallai C, Locati LD, Cortelazzi B, Quattrone P, Potepan P, Licitra L, Pilotti S: **Tp53 status as guide for the management of ethmoid sinus intestinal-type adenocarcinoma.** *Oral Oncol* 2013, **49**(5):413-419.
24. Choi IJ, Kim DW, Kim DY, Lee CH, Rhee CS: **Predictive markers for neoadjuvant chemotherapy in advanced squamous cell carcinoma of maxillary sinus: Preliminary report.** *Acta Otolaryngol* 2013, **133**(3):291-296.
25. Kang JH, Cho SH, Kim JP, Kang KM, Cho KS, Kim W, Seol YM, Lee S, Park HS, Hur WJ, Choi YJ, Oh SY: **Treatment outcomes between concurrent chemoradiotherapy and combination of surgery, radiotherapy, and/or chemotherapy in stage III and IV maxillary sinus cancer: multi-institutional retrospective analysis.** *J Oral Maxillofac Surg* 2012, **70**(7):1717-1723.
26. Cantu G, Solero CL, Miceli R, Mattana F, Riccio S, Colombo S, Pompilio M, Lombardo G, Formillo P, Quattrone P: **Anterior craniofacial resection for malignant paranasal tumors: a monoinstitutional experience of 366 cases.** *Head Neck* 2012, **34**(1):78-87.
27. Haerle SK, Gullane PJ, Witterick IJ, Zweifel C, Gentili F: **Sinonasal carcinomas: epidemiology, pathology, and management.** *Neurosurg Clin N Am* 2013, **24**(1):39-49.
28. Ariza M, Llorente JL, Alvarez-Marcas C, Baragano L, Salas A, Rodriguez Prado N, Hermsen M, Suarez C, Sampedro A: **Comparative genomic hybridization in primary sinonasal adenocarcinomas.** *Cancer* 2004, **100**(2):335-341.

29. Perez-Escuredo J, Lopez-Hernandez A, Costales M, Lopez F, Ares SP, Vivanco B, Llorente JL, Hermsen MA: **Recurrent DNA copy number alterations in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma.** *Rhinology* 2016.
30. Perrone F, Oggionni M, Birindelli S, Suardi S, Tabano S, Romano R, Moiraghi ML, Bimbi G, Quattrone P, Cantu G, Pierotti MA, Licitra L, Pilotti S: **TP53, p14ARF, p16INK4a and H-ras gene molecular analysis in intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses.** *Int J Cancer* 2003, **105**(2):196-203.
31. Holmila R, Bornholdt J, Heikkila P, Suitiala T, Fevotte J, Cyr D, Hansen J, Snellman SM, Dictor M, Steiniche T, Schlunssen V, Schneider T, Pukkala E, Savolainen K, Wolff H, Wallin H, Luce D, Husgafvel-Pursiainen K: **Mutations in TP53 tumor suppressor gene in wood dust-related sinonasal cancer.** *Int J Cancer* 2010, **127**(3):578-588.
32. Yom SS, Rashid A, Rosenthal DI, Elliott DD, Hanna EY, Weber RS, El-Naggar AK: **Genetic analysis of sinonasal adenocarcinoma phenotypes: distinct alterations of histogenetic significance.** *Mod Pathol* 2005, **18**(3):315-319.
33. Franchi A, Palomba A, Fondi C, Miligi L, Paglierani M, Pepi M, Santucci M: **Immunohistochemical investigation of tumorigenic pathways in sinonasal intestinal-type adenocarcinoma. A tissue microarray analysis of 62 cases.** *Histopathology* 2011, **59**(1):98-105.
34. Díaz-Molina JP: **La Ruta WNT en Adenocarcinomas Nasosinuales.** Tesis doctoral. Oviedo, España: Universidad de Oviedo; 2011.
35. Diaz-Molina JP, Llorente JL, Vivanco B, Martinez-Cambor P, Fresno MF, Perez-Escuredo J, Alvarez-Marcos C, Hermsen MA: **Wnt-pathway activation in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma.** *Rhinology* 2011, **49**(5):593-599.
36. Garcia-Inclan C, Lopez F, Perez-Escuredo J, Cuesta-Albalad MP, Vivanco B, Centeno I, Balbin M, Suarez C,

- Llorente JL, Hermsen MA: **EGFR status and KRAS/BRAF mutations in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas.** *Cell Oncol (Dordr)* 2012, **35**(6):443-450.
37. Lopez F, Llorente JL, Oviedo CM, Vivanco B, Marcos CA, Garcia-Inclan C, Scola B, Hermsen MA: **Gene amplification and protein overexpression of EGFR and ERBB2 in sinonasal squamous cell carcinoma.** *Cancer* 2012, **118**(7):1818-1826.
38. Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, Dictor M, Antonsen A, Wolff H, Schlunssen V, Holmila R, Luce D, Vogel U, Husgafvel-Pursiainen K, Wallin H: **K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure.** *BMC Cancer* 2008, **8**:53.
39. Zimmermann G, Papke B, Ismail S, Vartak N, Chandra A, Hoffmann M, Hahn SA, Triola G, Wittinghofer A, Bastiaens PI, Waldmann H: **Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling.** *Nature* 2013, **497**(7451):638-642.
40. Holmila R, Cyr D, Luce D, Heikkila P, Dictor M, Steiniche T, Stjernvall T, Bornholdt J, Wallin H, Wolff H, Husgafvel-Pursiainen K: **COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure.** *Int J Cancer* 2008, **122**(9):2154-2159.
41. Kobayashi Y, Wada H, Rossios C, Takagi D, Higaki M, Mikura S, Goto H, Barnes PJ, Ito K: **A novel macrolide solithromycin exerts superior anti-inflammatory effect via NF-kappaB inhibition.** *J Pharmacol Exp Ther* 2013, **345**(1):76-84.
42. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T: **The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.** *Science* 1988, **241**(4861):42-52.
43. Radha V, Nambirajan S, Swarup G: **Association of Lyn tyrosine kinase with the nuclear matrix and cell-cycle-dependent changes in matrix-associated tyrosine kinase activity.** *Eur J Biochem* 1996, **236**(2):352-359.

44. Ruetten H, Thiernemann C: **Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase.** *Br J Pharmacol* 1997, **122**(1):59-70.
45. Nelson D, Lehninger A, Cox M: **Principles of Biochemistry.** 5th ed; New York: W. H. Freeman, 2008.
46. Wiley HS, Burke PM: **Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking.** *Traffic* 2001, **2**(1):12-18.
47. Gunby RH, Sala E, Tartari CJ, Puttini M, Gambacorti-Passerini C, Mologni L: **Oncogenic fusion tyrosine kinases as molecular targets for anti-cancer therapy.** *Anticancer Agents Med Chem* 2007, **7**(6):594-611.
48. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ, Jr., Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ, Kay AC: **Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial.** *JAMA* 2003, **290**(16):2149-2158.
49. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD: **Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor.** *N Engl J Med* 2001, **344**(14):1052-1056.
50. Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, Cobleigh MA, Wolff AC, Eisenberg PD, Lehman M, Adams BJ, Bello CL, DePrimo SE, Baum CM, Miller KD: **Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(11):1810-1816.
51. Wellstein A: **ALK receptor activation, ligands and therapeutic targeting in glioblastoma and in other cancers.** *Front Oncol* 2012, **2**:192.
52. Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, Delsol G, Mason DY: **Detection of anaplastic**

- lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1.** *Blood* 1997, **89**(4):1394-1404.
53. Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, Wellstein A: **Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types.** *J Biol Chem* 2002, **277**(39):35990-35998.
54. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, Yamamoto T: **Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system.** *Oncogene* 1997, **14**(4):439-449.
55. Bilsland JG, Wheeldon A, Mead A, Znamenskiy P, Almond S, Waters KA, Thakur M, Beaumont V, Bonnert TP, Heavens R, Whiting P, McAllister G, Munoz-Sanjuan I: **Behavioral and neurochemical alterations in mice deficient in anaplastic lymphoma kinase suggest therapeutic potential for psychiatric indications.** *Neuropsychopharmacology* 2008, **33**(3):685-700.
56. Pulford K, Lamant L, Espinos E, Jiang Q, Xue L, Turturro F, Delsol G, Morris SW: **The emerging normal and disease-related roles of anaplastic lymphoma kinase.** *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**(23):2939-2953.
57. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H: **Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer.** *Nature* 2007, **448**(7153):561-566.
58. Lamant L, Meggetto F, al Saati T, Brugieres L, de Paillerets BB, Dastugue N, Bernheim A, Rubie H, Terrier-Lacombe MJ, Robert A, Rigal F, Schlaifer D, Shiuta M, Mori S, Delsol G: **High incidence of the t(2;5)(p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse**

- transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining.** *Blood* 1996, **87**(1):284-291.
59. Janku F, Garrido-Laguna I, Petruzella LB, Stewart DJ, Kurzrock R: **Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer.** *J Thorac Oncol* 2011, **6**(9):1601-1612.
60. Alamgeer M, Ganju V, Neil Watkins D: **Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer.** *Curr Opin Pharmacol* 2013. **3**:394-401
61. Mosse YP, Wood A, Maris JM: **Inhibition of ALK signaling for cancer therapy.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(18):5609-5614.
62. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, Stubbs H, Law K, Lindeman N, Mark E, Janne PA, Lynch T, Johnson BE, Iafrate AJ, Chirieac LR: **Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(16):5216-5223.
63. Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, Sekine I, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Tsuda H: **Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas.** *Am J Surg Pathol* 2011, **35**(8):1226-1234.
64. Mischel PS, Shai R, Shi T, Horvath S, Lu KV, Choe G, Seligson D, Kremen TJ, Palotie A, Liao LM, Cloughesy TF, Nelson SF: **Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling.** *Oncogene* 2003, **22**(15):2361-2373.
65. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G: **The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**(1):11-23.
66. Bai RY, Dieter P, Peschel C, Morris SW, Duyster J: **Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(12):6951-6961.
67. Gu TL, Tothova Z, Scheijen B, Griffin JD, Gilliland DG, Sternberg DW: **NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and**

- proliferative signaling through modulation of FOXO3a.** *Blood* 2004, **103**(12):4622-4629.
68. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M: **Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer.** *Nat Med* 2008, **14**(5):518-527.
69. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K: **Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis.** *Cancer Cell* 2006, **9**(3):157-173.
70. Wozniak A, Szyfter K, Szyfter W, Florek E: **[Head and neck cancer--history].** *Przegl Lek* 2012, **69**(10):1079-1083.
71. Flint P: *Cummings Otolaryngology Head & Neck Surgery.* 5th ed; Philadelphia: Mosby Elsevier, 2010.
72. Ong HS, Ji T, Zhang CP, Li J, Wang LZ, Li RR, Sun J, Ma CY: **Head and neck inflammatory myofibroblastic tumor (IMT): evaluation of clinicopathologic and prognostic features.** *Oral Oncol* 2012, **48**(2):141-148.
73. Pillay K, Govender D, Chetty R: **ALK protein expression in rhabdomyosarcomas.** *Histopathology* 2002, **41**(5):461-467.
74. Coffin CM, Hornick JL, Fletcher CD: **Inflammatory myofibroblastic tumor: comparison of clinicopathologic, histologic, and immunohistochemical features including ALK expression in atypical and aggressive cases.** *Am J Surg Pathol* 2007, **31**(4):509-520.
75. Butrynski JE, D'Adamo DR, Hornick JL, Dal Cin P, Antonescu CR, Jhanwar SC, Ladanyi M, Capelletti M, Rodig SJ, Ramaiya N, Kwak EL, Clark JW, Wilner KD, Christensen JG, Janne PA, Maki RG, Demetri GD, Shapiro GI: **Crizotinib in ALK-rearranged inflammatory myofibroblastic tumor.** *N Engl J Med* 2010, **363**(18):1727-1733.

76. Cessna MH, Zhou H, Sanger WG, Perkins SL, Tripp S, Pickering D, Daines C, Coffin CM: **Expression of ALK1 and p80 in inflammatory myofibroblastic tumor and its mesenchymal mimics: a study of 135 cases.** *Mod Pathol* 2002, **15**(9):931-938.
77. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, Lopez-Rios F, Moch H, Olszewski W, Pauwels P, Penault-Llorca F, Rossi G: **EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations.** *Virchows Arch* 2012, **461**(3):245-257.
78. Just PA, Cazes A, Audebourg A, Cessot A, Pallier K, Danel C, Vacher-Lavenu MC, Laurent-Puig P, Terris B, Blons H: **Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of Caucasian non-smokers.** *Lung Cancer* 2012, **76**(3):309-315.
79. Wallander ML, Geiersbach KB, Tripp SR, Layfield LJ: **Comparison of reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization methodologies for detection of echinoderm microtubule-associated proteinlike 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-positive non-small cell lung carcinoma: implications for optimal clinical testing.** *Arch Pathol Lab Med* 2012, **136**(7):796-803.
80. Atherly AJ, Camidge DR: **The cost-effectiveness of screening lung cancer patients for targeted drug sensitivity markers.** *Br J Cancer* 2012, **106**(6):1100-1106.
81. Ardini E, Galvani A: **ALK Inhibitors, a Pharmaceutical Perspective.** *Front Oncol* 2012, **2**:17.
82. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, Yamazaki S, Alton GR, Mroczkowski B, Los G: **Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(12 Pt 1):3314-3322.

83. McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, Shioda T, Classon M, Maheswaran S, Zhou W, Choi HG, Smith SL, Dowell L, Ulkus LE, Kuhlmann G, Greninger P, Christensen JG, Haber DA, Settleman J: **Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors.** *Cancer Res* 2008, **68**(9):3389-3395.
84. Ou SH, Bazhenova L, Camidge DR, Solomon BJ, Herman J, Kain T, Bang YJ, Kwak EL, Shaw AT, Salgia R, Maki RG, Clark JW, Wilner KD, Iafrate AJ: **Rapid and dramatic radiographic and clinical response to an ALK inhibitor (crizotinib, PF02341066) in an ALK translocation-positive patient with non-small cell lung cancer.** *J Thorac Oncol* 2010, **5**(12):2044-2046.
85. Casalupe F, Sgambato A, Sacco PC, Palazzolo G, Maione P, Rossi A, Ciardiello F, Gridelli C: **Resistance to crizotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with ALK rearrangement: mechanisms, treatment strategies and new targeted therapies.** *Curr Clin Pharmacol* 2016.
86. Shea M, Costa DB, Rangachari D: **Management of advanced non-small cell lung cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment approaches.** *Ther Adv Respir Dis* 2016, **10**(2):113-129.
87. Knowles PP, Murray-Rust J, Kjaer S, Scott RP, Hanrahan S, Santoro M, Ibanez CF, McDonald NQ: **Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain.** *J Biol Chem* 2006, **281**(44):33577-33587.
88. Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Jr., Milbrandt J: **The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development.** *Curr Opin Neurobiol* 2000, **10**(1):103-110.
89. Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M: **GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?** *Mol Cell Neurosci* 1999, **13**(5):313-325.
90. Qi XP, Ma JM, Du ZF, Ying RB, Fei J, Jin HY, Han JS, Wang JQ, Chen XL, Chen CY, Liu WT, Lu JJ, Zhang JG, Zhang XN: **RET germline mutations identified by exome sequencing in a Chinese multiple endocrine**

- neoplasia type 2A/familial medullary thyroid carcinoma family.** *PLoS One* 2011, **6**(5):e20353.
91. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, Curran JA, Balasubramanian S, Bloom T, Brennan KW, Donahue A, Downing SR, Frampton GM, Garcia L, Juhn F, Mitchell KC, White E, White J, Zwirko Z, Peretz T, Nechushtan H, Soussan-Gutman L, Kim J, Sasaki H, Kim HR, Park SI, Ercan D, Sheehan CE, Ross JS, Cronin MT, Janne PA, Stephens PJ: **Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies.** *Nat Med* 2012, **18**(3):382-384.
 92. Rowland KJ, Moley JF: **Hereditary thyroid cancer syndromes and genetic testing.** *J Surg Oncol* 2015, **111**(1):51-60.
 93. Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortora G, Vecchio G, Ryan AJ, Fontanini G, Fusco A, Santoro M: **ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases.** *Cancer Res* 2002, **62**(24):7284-7290.
 94. Cabanillas ME, Habra MA: **Lenvatinib: Role in thyroid cancer and other solid tumors.** *Cancer Treat Rev* 2016, **42**:47-55.
 95. Haugen BR, Sherman SI: **Evolving approaches to patients with advanced differentiated thyroid cancer.** *Endocr Rev* 2013, **34**(3):439-455.
 96. Matsushime H, Wang LH, Shibuya M: **Human c-ros-1 gene homologous to the v-ros sequence of UR2 sarcoma virus encodes for a transmembrane receptorlike molecule.** *Mol Cell Biol* 1986, **6**(8):3000-3004.
 97. Feldman RA, Wang LH, Hanafusa H, Balduzzi PC: **Avian sarcoma virus UR2 encodes a transforming protein which is associated with a unique protein kinase activity.** *J Virol* 1982, **42**(1):228-236.
 98. Neckameyer WS, Wang LH: **Nucleotide sequence of avian sarcoma virus UR2 and comparison of its transforming gene with other members of the tyrosine protein kinase oncogene family.** *J Virol* 1985, **53**(3):879-884.

99. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al.: **Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes.** *Nature* 1985, **313**(6005):756-761.
100. El-Deeb IM, Yoo KH, Lee SH: **ROS receptor tyrosine kinase: a new potential target for anticancer drugs.** *Med Res Rev* 2011, **31**(5):794-818.
101. Basler K, Hafen E: **Control of photoreceptor cell fate by the sevenless protein requires a functional tyrosine kinase domain.** *Cell* 1988, **54**(3):299-311.
102. Chen J, Zong CS, Wang LH: **Tissue and epithelial cell-specific expression of chicken proto-oncogene c-ros in several organs suggests that it may play roles in their development and mature functions.** *Oncogene* 1994, **9**(3):773-780.
103. Neckameyer WS, Shibuya M, Hsu MT, Wang LH: **Proto-oncogene c-ros codes for a molecule with structural features common to those of growth factor receptors and displays tissue specific and developmentally regulated expression.** *Mol Cell Biol* 1986, **6**(5):1478-1486.
104. Matsushime H, Shibuya M: **Tissue-specific expression of rat c-ros-1 gene and partial structural similarity of its predicted products with sev protein of *Drosophila melanogaster*.** *J Virol* 1990, **64**(5):2117-2125.
105. Sonnenberg E, Godecke A, Walter B, Bladt F, Birchmeier C: **Transient and locally restricted expression of the ros1 protooncogene during mouse development.** *EMBO J* 1991, **10**(12):3693-3702.
106. Acquaviva J, Wong R, Charest A: **The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1795**(1):37-52.
107. Nagarajan L, Louie E, Tsujimoto Y, Balduzzi PC, Huebner K, Croce CM: **The human c-ros gene (ROS) is located at chromosome region 6q16----6q22.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**(17):6568-6572.
108. Birchmeier C, Sharma S, Wigler M: **Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human**

- glioblastoma cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(24):9270-9274.
109. Lovly CM, Gupta A, Lipson D, Otto G, Brennan T, Chung CT, Borinstein SC, Ross JS, Stephens PJ, Miller VA, Coffin CM: **Inflammatory myofibroblastic tumors harbor multiple potentially actionable kinase fusions.** *Cancer Discov* 2014, **4**(8):889-895.
110. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y, Hu Y, Tan Z, Stokes M, Sullivan L, Mitchell J, Wetzel R, Macneill J, Ren JM, Yuan J, Bakalarski CE, Villen J, Kornhauser JM, Smith B, Li D, Zhou X, Gygi SP, Gu TL, Polakiewicz RD, Rush J, Comb MJ: **Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer.** *Cell* 2007, **131**(6):1190-1203.
111. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y: **RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer.** *Nat Med* 2012, **18**(3):378-381.
112. Awad MM, Katayama R, McTigue M, Liu W, Deng YL, Brooun A, Friboulet L, Huang D, Falk MD, Timofeevski S, Wilner KD, Lockerman EL, Khan TM, Mahmood S, Gainor JF, Digumarthy SR, Stone JR, Mino-Kenudson M, Christensen JG, Iafrate AJ, Engelman JA, Shaw AT: **Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1.** *N Engl J Med* 2013, **368**(25):2395-2401.
113. Davies KD, Mahale S, Astling DP, Aisner DL, Le AT, Hinz TK, Vaishnavi A, Bunn PA, Jr., Heasley LE, Tan AC, Camidge DR, Varella-Garcia M, Doebele RC: **Resistance to ROS1 inhibition mediated by EGFR pathway activation in non-small cell lung cancer.** *PLoS One* 2013, **8**(12):e82236.
114. Cargnelutti M, Corso S, Pergolizzi M, Mevellec L, Aisner DL, Dziadziuszko R, Varella-Garcia M, Comoglio PM, Doebele RC, Vialard J, Giordano S: **Activation of RAS family members confers resistance to ROS1 targeting drugs.** *Oncotarget* 2015, **6**(7):5182-5194.

115. Davies KD, Doebele RC: **Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(15):4040-4045.
116. Perez-Escuredo J, Garcia Martinez J, Garcia-Inclan C, Vivanco B, Costales M, Alvarez Marcos C, Llorente JL, Hermsen MA: **Establishment and genetic characterization of an immortal tumor cell line derived from intestinal-type sinonasal adenocarcinoma.** *Cell Oncol (Dordr)* 2011, **34**(1):23-31.
117. Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, Calcaterra T: **Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A series of 220 patients and a systematic review.** *Cancer* 2001, **92**(12):3012-3029.
118. Vaughan TL, Davis S: **Wood dust exposure and squamous cell cancers of the upper respiratory tract.** *Am J Epidemiol* 1991, **133**(6):560-564.
119. Wolf J, Schmezer P, Fengel D, Schroeder HG, Scheithauer H, Woeste P: **The role of combination effects on the etiology of malignant nasal tumours in the wood-working industry.** *Acta Otolaryngol Suppl* 1998, **535**:1-16.
120. Klintenberg C, Olofsson J, Hellquist H, Sokjer H: **Adenocarcinoma of the ethmoid sinuses. A review of 28 cases with special reference to wood dust exposure.** *Cancer* 1984, **54**(3):482-488.
121. Mannelje A, Kogevinas M, Luce D, Demers PA, Begin D, Bolm-Audorff U, Comba P, Gerin M, Hardell L, Hayes RB, Leclerc A, Magnani C, Merler E, Tobias A, Boffetta P: **Sinonasal cancer, occupation, and tobacco smoking in European women and men.** *Am J Ind Med* 1999, **36**(1):101-107.
122. Bussi M, Gervasio CF, Riontino E, Valente G, Ferrari L, Pira E, Cortesina G: **Study of ethmoidal mucosa in a population at occupational high risk of sinonasal adenocarcinoma.** *Acta Otolaryngol* 2002, **122**(2):197-201.
123. Llorente JL, Núñez F, Rodrigo JP, Fernández R, Alvarez C, Hermsen M, Suárez C: **Adencarcinomas nasosinusales:**

- nuestra experiencia.** *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008, **59**:235-238.
124. Hoppe BS, Stegman LD, Zelefsky MJ, Rosenzweig KE, Wolden SL, Patel SG, Shah JP, Kraus DH, Lee NY: **Treatment of nasal cavity and paranasal sinus cancer with modern radiotherapy techniques in the postoperative setting--the MSKCC experience.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007, **67**(3):691-702.
125. Suárez C, Llorente JL, Fernández de León R, Cabanillas R, Suárez V, López A: **Resección craneofacial anterior: Resultados oncológicos y complicaciones en una serie de 111 casos.** *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004, **55**: 27-33.
126. Barnes L: **Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses.** *Am J Surg Pathol* 1986, **10**(3):192-202.
127. McKinney CD, Mills SE, Franquemont DW: **Sinonasal intestinal-type adenocarcinoma: immunohistochemical profile and comparison with colonic adenocarcinoma.** *Mod Pathol* 1995, **8**(4):421-426.
128. Franchi A, Fondi C, Paglierani M, Pepi M, Gallo O, Santucci M: **Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in sinonasal intestinal type adenocarcinoma.** *Oral Oncol* 2009, **45**(9):835-838.
129. Franchi A, Innocenti DR, Palomba A, Miligi L, Paiar F, Franzese C, Santucci M: **Low prevalence of K-RAS, EGF-R and BRAF mutations in sinonasal adenocarcinomas. Implications for anti-EGFR treatments.** *Pathol Oncol Res* 2014, **20**(3):571-579.
130. Vivanco Allende B, Perez-Escuredo J, Fuentes Martinez N, Fresno Forcelledo MF, Llorente Pendas JL, Hermsen M: **Intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. Immunohistochemical profile of 66 cases.** *Acta Otorrinolaringol Esp* 2013, **64**(2):115-123.
131. Projetti F, Durand K, Chaunavel A, Leobon S, Lacorre S, Caire F, Bessede JP, Moreau JJ, Coulibaly B, Labrousse F: **Epidermal growth factor receptor expression and KRAS and BRAF mutations: study of 39 sinonasal**

- intestinal-type adenocarcinomas.** *Hum Pathol* 2013, **44**(10):2116-2125.
132. Progetti F, Mesturoux L, Coulibaly B, Durand K, Chaunavel A, Leobon S, Gadeaud E, Caire F, Bessede JP, Labrousse F: **Study of MET protein levels and MET gene copy number in 72 sinonasal intestinal-type adenocarcinomas.** *Head Neck* 2015, **37**(11):1563-1568.
133. Sag SO, Gorukmez O, Ture M, Gorukmez O, Deligonul A, Sahinturk S, Topak A, Gulden T, Kurt E, Yakut T: **Spectrum of EGFR gene mutations and ALK rearrangements in lung cancer patients in Turkey.** *Springerplus* 2016, **5**:482.
134. Perner S, Wagner PL, Demichelis F, Mehra R, Lafargue CJ, Moss BJ, Arbogast S, Soltermann A, Weder W, Giordano TJ, Beer DG, Rickman DS, Chinnaiyan AM, Moch H, Rubin MA: **EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event.** *Neoplasia* 2008, **10**(3):298-302.
135. Camidge DR, Theodoro M, Maxson DA, Skokan M, O'Brien T, Lu X, Doebele RC, Baron AE, Varella-Garcia M: **Correlations between the percentage of tumor cells showing an anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement, ALK signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in situ hybridization-positive nonsmall cell lung cancer.** *Cancer* 2012, **118**(18):4486-4494.
136. Karkouche R, Bachet JB, Sandrini J, Mitry E, Penna C, Cote JF, Blons H, Penault-Llorca F, Rougier P, Saint Andre JP, Emile JF: **Colorectal neuroendocrine carcinomas and adenocarcinomas share oncogenic pathways. A clinico-pathologic study of 12 cases.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012, **24**(12):1430-1437.
137. Bavi P, Jehan Z, Bu R, Prabhakaran S, Al-Sanea N, Al-Dayel F, Al-Assiri M, Al-Halouly T, Sairafi R, Uddin S, Al-Kuraya KS: **ALK gene amplification is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma.** *Br J Cancer* 2013, **109**(10):2735-2743.
138. Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, Le AT, Haney J, Schulte N, Chionh F, Hardingham J, Mariadason J, Tebbutt N, Doebele RC, Weickhardt AJ, Varella-Garcia M: **ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with**

- evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Mol Cancer Res* 2014, **12**(1):111-118.**
139. Llorente JL, Aldama P, Alvarez-Marcos C, Escudero J, Alonso-Guervos M, Fresno F, Suarez C, Hermsen M: **Nasosinusal adenocarcinoma: molecular and genetic analysis by MLPA.** *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008, **59**(4):151-158.
140. Salido M, Pijuan L, Martinez-Aviles L, Galvan AB, Canadas I, Rovira A, Zanui M, Martinez A, Longaron R, Sole F, Serrano S, Bellosillo B, Wynes MW, Albanell J, Hirsch FR, Arriola E: **Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer.** *J Thorac Oncol* 2011, **6**(1):21-27.
141. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioka H, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Takeuchi K, Shimada T, Tanaka T, Tamura T: **CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study.** *Lancet Oncol* 2013, **14**(7):590-598.
142. Socinski MA, Goldman J, El-Hariry I, Koczywas M, Vukovic V, Horn L, Paschold E, Salgia R, West H, Sequist LV, Bonomi P, Brahmer J, Chen LC, Sandler A, Belani CP, Webb T, Harper H, Huberman M, Ramalingam S, Wong KK, Teofilovici F, Guo W, Shapiro GI: **A multicenter phase II study of ganetespib monotherapy in patients with genotypically defined advanced non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(11):3068-3077.
143. Gambacorti Passerini C, Farina F, Stasia A, Redaelli S, Ceccon M, Mologni L, Messa C, Guerra L, Giudici G, Sala E, Mussolin L, Deeren D, King MH, Steurer M, Ordemann R, Cohen AM, Grube M, Bernard L, Chiriano G, Antolini L, Piazza R: **Crizotinib in advanced, chemoresistant anaplastic lymphoma kinase-positive lymphoma patients.** *J Natl Cancer Inst* 2014, **106**: 378.
144. Godbert Y, Henriques de Figueiredo B, Bonichon F, Chibon F, Hostein I, Perot G, Dupin C, Daubech A, Belleanne G, Gros A, Italiano A, Soubeyran I:

- Remarkable Response to Crizotinib in Woman With Anaplastic Lymphoma Kinase-Rearranged Anaplastic Thyroid Carcinoma.** *J Clin Oncol* 2015, **33**(20):e84-87.
145. Bresler SC, Wood AC, Haglund EA, Courtright J, Belcastro LT, Plegaria JS, Cole K, Toporovskaya Y, Zhao H, Carpenter EL, Christensen JG, Maris JM, Lemmon MA, Mosse YP: **Differential inhibitor sensitivity of anaplastic lymphoma kinase variants found in neuroblastoma.** *Sci Transl Med* 2011, **3**:108-114.
146. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, Jessop NA, Wain JC, Yeo AT, Benes C, Drew L, Saeh JC, Crosby K, Sequist LV, Iafrate AJ, Engelman JA: **Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers.** *Sci Transl Med* 2012, **4**:120-117.
147. Sean MT, Urick M, Nickolay A. Khazanov, Williams P, Bankhead A, Cyanam D, Gajjala S, Wyngaard P, Bowden E, Rhodes D: **Expanded clinical opportunities for crizotinib from an analysis of over 5,000 cancer patient exomes. [abstract].** In: **Proceedings of the AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics.** *Mol Cancer Ther* 2013, **12**:Abstract nr C256.
148. Rosell R, Gettinger SN, Bazhenova LA, Langer CJ, Salgia R, Shaw AT, Narasimhan NI, Dorer DJ, Kerstein D, Camidge DR: **1330: Brigatinib efficacy and safety in patients (Pts) with anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive (ALK+) non-small cell lung cancer (NSCLC) in a phase 1/2 trial.** *J Thorac Oncol* 2016, **11**(4 Suppl):S114.
149. Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee S, Bleazard T, Won JK, Kim YT, Kim JI, Kang JH, Seo JS: **A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing.** *Genome Res* 2012, **22**(3):436-445.
150. Saito M, Ishigame T, Tsuta K, Kumamoto K, Imai T, Kohno T: **A mouse model of KIF5B-RET fusion-dependent lung tumorigenesis.** *Carcinogenesis* 2014, **35**(11):2452-2456.

151. Suzuki M, Makinoshima H, Matsumoto S, Suzuki A, Mimaki S, Matsushima K, Yoh K, Goto K, Suzuki Y, Ishii G, Ochiai A, Tsuta K, Shibata T, Kohno T, Esumi H, Tsuchihara K: **Identification of a lung adenocarcinoma cell line with CCDC6-RET fusion gene and the effect of RET inhibitors in vitro and in vivo.** *Cancer Sci* 2013, **104**(7):896-903.
152. Bagheri-Yarmand R, Sinha KM, Gururaj AE, Ahmed Z, Rizvi YQ, Huang SC, Ladbury JE, Bogler O, Williams MD, Cote GJ, Gagel RF: **A novel dual kinase function of the RET proto-oncogene negatively regulates activating transcription factor 4-mediated apoptosis.** *J Biol Chem* 2015, **290**(18):11749-11761.
153. **National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) thyroid carcinoma.**, Version 2. 2015.
154. Moura MM, Cavaco BM, Leite V: **RAS proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma.** *Endocr Relat Cancer* 2015, **22**(5):R235-252.
155. Luo Y, Tsuchiya KD, Il Park D, Fausel R, Kanngurn S, Welcsh P, Dzieciatkowski S, Wang J, Grady WM: **RET is a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer.** *Oncogene* 2013, **32**(16):2037-2047.
156. Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, Ross J, Miller V, Ginsberg M, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M, Rizvi N: **Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas.** *Cancer Discov* 2013, **3**(6):630-635.
157. Gautschi O, Zander T, Keller FA, Strobel K, Hirschmann A, Aebi S, Diebold J: **A patient with lung adenocarcinoma and RET fusion treated with vandetanib.** *J Thorac Oncol* 2013, **8**(5):e43-44.
158. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T: **KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma.** *Nat Med* 2012, **18**(3):375-377.

159. Verbeek HH, Alves MM, de Groot JW, Osinga J, Plukker JT, Links TP, Hofstra RM: **The effects of four different tyrosine kinase inhibitors on medullary and papillary thyroid cancer cells.** *J Clin Endocrinol Metab* 2011, **96**(6):E991-995.
160. Couto JP, Almeida A, Daly L, Sobrinho-Simoes M, Bromberg JF, Soares P: **AZD1480 blocks growth and tumorigenesis of RET- activated thyroid cancer cell lines.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e46869.
161. Wells SA, Jr., Gosnell JE, Gagel RF, Moley J, Pfister D, Sosa JA, Skinner M, Krebs A, Vasselli J, Schlumberger M: **Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(5):767-772.
162. Wells SA, Jr., Robinson BG, Gagel RF, Dralle H, Fagin JA, Santoro M, Baudin E, Elisei R, Jarzab B, Vasselli JR, Read J, Langmuir P, Ryan AJ, Schlumberger MJ: **Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial.** *J Clin Oncol* 2012, **30**(2):134-141.
163. Marotta V, Sciammarella C, Vitale M, Colao A, Faggiano A: **The evolving field of kinase inhibitors in thyroid cancer.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2015, **93**(1):60-73.
164. Okamoto K, Kodama K, Takase K, Sugi NH, Yamamoto Y, Iwata M, Tsuruoka A: **Antitumor activities of the targeted multi-tyrosine kinase inhibitor lenvatinib (E7080) against RET gene fusion-driven tumor models.** *Cancer Lett* 2013, **340**(1):97-103.
165. Elisei R, Schlumberger MJ, Muller SP, Schoffski P, Brose MS, Shah MH, Licitra L, Jarzab B, Medvedev V, Kreissl MC, Niederle B, Cohen EE, Wirth LJ, Ali H, Hessel C, Yaron Y, Ball D, Nelkin B, Sherman SI: **Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer.** *J Clin Oncol* 2013, **31**(29):3639-3646.
166. Samadi AK, Bazzill J, Zhang X, Gallagher R, Zhang H, Gollapudi R, Kindscher K, Timmermann B, Cohen MS: **Novel withanolides target medullary thyroid cancer through inhibition of both RET phosphorylation and the mammalian target of rapamycin pathway.** *Surgery* 2012, **152**(6):1238-1247.

167. Taguchi F, Koh Y, Koizumi F, Tamura T, Saijo N, Nishio K: **Anticancer effects of ZD6474, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in gefitinib ("Iressa")-sensitive and resistant xenograft models.** *Cancer Sci* 2004, **95**(12):984-989.
168. Yoshikawa D, Ojima H, Kokubu A, Ochiya T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T: **Vandetanib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signalling, as a novel molecular-targeted therapy against cholangiocarcinoma.** *Br J Cancer* 2009, **100**(8):1257-1266.
169. Gainor JF, Shaw AT: **Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions.** *Oncologist* 2013, **18**(7):865-875.
170. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, Tan W, Stephenson P, Shreeve SM, Tye LM, Christensen JG, Wilner KD, Clark JW, Iafrate AJ: **Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer.** *N Engl J Med* 2014, **371**(21):1963-1971.
171. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ: **ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers.** *J Clin Oncol* 2012, **30**(8):863-870.
172. Sang J, Acquaviva J, Friedland JC, Smith DL, Sequeira M, Zhang C, Jiang Q, Xue L, Lovly CM, Jimenez JP, Shaw AT, Doebele RC, He S, Bates RC, Camidge DR, Morris SW, El-Hariry I, Proia DA: **Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer.** *Cancer Discov* 2013, **3**(4):430-443.

8 ANEXOS

8.1 Mutaciones de ALK, RET y ROS susceptibles de tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa

Tabla 3: Mutaciones de ALK, RET y ROS susceptibles de tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa.

Origen	Gen	Variante	Mutación	Función	Asociación	Fármaco	Estado
Cerebro	ALK	R1275Q	MSS	↑↑↑	Sensibilidad	crizotinib	Preclínico
Cerebro	ALK	F1174L	MSS	↑↑↑	Sensibilidad	crizotinib	Preclínico
Cerebro	ALK	G1128A	MSS	↑↑↑	Sensibilidad	crizotinib	Preclínico
Cerebro	ALK	I1171N	MSS	↑↑↑	Sensibilidad	crizotinib	Preclínico
Cerebro	ALK	R1192P	MSS	↑↑↑	Sensibilidad	crizotinib	Preclínico
Cerebro	ALK	F1245C	MSS	↑↑↑	Sensibilidad	crizotinib	Preclínico
IMT	ALK	Reordenamientos	Fusión	↑↑↑	Respuesta	crizotinib	Caso
Pulmón	ALK	Reordenamientos	Fusión	↑↑↑	Respuesta	crizotinib, ceritinib	Aprobados
Pulmón	ALK	Reordenamientos	Fusión	↑↑↑	Respuesta	Inhibidores de ALK	Ensayos
Pulmón	ALK	Reordenamientos	Fusión	↑↑↑	Respuesta	Inhibidores de HSP90	Ensayos
Pulmón	ALK	Reordenamientos	Fusión	↑↑↑	nan		
Pulmón	ALK	L1196M	MSS	↑↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso
Pulmón	ALK	L1196M	MSS	↑↑↑	Respuesta	ceritinib	Aprobados
Pulmón	ALK	L1196M	MSS	↑↑↑		nan	nan
Pulmón	ALK	L1152R	MSS	↑↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso
Pulmón	ALK	C1156Y	MSS	↑↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso

Pulmón	ALK	F1174L	MSS	↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso
Pulmón	ALK	F1174L	MSS	↑↑	Respuesta	Nuevos Inhibidores de ALK	Preclínico
Pulmón	ALK	G1202R	MSS	↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso
Pulmón	ALK	S1206Y	MSS	↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso
Pulmón	ALK	S1206Y	MSS	↑↑	Respuesta	ceritinib	Aprobados
Pulmón	ALK	G1269A	MSS	↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso
Pulmón	ALK	G1269A	MSS	↑↑	Respuesta	ceritinib	Aprobados
Pulmón	ALK	1151Tins	Inserción	↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso
Pulmón	ALK	1151Tins	Inserción	↑↑	Respuesta	ceritinib	Aprobados
Pulmón	ALK	Amplificación	Copias	↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso
Linfoma	ALK	Reordenamientos	Fusión	↑↑	Respuesta	crizotinib	early clinical
Tiroides	ALK	Reordenamientos	Fusión	↑↑	Respuesta	crizotinib	Caso
Pulmón	RET	Reordenamientos	Fusión	↑↑	Respuesta	cabozantinib, vandetanib	Ensayos , Caso
Pulmón	RET	Reordenamientos	Fusión	↑↑	Sensibilidad	Inhibidores de RET	Preclínico
Tiroides	RET	codones 618, 620, 634, 768, 791, 891, 918	MSS	↑↑	Respuesta	vandetanib	Aprobados
Tiroides	RET	C634W	MSS	↑↑	Respuesta	vandetanib	Aprobados
Tiroides	RET	C634W	MSS	↑↑	Sensibilidad	cabozantinib, sunitinib	Preclínico
Tiroides	RET	C634W	MSS	↑↑	Sensibilidad	Inhibidores de RET	Preclínico
Tiroides	RET	M918T	MSS	↑↑	Respuesta	vandetanib	Aprobados
Tiroides	RET	M918T	MSS	↑↑	Sensibilidad	cabozantinib, sunitinib	Preclínico
Tiroides	RET	M918T	MSS	↑↑	Sensibilidad	Inhibidores de RET	Preclínico

Tiroides	RET - PTC 1	Reordenamientos	Fusión	↑↑	Sensibilidad	cabozantinib, vandetanib, sunitinib	Preclínico
Tiroides	RET - PTC 1	Reordenamientos	Fusión	↑↑	Sensibilidad	Inhibidores de RET	Preclínico
Pulmón	ROS 1	Reordenamientos	Fusión	↑↑	Respuesta	crizotinib	Ensayos
Pulmón	ROS 1	Reordenamientos	Fusión	↑↑	Sensibilidad	Inhibidores de HSP90	Preclínico
Pulmón	ROS 1	G2032R	MSS	↑↑	Resistencia	crizotinib	Caso

8.2 Abreviaturas

ACNS: Adenocarcinomas nasosinusales.

ALCL: Linfomas anaplásicos de células grandes.

ALK: "Anaplastic lymphoma kinase".

***c-ErbB*:** gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

***c-Fms*:** gen del receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos.

CCC: Cáncer de cabeza y cuello.

CGH: "Comparative Genomic Hybridization". Hibridación genómica comparativa

CRC: "Colorectal cáncer". Carcinoma colorectal.

CRK: "CT10 regulator of kinase"

EGFR: "Epidermal growth factor receptor".

FDA: "Food and drug administration". Administración de alimentos y medicamentos.

FISH: Hibridación fluorescente in situ.

FMTC: Carcinoma medular de tiroides familiar.

GDNF: Factor neurotrópico derivado del la línea celular glial.

HIR: Receptor de insulina humana.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IMT: Tumor miofibroblástico inflamatorio.

IRS-1: Substrato del receptor de insulina.

ITAC: "Intestinal type adenocarcinoma". Adenocarcinoma de tipo intestinal.

ITQ: Inhibidores de la tirosin quinasa

KRAS: "Kristen rat sarcoma".

LKT: Tirosin quinasa del leucocito.

MEN: Neoplasia endocrina múltiple.

MK: Midkina.

MLPA: "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification".

Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación.

NSCLC: "Non small cell lung carcinoma". Cáncer de pulmón de célula no pequeña.

PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PET: "Positron emission tomography". Tomografía con emisión de positrones.

PTC: Carcinoma papilar de tiroides.

PTN: Pleiotropina.

RET: "Rearranged during Transfection"

RM: Resonancia magnética.

ROS: "v-ros avian UR2 sarcoma virus oncogene homolog"

RT-PCR: Reacción de la cadena de polimerasa con transcriptasa reversa.

RTQ: Receptores tirosin quinasa.

SNG: Secuenciación de nueva generación.

TC: Tomografía computarizada.

TMA: "tissue microarrays".

TIMP2: "Metallopeptidase inhibitor 2"

UICC: "Union for international cancer control". Unión internacional para el control del cáncer.

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.

8.3 Artículo

Acta Otorrinolaringol Esp. 2017;68(1):9-14



Acta Otorrinolaringológica Española

www.elsevier.es/otorrino



ARTÍCULO ORIGINAL

Ausencia de translocaciones cromosómicas y de expresión proteica de *ALK* en los adenocarcinomas nasosinusales



Esteban Pacheco^a, José Luis Llorente^{a,*}, Alejandro López-Hernández^a,
Cristina García-Inclán^a, María Costales^a, Sira Potes Ares^a, Fernando López^a,
Blanca Vivanco^b y Mario A. Hermsen^a

^a Departamento de Otorrinolaringología, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, España

^b Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, España

Recibido el 10 de enero de 2016; aceptado el 8 de febrero de 2016
Disponible en Internet el 13 de mayo de 2016

PALABRAS CLAVE

Adenocarcinoma nasosinusal;
FISH;
ALK;
Carcinoma nasosinusal

Resumen

Introducción: Las translocaciones de la región cromosómica 2p23 causan la sobreexpresión del gen de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*), un receptor tirosinquinasa involucrado en rutas de señalización celular que regulan la proliferación. Dicha alteración se identifica en el 5% de los adenocarcinomas de pulmón, representando una diana terapéutica en dicho subgrupo de tumores. Debido a que los adenocarcinomas nasosinusales (ACNS) tienen una histología similar a los adenocarcinomas de pulmón, el objetivo de este estudio fue evaluar si existen alteraciones en el gen *ALK* en los ACNS.

Método: La presencia de translocaciones del gen *ALK* se analizó en 96 muestras de ACNS mediante fluorescencia in situ hybridization usando unas sondas «break apart». Además se estudió la expresión proteica de *ALK* por inmunohistoquímica.

Resultados: En ninguno de los casos se observó la presencia de translocaciones de *ALK*. Además, no se detectó expresión proteica en ninguno de los casos.

Conclusiones: Los resultados obtenidos sugieren que *ALK* no desempeña un papel relevante en la oncogénesis de los ACNS.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: llorentependas@telefonica.net (J.L. Llorente).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.otorri.2016.02.003>

0001-6519/© 2016 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Sinonasal adenocarcinoma;
FISH;
ALK;
Sinonasal carcinoma

Absence of chromosomal translocations and protein expression of ALK in sinonasal adenocarcinomas**Abstract**

Introduction: Chromosomal translocations at 2p23 cause overexpression of anaplastic lymphoma kinase (ALK), a receptor tyrosine kinase involved in signalling pathways that regulate cell proliferation. This translocation occurs in 5% of lung adenocarcinoma and has been demonstrated to be useful as a therapeutic target for crizotinib. sinonasal adenocarcinomas (SNAC) are histologically similar to lung adenocarcinomas; the aim of this study was to evaluate the presence of ALK alterations in SNAC.

Method: Break-apart fluorescent in-situ hybridization was used to analyse the presence of ALK translocations in 96 tumour samples. In addition, ALK protein expression was studied by immunohistochemistry.

Results: The samples of SNAC did not show ALK translocation. Moreover, ALK protein expression was absent in all cases.

Conclusions: These results suggest that ALK is not involved in SNAC.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. All rights reserved.

Introducción

Los adenocarcinomas nasosinusales (ACNS) de tipo intestinal representan aproximadamente el 25-50% de los tumores nasosinusales, siendo la exposición al polvo de la madera el factor de riesgo predominante¹.

A pesar de los avances en la cirugía y la radioterapia, la supervivencia de los pacientes es baja, debido a la elevada frecuencia de recidivas a nivel local². Los ACNS no responden bien a la quimioterapia clásica por lo que parece necesario intentar desarrollar nuevos agentes terapéuticos que mejoren el control local y la supervivencia.

Debido a la similitud histológica con los adenocarcinomas de pulmón, un tipo de cáncer en el que en los últimos años se ha avanzado mucho en cuanto al diagnóstico molecular y nuevas terapias biológicas³, es posible que los hallazgos obtenidos en estos tumores fueran aplicables también a los ACNS. Recientemente se han encontrado alteraciones del gen anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (ALK) en el cáncer de pulmón de célula no pequeña y, en concreto, en su variante más común, el adenocarcinoma⁴. El gen ALK da lugar a una proteína con actividad tirosinquinasa que promueve la supervivencia celular e inhibe la apoptosis⁵.

Las translocaciones cromosómicas de la región 2p23, donde se localiza ALK, hacen que este se pueda fusionar con otros genes, dando lugar a la expresión de una proteína quimérica que conlleva la expresión constitutiva de ALK, estimulando así la proliferación celular. Se han descrito varias posibles translocaciones con ALK, incluyendo ALK/EML4, ALK/RANBP2, ALK/ATIC, ALK/TFG, ALK/NPM1, ALK/SQSTM1, ALK/KIF5B, ALK/CLTC, ALK/TPM4 y ALK/MSN⁶.

Entre el 2 y el 7% de los adenocarcinomas de pulmón pueden presentar la fusión entre el gen ALK y el gen equinoderm microtubulee-associated protein-like (EML4)⁷. En la mayoría de estos tumores no se detectan mutaciones en los genes EGFR epidermal grow factor receptor (EGFR) y kirsten

rat sarcoma, y se detectan mayoritariamente en pacientes jóvenes y no fumadores⁸.

Aparte de las translocaciones, se han encontrado mutaciones y amplificaciones del gen ALK en varios tipos de cáncer, tales como el linfoma anaplásico de células grandes, el neuroblastoma y el tumor miofibroblástico inflamatorio⁹⁻¹⁰. En relación al cáncer de cabeza y cuello son pocos los trabajos que demuestran la implicación de ALK y solo se ha estudiado en algunos tipos de tumores poco frecuentes como el pseudotumor inflamatorio de cabeza y cuello y el rabdomiosarcoma¹¹⁻¹².

La relevancia de la presencia de alteraciones en ALK viene dada por su capacidad para ser diana terapéutica. El crizotinib es un inhibidor de la tirosinquinasa, codificada por este gen, recientemente aprobado para el tratamiento del cáncer de pulmón¹³.

El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de translocaciones en el gen ALK, así como evaluar su expresión proteica en una serie de 96 ACNS, para valorar la posible aplicación del inhibidor crizotinib en el tratamiento de los ACNS.

Material y método**Pacientes**

Se estudiaron las muestras de un total de 96 pacientes con ACNS tratados en nuestro servicio entre 1990 y 2008. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes, siendo aprobado el estudio por el comité ético del hospital.

Todos los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente y en todos los casos los bordes quirúrgicos estuvieron libres de enfermedad. Los criterios de inclusión para la composición de la muestra fueron los siguientes: 1) no haber recibido radio- o quimioterapia preoperatoria antes de obtener las muestras tisulares; 2) tener un historial clínico completo así como un estudio histopatológico que confirme el

diagnóstico de ACNS y 3) disponer de material tisular suficiente para realizar estudios genéticos o de expresión.

La serie estuvo formada por 94 varones y 2 mujeres con una media de edad de 66 años (rango 48-92). En 84 pacientes (88%) se objetivó como antecedente la exposición al polvo de madera y 30 pacientes (31%) eran fumadores. En relación con el estadio tumoral T¹⁴, 24 pacientes tenían un tumor T1 (25%), 6 T2 (6%), 38 T3 (40%) y 28 T4 (29%). En relación con la histología¹⁵ 6 ACNS eran de tipo papilar (6%); 56 de tipo colónico (58%); 9 de tipo sólido (10%) y 25 de tipo mucinoso (26%).

Después de la cirugía, 61 pacientes recibieron tratamiento complementario con radioterapia (64%).

El seguimiento medio de los pacientes fue de 61 meses (1 a 264 meses). Durante el mismo, 48 casos (50%) desarrollaron una recidiva locoregional y 16 casos (17%) una metástasis a distancia. El tiempo medio libre de enfermedad fue de 9 meses (rango entre 0 y 96 meses). La supervivencia global a 5 años fue del 44%.

Muestras

Se emplearon muestras de tejido tumoral fijadas en formol y embebidas en parafina. Las muestras tumorales fueron recogidas en bloques tissue microarray (TMA) incluyendo 3 cilindros de 1 mm de diámetro del área tumoral más representativa en cada caso. Se realizan 4 bloques TMA

de 2 × 2,5 cm. En total fueron 72 cilindros tumorales más 6 cilindros de mucosa normal en cada bloque¹⁶.

Hibridación fluorescente in situ

Para la realización de la hibridación fluorescente in situ (FISH) utilizamos la sonda LSI ALK Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Vysis, Abbott Científica SA, Madrid, España). Esta sonda está diseñada para detectar una rotura cromosómica en 2p23 donde se localiza el gen ALK. Una rotura puede indicar la inversión en el cromosoma 2 (fusión ALK/EML4), pero también otras posibles translocaciones involucrando ALK, como por ejemplo con NPM en el cromosoma 5. Las roturas en cromosoma 2p23 se detecta por la separación de las señales rojo y verde.

Los cortes de 4 µm de los TMA se desparafinaron mediante inmersión en xylol a temperatura ambiente durante 10 min y dos lavados posteriores de 5 min en etanol al 100%. A continuación las preparaciones se incubaron en 0,2 N HCl durante 20 min a temperatura ambiente y después en NaSCN al 8% a 80 °C durante 30 min, seguido por un lavado con 2xSSC durante 3 min a temperatura ambiente. A continuación se hizo una digestión en pepsina 10% a 37 °C durante 10 min. Se lavaron en 2xSSC durante 5 min, se deshidrataron en una serie de etanol a temperatura ambiente durante 3 min cada vez y, finalmente, se dejaron secar al aire. Se colocaron 10 µl de la sonda FISH sobre los portales y se desnaturalizaron sobre una placa térmica a 75 °C durante 10 min. La hibridación tenía lugar en una cámara húmeda dentro de una estufa a 37 °C durante 16 h. Se lavaron los portales una vez en 70% formamida/2xSSC a 56 °C y después dos veces en 2xSSC, cada uno durante 2 min. Finalmente se lavaron las preparaciones en agua destilada, se dejaron secar a oscuras y se teñían

con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, 350 ng/mL) disuelto en AntiFade (Vectashield, Vector Laboratories).

Las preparaciones fueron evaluadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX-61 con filtros para DAPI, SpectrumGreen (verde) y SpectrumOrange (rojo).

Consideramos una muestra positiva, si más de 25 células o más del 50% de células, del total de la muestra, son ALK-FISH positivas.

Las células son ALK-FISH positivas cuando una señal verde y una roja tienen por lo menos una distancia de 2 diámetros de la señal más grande, sea esta roja o verde. La separación de las sondas de diferente color indica fusión por inversión. También se considera ALK-FISH positivo cuando hay solo una señal roja sin su correspondiente señal verde, lo que indica fusión del gen por inversión y delección. Hay que tener en cuenta que una señal verde sin su correspondiente señal roja es indicativa de ALK-FISH negativo, por lo que la señal roja es la que localiza el dominio tirosinquinasa.

Una muestra se considera negativa, si menos de 5 células o menos del 10% de células, del total de la muestra, son positivas. La muestra se considera no valorable cuando hay entre 5 y 25 células positivas por cada muestra, en este caso un segundo lector podría estudiar la muestra y si el promedio de los dos lectores es de 15% o más de células positivas indicaría ALK-FISH positivo¹⁷.

Inmunohistoquímica

La expresión proteica de ALK fue analizada por inmunohistoquímica sobre cortes de 3 µm de los TMA. Aplicamos una solución recuperadora de antígenos pH bajo según las instrucciones de la casa comercial (DAKO Cytomation, Glostrup, Dinamarca). El anticuerpo primario fue monoclonal humano anti-CD246, ALK Protein, clon ALK1 (DAKO Cytomation, Glostrup, Dinamarca) prediluido y el tiempo de incubación fue de 30 min. Utilizamos el DAKO Inmunoteñidor Autostainer Plus (DAKO Cytomation, Glostrup, Dinamarca) y la inmunodetección fue realizada con el sistema EnVision Plus «anti-mouse» empleando como sustrato el cromógeno diaminobenzidina. Como control positivo usamos un linfoma de células anaplásicas grandes con translocación t(2;5). Como positividad fue interpretado cuando observamos tinción de membrana citoplasmática con o sin tinción del citoplasma.

Resultados

El estudio mediante FISH no fue valorable en 36 de los 96 casos del estudio debido a la falta de suficiente representación tumoral en la muestra y por un elevado nivel de señal de fondo (fig. 1). En los 60 casos restantes analizados no se observó en ningún caso la presencia de una separación («break apart») de las dos señales y solo se han visto parejas de señales rojo y verde (fig. 2A). El número de señales por núcleo (siempre parejas rojo y verde) observadas fue 1-2 en 50 casos. En 10 casos mostraron 2-3 o más señales, indicando ganancias de este segmento de cromosoma 2 (fig. 2B), incluyendo un caso mostrando núcleos con 5-6 señales (fig. 2C).

El estudio de la expresión proteica de ALK dio resultados analizables en 86 de los 96 casos, pero en ningún caso se

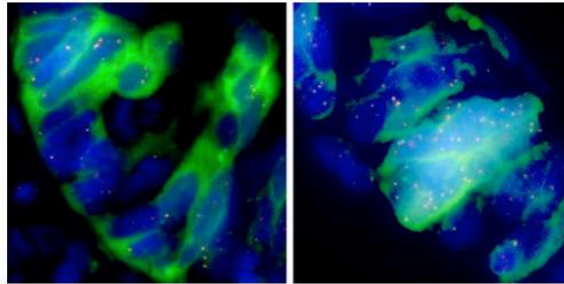


Figura 1 Dos muestras que presentan señales FISH con mucho fondo, haciendo una evaluación de las señales «break apart» poco fiable.

objetivó positividad, mientras la muestra control mostró una fuerte positividad en la membrana (fig. 3).

Discusión

En los últimos años han surgido muchas expectativas en referencia a la genética molecular y a las terapias biológicas dirigidas, especialmente con los inhibidores de las tirosinquinasa¹³. En los adenocarcinomas de colon, mama y especialmente de pulmón, se han descrito dianas moleculares en relación con alteraciones en proteínas con actividad tirosinquinasa como EGFR, ALK, human epidermal growth receptor-2 factor o cMET (hepatocyte growth factor receptor)⁵, lo cual ha permitido el desarrollo y aplicación de terapias biológicas.

Estas alteraciones moleculares pueden ser mutaciones, amplificaciones génicas y translocaciones cromosómicas,

conllevando en la mayor parte de los casos la sobreexpresión de la proteína y la activación de la ruta de señalización.

Por su similitud histológica con los adenocarcinomas de colon y de pulmón¹⁶ se ha intentado identificar las alteraciones observadas en estos tumores, más frecuentes, en los ACNS. En particular, se han hecho estudios dirigidos a buscar alteraciones en los genes EGFR, FGFR1 y cMET. La amplificación génica y la sobreexpresión proteica de EGFR ocurre en un 40% y 20-32% de los ACNS respectivamente, sin observarse mutaciones¹⁶⁻²⁰. La sobreexpresión de human epidermal growth receptor-2 factor ha sido descrita en solo un 8% de los ACNS²¹. Projetti et al.²², detectaron mediante FISH amplificaciones de FGFR1 en tumores nasosinusales, pero solo en los carcinomas epidermoides y no en los ACNS. No se han encontrado amplificaciones del gen cMET, pero sí ganancias en el 52% y sobreexpresión proteica en el 64% de los ACNS²³.

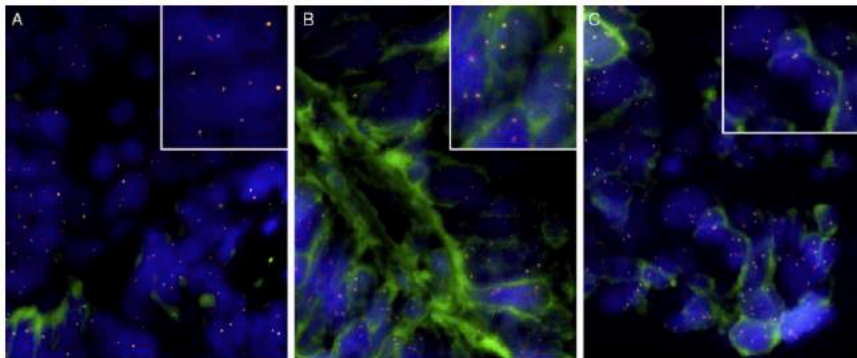


Figura 2 A) Ejemplo de un resultado FISH en que se observan 1-2 parejas de señales rojo y verde adyacentes. B) Ejemplo de un resultado FISH en que se observan 2-3 parejas de señales rojo y verde adyacentes. C) Ejemplo de un resultado FISH en que se observan 3-6 parejas de señales rojo y verde adyacentes. El color de esta figura solo puede apreciarse en la versión electrónica del artículo.

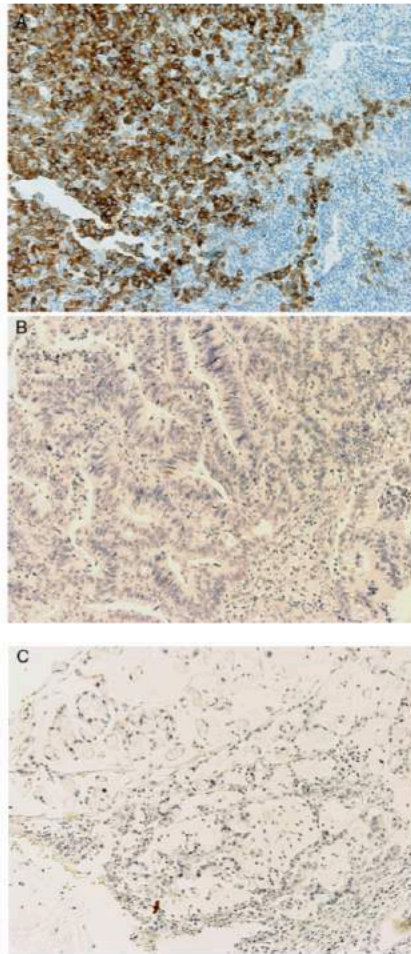


Figura 3 Tinción Inmunohistoquímica. A) Positividad de ALK en la membrana citoplasmática en el control positivo, una muestra de linfoma de células anaplásicas grandes con translocación t(2;5). B) Ausencia de ALK en una muestra tumoral de ACNS de tipo colónico. C) Ausencia de ALK en una muestra tumoral de ACNS de tipo mucinoso.

Hasta el momento no existen estudios sobre el papel de ALK en los ACNS. Este estudio fue dirigido a la identificación de la translocación ALK/EML4 o de la expresión de la proteína, con vista a una posible aplicación de nuevas terapias biológicas para los ACNS. La detección de la

translocación debe ser realizada por FISH de acuerdo a la técnica validada²⁴. Es importante señalar que para la interpretación del FISH, se debe tener una experiencia contrastada, ya que su análisis puede servir como un marcador de respuesta terapéutica. Las sondas «break-apart» empleadas en este estudio tienen la ventaja de poder indicar diferentes translocaciones involucrando un solo gen, en nuestro caso el gen ALK, pero la evaluación de las señales es más difícil. Al contrario, las sondas «fusión» producen una conjunción de las señales verde y roja fácil de detectar, pero solo pueden identificar una translocación particular.

El crizotinib es un inhibidor de ALK y de cMET²⁵. Su mecanismo de acción consiste en ser un inhibidor de la tirosinasa. Su uso está aprobado en los adenocarcinomas pulmonares, en los que si bien la fusión de ALK/EML4 ocurre solo en el 2-7% tumores, crizotinib produce control de la enfermedad en aproximadamente el 90% de los pacientes y la supervivencia libre de progresión a los 6 meses es de más del 70%¹³.

Desafortunadamente, en el presente estudio no se ha hallado la translocación ALK/EML4 en ninguno de los 60 casos analizables. En consistencia con este hallazgo no se objetivó sobreexpresión de ALK en ninguno de los 86 casos. Además, las ganancias en el número de copias de la región cromosómica 2p23 en 10 casos, observado como 3 o más señales FISH por núcleo, tampoco fueron acompañadas por una sobreexpresión de la proteína de ALK.

Conclusiones

En conclusión los resultados observados sugieren que el gen ALK no parece jugar un papel relevante en la oncogénesis de

los ACNS y, por tanto, no apoyan el uso del crizotinib como arma terapéutica.

Financiación

Proyectos PI08-1599, PI11-929 y PI13-646 de los Fondos de Investigación Sanitaria, Plan Nacional de I+D+I 2008-2011 y Plan Estatal de I+D+I 2013-2016. RD12/0020/0034 de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A las técnicas Laura Suárez, Eva Allonca y Aitana Vallina por su trabajo en la realización de las matrices de tejidos y la inmunohistoquímica.

Bibliografía

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 2012;100:11-465.
2. Llorente JL, López F, Suárez C, Hermsen M. Sinonasal carcinoma: Clinical, pathological and genetic advances for new therapeutic opportunities. Nat. Rev Clin Oncol. 2014;11:460-72.

3. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511:543-50.
4. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448:561-6.
5. Wellstein A. ALK receptor activation, ligands and therapeutic targeting in glioblastoma and in other cancers. *Front Oncol*. 2012;2:192.
6. Mosse YP, Wood A, Maris JM. Inhibition of ALK signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5609-14.
7. Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, et al. Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2011;35:1226-34.
8. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinic pathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5216-23.
9. Pulford K, Lamant L, Espinos E, Jiang Q, Xue L, Turturro F, et al. The emerging normal and disease-related roles of anaplastic lymphoma kinase. *CMLS*. 2004;61:2939-53.
10. Lamant L, Meggetto F, al Saati T, Brugieres L, de Paillerets BB, Dastugue N. High incidence of the t(2;5)(p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining. *Blood* 1996; 87(1): 284-291.
11. Pillay K, Govender D, Chetty R. ALK protein expression in rhabdomyosarcomas. *Histopathology*. 2002;41:461-7.
12. Ong HS, Ji T, Zhang CP, Li J, Wang LZ, Li RR, et al. Head and neck inflammatory myofibroblastic tumor (IMT): evaluation of clinicopathologic and prognostic features. *Oral Oncol*. 2012;48:141-8.
13. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *New England J Med*. 2010;363:1693-703.
14. Sobin LH, Gospodarowicz NK, Wittekind CH, editores. International Union Against Cancer (UICC) TNM classification of malignant tumors. 7. th edn Wiley-Blackwell; 2009.
15. Franchi A, Santucci M, Wenig BM. Adenocarcinoma. En: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 22-6.
16. García-Inclán C, López F, Pérez-Escuredo J, Cuesta-Albalad MP, Vivanco B, Centeno I, et al. EGFR status and KRAS/BRAF mutations in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. *Cell Oncol (Dordr)*. 2012;35:443-50.
17. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, Lopez-Rios F, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch*. 2012;461:245-57.
18. McKinney CD, Mills SE, Franquemont DW. Sinonasal intestinal-type adenocarcinoma: immunohistochemical profile and comparison with colonic adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 1995;8:421-6.
19. Franchi A, Fondi C, Paglierani M, Pepi M, Gallo O, Santucci M. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in sinonasal intestinal type adenocarcinoma. *Oral Oncol*. 2009;45:835-8.
20. Franchi A, Innocenti DR, Palomba A, Miligi L, Psar F, Franzese C, et al. Low prevalence of K-RAS, EGFR and BRAF mutations in sinonasal adenocarcinomas. Implications for anti-EGFR treatments. *Pathol Oncol Res*. 2014;20:571-9.
21. Vivanco Allende B, Perez-Escuredo J, Fuentes Martínez N, Fresno Forcelliedo MF, Llorente Pendas JL, Hermesen M. Intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. Immunohistochemical profile of 66 cases. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2013;64: 115-23.
22. Proietti F, Durand K, Chaunavel A, Léobon S, Lacorre S, Caïre F, et al. Epidermal growth factor receptor expression and KRAS and BRAF mutations: study of 39 sinonasal intestinal-type adenocarcinomas. *Hum Pathol*. 2013;44:2116-25.
23. Proietti F, Mestroux L, Coulibaly B, Durand K, Chaunavel A, Léobon S, et al. Study of MET protein levels and MET gene copy number in 72 sinonasal intestinal-type adenocarcinomas. *Head Neck*. 2015;37:1563-8.
24. Perner S, Wagner PL, Demichelis F, Mehra R, LaFargue CJ, Moss, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia*. 2008;10:298-302.
25. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther*. 2007;6:3314-22.