

Mutaciones en Cáncer de Pulmón en Población Chilena

Dra. Cristina Fernández F.
Instituto Nacional del Tórax
Hospital Clínico de la U. De Chile

Patología quirúrgica 1965

UNIVERSIDAD DE CHILE
HOSPITAL CLÍNICO "JOSE TORRES AGUIRRE"
SANTIAGO, CHILE

INSTITUTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA 51751 AUTOPSIA

Servicio Prof. Garentón Núm. 305 Cma. 24 N.º Hist. Clínica 57/60/186

Paciente María Inés Aravena Vidal Edad 60 años Sexo F

Lugar de nacimiento operación 13-V-62 T. de envío: Id. Anatomía 20

Motivo de la consulta Biopsia Pleural Hno

DIAGNOSTICO CLINICO

Antecedentes de cuadros bronquiales ^{de años atrás} ~~de años atrás~~ ^{de años atrás} ~~de años atrás~~
Actualmente, de curso de la mitad inferior del hemitórax derecho - Baja de peso Compromiso del generador
Diagnóstico clínico:
- Diferenciación pleural?
- Diferenciación pleural derecha
- TBC?
- Neoplásico?

Fecha

P. Dr. C. Larrain
P. Dr. C. Larrain

DIAGNOSTICO ANATOMO PATOLOGICO

Se estudia un fragmento tisular de 3mm. en su diámetro mayor.

Hallazgos histológicos:
Venos tejido propio de pleura invadido por un tumor de naturaleza epitelial estructurando formaciones glanduliformes con núcleos hipercrómicos irregulares en tamaño y forma.

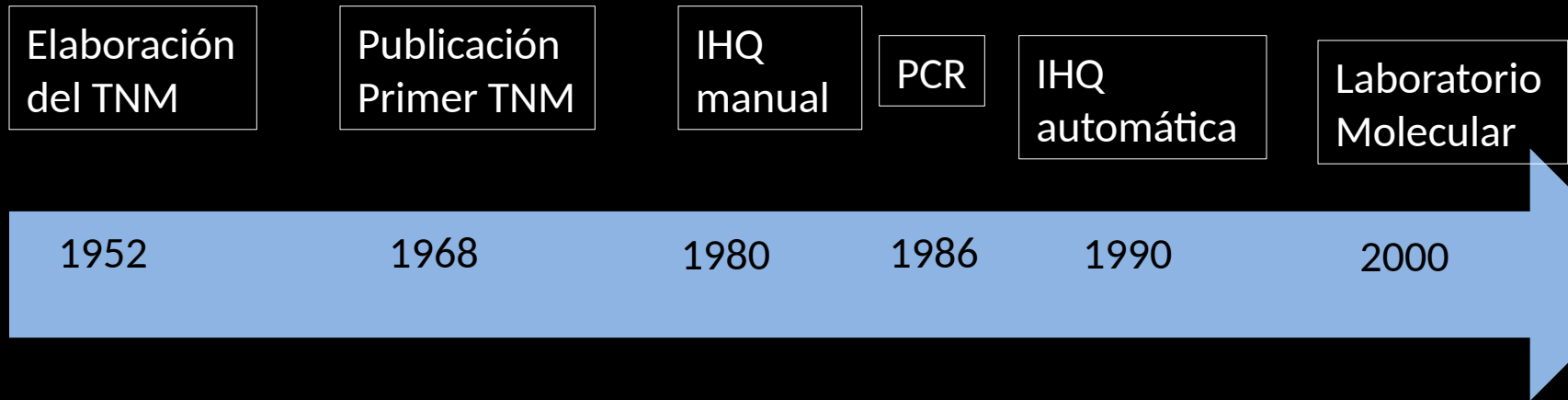
DIAGNOSTICO:
ADENOCARCINOMA DE LA PLEURA PROBABLEMENTE METASTASICO.

Dr. B. Rosenber
Dr. B. Rosenber

Fecha

Recibido en el Instituto Patológico
57/60/186

Línea de Tiempo en Anatomía Patológica



Análisis moleculares en laboratorios

- Análisis moleculares con fines de investigación vs diagnóstico.
- En 2011 la FDA escribe guía para plataformas (companion diagnosis devices) para IVD
- Esenciales para la seguridad y uso efectivo de terapia
- Capaces de identificar a los pacientes que se benefician del tratamiento.

Programas de Control de Calidad

- AIOM-SIAPEC Italian Program for EQA in molecular pathology

- College of A

“Todos los test moleculares que modifican el manejo del paciente deben ser realizados en un Laboratorio certificado”

- European M

European

- Society for

“El test en proceso de investigación usado para determinar las características de rendimiento del mismo pueden representar CLIA

stitute (INCa)

- Gen and Ti

- German So

escenario.” Validación analítica”

Med

- German So

“ Para asegurar la calidad en EEUU es un requerimiento legal la validación anual de los test”

- United King

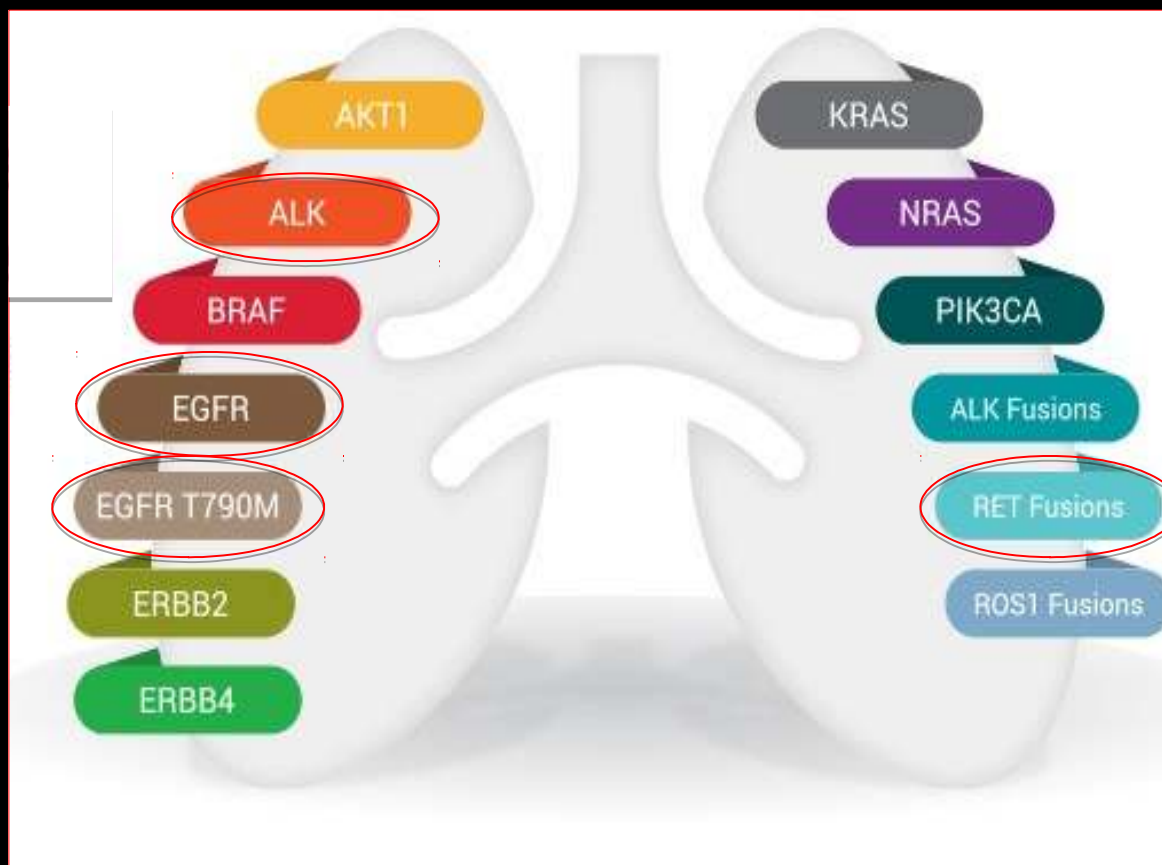
dom, National External Quality Assessment

- Service

Validación de Test. Guías CAP

- Enrolarse en sistema de evaluación de competencias.
- La certeza de los resultados debe ser validada por otro Laboratorio. Que tenga el test validado.
- Si no hay una organización es válido intercambiar test con otros laboratorios al menos dos veces al año.

Testeo Molecular para NSLC 2016 Chile



Test aprobados por FDA para EGFR

AS-PCR

- COBAS EGFR Mutation-Kit:
- **Detecta 41 mutaciones en exones 18,19,20,21**
- Requiere 150ug de DNA (se obtienen de una sección de 5micrones de parafina)



del 99%
s
asta 24 casos.
tación L861Q

ARMS TEST

- Therascreen EGFR 29 mutation kit.
- Es real time PCR. Combina ARMS y Scorpion fluorescence prime probe.
- **Detecta 29 mutaciones entre exones 18,19,20 y 21.**
- Requiere 160 ug de AND genómico y menos de 10% de células neoplasicas por área.
- El contenido de linfocitos, necrosis o mucina no altera los resultados.

Ventana ha Desarrollado el anticuerpo para detectar sobreexpresión de ALK ¹

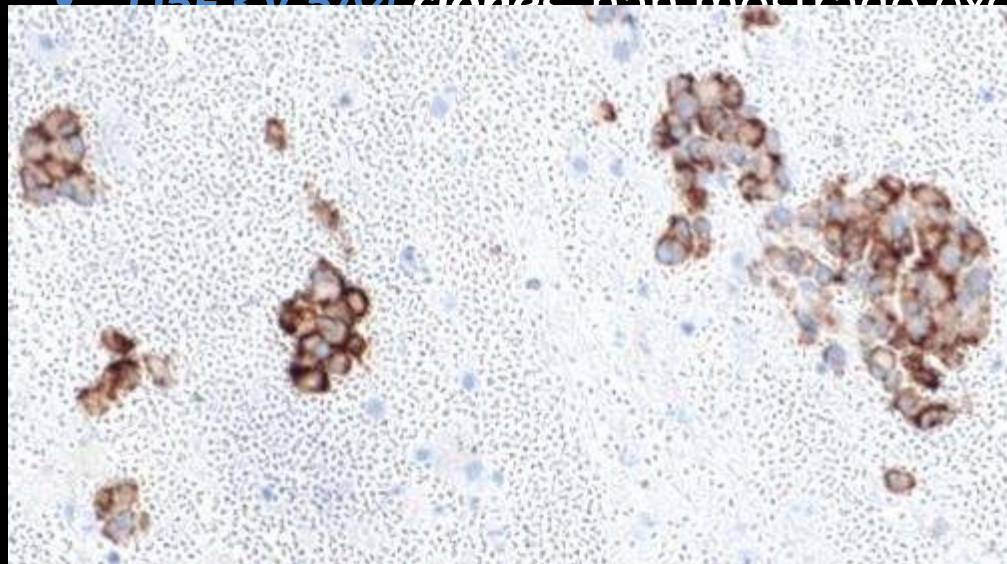
- Requiere equipo de inmunohistoquímica automatizado VENTANA BenchMark XT or BenchMark GX
- Disponible en 53 países
- 93 % de concordancia entre Ventana y Abbott's Vysis ALK break apart FISH (1100 pacientes chinos)
- Requiere validación de la técnica
- Excelente concordancia interobservador. No mejora la precisión diagnóstica con más de un observador

BENCHMARK GX

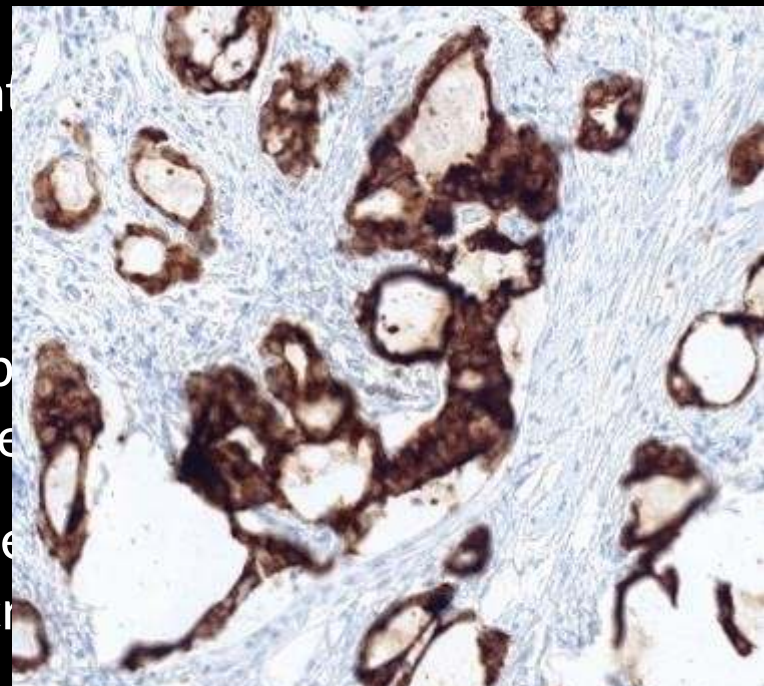


Immunohistoquímica

- D5E2 y 5A4 clones han mostrado excelentes resultados en



Patólogos)



- FDA lo ha validado como método diagnóstico

<http://www.ventana.com/site/page?view=press-release-jun15-2015>)

Estandarización de fase Preanalítica

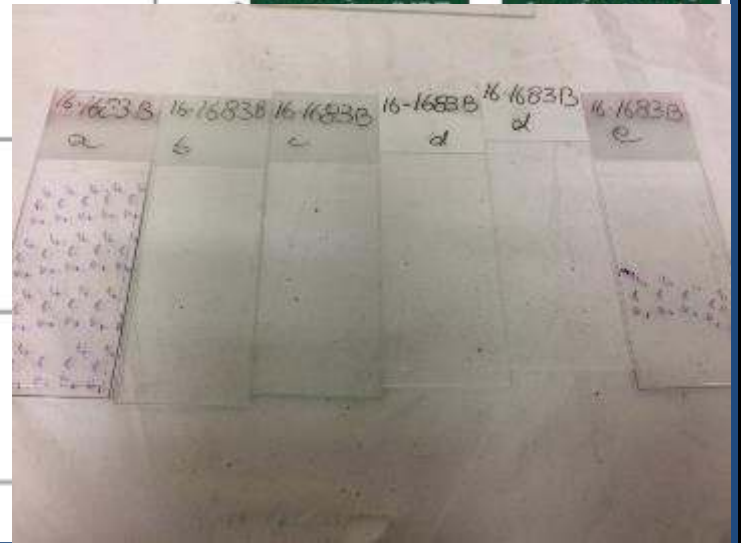
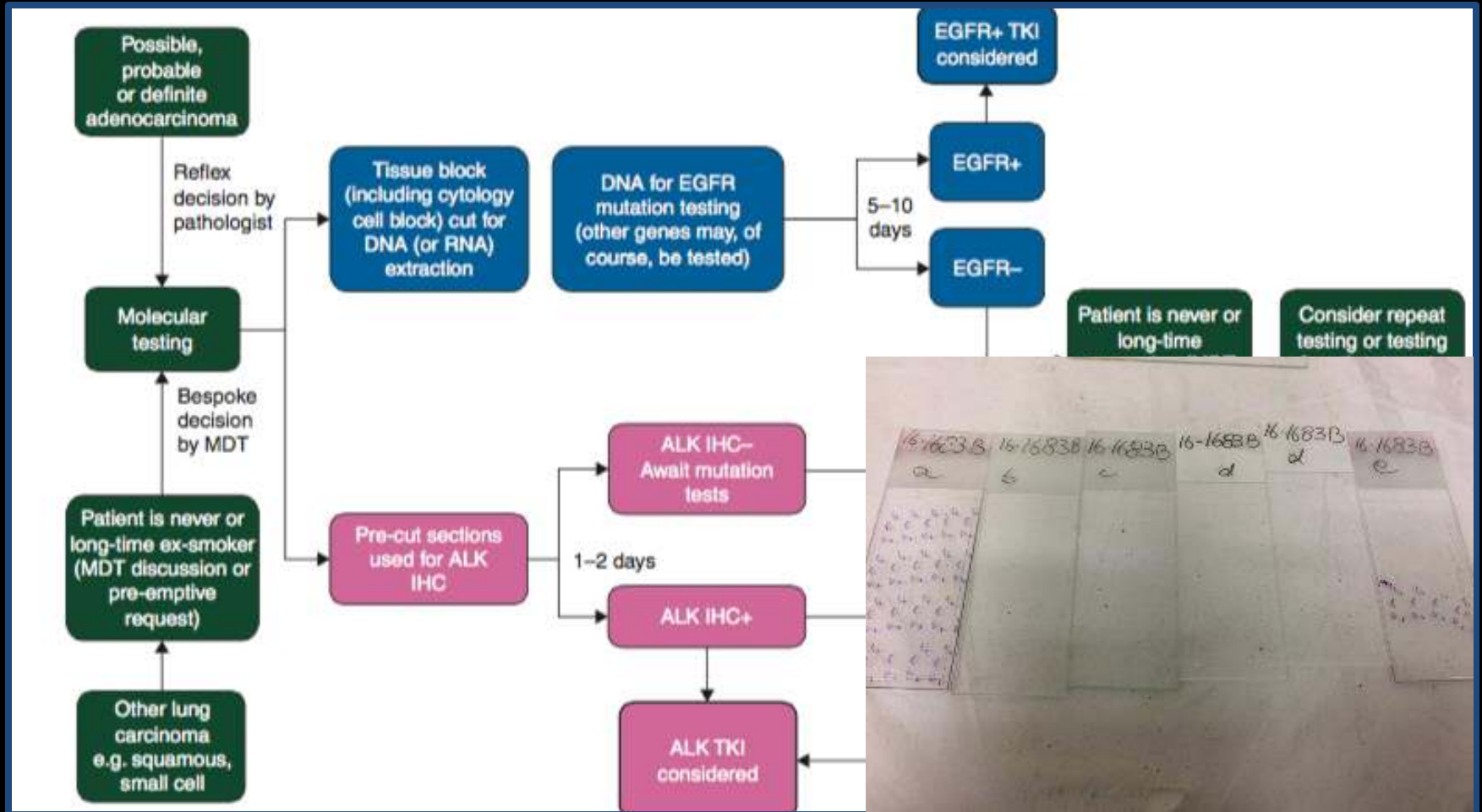
- Tanto el Fish (test basado en ADN) como la inmunohistoquímica son afectados en sus resultados por la calidad del tejido

Tiempo de extracción hasta la fijación de la muestra	<ul style="list-style-type: none">• No mas de una hora
Tiempo de fijación	<ul style="list-style-type: none">• 6-48 horas
Método de fijación	<ul style="list-style-type: none">• Formalina tamponada al 10%
Preparación	<ul style="list-style-type: none">• Secciones de tejido embebido en parafina $5\pm 1 \mu\text{m}$ (buena parafina)
Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none">• En Bloques• Protejidos de la luz, calor y humedad• Slides no ser guardados mas de 6 semanas
Descalcificación	<ul style="list-style-type: none">• EDTA debe ser usado si es necesario (mejor aspirados y bloques de lesiones oseas)
Calidad de la muestra	<ul style="list-style-type: none">• Tumores pobremente diferenciados son mas sensibles a la prehibridación, tumores con fibrosis o mucina son mas resistentes.• La calidad del especimen es revelada al momento de la visualización en el microscopio de fluorescencia.

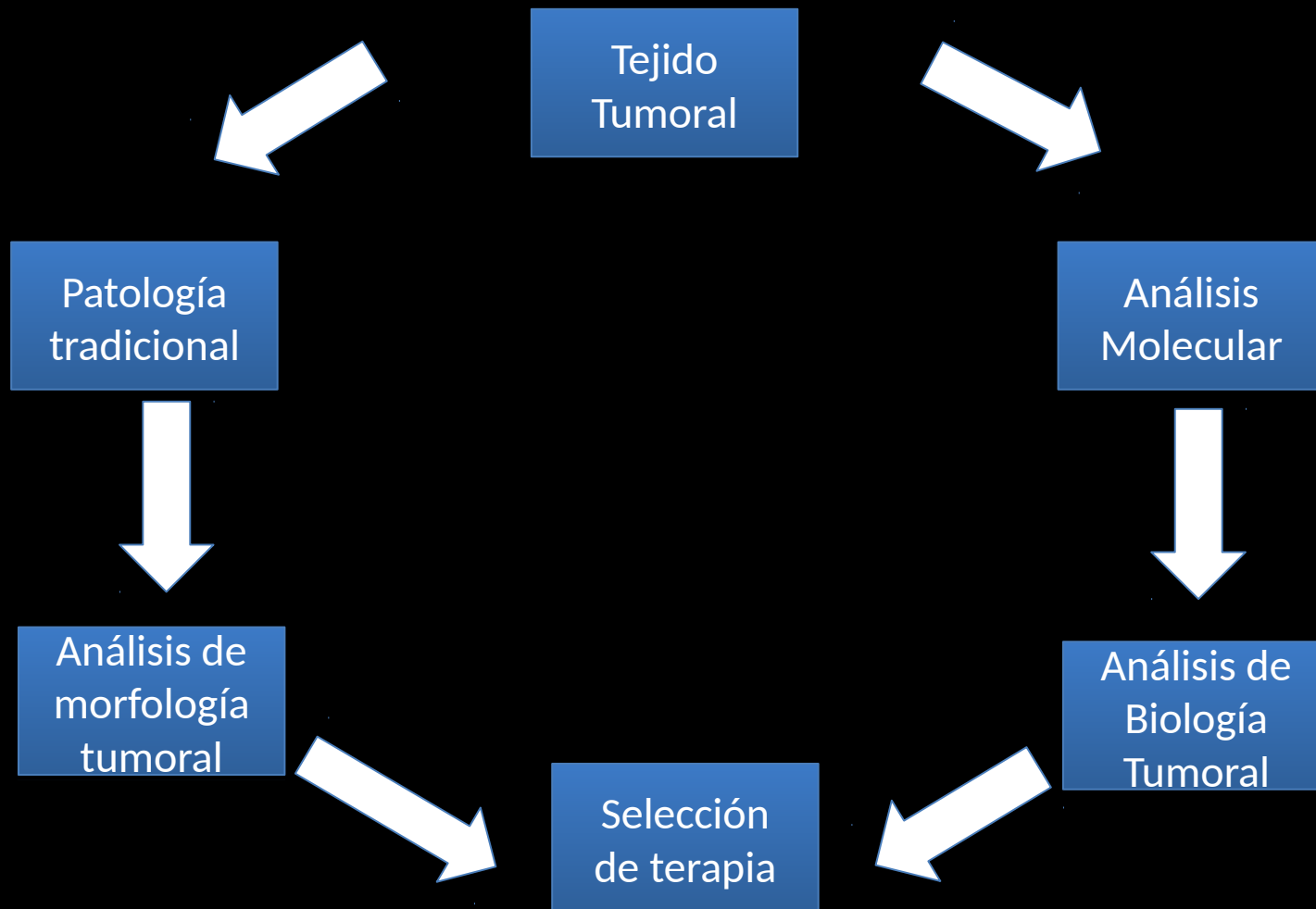
Consideraciones técnicas para análisis molecular

- Testeo paralelo vs Testeo secuencial
- Muestras listas para testeo:
 - En el mismo lab: 24 horas
 - En otro laboratorio: menos de tres días
- Control de calidad de la muestra antes del testeo: realizado por patólogo:
 - ✓ Al menos 500 células
 - ✓ 50% de tumor vs células benignas (macrodissección)-20%para NGS

Algoritmo diagnóstico



Incremento de la Complejidad del laboratorio de Anatomía Patológica



CHILE



Determinación Molecular en pacientes INT

- En una población total estimada a partir de la tasa de incidencia (13,28 casos x 100.000 habitantes) de 7.350 sujetos con cáncer de pulmón , aproximadamente 2940 con adenocarcinoma (6% de error y un 95% de confianza) una muestra de 244 casos sería representativa.
- Se determina EGFR desde 2014
- Se determina ALK por FISH desde 2014. 2015 por IHQ

Datos de la Serie

- Determinación de ALK con IHQ D5F3 en plataforma Benchmark GX y Optiview.
- Determinación de EGFR con ARMS o Sanger en Laboratorio validado y acreditado.
- Los pacientes firmaron consentimiento
- Se registraron datos epidemiológicos
- Se recolectaron 452 pacientes

Datos de la Serie

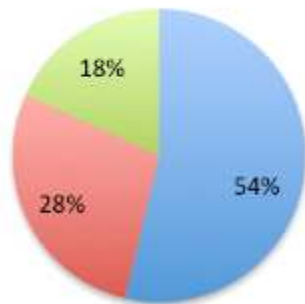
- 324 tienen determinación de ALK y EGFR (72%)
- Las determinaciones fueron solicitadas por el tratante. No se realizó test reflejo.
- Se registró edad, sexo, hábito tabáquico, status de las mutaciones, etapa, metástasis.

Hábito tabáquico y Edad

n=452

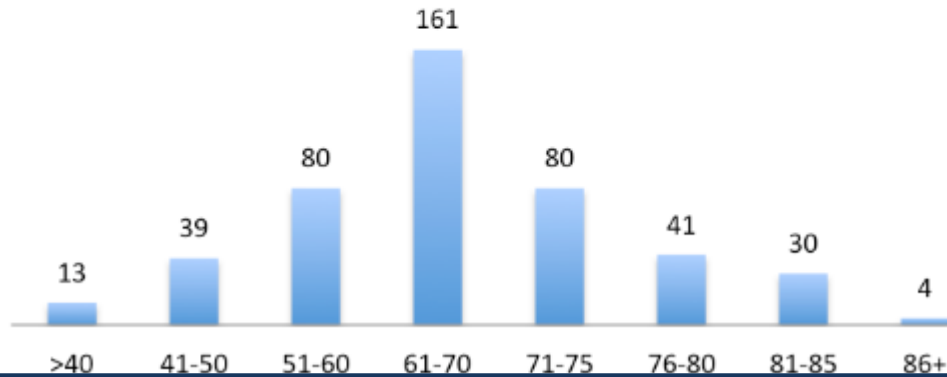
HABITO TABAQUICO

■ FUMAN ■ NO FUMAN ■ SIN DATOS



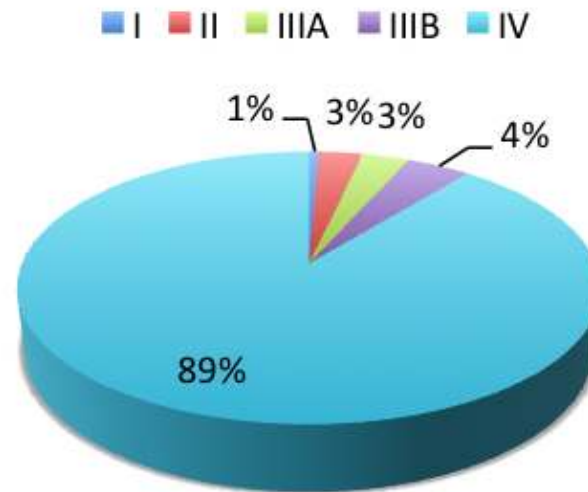
EDAD

■ EDAD



Etapa en pacientes testeados

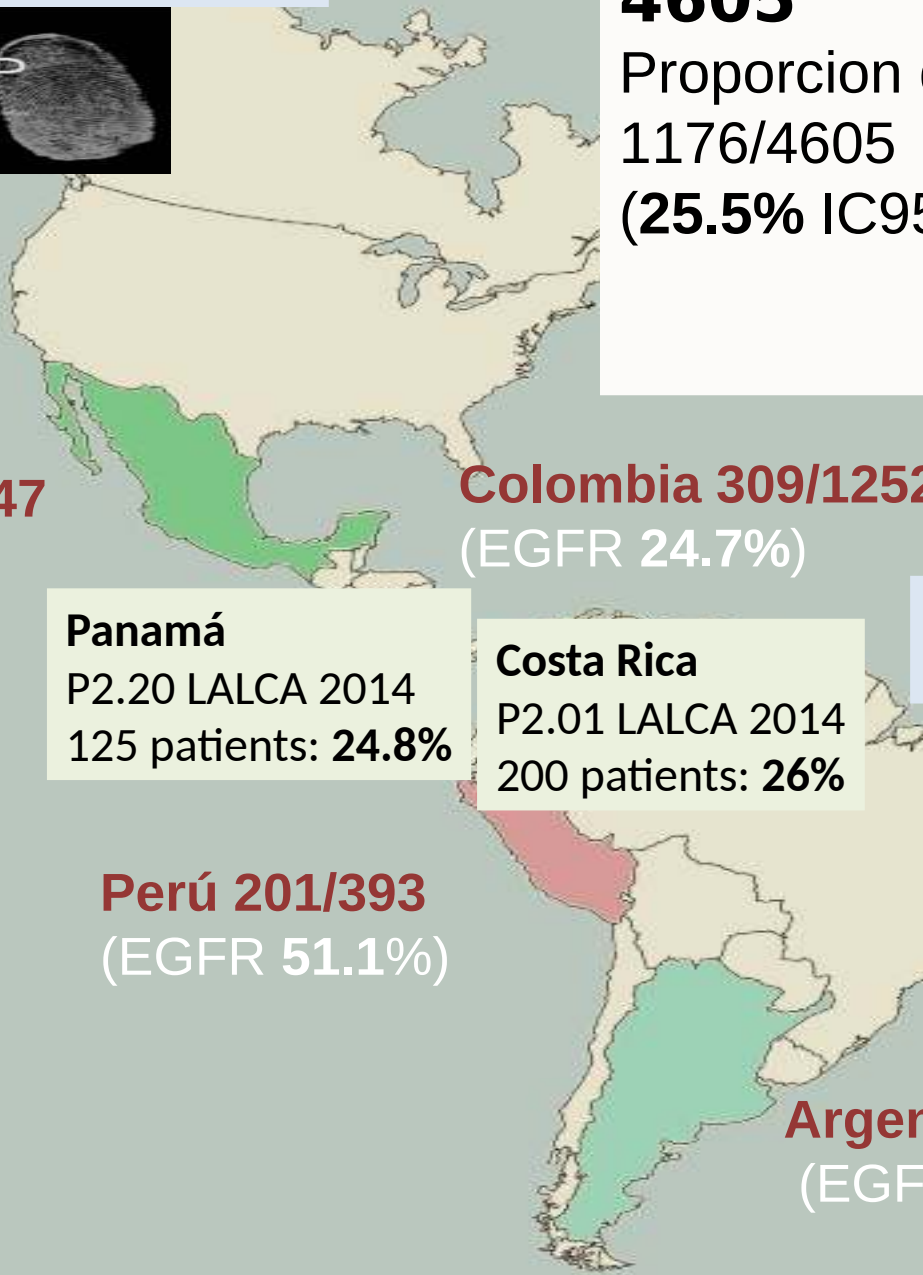
Etapa pacientes testeados n=452





Número de pacientes 4605

Proporcion de Mutación
1176/4605
(25.5% IC95% 24.2-26.7)



México 419/1247
(EGFR 33.6%)

Colombia 309/1252
(EGFR 24.7%)

Panamá
P2.20 LALCA 2014
125 patients: **24.8%**

Costa Rica
P2.01 LALCA 2014
200 patients: **26%**

Brasil. Bacchi et al
Clinics 2012;67:419-424: **30%**

Brasil (testing program)
P2.21 LALCA 2014
3364 patients: **25.5%**

Perú 201/393
(EGFR 51.1%)

Brasil (INCA)
P1.03 LALCA 2014
248 patients: **27%**

Argentina 247/1713
(EGFR 14.4%)

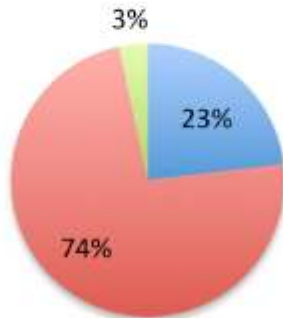
Status de EGFR

75 casos EGFR Mut

Si discriminamos entre fumadores y no fumadores

STATUS DE EGFR N=324

■ POSITIVO ■ NEGATIVO ■ INSUFICIENTE



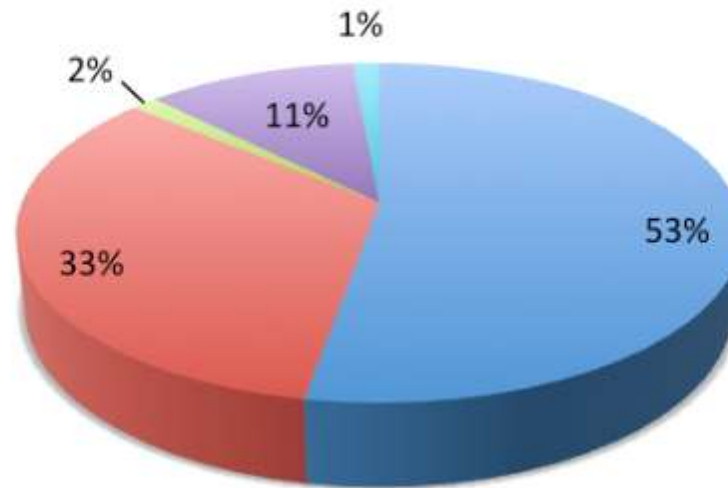
Fumadores: 7.3%
tienen EGFR Mut

No Fumadores: 32,5%
de EGFR Mut

Distribución de Mutaciones de EGFR

Distribución de los tipos de mutaciones de EGFR

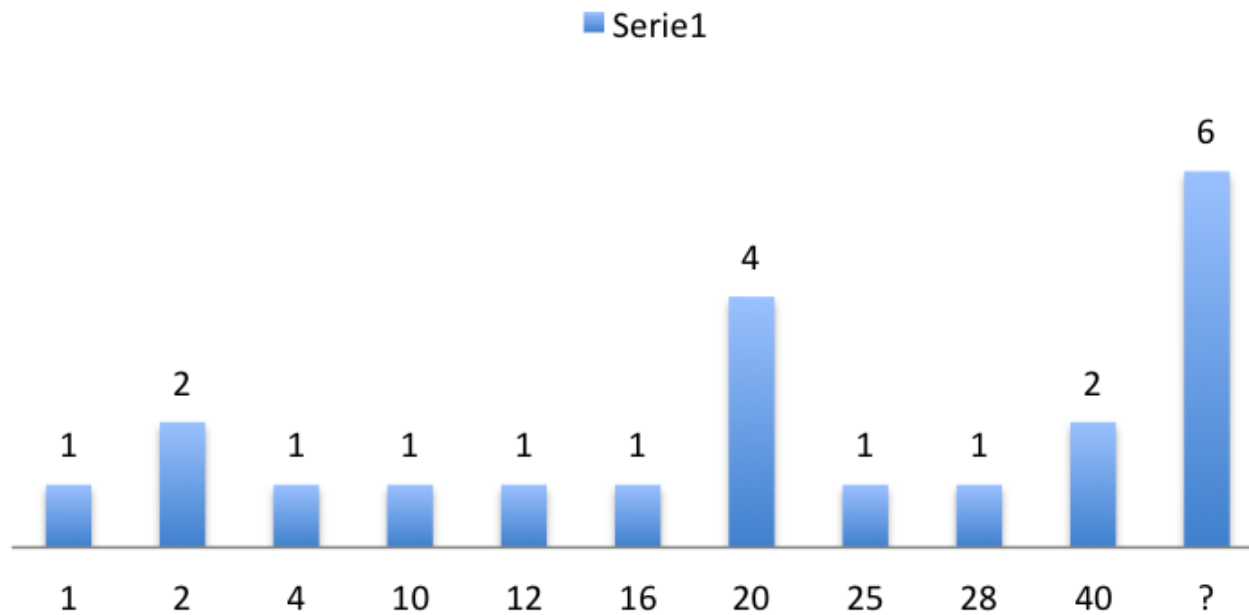
DEL 19 L858R INSGGT/CAG EXON 20 DEL 19 T790M G719 EXON 18



Paquetes año en EGFR MUT fumadores

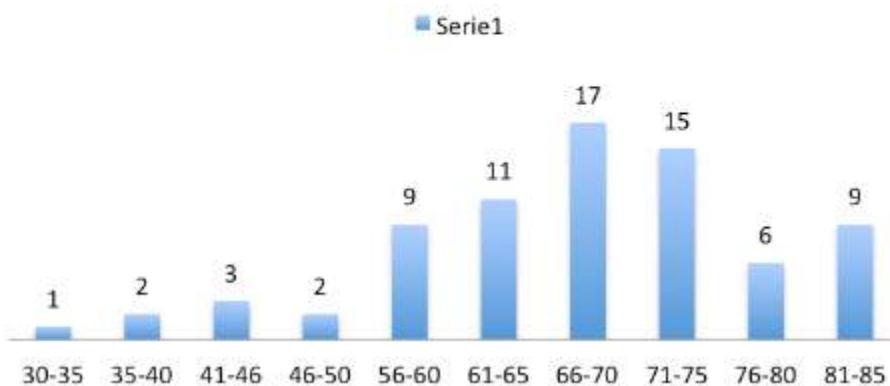
60% de pac. EGFR
MUT no fuman

Paquetes año en pac. EGFR MUT

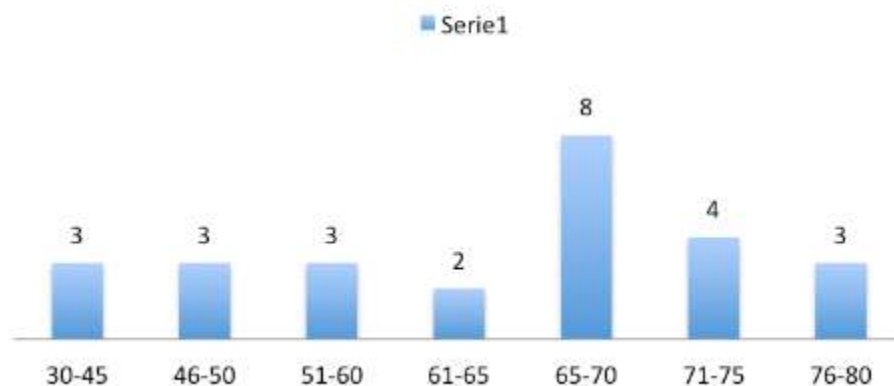


Distribución etaria en pacientes ALK o EGFR Mut.

Distribucion de edad en EGFR MUT n=75



Distribución de Edad en pacientes ALK + n=27

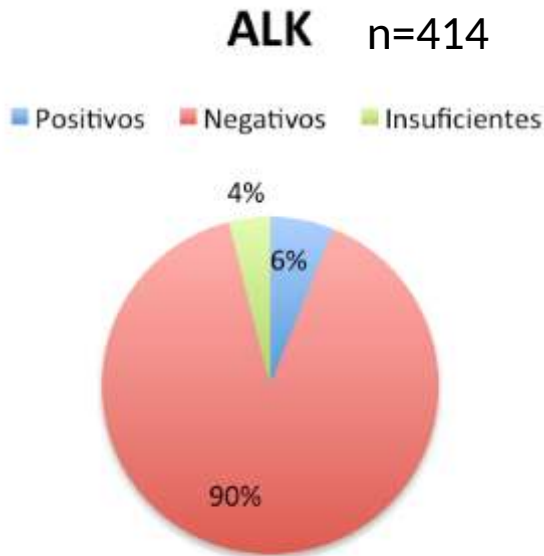


Number of patients 4136

Positivity Rate ALK
 $4136/252 = 6.02\%$



Frecuencia de Reordenamiento ALK



Si discriminamos entre fumadores y no fumadores

Fumadores: 1,6% tienen fusión ALK

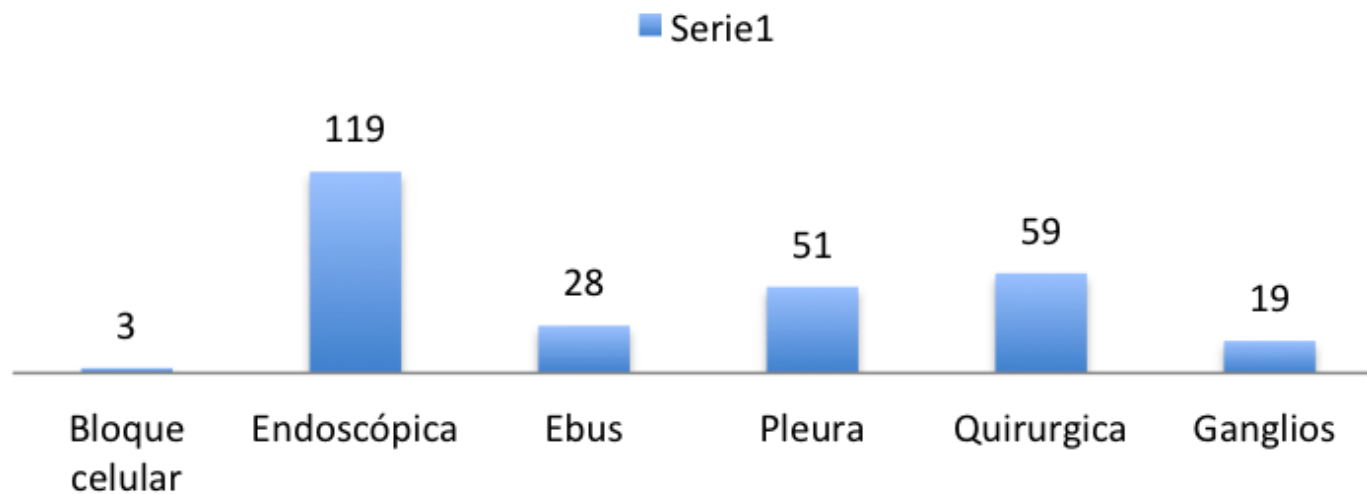
No Fumadores: 15,8% de fusión alk

70% de los ALK pos son no fumadores

P/año
110
47
12
2
1

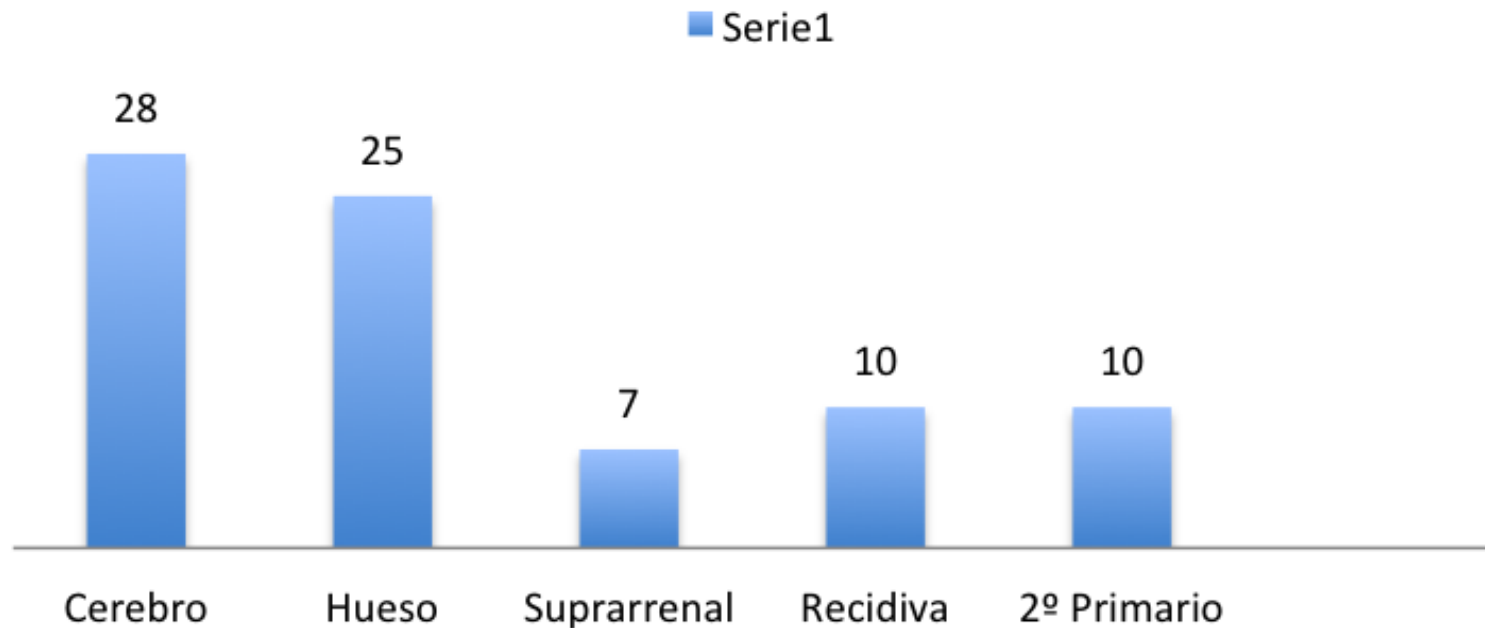
Tipo de biopsia realizada

Tipo de Biopsia en pacientes testeados N=452



Lugares de metástasis Extra torácica/ recidiva

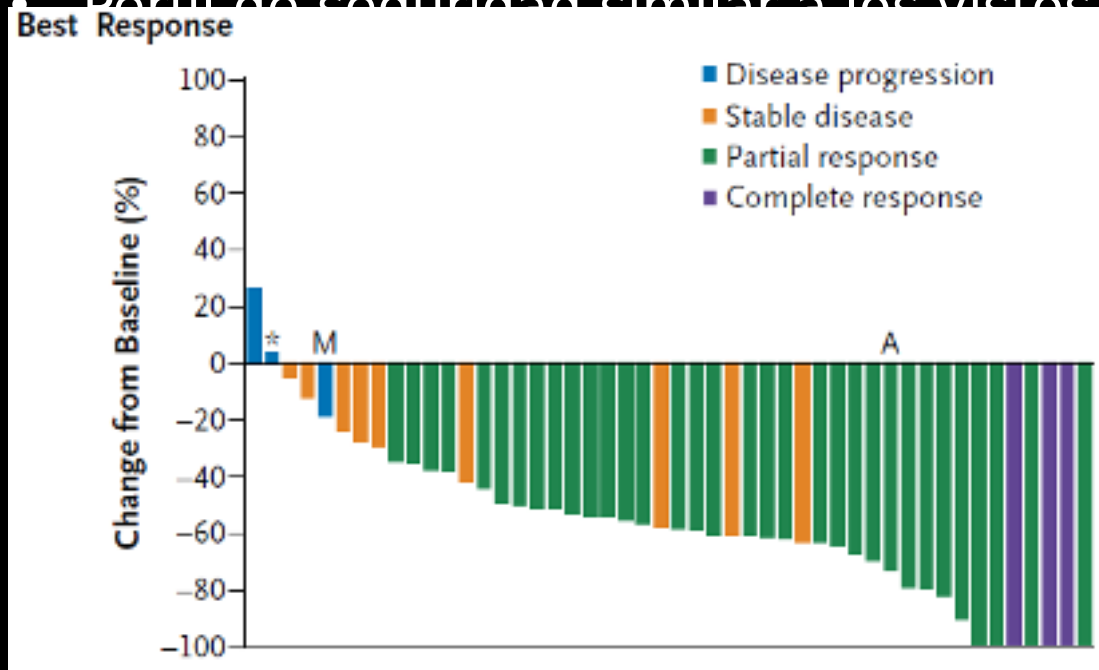
Enfermedad metastásica n=90



Futuro Próximo

ROS1

- 50 ptes con reordenamiento de ROS1 tratados con crizotinib
- TR: 72% : 3 RC + 33 RP
- Mediana de duración de respuesta: 17,6 m
- SLP mediana: 19,2 m
- Perfil de seguridad similar a los vistos en los pacientes



Crizotinib mostró una actividad muy destacada en pacientes con reordenamiento ROS1

Pruebas moleculares para ROS1

Table 5 Commercially available assays for *ROS1* testing

Method	Manufacturer	Reagent	Regulatory status
FISH	Cytocell	ROS1 Dual Color Break Apart Probe	CE-IVD
	ZytoVision/Zytomed	ZytoLight SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe	CE-IVD
	Abbott	ROS 1 Break-Apart FISH	RUO
IHC	Cell Signaling Technologies	ROS1 D4D6 rabbit monoclonal antibody	RUO
RT-PCR	AmoyDx	ALK and ROS1 gene fusion detection kit	CE-IVD
NGS	Thermo Fisher	Oncomine Fusion panel (ALK, ROS1, RET and NTRK1)	CE-IVD
	ArcherDx	FusionPlex™ ALK, RET, ROS1 v2 Panel	RUO

FISH fluorescence in situ hybridisation, *IHC* immunohistochemistry, *IVD* in vitro diagnostic, *NGS* next-generation sequencing, *RT-PCR* reverse transcription polymerase chain reaction, *RUO* research use only

Secuenciación

Ion Torrent

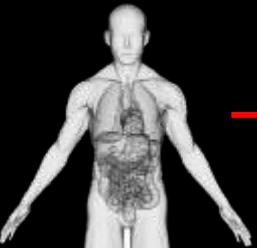
CEMP-PROYECTO NIRVANA

Proyecto Nirvana. Secuenciación de Adenocarcinoma

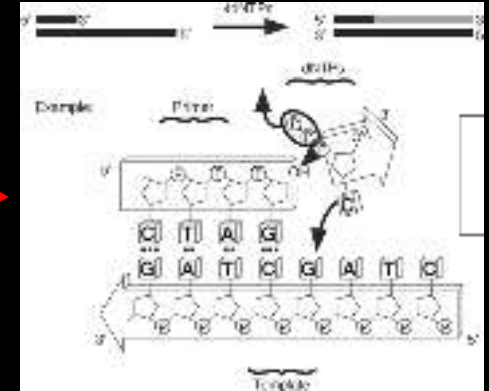
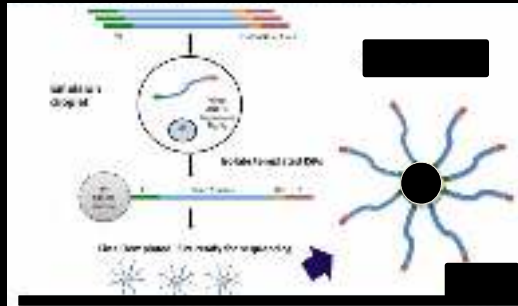
Toma de muestra y Extracción

Procesamiento

Proton Secuenciación



IHQ test



Consentimiento Informado
Encuesta (CRF)



Base de Datos



**Datos de
Secuenciación**



Panel Oncomine Focus Assay for Oncology Research

- **52 genes** asociados a tumores sólidos con **evidencia recientemente publicada** relacionada con drogas oncológicas
- Detalles del panel:
 - 35 genes hotspot
 - 19 CNV
 - 23 fusiones génicas
- Emplea DNA y RNA en el mismo workflow
- 10-20 ng de DNA y 10-20 ng de RNA iniciales desde muestras de FFPE.

Oncomine focus assay

Hotspot genes, n=35

AKT1	IDH2
ALK	JAK1
AR	JAK2
BRAF	JAK3
CDK4	KIT
CTNNB1	KRAS
DDR2	MAP2K1
EGFR	MAP2K2
ERBB2	MET
ERBB3	MTOR
ERBB4	NRAS
ESR1	PDGFRA
FGFR2	PIK3CA
FGFR3	RAF1
GNA11	RET
GNAQ	ROS1
HRAS	SMO
IDH1	

Copy Number Variants, n=19

ALK	FGFR3
AR	FGFR4
BRAF	KIT
CCND1	KRAS
CDK4	MET
CDK6	MYC
EGFR	MYCN
ERBB2	PDGFRA
FGFR1	PIK3CA
FGFR2	

Fusion drivers, n=23

ALK
RET
ROS1
NTRK1
NTRK2
NTRK3
FGFR1
FGFR2
FGFR3
MET
BRAF
RAF1
ERG
ETV1
ETV4
ETV5
ABL1
AKT3
AXL
EGFR
ERBB2
PDGFRA
PPARG

DNA Panel

RNA Panel

Secuenciación

ILUMINA

Proyecto FONDEF

PROYECTO FONDEF D111029



**“INCORPORACIÓN
DE LA SECUENCIACIÓN
DE ÚLTIMA GENERACIÓN
EN EL CUIDADO
DEL PACIENTE CON CÁNCER”.**



Secuenciación en Illumina

- La inversión en equipamiento es del orden de los M\$150
- El costo estimado por paciente (2 muestras: sangre y tumor) es de aprox. \$800.000 si se tiene un flujo de 12 pacientes al mes. El panel reducido \$400.000.
- 1 solo paciente (costo aprox. \$1.800.000.-)
- El tiempo que demora es de aprox. 3 días desde la llegada de la muestra hasta la secuenciación.
- Tiempo de análisis es variable. Cerca de los 4 días.

Laboratorio para Biomarcadores

Anatomía patológica

Laboratorio Molecular

Estandarización de fase preanalítica

Secuenciación

INVERSION, IMPLEMENTACION, CAPACITACION, CONTRATACION

Técnicas de PCR, FISH, IHQ

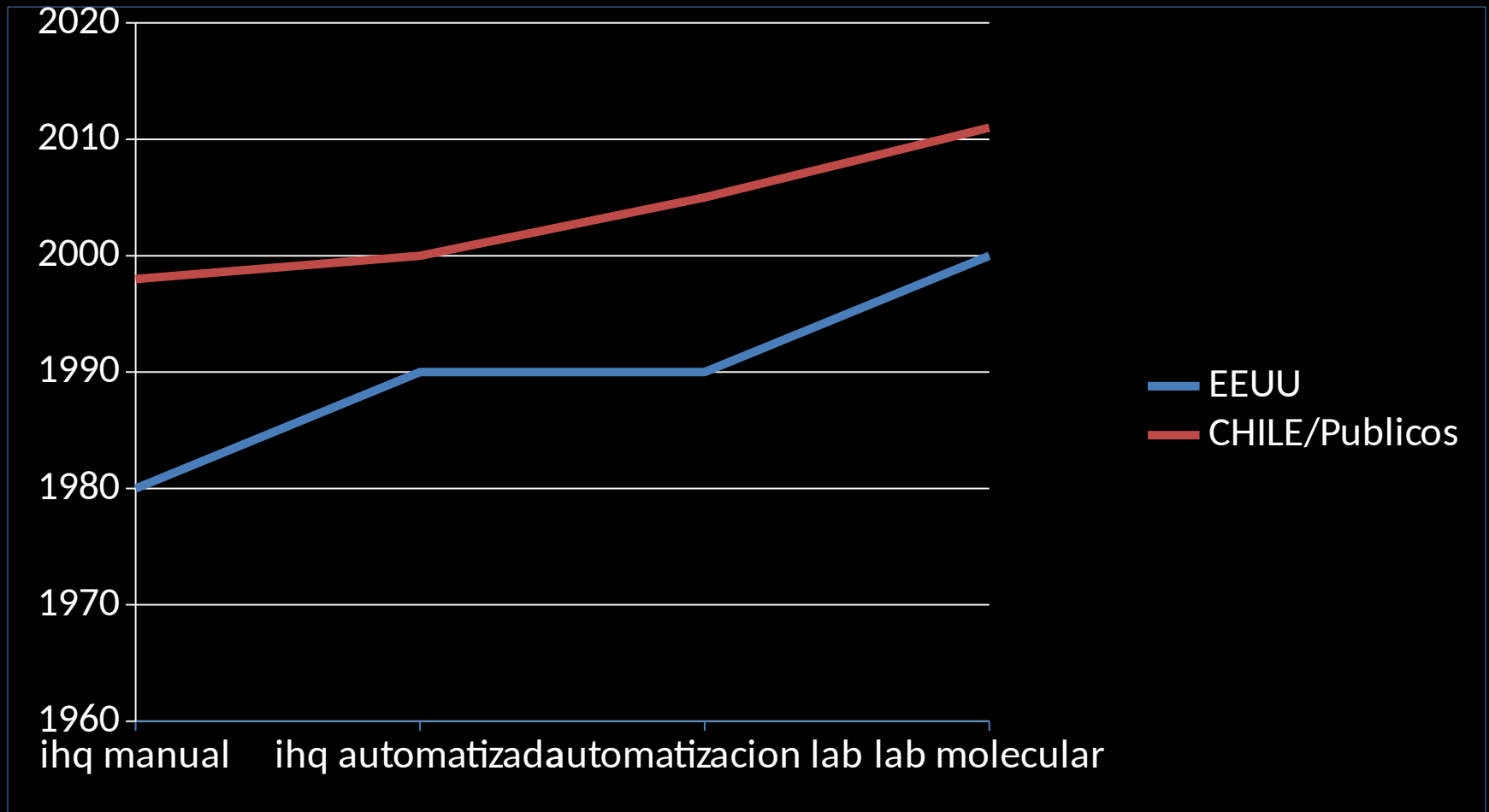
Sistema bioinformático de interpretación de resultados

Reporte y archivo de resultados

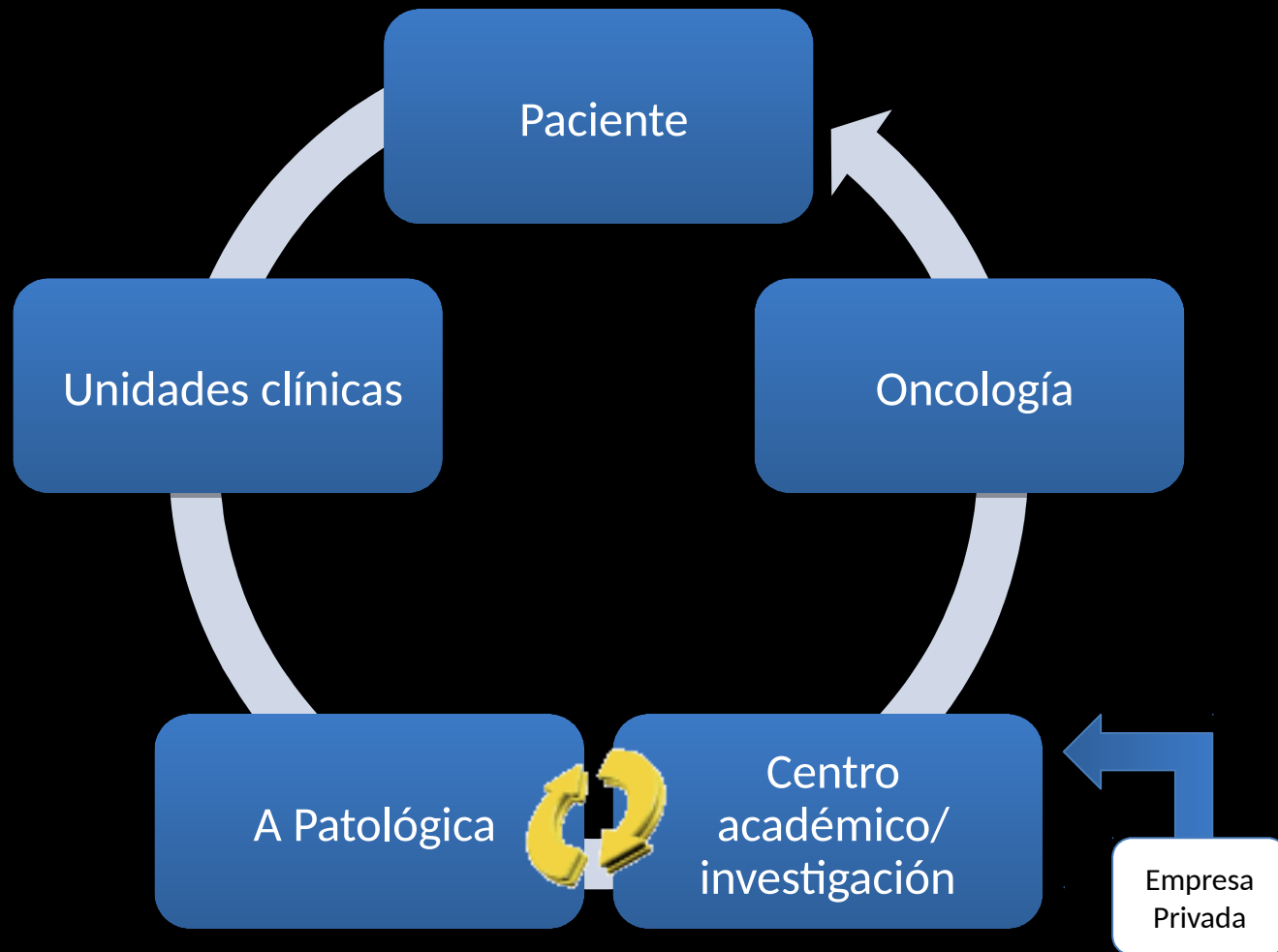
Biólogo molecular

Control de calidad

Los últimos 30 años



Modelo clínico patológico/Centro de cáncer



Conclusiones

- 80% de las decisiones médicas involucran exámenes de laboratorio, diagnóstico, pronóstico y tratamiento.
- Requerimiento de más test, más tejido / técnicas de obtención de muestras con especímenes más pequeños
- Necesaria Planificación de implementación de los laboratorios.
- El conocimiento del porcentaje de Mutaciones en Chile permitirá la planificación y racionalización de recursos en diagnóstico y tratamiento.