



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# TESIS DOCTORAL



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES DE VÍAS BILIARES AVANZADOS E IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES POTENCIALES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS**

**Tamara Saurí Nadal**

DIRECTORES: Dr. Josep Tabernero i Caturla  
Dra. Teresa Macarulla Mercadé  
TUTOR: Dr. Albert Selva O'Callaghan

Universitat Autònoma de Barcelona, abril de 2019

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES DE  
VÍAS BILIARES AVANZADOS E IDENTIFICACIÓN DE  
BIOMARCADORES POTENCIALES PREDICTIVOS DE  
RESPUESTA A NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS**

Tesis para optar al grado de doctor  
Tamara Saurí Nadal

Directores de la Tesis:  
Dr. Josep Taberner i Caturla  
Dra. Teresa Macarulla Mercadé

Tutor: Dr. Albert Selva O'Callaghan



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Programa de Doctorado en Medicina  
Facultad de Medicina  
Barcelona, abril de 2019

A mis padres,  
por darme todo sin esperar nada a cambio,  
por disfrutar y sufrir conmigo, por enseñarme a vivir y a ser feliz.  
A todos los pacientes que luchan día a día.

## Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral supone la culminación de un periodo de formación académica, con trabajo duro y constante, en investigación biomédica. El título de doctor es para mí el afán por superarme, intentando día tras día dar continuidad a mi formación académica, científica y personal.

Quiero agradecer a todos aquellos profesionales que han hecho posible este proyecto, en especial al Dr. Josep Tabernero y la Dra. Teresa Macarulla, quienes me dieron la oportunidad de formar parte de su equipo, me ofrecieron su apoyo en el día día, y me han transmitido todos los conocimientos en el aprendizaje de la investigación médica. Ambos han sido para mí un claro ejemplo del esfuerzo en el trabajo de alta calidad y de la humanidad en el trato con los pacientes.

Muchas personas han contribuido indirecta o directamente a este proyecto, pero en especial quiero agradecer al Dr. Rodrigo Dienstmann, por todo el apoyo en la elaboración de la Tesis. Él me ha enriquecido con sus amplios conocimientos sobre el tema y me ha ayudado de forma incondicional como un amigo.

Al Dr. Albert Selva, mi tutor, quien siempre me ha transmitido paciencia, calma y comprensión, valorando mi esfuerzo de realizar la Tesis Doctoral simultáneamente a mi trabajo en la clínica.

A todas aquellas personas con las que he compartido el camino de mi vida profesional, destacando al Dr. Joan Borrás durante mi época universitaria, Dra. Sonia del Barco, Dr. Ángel Izquierdo, Dr. Xavi Hernández, Dr. Bernardo Queralt y Dr. Joan Brunet durante mi especialización en Oncología Médica.

Ellos dejaron en su día una huella en mí, que siempre me acompañará.

Agradezco a la Dra. Marta Pulido la ayuda editorial en la revisión y corrección del manuscrito.

A mis amigos, por haber estado siempre a mi lado, y por haber compartido aquellos momentos inolvidables para evadirnos del trabajo.

Quiero agradecer la paciencia, el amor, la comprensión y el apoyo diario de Albert, que han hecho que fueran más llevaderos los días de estrés en estos últimos meses.

Y en especial, a mi pequeña pero gran familia, mis padres, Lola y Pepe, por sus valores transmitidos, su cariño, su apoyo y su confianza incondicional, que me ha ayudado a llegar hasta aquí.

A todos los pacientes que confían en nosotros, y sin los cuales no sería posible la investigación que he desarrollado en este trabajo.

## Acrónimos

- AGCR: alteraciones genómicas clínicamente relevantes
- ADNc: ADN complementario
- Ampl: amplificación
- BilIN: neoplasia intraepitelial biliar
- CC: colangiocarcinoma
- CCIH: colangiocarcinoma intrahepático
- CCEH: colangiocarcinoma extrahepático
- CCH: colangiocarcinoma hiliar
- CEA: antígeno carcinoembrionario
- CIS: carcinoma *in situ*
- COX2: ciclooxigenasa 2
- CTLA4: antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos
- CVB: cáncer de vía biliar
- CVBM: cáncer de vía biliar metastásico
- DT: diana terapéutica
- EGFR: factor de crecimiento epidérmico
- FEC: epirubicina, cisplatino, 5-FU
- FELV: 5-FU, leucovorin, etopósido
- FDG: fluorodesoxiglucosa
- FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
- FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
- FHT: tríada de histidina frágil
- 5-FU: 5-fluorouracilo
- Fus: fusión
- GCP: plataforma de caracterización genómica (*genomic comprehension profiling*)
- HCC: hepatocarcinoma
- HGF: factor de crecimiento hepático
- 2-HG: oncometabolito 2-hidroxiglutarato
- HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
- HR: *hazard ratio* (cociente de riesgos instantáneos)
- IC: intervalo de confianza
- IDH: isocitrato deshidrogenasa
- iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
- LOH: pérdida de heterocigosidad
- MEK: proteína de la familia quinasa (*mitogen protein kinases*)
- MET: receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
- MMR: sistema de reparación de errores
- MSI: inestabilidad de microsatélites
- Mut: mutación
- mTOR: proteína diana de la rapamicina en mamíferos (*mamalian target of rapamin*)
- MUC1: proteína 1 de mucina

- MUC5AC: proteína de núcleo de mucina 5AC
- NA: no alcanzado
- NGS: *next-generation sequencing* (plataforma genómica)
- NmPI: neoplasia mucinosa papilar intraductal
- NPIVB: neoplasia papilar intraductal del conducto biliar
- NTKR: receptor de tirosina quinasa neurotrófico
- ODysSey: *Oncology Data Science Group*
- ONSi: óxido nítrico sintasa inducible
- PanIN: neoplasia intraepitelial pancreática
- PET: tomografía por emisión de positrones
- PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*platelet-derived growth factor*)
- PIK3CA: fosfoinositida-3-quinasa
- QT: quimioterapia
- RDT: radioterapia
- SG: supervivencia global
- SLP: supervivencia libre de progresión
- SP1°T: supervivencia global desde la fecha de progresión a primera línea de tratamiento
- TC: tomografía computarizada
- TCE: tasa de control de enfermedad
- TCGA: *Cancer Genome Atlas*
- TIL: linfocitos infiltrantes de tumor
- TKI: tirosina quinasa
- TM: terapia dirigida (*matched*)
- TR: tasa de respuesta
- TKI: inhibidor de tirosina quinasa
- VB: vesícula biliar
- VEGF: factor de crecimiento endotelio vascular
- VHIO: Vall d'Hebron Institut d'Oncologia
- VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
- WES: whole exome sequencing
- WT1: proteína 1 de tumor de Wilms

## Índice

<i>Capítulo 1. Cáncer de vías biliares: generalidades</i> .....	11
1.1 Etiología y factores de riesgo .....	14
1.2 Presentación clínica y diagnóstico .....	18
1.3 Estadificación .....	21
1.4 Anatomía patológica .....	23
1.4.1 Biología tumoral y lesiones premalignas .....	24
1.5 Tratamiento sistémico de la enfermedad metastásica .....	26
<i>Capítulo 2. Biología molecular</i> .....	32
2.1 Clasificación molecular del cáncer de vías biliares .....	33
2.2 Vías de señalización y alteraciones genéticas .....	36
2.3 Estrategias terapéuticas dirigidas contra alteraciones moleculares específicas .....	41
2.4 Estrategias terapéuticas dirigidas contra vías de señalización .....	49
2.5 Inmunoterapia .....	54
<i>Capítulo 3. Justificación de la tesis</i> .....	58
<i>Capítulo 4. Hipótesis y objetivos</i> .....	62
4.1 Hipótesis primaria y secundaria .....	63
4.2 Objetivos primario y secundarios .....	63
<i>Capítulo 5. Métodos</i> .....	64
5.1 Diseño y emplazamiento .....	65
5.2 Selección de la muestra .....	65
5.3 Análisis molecular aplicado a la muestra .....	66
5.4 Variables clínico-patológicas .....	68
5.5 Definiciones y conceptos relevantes .....	68
5.6 Análisis estadístico .....	69
<i>Capítulo 6. Resultados</i> .....	71
6.1 Características de la población .....	72
6.2 Supervivencia global .....	73
6.3 Supervivencia libre de progresión a la primera línea de tratamiento .....	74
6.4 Alteraciones moleculares en CCIH, CCEH, VB .....	75
6.5 Impacto del uso de diferentes plataformas de secuenciación .....	79
6.6 Descripción de la población que participa en ensayos clínicos .....	81
6.7 Supervivencia libre de progresión de los pacientes que participaron en ensayo clínico .....	83
6.8 Supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento .....	85
<i>Capítulo 7. Discusión</i> .....	88



<i>Capítulo 8. Conclusiones</i> .....	96
<i>Capítulo 9. Líneas futuras</i> .....	98
<i>Capítulo 10. Bibliografía</i> .....	100
<i>Apéndice</i> .....	119

## **Resumen**

**Antecedentes:** El cáncer de vía biliar (CVB) tiene un mal pronóstico y el beneficio del tratamiento con quimioterapia sistémica es modesto. En esta Tesis Doctoral se efectúa un estudio genómico de los CVB; se analiza la presencia de alteraciones moleculares clínicamente relevantes (AGCR) y se definen las alteraciones moleculares en función de la localización del tumor en el árbol biliar. También se examina el beneficio de la participación de pacientes con CVB en ensayos clínicos con o sin terapia dirigida (TM).

**Métodos:** Se analizó la muestra tumoral en bloques de parafina de 154 pacientes; 101 colangiocarcinomas intrahepáticos (CCIH), 28 colangiocarcinomas extrahepáticos (CCEH) y 25 tumores de la vesícula biliar (VB). El análisis genómico completo de las mutaciones, amplificaciones y fusiones se llevó a cabo mediante la técnica de Sequenom<sup>®</sup>, Amplicon-MiSeq, inmunohistoquímica, nCounter Nanostring<sup>®</sup> o FoundationONE<sup>®</sup> según disposición de la técnica en nuestro centro en cada periodo de tiempo. Se analizaron las AGCR en las distintas muestras tumorales. Asimismo, se evaluó el beneficio de la participación en un ensayo clínico de pacientes con CVB, mediante el cálculo de la supervivencia global desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento (SP1<sup>o</sup>T) hasta el fallecimiento o el último seguimiento del paciente, y el beneficio clínico definido como respuestas parciales o estabilizaciones de más de 4 meses.

**Resultados:** Las características de los pacientes fueron similares en los tres tipos tumorales. Las AGCR que se describieron fueron diferentes según la localización tumoral. Los CCIH se caracterizaron por presentar fusiones de *FGFR*, mutaciones en *IDH1/2*, mutaciones en *ARID1A* y amplificación de *MET*. Los CCEH y los tumores de la VB presentaron amplificaciones en *ERBB2*. Los CCEH se caracterizaron por presentar una alta frecuencia de mutaciones en *KRAS*. Se observó beneficio clínico en pacientes que participaron en un ensayo clínico con TM (n = 19), con una respuesta parcial y ocho estabilizaciones. La SP1<sup>o</sup>T fue de 6,17 meses en los pacientes que no participaron en un ensayo clínico y de 14,1 meses en aquellos que participaron en un ensayo clínico. La diferencia fue estadísticamente significativa,  $P = 0,003$ . No obstante, la SP1<sup>o</sup>T fue de 12,8 meses en los pacientes incluidos en un ensayo con TM y de 14,1 meses en aquellos que participaron en un ensayo sin TM, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P = 0,7$ ).

**Conclusiones:** El análisis molecular realizado en este trabajo revela una gran variedad de AGCR en las diferentes localizaciones de los tumores CVB. Algunas de estas alteraciones moleculares se consideran potenciales dianas terapéuticas para fármacos en fase de desarrollo clínico. En nuestra serie, los pacientes afectados de un CVB que participaron en un ensayo clínico presentaron una SP1<sup>o</sup>T superior respecto a los que no participaron en él. Sin embargo, no se encontró aumento en SP1<sup>o</sup>T tras la participación en un ensayo clínico con TM, pero sí beneficio clínico.

## **Abstract**

**Background:** Biliary tract cancer (BTC) has a poor prognosis and treatment with systemic chemotherapy provides a modest benefit. In the present Doctoral Thesis, it is proposed whether genomic comprehensive profiling (GCP) of the BTC would reveal clinically relevant genomic alterations (CRGA), which may be different depending on the tumor location in the biliary tree. We also examined the benefits provided by patient's participation in a clinical trial (CT) with or without targeted therapy.

**Methods:** Tumor samples embedded in paraffin blocks from 154 patients were analyzed; intrahepatic cholangiocarcinoma 101 cases, extrahepatic cholangiocarcinoma 28, and gallbladder 25. The complete genomic analysis of mutations, amplifications, and fusions was performed using the Sequenom, Amplicon-MiSeq, immunohistochemistry, Nanostring or FoundationONE technique. CRGA were analyzed in the different tumor samples. Likewise, we assessed the benefit of participation in CT of patients with BTC by survival from the date of progression to the first-line of treatment (OS1°T) until death or the last follow-up and with clinical benefit defined as partial responses or stabilizations more than 4 months.

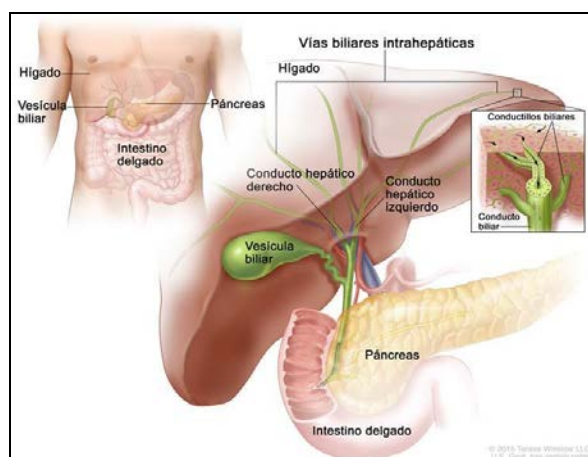
**Results:** The characteristics of the patients were similar in the three tumor types. We observed different CRGA according to the site of tumor. CRGA in intrahepatic cholangiocarcinoma were characterized by *FGFR* fusions, *IDH1/2* mutations, *ARID1A* mutations, and *MET* amplification. CRGA in extrahepatic cholangiocarcinoma and gallbladder presented amplifications in *ERBB2*. Also, extrahepatic cholangiocarcinoma was further characterized by a high frequency *KRAS* mutation. Clinical benefit was observed with TM (n = 19), one partial response and eight stabilizations. OS1°T was 6,17 months in patients who did not participate in a CT and 14.1 months in the group of patients who did participate in a CT. The difference was statistically significant,  $P = 0,003$ . However, SP1°T was 12,8 months in patients who participated in a CT with TM and 14,1 months in the group of patients who participated in a CT without TM. No statistically significant differences were observed ( $P = 0,7$ ).

**Conclusions:** A high frequency of CRGA in different types of BTC was detected by GCP. Some of these molecular alterations may be potential therapeutic targets for the development of new drugs in CT. In our series, patients with a BTC who participated in a CT presented a higher OS1°T compared to those who did not participate in a CT. Although there was no statistically significant increase in OS1°T according to the participation in a CT with TM, clinical benefits were observed.

## **Capítulo 1. Cáncer de vías biliares: generalidades**

## 1. Cáncer de vías biliares: generalidades

El cáncer de vía biliar (CVB) es una neoplasia de células epiteliales originada en el árbol biliar. En función de la localización anatómica se divide en cuatro tipos: colangiocarcinoma intrahepático (CCIH), colangiocarcinoma hiliar (CCH), colangiocarcinoma extrahepático (CCEH) y tumores de la vesícula biliar (VB) (figura 1). Generalmente CCEH y CCH se analizan conjuntamente como una misma localización. Mientras que anatómicamente estos tumores están relacionados y cursan con patrones metastásicos semejantes, cada uno de ellos tiene una presentación clínica diferente, así como una patología molecular propia.



**Figura 1.** Distribución anatómica de CVB

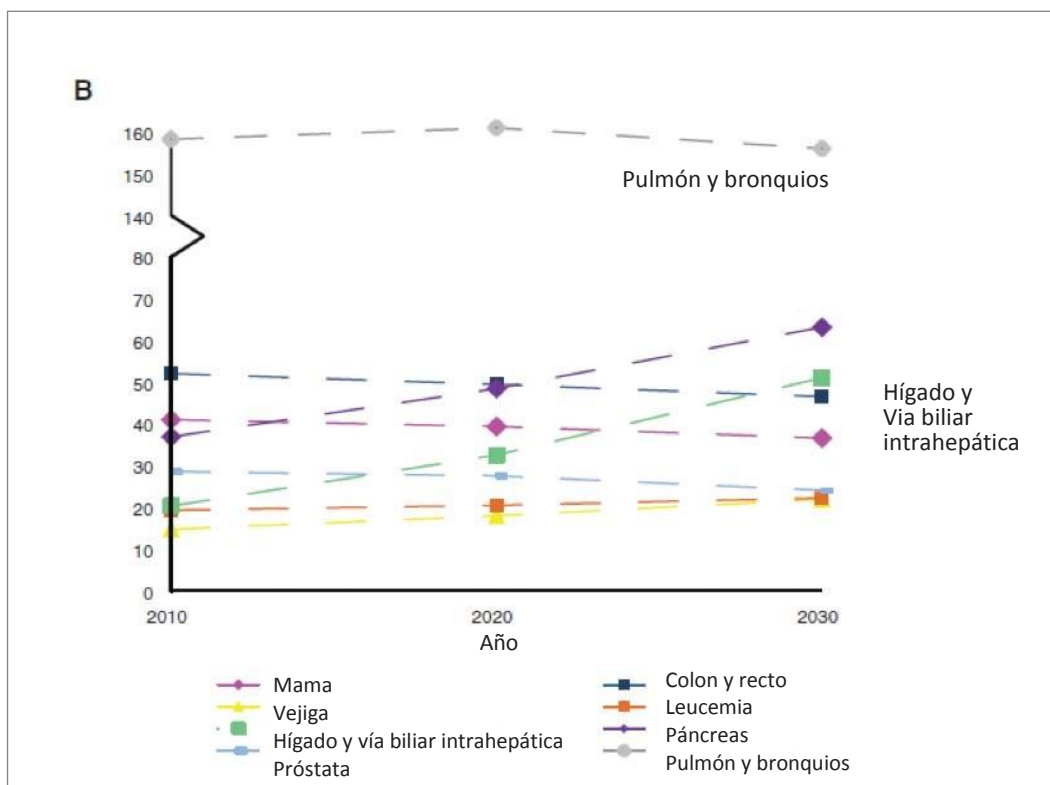
El CVB representa un problema de salud importante. Las tasas de incidencia de CVB son heterogéneas a nivel mundial, las tasas más altas han sido descritas en el sudeste asiático y las más bajas en Australia. En el sudeste asiático, la incidencia anual oscila entre 0,1/100,000 y 71,3/100,000 habitantes. En Europa, las tasas de incidencia varían entre 0,4/100,000 y 1,8/100,000 habitantes, y en los Estados Unidos entre 0,6/100,000 y 1,0/100,000 habitantes.<sup>1,2</sup>

La incidencia aumenta con la edad, presentando la mayoría de los pacientes edades comprendidas entre los 50-70 años, con un pico en la octava década de la vida. Sin embargo, los pacientes con colangitis esclerosante primaria y aquellos con quistes de colédoco tienden a desarrollar tumores biliares en edades más tempranas (entre los 30-50 años). En relación con el sexo, es ligeramente más frecuente en los varones que en las mujeres.<sup>3</sup>

En los pacientes con CVB, la tasa de supervivencia a los 5 años es inferior al

5%.<sup>2</sup> Estas cifras tan bajas de supervivencia podrían estar relacionadas con tres circunstancias. En primer lugar, el diagnóstico de CVB en estadios tempranos de la enfermedad (tumores localizados potencialmente susceptibles de tratamiento quirúrgico) solo se establece en un 20% de los pacientes, y tampoco existen programas de cribado que permiten un diagnóstico precoz. En segundo lugar, hay que considerar la agresividad del tumor. En tercer lugar, la falta de tratamientos oncológicamente activos.

En más de la mitad de los pacientes con CVB, el diagnóstico se establece en estadios avanzados, siendo la supervivencia media de 8 a 11 meses, a pesar de haber recibido tratamiento con quimioterapia.<sup>3,4</sup> Asimismo, las expectativas futuras para la década del 2020-2030 son desalentadoras. Según un artículo de Rahib y cols.<sup>5</sup> publicado en 2014 en la revista *Cancer Research*, la previsión para la próxima década en los Estados Unidos es que los tumores de hígado sean la tercera causa de muerte por cáncer, superando a tumores con una alta prevalencia, como el cáncer de mama, de próstata o de colon (figura 2). Frente a la alarma de dichas previsiones los autores insisten en la necesidad de invertir en la investigación para la detección precoz de esta enfermedad, y en la profundización del conocimiento de la biología del CVB, con el objetivo de encontrar nuevas terapias moleculares que puedan ser ensayadas en estudios clínicos y mejorar las opciones terapéuticas para luchar contra esta enfermedad.



**Figura 2.** Curvas de estimación de la mortalidad por cáncer para el año 2020-2030 en los Estados Unidos

## 1.1 Etiología y factores de riesgo

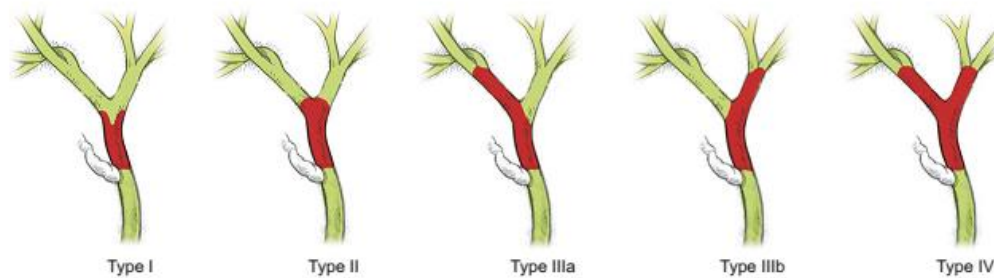
En la clasificación actual de los CVB se distinguen los colangiocarcinomas (CC) que son tumores derivados del epitelio de los conductos biliares intrahepáticos, extrahepáticos e hiliares, y los tumores de la VB. Los CC y los cánceres de la VB deberían ser considerados entidades independientes dadas sus diferencias relativas a la etiología, epidemiología y biología.

### ➤ Colangiocarcinoma

El término CC hace referencia a los tumores malignos originados del epitelio de los conductos biliares. Dependiendo de su localización anatómica, los CC se dividen en intrahepáticos (5-15%), hiliares o perihiliares (60-70%) y extrahepáticos o distales (25%).<sup>6</sup> Los CCIH se originan en los pequeños conductos biliares (también denominados CC periféricos) o en los grandes conductos intrahepáticos proximales a la bifurcación de los conductos hepáticos derecho e izquierdo, y habitualmente se presentan como masas hepáticas. Los tumores hiliares se originan en la confluencia de los conductos hepáticos derecho e izquierdo, y también son conocidos como tumores de Klatskin. Estos tumores se clasifican de acuerdo con el patrón de afectación de los conductos hepáticos en cuatro grupos (clasificación de Bismuth) (figura 3):

- Tipo I: tumores por debajo de la bifurcación de los conductos hepáticos derecho e izquierdo.
- Tipo II: tumores que afectan a la confluencia de los conductos hepáticos.
- Tipo III: tumores que producen obstrucción del conducto hepático común y de uno de los dos conductos hepáticos, el derecho (IIIA) o el izquierdo (IIIB).
- Tipo IV: tumores multicéntrico, que afectan a la confluencia de los conductos hepáticos o a ambos (derecho e izquierdo).

Los CCEH son aquellos que afectan a la vía biliar distal a la unión de los conductos hepáticos derecho e izquierdo, es decir, al conducto hepático común y al colédoco (que se forma de su unión con el conducto cístico).<sup>7</sup>



**Figura 3.** Clasificación Bismuth

En la mayoría de los casos los CC son esporádicos, sin relación con ninguna causa desencadenante. Sin embargo, se han descrito varios factores asociados con un incremento de su incidencia.<sup>8</sup> En los Estados Unidos y en Europa, los principales factores de riesgo identificados son la colangitis esclerosante primaria y los quistes de colédoco.

- *Colangitis esclerosante primaria.* Se trata de una enfermedad autoinmune en la que se produce una inflamación crónica de la vía biliar, con fibrosis y estenosis de los conductos biliares intra y extrahepáticos.<sup>8</sup> Alrededor de un 30% de los CC son diagnosticados en pacientes con esta enfermedad, y el riesgo absoluto estimado de desarrollar un CC en esta población es del 9% a los 10 años.<sup>9,10</sup> En estos pacientes el tumor aparece en edades más tempranas que en la población general (habitualmente entre los 30-50 años), y su diagnóstico se realiza durante los primeros 2 años de evolución. Varios estudios han sugerido la existencia de una relación entre el desarrollo de un CC en estos pacientes y el consumo de tabaco o alcohol.<sup>10,11</sup>

- *Enfermedad poliquística hepática.* Se han descrito varias enfermedades congénitas de la vía biliar (enfermedad de Caroli, fibrosis hepática congénita, quistes de colédoco) que tienen un riesgo de entre un 10-20% de degeneración tumoral en los pacientes no tratados, con una edad media al diagnóstico de 34 años.<sup>12,13</sup> Aunque en estas enfermedades se desconocen los mecanismos de degeneración tumoral, es probable que la estasis de la bilis junto con el reflujo pancreático den lugar a una inflamación crónica de los conductos biliares afectados.<sup>14</sup>

- *Infección por parásitos.* La infección parasitaria de las vías biliares por *Clonorchis sinensis* y *Opisthorchis viverrini*<sup>15</sup> que afecta a 17 millones de personas en todo el



mundo, especialmente en China y en el sudeste asiático, está asociada con el desarrollo de neoplasias de los conductos biliares intrahepáticos. La incidencia de CC en estos países de 87/10.000 habitantes es la más alta a nivel mundial. La vía de contagio es la ingesta de pescados poco cocinados, quedando los parásitos adultos acantonados en la vía biliar y produciendo un estado de inflamación crónica que favorece la aparición del CC.

- *Colelitiasis y hepatolitiasis*. En la colelitiasis se produce una descamación del epitelio biliar, induciendo inflamación crónica con desarrollo de hiperplasia adenomatosa y fibrosis periductal, promoviendo eventualmente la transformación maligna del epitelio biliar.<sup>17</sup> En Taiwán, entre un 50% y un 70% de los pacientes intervenidos por CC presentan hepatolitiasis.<sup>18</sup>

- *Infecciones virales*. Varios estudios han sugerido un incremento del riesgo de CC en pacientes con cirrosis hepática por virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B o con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.<sup>19</sup>

- *Exposición a tóxicos*. Se han descrito carcinógenos que favorecen el desarrollo de CC, tales como el disolvente orgánico 1,2-dicloropropano (1,2-DCP),<sup>20</sup> habiendo menos evidencia respecto a otras sustancias ambientales como radionúclidos naturales, radón, nitrosaminas, dioxina, asbestos o tabaco.

- *Síndrome de Lynch y papilomatosis biliar*. Estas dos enfermedades hereditarias se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar un CC. La papilomatosis biliar se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos adenomatosos en el interior de los conductos biliares. Debe considerarse una enfermedad premaligna, dada la alta tasa de degeneración neoplásica (hasta un 83% en algunos estudios).<sup>21</sup>

- *Enfermedad crónica hepática*. La cirrosis hepática de cualquier etiología se ha asociado con un incremento notable del riesgo de desarrollar un CC (de hasta 10 veces más en algunos estudios).<sup>22</sup>

### ➤ **Carcinoma de la vesícula biliar (VB)**

El tumor de la VB es la neoplasia más frecuente de las vías biliares y la quinta neoplasia más común del tubo digestivo después del estómago, colon, recto y esófago.

Se han descrito distintos factores etiológicos de los tumores de la VB, tales como:

- *Colelitiasis*. La colelitiasis es una de las causas principales de los tumores de la VB, estando presente en un 70-90% de los pacientes con cáncer de VB.<sup>23</sup> Sin embargo, la incidencia de cáncer en los pacientes con colelitiasis es baja, del 0,3% al 5%. Se ha descrito un aumento del riesgo en relación con el tamaño de los cálculos (el riesgo es 10 veces superior con cálculos mayores de 3 cm) y a la duración de la colelitiasis (principalmente en pacientes con litiasis de más de 40 años de evolución). La denominada “vesícula en porcelana” caracterizada por la calcificación intramural de la pared vesicular, es una manifestación infrecuente de la colecistitis crónica. Se asocia con colelitiasis en más del 95% de los casos, y, por lo tanto, con un incremento del riesgo de cáncer de VB, con una incidencia en las diferentes series entre el 12,5% y el 60%.<sup>23</sup>

- *Infecciones crónicas*. En lugares endémicos, alrededor de un 14% de los pacientes con infección aguda por *Salmonella typhi* se convierten en portadores crónicos de la infección, especialmente aquellos con colelitiasis, siendo un cofactor potencial para la colangiocarcinogénesis. Varios estudios han establecido una relación entre la infección crónica y un incremento del riesgo de cáncer.<sup>24</sup> También se ha establecido una relación entre el cáncer de VB y la colonización del epitelio biliar por *Helicobacter bilis*.<sup>25</sup>

- *Quistes biliares*. Los quistes de la vía biliar son dilataciones de los conductos biliares, y pueden ser únicos o múltiples, congénitos o adquiridos. Aproximadamente un 70% de los pacientes con quistes biliares presentan diversas alteraciones estructurales, las cuales se han asociado con un aumento de la incidencia de VB.<sup>26,27</sup>

- *Fármacos y exposición a tóxicos*. Se ha sugerido una implicación de ciertos fármacos en el proceso de carcinogénesis biliar, como la metildopa, la isoniazida, los anticonceptivos orales, exposiciones prolongadas en trabajadores de las industrias del aceite, papel, zapatos, fibras de acetato de celulosa y textil, y en los mineros expuestos a radón. En 1976, se describió el papel carcinogénico de las aflatoxinas, y su papel en la carcinogénesis de la VB ha sido evaluado recientemente.<sup>28</sup>

- *Diabetes*. Se ha sugerido una asociación entre la diabetes y el cáncer de la VB.<sup>29</sup>

## 1.2 Presentación clínica y diagnóstico

El síntoma más frecuente de los CVB es la ictericia obstructiva (70-90% de los casos), que puede ir precedida de prurito hasta en un 66% de los pacientes, asociándose asimismo con coluria y acolia. Otros síntomas frecuentes son la pérdida de peso (hasta en un 50% de los casos) y el dolor abdominal (30-50% de los casos).<sup>7</sup> Los pacientes con colangitis esclerosante primaria y CC suelen experimentar un deterioro clínico importante y una elevación de las enzimas de colestasis.

La tríada colestasis, dolor abdominal y pérdida de peso es sugestiva de proceso neoplásico, tanto a nivel hepatobiliar como pancreático. Frente a esta sospecha clínica hay que realizar las siguientes exploraciones:

- Exploración física. Generalmente suele ser inespecífica. No obstante, en casos de enfermedad avanzada se observa un síndrome tóxico, ictericia, y hepatomegalia en un 40% de los casos.
- Análisis de sangre. Los resultados de los análisis generales son irrelevantes, aunque puede destacar un patrón de colestasis. Inicialmente, los valores de transaminasas pueden ser normales.
- Marcadores tumorales. El CA 19.9 es el marcador más útil en el diagnóstico del CVB, con una sensibilidad del 67-79% y una especificidad del 98-99%. El CEA también puede ser de ayuda, con una sensibilidad del 68% y una especificidad del 82%.<sup>30,31</sup> En pacientes con colestasis y colangitis, los valores de CA 19.9 pueden estar aumentados, dando falsos positivos para el diagnóstico de CVB. En la colangitis esclerosante primaria, la sensibilidad y especificidad del CA 19.9 (concentración sérica > 120 U/mL) es del 79% y 98%, respectivamente.<sup>32,33</sup> La determinación conjunta de CEA y CA 19.9 (cifras de CEA > 5,2 ng/dL y de CA 19.9 > 189 U/mL) alcanza una sensibilidad diagnóstica del 100% con una especificidad del 78%.<sup>34</sup> Los valores de CA 19.9 pueden ser útiles en el seguimiento de los pacientes con elevaciones iniciales de este marcador (un descenso del 25-30% es indicativo de respuesta al tratamiento de quimioterapia), y su elevación también puede ser útil como marcador precoz de recidiva de la enfermedad tras una cirugía radical.<sup>35</sup>

- Ecografía abdominal. Debe ser la primera técnica diagnóstica utilizada para confirmar la dilatación de la vía biliar, localizar el punto de la obstrucción y excluir la presencia de cálculos vesiculares. Tiene una sensibilidad para el diagnóstico de obstrucción de la vía biliar y para su localización del 89 y 94% respectivamente.<sup>36</sup>
  
- Tomografía computarizada (TC) abdominal. Es una prueba de obligada realización ante la sospecha de un CVB. Es más sensible en el diagnóstico de CCIH, ya que se observan lesiones hipodensas en la fase venosa portal, e hiperatenuadas en fases tardías. Presenta ciertas limitaciones a la hora de establecer la extensión local del tumor y su resecabilidad.<sup>37</sup> Sin embargo, los avances técnicos, como la tecnología multifásica, mejoran sustancialmente la precisión de la TC para detectar la afectación de afectación arterial y de la vena porta.<sup>38,39</sup>
  
- Colangiorresonancia magnética. Se trata de una técnica no invasiva, útil en la evaluación de la vía biliar intra y extrahepática, así como del conducto pancreático. Es la técnica de elección para el CC perihiliar. Su precisión en la evaluación de la extensión local y la resecabilidad es de hasta 95%, y es comparable a la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica.<sup>40-42</sup> Sin embargo, su precisión en la evaluación de la afectación vascular y la invasión del parénquima hepático es de solo del 67-73% y del 75-80%, respectivamente.<sup>43</sup>
  
- Colangiopancreatografía retrógrada endoscópica. Esta técnica consiste en la inyección de un contraste radiológico en el interior de los conductos biliares, bien por vía endoscópica o mediante un abordaje percutáneo (colangiografía transhepática percutánea), ofreciendo posibilidades tanto diagnósticas como terapéuticas. En relación con su utilidad en el diagnóstico histológico, permite obtener muestras de líquido biliar o mediante cepillado del árbol biliar para estudio citológico. La citología del líquido biliar sólo es positiva para malignidad en el 30% de todos los CC. El estudio de marcadores tumorales (CA 19.9) junto con el cepillado biliar aumenta de manera importante la precisión

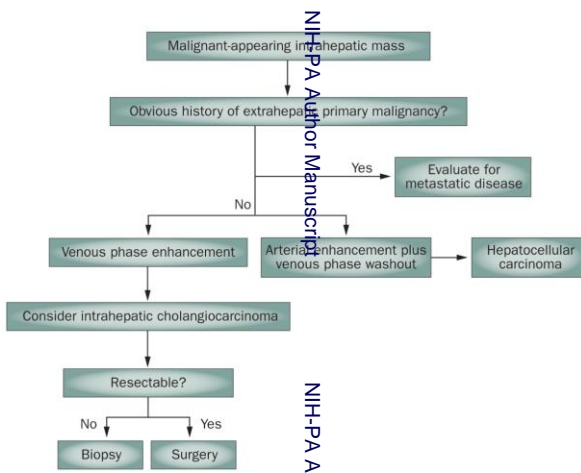
diagnóstica, alcanzando una sensibilidad y especificidad del 88% y 97%, respectivamente. Respecto a su utilidad terapéutica, permite la colocación de endoprótesis para el drenaje de la vía biliar, reduciendo el riesgo de infección y colangitis, y permitiendo la normalización de la función hepática.<sup>45</sup>

- Ecografía endoscópica. Tiene su indicación fundamental en el estudio diagnóstico de los tumores distales de la vía biliar, permitiendo definir la extensión local y la afectación ganglionar, así como la toma de biopsias con aguja fina del tumor y de los ganglios linfáticos sospechosos, aportando mayor sensibilidad y con menor contaminación de la vía biliar que la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica. Por otra parte, la ecografía endoscópica es más sensible y precisa que la ecografía abdominal, la TC y la arteriografía para el diagnóstico del tumor y de la afectación vascular portal.
- Biopsia. La necesidad de obtener un diagnóstico anatomopatológico previo a la cirugía depende de la situación clínica del paciente con sospecha de CVB. La confirmación histológica es necesaria en pacientes con estenosis no filiada de la vía biliar (p. ej. en caso de antecedentes de cirugía de la vía biliar, cálculos biliares o colangitis esclerosante primaria) y en sujetos que no son candidatos a resección quirúrgica y deban ser tratados con un tratamiento oncológico activo.
- Tomografía por emisión de positrones (PET). Esta exploración no se realiza de rutina en el estudio de extensión del CVB, reservándose para los casos en que existen dudas de posibles lesiones metastásicas en pacientes con un resecables. La sensibilidad y especificidad del PET para el CC perihiliar es solo del 69% y del 67% respectivamente, y para la detección de metástasis en los ganglios linfáticos regionales su sensibilidad es del 13-38%. El papel del PET es aún más limitado debido a los resultados falsos positivos en el contexto de la inflamación y los resultados falsos negativos debido a la alta reacción desmoplásica que presentan estos tumores.<sup>46,47</sup>

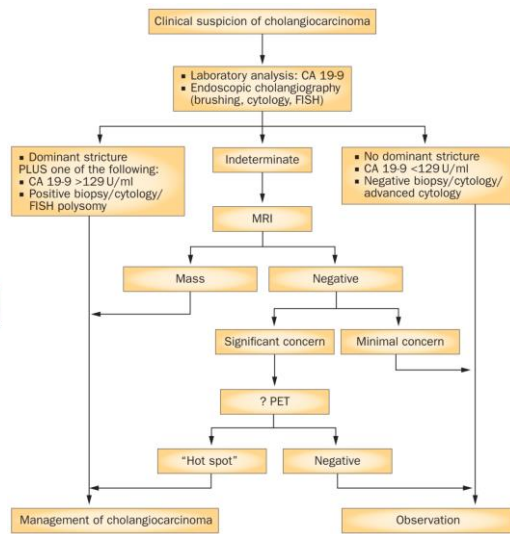
A pesar del alto rendimiento diagnóstico con las nuevas técnicas de imagen, en muchos casos la resecabilidad tumoral únicamente se puede determinar mediante un abordaje quirúrgico. En estos casos, la laparoscopia es útil para identificar la mayoría de

los CC hiliares y distales irresecables, reduciendo el número de laparotomías innecesarias. Sin embargo, en algunos casos es preciso efectuar una laparotomía para evaluar la posibilidad de resección tumoral.

En las figuras 4 y 5 se detalle el algoritmo diagnóstico del CCIH, CCH y CCEH, en función del síntoma o lesión sospechosa identificada en las diferentes exploraciones. En el caso del CCIH, lo más habitual es una masa intrahepática y en el CCH o CCEH el síntoma más frecuente es una obstrucción maligna de la vía biliar distal.<sup>48</sup>



**Figure 4.** Algorithm for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma.  
**Figura 4.** Algoritmo diagnóstico de CCIH<sup>48</sup>



**Figure 5.** Diagnostic criteria for perihilar and distal extrahepatic cholangiocarcinoma.  
**Figura 5.** Algoritmo diagnóstico de CCH y CCEH<sup>48</sup>

### 1.3 Estadificación

Para la estadificación de los CC se utiliza el sistema de clasificación TNM, que es discretamente diferente para los CCIH (similar al de hepatocarcinoma) (tabla 1), perihiliares o distales (tabla 2).

La estadificación del carcinoma de VB según clasificación TNM se muestra en la tabla 3.<sup>49</sup>

**Tabla 1.** Clasificación TNM de los CCIH<sup>49</sup>

<b>Tumor primario (T)</b>	
Tx: No puede evaluarse el tumor primario	
T0: No evidencia de tumor primario	
Tis Carcinoma <i>in situ</i> (tumor intraductal)	
T1a: Tumor solitario <5cm sin invasión vascular	
T1b: Tumor solitario >5cm sin invasión vascular	
T2: Tumor solitario con invasión vascular o múltiples tumores con o sin invasión vascular	
T3: Tumor que perfora peritoneo visceral o con invasión de una rama principal de la vena porta o de las venas hepáticas	
T4: El tumor invade órganos adyacentes distintos de la vesícula biliar o perfora el peritoneo visceral	
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
Nx: No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales	
N0: No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales	
N1: Metástasis en los ganglios linfáticos regionales	
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
M0: No hay metástasis a distancia	
M1: Metástasis a distancia	

Estadio	0	Tis	N0	M0
Estadio	Ia	T1a	N0	M0
Estadio	Ib	T1b	N0	M0
Estadio	II	T2	N0	M0
Estadio	IIIA	T3	N0	M0
Estadio	IIIB	T1-3	N1	M0
Estadio	IVA	T4	N0-N1	M0
Estadio	IVB	Cualquiera T	N2	M0
		Cualquiera T	Cualquier N	M1

**Tabla 2.** Clasificación TNM de los CCEH<sup>49</sup>

<b>Tumor primario (T)</b>	
Tx: No puede evaluarse el tumor primario	
T0: No evidencia de tumor primario	
T1: Tumor limitado al conducto biliar con profundidad <5mm.	
T2: El tumor invade más allá de la pared del conducto biliar, circundante al tejido adiposo entre 5-12mm.	
T3: El tumor invadela pared del conducto >12mm.	
T4: El tumor invade cualquiera de las siguientes estructuras: arteria hepática común, tronco celiaco, arteria mesentérica superior u otras estructuras adyacentes, como el colon, estómago, duodeno, pared abdominal	
<b>Ganglios regionales (N)</b>	
Nx: No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales	
N0: No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales	
N1: Metástasis en 1- 3 ganglios linfáticos	
N2: Metástasis en >4 ganglios linfáticos.	
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
M0: No hay metástasis a distancia	
M1: Metástasis a distancia	

Estadio	0	Tis	N0	M0
Estadio	I	T1	N0	M0
Estadio	IIA	T1/2	N1-No	M0
Estadio	IIB	T2/3	N1	M0
Estadio	IIIA	T1-3	N2	M0
Estadio	IIIB	T4	N0-2	M0
Estadio	IVB	Cualquiera T	Cualquier N	M1

**Tabla 3.** Clasificación TNM del cáncer de VB<sup>49</sup>

<b>Tumor primario (T)</b>	
Tx: No puede evaluarse el tumor primario	
T0: No evidencia de tumor primario	
Tis: Carcinoma <i>in situ</i>	
T1: El tumor invade la lámina propia o capa muscular	
T1a: El tumor invade la lámina propia	
T1b: El tumor invade la capa muscular	
T2a: El tumor invade el tejido conectivo perimuscular, localizado peritoneo.	
T2b: El tumor localizado en área hepática.	
T3: El tumor perfora la serosa (peritoneo visceral) o invade directamente el hígado u otras estructuras adyacentes: estómago, duodeno, colon o páncreas, omento o conductos biliares extrahepáticos	
T4: El tumor invade el sistema venoso portal principal o la arteria hepática, o invade múltiples órganos o estructuras extrahepáticos	
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
Nx: No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales	
N0: No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales	
N1: Metástasis en los ganglios linfáticos regionales, conducto cístico, arteria hepática y vena porta	
N2: Metástasis en los ganglios linfáticos (periaorticos, pericava, arteria mesentérica superior y celíacos)	
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
M0: No hay metástasis a distancia	
M1: Metástasis a distancia	

<b>Estadio</b>	<b>0</b>	<b>Tis</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio</b>	<b>I</b>	<b>T1</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio</b>	<b>IIA</b>	<b>T2a</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio</b>	<b>IIB</b>	<b>T2b</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio</b>	<b>IIIA</b>	<b>T3</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio</b>	<b>IIIB</b>	<b>T1-3</b>	<b>N1</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio</b>	<b>IVA</b>	<b>T4</b>	<b>N0-1</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio</b>	<b>IVB</b>	<b>Cualquiera T</b>	<b>N2</b>	<b>M0</b>
		<b>Cualquiera T</b>	<b>N0-2</b>	<b>M1</b>

## 1.4 Anatomía patológica

En más de un 90% de los casos, los CC son adenocarcinomas, correspondiendo el resto a carcinomas escamosos, sarcomas, tumores de células pequeñas y linfomas. Los adenocarcinomas se pueden dividir en tumores bien diferenciados, moderadamente diferenciados o pobremente diferenciados.

Se distinguen tres tipos histológicos: esclerosante, anular y papilar. Los tumores esclerosantes se caracterizan por la presencia de una intensa reacción desmoplásica, con extensas áreas de fibrosis que dan lugar a un engrosamiento difuso de los conductos biliares, lo que dificulta el diagnóstico histológico preoperatorio. Estos tumores muestran gran tendencia a la invasión precoz de la pared de los conductos biliares, lo que implica bajas tasas de resecabilidad y curación. Es el tipo más frecuente de CC.<sup>50</sup>

Los adenocarcinomas nodulares se presentan como lesiones anulares constrictivas de la vía biliar, habitualmente de localización intrahepática, altamente invasivos y se suelen



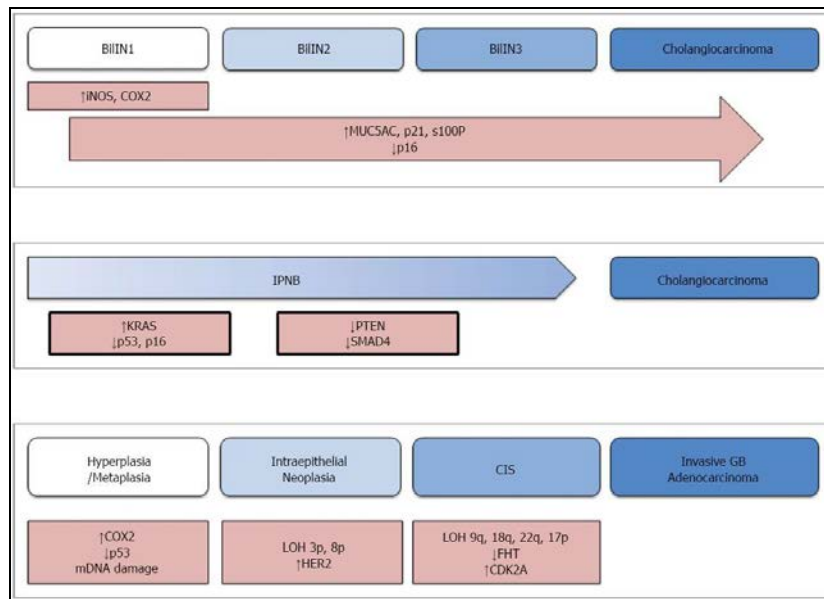
diagnosticar en estadios avanzados de la enfermedad. Por último, los tumores papilares son los menos frecuentes. Habitualmente se presentan como masas polipoides en el interior de los conductos, afectando con frecuencia al conducto hepático común, causando obstrucción al flujo biliar en fases iniciales de la enfermedad, por lo que son los que presentan las tasas de resecabilidad y de curación más elevadas.

Respecto la anatomía patológica de los tumores de la VB, el tipo histológico más frecuente es el adenocarcinoma, aunque también se han descrito tumores de células pequeñas, carcinomas escamosos, adenoescamosos, linfomas y sarcomas. Morfológicamente los tumores pueden ser infiltrantes, nodulares, papilares o una combinación de los tres tipos, siendo los papilares los que tienen un mejor pronóstico.<sup>51,52</sup>

#### **1.4.1 Biología tumoral y lesiones premalignas**

Para determinar las alteraciones moleculares de los tumores de las vías biliares es necesario conocer el mecanismo patogénico del desarrollo del CVB. Los CC y los tumores de la VB son el resultado de la transformación maligna del epitelio biliar, que se produce típicamente en el contexto de una inflamación crónica, aunque su desarrollo es diferente.

Se han descrito una serie de alteraciones moleculares que afectan tanto a oncogenes (*KRAS*, *C-MYC*, *c-NEU*, *C-ERBB2* y *C-MET*) como a genes supresores de tumores (sobreexpresión de *p53*), la presencia de las cuales se ha asociado a un fenotipo tumoral más agresivo.<sup>53</sup> Además, se han descrito mutaciones puntuales en algunos genes promotores (como el *p16INK4a*) que contribuyen al inicio y desarrollo tumoral en pacientes con colangitis esclerosante primaria.<sup>53</sup> Por otra parte, se han observado algunas alteraciones cromosómicas en los CCIH que son comunes con el hepatocarcinoma (figura 6).<sup>54</sup>



**Figura 6.** Cambios moleculares y genéticos que ocurren durante la patogénesis de CVB. BilN: biliary intraepithelial neoplasm; CIS: carcinoma *in situ*; COX2: ciclooxigenasas 2; FHT: fragile histidine triad; iNOS: inducible nitric oxide synthase; IPNB: intraepithelial papillary neoplasm of the bile duct.<sup>53</sup>

### ➤ Lesiones premalignas

El CC generalmente se desarrolla a partir de dos tipos distintos de lesiones precursoras, neoplasia intraepitelial biliar (BilIN) y neoplasia papilar intraductal de la vía biliar (NPIVB).<sup>54</sup> Desde una perspectiva molecular e histológica, estas lesiones son muy similares a la neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) y la neoplasia mucinosa papilar intraductal (NmPI), dos precursores del adenocarcinoma pancreático.<sup>55,56</sup> Dado que el CC rara vez se detecta en el desarrollo inicial, la evidencia sobre los mecanismos patogénicos es limitada. Por ello, los datos obtenidos de estudios de adenocarcinoma pancreático han sido utilizados para generar modelos de trabajo de CVB.<sup>57</sup>

La lesión precursora más frecuente, BilIN, es una proliferación papilar microscópica de epitelios biliares atípicos que afecta exclusivamente a los conductos biliares grandes, generalmente originando un CCEH.<sup>58</sup> Histológicamente, la BilIN se clasifica de I a III en base a la atipia celular y la pérdida de polaridad, al igual que las lesiones de PanIN.<sup>59</sup> Las etapas iniciales del desarrollo de BilIN a menudo ocurren en el contexto de un estado de inflamación crónica, en el cual las citoquinas inflamatorias estimulan la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) y la ciclooxigenasa-2 (COX2)<sup>60,61</sup>, estimulando el crecimiento celular al sintetizar prostaglandina E2.<sup>62</sup> A medida que la lesión progresa de BilIN1 a BilIN3, se presentan anomalías genéticas y moleculares adicionales. En general, se observa una mayor expresión de la proteína

del núcleo de mucina 5AC (MUC5AC), p21CDKN2A y S100p durante esta progresión.<sup>63</sup> Asimismo, el supresor tumoral p16INK4A está marcadamente disminuido en casos de BilIN avanzado y de CC.<sup>63,64,65</sup> La otra clase de precursor del CC es la NPID. Se origina preferentemente en los conductos biliares intrahepáticos, caracterizándose por un crecimiento papilar macroscópico de epitelios biliares que es compatible con núcleos de tejido fibrovascular.<sup>66,67</sup>

En el proceso de carcinogénesis de la neoplasia de la VB<sup>68</sup>, el epitelio normal se transforma secuencialmente en epitelio metaplásico o menos frecuentemente en epitelio hiperplásico, seguido de neoplasia displásica/intraepitelial y carcinoma *in situ*, previsa a la eventual aparición de una neoplasia maligna invasiva. Al igual que el CC, el desarrollo de tumores de la VB generalmente está precedido por inflamación crónica.<sup>69</sup> Las citoquinas inflamatorias son las causantes de la sobreexpresión de COX2 y de la inhibición epigenética de los genes supresores de tumores. Las mutaciones de *TP53* y el ADN mitocondrial también se observan comúnmente en esta etapa temprana.<sup>70,71</sup> Estos cambios moleculares impulsan la transformación del epitelio inicialmente normal en células metaplásicas. El siguiente paso de la transformación maligna se define desde el punto de vista histológico por la aparición de una neoplasia intraepitelial. En este punto se produce una pérdida de heterocigosidad en loci 3p y 8p<sup>71</sup>, así como sobreexpresión del receptor de superficie celular HER2.<sup>72</sup> Seguidamente, la lesión luego se transforma en carcinoma *in situ*, en cuyo punto surgen mutaciones de la tríada de histidina frágil (FHT) y del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A). En esta fase también se puede observar una pérdida de heterocigosidad en 9q, 18q, 22q, 5q y 17p.<sup>67</sup> Posteriormente, la lesión acumula mutaciones de *KRAS* y pérdida de heterocigosidad en 9p, 13q y 18q.<sup>67</sup> Se postula que estas últimas aberraciones genéticas sean determinantes para la consersión en un carcinoma invasivo.<sup>71</sup>

## **1.5 Tratamiento sistémico de la enfermedad metastásica**

La quimioterapia continúa siendo el tratamiento principal del CVB metastásico, asociándose con un aumento significativo de la supervivencia. No obstante, la supervivencia suele limitarse a un año en el mejor de los esquemas de tratamiento quimioterápico. La mayoría de los ensayos se han realizado con combinaciones basadas en fluoropirimidinas o gemcitabina.

El 5-fluorouracilo (5-FU) se ha evaluado en ensayos limitados, en monoterapia y en combinación.<sup>73-76</sup> Las tasas de respuestas (TR) en estos estudios oscilaban del 10%

al 40%; la mediana de supervivencia global (SG) también varió notablemente, de 5 a 16 meses. La gemcitabina en monoterapia mostró una eficacia moderada, con TR que oscilaban entre 0% y 30% con esquemas de dosis diferentes (tabla 4).<sup>77-80</sup> En combinación con otros múltiples agentes citotóxicos, como 5-FU, capecitabina, cisplatino, oxaliplatino e irinotecán, los datos de respuesta fueron modestos (tablas 5 y 6).<sup>81-89</sup>

El avance terapéutico más notable registrado en los últimos años fue la publicación de Valle et al.<sup>90</sup> del ensayo clínico fase III en el que se aleatorizaron pacientes con CVB a recibir tratamiento de quimioterapia con cisplatino y gemcitabina o gemcitabina en monoterapia. En dicho estudio se demostró una mejoría de la SG en la rama de la combinación, con una SG de 11,7 meses *versus* 8,1 meses en la rama de monoterapia, con un cociente de riesgos instantáneos (*hazard ratio*, HR) de 0,64 (intervalo de confianza [IC] del 95%, 0,52-0,80;  $P < 0,001$ ).

A continuación, se resumen los datos más obtenidos hasta la fecha con los diferentes esquemas de quimioterapia.

5-FU combinado con platinos. El 5-FU ha demostrado una eficacia limitada, aunque su eficacia es superior al mejor tratamiento de soporte. Un metaanálisis sugiere que los platinos aumentan la eficacia de las fluoropirimidinas en monoterapia.<sup>75</sup> Existen alrededor de seis estudios de fase II que han evaluado la combinación de 5-FU con platinos, cuatro de los cuales analizaron la eficacia de 5-FU en combinación con cisplatino<sup>73</sup> y dos, combinando 5-FU con oxaliplatino.<sup>74,75</sup> La TR obtenida mediante el uso 5-FU con platinos es del 21,4%, con una mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) y SG de 3,7 y 9,5 meses, respectivamente.<sup>73-75</sup> En el único estudio de fase III disponible,<sup>76</sup> 54 pacientes con CVB se asignaron al azar a un esquema de tratamiento con FEC (epirubicina, cisplatino, 5-FU) o FELV (5-FU, leucovorina, etopósido). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana de SG (9,02 meses en FEC *versus* 12,03 meses en FELV,  $P = 0,205$ ) ni en la TR (19,2% en FEC *versus* 15% en FELV,  $P = 0,72$ ) entre ambos grupos de tratamiento.<sup>76</sup>

#### Gemcitabina en monoterapia y en combinación con otros fármacos citostáticos.

La gemcitabina ha sido considerada en los últimos años como el principal citostático en el tratamiento de las neoplasias pancreatobiliares. Las TR con gemcitabina en monoterapia oscilan del 13% al 60%, con una mediana de SG alrededor de 8 meses. La adición de 5-FU no aumenta la actividad de la gemcitabina en monoterapia (tabla 5) y la

asociación con irinotecán tiene menor actividad. Las combinaciones que han mostrado mayor eficacia son aquellas que incluyen cisplatino (tabla 6) y capecitabina.<sup>77</sup>

**Tabla 4.** Estudios de fase II que han evaluado la actividad de gemcitabina en monoterapia.

Tratamiento	Número pacientes	TR (%)	SG (meses)
Gemcitabina 2.200 mg/m <sup>2</sup> <sup>78</sup>	32	22	11,5
Gemcitabina 1.200 mg/m <sup>2</sup> tres semanas consecutivas cada 4 semanas <sup>79</sup>	24	4	6,8
Gemcitabina 1.000 mg/m <sup>2</sup> tres semanas consecutivas cada 4 semanas <sup>80</sup>	23	30	No alcanzada
Gemcitabina 1.000 mg/m <sup>2</sup> tres semanas consecutivas cada 4 semanas <sup>81</sup>	39	36	6,5

**Tabla 5.** Estudios de fase II que han evaluado la actividad de gemcitabina en combinación con 5-FU

Tratamiento	Número pacientes	TR (%)	SG (meses)
Gemcitabina + bolus 5-FU <sup>82</sup>	9	33	9
Gemcitabina + bolus 5-FU <sup>83</sup>	42	10	9,7
Gemcitabina + bolus 5-FU <sup>84</sup>	26	30	7,3
Capecitabina <sup>85</sup>	35	36	10,3

**Tabla 6.** Estudios fase II que han testado la actividad de gemcitabina en combinación con platinos

Tratamiento (referencia)	Número pacientes	TR (%)	SG (meses)
Gemcitabina + cisplatino <sup>86</sup>	40	28	8,4
Gemcitabina + cisplatino <sup>87</sup>	42	48	7
Gemcitabina + carboplatino <sup>87</sup>	13	30	No alcanzada
Gemcitabina + oxaliplatino <sup>88</sup>	53	19	8,3

En un metaanálisis que incluyó 104 ensayos publicados entre 1985 y 2006,<sup>89</sup> la TR global fue del 22,6% y la tasa de control de la enfermedad del 57,3%. El análisis de subgrupos mostró TR superiores para los pacientes con tumores de la VB en comparación con los pacientes con CC (TR 35,5% *versus* 17,7%,  $P = 0,008$ ), pero con

SG inferior (mediana 9,3 meses en CC *versus* 7,2 meses en VB,  $P = 0,048$ ). El análisis por subgrupos en relación con el tipo de tratamiento mostró que los tratamientos que contenían gemcitabina y un platino tuvieron una tasa de control de la enfermedad significativamente mayor en comparación con 5-FU o gemcitabina en monoterapia o regímenes de 5-FU con platinos.

En base a los resultados previos, se realizó en Reino Unido el ensayo fase III Advanced Biliary Care (ABC)-02.<sup>90</sup> Se incluyeron 410 pacientes con CVB no resecable, recidivante o metastásico, siendo aleatorizados a recibir gemcitabina monoterapia o gemcitabina en combinación con cisplatino. El ensayo incluyó pacientes con CC, tumores de la VB y ampulomas. Los pacientes fueron randomizados a recibir cisplatino 25 mg/m<sup>2</sup> y gemcitabina 1.000 mg/m<sup>2</sup> los días 1 y 8 de un ciclo de 3 semanas ( $n = 204$ ) durante ocho ciclos o bien gemcitabina en monoterapia 1.000 mg/m<sup>2</sup> los días 1, 8 y 15 cada 28 días ( $n = 206$ ) durante seis ciclos. Después de una mediana de seguimiento de 8,2 meses, la mediana de SG fue de 11,7 meses en el grupo de combinación de gemcitabina con cisplatino, en comparación con 8,1 meses en el grupo de gemcitabina (HR = 0,64,  $P < 0,001$ ). La mediana de SLP fue superior en el grupo tratado en el brazo de la combinación (8,0 meses *versus* 5,0 meses, HR = 0,64,  $P < 0,001$ ) (figura 7). Se observaron toxicidades hematológicas graves con mayor frecuencia en el brazo de la combinación. Sin embargo, las toxicidades hepáticas fueron más graves en el brazo de la gemcitabina (tabla 7).

Tras la publicación de este estudio, el tratamiento con cisplatino en combinación con gemcitabina es el régimen estándar de primera línea para los pacientes con CVB avanzado.

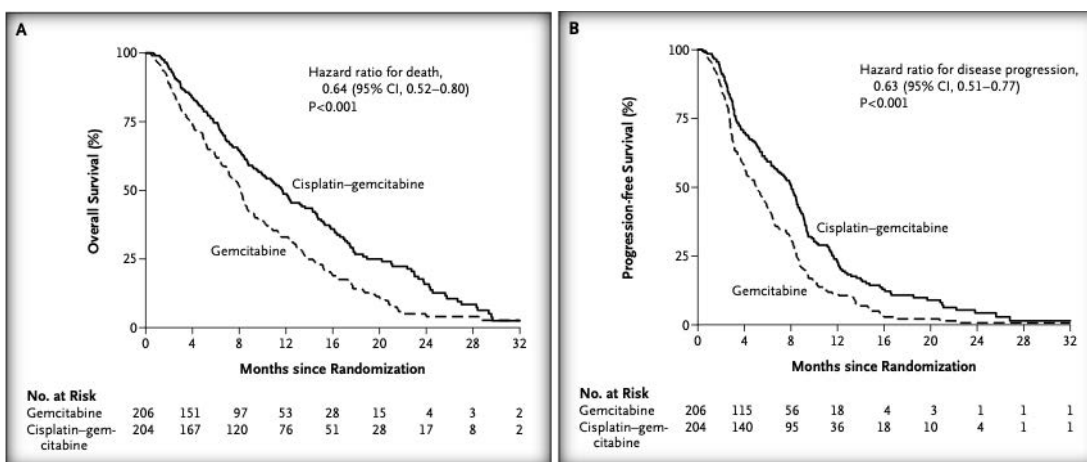


Figura 7. Resultados de las curvas de SG (A) y resultados de las curvas de SLP (B) del estudio ABC-02<sup>90</sup>

<b>Tabla 7.</b> Efectos adversos grado 3 o superiores publicados en el estudio ABC-02.90			
Eventos	Gemcitabina (n = 199)	Cisplatino + gemcitabina (n = 198)	Valor de <i>P</i>
Hematológicos			
Neutropenia	33/199 (38)	50/198 (25,3)	0,03
Leucopenia	19/199 (9,5)	31/198 (15,7)	0,07
Trombocitopenia	13/199 (6,5)	17/198 (8,6)	0,44
Anemia	6/199 (3)	15/198 (7,6)	0,04
No hematológicos			
Disfunción hepática	54/199 (27,1)	33/198 (16,7)	0,01
Fatiga	33/199 (16,6)	37/198 (18,7)	0,58
Alopecia	0/199	2/198 (1,0)	0,16
Vómitos	11/199 (5,5)	10/198 (5,1)	0,65

El mismo año 2010 se publicó el resultado de un estudio que evaluaba la combinación de cisplatino y gemcitabina en población asiática con CVB.<sup>91</sup> Un metaanálisis de ambos estudios<sup>92</sup> ha demostrado que los pacientes se benefician de la combinación independiente de la edad (< 65 *versus* ≥ 65 años), sexo, localización del tumor primario (CCIH, CCEH, y VB), estadio de la enfermedad (localmente avanzado versus metastásico) y del tratamiento previo (cirugía o colocación de stent). El único grupo que no se beneficiaban de la combinación eran los pacientes con estado funcional 2.<sup>92</sup>

En el tratamiento de segunda línea para enfermedad localmente avanzada o metastásica varios agentes citostáticos han mostrado actividad en pequeños estudios prospectivos y retrospectivos, en pacientes seleccionados, sin haberse realizado hoy en día un estudio aleatorizado que demuestre una mejoría de la supervivencia. Por tanto, no se dispone de un tratamiento estándar para estos pacientes.<sup>93</sup>

En la actualidad se ha iniciado el primer estudio de fase III aleatorizado, ABC-06, que compara oxaliplatino y 5-FU (régimen FOLFOX)<sup>94</sup> con tratamiento de soporte versus únicamente tratamiento de soporte tras la progresión a cisplatino/gemcitabina en primera línea (NCT01926236).

Las recomendaciones de la *European Society for Medical Oncology* (ESMO) para el tratamiento del cáncer de vías biliares metastásico<sup>95</sup> son las siguientes:

1. La quimioterapia sistémica es el tratamiento de elección para pacientes con enfermedad localmente avanzada o inoperable; quimioterapia combinada para pacientes con performance estatus 0-1 y monoterapia para pacientes con performance estatus 2.
2. Cisplatino/gemcitabina es el régimen de quimioterapia estándar para pacientes con performance estatus 0-1; cisplatino puede ser substituido por oxaliplatino cuando existe disfunción renal.
3. Gemcitabina en monoterapia se puede considerar para pacientes con performance estatus 2.
4. No existe un régimen establecido de quimioterapia en segunda línea; los pacientes deben ser valorados para participar en ensayos clínicos.



## **Capítulo 2. Biología molecular**

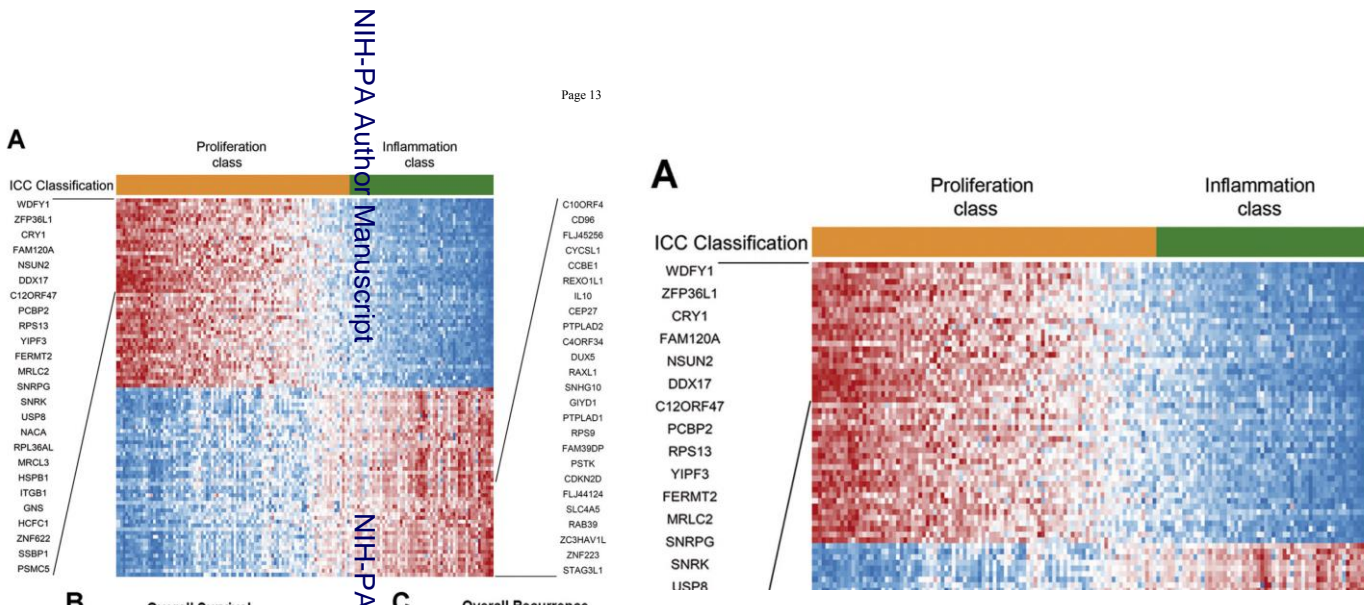
## 2. Biología molecular

Los CVB presentan diferentes perfiles moleculares en función de su localización anatómica.<sup>96</sup> Los tumores de la vía biliar comparten alteraciones genéticas en los genes implicados en la regulación del ciclo celular (*CDKN2B*) y en la remodelación de la cromatina (*ARID1A*).<sup>97</sup> El CCIH de forma característica presenta translocaciones en *FGFR2*<sup>98</sup>, mutaciones en *IDH1/2*<sup>99</sup>, mutaciones en *BRAF*<sup>97</sup> y baja tasa de mutaciones en *KRAS*. Los CCEH se caracterizan por una alta frecuencia de mutación en *KRAS*, mientras que en los tumores de la VB la frecuencia es más baja. Los CCEH y los tumores de la VB comparten amplificaciones en *ERBB2*<sup>100</sup> (VB > CCEH) y alteraciones de la vía fosfoinositida-3-quinasa (*PI3K*)/mamalian target of rapamycin (*mTOR*).<sup>101</sup>

Actualmente, y gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación, se ha podido profundizar en el conocimiento de la biología molecular de estos tumores y de los trastornos genéticos acompañantes que originan la alteración del ciclo celular, aumento de la supervivencia celular, invasión y metástasis.

### 2.1 Clasificación molecular del cáncer de vías biliares

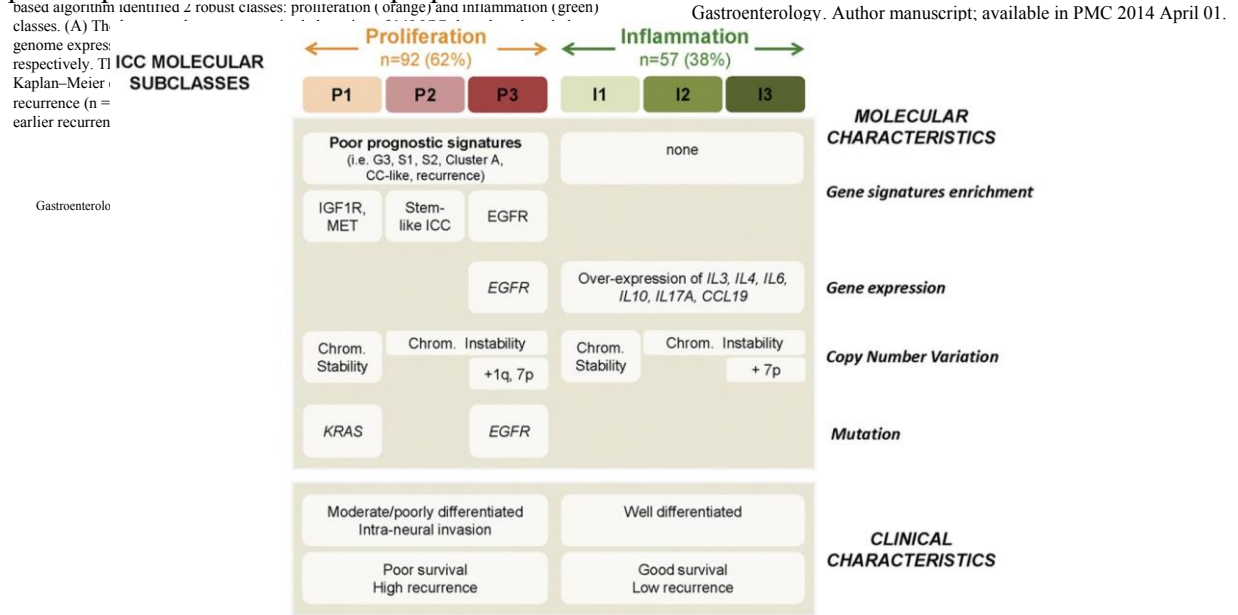
La patogenia molecular de CVB es un proceso complejo que implica múltiples alteraciones genómicas y desregulación de las vías de señalización. En los años 2012 y 2013 aparecen las primeras publicaciones describiendo los transcriptomas completos y los dos subtipos moleculares diferentes de CCIH.<sup>102</sup> El equipo de investigación que describió los subtipos moleculares del CCIH fue el grupo de cáncer de hígado del Hospital Clinic de Barcelona.<sup>103</sup> En este estudio se incluyeron 119 muestras tumorales y se identificaron dos subtipos moleculares; el primero era el subtipo inflamatorio (38% de los CCIH incluidos en el análisis), el cual se caracterizaba por una activación de vías de señalización inflamatorias, con sobreexpresión de citoquinas y activación STAT3. El subtipo inflamatorio se asoció a un mejor pronóstico. Por el contrario, el subtipo proliferativo (62% de los CCIH incluidos en el análisis) se caracterizaba por la activación de vías de señalización oncogénica, incluidas RAS-MAPK-MET, la presencia de mutaciones en *KRAS* y *BRAF*, la activación de HER2 y la amplificación del DNA. Este subtipo se asoció con un peor pronóstico (figura 8).<sup>103</sup>



**Figura 8.** Se han descrito dos subtipos moleculares en el CCIH: subtipo proliferativo (color naranja) y subtipo inflamatorio (color verde). Las estimaciones de supervivencia global analizadas por Kaplan-Meier (n = 119).<sup>103</sup>

En la figura 9 se resumen las diferentes características moleculares y clínicas de cada subtipo de CCIH (proliferación y inflamación). Asimismo, también se observaron

tumores pobremente diferenciados con invasión perineural, más riesgo de recidiva, y peor supervivencia en el subtipo proliferativo.

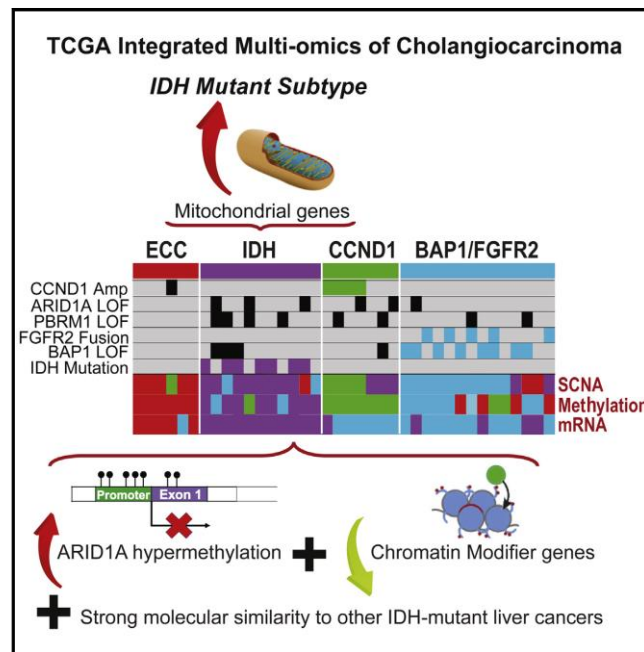


**Figura 9.** Características moleculares y clínicas del subtipo inflamatorio y proliferativo en el CCIH.<sup>103</sup>

Existen similitudes moleculares entre la clase de proliferación de CC y las firmas de hepatocarcinoma (HCC) con un pronóstico precario.<sup>103</sup> Los tumores mixtos de colangiocarcinoma y hepatocarcinoma, un subtipo con predominio de células madre, pone de manifiesto la posibilidad de una posible célula de origen común entre los dos tipos tumorales.<sup>42</sup> Por lo tanto, actualmente se cree que CCIH deriva de células

epiteliales biliares (colangiocitos) del tracto biliar intrahepático, de células progenitoras hepáticas o incluso de hepatocitos maduros.<sup>104</sup>

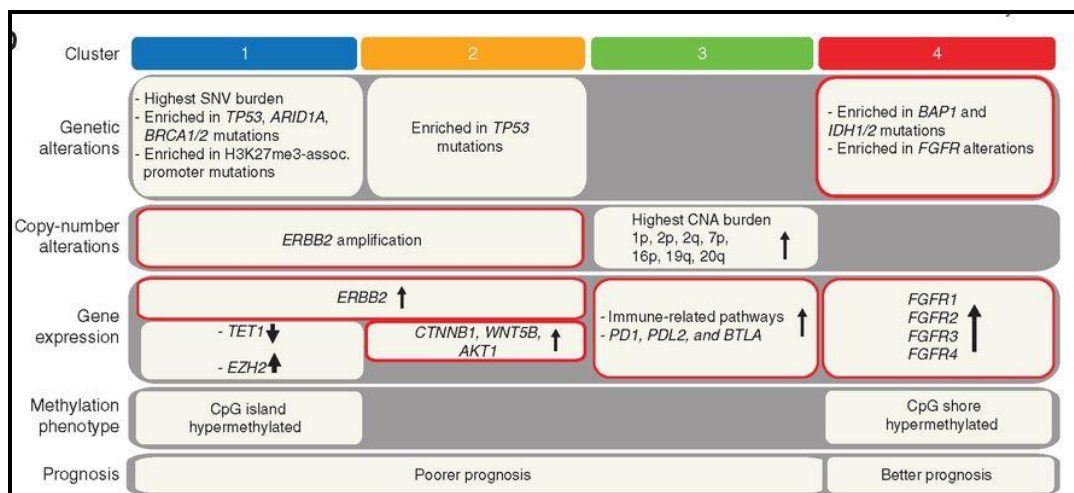
Recientemente se ha publicado el estudio del grupo *Cancer Genome Atlas* (TCGA) en CC, siendo la mayoría de muestras tumorales incluidas CCIH (figura 10). Se analizaron mutaciones somáticas, expresión de ARN, número de copias y metilación del ADN. A partir de dicho análisis se propuso un esquema de clasificación molecular, identificándose un subtipo de colangiocarcinomas con mutación en *IDH* enriquecido con distintas características moleculares, incluida la baja expresión de modificadores de cromatina, expresión elevada de genes mitocondriales, aumento del número de copias de ADN mitocondrial y baja expresión de *ARID1A*.<sup>104</sup>



**Figura 10.** Los CC *IDH* mutados están enriquecidos por una alta expresión de genes mitocondriales y ADN mitocondrial, y una baja expresión de genes modificadores de cromatina.<sup>104</sup>

El CC, presenta una alta incidencia en países donde la infección hepática por parásitos es endémica. El grupo de investigación *Cancer Genome Consortium* presentó los resultados del análisis genómico, epigenómico y transcriptómico de 489 casos de CC procedentes de 10 países. Dicho análisis integrativo definió cuatro clústers de CC y descubrió nuevos genes reguladores (*RASA1*, *STK11*, *MAP2K4*, *SF3B1*) y variantes estructurales (delección *FGFR2* 3'UTR) como un mecanismo de la regulación positiva de *FGFR2*. Los clústers 1/2 relacionados con infección hepática por parásitos, estaban enriquecidos por amplificaciones *HER2* y mutaciones en *TP53*. Los clústers 3/4 que no

estaban relacionados con infección hepática por parásitos mostraron alteraciones en el número de copias, expresión PD-1/PD-L2 y mutaciones epigenéticas (*IDH1/2*, *BAP1*), así como reordenamientos de genes relacionados con *FGFR/PRKA* (figura 11). Los autores concluyen que el CC es un ejemplo de cómo la genética, la epigenética y los carcinógenos ambientales pueden interactuar en diferentes geografías para generar distintos subtipos moleculares de cáncer, lo que ofrece la posibilidad de realizar estrategias terapéuticas diferentes.<sup>105</sup>



**Figura 11.** Representación de alteraciones genéticas, epigenéticas y de expresión génica de los clústeres en el CC.<sup>105</sup>

En el siguiente apartado se describen los diferentes tratamientos que han sido evaluados o que actualmente están siendo evaluados frente a alteraciones moleculares específicas.

## 2.2 Vías de señalización y alteraciones genéticas

El comportamiento maligno del CVB es debido, en gran parte, a la desregulación de las vías de señalización celular que en condiciones normales controlan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular. Las dos vías de señalización intracelular más relevantes en CVB son la vía RAS-RAF-MEK y la vía PI3K-AKT-mTOR.

Respecto a las alteraciones genéticas que ocurren en el CC existen diversos estudios basados en la secuenciación completa del exoma (*whole exome sequencing*, WES).<sup>106-113</sup> En uno de ellos se realizó dicha secuenciación en 8 casos de CC relacionado con la infección por el trematodo parásito *Opisthorchis viverrini*, detectándose mutaciones en *TP53* (44,4%), *KRAS* (16,7%) y *SMAD4* (16,7%). También se han detectado mutaciones en genes supresores de tumores con una frecuencia global

del 15%.<sup>114-116</sup> Otras mutaciones descritas incluyen *CDKN2A/B* (p16) (7%) en CCIH, mutaciones de inactivación en *MLL3* (14,8%), *ROBO2* (9,3%), *RNF43* (9,3%) y *PEG3* (5,6%), así como mutaciones activadoras en *GNAS* (9,3%).<sup>117-118</sup> No obstante, las alteraciones genéticas más relevantes en CVB son *IDH*, *FGFR*, *ARID1*, *BAP1*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, que se describen a continuación.

#### ➤ **Vía RAS-RAF-MEK-MAPK**

Una de las principales vías de señalización en la biología molecular del CC es la vía RAS-RAF-MEK-MAPK.<sup>119</sup> A través de una compleja red de interacciones con las proteínas reguladoras del ciclo celular como p53, p16INK4A, p21CDKN2A, esta vía puede impulsar la progresión a través del ciclo celular. La conexión entre esta vía y la vía de señalización PI3K-AKT también permite a estas células evadirse de la apoptosis, a menudo a través de la señalización de BCL-2. El primer componente de esta vía, *KRAS*, es de particular importancia debido a su capacidad de estimulación cruzada de la vía PI3K-AKT además de propagar una señal por la secuencia RAS-RAF-MEK-MAPK. La proteína quinasa *BRAF* también está mutada en un subgrupo de CVB.<sup>120,121</sup> El tercer elemento de esta ruta es la proteína quinasa-quinasa activada por mitógeno (MEK). Aunque no se ha establecido la frecuencia de la mutación MEK, es probable que sea bastante baja.<sup>122</sup>

#### ➤ **Vía PI3K-AKT-mTOR**

La cascada de señalización PIK3CA-AKT-mTOR está hiperactivada en prácticamente la mitad de los cánceres humanos, incluyendo el CVB.<sup>123</sup> Al igual que la vía RAS-RAF-MEK, esta ruta es estimulada por receptores como EGFR, VEGF, HER2 y factor de crecimiento de hepatocitos (MET).<sup>124-125</sup> Cuando está activa, funciona para proteger las células neoplásicas de la apoptosis mediante la estimulación del BCL-2 y el bloqueo de la actividad de la caspasa-9.<sup>126</sup> Esta vía también impulsa la progresión a través del ciclo celular y facilita la angiogénesis. El primer componente de esta vía es la PI3K, su señal se propaga a través de la actividad de un dominio catalítico de PIK3CA. La activación de mutaciones de esta quinasa en CVB y otras neoplasias se produce típicamente en los exones 9 y 20.<sup>127</sup>

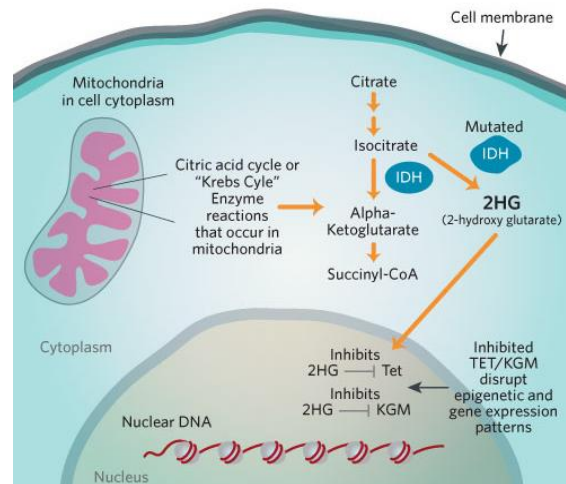
PI3K actúa directamente para estimular AKT y por debajo del cual se encuentra mTOR.<sup>128</sup> En su estado activado, mTOR impulsa la progresión a través del

ciclo celular mediante la inhibición de la proteína reguladora 4E-BP1. Sus otras funciones incluyen acelerar la proliferación celular y promover la angiogénesis a través de la producción de factor inducible por hipoxia. Aunque rara vez está mutado en CVB, la hiperactividad de mTOR se asocia con peor pronóstico en el CC.<sup>129-130</sup>

Por otra parte, los receptores HER2 y EGFR tienen un dominio extracelular y un dominio intracelular con actividad de tirosina quinasa. El aumento de la activación de EGFR se asocia con peor supervivencia en pacientes con CCIH.<sup>131,132</sup> El receptor HER2 es el activador más potente de estas vías, estimulando una señalización prolongada y más eficaz. El aumento de la expresión de este receptor es bastante común en CVB, especialmente en los tumores de la VB (figura 8). El receptor VEGF es un potente estimulador de la angiogénesis mediante la producción de endotelios vasculares y dirige su migración a los vasos en desarrollo.<sup>133,134</sup> En los pacientes con CVB se ha observado que favorece la enfermedad metastásica. El receptor MET, también conocido como el receptor de dispersión, promueve la invasión de las células tumorales mediante la degradación a uniones intercelulares.<sup>135</sup> El aumento de la expresión de c-MET en el CVB generalmente indica un mal pronóstico.<sup>136,137</sup>

#### ➤ **Alteraciones de *IDH***

Las mutaciones en los genes de la isocitrato deshidrogenasa (*IDH1* e *IDH2*; figura 12)<sup>138</sup> están descritas con mayor frecuencia en los CCIH (del 10% al 43% de los casos) y raramente en CCEH y VB.<sup>139</sup> Estas mutaciones se agruparon en hotspots previamente identificados (codones 132 y 172 respectivamente).<sup>140</sup> Las mutaciones más comunes son *IDH1-R132C* e *IDH1-R132G* (44% y 14%, respectivamente).<sup>141</sup> Se ha observado que las mutaciones en *IDH1/2* son mutuamente excluyentes con mutaciones de *KRAS/NRAS* en el CC, pero pueden coexistir frecuentemente con mutaciones de *BAP1*.<sup>142</sup>



**Figura 12.** Vía *IDH1* e *IDH2*. Se trata de enzimas metabólicas localizadas en el citoplasma (*IDH1*) y en las mitocondrias (*IDH2*), respectivamente, que catalizan la descarboxilación de isocitrato a alfa-cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), lo que conlleva la reducción de NADP + a NADPH.<sup>138</sup>

### ➤ **Vía FGFR**

Es una vía de señalización compleja que consta de cuatro receptores transmembrana de tirosina quinasa FGFR (1 a 4) junto con 18 ligandos de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estos ligandos son factores de crecimiento polipeptídicos que se unen a receptores expresados en la superficie de las células diana. Tras la unión, la combinación receptor-ligando es responsable de la regulación de varios procesos celulares clave, incluida la proliferación celular, supervivencia, migración y angiogénesis.<sup>143-144</sup> Las alteraciones genéticas de la vía FGFR, como mutaciones, amplificaciones o translocación cromosómica puede iniciar tumorigénesis. El hepatocarcinoma está asociado con sobreexpresión de FGFR4.<sup>145-146</sup> En el CCIH, las alteraciones más frecuentes son las fusiones de *FGFR2* (alrededor del 13-14%).<sup>147</sup> Estas fusiones se han observado más comúnmente en mujeres, con una mejor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Las fusiones descritas con mayor frecuencia son: *FGFR2-AHCYL1*, *FGFR2-BICC1*, *FGFR2-PARK2*, *FGFR2-MGEA5*, *FGFR2-TACC3*, y *FGFR2-KIAA1598*.<sup>110</sup> Recientemente se han descrito mutaciones emergentes de *FGFR2* como mecanismos de resistencia a inhibidores de FGFR en pacientes con fusiones en *FGFR2*.<sup>148-149</sup>



### ➤ **Modificadores de la cromatina**

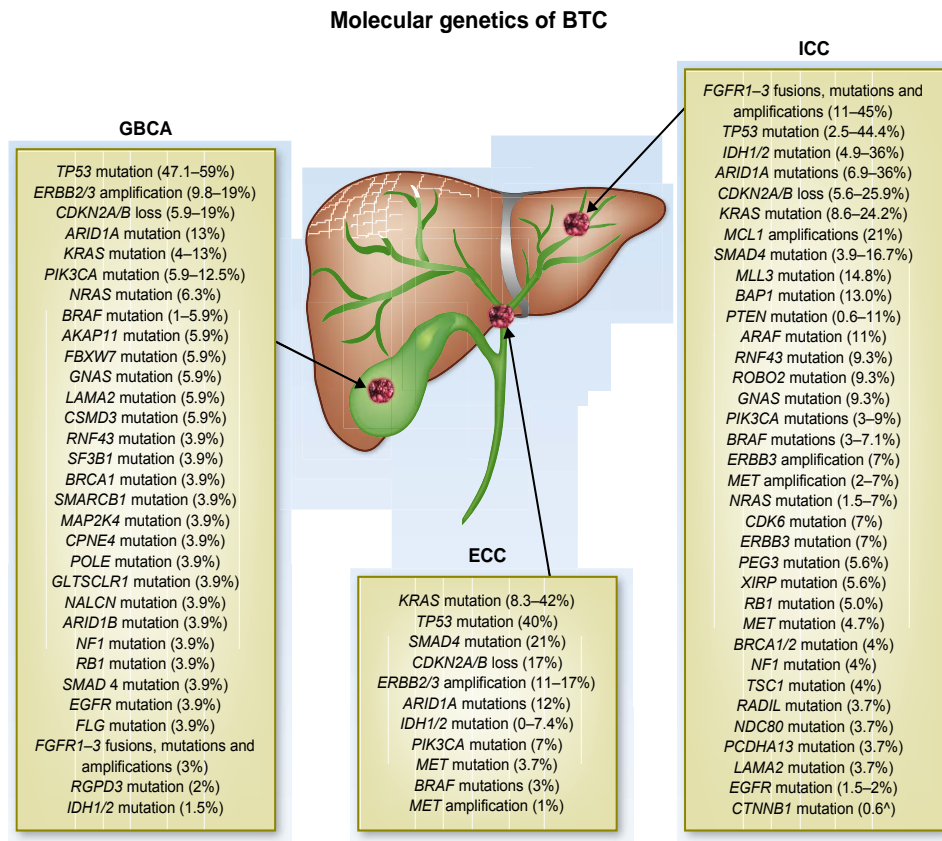
La remodelación de la cromatina permite que el ADN genómico regule las proteínas transcripcionales y por tanto controle la expresión génica. Genes involucrados en la remodelación de la cromatina como *ARID1*, *BAP1*, *PBRM1* y *MLL* están mutados en varios tipos de cáncer, pudiendo inducir carcinogénesis.<sup>107</sup> *BAP1* codifica para una desubiquitinasa nuclear involucrada en la remodelación de la cromatina y las mutaciones en este gen están asociadas con melanoma uveal, mesotelioma y cáncer renal<sup>150-151</sup>, mientras que *PBRM1* y *ARID1A* codifican una subunidad accesoria del complejo de remodelación de cromatina *SWI/SNF*.<sup>152</sup>

Jiao et al.<sup>153</sup> llevaron a cabo la secuenciación del exoma en 32 casos de CCIH y describieron por primera vez mutaciones en *BAP1* (20% de los tumores analizados), *ARID1A* (14%) y *PBRM1* (13%). De hecho, en casi la mitad de los CCIH secuenciados se puso en evidencia la mutación en al menos uno de estos genes.

### ➤ **Fusiones de nuevos genes: *NTRK***

Se han identificado nuevas fusiones de genes en CCIH, tales como *RABGAP1L-NTRK1*. *NTRK1* codifica una proteína de la familia del receptor de tirosina quinasa neurotrófico (*NTKR*); esta quinasa es un receptor unido a la membrana que, en la unión a neurotrofina, se fosforila a sí mismo y a los miembros de la vía *MAPK*.<sup>154</sup> Las fusiones génicas que implican a los genes *NTRK1*, *NTRK2* y *NTRK3* dan como resultado *TRKA* constitutivamente activo, *TRKB* y *TRKC* quinasas. Los estudios de secuenciación han identificado la presencia de fusiones de *NTRK* en 1 de cada 28 (3,5%) de los pacientes diagnosticados de CCIH. Las fusiones en *ROS1* y *ALK* son fenómenos poco frecuentes en los CCIH (0% a 8,7% y 2.6%, respectivamente).<sup>155</sup>

En síntesis, los análisis genómicos recientes han sido determinantes para una mejor comprensión y clasificación molecular de los CVB (figura 13).



**Figura 13.** Alteraciones genéticas descritas en los tumores de la vía biliar según su localización en el árbol biliar.

112,145,147. **Figure 4.** Genetic landscape of BTC. Most frequent genetic aberrations in targetable pathways of interest in BTC. The mutation is quoted as the highest to lowest with range from different reports on each mutation. Those without range come from single reports. Extracted from Deshpande et al. BMC Cancer 2011 (103), Borger et al. The Oncologist 2012 (102), Voss et al. Human Pathology 2013 (204), Ross et al. The Oncologist 2014 (52), Ong et al. Nature Genetics 2012 (45), Graham et al. Human Pathology 2014 (123), Arai et al. Hepatology 2014 (81), Sia et al. Nature Communications 2015 (82), Javle et al. Cancer 2016 (53), Zou et al. Nature Communications 2011 (62), Li et al. Nature Genetics 2014 (101), Zhu et al. Annals of Surgical Oncology 2013 (19), Wang et al. Nature Reviews Cancer 2013 (13), Wang et al. Nature Reviews Cancer 2013 (115), Wu et al. Cancer Discovery 2013 (79), Ross et al. Journal of Clinical Oncology 2015 (51), Nakamura et al. Nature Genetics 2015 (89), Borad et al. Nature Genetics 2014 (48), Randall et al. Journal of Clinical Oncology 2015 (50), Galdy et al. Cancer and Metastases Reviews 2016 (162), Churi et al. PlosOne 2014 (83), Turner et al. Nature Reviews in Cancer 2010 (124), Pai et al. European Journal of Cancer Prevention 2011 (199), Riener et al. Genes, Chromosomes and Cancer 2008 (208). GBCA, gallbladder cancer.

### 2.3 Estrategias terapéuticas dirigidas contra alteraciones moleculares específicas

Diferentes estudios han investigado la eficacia de la combinación de quimioterapia basada en gemcitabina con terapias moleculares. Lamentablemente, gran parte de los fármacos ensayados para el tratamiento de los CVB no han sido exitosos, sin embargo, uno de los puntos clave es que en dichos estudios se incluyan CVB indistintamente de su localización o características moleculares. No obstante, gracias a un conocimiento más profundo de las vías de señalización involucradas en los distintos CVB, en el momento actual están en desarrollo nuevos fármacos dirigidos con resultados prometedores. Estos nuevos fármacos están siendo especialmente desarrollados en el caso de ICC

A continuación, se describen las distintas estrategias empleando diferentes fármacos en combinación con quimioterapia. El mecanismo de acción de cada agente seleccionado se revisa en la figura 14 y los resultados de eficacia de los ensayos clínicos en CVB con los regímenes de combinación con agentes dirigidos se describen en la tabla 8.<sup>156</sup> Los fármacos ensayados en monoterapia se resumen en la tabla 9.

**Tabla 8.** Estudios que han evaluado la combinación de quimioterapia basada en gemcitabina y tratamientos diana

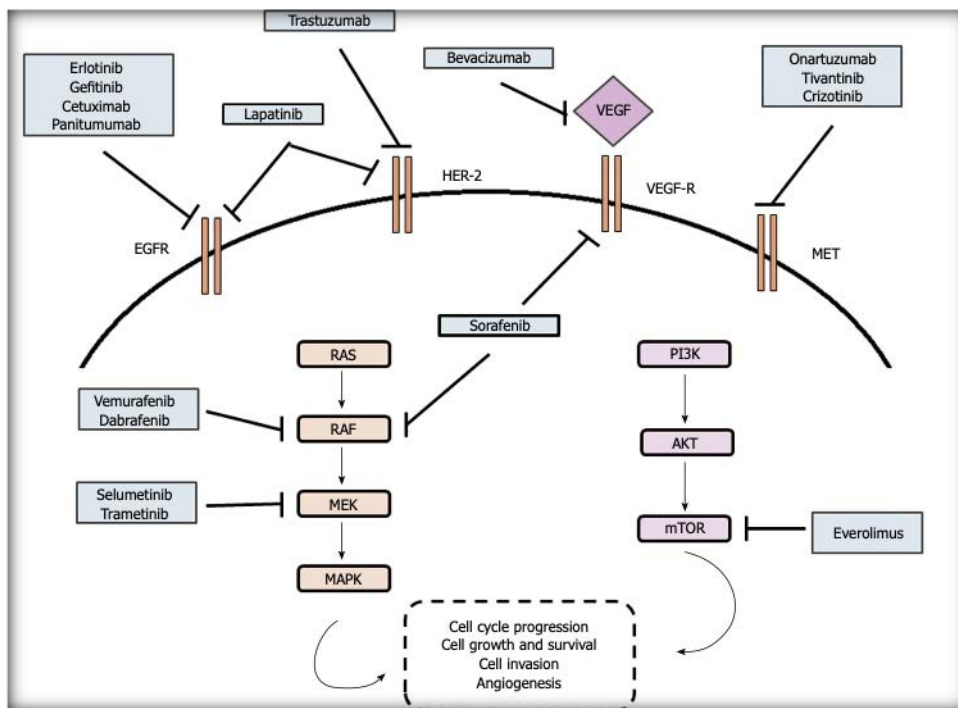
Régimen en el estudio	Número	TR (%)	SG (meses)
Gemcitabina + oxaliplatino + erlotinib <sup>157,158</sup>	135	30	9,5
Gemcitabina + oxaliplatino + cetuximab <sup>160,161</sup>	76	24	11
Gemcitabina + oxaliplatino + panitumumab <sup>162</sup>	46	33	10
Gemcitabina + oxaliplatino + bevacizumab <sup>171</sup>	35	40	12

TR: tasa de respuesta; SG: supervivencia global.

**Tabla 9.** Estudios que han evaluado tratamientos diana en monoterapia

Régimen en el estudio	Número	TR (%)	SG (meses)
Sorafenib <sup>173-175</sup>	9	33	9
Lapatinib <sup>165-167</sup>	42	10	9,7
Selumetinib <sup>179</sup>	26	30	7,3
Sunitinib <sup>176</sup>	35	36	10

TR: tasa de respuesta; SG: supervivencia global.



**Figura 14.** Agentes diana en CVB<sup>156</sup>

## ➤ **Inhibidores de EGFR**

El EGFR está ampliamente expresado en CVB, en un 100% de los casos de CCIH, 52,6% de los casos de CCEH y 38,5% de los tumores de VB.<sup>95,97</sup> Las amplificaciones y mutaciones en estos tres tipos de tumores se han descrito en aproximadamente en un 6%, 13,6%, y 15%, respectivamente. Sin embargo, la implicación biológica de estas mutaciones todavía es dudosa.

**Erlotinib** es un inhibidor de tirosina quinasa (TKI) que previene la activación de EGFR mediante bloqueo reversible del receptor de ATP. Esto conlleva que el receptor no pueda activar sus rutas efectoras como RAS-RAF-MEK y PI3K-AKT-mTOR. Los estudios iniciales que evaluaron el uso de erlotinib en monoterapia demostraron cierta actividad en CVB<sup>157</sup>, pero las investigaciones posteriores de este agente en combinación con otras drogas han sido decepcionantes hasta la fecha. Erlotinib se ha estudiado en combinación con GEMOX (gemcitabina y oxaliplatino)<sup>158</sup> y en combinación con el inhibidor de VEGF, bevacizumab.<sup>159</sup> Un ensayo fase III aleatorizó a 268 pacientes con un CVB a recibir GEMOX con erlotinib o GEMOX en monoterapia. La combinación mostró un aumento de TR (30% *versus* 16%,  $P = 0,005$ ), sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en SLP (5,8 *versus* 4,2 meses,  $P = 0,087$ ) ni en SG (9,5 meses para ambos brazos). En la actualidad se están efectuando algunos estudios que evalúan la actividad de erlotinib en combinación con quimioterapia o en combinación con agentes dirigidos (NCT00832637 y NCT00987766).

**Cetuximab y panitumumab** son anticuerpos monoclonales que bloquean selectivamente el dominio de unión del ligando extracelular del receptor *EGFR*, impidiendo su activación (figura 14). Un estudio aleatorizado fase II evaluó la combinación de GEMOX con o sin cetuximab en 150 pacientes con CVB, sin demostrarse diferencias en la TR, SLP o SG.<sup>160</sup> El ensayo TCOG evaluó el mismo régimen en pacientes con CVB con estratificación según la localización tumoral (CCIH/CCEH/ VB) y el estado de *KRAS* (se encontraron 36,1% de mutación en *KRAS*). En el análisis por intención de tratar, se observó cierto beneficio en SLP en el brazo de GEMOX + cetuximab (7,1 *versus* 4,0 meses,  $P = 0,0069$ ), pero no hubo diferencias en la TR (27,3% *versus* 15%,  $P = 0,122$ ) ni en la SG (10,3 *versus* 8,8 meses,  $P = 0,405$ ). El análisis por subgrupos planificado mostró que el máximo beneficio del brazo de cetuximab con GEMOX era en pacientes con *KRAS* mutado, con una SLP de 7,1 meses

*versus* 1,9 meses ( $P = 0,035$ ), sin embargo, no había diferencia estadísticamente significativa en la SG (10,3 *versus* 6,6 meses,  $P = 0,692$ ).<sup>161</sup>

Por otra parte, panitumumab ha demostrado un beneficio de supervivencia en pacientes con CVB. En un estudio fase II que se incluyeron 35 pacientes con CC, se evaluaba la eficacia del tratamiento con gemcitabina, irinotecán y panitumumab. Se describió una SLP de 9,7 meses y SG de 12,9 meses.<sup>162</sup> En un ensayo clínico similar de un solo brazo con pacientes con CCIH o CCEH demostró datos de supervivencia similares cuando se administró panitumumab en combinación con GEMOX seguido de capecitabina.<sup>163</sup> Se han realizado dos ensayos clínicos con la combinación de panitumumab con GEMOX (NCT01206049) y panitumumab con cisplatino más gemcitabina (NCT01320254), pero los resultados de eficacia aún no han sido publicados.

### ➤ **Inhibidores de HER2**

A pesar de los éxitos de la inhibición de HER2 en el tratamiento de otros cánceres, como el cáncer de mama y el cáncer gástrico, el bloqueo de este receptor en el CVB parece demostrar escaso beneficio. Publicaciones recientes sugieren que las alteraciones en HER2 presentan una mayor incidencia en cáncer de VB (19%)<sup>164</sup> y en CCEH (17,4%).<sup>164</sup>

**Lapatinib** es un TKI reversible que previene la activación tanto de EGFR como de HER2 (figura 14). A pesar de datos preclínicos alentadores, los resultados de dos ensayos fase II de lapatinib en monoterapia en pacientes con CVB no han cubierto las expectativas de eficacia de este fármaco.<sup>165-167</sup>

Existe algún caso clínico publicado que sugiere potencial actividad de **trastuzumab**, anticuerpo monoclonal contra receptor HER2, en VB<sup>168</sup> y está en curso un ensayo clínico fase II (NCT00478140).

**Afatinib** es un inhibidor potente, selectivo e irreversible de receptores de EGFR, HER2 y HER4. Ha demostrado actividad en un paciente diagnosticado con CC en un ensayo clínico fase I.<sup>169</sup> Se está llevando a cabo un ensayo clínico fase I de afatinib en combinación con cisplatino y gemcitabina en pacientes con CVB (NCT01679405) y asociado a capecitabina en un ensayo de fase I/Ib en pacientes con tumores sólidos refractarios (NCT02451553).

**Varlitinib** es un inhibidor potente y reversible de receptores EGFR y HER2. Se ha diseñado un estudio aleatorizado fase II/III (“*Tree Topp*”), para evaluar la eficacia de varlitinib en combinación con capecitabina frente a capecitabina en monoterapia en segunda línea en pacientes con tumores de vía biliar. Se estima incluir 120 pacientes en la fase II y 482 en la fase III. El objetivo primario es la tasa de respuesta y los objetivos secundarios son la SLP y la SG (NCT03093870).

Actualmente también se está llevando a cabo un ensayo clínico fase II de trastuzumab-emtansina en pacientes con CVB con *HER2* amplificado (NCT02999672).<sup>170</sup>

### ➤ **Inhibidores de VEGF**

Los ligandos que regulan la angiogénesis (particularmente VEGF-A) están presentes entre un 40-75% de los tumores de la vía biliar.<sup>133</sup> **Bevacizumab** es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a VEGF-A, evitando que estimule el receptor de VEGF (VEGFR) (figura 14). Este fármaco se ha estudiado en combinación con quimioterapia con resultados prometedores. Un estudio fase II de brazo único demostró eficacia de bevacizumab con GEMOX en CVB, con una mediana de SLP de 7 meses y SG de 12,7 meses. Después de dos ciclos de tratamiento se demostró una disminución significativa en la captación tumoral de fluorodesoxiglucosa (FDG) en la tomografía por emisión de positrones (PET) (FDG-PET), especialmente en pacientes con una respuesta parcial o enfermedad estable<sup>171</sup>. Este esquema fue bien tolerado por la mayoría de los pacientes, aunque un paciente presentó isquemia cardíaca grado IV durante el estudio. En los pacientes restantes, los eventos grados III o IV más frecuentes fueron neutropenia (20%), neuropatía (14%) e hipertensión (14%). La combinación de bevacizumab con erlotinib ha sido ensayada en pacientes con un CVB, con TR del 12% y enfermedad estable en el 51% de los pacientes y una mediana de SG de 9,9 meses, especialmente en ausencia de quimioterapia concurrente.<sup>159</sup>

**Cediranib** es un fármaco TKI oral que bloquea VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3, con actividad contra los receptores de PDGF y c-KIT. En un estudio aleatorizado fase II (ABC-03)<sup>172</sup> se observó una TR superior en pacientes que recibieron cisplatino/gemcitabina con cediranib (44%) *versus* placebo (19%) ( $P = 0,003$ ) y una mejoría de la SLP a 6 meses (70,5% *versus* 61,3%;  $P > 0,05$ ). Sin embargo, el estudio no cumplió con su objetivo primario (mejoría en la mediana de SLP).<sup>172</sup>

Los estudios fase II de **sorafenib** en monoterapia<sup>173</sup> o en combinación con erlotinib<sup>174</sup> o cisplatino/gemcitabina<sup>175</sup> no han demostrado actividad en CVB. Un ensayo clínico fase II con **sunitinib** (inhibidor de VEGF, PDGF, c-KIT y RET) que incluía 56 pacientes con CVB obtuvo una mediana del tiempo hasta la progresión de 1,7 meses, una tasa de respuesta objetiva del 8,9% y una tasa de control de la enfermedad del 50% (tabla 8).<sup>176</sup>

**Vandetanib** es un fármaco oral inhibidor multiquinasa que se dirige al receptor VEGF2, EGFR y RET. El grupo italiano de Santoro et al.<sup>177</sup> publicaron los resultados de un ensayo clínico fase II aleatorizado de tres brazos que exploró el papel de vandetanib en 173 pacientes con CVB que no habían recibido quimioterapia. Los tres brazos del estudio eran: vandetanib en monoterapia, vandetanib más gemcitabina y gemcitabina más placebo. La mediana de SLP fue de 105 días (intervalo de confianza [IC] del 95% 72-155), 114 días (IC del 95% 91-193) y 148 días (IC del 95% 71-225), respectivamente, mientras que la SG fue de 228 días (IC del 95% 190-364), 284 días (IC del 95% 213-359) y 307 días (IC del 95% 254-523) para cada uno de los tres regímenes, respectivamente. Así pues, vandetanib solo o en combinación con gemcitabina no demostró ninguna superioridad en comparación con gemcitabina en monoterapia.<sup>177,178</sup> Estamos a la espera de los resultados de los estudios en curso con pazopanib (NCT01855724), regorafenib (NCT02053376 y NCT02115542) y ramucirumab (NCT02711553).

#### ➤ **Inhibidores de MEK**

**Selumetinib**, es un inhibidor de la proteína quinasa MEK (figura 14 y tabla 9).<sup>179</sup> En un ensayo clínico en segunda línea, selumetinib demostró moderada actividad antitumoral en CVB, objetivándose enfermedad estable en aproximadamente dos tercios de los pacientes con buena tolerancia. La única toxicidad grado IV observada fue astenia.<sup>180</sup> En el apartado de estrategias terapéuticas sobre vías de señalización se describe más ampliamente la experiencia en la inhibición de MEK.

#### ➤ **IDH**

Diversos grupos de investigación han caracterizado las mutaciones de *IDH*, y han demostrado que la mutación de *IDH1* es más común que la mutación de *IDH2*; las mutaciones de "hotspot" *IDH1/2* son mutaciones puntuales localizadas en el residuo de

arginina 132 (*R132*) en *IDH1* o el residuo de arginina 172 (*R172*) en *IDH2*;<sup>76,180</sup>; estas mutaciones son más frecuentes en CCIH que en CCEH; la importancia pronóstica de las mutaciones de *IDH* sigue estando en discusión en CC,<sup>94,181-183</sup> *IDH* mutado pierde su actividad enzimática normal y adquiere una nueva capacidad para producir el 2-hidroxi-glutarato de oncometabolito (2-HG) que puede detectarse en el tumor y la sangre periférica.<sup>184</sup> Se han desarrollado inhibidores farmacológicos altamente específicos para los alelos mutantes de *IDH* (por ejemplo, para *IDH1R132* e *IDH2R172*). Estos bloquean la función de *IDH1* o *IDH2* mutado a concentraciones nanomolares, lo que conduce a niveles reducidos de 2-HG (figura 12). Rohle et al.<sup>185</sup> describieron un inhibidor selectivo de *IDH1R132H* (AGI-5198) que impedía el crecimiento de las células de glioma con *IDH* mutado. Del mismo modo, Wang et al.<sup>186</sup> demostraron que AGI-6780 podría inhibir selectivamente las células leucémicas que tiene la mutación *IDH2R140Q*.

En un ensayo clínico fase I, AG-120 (inhibidor de *IDH1*, Agios) fue bien tolerado en pacientes con tumores sólidos avanzados con mutaciones de *IDH1* (NCT02073994). No hubo efectos tóxicos que limitaran la dosis, y la anemia fue el evento adverso grado 3 descrito con mayor frecuencia (5%). De los 20 pacientes con CCIH metastásico, 1 paciente (5%) obtuvo una respuesta parcial y 11 pacientes (55%) obtuvieron enfermedad estable. En todos los pacientes que respondieron a AG-120, se observó una reducción en los niveles circulantes de 2-HG que oscilaban entre el 73% y el 99%. Actualmente está en marcha un ensayo clínico fase III con pacientes portadores de la mutación en *IDH1* tras progresar a una primera línea de tratamiento (NCT02989857). Otros inhibidores de *IDH1* y *IDH2* están siendo evaluados en ensayos clínicos en pacientes con CCIH (NCT02273739, NCT02381886 y NCT02481154).

Estudios preclínicos han puesto en evidencia que las células de CCIH que tenían mutaciones en *IDH* presentaban respuesta al dasatinib, inhibidor de las tirosina quinasas BCR/ABL, SRC, c-Kit, varias quinasas Eph y otras, pero sin efecto sobre el EGFR.<sup>186</sup> Además, los xenografts con mutaciones de *IDH* tratados con dasatinib demostraron una importante apoptosis y regresión tumoral. Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico fase II con dasatinib en pacientes con CCIH con mutación en *IDH* (NCT02428855).



## ➤ **FGFR**

La vía del FGFR está involucrada en la migración, proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Las fusiones FGFR2 están presentes de un 11% a un 45% de los pacientes con un CCIH. Este descubrimiento ha abierto una prometedora vía terapéutica.<sup>118-121,187,188</sup> En los estudios de perfil genómico, las fusiones de *FGFR2* se encuentran sincrónicamente con mutaciones en *ARID1A*, *PBRM1* y *TP53*, entre otros.<sup>81</sup> Histológicamente, las fusiones de *FGFR2* se asocian con un crecimiento intraductal prominente y la anastomosis de las glándulas tubulares<sup>189</sup>; estas características pronósticas parecen estar asociadas con un curso de enfermedad indolente y una supervivencia prolongada.<sup>187,188</sup>

Los primeros datos publicados con un inhibidor selectivo de FGFR en CC fueron con el fármaco oral BGJ398 (infigratinib). En el estudio fase II de brazo único se incluyeron 61 pacientes afectados de CC con alteraciones en *FGFR* tras progresión a tratamiento estándar (NCT02150967). La TR fue del 14,8%, la tasa de control de enfermedad (TCE) del 75,4% y la SLP de 5,8 meses (IC del 95% 4,3-7,6).<sup>190</sup> Los datos de este ensayo clínico fueron actualizados en el último congreso europeo de oncología con 71 pacientes incluidos; la TR fue del 31,5% (IC del 95% 20,5-43,1%). La TCE fue del 86,9%, con una duración media de respuesta de 5,4 meses, y la mediana de SLP y la SG de 6.8 meses (IC del 95% 5,8-7,6) y 12,5 meses (IC del 95% 9,9-16,6), respectivamente.<sup>191</sup>

El grupo de Borad et al.<sup>192</sup> publicaron por primera vez resistencia adquirida a la inhibición del FGFR en un análisis de tres pacientes con CCIH con fusión *FGFR2* que fueron tratados con BGJ398. La secuenciación del ADN libre de células (ADNc) y las muestras de biopsia recogidas al inicio y después de la progresión revelaron mutaciones policlonales secundarias en el dominio de la quinasa FGFR2, incluida la mutación *FGFR2V564F* en los tres pacientes. Los estudios in vitro identificaron inhibidores de FGFR estructuralmente distintos que pueden superar la resistencia. Estos datos sugieren futuras estrategias de tratamiento en este escenario.

En relación a otro inhibidor selectivo de FGFR, INCB54828 (Incyte; NCT02924376), se han comunicado datos en el último congreso europeo de oncología. Los pacientes fueron incluidos en tres cohortes: cohorte A (fusiones de *FGFR2*) (47 pacientes), cohorte B (otras alteraciones genéticas *FGF/FGFR*) (22 pacientes) y cohorte C (sin alteraciones no *FGF/FGFR*) (18 pacientes). Un total de 45 pacientes fueron

evaluables, observándose en la cohorte A 8 pacientes (18%) con respuesta parcial y 26 pacientes (58%) con enfermedad estable. La TR fue 24% (IC del 95% 12-37) y la SLP de 6,8 meses (IC del 95% 3.6-9,2). No se observaron respuestas ni aumento de la SPL en las cohortes B y C.<sup>193</sup>

Otros inhibidores selectivos de FGFR que se están evaluando actualmente en pacientes con tumores sólidos avanzados, incluyendo CCIH, son BAY1163877 (NCT01976741) y el inhibidor irreversible de FGFR TAS-120 (NCT02052778). Los multi-TKI no selectivos que también se dirigen a FGFR, ponatinib y pazopanib, han demostrado actividad en pacientes con CCIH que han desarrollado resistencia a la quimioterapia.<sup>194</sup> Un tercer TKI no selectivo, ARQ 087 (NCT01752920), que inhibe *RET*, *PDGFR*, *KIT*, *SRC* y *FGFR1-3* (IC<sub>50</sub> para *FGFR2* 0,68 nmoL/L), se está evaluando actualmente en un ensayo fase II con pacientes previamente tratados con alteraciones en FGFR. Los datos preliminares del ensayo fase I/II muestran que 3 de los 12 pacientes con CCIH con fusión *FGFR2* tratados con ARQ 087 presentaron una respuesta parcial (con una tasa de control de la enfermedad del 75%).<sup>195</sup> Los niveles circulantes de ligandos de FGF como FGF19, FGF21 y FGF23 mostraron cierta correlación con la respuesta en el ensayo ARQ 087.<sup>196</sup>

El perfil de seguridad de los inhibidores de FGFR es manejable, siendo la hiperfosfatemia una de las toxicidades más comunes. Este es un efecto de clase debido al bloqueo de FGF23 en el hueso y el riñón. FGF23 es una hormona fosfatúrica que regula la excreción de fósforo en el túbulo proximal del riñón, y la inhibición de esta hormona conduce a la reabsorción del fosfato. Los datos preliminares del uso de inhibidores de FGFR en CCIH avanzado son alentadores.

## **2.4 Estrategias terapéuticas dirigidas contra vías de señalización**

### **➤ La vía WNT/ $\beta$ -catenina**

La vía WNT/ $\beta$ -catenina está implicada en la regulación de la invasión y migración celular. La alta expresión nuclear con baja expresión membranosa de la expresión de  $\beta$ -catenina se ha descrito en CCIH (15%)<sup>197,198</sup>; la señalización de WNT parece ser más relevante en el CC hilar.<sup>199</sup> La activación de la vía WNT se asoció con la quimiorresistencia y la diseminación metastásica en un modelo de tumor de xenoinjerto de CC<sup>200</sup> y la inhibición de WNT revirtió la quimiorresistencia en las líneas celulares.<sup>201</sup> Por el contrario, su impacto y el estado mutacional de los componentes de

esta vía hoy en día no se conocen completamente en CVB.<sup>202,203</sup> La secuenciación del exoma completo del CC relacionado con infección por *Opisthorchis viverrini* identificó mutaciones en la vía WNT, como *RNF43* (9,3%).<sup>204</sup>

La expresión de  $\beta$ -catenina se asocia con apoptosis disminuida en CVB.<sup>205</sup> A pesar de que actualmente se están desarrollando múltiples inhibidores de la vía WNT, hasta el momento se han efectuado escasos ensayos clínicos en pacientes con CVB (figura 15).<sup>206,207</sup> Eads et al.<sup>206</sup> evaluaron la seguridad de DKK1, un inhibidor de la vía canónica de WNT/ $\beta$ -catenina, en combinación con gemcitabina y cisplatino en un ensayo clínico fase I que incluía pacientes con CVB. La combinación resultó ser segura y con una potencial estabilización prolongada de la enfermedad, por lo que se espera un mayor desarrollo de esta estrategia.

#### ➤ **La vía Hedgehog**

La vía Hedgehog también está involucrada en el desarrollo de CVB.<sup>208-209</sup> Los pacientes con CVB y vía de Hedgehog activada tendrían tumores más agresivos y con peor pronóstico.<sup>210,211</sup> La supresión de la vía de Hedgehog en la VB y las líneas celulares de CC<sup>212</sup> implantadas en xenoinjertos de ratón inhibieron la transición epitelio-mesenquimal y redujeron el volumen tumoral, lo que sugiere un nuevo objetivo potencial de esta vía.

#### ➤ **La vía HGF-c-MET**

La tirosina quinasa c-MET desempeña un papel integral en la carcinogénesis promoviendo la angiogénesis, la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis. La unión de este receptor con el factor de crecimiento del hepatocito ligando (HGF) activa múltiples rutas de transducción de señal, incluyendo la cascada GRB2-RAS-MAPK y las rutas PI3K, EGFR, VEGF y RAC1-CDC42. La sobreexpresión de c-MET, se asocia con un mal pronóstico en CC, y se ha descrito con una frecuencia del 12% al 58% en los CCIH<sup>213-214</sup> y del 0% al 16% en los CCEH. Existe una amplia variación probablemente explicada por las diferencias en el anticuerpo c-MET utilizado, la definición de positividad, el análisis de las muestras quirúrgicas frente a muestras de etapa avanzada y la cantidad de material tumoral disponible. La amplificación de c-MET es rara en el CC, pero se ha observado con una frecuencia del 7% en un estudio de 26 casos de CCIH analizados por NGS. Además del efecto mencionado anteriormente en el CC, la vía

HGF-c-MET promueve la actividad proteolítica e induce la motilidad celular, esencial para la progresión invasiva de las líneas celulares de carcinoma de VB.<sup>215</sup> Se ha demostrado que la amplificación de c-MET conduce a la resistencia a los inhibidores de EGFR a través de la activación de *PI3KCA* dependiente de *HER3*. Por tanto, la doble inhibición de c-MET con otras vías podría representar una estrategia terapéutica en el CC.

El **cabozantinib** tiene una actividad potente contra c-MET (IC<sub>50</sub> 1,3 nmoL/L) y VEGFR2 (IC<sub>50</sub> 0,035 nmoL/L). Se analizó su actividad en un ensayo clínico fase II en pacientes con CC avanzado; la mediana de SLP fue de 1,8 meses (IC del 95%, 1,6-5,4) y la mediana de SG de 5,2 meses (IC del 95%, 2,7-10,5). Los eventos adversos de grado 3/4 ocurrieron en el 89% de los pacientes. Un paciente con expresión de 3+ MET en el tumor permaneció en tratamiento durante 278 días, pero la expresión MET no se correlacionó con los resultados en la población general del estudio y el ensayo se interrumpió anticipadamente por la toxicidad registrada durante el estudio.<sup>216</sup>

Se está llevando a cabo un ensayo clínico aleatorizado fase II con merestininib más cisplatino/gemcitabina en primera línea de tratamiento (NCT02711553).

#### ➤ **Vía RAS-BRAF-MEK-ERK**

La vía RAS-RAF-MEK-ERK con frecuencia está desregulada en el CC.<sup>217</sup> El *RAS* activado desencadena la fosforilación y la activación de RAF cinasa, lo que conduce a la fosforilación final de MEK1 y MEK2. La MEK activada fosforila ERK1 y ERK2 (figura 15). La ERK fosforilada (pERK) seguidamente se dimeriza y se transloca al núcleo, donde regula varias funciones celulares importantes. La mutación de *KRAS* está presente con una frecuencia del 9% al 40% en el CC.<sup>110,112</sup> La mutación *KRAS* se ha asociado con invasión perineural, etapa avanzada y mal pronóstico.<sup>218</sup> *KRAS* puede estar mutado hasta en un 7,8% en los tumores de VB.<sup>219</sup>

Las mutaciones *BRAF* parecen no ser significativas en el cáncer de VB y solamente aparecen en CCIH.<sup>220</sup> Sin embargo, se han descrito tasas de mutación del 5,9% al 33%.<sup>94</sup> La mutación *V600E* es la más frecuente en los cánceres humanos incluyendo el CC. En un estudio fase II de **vemurafenib** en una cohorte de 122 pacientes con cánceres no melanoma mutados por *BRAF V600*, en 1 paciente con CC se describió una respuesta parcial duradera de más de un año.<sup>221</sup>

Los datos publicados sobre la eficacia de un inhibidor de MEK en un estudio de brazo único con **selumetinib** en CVB avanzados y 25 pacientes evaluables<sup>179</sup> mostraron respuesta parcial en 3 pacientes (12%) y enfermedad estable en 17 (68%). La mediana de SLP fue de 3,7 meses (IC del 95%, 3,5-4,9) y la mediana de SG de 9,8 meses (IC del 95%, 6,0-no evaluable). En este estudio, no se detectaron mutaciones *BRAF V600E*, pero la ausencia de tinción de pERK pareció estar asociada con una falta de respuesta a selumetinib. En el estudio ABC-04 fase Ib, se está evaluando la seguridad y tolerabilidad de selumetinib en combinación con cisplatino/gemcitabina en CVB avanzado; 3 de 8 pacientes evaluables obtuvieron respuestas parciales. Las toxicidades relacionadas con selumetinib incluyeron edema y erupción de grado 1 a 2.<sup>222</sup>

Otro inhibidor no competitivo de MEK 1/2, **binimetinib**, después de resultados alentadores en seguridad y actividad durante los estudios de fase I<sup>223</sup>, se encuentra actualmente en evaluación en estudios de fase II (NCT02151084, NCT01828034). Por el contrario, **pazopanib**, un inhibidor multiquinasa del receptor VEGF, PDGF, c-KIT, FGFR y RAF, así como **trametinib**, un inhibidor altamente específico de MEK 1 y MEK 2, ambos disponibles por vía oral, han mostrado resultados desalentadores.<sup>224,225</sup>

No obstante, dada la importancia de en esta vía, nuevas estrategias combinadas dirigidas a diferentes moléculas representan enfoques atractivos en el CC.

### ➤ **La vía PI3K-AKT-mTOR**

La activación más frecuente de la vía PI3K-AKT son mutaciones somáticas de *PIK3CA* en CVB.<sup>96</sup>

**MK-2206** es un inhibidor alostérico selectivo oral de *AKT* que se dirige a las tres isoformas de *AKT* humano (*AKT1*, *AKT2* y *AKT3*) con valores de IC<sub>50</sub> de 8, 12 y 65 nmoL/L, respectivamente. El resultado de un estudio fase II que utilizó este compuesto en 8 pacientes con al menos un tratamiento sistémico previo fue desalentador, con una mediana de SLP de 1,7 meses y de SG de 3,5 meses.<sup>226,227</sup>

Un estudio fase II con **everolimus** en primera línea mostró evidencia sobre la actividad antitumoral, en 14 de los 27 pacientes (56%, IC 95%, 35-76) logrando control tumoral a las 12 semanas y en 2 de ellos logrando una respuesta parcial. La mediana de SLP fue de 6,0 meses (IC del 95%, 2,1-11,2) y la mediana de SG fue de 9,5 meses (IC del 95%, 5,5 a 16,6). Los estudios correlativos sugieren que el estado mutacional de

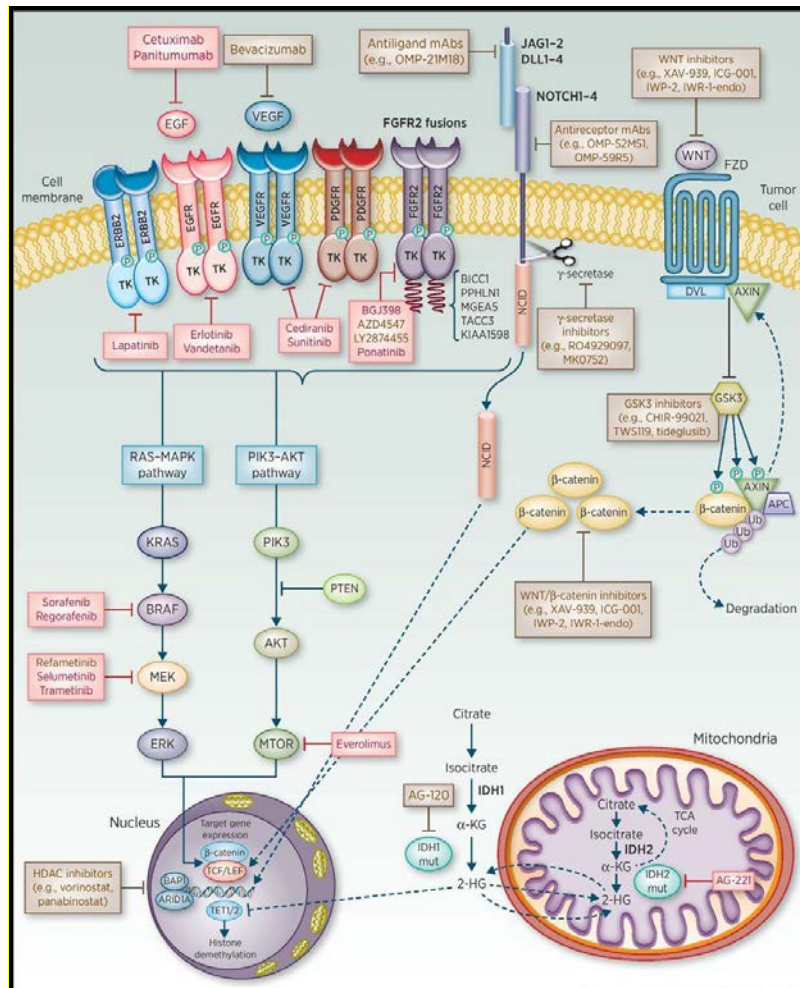
KRAS y los niveles de pAKT basales podrían estar asociados con la resistencia al tratamiento con everolimus.<sup>228</sup> En el momento presente se está realizando un ensayo fase II de copanlisib (BAY 80-6946) en combinación con gemcitabina y cisplatino en tratamiento de primera línea (NCT02631590).

➤ **ROS, ALK, NTRK**

La presencia de fusiones de *NTRK* en pacientes diagnosticados de CCIH se ha establecido en torno al 3,5%.<sup>81</sup> También se han descrito fusiones esporádicas de *ROS1* (hasta 8,7%) y *ALK* (2,6%).<sup>129</sup>

Los fármacos dirigidos a los genes *NTRK1/2/3*, *ROS1* o *ALK* han demostrado una tasa de respuestas notablemente elevadas (57-86%) en una población seleccionada de tumores sólidos.<sup>228,229</sup> En base a estos datos y a la actividad clínica bien conocida de los inhibidores de ALK en el cáncer de pulmón de células no pequeñas con translocación de *ALK* o *ROS1*, se está llevando a cabo un ensayo fase II, en el que se evalúa la eficacia y la seguridad de **ceritinib** en pacientes con CCIH que sobreexpresa *ROS1* o *ALK* (NCT02374489). La fusión FIG-ROS recientemente identificada ha propiciado que se esté evaluando el uso de crizotinib en un ensayo fase II en pacientes con *ALK*, *MET* o *ROS1* (NCT02034981).

Durante la reunión anual ASCO 2017, se presentaron datos preliminares sobre **larotrectinib**, que mostró una actividad antitumoral consistente y duradera en 55 pacientes con varios tipos de tumores sólidos con fusiones en *NTRK* (CC en 2 pacientes). Las tasas de respuestas de 46 pacientes evaluados fueron del 78%, con respuestas en 12 tipos de tumores.<sup>230</sup>



**Figura 15.** Detalle de las vías más relevantes en CVB. Las flechas negras describen activación, las flechas rojas inhibición, y los asteriscos mutación de la proteína.<sup>197</sup>

## 2.5 Inmunoterapia

### ➤ Terapia con vacunas

El sistema inmune del huésped se sensibiliza contra antígenos específicos de tumores utilizando vacunas de células enteras, vacunas de péptidos específicas de antígenos o células dendríticas cargadas con antígeno. La proteína 1 de tumor de Wilms (WT1) y la proteína 1 de mucina (MUC1) son dos antígenos de especial interés para CVB.<sup>231</sup>

WT1, un factor de transcripción también es un supresor tumoral mediante la interacción con *PDGFR*, *EGFR*, *c-MYC* y *BCL2*.<sup>232</sup> En un ensayo fase I en combinación con gemcitabina los pacientes con respuesta de células T a la vacunación WT1 presentaban una SG más larga que los pacientes tratados solo con gemcitabina, con enfermedad estable a los 2 meses en el 50% de los casos y una mediana de SG de 288 días.<sup>233</sup> Las células T específicas de WT1 fueron detectables en el 65% de los pacientes

después de la vacunación, aunque no se observó una correlación con resultados significativos.

MUC1, una glicoproteína que forma una barrera hidrófila para los agentes citotóxicos hidrófobos está muy sobreexpresada en los CVB (90%) y en menor medida en los CC (59-77%)<sup>234</sup>, asociándose con estadio avanzado de la enfermedad y peor supervivencia. En un ensayo fases I, la vacunación con MUC1 no se tradujo en beneficio clínico a pesar de lograr una respuesta IgG anti MUC1, en un solo paciente con enfermedad estable.<sup>235</sup> En un estudio de una vacuna basada en células dendríticas dirigida a MUC1 en pacientes con cáncer de páncreas reseccionado y CVB tratados con quimioterapia adyuvante o radioterapia, se observó que 4 de los 12 pacientes estaban libres de enfermedad a los 4 años.<sup>236</sup> Ampliar la vacunación para alcanzar dos<sup>237</sup>, tres<sup>238</sup> o cuatro<sup>239</sup> péptidos, o incluso "personalizar" la vacuna es aspecto prometedor que merece ser investigado.

El grupo de Yoshitomi et al.<sup>240</sup> ensayaron una vacuna multipéptido en un ensayo fase II en pacientes con CVB avanzado. Cada vacuna se personalizó, seleccionando hasta cuatro péptidos HLA compatibles de acuerdo con la inmunidad preexistente del huésped. Esta vacuna multipéptido personalizada fue bien tolerada y se observó una respuesta de células T al péptido de la vacuna en 8 de 17 pacientes (47%) que completaron el primer ciclo de vacunación y en 4 de 7 pacientes (57%) después del segundo ciclo.<sup>240</sup>

Una alternativa a la terapia con la vacuna peptídica es la utilización de células dendríticas pulsadas con antígeno para activar y regular positivamente una respuesta de células T específica. En un estudio se administró la vacuna de células dendríticas pulsadas WT1 y MUC1 a 65 pacientes con CVB irresecable o recurrente con y sin quimioterapia.<sup>240</sup> Es de destacar que los pacientes que experimentaron fiebre después de la vacunación mejoraron la supervivencia general en el análisis multivariado, lo que infiere que una respuesta inmunológica puede ser beneficiosa.<sup>241</sup>

### ➤ **Terapia adoptiva con células T**

Un enfoque alternativo para aumentar la respuesta inmune específica del tumor del huésped y la infiltración de células T intratumorales es la infusión de linfocitos tumorales infiltrados (TIL) propios del paciente.<sup>242</sup> La transferencia de células T adoptivas aumenta el número de linfocitos T citotóxicos activados en el



microambiente tumoral que el inducido por una vacuna sola. En el melanoma metastásico, la infusión de TIL enriquecida en CD8 + después de un régimen preparado de linfodepleción condujo a una respuesta objetiva en el 58% de los pacientes, incluidos tres respuestas completas. La transferencia directa de la inmunidad celular a través de la inmunoterapia adoptiva también se ha investigado para su uso en CVB en combinación con la vacunación con células dendríticas.<sup>242</sup>

Higuchi et al.<sup>243</sup> han descrito un caso clínico de más de 3 años de supervivencia a largo plazo en un paciente con CCIH con ganglios positivos tratado con terapia adyuvante basada en células T y células dendríticas pulsadas con lisado tumoral. Estos alentadores resultados en casos clínicos individuales han demostrado la viabilidad de esta estrategia de tratamiento y, por lo tanto, se han desarrollado ensayos clínicos prospectivos más amplios como terapia adyuvante. Un total de 36 pacientes recibieron transferencia de células T activadas y se vacunaron con células dendríticas pulsadas de lisado tumoral autólogo.<sup>243</sup> La mediana de SLP mejoró significativamente a los 18,3 meses en los pacientes que recibieron inmunoterapia adyuvante en comparación con 7,7 meses en los pacientes con terapia adyuvante sola ( $P = 0,005$ ). La SG fue similarmente alentadora, alcanzando 31,9 meses en pacientes que recibieron inmunoterapia adyuvante en comparación con 17,4 meses en pacientes sin inmunoterapia ( $P = 0,022$ ). Es necesaria la realización un ensayo clínico aleatorizado fase III para confirmar la eficacia de la combinación de transferencia de células T adoptivas y vacunas de células dendríticas como terapia adyuvante para la CCIH.

#### ➤ **Inhibidores del punto de control (*checkpoint inhibitors*)**

Los puntos de control inmunológico y otras vías co-inhibidoras de células T son receptores de superficie celular que participan en la respuesta inmune. Estos receptores incluyen PD1, su ligando (PDL1) y el antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4). Múltiples estudios han observado la expresión de PD1/PDL1 en células neoplásicas y agregados de células inflamatorias en CCIH, lo que se ha correlacionado con un peor pronóstico, sugiriendo que un subgrupo de pacientes podrían ser candidatos a tratamiento con estos agentes.<sup>244</sup> Gani et al.<sup>245</sup> describieron la expresión de PDL1 en las células tumorales en el 72% de las muestras de CCIH reseca. Esta expresión de PDL1 se asoció significativamente con una reducción del 60% en la SG respecto a los pacientes PDL1 negativos. Holcombe et al.<sup>109</sup> analizaron una cohorte de muestras de

CVB (126 CCEH, 434 CCIH, 244 VB y 11 no especificadas) e identificaron alta expresión PD-1 (40%) y PD-L1 en (15%). En la cohorte CVB de KEYNOTE-28 (NCT02054806), 37 de 89 pacientes (42%) fueron positivos a PD-L1 (definidos como  $\geq$  1% de tinción de células en nidos tumorales o bandas PD-L1-positivas en estroma por inmunohistoquímica).<sup>246</sup> Cuatro de los 24 pacientes (17%) tratados con pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado altamente selectivo dirigido a PD-1, presentaron una respuesta parcial y otros 4 pacientes lograron una enfermedad estable; 5 pacientes estuvieron en tratamiento durante un largo periodo, incluidos los 4 respondedores.<sup>247</sup> Actualmente se está llevando a cabo un ensayo fase I en combinación con quimioterapia FOLFOX, con una cohorte fase II de expansión en CVB, (NCT02268825), junto con la validación de la expresión de PD-L1 como biomarcador predictivo, evaluación del papel de la expresión de PD-L2 y evaluación de la eficacia en los diversos subgrupos de CVB, así como en pacientes con tumores deficientes en MMR.

La deficiencia de reparación de errores (MMR) y la inestabilidad de microsatélites (MSI) en CVB, son infrecuentes, según datos de series retrospectivas: la MSI 5% en VB, 5% -13% de CCEH y hasta 10% de CCIH.<sup>248</sup>

En 2017, Le et al.<sup>249</sup> publicaron un estudio con 86 pacientes de diferentes histologías con MMR que fueron sensibles al bloqueo del punto de control inmune con anticuerpos anti-PD-1. Las respuestas objetivas se observaron en el 53% de los casos y respuestas completas en el 21%. En el CC, se obtuvo una TR del 25%. Estas respuestas fueron duraderas, pero no se alcanzó SPL ni SG, y el estudio todavía está en marcha.<sup>249,250</sup>

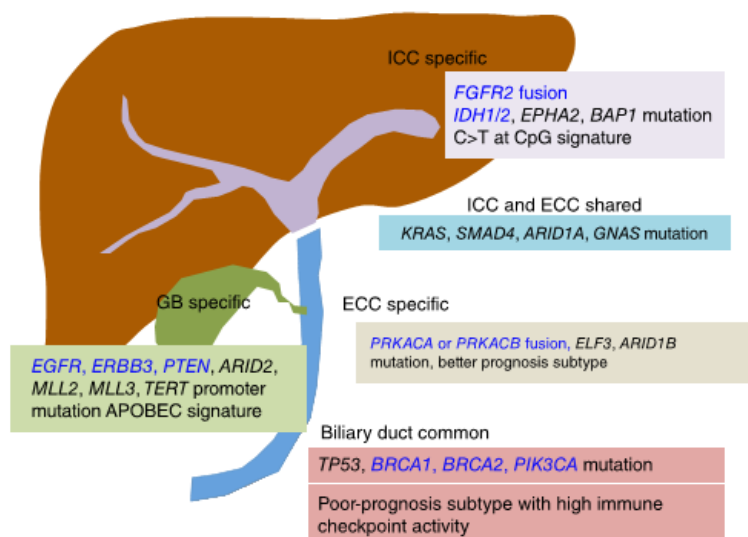
En la actualidad, múltiples ensayos fase I y II están evaluando el impacto de la terapia combinada de inhibidores de punto de control en CVB avanzado y pueden ayudar a maximizar las estrategias de tratamiento futuras. Estos incluyen combinaciones como ipilimumab (inhibición de CTLA4) y nivolumab (inhibición de PD1) (NCT02834013, NCT02923934 y NCT03101566) o durvalumab (inhibición de PDL1) y tremelimumab (inhibición de CTLA4) (NCT02821754).

### **Capítulo 3. Justificación de la tesis**

El cáncer de vías biliares constituye un problema de salud de gran relevancia clínica, no tan solo por su elevada mortalidad, sino también por la perspectiva de convertirse en la tercera causa de muerte por cáncer en la próxima década.<sup>5</sup> El mal pronóstico de este tumor está condicionado por la dificultad de establecer un diagnóstico precoz y la falta de programas de cribado de base poblacional, de modo que en un 80% de los pacientes se diagnostican en estadios avanzados. Además, en el momento actual no se dispone de un tratamiento sistémico claramente efectivo más allá de la primera línea de tratamiento.<sup>90</sup> La falta de tratamiento efectivo condiciona que la tasa de SG a los 5 años sea inferior al 10%.<sup>2,3</sup>

En función de la localización anatómica el CVB se dividen en tres tumores: CCIH, CCEH (que incluye el CCH) y VB.<sup>3</sup> Anatómicamente estos tumores están relacionados entre sí y presentan patrones metastásicos parecidos, pero cada uno de ellos se caracteriza por manifestaciones clínicas y biología molecular propia.<sup>149</sup>

Los resultados de las investigaciones en el campo de la biología molecular del CVB han permitido profundizar en el conocimiento de estos tumores, especialmente a partir de la aplicación de plataformas genómicas.<sup>96,97</sup> Gracias a estos avances se conoce que la patogénesis de estos tumores es compleja y variada, en la que están implicadas diferentes vías de señalización (figura 16), tales como RAS-RAF-MEK, PI3K-AKT-mTOR, WNT/b-catenina<sup>199</sup>, Hedgehog, HGF-c-MET<sup>136</sup>, entre otras, así como diversas alteraciones moleculares en función de la localización anatómica<sup>111</sup>, alguna de ellas potenciales dianas terapéuticas, por ejemplo mutaciones en *BRAF*<sup>124,131</sup>, *IDH1/2*<sup>98</sup>, o translocaciones en *FGFR*<sup>146</sup> en CCIH; *PI3K*, *MET*, *BRAC1/2* en CCEH; EGFR y amplificaciones de *HER2*<sup>125</sup> en VB.<sup>168</sup> Los CCIH, CCEH, CCH, VB comparten alteraciones genéticas en la regulación del ciclo celular (*CDKN2B*) y la remodelación de la cromatina (*ARID1A*).<sup>107</sup>



**Figura 16.** El análisis genómico de CVB muestra alteraciones específicas en cada localización tumoral. Existen alteraciones comunes en CCIH y CCEH. En azul se muestran los genes considerados potenciales dianas terapéuticas.<sup>149</sup>

En la actualidad el tratamiento estándar de primera línea en los CVB es la combinación de cisplatino con gemcitabina. Los resultados del estudio pivotal fase III en pacientes con CVB demostraban que la combinación de cisplatino y gemcitabina permitía alcanzar una mayor supervivencia en comparación con gemcitabina en monoterapia (11,7 *versus* 8,1 meses) (HR 0,64, IC del 95% 0,52-0,80;  $P < 0,001$ ).<sup>90</sup> Desgraciadamente, más allá del estudio de primera línea, ningún tratamiento ha demostrado su eficacia para el tratamiento de los CVB.

La terapia dirigida en CVB tiene como objetivo mejorar la eficacia terapéutica, especialmente en los pacientes refractarios a quimioterapia convencional en primera línea. La terapia dirigida usa fármacos diferentes a los de la quimioterapia tradicional. Este tipo de tratamiento actúa dirigiéndose a genes o proteínas específicas, que se encuentran en células cancerosas o en células relacionadas con el crecimiento del cáncer, para ayudar a detener el crecimiento y la propagación de la enfermedad. El mayor conocimiento de la biología molecular del CVB ha permitido diseñar estudios contra potenciales dianas terapéuticas (DT) descritas en los CVB.

Sin embargo, continúa existiendo la necesidad de identificar potenciales biomarcadores predictivos de respuesta con el objetivo de poder individualizar el tratamiento del CVB a fin de mejorar los resultados terapéuticos. Algunos estudios actuales que están ensayando nuevos fármacos en CVB, están ya dirigidos a un subtipo

determinado de pacientes que presentan unos rasgos específicos de biología molecular, lo que los puede hacer más susceptibles para obtener un mayor beneficio terapéutico.

En esta tesis doctoral presentamos los resultados de un estudio de investigación cuyo objetivo ha sido contribuir al conocimiento de la biología molecular del CVB. Para ello se han analizado muestras de pacientes con CVB que han sido considerados potenciales candidatos para participar en un estudio clínico en la Unidad de Investigación de Terapia Molecular del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. Esta unidad centra su actividad en el desarrollo clínico precoz de fármacos. A la población seleccionada se le realizó un estudio molecular según la técnica vigente en el centro en cada momento. Una de las dificultades para la realización del estudio molecular fue disponer de una muestra con la cantidad suficiente de células tumorales que se necesitan para el análisis genómico. Como complemento, también se analizó de forma retrospectiva el beneficio que obtenían los pacientes tras la participación en un estudio clínico (dirigido o no a una diana terapéutica) tras el fallo al tratamiento estándar.

## **Capítulo 4. Hipótesis y objetivos**

## 4.1 Hipótesis primaria y secundaria

### ➤ **Primaria**

La identificación de nuevas dianas terapéuticas mediante la caracterización molecular permite estrategias terapéuticas dirigidas en cáncer de vía biliar.

### ➤ **Secundaria**

Las diferentes localizaciones anatómicas en cáncer de vía biliar (CCIH, CCEH, VB) muestran alteraciones moleculares específicas.

## 4.2 Objetivos primarios y secundarios

### ➤ **Primario**

Determinar la frecuencia de las diferentes alteraciones moleculares y describir los genes *drivers* para identificar potenciales biomarcadores predictivos de respuesta a dianas terapéuticas en una cohorte de pacientes con cáncer de vía biliar.

### ➤ **Secundarios**

- 1- Determinar la frecuencia de las alteraciones moleculares según la localización tumoral (CCIH, CCEH, VB).
- 2- Determinar la frecuencia de las alteraciones moleculares según la plataforma genómica utilizada.
- 3- Evaluar la respuesta antitumoral y la supervivencia global desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento al participar en un ensayo clínico tras la realización de un estudio molecular, en los pacientes con cáncer de vía biliar que han fracasado al tratamiento estándar.



## **Capítulo 5. Métodos**

## **5.1 Diseño y emplazamiento**

Se trata de un estudio retrospectivo y descriptivo, en el que se han incluido 154 pacientes con un CVB metastásico, los cuales fueron evaluados como candidatos a la realización de un estudio de biología molecular en el tejido tumoral disponible, con posterior inclusión en ensayos clínicos llevados a cabo en la Unidad de Investigación de Terapia Molecular o en la Unidad de Tumores Digestivos del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

El Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitari Vall d'Hebron dispone de la Unidad de Investigación de Terapias Moleculares para el Cáncer, que cuenta con un programa de cribaje molecular donde se realiza un análisis molecular del tumor del paciente para determinar los posibles escenarios de dependencia oncogénica para tratar de asociar cada una de las alteraciones del tumor a un fármaco DT.

En la Unidad están perfectamente integrados diferentes especialistas, incluyendo oncólogos médicos y especialistas en patología, genómica y biología molecular. Los oncólogos médicos poseen el conocimiento de la biología molecular de cada tumor y de cada paciente que va a ser tratado en estos estudios clínicos, así como de las propiedades de los fármacos utilizados en los ensayos clínicos y sus toxicidades. Por su parte, los especialistas en patología, genómica y biología molecular efectúan la caracterización de los tumores de los pacientes, de forma individualizada en función de las propiedades de cada tumor.

La búsqueda individualizada de una opción terapéutica específica ajustada a cada paciente es hoy en día prioritaria. La característica más relevante del proyecto es su alta aplicabilidad clínica, ya que podrían obtenerse nuevas terapias en base a alteraciones moleculares descritas en CVB.

## **5.2 Selección de la muestra**

Para la selección de la muestra se ha utilizado una base de datos generada por el equipo Oncology Data Science Group (ODysSey) del Hospital liderado por el Dr. Rodrigo Dienstmann; con los resultados procedentes del programa de cribado molecular del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. Se han seleccionado 154 pacientes con un CVB a los que se les ha realizado un estudio molecular en el periodo de tiempo de enero del 2011 a diciembre del 2016. Con un seguimiento del estado de los pacientes hasta diciembre 2017.

Los pacientes seleccionados dieron su consentimiento por escrito para autorizar el análisis molecular. El protocolo del cribaje molecular fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron, en la sesión ordinaria número 190, en fecha del 29 de julio de 2011.

### **5.3 Análisis molecular aplicado a la muestra**

Se han analizado muestras tisulares incluidas parafina procedentes indistintamente del tumor primario o de las metástasis, según disponibilidad.

De enero de 2011 a junio de 2014 las muestras fueron analizadas mediante espectrometría de masas (MassARRAY Sequenom<sup>®</sup>) (apéndice, tabla 1). De junio de 2014 hasta el momento presente la técnica utilizada ha sido un panel de *Next Generation Sequencing (NGS)* con Amplicon-MiSeq, mediante Illumina MySeq<sup>®</sup> (apéndice, tabla 2).

El análisis molecular que se ha llevado a cabo mediante Sequenom MassARRAY<sup>®</sup>, ha sido utilizando la OncoCarta versión 1.0, y mediante Amplicon-MiSeq, una plataforma de NGS, usando una OncoCarta realizada por el Instituto de Oncología Vall d'Hebron (VHIO), la VHIO-Card versión 1.0. Con ambos métodos se pueden analizar mutaciones *hotspots* bien establecidas en múltiples genes.

La OncoCarta versión 1.0 analiza 238 mutaciones en 19 genes. Además, junto con dicha OncoCarta se ha utilizado un panel propio generado en nuestro centro que ha permitido ampliar la detección a 288 mutaciones localizadas en 24 oncogenes, con una sensibilidad del 10% al 15%. En cambio, la VHIO-Card versión 1.0 es capaz de analizar un mayor número de mutaciones, hasta más de 50.000 posiciones en el genoma en 59 oncogenes y supresores tumorales, con una sensibilidad del 1% al 3%.

El análisis de translocaciones/fusiones de los genes se realizó con Nanostring (nCounter<sup>®</sup>) versión 3 hasta marzo 2016, y con la versión 4 a partir de esta fecha (apéndice, tablas 3 y 4). Esta técnica permite el análisis simultáneo digital de hasta 800 ARNm de forma simultánea y con una alta sensibilidad.

De junio de 2015 a diciembre del 2016 se analizaron las muestras mediante FoundationONE (apéndice, tabla 5) en los CC. Dicho análisis formaba parte del cribaje molecular del estudio NCT02160041.

La plataforma de FoundationONE, esta validada para analizar 300 genes relacionados con cáncer, incluidos 25 intrones, con una especificidad y sensibilidad entre del 90% al 99% en ambos casos.

**HER2:** se analizó con expresión proteica mediante inmunohistoquímica utilizando el kit Herceptest de (DAKO#K5207) y para análisis de amplificaciones de HER2 (DAKO #5331) con técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia.

**PTEN:** se analizó con expresión proteica mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo acreditado (clon 138G6). Una muestra se consideraba con pérdida de PTEN si el H-score era menor de 50.

**cMET:** se analizó mediante un ensayo inmunohistoquímico con peroxidasa para la determinación de la expresión de la proteína c-MET en tejido fijado en formol e incluido en parafina. Se utiliza el anticuerpo monoclonal (rabbit) c-MET (D1C2) de Cellsignaling (cat#8198).

La valoración microscópica de la tinción se realizaba utilizando una escala de expresión semicuantitativa, denominada Histo-score (H-score, de 0 a 300), que considera el porcentaje de células con expresión y la intensidad de ésta. En este proyecto se consideró amplificación de c-MET si H-score era mayor de 200.

Las dianas terapéuticas más relevantes y la TD correspondiente se resumen en la tabla 10.

**Tabla 10.** Dianas terapéuticas más relevantes descritas en el proyecto y su terapia dirigida

<b>Diana terapéutica</b>	<b>Terapia dirigida (TD)</b>
<i>IDH1/2</i> mutado	Inhibidor IDH
<i>HER2</i> amplificado	Inhibidor HER2
<i>FGFR</i> fusión/mutación/amplificación	Inhibidor FGFR
<i>PIK3CA</i> mutado	Inhibidor PI3K
<i>AKT</i> mutado	Inhibidor PI3K
<i>PTEN</i> null expresión	Inhibidor PI3K
<i>KRAS</i> mutado	Inhibidor MEK
<i>NRAS</i> mutado	Inhibidor MEK
<i>BRAF</i> mutado	Inh. BRAF o Inh. MEK
<i>NOTCH4</i> mutado	Inhibidor NOTCH
<i>MET</i> amplificado	Inhibidor MET
Genes de reparación de ADN mutados ( <i>BRAC2</i> , <i>ATM</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> )	Inhibidor PARP

## 5.4 Variables clínico-patológicas

Para cada paciente se han recogido las siguientes variables: género, edad en el momento del diagnóstico, el estadiaje al diagnóstico de la enfermedad según clasificación TNM, la fecha del diagnóstico de la enfermedad metastásica, localización de las metástasis, terapia oncológica aplicada (número de líneas de tratamiento), inclusión en un ensayo clínico (sí/no), tipo de tratamiento recibido en ensayo, respuesta obtenida, tiempo de permanencia en el ensayo, motivo de retirada del ensayo, supervivencia desde el diagnóstico de las metástasis, supervivencia desde la inclusión en un ensayo clínico, supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento, y fecha de la defunción en caso de que el paciente haya fallecido o fecha del último seguimiento.

## 5.5 Definiciones y conceptos relevantes

Las principales definiciones aceptadas han sido las siguientes:

- Supervivencia global (SG): tiempo desde el diagnóstico del tumor hasta la fecha del fallecimiento del paciente o del último seguimiento.
- Supervivencia del periodo metastásico: periodo desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta la fecha del fallecimiento del paciente o del último seguimiento.
- Supervivencia libre de progresión (SLP) a la primera línea de tratamiento: periodo desde inicio del tratamiento de primera línea hasta la progresión tumoral a la primera línea.
- Supervivencia desde la fecha de progresión a primera línea de tratamiento (SP1°T): periodo desde la progresión a primera línea de tratamiento hasta la fecha del fallecimiento del paciente o del último seguimiento. Esta variable permite definir mejor el beneficio de la participación en un ensayo clínico, dado que se excluye el tiempo de supervivencia correspondiente a la primera línea de tratamiento, con eficacia demostrada e impacto en supervivencia.
- SLP del ensayo clínico: periodo de permanencia en el ensayo, desde el inicio hasta la discontinuación del tratamiento, independientemente de cuál haya sido el motivo (toxicidad o progresión tumoral).
- Los datos de supervivencia se censuran en la fecha del último seguimiento.

Algunos conceptos relevantes utilizados durante el proyecto son los siguientes:

- Oncogén *driver*: al adquirir una mutación activadora, un protooncogén se convierte en un agente inductor de tumores, un oncogén. Este gen dará una ventaja selectiva a la supervivencia de células tumorales. Los ejemplos de oncogenes *driver* en CVB incluyen *IDH*, *PIK3CA*, *KRAS*, *NRAS* y *AKT* (figura 16)
- Alteraciones genómicas clínicamente relevantes (AGCR): son alteraciones genéticas (mutaciones, amplificaciones, translocaciones etc.), potenciales DT capaces de ser bloqueadas con TM.
- Diana terapéutica (DT): es una sustancia localizada en cualquier parte de la célula como la membrana celular, el citoplasma o el núcleo, capaz de ser reconocida por un fármaco y producir una respuesta celular. Los receptores farmacológicos formarían parte de las dianas terapéuticas. La mayoría de las dianas moleculares son lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.
- Terapia dirigida (terapia *matched*) (TM): son terapias dirigidas contra el cáncer como fármacos, u otras sustancias, diferentes de la quimioterapia tradicional que bloquean el crecimiento y la diseminación del cáncer al interferir en moléculas específicas como DT. Con ello detienen el crecimiento tumoral y favorecen la muerte de las células malignas. Las terapias contra el cáncer también se pueden llamar “terapias dirigidas molecularmente” o “medicina de precisión”. Su mecanismo de acción consiste en la unión del fármaco dirigido a oncogén *driver*, bloqueando así el crecimiento celular.
- Beneficio clínico: es el beneficio obtenido tras participar en ensayo clínico al observar tasas de respuesta o estabilidad de la enfermedad al menos 4 meses, con mejoría de los síntomas del paciente.

## 5.6 Análisis estadístico

Los datos han sido analizados por el equipo ODysSey de nuestro centro (Dr. Rodrigo Dienstmann), efectuándole el análisis de correlación clínico-patológica-molecular con la descripción de la población y los modelos predictivos multivariados. Se ha utilizado el programa estadístico R (versión 3.5.1), para las comparaciones entre variables clínico-patológicas y moleculares, con un test de ji al cuadrado o la prueba exacta de Fisher para la comparación de las variables categóricas. Para el análisis de supervivencia se

utilizó el estimador Kaplan-Meier con su representación gráfica mediante curvas de supervivencia (package “survival”). Las curvas de supervivencia se compararon con el log-rank test. Se ha aceptado un nivel de significación estadística de  $P < 0,05$ .

## **Capítulo 6. Resultados**



## 6.1 Características de la población

La población de estudio estaba formada por 154 pacientes con CVB avanzado, en los que se realizó un estudio molecular con las plataformas genómicas descritas y atendidos en nuestro centro desde enero de 2011 a diciembre de 2016. De los 154 pacientes, 64 eran varones y 90 mujeres, con una edad media de 59 años (rango 27-83 años). La distribución por tipo de CVB era CCIH en 101 pacientes (65,6%), CCEH en 28 (18,2%) y VB en 25 (16,2%).

Un total de 99 pacientes (64,3%) fueron diagnosticados en estadio IV. La localización de las metástasis en el momento del diagnóstico del estadio IV fueron: hígado (n = 115), ganglionar (n = 38), pulmón (n = 23) y otras localizaciones (hueso, pleura o peritoneo, n = 40). El número de líneas de tratamiento recibido previo al análisis molecular fue de 1 en 94 pacientes y más de 1 en 52. Se analizaron las muestras mediante Sequenom en 22 pacientes, mediante Amplicon-MiSeq en 56, mediante Nanostring 59 y mediante FoundationONE en 44. Los datos generales de los pacientes se resumen en la tabla 11.

**Tabla 11.** Características de los pacientes afectados de un CBV en los que se les analizó la muestra tumoral

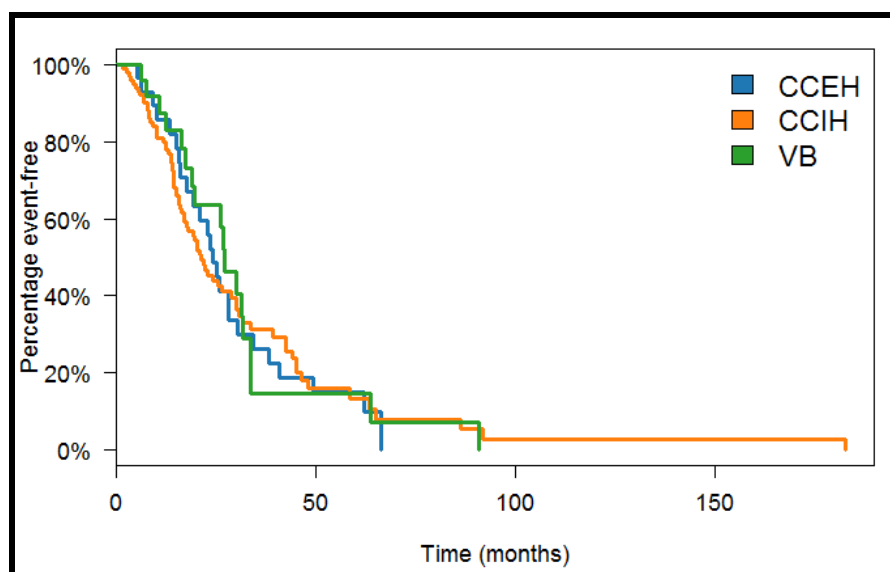
Variables		Número de pacientes
<b>Género</b>	Varón	64
	Mujer	90
<b>Edad, años, media (rango)</b>		59 (27-83)
<b>Estadio al diagnóstico</b>	I	0
	II	6
	III	49
	IV	99
<b>Cáncer vías biliares</b>	CCIH	101
	CCEH	28
	VB	25
<b>Cirugía del tumor primario</b>	Sí/No	62/92
<b>Tratamiento adyuvante</b>	Sí/No	30/124
<b>Localización metastásica</b>	Hígado	115
	Pulmón	23
	Ganglios	38
	Otrsa (pleura, peritoneo etc.)	40
<b>Número de tratamientos previos al análisis molecular</b>	0	8
	1	94
	>1	52

<b>Esquemas de tratamiento metastásico</b>	Cisplatino /gemcitabina	98
	Gemcitabina/oxaliplatino	22
	Gemcitabina	15
	Capecitabina	8
	Otros	6
<b>Ensayo clínico</b>	Sí/No	39/115
<b>Ensayo clínico diana terapéutica</b>	Sí/No	20/19
<b>Técnicas de secuenciación</b>	Mass ARRAY	22
	Sequenom	56
	Amplicon-Miseq	44
	Foundation One	59
	Fusion Nanostring	
<b>Proteómica</b>	MET	30
	PTEN	26
	HER2	11

## 6.2 Supervivencia global

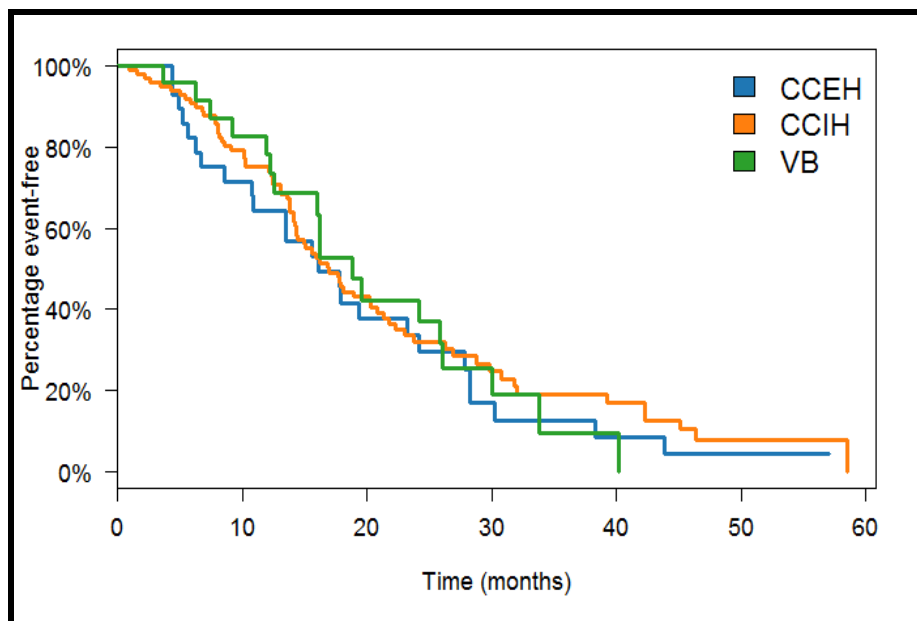
La mediana de SG fue de 23,4 meses (IC del 95% 19,6-28,2). La SG en función de la localización anatómica fue la siguiente: 21,3 meses (IC del 95% 16,9-30) en el grupo de 101 pacientes con CCIH, 24,2 meses (IC del 95% 19,4-34,3) en el grupo de 28 pacientes con CCEH y 27,1 meses (IC del 95% 19,6-33,8) en el grupo de 25 pacientes con cáncer VB (figura 17). La diferencia en SG en función de la localización anatómica no fue estadísticamente significativa (log-rank,  $P = 0,9$ ).

**Figura 17.** Supervivencia global según la localización anatómica (CCIH, CCEH, VB)



La supervivencia del periodo metastásico por localización anatómica fue de 16,9 meses (IC del 95% 14,3-21,3) en el grupo de 101 pacientes con CCIH, 16,1 meses (IC del 95% 10,9-27,8) en el grupo de 28 pacientes con CCEH y 18,8 meses (IC del 95% 19,6-33,8) en el grupo de 25 pacientes con tumores de VB. Las diferencias en la supervivencia durante este periodo tampoco fueron estadísticamente significativas (log-rank,  $P = 0,7$ ) (figura 18).

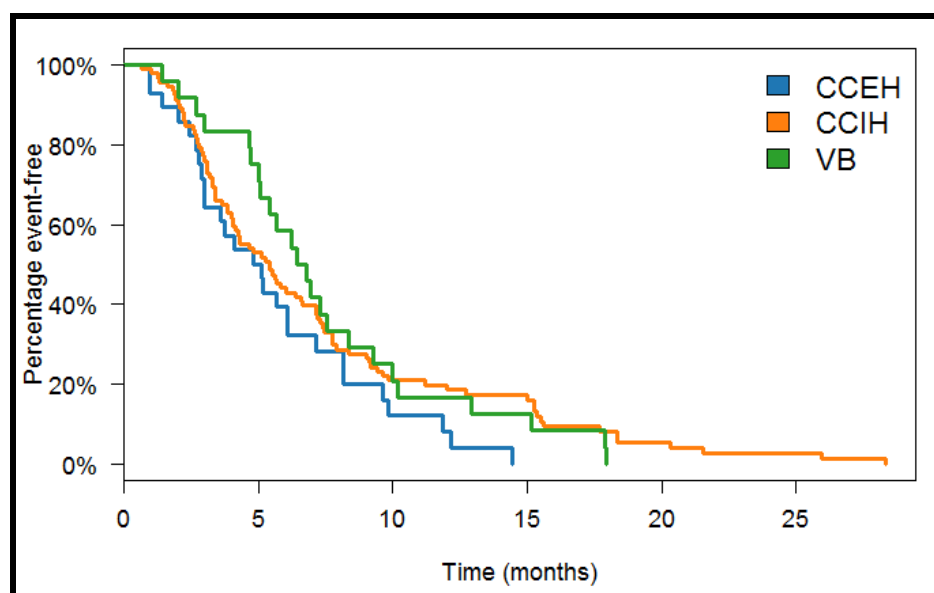
**Figura 18.** Supervivencia del periodo metastásico según la localización anatómica (CCIH, CCEH, VB)



### 6.3 Supervivencia libre de progresión a la primera línea de tratamiento

La SLP a la primera línea de quimioterapia fue de 5,4 meses (IC del 95% 4,7-6,6). La SLP por localización anatómica fue de 5,4 meses (IC del 95% 4,1-7,1) en el grupo de 101 pacientes con CCIH, 4,9 meses (IC del 95% 3-8,2) en el grupo de 28 pacientes con CCEH y 6,6 meses (IC del 95% 5,4-9,3) en el grupo de 25 pacientes con tumores de VB. Las diferencias en SLP según la localización tumoral no fueron estadísticamente significativas (log-rank,  $P = 0,2$ ) (figura 19).

**Figura 19.** Supervivencia libre de progresión según la localización tumoral (CCIH, CCEH, VB)



#### 6.4 Alteraciones moleculares en CCIH, CCEH, VB

Las muestras tumorales fueron analizadas mediante Sequenom en 22 pacientes, Amplicon-MiSeq en 56 pacientes, mediante Nanostring en 59 pacientes, y mediante FoundationONE en 44 pacientes. En relación con el análisis proteómico, se analizó MET en 30 pacientes, PTEN en 26 pacientes y HER2 en 11 pacientes. Algunas de las muestras tumorales fueron analizadas con más de una técnica.

Las diferentes alteraciones moleculares, potenciales DT, detectadas en las muestras de CCIH, CCEH y VB se presentan en la tabla 12.

En las muestras correspondientes a CCIH, la alteración molecular más frecuentemente observada fue la mutación de *IDH1/2* (22 de 101 pacientes, 21,8%), con una diferencia relevante respecto a las otras localizaciones anatómica CCEH (3,5%) y VB (4%), siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0,014$ ). Las isoformas más frecuentes de mutación de *IDH1* (por orden de frecuencia) fueron R132C, R132L, R132G, R132H, y de la mutación de *IDH2* eran R172W, R172K. También se detectaron otras alteraciones relevantes, incluyendo alteración de *FGFR* en 6 pacientes (5,9%), tres de las cuales fueron fusiones en *FGFR2* (una *BICCI* y dos desconocidas), una mutación en *FGFR2*, una fusión en *FGFR3* (*FGFR3-E17\_TACC3-E10*) y una amplificación en

*FGFR3*. Cuatro pacientes presentaron mutación en *ARID1A* (3,9%), 5 pacientes presentaron mutación de *NRAS* (5,9%), 7 pacientes tenían *KRAS* mutado (6,9%), 3 pacientes (2,9%) *PIK3CA* mutado isoformas *E545K*, *N345K*, *E109L*, 2 pacientes (1,9%) presentaban *BRAF* mutado no V600, 3 pacientes (2,9%) *MET* amplificado, 3 pacientes tenían mutaciones en *RNF43* (2,9%), 1 con *MDM2* amplificado, 1 con *NOTCH4* mutado y 1 con *AKT* mutado. Respecto a las mutaciones en genes de la reparación de ADN se observaron 3 pacientes portadores de mutaciones en *BRCA2*, 3 con *ATM* mutado y 1 con mutación en *MSH6*.

En las muestras de CCEH, las alteraciones moleculares más frecuentes fueron *KRAS* mutado en 4 pacientes (14,3%), *PTEN* null en 3 pacientes (10,7%), *PIK3CA* mutado isoformas *K111E*, *E542K* en 2 pacientes (7,1%), *ARID1A* mutado en 2 pacientes (7,1%), *BRAF* mutado no V600 en 2 pacientes (7,1%), *HER2* mutado en 2 pacientes (7,1%), 3 pacientes presentaron *PTEN* null (10,7%), *FGFR3* amplificado en 1 paciente (3,5%) y *MDM2* amplificado en 1 paciente (3,5%). Respecto a las mutaciones en genes de la reparación de ADN se observó 1 paciente portador de una mutación en *BRCA2* y 1 paciente con una mutación en *MSH2*.

En las muestras de VB, la alteración molecular más frecuente era la amplificación de *HER2* en 4 pacientes (16%), con una diferencia estadísticamente significativamente respecto las otras localizaciones ( $P = 0,007$ ). Otras alteraciones relevantes encontradas fueron *PIK3CA* mutado isoformas *E545K*, *E542K*, *H1047L* en 3 pacientes (12%), *KRAS* mutado en 3 pacientes (12%), *PTEN* null en 1 paciente (4%), y *NRAS* mutado en 1 paciente (4%).

Las fusiones de *FGFR2*, mutaciones en *AKT*, *NOTCH4*, y *RNF43* y amplificación de *MET* solo se observaron en CCIH.

Las mutaciones en *IDH1/2*, *PIK3CA*, *KRAS* y en los genes de reparación del DNA, las amplificaciones de *HER2* y la detección de *PTEN* null, estuvieron presentes tanto en CCIH, CCEH, como en VB (tabla 12).

**Tabla 12.** Descripción de las alteraciones moleculares potenciales dianas terapéuticas en función de la localización anatómica del tumor.

Alteración molecular	CCIH n (%)	CCHE n (%)	VB n (%)	Valor de <i>P</i>
<b>Total pacientes</b>	101	28	25	
<i>IDH1</i> o <i>IDH2</i> mutado	22 (21,8)	1 (3,5)	1 (4)	0,014
<i>ARID1A</i> mutado	4 (3,9)	2 (7,14)	0	0,580
<i>HER2</i> ampl or high expr	1 (1)	1 (3,5)	4 (16)	0,007
<i>HER2</i> mutado	1 (1)	2 (7,1)	0	0,15
<i>FGFR</i> alterado	6 (5,9)	1 (3,6)	0	0,83
<i>FGFR2</i> fusión	3 (2,9)	0	0	1
<i>FGFR2</i> mutado	1 (1)	0	0	1
<i>FGFR3</i> fusión	1 (1)	0	0	1
<i>FGFR3</i> amplificado	1 (1)	1 (3,5)	0	0,37
<i>PIK3CA</i> mutado	3 (2,9)	2 (7,1)	3 (12)	0,08
<i>AKT</i> mutado	1 (1)	0	0	1
<i>PTEN</i> null expresión	2 (2,0)	3 (10,71)	1 (4)	0,58
<i>PTEN</i> mutado	1 (1)	1 (3,6)	1 (4)	0,2
<i>KRAS</i> mutado	7 (6,9)	4 (14,3)	3 (12)	0,32
<i>NRAS</i> mutado	5 (4,9)	0	1 (4)	0,69
<i>BRAF</i> mutado	2 (2,0)	2 (7,1)	0	0,23
<i>NOTCH4</i> mutado	1 (1)	0	0	1
<i>MET</i> amplificado	3 (2,9)	0	0	1
<i>RNF43</i> mutado	3 (2,9)	0	0	1
<i>MDM2</i> amplificado	1 (0,9)	1 (3,5)	0	0,37
Genes de reparación de ADN mutados ( <i>BRAC2</i> , <i>ATM</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> )	7 (6,9)	2 (7,1)	1 (4)	1

El número de alteraciones moleculares por muestra respecto al tipo tumoral se detalla en la tabla 13. Cabe destacar que no se detectó ninguna alteración molecular en casi el 50% de las muestras de CCIH, CCEH y VB. Asimismo, se observaron otras alteraciones moleculares no DT, tales como mutación *TP53* en 29 muestras correspondiendo a 19 (18,8%) casos de CCIH, 5 (17,8%) de CCEH y 5 (20%) de VB.

**Tabla 13.** Número de alteraciones moleculares por muestra analizada y tipo tumoral.

Alteración molecular	CCIH n (%)	CCHE n (%)	VB n (%)
<b>Total pacientes</b>	101	28	25
Ninguna	51(50,5)	14 (50)	13 (52)
1	35 (34,7)	9 (32)	9 (36)
>2	15 (14,8)	5 (17,8)	3 (12)

En el último año se utilizó la plataforma FoundationONE, la cual es una de las plataformas disponibles más completas, ya que analiza más de 300 genes. El uso de esta plataforma permitió detectar la coexistencia de mutaciones potenciales DT en 15 pacientes (14,8%) con CCIH, en 5 pacientes (17,8%) con CCEH y en 3 pacientes (12%) con VB (tabla 14).

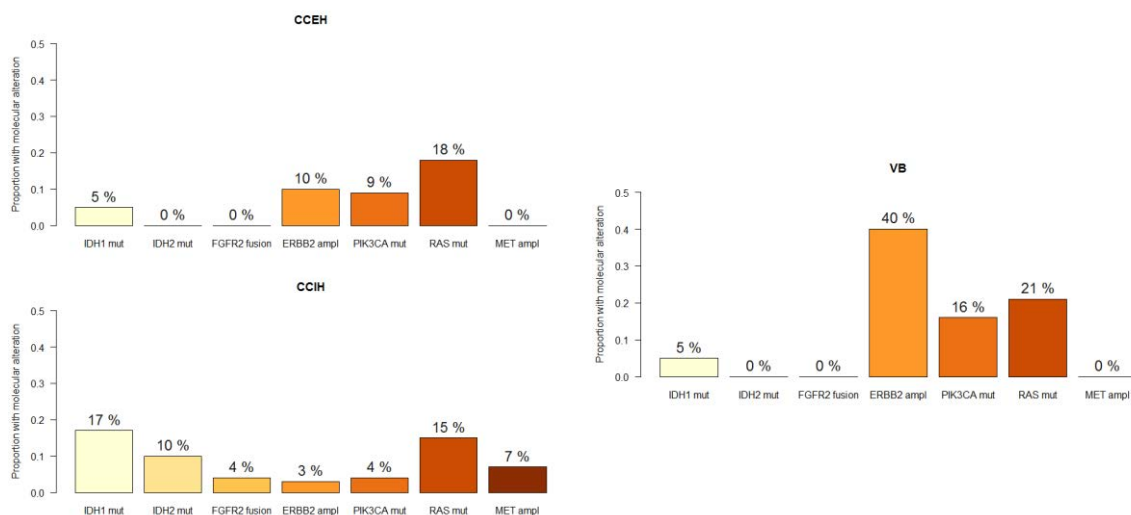
**Tabla 14:** Coexistencia de potenciales dianas terapéuticas encontradas en el análisis de las muestras de tumores de CVB.

CCIH	CCHE	VB
<i>IDH1</i> mut + <i>FGFR3</i> fus	<i>IDH1</i> mut + <i>BRAF</i> mut	<i>IDH1</i> mut + <i>NRAS</i> mut
<i>IDH1</i> mut + <i>PIK3CA</i> mut	<i>HER2</i> mut + <i>KRAS</i> mut	<i>PIK3CA</i> mut + <i>KRAS</i> mut
<i>IDH1</i> mut + <i>BRCA 2</i> mut	<i>FGFR2</i> fus + <i>DDR</i> mut	<i>HER2</i> ampl + <i>DDR</i> mut
<i>IDH1</i> mut + <i>BRCA2</i> mut	<i>BRAF</i> mut + <i>HER2</i> mut + <i>PIK3CA</i> mut	
<i>IDH1</i> mut + <i>MET</i> high	<i>HER2</i> ampl + <i>KRAS</i> mut	
<i>IDH1</i> mut + <i>FGFR2</i> mut		
<i>AKT1</i> mut + <i>NRAS</i> mut		
<i>KRAS</i> mut + <i>ATM</i> mut		
<i>KRAS</i> mut + <i>RNF43</i> mut		
<i>PIK3CA</i> mut + <i>KRAS</i> mut		
<i>BRAF</i> mut + <i>HER2</i> mut		
<i>MET</i> ampl + <i>MDM2</i> ampl + <i>ATM</i> mut		
<i>NOTCH4</i> mut + <i>NRAS</i> mut		
<i>FGFR2</i> fusion + <i>BRCA2</i> mut		
<i>NRAS</i> mut + <i>RNF43</i> mut		

Mut: mutación; Fus: fusión; Ampl: amplificación

Respecto a la prevalencia de DT (figura 20), destaca la mayor prevalencia de *IDH1* (17%) en CCIH, *RAS* mutado (18%) en CCEH y *HER2* amplificado en VB

**Figura 20.** Prevalencia de las alteraciones moleculares diana terapéutica (DT) en CCIH, CCEH, VB

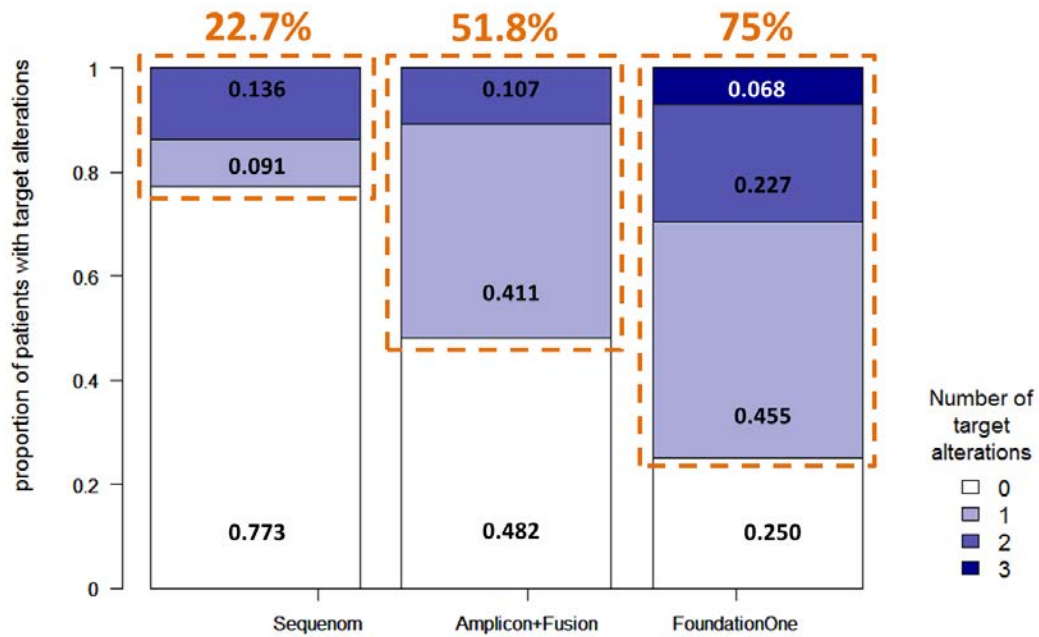


## 6.5 Impacto del uso de diferentes plataformas de secuenciación

Desde enero de 2011 a junio de 2014 las muestras fueron analizadas mediante Sequenom, de junio de 2014 a diciembre de 2016 mediante Amplicon-MiSeq y de junio de 2015 a diciembre de 2016 con FoundationONE. Los avances técnicos en el análisis genómico a través de las diferentes plataformas permitieron ampliar el número de genes rastreados, aumentando de 24 genes con Sequenom a 59 genes con Amplicon-MiSeq y hasta 300 genes con FoundationONE. Por ello, y como era de esperar, la probabilidad de detectar una alteración molecular potencial DT por muestra tumoral aumentaba en relación con el número de genes analizados. Con el empleo de Sequenom se observó al menos una AGCR en el 22,7% de las muestras, aumentando al 51,8% con Amplicon-MiSeq y al 75% con FoundationONE (figura 21). En el total de 154 pacientes, se detectó al menos una alteración molecular DT en 76 (49,3%).

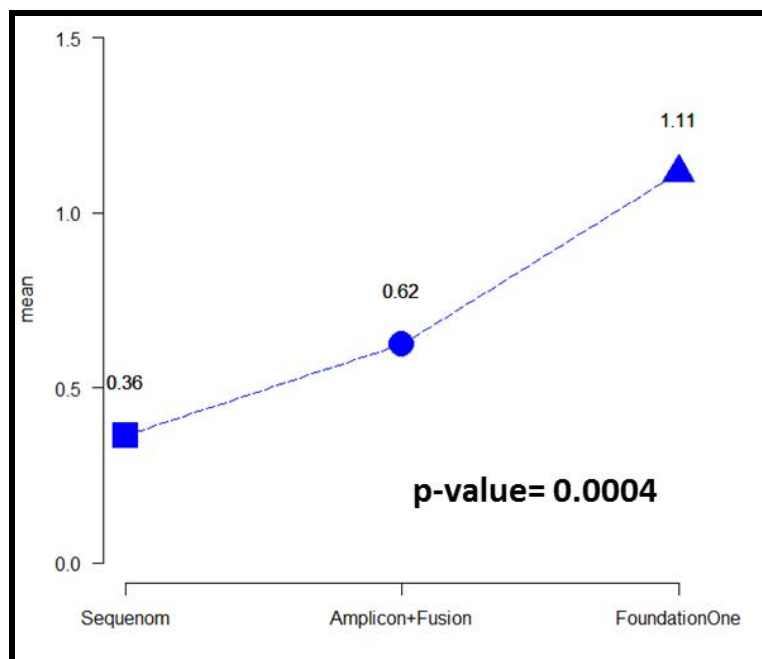


**Figura 21.** Número promedio de alteraciones moleculares clínicamente relevantes detectadas por muestra en función de la plataforma de secuenciación utilizada



La media de AGCR detectadas por cada plataforma genómica aumentó significativamente de 0,36 para Sequenom, 0,62 para Amplicon-MiSeq y 1,11 para FoundationONE 1.11 ( $P = 0,004$ ) (figura 22). En el caso de la plataforma FoundationONE, un 29,5% presentaban más de una AGCR (22,7% más de dos y 6,8% más de tres).

**Figura 22.** Media de alteraciones moleculares diana terapéutica detectadas por plataforma genómica.



## 6.6 Descripción de la población que participa en ensayos clínicos.

De los 76 pacientes con alteraciones moleculares DT, 39 pacientes (50%) fueron incluidos en ensayos clínicos. De ellos, 19 pacientes fueron tratados con TM (tabla 15 y figura 23) y 20 pacientes fueron tratados sin TM.

De los 19 pacientes que se incluyeron en estudios con terapia dirigida, se observaron ocho estabilizaciones en pacientes tratados con inhibidores de *FGFR*, *IDH*, *MEK*, *PI3K* y *NOTCH*, y una respuesta parcial en un paciente tratado con un inhibidor de *MET*. Las mejores SLP fueron observadas en 3 de los 19 pacientes: 9 meses con un inhibidor de FGFR en 1 paciente con CCIH (fusión de *FGFR2*), 8 meses en 1 paciente con un CCIH tratado con un inhibidor de *MET* (portador de una amplificación de *MET*); y 8 meses en 1 paciente con un CCEH (*PTEN* null) tratado con un inhibidor de *PI3K*.

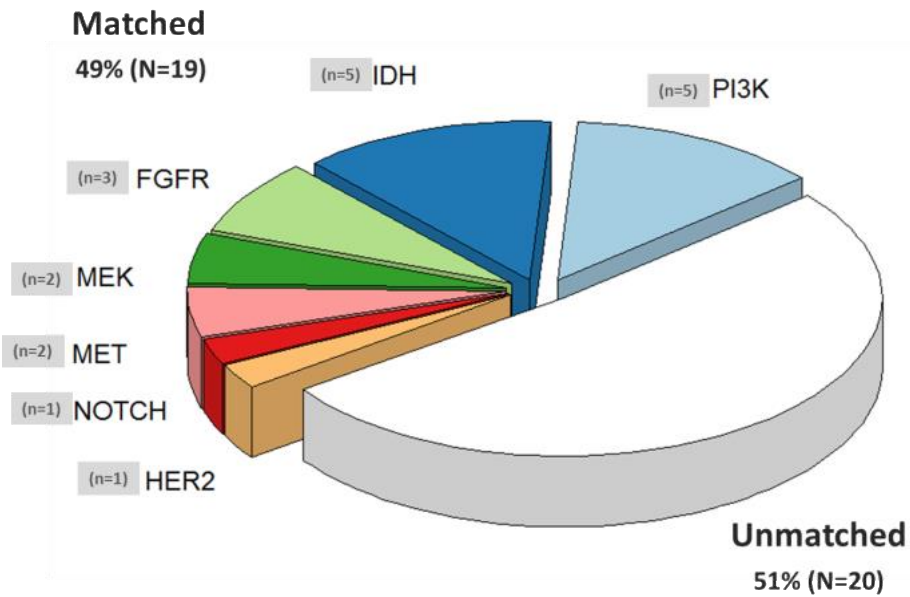
De los 20 pacientes que se incluyeron en un ensayo clínico sin TM, 3 pacientes participaron en un ensayo con fármacos de quimioterapia en escalada de dosis, 5 pacientes fueron tratados con inmunoterapia y 12 pacientes con terapia molecular sin diana terapéutica. La mejor SLP observada en este grupo fue de 5 meses en 1 paciente afecto de un CCIH tratado con un inhibidor de *NOTCH* en combinación con un inhibidor de *mTOR*. Los 19 pacientes restantes presentaron progresión radiológica en la primera evaluación tumoral, con una SLP inferior a los 3 meses.

**Tabla 15:** Pacientes que han participado en ensayo clínico con terapia dirigida.

Paciente	Tipo tumor	Alteración molecular	Ensayo clínico	SLP	Mejor respuesta
1	VB	<i>HER2 ampl</i>	NCT02912949	3 meses	PD
2	CCIH	<i>FGFR3 ampl</i>	NCT01004224	2 meses	PD
3	CCIH	<i>FGFR2 fus</i>	NCT01004224	<b>9 meses</b>	<b>SD</b>
4	CCIH	<i>FGFRmut/IDHmut</i>	NCT02608125	3 meses	<b>SD</b>
5	CCIH	<i>IDH</i>	NCT02381886	1 mes	PD
6	CCIH	<i>IDH</i>	NCT02381886	<b>5 meses</b>	<b>SD</b>
7	CCIH	<i>IDH</i>	NCT02381886	1 mes	PD
8	CCIH	<i>IDH</i>	NCT02381886	<b>4 meses</b>	<b>SD</b>
9	CCIH	<i>IDH</i>	NCT02381886	<b>5 meses</b>	<b>SD</b>
10	VB	<i>MEK (NRAS mut)</i>	NCT01449058	3 meses	<b>SD</b>
11	CCEH	<i>MEK (BRAF mut)</i>	NCT01449058	1 mes	PD
12	CCIH	<i>MET</i>	NCT01379032	3 meses	PD
13	CCIH	<i>MET</i>	NCT01391533	<b>8 meses</b>	<b>RP</b>
14	CCEH	<i>PIK3CA</i>	NCT01482156	2 meses	PD
15	CCEH	<i>PIK3CA (PTENnull)</i>	NCT01090960	<b>8 meses</b>	<b>SD</b>
16	CCIH	<i>PIK3CA</i>	NCT01449370	2 meses	PD
17	CCEH	<i>PIK3CA (PTENnull)</i>	NCT02128724	1 mes	PD
18	CCEH	<i>PIK3CA (PTENnull)</i>	NCT01285466	2 meses	PD
19	CCIH	<i>NOTCH</i>	NCT03135714	3 meses	<b>SD</b>

PD: progresión de la enfermedad; SD: enfermedad estable; RP: respuesta parcial; Mut: mutación; Fus: fusión; Ampl: amplificación.

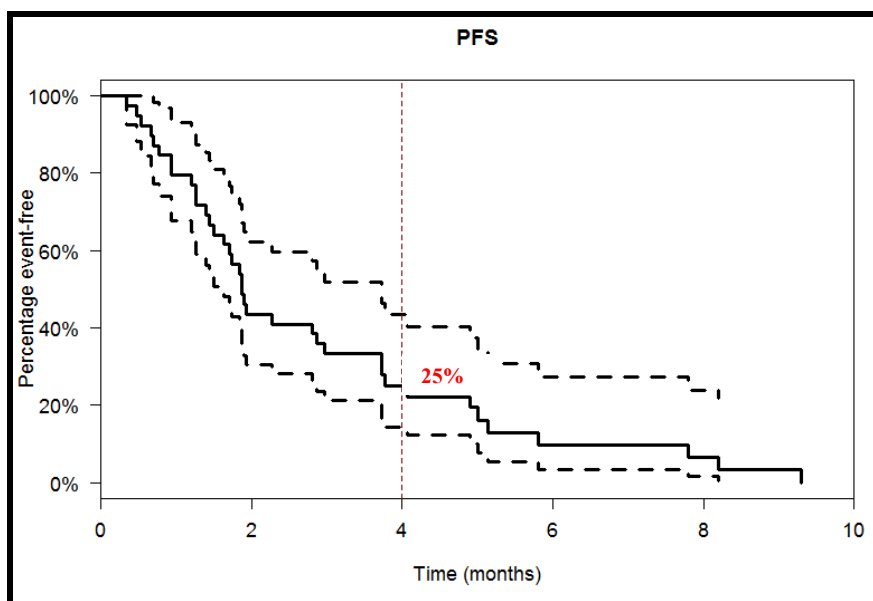
**Figura 23.** Dianas terapéuticas de los pacientes tratados con terapia dirigida



### 6.7 Supervivencia libre de progresión de los pacientes que participaron en ensayo clínico.

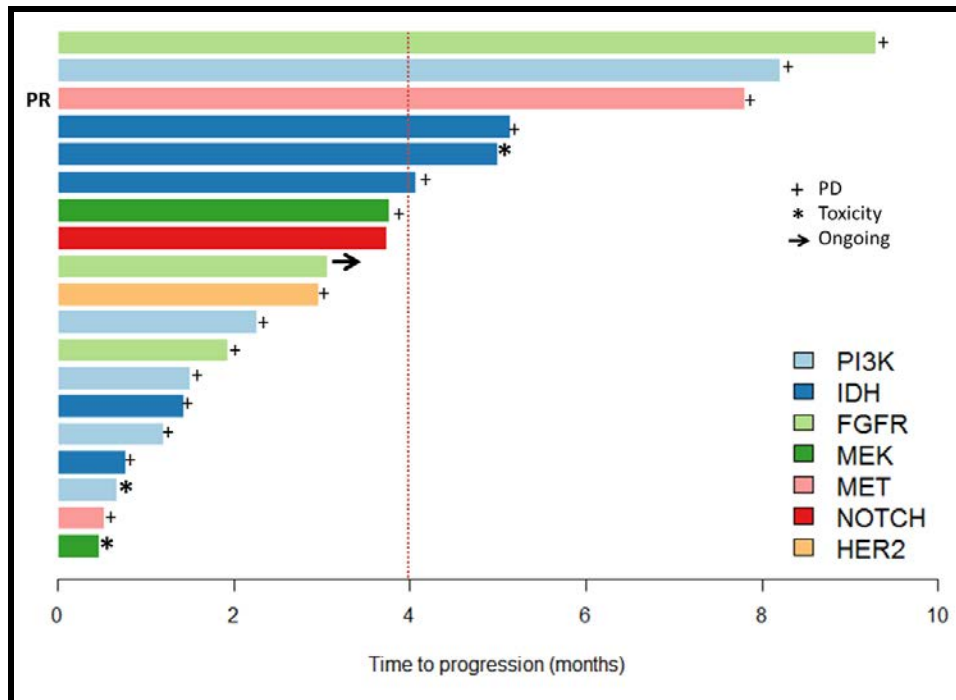
En los 39 pacientes que participaron en un ensayo clínico, con independencia de si fueron tratados con TM o no, la mediana de SLP fue de 1,9 meses (IC del 95% 1,63-3,73) (figura 24), no obstante a los 4 meses la tasa de SLP estimada fue del 25% (IC del 95% 14,4 - 43,4).

**Figura 24.** Supervivencia libre de progresión de los pacientes que participaron en un ensayo clínico



La SLP de los 19 pacientes que participaron en un ensayo clínico con TM y los motivos de discontinuación se muestran en la figura 25.

**Figura 25-** Supervivencia libre de progresión de los 19 pacientes incluidos en un ensayo clínico tratados con una terapia dirigida



En este grupo de 19 pacientes, la progresión tumoral fue causa de discontinuación del ensayo en un 73,7% de los pacientes (n = 14). Uno de los pacientes con una fusión en *FGFR2* estuvo en tratamiento en el marco del ensayo desde agosto del 2017 hasta finales del mismo año. No obstante, en la mayoría de los casos la SLP fue inferior a 4 meses, pero 6 pacientes (31,6%) presentaron SLP superiores a 4 meses, demostrando beneficio clínico: 9 meses con un inhibidor de *FGFR* en 1 paciente con CCIH (fusión de *FGFR2*), 8 meses en 1 paciente con CCIH tratado con un inhibidor de *MET* (amplificación de *MET*), 8 meses con inhibidor de *PI3K* en 1 paciente con CCEH (*PTEN* null), y 5 meses con inhibidor de *IDH* en 3 pacientes con CCIH (*IDH* mutado).

En la tabla 16 se describe la tasa de inclusión en ensayos clínicos con TM según la alteración molecular. En nuestro proyecto fue del 25%, ya que de los 76 pacientes con alteraciones moleculares que eran potenciales DT, se incluyeron 19 pacientes en EC dirigidos. Esta tasa de inclusión no solo depende de la plataforma genómica utilizada en el cribado molecular, sino también de la disponibilidad de un ensayo clínico con TM durante el periodo de tiempo correspondiente.

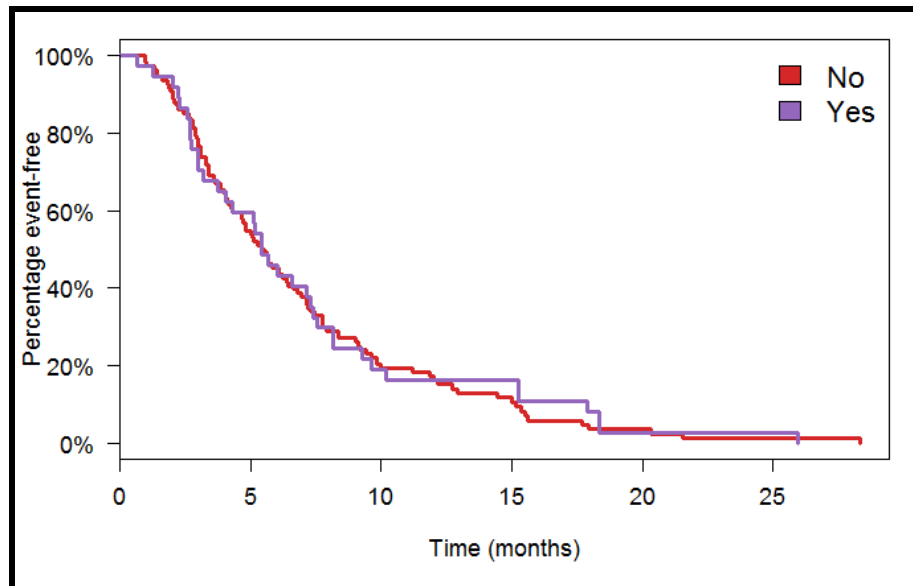
**Tabla 16:** Tasas de inclusión en ensayo clínico en relación con la alteración molecular

<b>Ensayo clínico: DT</b>	<b>Diana terapéutica</b>	<b>Nº de casos con DT</b>	<b>Pacientes incluidos en EC con TM</b>	<b>Tasas de inclusión (%)</b>
<b>MEK/RAF</b>	<i>BRAF</i> (4 mut), <i>NRAS</i> (6 mut), <i>KRAS</i> (13 mut), <i>GNAS</i> (1 mut)	24	2	8
<b>IDH</b>	<i>IDH1</i> (16mut), <i>IDH2</i> (7 mut)	23	5	22
<b>PI3K/AKT</b>	<i>PIK3CA</i> (8mut), <i>PTEN</i> (7 null, 3mut), <i>AKT</i> (1mut)	19	5	26
<b>HER2</b>	<i>HER2</i> (6 ampl, 3 mut)	9	1	11
<b>FGFR</b>	<i>FGFR</i> (3 fus, 1 mut), <i>FGFR3</i> (2 ampl, 1 fus)	7	3	43
<b>MET</b>	<i>MET</i> (3 ampl, 2 high)	5	2	40
<b>NOTCH</b>	<i>NOTCH4</i> (1mut)	1	1	100
		88 casos	19 pacientes	22
		76 pacientes	19 pacientes	25

## 6.8 Supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento

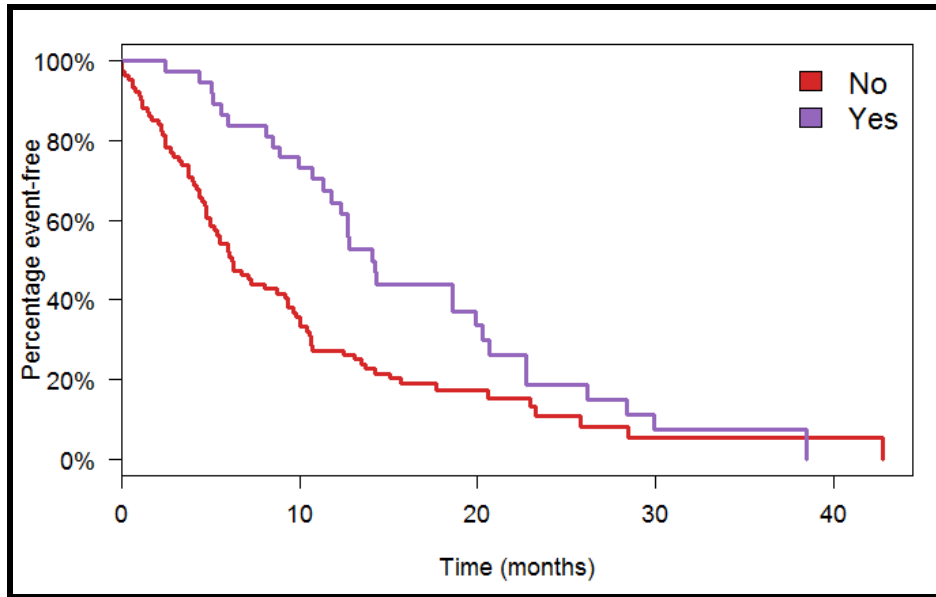
Todos los pacientes incluidos en la muestra presentaron una SLP a la primera línea de tratamiento similar, con una mediana de 5,4 meses (IC del 95% 4,07-7,57). La diferencia en la SLP entre los grupos de pacientes que habían participado en un ensayo clínico (mediana 5,5 meses) y los que no habían participado (mediana 5,4 meses) no fue estadísticamente significativa (log-rank,  $P = 0,8$ ) (figura 26).

**Figura 26.** Supervivencia libre de progresión a la primera línea de quimioterapia en función de la participación o no en un ensayo clínico (n = 145)



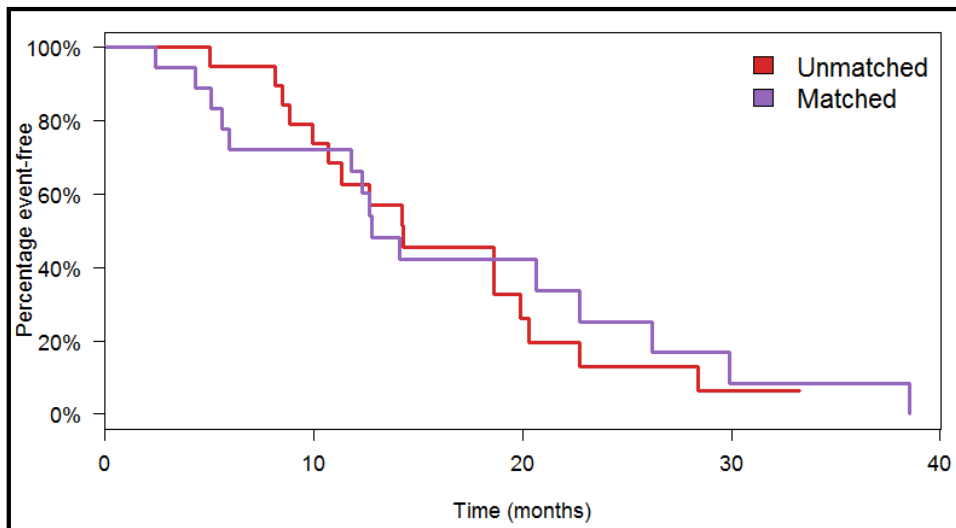
Por el contrario, la supervivencia desde el fracaso de la primera línea de tratamiento hasta la muerte o último seguimiento fue significativamente superior en el grupo de pacientes que participaron en un ensayo clínico (mediana 14,1 meses, IC del 95% 12,3-20,6) en comparación con los que no participaron en un ensayo clínico (mediana 6,2 meses, IC del 95% 4,97-9,3) (log-rank,  $P = 0,003$ ) (figura 27).

**Figura 27.** Supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de quimioterapia en función de participar en un ensayo clínico (n = 145)



Sin embargo, el hecho de participar en un ensayo clínico con o sin TM no tuvo efecto en la supervivencia (figura 28). La mediana de supervivencia fue de 12,8 meses (IC del 95% 11,8-no estimada) en el grupo que se incluyó en un ensayo clínico con TM y de 14,3 meses (IC del 95% 11,3-22,7) en el grupo tratado sin TM. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa (hazard ratio 0,88; log-rank,  $P = 0,7$ ).

**Figura 28.** Supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de quimioterapia en función de participar en un ensayo clínico con TM (matched) o sin TM (unmatched) (n = 39)





## **Capítulo 7. Discusión**

El CVB es un tumor con mal pronóstico por falta de terapias oncológicas activas. Por el momento únicamente la combinación de gemcitabina y cisplatino ha demostrado su eficacia, y sigue siendo el tratamiento de quimioterapia estándar en primera línea del CVB avanzado. No obstante, más allá de la primera línea de tratamiento no se dispone de tratamientos que hayan demostrado su eficacia en este tipo de cáncer.

El CVB presenta una biología molecular con elevada prevalencia de alteraciones moleculares oncogénicas. En los últimos años se ha realizado un esfuerzo para profundizar en el conocimiento de la biología molecular de este tumor, habiéndose identificado AGCR como potenciales DT, propias según la localización tumoral. De hecho, el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a bloquear dichas AGCR supone un potencial cambio de paradigma en el abordaje terapéutico del CVB.

Este tumor es un buen modelo para el desarrollo de nuevas DT, ya que presenta muchas AGCR potencialmente tratables. En otros tumores sólidos, como el cáncer de pulmón y de mama, hace años que ya se ha demostrado la eficacia de bloquear DT con TM. En 2007, se identificó que las translocaciones de *ALK* estaban presentes en algunos pacientes con cáncer de pulmón con una frecuencia de 1% al 7%.<sup>251,252</sup> En la actualidad, el cáncer de pulmón *ALK* positivo constituye una entidad propia y existen tratamientos con inhibidores tirosinquinasa de *ALK* aprobados para esta población. Asimismo, en cáncer de mama en el cual un 25-30% de los tumores presentan amplificación de *HER2*,<sup>253</sup> desde 1998 está aprobado trastuzumab para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama avanzado *HER2* amplificado.<sup>253</sup>

En CVB, el estudio de las mutaciones de *IDH*, de *BRAF V600* y las fusiones de *FGFR2*, más frecuentes en CCIH, han suscitado un gran interés. En la actualidad, el CCIH *IDH* mutado y el CCIH con fusión de *FGFR2* se consideran entidades propias y existen tratamientos que están testando su actividad en estudios clínicos en estos subgrupos de pacientes.<sup>185,193-195</sup>

En el año 2011 se identificó que las mutaciones de *IDH1/2* estaban presentes en algunos pacientes con CCIH. Estas mutaciones ya habían sido descritas previamente en gliomas y en la leucemia mieloide aguda.<sup>138</sup> Desde entonces diversos estudios situaban su frecuencia entre el 4,9% y el 36%.<sup>139-142</sup> En 2017, el TCGA, describió la existencia en el CCIH de un subtipo *IDH* mutado caracterizado por diferentes alteraciones moleculares, incluida la baja expresión de modificadores de cromatina, expresión elevada de genes mitocondriales y aumento del número de copias de ADN mitocondrial.<sup>103</sup> Este subtipo podría representar una entidad clínica propia, pero hacen

falta más estudios para establecer una clasificación definitiva del CCIH *IDH* mutado. En un ensayo clínico fase I se observó una respuesta parcial y 11 estabilizaciones de la enfermedad de los 20 pacientes con CCIH metastásico incluidos. En la actualidad se está evaluando el papel de los inhibidores de *IDH* en pacientes con CCIH *IDH* mutados en progresión a primera línea de tratamiento en un ensayo clínico fase III (NCT02989857).

Respecto a las fusiones de *FGFR2*, han sido descritas por diferentes grupos de investigación como una prometedora vía terapéutica en CCIH 143-145<sup>95,97</sup>, con una frecuencia entre un 11% y un 45%.<sup>143-145</sup> Los primeros datos publicados sobre la inhibición selectiva de *FGFR2* en CC fueron con el fármaco oral BGJ398 en un ensayo clínico fase II, que actualmente sigue en marcha<sup>190</sup>. Recientemente en el congreso europeo de Oncología, se presentaron los datos de 71 pacientes incluidos. Con una media de seguimiento de 8,4 meses, la TR era de 31,5% (IC del 95% 20,5-43,1), TCE de 86,9%, con una duración media de respuesta de 5,4 meses, SLP de 6,8 meses (IC del 95% 5,8-7,6) y SG de 12,5 meses (IC del 95% 9,9-16,6).<sup>191</sup>

Los avances relacionados con los inhibidores de *IDH* y *FGFR2* son esperanzadores en el logro de una mayor eficacia terapéutica basada en el tratamiento individualizado. En la era de la introducción de las terapias moleculares, la selección de los pacientes basada en sus características clínicas es insuficiente para la individualización terapéutica. Por ello, es indispensable ahondar en la investigación de las características moleculares de cada tumor, ya que dichas características condicionan el crecimiento y potencial respuesta al tratamiento dirigido.

El objetivo de este estudio ha sido describir el análisis molecular de los tumores primarios o metástasis de una cohorte consecutiva de 154 pacientes con CVB atendidos en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitari Vall d'Hebrón de Barcelona, así como evaluar el beneficio potencial de la participación de algunos de estos pacientes en ensayos clínicos. Hay que destacar que, en la práctica diaria, la dificultad de disponer de una muestra tumoral óptima para el estudio molecular es un serio inconveniente para ofrecer a los pacientes con CVB estrategias terapéuticas con terapia dirigida en ensayos clínicos.

Antes de comentar los resultados y la implicación de los mismos, hay que mencionar las limitaciones del trabajo, especialmente el diseño retrospectivo con las consiguientes dificultades para disponer de material tumoral suficiente, en cantidad y calidad, para poder efectuar un análisis molecular completo. Hay que destacar que la

base de datos de los pacientes se generó retrospectivamente en la que se incluyeron solamente los pacientes con CVB sometidos a cribaje molecular durante el periodo de estudio de enero de 2011 a diciembre de 2016. Por lo tanto, la población de estudio no es representativa del total de pacientes con CVB tratados en el Servicio de Oncología de nuestro centro durante este periodo.

Los resultados del estudio permiten aceptar la hipótesis principal, ya que se han detectado diferentes dianas terapéuticas en base a las alteraciones moleculares detectadas en el análisis de las muestras de CVB utilizando diferentes plataformas genómicas. Por otra parte, el hallazgo de alteraciones moleculares específicas en función de las diferentes localizaciones anatómicas del CVB (CCIH, CCEH, VB) confirma la hipótesis secundaria del estudio. Ello está en la misma línea que los datos publicados recientemente.

Para cumplir con el objetivo primario del trabajo de describir la frecuencia de las diferentes alteraciones moleculares, especialmente de los genes *drivers* que participan en el crecimiento tumoral de los CVB, dispusimos de una base de datos de 154 pacientes con CVB en los que se había realizado el análisis molecular. Los resultados de dicho análisis han servido para identificar biomarcadores potenciales predictivos de respuesta a DT.

Respecto a los objetivos secundarios de determinar la frecuencia de las alteraciones moleculares según la localización anatómica del tumor en el árbol biliar, se observó la presencia de varias AGCR en los tumores de las tres localizaciones CCIH, CCEH y VB, pero con una frecuencia diferente. En síntesis, estas alteraciones incluían mutaciones en *IDH1/2*, *PIK3CA*, *KRAS*, alteraciones en genes de la reparación del DNA, amplificación en *HER2* y presencia de *PTEN* null. Además, también se detectaron AGCR presentes únicamente en muestras de CCIH, tales como fusión en *FGFR2*, mutaciones en *AKT*, *NOCTH*, *RNF43* y amplificación de *MET*.

La presencia de *IDH1/2* mutado en el CVB, fue la alteración más frecuente, estando presente en un 21,8% de los pacientes con CCIH, un porcentaje significativamente superior que un 3,5% en el CCEH y un 4% en el VB ( $P = 0,014$ ).

En el grupo de 101 pacientes con CCIH, también se identificaron otras AGCR, tales como alteraciones de *FGFR* (5,9%), mutaciones en *ARIDIA* (3,9%), mutaciones en *NRAS* (5,9%), mutaciones en *KRAS* (6,9%) y mutaciones en *PIK3CA* isoformas *E545K*, *N345K*, *E109L* (2,9%). Respecto a las mutaciones en genes de la reparación de ADN se observaron 3 pacientes con *BRC A2* mutado y 3 con *ATM* mutado. En relación

con las alteraciones de *FGFR*, en nuestro proyecto encontramos un porcentaje del 3% de fusiones en *FGFR2* en CCIH, que no estaban presente en CCEH ni en VB.

En el grupo de 28 pacientes con CCEH, las AGCR más frecuentes fueron mutación *KRAS* (14,3%), *PTEN* null (10,7%), mutaciones en *PIK3CA* isoformas *K111E*, *E542K* (2,9%), mutaciones en *ARID1A* (7,1%), mutaciones en *BRAF* (7,1%), mutaciones en *HER2* (7,1%), *FGFR3* amplificado (3,5%) y una amplificación en *MDM2* (3,5%). Respecto a las mutaciones en genes de la reparación de ADN se observó 1 paciente con una mutación en *BRAC2* y 1 con una mutación en *MSH2*.

En el grupo de 25 pacientes VB, la AGCR más frecuente era la amplificación de *HER2* (16%), con una diferencia en frecuencia respecto a las otras localizaciones anatómicas CCIH y CCEH estadísticamente significativa ( $P = 0,07$ ). Otras AGCR incluían mutaciones en *PIK3CA* isoformas *E545K*, *E542K*, *H1047L* (12%), mutaciones en *KRAS* (12%), *PTEN* null (4%) y mutación *NRAS* (4%).

En la cohorte de este estudio, el hecho de encontrar diferentes alteraciones moleculares con una frecuencia distinta en función de la localización tumoral, pone de manifiesto la importancia de considerar estos tumores como diferentes entidades a la hora de plantear un tratamiento oncológico. Este hallazgo tiene una relevancia clínica notable, dado que hasta el momento actual los CVB se han tratado como una entidad única.

En el presente trabajo, hemos podido utilizar diferentes plataformas genómicas como Amplicon-MiSeq y FoundationONE detectando alteraciones moleculares poco frecuentes en CVB, pero potenciales DT, como mutaciones de *RNF43* con fármacos dirigidos contra la vía Wnt, así como describir la coexistencia de dos o más mutaciones en 15 pacientes con CCIH, 5 pacientes con CIH y 3 pacientes con VB. No obstante, el fenómeno de la coexistencia de mutaciones en una muestra tumoral dificulta la elección de la DT. Hoy en día se desconoce a qué gen *driver* hay que dar prioridad y por ello, la decisión terapéutica se debe basar en el buen conocimiento de las vías moleculares del CVB, y así enfocar el tratamiento en ensayos clínicos.

El análisis de las muestras se realizó con diferentes plataformas genómicas en función de la disponibilidad según el periodo de estudio, a medida que se incorporaban tecnologías más avanzadas, analizando un mayor número de genes y con mayor sensibilidad. Como era de esperar, en función de la plataforma utilizada aumentaba la posibilidad de detectar más AGCR. Con la plataforma Sequenom, se observó al menos una alteración DT en 22,7% de las muestras analizadas, aumentando al 51,8% con la

plataforma Amplicon-MiSeq y al 75% con la plataforma de FoundationONE. A más genes examinados, el incremento en frecuencia de detección de alteraciones moleculares con potencial DT era estadísticamente significativo ( $P = 0,0004$ ).

En el total de la serie de 154 pacientes, se puso de manifiesto al menos una alteración molecular DT en 76 pacientes (49,3%). Estos resultados coinciden con los hallazgos publicados por un equipo de investigación japonés. Nakamura et al.<sup>149</sup> efectuaron un análisis genómico de 260 muestras de CVB y describen AGCR potenciales DT en un 40% de los casos.

Otro objetivo secundario del estudio era evaluar el beneficio que podían obtener los pacientes de la participación en un ensayo clínico tras el fracaso al tratamiento quimioterápico estándar de primera línea. La mediana de SG fue de 23,4 meses, con un IC del 95% de 19,6 a 28,2 meses. La mediana de supervivencia del estadio metastásico de la enfermedad fue de 16,9 meses, con un IC del 95% de 14,3 a 21,3 meses. No hubo diferencias estadísticamente significativas en relación con la localización anatómica del tumor primario. Al tratarse de una población seleccionada, la SG de los pacientes incluidos en el presente estudio es superior a la descrita en otras series de CVB publicadas en la literatura, como una mediana de 8,1 meses en el estudio ABC-02<sup>90</sup> con quimioterapia en primera línea. Los resultados de este estudio deben interpretarse con cautela, teniendo en cuenta el sesgo de selección, ya que se trata de pacientes con CVB cuya evolución de la enfermedad tras progresar a la terapia estándar y mantener un estado general conservado, permite efectuar un análisis molecular con la finalidad de establecer la biología molecular del tumor y valorar la participación en un ensayo clínico.

De los 154 pacientes analizados, se identificaron 76 pacientes con al menos una AGCR, potencial DT (49,3%). De los 76 pacientes, 39 pacientes (50%) fueron incluidos en un ensayo clínico y 19 de ellos tratados con TM. De los 19 pacientes afectados de un CVB que habían progresado a la terapia estándar y participaron en un ensayo clínico con TM según perfil molecular se observó beneficio en 9 pacientes (47,4%). En este subgrupo de pacientes con beneficio hubo una estabilización de la enfermedad en 8 pacientes y una respuesta parcial en 1 paciente. En 6 pacientes se observó beneficio clínico, con una SLP superior a 4 meses. Hay que destacar que en segunda línea no existe tratamiento estándar para el CVB y que las SLP son inferiores a los 4 meses.<sup>92</sup>

A fin de especificar mejor el beneficio de la participación en un ensayo clínico en esta población de pacientes, se ha restado a la supervivencia global individual, el

tiempo libre de progresión de la primera línea de los pacientes incluidos, dado que la primera línea de tratamiento es la única que claramente ha demostrado un beneficio en la supervivencia en los pacientes afectados de un CVB, y esta línea de tratamiento puede influir en la supervivencia global del paciente.

La SLP de la primera línea de tratamiento era similar en los pacientes que tras la progresión participaron en un ensayo clínico (5,5 meses) y en los que no lo hicieron (5,4 meses). Ello demuestra que no existe ningún sesgo de selección para la inclusión en un ensayo clínico basado en la SLP a la primera línea de tratamiento. Por tanto, una vez descartada la influencia de la primera línea en la supervivencia, se observaron diferencias significativas de 14,1 meses *versus* 6,7 meses en función de la participación o no en un ensayo clínico ( $P = 0,03$ ). No obstante, esta diferencia en supervivencia tras la primera línea de tratamiento respecto a la participación en un ensayo clínico debe interpretarse con cautela, dado que en las características basales de la población no se dispone de los datos de algunas variables con valor pronóstico, como las cifras de albúmina sérica, PCR, LDH o CA 19.9.

Recientemente, en octubre de 2017, se publicaron los resultados del ensayo clínico MOSCATO-01<sup>254</sup> que demostraba un claro beneficio clínico y altas tasas de respuestas con TM dirigida a DT individualizada, en pacientes con CVB tras progresión a la primera línea de tratamiento a régimen basado en platinos. Este estudio se llevó a cabo en la unidad de ensayos clínicos fase I del Hospital Gustave Roussy, de París. De los 1.035 pacientes evaluados, 43 pacientes (4,1%) tenían CVB, la mayoría (67%) CCIH. De los 43 pacientes, se realizó análisis molecular en 34 pacientes (79,1%), 23 pacientes (68%) tenían al menos una AGCR, de los cuales, 18 pacientes (41,8%) recibieron TM en un ensayo fase 1, y 25 (58,1%) recibieron terapia no dirigida. Los resultados obtenidos fueron mediana de SLP (objetivo primario) de 5,2 meses (IC del 95% 1,7-15,9) con TM y 1 paciente con respuesta completa, 5 con respuestas parciales, 10 con estabilización de la enfermedad y 2 con progresión. Respecto a la mediana de SG, definida como la supervivencia desde la inclusión en ensayo hasta el fallecimiento (similar SP1°T en el presente estudio) fue de 17 meses (IC del 95% 15-no estimable) con TM *versus* 5 meses (IC del 95% 4-no estimable) con terapia no dirigida (HR 0,29;  $P = 0,008$ ).

En el presente estudio, a diferencia del grupo francés que demostraba un beneficio de la participación en un ensayo clínico con TM en términos de SG (17 meses *versus* 5 meses sin TM, HR 0,29;  $P = 0,008$ )<sup>251</sup>, no se observan diferencias de SP1°T en

función de la participación en un ensayo clínico con TM o sin TM (14,3 meses *versus* 12,8 meses).

Esta diferencia de resultados respecto a los reportados en el ensayo MOSCATO-01<sup>254</sup>, puede estar influenciada por la heterogeneidad de la muestra, el número de líneas previas a la inclusión en ensayo clínico con DT no eran similares en ambos estudios, ó a las altas tasas de repuesta reportadas por el grupo francés. De los 18 pacientes tratados con TM, reportaron una respuesta completa en 1 paciente, respuestas parciales en 5 pacientes, estabilización de la enfermedad en 10 pacientes y beneficio clínico con SLP > 4 meses en 9 pacientes.

En nuestra cohorte de pacientes observamos bajas tasas de respuesta con sólo un paciente con una respuesta parcial, 8 estabilizaciones y beneficio clínico en 6 pacientes de los 19 pacientes (31,6%) tratados con TM con SLP >4 meses.

Ambas cohortes de pacientes, tanto la del grupo francés como la nuestra, son muestras pequeñas, cuyas diferencias estadísticas son poco representativas, por tanto, se debe profundizar en la caracterización molecular de CVB en un mayor número de pacientes a fin de analizar el beneficio de la participación en ensayo clínico con DT.

La experiencia de este trabajo pone de manifiesto que no hay que excluir a los pacientes con un CVB de participar en un ensayo clínico, dado que ello puede impactar en la supervivencia y beneficio clínico. Dada la falta de un tratamiento estándar tras la primera línea de tratamiento, se debería poder ofrecer dicha posibilidad a los pacientes con un CVB. Los datos disponibles tan prometedores con inhibidores de *FGFR*, *BRAF* e *IDH1* en CCIH, la reciente aprobación de pembrolizumab por la FDA para pacientes con tumores *MSI-H* independientemente del tumor sólido, y las altas tasas de respuesta en pacientes con fusiones *NTRK*, hacen que la caracterización del CVB continúe siendo un importante reto científico.

Finalmente, queremos destacar la importancia de realizar el análisis genómico completo y precoz en el curso de la enfermedad en pacientes con buen estado general y posibles candidatos a participar en ensayos clínicos, con el propósito de detectar AGCR potencialmente DT. La identificación de estas alteraciones moleculares es fundamental en la toma de decisiones terapéuticas para mejorar el pronóstico del CVB.



## **Capítulo 8. Conclusiones**

1. El cáncer de vía biliar presenta una alta frecuencia de alteraciones moleculares en genes *drivers*, que son potenciales dianas terapéuticas.
2. Estas alteraciones moleculares son diferentes en función de la localización anatómica.
3. La mutación de *IDH* y translocaciones en *FGFR2* son frecuentes en el cáncer de vías biliares, siendo específicos del colangiocarcinoma intrahepático. La mutación de *PI3K* y *KRAS* son más frecuentes en colangiocarcinoma extrahepático, así como la amplificación de *HER2* en el cáncer de vesícula biliar.
4. Los pacientes afectos de un cáncer de vías biliares que han progresado a una terapia estándar de primera línea, pueden beneficiarse de la participación en un ensayo clínico habiéndose observado en nuestra serie un aumento de la supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento. Y uno de cada cuatro pacientes estaban libres de progresión a los 4 meses.

## **Capítulo 9. Líneas futuras**

El CVB es una enfermedad poco frecuente con pronóstico infausto que se diagnostica en estadios avanzados en la mayoría de los casos. Hoy en día sólo disponemos de un esquema de tratamiento que haya demostrado ser eficaz para este grupo de pacientes, ofreciendo supervivencias medias inferiores a los 12 meses. Desde hace años se han dedicado recursos a investigar en profundidad la biología molecular del CVB, describiendo una patogénesis compleja y diversas vías moleculares alteradas, algunas de ellas potenciales DT. Algunos ejemplos, serían mutaciones en *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *PI3K*, *MET* o translocaciones en *FGFR2*. Existe una necesidad de continuar profundizando en el conocimiento de la biología molecular de estos tumores, así como en la selección de DT que permitan aumentar las opciones de tratamiento para los pacientes con esta patología.

En el presente trabajo, la identificación de biomarcadores potencialmente predictivos para la TM en casi la mitad de los pacientes con CVB indica que la caracterización molecular prospectiva podría acelerar el diseño de ensayos clínicos en esta población y conducir a un cambio de paradigma en un futuro cercano en el tratamiento del CVB.

De cara a armonizar la investigación en una enfermedad con tan baja incidencia, heterogeneidad clínica y genómica, será importante centralizar tanto el análisis molecular (lo más completo posible) como la toma de decisiones terapéuticas. Por tanto, el desarrollo de TM para pacientes con CVB requerirá alta experiencia en el campo de ensayos clínicos, la cooperación de los diferentes centros académicos, grupos cooperativos de investigación, servicios con alto volumen de casos y el apoyo de la industria farmacéutica para aunar los esfuerzos y minimizar la duplicación de pruebas en un tumor donde la disponibilidad de muestras tisulares suficientes para el análisis genómico completo es difícil.

En un futuro, es preciso diseñar proyectos de investigación de biopsia líquida, y así superar la actual dificultad que supone la falta de tejido tumoral que impide realizar análisis genómicos completos en algunas ocasiones.

El avance en este cáncer huérfano de tratamiento requiere un esfuerzo integrado y global para profundizar en la detección del perfil molecular del paciente individual, desarrollando nuevas estrategias terapéuticas en función de las AGCR identificadas.

## Capítulo 10. Bibliografía

En esta tesis, las referencias bibliográficas se han ordenado siguiendo el sistema recomendado por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (*International Committee of Medical Journal Editors*, [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) o estilo Vancouver. En el texto, las citas se identifican por números arábigos correlativos. En la bibliografía, cada referencia incluye los nombres de todos los autores hasta seis, seguido de et al. (y cols.) en caso de más de seis firmantes. Las revistas se abrevian según el patrón de MEDLINE/PubMed. No se incluyen los números de las revistas en aquellas con numeración correlativa de sus volúmenes. Se incluyen los dígitos completos de la última página de los artículos. Para las referencias de artículos publicados en revistas *open access* también se incluye el doi (*digital object identifier*).

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-1403.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7-30.
3. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005;366:1303-1314.
4. Bartlett DL. Intrahepatic cholangiocarcinoma: a worthy challenge. *Cancer J* 2009;15:255-256.
5. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014;74:2913-2921.
6. Shahid AK, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* 2012;61:1657-1669.
7. Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S, et al. Cholangiocarcinoma: a spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg* 1996;224:463-473.
8. Chapman RW. Risk factors for biliary tract carcinogenesis. *Ann Oncol* 1999;10:308-311.
9. Burak K, Angulo P, Pasha TM, Egan K, Petz J, Lindor KD. Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:523-526.
10. Lee YM, Kaplan MM. Primary sclerosing cholangitis. *N Engl J Med* 1995;332:924-933.
11. Bergquist A, Ekblom A, Olsson R, Kornfeldt D, Lööf L, Danielsson A, et al. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2002;36:32-37.
12. Jang MH, Lee YJ, Kim H. Intrahepatic cholangiocarcinoma arising in Caroli's disease. *Clin Mol Hepatol* 2014;20:402-405.
13. Dayton MT, Longmire WP Jr, Tompkins RK. Caroli's Disease: a premalignant condition? *Am J Surg* 1983;145:41-48.
14. Lipsett PA, Pitt HA, Colombani PM, Boitnott JK, Cameron JL. Choledochal cyst disease. A changing pattern of presentation. *Ann Surg* 1994;220:644-652.
15. Kurathong S, Lerdverasirikul P, Wongpaitoon V, Pramoolsinsap C, Kanjanapitak A, Varavithya W, et al. Opisthorchis viverrini infection and cholangiocarcinoma. A prospective, case-controlled study. *Gastroenterology* 1985;89:151-156.
16. Jang KT, Hong SM, Lee KT, Lee JG, Choi SH, Heo JS, et al. Intraductal papillary neoplasm of the bile duct associated with *Clonorchis sinensis* infection. *Virchows Arch* 2008;453:589-598.
17. Palmer WC, Patel T. Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2012;57:69-76.

18. El-Serag HB, Engels EA, Landgren O, Chiao E, Henderson L, Amaratunge HC, et al. Risk of hepatobiliary and pancreatic cancers after hepatitis C virus infection: a population-based study of U.S. Veterans. *Hepatology* 2009;49:116-123.
19. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-567.
20. Yamada K, Kumagai S, Nagoya T, Endo G. Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma. *J Occup Health* 2014;56:332-338.
21. Shaib YH, El-Serag HB, Davila JA, Morgan R, McGlynn KA. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. *Gastroenterology* 2005;128:620-626.
22. Welzel TM, Graubard BI, El-Serag HB, Shaib YH, Hsing AW, Davila JA, et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1221-1228.
23. Randi G, Franceschi S, La Vecchia C. Gallbladder cancer worldwide: geographical distribution and risk factors. *Int J Cancer* 2006;118:1591-602.
24. Vladoianu IR, Chang HR, Pechere JC. Expression of host resistance to *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*: bacterial survival within macrophages of murine and human origin. *Microb Pathog* 1990;8:83-90.
25. Kumar S. Infection as a risk factor for gallbladder cancer. *J Surg Oncol* 2006;93:633-639.
26. Chang JS, Tsai CR, Chen LT. Medical risk factors associated with cholangiocarcinoma in Taiwan: a population-based case-control study. *PLoS One* 2013;8:e69981. doi: 10.1371/journal.pone.0069981.
27. Arora A, Mukund A, Thapar S, Alam S. Anomalous pancreaticobiliary junction. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;58:e13. doi: 10.1097/MPG.0b013e31825a2a71.
28. Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banzinger M, Bhat RV, Breiman R, Brune M, et al. Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environ Health Perspect* 2006;114:1898-1903.
29. Shebl FM, Andreotti G, Rashid A, Gao YT, Yu K, Shen MC, et al. Diabetes in relation to biliary tract cancer and stones: a population-based study in Shanghai, China. *Br J Cancer* 2010;103:115-119.
30. Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:204-207.
31. Levy C, Lymp J, Angulo P, Gores GJ, Larusso N, Lindor KD. The value of serum CA 19-9 in predicting cholangiocarcinomas in patients with primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis Sci* 2005;50:1734-1740.
32. Malaguarnera G, Paladina I, Giordano M, Malaguarnera M, Bertino G, Berretta M. Serum markers of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Dis Markers* 2013;34:219-228.
33. Qin X, Wang Z, Shi J, Lu M, Wang L, Quan-Ru He. Utility of serum CA19-9 in diagnosis of cholangiocarcinoma: in comparison with CEA. *World J Gastroenterol* 2004;10:427-432.

34. Lee BS, Lee SH, Son JH, Jang DK, Chung KH, Paik WH, et al. Prognostic value of CA 19-9 kinetics during gemcitabine-based chemotherapy in patients with advanced cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;31:493-500.
35. Liu SL, Song ZF, Hu QG, Shan D, Hu SB, Li J, Zheng QC. Serum carbohydrate antigen (CA) 19-9 as a prognostic factor in cholangiocarcinoma: a meta-analysis. *Front Med China* 2010;4:457-462.
36. Bloom CM, Langer B, Wilson SR. Role of US in the detection, characterization, and staging of cholangiocarcinoma. *Radiographics* 1999;19:1199-218.
37. Tillich M, Mischinger HJ, Preisegger KH, Rabl H, Szolar DH. Multiphasic helical CT in diagnosis and staging of hilar cholangiocarcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 1998;171:651-658.
38. Lee HY, Kim SH, Lee JM, Kim SW, Jang JY, Han JK, Choi BI. Preoperative assessment of resectability of hepatic hilar cholangiocarcinoma: combined CT and cholangiography with revised criteria. *Radiology* 2006;239:113-121.
39. Aloia TA, Chusilp M, Faria S, Ribero D, Abdalla E, Vauthey JN, Curley SA. High-resolution computed tomography accurately predicts resectability in hilar cholangiocarcinoma. *Am J Surg* 2007;193:702-706.
40. Lopera JE, Soto JA, Munera F. Malignant hilar and perihilar biliary obstruction: use of MR cholangiography to define the extent of biliary ductal involvement and plan percutaneous interventions. *Radiology* 2001;220:90-96.
41. Manfredi R, Barbaro B, Masselli G, Vecchioli A, Marano P. Magnetic resonance imaging of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004;24:155-164.
42. Masselli G, Manfredi R, Vecchioli A, Gualdi G. MR imaging and MR cholangiopancreatography in the preoperative evaluation of hilar cholangiocarcinoma: correlation with surgical and pathologic findings. *Eur Radiol* 2008;18:2213-2221.
43. Vogl TJ, Wolfram O, Matthias H, Herzog C, Zangos S, et al. Staging of Klatskin tumours (hilar cholangiocarcinomas): comparison of MR cholangiography, MR imaging, and endoscopic retrograde cholangiography. *Eur Radiol* 2006;16:2317-2325.
44. Hattori M, Nagino L, Ebata T, Kato K, Okada K, Shimovama Y. Prospective study of biliary cytology in suspected perihilar cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 2011;98:704-709.
45. Blechacz B, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology* 2008;48:308-321.
46. Kato T, Tsukamoto E, Kuge Y, Katoh C, Nambu T, Nobuta A, et al. Clinical role of (18) F-FDG PET for initial staging of patients with extrahepatic bile duct cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:1047-1054.
47. Kluge R, Schmidt F, Caca K, Barthel H, Hesse S, Georgi P, et al. Positron emission tomography with [(18) F] fluoro-2-deoxy-D-glucose for diagnosis and staging of bile duct cancer. *Hepatology* 2001;33:1029-1035.
48. Rizvi S, Khan S.A, Hallemeier C, Kelley RK, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: evolving concepts and therapeutics strategies. *Nature Rev Clin Oncol* 2018;15:95-111.



49. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK. AJCC cancer staging manual (8th ed). New York, Springer; 2017.
50. Okabayashi T, Yamamoto T, Kosume L, Shimada K, Yamasaki S, Takayama T, Makuuchi M. A new staging system for mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma: analysis of preoperative and postoperative variables. *Cancer* 2001;92:2374-2383.
51. Heron DE, Stein DE, Eschelman CJ, Topham AK, Waterman FM, Rosato EL, et al. Cholangiocarcinoma: the impact of tumor location and treatment strategy on outcome. *Am J Clin Oncol* 2003;26:422-428.
52. Nakano M, Ariizumi SI, Yamamoto. Intrahepatic cholangiocarcinoma. *Semin Diagn Pathol* 2017;34:160-166.
53. Hezel AF, Deshpande V, Zhu AX. Genetics of biliary tract cancers and emerging targeted therapies. *J Clin Oncol* 2010;28:3531-3540.
54. Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds). World Health Organization. Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon, France: IARC Press, 2000.
55. Aishima S, Kubo Y, Tanaka Y, Oda Y. Histological features of precancerous and early cancerous lesions of biliary tract carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014;21:448-452.
56. Zen Y, Adsay NV, Bardadin K, Colombari R, Ferrell L, Haga H, et al. Biliary intraepithelial neoplasia: an international interobserver agreement study and proposal for diagnostic criteria. *Mod Pathol* 2007;20:701-709.
57. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem* 2006;387:365-372.
58. Aishima S, Mano Y, Tanaka Y, Kubo Y, Shirabe Y, Maehara Y, Oda Y. Different roles of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in carcinogenesis and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2013;44:1031-1037.
59. Sia D, Tovar V, Moeini A, Llobet JM. Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. *Oncogene* 2013;32:4861-4870.
60. Aishima S, Iguchi T, Fujita N, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyoshi, Oda Y. Histological and immunohistological findings in biliary intraepithelial neoplasia arising from a background of chronic biliary disease compared with liver cirrhosis of non-biliary etiology. *Histopathology* 2011;59:867-875.
61. Hsu M, Sasaki M, Igarashi S, Sato Y, Nakamura Y. KRAS and GNAS mutations and p53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia and intrahepatic cholangiocarcinomas. *Cancer* 2013;119:1669-1674.
62. Nakanishi Y, Zen Y, Kondo S, Itoh T, Itatsu K, Nakanuma Y. Expression of cell cycle-related molecules in biliary premalignant lesions: biliary intraepithelial neoplasia and biliary intraductal papillary neoplasm. *Hum Pathol* 2008;39:1153-1161.
63. Furukawa T, Klöppel G, Volkan Adsay N, Albores-Saavedra J, Fukushima N, Horii A, et al. Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study. *Virchows Arch* 2005;447:794-799.

64. Schlitter AM, Born D, Bettstetter M, Specht K, Kim-Fuchs C, Riener MO, et al. Intraductal papillary neoplasms of the bile duct: stepwise progression to carcinoma involves common molecular pathways. *Mod Pathol* 2014;27:73-86.
65. Barreto SG, Dutt A, Chaudhary A. A genetic model for gallbladder carcinogenesis and its dissemination. *Ann Oncol* 2014;25:1086-1097.
66. Tazuma S, Kajiyama G. Carcinogenesis of malignant lesions of the gall bladder. The impact of chronic inflammation and gallstones. *Langenbecks Arch Surg* 2001;386:224-229.
67. Legan M, Luzar B, Marolt VF, Cör A. Expression of cyclooxygenase-2 is associated with p53 accumulation in premalignant and malignant gallbladder lesions. *World J Gastroenterol* 2006;12:3425-3429.
68. Wistuba II, Albores-Saavedra J. Genetic abnormalities involved in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999;6:237-244.
69. Wistuba II, Maitra A, Carrasco R, Tang M, Troncoso P, Minna JD, Gazdar AF. High resolution chromosome 3p, 8p, 9q and 22q allelotyping analysis in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *Br J Cancer* 2002;87:432-440.
70. Chaube A, Tewari M, Garbyal RS, Singh U, Shukla HS. Preliminary study of p53 and c-erbB-2 expression in gallbladder cancer in Indian patients. *BMC Cancer* 2006;6:126. doi: 10.1186/1471-2407-6-126.
71. Chang HJ, Kim SW, Kim YT, Kim WH. Loss of heterozygosity in dysplasia and carcinoma of the gallbladder. *Mod Pathol* 1999;12:763-769
72. Wistuba II, Ashfaq R, Maitra A, Alvarez H, Riquelme R, Gazdar AF. Fragile histidine triad gene abnormalities in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:2073-2079.
73. Kobayashi K, Tsuji A, Morita S, Horimi T, Shirasaka T, Kanematsu T, et al. A Phase II study of LFP therapy (5-FU (5-fluorouracil) continuous infusion (CVI) and Low-dose consecutive (Cisplatin) CDDP) in advanced biliary tract carcinoma. *BMC Cancer* 2006;6:121. doi: 10.1186/1471-2407-6-121.
74. Nehls O, Klump B, Arkenau HT, Hass HG, Greschniok A, Gregor M, Porschen R. Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin for advanced biliary system adenocarcinomas: a prospective phase II trial. *Br J Cancer* 2002;87:702-704.
75. Lee S, Kim KH, Kim HJ, Kim SH, Bae SB, Kim CK, et al. Oxaliplatin, 5-FU, and leucovorin (FOLFOX) in advanced biliary tract cancer. *J Clin Oncol* 2011;29 (15 Suppl):4106.
76. Rao S, Cunningham D, Hawkins RE, Hill ME, Smith D, Daniel F, et al. Phase III study of 5FU, etoposide and leucovorin (FELV) compared to epirubicin, cisplatin and 5FU (ECF) in previously untreated patients with advanced biliary cancer. *Br J Cancer* 2005;92:1650-1654.
77. Penz M, Kornek GV, Raderer M, Ulrich-Pur H, Fiebiger W, Lenauer A, et al. Phase II trial of two-weekly gemcitabine in patients with advanced biliary tract cancer. *Ann Oncol* 2001;12:183-186.
78. Valencak J, Kornek G V, Raderer M, Ulrich-Pur H, Krauss G, Greul R, et al. Gemcitabine for the treatment of advanced biliary tract carcinomas: evaluation of two different dose regimens. *Onkologie* 1999;22:498-501.

79. Kubicka S, Rudolph KL, Tietze MK, Lorenze M, Manns S, et al. Phase II study of systemic gemcitabine chemotherapy for advanced unresectable hepatobiliary carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2001;48:783-789.
80. Arroyo G J, Rubio B, Orlandi L, Yañez M, Gamargo C, Ahumada M, et al. Gemcitabine in advanced biliary tract cancer. Experience from Chile and Argentina in phase II trials. *Proc ASCO* 2001;20:157a [Abstract 626].
81. Murad AM, Guimarães RC, Aragão BC, Rodrigues VH, Scalabrini-Neto A, Padua C, et al. Phase II trial of the use of gemcitabine and 5-fluorouracil in the treatment of advanced pancreatic and biliary tract cancer. *Am J Clin Oncol* 2003;26:151-154.
82. Steven R, Hani Al-Khatib, Michelle R, Burgart L, Cera PJ, Flynn PJ, et al. Gemcitabine, 5-fluorouracil, and leucovorin in advanced biliary tract and gallbladder carcinoma. *Cancer* 2005;103:111-118.
83. Hsu C, Shen Y-C, Yang C-H, Yeh K, Lu Y, Hsu C, et al. Weekly gemcitabine plus 24-h infusion of high-dose 5-fluorouracil/leucovorin for locally advanced or metastatic carcinoma of the biliary tract. *Br J Cancer* 2004;90:1715-1719.
84. Knox JJ, Hedley D, Oza A, Feld R, Siu LL, Chen E, et al. Combining gemcitabine and capecitabine in patients with advanced biliary cancer: a phase ii trial. *J Clin Oncol* 2005;23:2332-2338.
85. Thongprasert S, Napapan S, Charoentum C, Moonprakan S. Phase II study of gemcitabine and cisplatin as first-line chemotherapy in inoperable biliary tract carcinoma. *Ann Oncol* 2005;16:279-281.
86. Reyes-Vidal J, J Gallardo, E Yanez, J Rosas, M Palma. Gemcitabine and cisplatin in the treatment of patients with unresectable or metastatic gallbladder cancer: results of the phase II GOCCHI study 2000-13. *Proc ASCO* 2003;22 [Abstract 1095].
87. Ulahannan SV, Rahma OE, Duffy AD, Makarova-Rusher OV, Kurtoglu M, David J Liewehr DJ, et al. Identification of active chemotherapy regimens in advanced biliary tract carcinoma: a review of chemotherapy trials in the past two decades. *Hepat Oncol* 2015;2:39-50.
88. Jang JS, Lim HY, Hwang IG, Song HS, Yoo N, Yoon S, et al. Gemcitabine and oxaliplatin in patients with unresectable biliary cancer including gall bladder cancer: Korean Cancer Study Group phase II trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:641-647.
89. Eckel F, Schmid RM. Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis of clinical trials. *Br J Cancer* 2007;96:896-902.
90. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010;362:1273-1281.
91. Okusaka T, Nakachi K, Fukutomi A, Mizuno N, Ohkawa S, Funakoshi A, et al. Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: a comparative multicentre study in Japan. *Br J Cancer* 2010;103:469-474.
92. Park J, Oh DY, Hsu C, Chen JS, Chen LT, Orlando M, et al. Gemcitabine Plus Cisplatin for Advanced Biliary Tract Cancer: A Systematic Review. *Cancer Res Treat* 2015; 47(3): 343-361.

93. Lamarca A, Hubner RA, David Ryder W, Valle JW. Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: a systematic review. *Ann Oncol* 2014;25:2328-2338.
94. Lamarca A, Palmer D, Wasan H, Ryder WD, Davies L, Flight H, et al. ABC-06: A randomised phase III, multi-centre, open-label study of active symptom control (ASC) alone or ASC with oxaliplatin/5-FU chemotherapy for patients with locally advanced/metastatic biliary tract cancer (ABC) previously treated with cisplatin/gemcitabine chemotherapy. *Ann Oncol* 2014;25:252-260.
95. Valle JW, Borbath I, Khan SA, Huguet F, Gruenberger T, Arnold D, et al. Biliary cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up *Annals of Oncology* 2016;27:28-37.
96. Ross JS, Wang T, Catenacci ML, Chmielecki J, Ali SM, Elvin JA et al. Comprehensive genomic profiling of biliary tract cancers to reveal tumor-specific differences and genomic alterations. *J Clin Oncol* 2015;33 (15 Suppl):231 [Abstract 4009].
97. Simbolo M, Razzan T, Ruimenete L, Mafficini A, Wood LD, Corbo V et al. Multigene mutational profiling of cholangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups. *Oncotarget* 2014;5:2839-2852.
98. Sia D, Losic B, Moeni L, Cabellos L, Hao K, Revill K, et al. Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2-PPHLN1 fusion and ARAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* 2015;6:6087-6098.
99. Borger DR, Tanabe KK, Fan KC, Lopez HU, Fantin VR, Straley KS, et al. Frequent mutation of isocitrate dehydrogease IDH 1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist* 2012;17:72-79.
100. Li M, Zhang Z, Li X, Ye J, Wu X, Tan Z, et al. Whole-exome and targeted gene sequencing of gallbladder carcinoma identifies recurrent mutations in the ErbB pathway. *Nat Genet* 2014;46:872-876.
101. Deshpande V, Nguaguba A, Zimmerman SM, Kehoe SM, Macconail LE, Lauwers GY, et al. Mutational profiling reveals PIK3CA mutations in gallbladder carcinoma. *BMC Cancer* 2011;11:60. doi: 10.1186/1471-2407-11-60.
102. Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* 2012;142:1021-1031.
103. Daniela Sia, Y. Hoshida, A. Villanueva, S. Roayaie, J. Ferrer, B. Tabak et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes That Have Different Outcomes. *Gastroenterology* 2013;144:829-840.
104. Farshidfar F, Zheng S, Gingras MC, Newton Y, Shih J, Robertson AG, et al. Integrative genomic analysis of cholangiocarcinoma identifies distinct IDH-mutant molecular profiles. *Cell Rep* 2017;18:2780-2794.
105. Jusakul A, Cutcutache I, Yong CH, Lim JQ, Huang MN, Padmanabhan N, et al. Whole-Genome and epigenomic landscapes of etiologically distinct subtypes of cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* 2017;7:1116-1135.
106. Ong CK, Subimerb J, Paikorju L, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, et al. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat Genet* 2012;44:690-693.

107. Chan-On W, Nairismagi ML, Ong CK, Lim WK, Dima S, Pairojkul C, et al. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. *Nat Genet* 2013;45:1474-1478.
108. Jiao Y, Pawlik T, Anders RA, Selaru FM, Streppel MM, Lucas DJ, et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet* 2013;45:1470-1473.
109. Holcombe RF, Xiu J, Paslwal T, Millis SZ, Gatalica, Reddy SK, et al. Tumor profiling of biliary tract carcinomas to reveal distinct molecular alterations and potential therapeutic targets. *J Clin Oncol* 2015;33:285.
110. Moeini A, Sia, Bardesy M, Mazzaferro V, Llovet JM. Molecular pathogenesis and targeted therapies of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;22:291-300.
111. Ross JS, Wang K, Gay L, Al-Rohil R, Rand JV, Jones DM, et al. New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing. *Oncologist* 2014;19:235-242.
112. Javle M, Bekaii-Saab T, Jain A, Wang Y, Kelley RK, Wang K, et al. Biliary cancer: utility of next-generation sequencing for clinical management. *Cancer* 2016;122:3838-3847.
113. Wardell CP, Fujita M, Yamada T, Simbolo M, Fassan M, Karlic R, et al. Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations *J Hepatol* 2018;68:959-969.
114. Furubo S, Harada K, Shimonishi T, Katayanagi K, Tsui W, Nakanuma Y, et al. Protein expression and genetic alterations of p53 and ras in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 1999;35:230-240.
115. Momoi H, Itho K, Nosaki M, Arima Y, Okabe H, Satoh S, et al. Microsatellite instability and alternative genetic pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2001;35:235-244.
116. Tannapfel A, Weinans L, Gleifer F, Schütz A, Katalinic A, Köckerling F, et al. Mutations of p53 tumor suppressor gene, apoptosis, and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver. *Dig Dis Sci* 2000;45:317-324.
117. Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, Weinans L, Katalinic A, Geißler F, et al. Genetic and epigenetic alterations of the INK4a-ARF pathway in cholangiocarcinoma. *J Pathol* 2002;197:624-631.
118. Zou S, Li J, Zhou H, Frech C, Jiang X, Chu JS, et al. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* 2014;5:5696. doi: 10.1038/ncomms6696.
119. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2014;383:2168-2179.
120. Hansel DE, Rahman, Hidalgo M, Thuluvath PJ, Lillemoe KD, Shulick R, et al. Identification of novel cellular targets in biliary tract cancers using global gene expression technology. *Am J Pathol* 2003;163:217-229.
121. Saetta AA, Papanastasiou P, Michalopoulos NV, Gigelou F, Korkolopoulou P, Bei T, et al. Mutational analysis of BRAF in gallbladder carcinomas in association with K-ras and p53 mutations and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2004;445:179-182.

122. Riener MO, Bawohl, Clavien PA, Jochum W. Rare PIK3CA hotspot mutations in carcinomas of the biliary tract. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:363-367.
123. Ruzzenente A, FassaM, Conci S, Simbolo M, Lawlor RT, Pedrazzani C, et al. Cholangiocarcinoma heterogeneity revealed by multigene mutational profiling: clinical and prognostic relevance in surgically resected patients. *Ann Surg Oncol* 2016;23:1699-1707.
124. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 2002;7:2-8.
125. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2008;98:418-425.
126. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282(5392):1318-1321.
127. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;27:5497-5510.
128. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:21-35.
129. Geynisman DM, Catenacci DV. Toward personalized treatment of advanced biliary tract cancers. *Discov Med* 2012;14:41-57.
130. Herberger B, Puhalla, Lehnert M, Wrba F, Novak S, Brandstetter A, et al. Activated mammalian target of rapamycin is an adverse prognostic factor in patients with biliary tract adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:4795-4799.
131. Chang YT, Chang MC, Huang KW, Tung CC, Hsu C, Wong JM, et al. Clinicopathological and prognostic significances of EGFR, KRAS and BRAF mutations in biliary tract carcinomas in Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol* 2014;29:1119-1125.
132. Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Polychronidis A, Gatter KC, Harris AL et al. Hypoxia inducible factors 1alpha and 2alpha are associated with VEGF expression and angiogenesis in gallbladder carcinomas. *J Surg Oncol* 2006;94:242-247.
133. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000;5:3-10.
134. Tian Y, Ding RY, Zhi YH, Guo RX, Wu SD. Analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in human gallbladder carcinoma for the determination of tumor vascularity. *World J Gastroenterol* 2006;12:415-419.
135. Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:41-59.
136. Yang L, Guo T, Jiang S, Yang Z. Expression of ezrin, HGF and c-met and its clinicopathological significance in the benign and malignant lesions of the gallbladder. *Hepatogastroenterology* 2012;59:1769-1775.

137. Moon WS, Park HS, Lee H, Pai R, Tarnawski AS, Kim KR, et al. Co-expression of cox-2, C-met and beta-catenin in cells forming invasive front of gallbladder cancer. *Cancer Res Treat* 2005;37:171-176.
138. Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med* 2010;16:387-97.
139. Borger DR, Zhu AX. IDH mutations: new genetic signatures in cholangiocarcinoma and therapeutic implications. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012;12:543-546.
140. Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov* 2013;3:730-741.
141. Kipp BR, Voss RR, Kerr M, Barr Fritcher EG, Graham RP, Zhang L, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2012;43:1552-1558.
142. Grassian AR, Pagliarini R, Chiang DY. Mutations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2014;30:295-302.
143. Ang C. Role of the fibroblast growth factor receptor axis in cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30:1116-1122.
144. Hierro C, Rodon J, Tabernero J. Fibroblast growth factor (FGF) receptor/FGF inhibitors: novel targets and strategies for optimization of response of solid tumors. *Semin Oncol* 2015;42:801-819.
145. Wu YM, Su F, Kalyana-Sundaram S, Khazanov N, Ateeq B, Cao X, et al. Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer Discov* 2013;3:636-647.
146. Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, Shiota T, Hama N, Nakamura H, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2014;59:1427-1434.
147. Narong S, Leelawat K. Basic fibroblast growth factor receptor induces in cholangiocarcinoma cell migration via activation Mek1/2 pathway. *Oncol Lett* 2011;2:821-825.
148. Goyal L, Supriya K, Saha SK, Liu LY, Siravegna G, Leshchiner I, et al. Polyclonal secondary FGFR2 mutations drive acquired resistance to FGFR inhibition in patients with FGFR2 fusion- positive colangiocarcinoma. *Cancer Discov* 2017;7:252-263.
149. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shiota T, Elzawahry A, Kato M, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* 2015;47:1003-1010.
150. Bott M, Brevet M, Taylor BS, Shimizu S, Ito T, Wang L, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 loss in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet* 2011;43:668-672.
151. Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-celis S, Liao A, Leng N, Pavia-Jiménez A, Wang S, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:751-759.
152. Wu RC, Wang TL, Shih M. The emerging roles of ARID1A in tumor suppression. *Cancer Biol Ther* 2014;15:655-664.
153. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. *NTRK* gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* 2016;1:e000023. doi: 10.1136/esmoopen-2015-000023.

154. Lee KH, Lee KB, Kim TY, Han SW, Oh DY, Im SA, et al. Clinical and pathological significance of ROS1 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* 2015;15:721. doi: 10.1186/s12885-015-1737-4.
155. Gu TL, Deng X, Huang F, Tucker M, Crosby K, Rimkunas V, et al. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One* 2011;6:e15640. doi: 10.1371/journal.pone.0015640.
156. Marks E, Yee NS. Molecular genetics and targeted therapeutics in biliary tract carcinoma. *World J Gastrointest Oncol* 2016;22:1335-1347.
157. Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, et al. Phase II study of erlotinib in patients with advanced biliary cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3069-3074.
158. Lee J, Park SH, Chang HM, Kim JS, Choi HJ, Lee MA, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2012;13:181-188.
159. Lubner SJ, Mahoney MR, Kolesar JL, Loconte NK, Kim GP, Pitot HC, et al. Report of a multicenter phase II trial testing a combination of biweekly bevacizumab and daily erlotinib in patients with unresectable biliary cancer: a phase II Consortium study. *J Clin Oncol* 2010;28:3491-3497.
160. Malka D, Cervera P, Foulon S, Trarbach T, de la Fouchardière C, Boucher E, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary- tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:819-828.
161. Chen JS, Hsu C, Chiang NJ, Tsai CS, Tsou HH, Huang SF, et al. KRAS mutation status stratified randomized phase II trial of GEMOX with and without cetuximab in advanced biliary tract cancer. *Ann Oncol* 2015;26:943-949.
162. Sohal DP, Mykulowycz K, Uehara T, Teitelbaum UR, Damjanov N, Giantonio BJ, et al. A phase II trial of gemcitabine, irinotecan and panitumumab in advanced cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 2013;24:3061-3065.
163. Jensen LH, Lindebjerg J, Ploen J, Hansen TF, Jakobsen A. Phase II marker driven trial of panitumumab and chemotherapy in KRAS wild-type biliary tract cancer. *Ann Oncol* 2012;23:2341-2346.
164. Galdy S, Lamarca A, McNamara MG, Hubner RA, Cella CA, Fazio N, Valle JW. HER2/HER3 pathway in biliary tract malignancies; systematic review and meta-analysis: a potential therapeutic target? *Cancer Metastasis Rev* 2016;36:141-157.
165. Ramanathan RK, Belani CP, Singh DA, Tanaka M, Lenz HJ, Yen Y, et al. A phase II study of lapatinib in patients with advanced biliary tree and hepatocellular cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64:777-783.
166. Peck J, Wei L, Zalupski M, O'Neil B, Villalona Calero M, Bekaii-Saab T. HER2/neu may not be an interesting target in biliary cancers: results of an early phase II study with lapatinib. *Oncology* 2012;82:175-179.
167. Pignochino Y, Sarotto I, Peraldo-Neia C, Penachioni JY, Cavalloni G, Migliardi G, et al. Targeting EGFR/HER2 pathways enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in biliary tract and gallbladder carcinomas. *BMC Cancer* 2010;10:631. doi: 10.1186/1471-2407-10-631.



168. Roa I, de Toro G, Schalper K, de Aretxabala X, Churi C, Javle M. Overexpression of the HER2/neu gene: a new therapeutic possibility for patients with advanced gallbladder cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2014;7:42-48.
169. Suder A, Ang JE, Kyle F, Harris D, Rudman S, Kristeleit R, et al. A phase I study of daily afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in combination with weekly paclitaxel in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* 2015;51:2275-2284.
170. Javle M, Churi C, Kang HC, Shroff R, Janku F, Surapaneni R, et al. HER2/neu directed therapy for biliary tract cancer. *J Hematol Oncol* 2015;8:58. doi: 10.1186/s13045-015-0155-z.
171. Zhu AX, Meyerhardt JA, Blaszkowsky LS, Kambadakone AR, Muzikansky A, Zheng H, et al. Efficacy and safety of gemcitabine, oxaliplatin, and bevacizumab in advanced biliary-tract cancers and correlation of changes in 18- uorodeoxyglucose PET with clinical outcome: a phase 2 study. *Lancet Oncol* 2010;11:48-54.
172. Valle JW, Wasan H, Lopes A, Backen AC, Palmer DH, Morris K, et al. Cediranib or placebo in combination with cisplatin and gemcitabine chemotherapy for patients with advanced biliary tract cancer (ABC-03): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:967-978.
173. El-Khoueiry AB, Rankin C, Lenz HJ, Philip P, Rivkin SE, Blanke CD, et al. SWOG 0514: A phase II study of sorafenib (BAY 43-9006) as single agent in patients with unresectable or metastatic gallbladder cancer or cholangiocarcinomas. *J Clin Oncol* 2007;25:4639-4639.
174. Bengala C, Bertolini F, Malavasi N, Boni C, Aitini E, Dealis C, et al. Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial. *Br J Cancer* 2010;102:68-72.
175. El-Khoueiry AB, Rankin C, Siegel AB, Iqbal S, Gong IY, Micetich KC, et al. S0941: a phase 2 SWOG study of sorafenib and erlotinib in patients with advanced gallbladder carcinoma or cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2014;110:882-887.
176. Yi JH, Thongprasert S, Lee J, Doval DC, Park SH, Park JO, et al. A phase II study of sunitinib as a second-line treatment in advanced biliary tract carcinoma: a multicentre, multinational study. *Eur J Cancer* 2012;48:196-201.
177. Santoro A, Gebbia V, Pressiani T, Testa A, Personeni N, Arrivas Bajardi E, et al. A randomized, multicenter, phase II study of vandetanib monotherapy versus vandetanib in combination with gemcitabine versus gemcitabine plus placebo in subjects with advanced biliary tract cancer: The VanGogh study. *Ann Oncol* 2015;26:542-547.
178. Yeh TC, Marsh V, Bernat BA, Ballard J, Colwell H, Evans RJ, et al. Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin Cancer Res* 2007;13:1576-1583.
179. Bekaii-Saab T, Phelps MA, Li X, Saji M, Goff L, Kauh JS, et al. Multi-institutional phase II study of selumetinib in patients with metastatic biliary cancers. *J Clin Oncol* 2011;29:2357-2363.
180. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006;439:358-362.

181. Wang P, Dong Q, Zhang C, Kuan PF, Liu Y, Jeck WR, et al. Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene* 2013;32:3091-100.
182. Zhu AX, Borger DR, Kim Y, Cosgrove D, Ejaz A, Alexandrescu S, et al. Genomic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma: refining prognosis and identifying therapeutic targets. *Ann Surg Oncol* 2014;21:3827-3834.
183. Goyal L, Govindan A, Sheth RA, Nardi V, Blaszkowsky LS, Faris JE, et al. Prognosis and clinicopathologic features of patients with advanced stage isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant and IDH wild-type intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncologist* 2015;20:1019-1027.
184. Borger DR, Goyal L, Yau T, Poon RT, Ancukiewicz M, Deshpande V et al. Circulating oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a potential surrogate biomarker in patients with isocitrate dehydrogenase mutant intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2014;20:1884-1890.
185. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science* 2013;340:626-630.
186. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 2013;340(6132):622-6.
187. Saha SK, Gordan JD, Kleinstiver BP, Vu P, Najem MS, Yeo JC, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations confer dasatinib hypersensitivity and SRC-dependence in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* 2016;6:727-739.
188. Graham RP, Barr Fritcher EG, Pestova E, Schulz J, Sitailo LA, Vasmatazis G, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 translocations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2014;45:1630-1638.
189. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:116-129.
190. Javle M, Lowery M, Shroff RT, Weiss KH, Springfield C, Borad MJ, et al. Phase II Study of BGJ398 in patients with FGFR-altered advanced cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol* 2018;36:276-282.
191. Javle M, Kelley R.W, Roychowdhury S, Weiss K.H, Abou-Alfa G.K, Macarulla T, et al. Updated results from a phase II study of infigratinib (BGJ398), a selective pan-FGFR kinase inhibitor, in patients with previously treated advanced cholangiocarcinoma containing FGFR2 fusions. *Ann Oncol* 2018;29:Issue suppl\_8, 1 October 2018. doi: 10.1093/annonc/mdy424.030.
192. Borad MJ, Champion MD, Egan JB, Liang WS, Fonseca R, Bryce AH, et al. Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS Genet* 2014;10:e1004135. doi: 10.1371/journal.pgen.1004135.
193. Hollebecque A, Borad M, Sahai V, Catenacci D, Murphy A, Vaccaro G, et al Interim results of fight-202, a phase 2, open-label, multicenter study of INCB054828 in patients (pts) with previously treated advanced/metastatic or surgically unresectable

- cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 2018;29:Issue suppl\_8, 1 October 2018. doi:10.1093/annonc/mdy282.139.
194. Mazzaferro V, El-Rayes BF, Droz Dit Busset M, Cotsoglou C, Harris WP, Damjanov N, et al. Derazantinib (ARQ 087) in advanced or inoperable FGFR2 gene fusion-positive intrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2018 Nov 13. doi: 10.1038/s41416-018-0334-0.
  195. Hall TG, Savage RE, Schwartz BJ, Yu Y, Wang Y, Kazakin J, et al. In FGFR2 driven tumors, preclinical pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD) and efficacy translate into clinical activity of ARQ 087. *Mol Cancer Ther* 2015;14 (Suppl 2) [Abstract B151]. doi: 10.1158/1535-7163.
  196. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1637-1647. Valle JW, Lamarca A, Goyal L, Barriuso J, Zhu AX. New horizons for precision medicine in biliary tract cancer. *Cancer Discov* 2017;7:943-962.
  197. Valle JW, Lamarca A, Goyal L, Barriuso J, Zhu AK. New horizons for precision medicine in biliary tract cancer. *Cancer Discov* 2017;7:943-962.
  198. Chen W, Huang L, Liang J, Cai J, Lei Y, Lai J, et al. Characterizing the activation of the Wnt signaling pathway in hilar cholangiocarcinoma using a tissue microarray approach. *Eur J Histochem* 2016;60:2536. doi: 10.4081/ejh.2016.2536.
  199. Wang W, Zhong W, Yuan J, Yan C, Hu S, Tong Y, et al. Involvement of Wnt/beta-catenin signaling in the mesenchymal stem cells promote metastatic growth and chemoresistance of cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 2015;6:42276-42289.
  200. Shen DY, Zhang W, Zeng X, Liu CQ. Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling downregulates P-glycoprotein and reverses multi-drug resistance of cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* 2013;104:1303-1308.
  201. Sugimachi K, Taguchi K, Aishima S, Tanaka S, Shimada M, Kajiyama K, et al. Altered expression of beta-catenin without genetic mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 2001;14:900-905.
  202. Tokumoto N, Ikeda S, Ishizaki Y, Kurihara T, Ozaki S, Iseki M, et al. Immunohistochemical and mutational analyses of Wnt signaling components and targets genes in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Int J Oncol* 2005;27:973-980.
  203. Jusakul A, Kongpetch S, Teh BT. Genetics of *Opisthorchis viverrini* related cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31:258-263.
  204. Hirata K, Ajiki T, Okazaki T, Horiuchi H, Fujita T, Kuroda Y. Frequent occurrence of abnormal E-cadherin/beta-catenin protein expression in advanced gallbladder cancers and its association with decreased apoptosis. *Oncology* 2006;71:102-110.
  205. Rosenbluh J, Wang X, Hahn WC. Genomic insights into WNT/beta-catenin signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2014;35:103-109.
  206. Eads JR, Lipika G, Stein S, El-Khoueiry AB, Manji GA, Abrams TA, et al. Phase I study of DKN-01, an anti-DKK1 antibody, in combination with gemcitabine and cisplatin in patients with advanced biliary cancer. *J Clin Oncol* 2017;35 (15\_Suppl) [Abstract 4075].

207. Fingas CD, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Guicciardi ME, Cazanave SC, et al. Myofibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2011;54:2076-2088.
208. Xie F, Xu X, Xu A, Liu C, Liang F, Xue M, et al. Aberrant activation of Sonic hedgehog signaling in chronic cholecystitis and gallbladder carcinoma. *Hum Pathol* 2014;45:513-521.
209. Li J, Wu T, Lu J, Cao Y, Song N, Yang T, et al. Immunohistochemical evidence of the prognostic value of hedgehog pathway components in primary gallbladder carcinoma. *Surg Today* 2012;42:770-775.
210. Tang L, Tan YX, Jiang BG, Pan YF, Li SX, Yang GZ, et al. The prognostic significance and therapeutic potential of hedgehog signaling in intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:2014-2024.
211. Matsushita S, Onishi H, Nakano K, Nagamatsu I, Imaizumi A, Hattori M, et al. Hedgehog signaling pathway is a potential therapeutic target for gallbladder cancer. *Cancer Sci* 2014;105:272-280.
212. Riedlinger D, Bahra M, Boas-Knoop S, Lippert S, Bradtmöller M, Guse K, et al. Hedgehog pathway as a potential treatment target in human cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014;21:607-615.
213. Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, Shimizu H, Kokubu A, Hiraoka N, et al. Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2011;105:131-138.
214. Terada T, Nakanuma Y, Sirica AE. Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis. *Hum Pathol* 1998;29:175-180.
215. Li H, Shimura H, Aoki Y, Date K, Matsumoto K, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor stimulates the invasion of gallbladder carcinoma cell lines in vitro. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:74-82.
216. Goyal L, Zheng Y, Yurgelum MB, Abrams TA, Allen JN, Cleary JM, et al. A phase 2 and biomarker study of cabozantinib in patients with advanced cholangiocarcinoma. *Cancer* 2017;123:1979-1988.
217. O'Neill E, Kolch W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/ MEK signalling pathway. *Br J Cancer* 2004;90:283-288.
218. Chen TC, Jan YY, Yeh TS. K-ras mutation is strongly associated with perineural invasion and represents an independent prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma after hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2012;19:S675-S681.
219. Pai RK, Mojtahed K, Pai RK. Mutations in the RAS/RAF/MAP kinase pathway commonly occur in gallbladder adenomas but are uncommon in gallbladder adenocarcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011;19:133-140.
220. Goeppert B, Frauenschuh L, Renner M, Roessler S, Stenzinger A, Klauschen F, et al. BRAF V600E specific immunohistochemistry reveals low mutation rates in biliary tract cancer and restriction to intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 2014;27:1028-1034.

221. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay J, et al. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2015;373:726-736.
222. Bridgewater J, Lopes A, Beare S, Duggan M, Lee D, Ricamara M, et al. A phase 1b study of selumetinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced or metastatic biliary tract cancer: the ABC-04 study. *BMC Cancer* 2016;16:153. doi: 10.1186/s12885-016-2174-8.
223. Lowery MA, O'Reilly EM, Harding JJ, Salehi E, Hollywood E, Bradley M, et al. A phase I trial of binimetinib in combination with gemcitabine and cisplatin patients with untreated advanced biliary cancer (ABC). *J Clin Oncol* 2015;33 (15\_Suppl):e15125.
224. Bridgewater J, Lopes A, Beare S, Duggan M, Lee D, Ricamara M, et al. A phase 1b study of selumetinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced or metastatic biliary tract cancer: the ABC-04 study. *BMC Cancer* 2016;16:153. doi: 10.1186/s12885-016-2174-8.
225. Shroff RT, Yarchoan M, O'Connor A, Gallagher D, Zahurak ML, Rosner G, et al. The oral VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor pazopanib in combination with the MEK inhibitor trametinib in advanced cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2017;116:1402-1407.
226. Ahn DH, Li J, Wei L, Doyle A, Marshall JL, Schaaf LJ, et al. Results of an abbreviated phase-II study with the Akt inhibitor MK-2206 in patients with advanced biliary cancer. *Sci Rep* 2015;5:12122. doi: 10.1038/srep12122.
227. Chung JY, Hong SM, Choi BY, Cho H, Yu E, Hewitt SM. The expression of phospho-AKT, phospho-mTOR, and PTEN in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:660-667.
228. Lau DK, Tay RY, Yeung YH, Chionh F, Mooi J, Murone C, et al. Phase II study of everolimus (RAD001) monotherapy as first line treatment in advanced biliary tract cancer with biomarker exploration: the RADiChol Study. *Br J Cancer* 2018;118:966-971.
229. Drilon A, Siena S, Ou SI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, et al. Safety and antitumor activity of the multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK inhibitor entrectinib: combined results from two phase I trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov* 2017;7:400-409.
230. Hyman DM, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Farago AF, Pappo AS, et al. Efficacy of larotrectinib (LOXO-101), a selective tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitor, in adult and pediatric TRK fusion cancers. *J Clin Oncol* 2017;35 (18\_Suppl), LBA2501.
231. Marks E, Yee NS. Immunotherapeutic approaches in biliary tract carcinoma: current status and emerging strategies. *World J Gastrointest Oncol* 2015;7:338-346.
232. Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, et al. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod Pathol* 2006;19:804-814.
233. Kaida M, Morita-Hoshi Y, Soeda A, Wakeda T, Yamaki Y, Kojima Y, et al. Phase 1 trial of Wilms tumor 1 (WT1) peptide vaccine and gemcitabine combination therapy

- in patients with advanced pancreatic or biliary tract cancer. *J Immunother* 2011;34:92-99.
234. Park SY, Roh SJ, Kim YN, Kim SZ, Park HS, Jang KY, et al. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact. *Oncol Rep* 2009;22:649-657
235. Yamamoto K, Ueno T, Kawaoka T, Hazama S, Fukui M, Suehiro Y, et al. MUC1 peptide vaccination in patients with advanced pancreas or biliary tract cancer. *Anticancer Res* 2005;25:3575-3579.
236. Lepisto AJ, Moser AJ, Zeh H, Lee K, Bartlett D, McKolanis JR, et al. A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors. *Cancer Ther* 2008;6: 955-964.
237. Kobayashi M, Sakabe T, Abe H, Tanii M, Takahashi H, Chiba A, et al. Dendritic cell-based immunotherapy targeting synthesized peptides for advanced biliary tract cancer. *J Gastrointest Surg* 2013;17:1609-1617.
238. Aruga A, Takeshita N, Kotera Y, Okuyama R, Matsushita N, Ohta T, et al. Phase I clinical trial of multiple-peptide vaccination for patients with advanced biliary tract cancer. *J Transl Med* 2014;12:61. doi: 10.1186/1479-5876-12-61.
239. Aruga A, Takeshita N, Kotera Y, Okuyama R, Matsushita N, Ohta T, et al. Long-term vaccination with multiple peptides derived from cancer-testis antigens can maintain a specific T-cell response and achieve disease stability in advanced biliary tract cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:2224-2231.
240. Yoshitomi M, Yutani S, Matsueda S, Itoji T, Komatsu N, Shichijo S, et al. Personalized peptide vaccination for advanced biliary tract cancer: IL-6, nutritional status and pre-existing antigen-specific immunity as possible biomarkers for patient prognosis. *Exp Ther Med* 2012;3:463-469.
241. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:299-308.
242. Dudley ME, Gross CA, Langhan MM, Garcia MR, Sherry RM, Yang JC. CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:6122-6131.
243. Higuchi R, Yamamoto M, Hatori T, Shimizu K, Imai K, Takasaki K. Intrahepatic cholangiocarcinoma with lymph node metastasis successfully treated by immunotherapy with CD3-activated T cells and dendritic cells after surgery: report of a case. *Surg Today* 2006;36:559-562.
244. Shimizu K, Kotera Y, Aruga A, Takeshita N, Takasaki K, Yamamoto M. Clinical utilization of postoperative dendritic cell vaccine plus activated T-cell transfers in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2012;19:171-178.
245. Gani F, Nagarajan N, Kim Y, Zhu Q, Luan L, Bhajjje F, et al. Program Death 1 Immune Checkpoint and Tumor Microenvironment: Implications for patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2016;23:2610-2617.

246. Fontugne J, Augustin J, Pujals A, Compagnon P, Rousseau B, Luciani A, et al. PD-L1 expression in perihilar and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 2017;8:24644-24651.
247. Ye Y, Zhou L, Xie X, Jiang G, Xie H, Zheng S. Interaction of B7-H1 on intrahepatic cholangiocarcinoma cells with PD-1 on tumor-infiltrating T cells as a mechanism of immune evasion. *J Surg Oncol* 2009;100:500-504.
248. Bang YJ, Doi T, De Braud F, Piha-Paul S, Hollebecque A, Abdul AR, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab (MK-3475) in patients (pts) with advanced biliary tract cancer: Interim results of KEYNOTE-028. *Eur J Cancer* 2015;51:112-117.
249. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulach LK, et al. Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017;357:409-413.
250. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509-2520.
251. Camidge DR, Doebele RC. Treating ALK-positive lung cancer-early successes and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:268-277.
252. Horn L, Pao W. EML4-ALK: homing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:4232-4235.
253. Albanell J, Baselga J. Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer. *Drugs Today (Barc)* 1999;35:931-946.
254. Verlingue L, Malka D, Allorant A, Massard C, Ferté C, Lacroix L, et al. Precision Medicine for patients with advanced biliary tract cancers: An effective strategy within the prospective MOSCATO-01 trial. *Eur J Cancer* 2017;87:122-130.

## Apéndice

**Tabla 1.** Panel de genes analizados por la técnica de Sequenom

AKT1	ERBB2	IDH2
AKT2	ERBB3	KRAS
AKT3	GNAQ	MET
BRAF	GNAS	NRAS
EGFR	IDH1	PIK3CA

**Tabla 2.** Panel de genes analizados por *next generation sequencing (NGS)*

ABL1	ERBB3	IDH1	MYC	RNF43
AKT1	ESR1	IDH2	NF2	RUNX1
AKT2	FBXW7	JAK1	NOTCH1	SMAD4
AKT3	FGFR1	JAK3	NOTCH4	SMARCB1
ALK	FGFR2	KIT	NRAS	SRC
APC	FGFR3	KRAS	PDGFRA	STK11
BRAF	FGFR4	MAG	PIK3CA	TP53
CDH1	FLT3	MAP2K1	PIK3R1	VHL
CDKN2A	GATA1	MET	PIK3R5	ZNRF3
CSF1R	GNA11	MLH1	PTCH1	
CTNNB1	GNAQ	MPL	PTEN	
EGFR	GNAS	MSH6	RB1	
ERBB2	HRAS	MTOR	RET	

**Tabla 3.** Panel de genes analizados mediante la plataforma FoundationONE

ABL1	ABL2	ACVR1	AKT1	AKT2
AKT3	ALK	APC	AMER1 (FAM123B)	ARAF
ARFRP1	ARID1A	ARID1B	ARID2	ASXL1
ATM	ATR	ATRX	AURKA	AURKB
AXIN1	AXL	BAP1	BARD1	BCL2
BCL2L1	BCL2L2	BCL6	BCOR	BCORL1
BLM	BRAF	BRCA1	BRCA2	BRD4
BRIP1	BTG1	BTK	C11orf30 (EMSY)	CARD1
CBFD	CBL	CCNE1	CCND1	CCND2



CCND3	CD274 (PD-L1)	CD79A	CD79B	CDC73
CDH1	CDK12	CDK4	CDK6	CDK8
CDKN1A	CDKN1B	CDKN2A	CDKN2B	CDKN2C
CEBPA	CHD2	CHD4	CHEK1	CHEK2
CIC	CREBBP	CRKL	CRLF2	CSF1R
CTCF	CTNNA1	CTNNB1	CUL3	CYLD
DAXX	DDR2	DICER1	DNMT3A	DOT1L
EGFR	EP300	EPHA3	EPHA5	EPHA7
EPHB1	ERBB2	ERBB3	ERBB4	ERG
ERRF1	ESR1	EZH2	FAM46C	FANCA
FANCC	FANCD2	FANCE	FANCF	FANCG
FANCL	FAS	FAT1	FBXW7	FGF10
FGF14	FGF19	FGF23	FGF3	FGF4
FGF6	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4
FH	FLCN	FLT1	FLT3	FLT4
FOXL2	FOXP1	FRS2	FUBP1	GABRA6
GATA1	GATA2	GATA3	GATA4	GATA6
GID4	(C17orf39)	GLI1	GNA11	GNA13
GNAQ	GNAS	GPR124	GRIN2A	GRM3
GSK3B	H3F3A	HGF	HNF1A	HRAS
HSD3B1	HSP90AA1	IDH1	IDH2	IGF1R
IGF2	IKBKE	IKZF1	IL7R	INHBA
INPP4B	IRF2	IRF4	IRS2	JAK1
JAK2	JAK3	JUN	KAT6A(MYST3)	KDM5A
KDM5C	KDM6A	KDR	KEAP1	KEL
KIT	KLHL6	KMY2A(MLL)	KMT2C(MLL3)	KMT2D(MLL2)
KRAS	LMO1	LRP1B	LYN	LZTR1
MAGI2	MAP2K1(MEK1)	MAP2K2(MEK2)	MAP2K4	MAP3K1
MCL1	MDM2	MDM4	MED12	MEF2B
MEN1	MET	MITF	MLH1	MPL
MRE11A	MSH2	MSH6	MTOR	MUTYH
MYC	MYCL(MYCL1)	MYCN	MYD88	NF1
MF2	NFE2L2	NFKBIA	NKX2-1	NOTCH1
NOTCH2	NOTCH3	NPM1	NRAS	NSD1
NTRK1	NTRK2	NTRK3	NUP93	PAK3

PALB2	PARK2	PAX5	PBRM1	PDCD1LG2 (PD-L2)
PDGFRA	PDGFRB	PK1	PIK3C2B	PIK3CA
PIK3CB	PIK3CG	PIK3R1	PIK3R2	PLCG2
PMS2	POLD1	POLE	PPP2R1A	PRDM1
PREX2	PRKAR1A	PRKCI	PRKDC	PRSS8
PTCH1	PTEN	PTPN11	QKI	RAK1
RAD50	RAD51	RAF1	RANBP2	RARA
RB1	RBM10	RET	RICTOR	RNF43
ROS1	RPTOR	RUNX1	RUNX1T1	SDHA
SDHB	SDHC	SDHD	SETD2	SF3B1
SLIT2	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMARCA4
SMARCB1	SMO	SNCAIP	SOCS1	SOX10
SOX2	SOX9	SPEN	SPOP	SPTA1
SRC	STAG2	STAT3	STAT4	STK11
SUFU	SYH	TAF1	TBX3	TERC
TERT	TET2	TGFBR2	TNFAIP3	TNFRSF14
TOP1	TOP2A	TP53	TSC1	TSC2
TSHR	U2AF1	VEGFA	VHL	WISP3
WT1	XPO1	ZBTB2	ZNF217	ZNF703

ALK	BCL2	BCR	BRAF	BRCA1
BRCA2	BRD4	EGFR	ETV1	ETV4
ETV5	ETV6	FGFR1	FGFR2	FGFR3
KIT	(MSH2)	MYB	MYC	NOTCH2
NTRK1	NTRK2	PDGFRA	RAF1	RARA
RET	ROS1	TMPRSS2		

**Tabla 4.** Panel de genes analizados por Nanostring (nCounter versión 3)

EML4 E13-ALK E20	CD44 E1-FGFR2 E3	NAV2 E3-TCF7L1 E4
EML4 E20-ALK E20	SLC45A3 E1-FGFR2 E2	VTI1A E2-TCF7L2 E4
EML4 E6-ALK E20	FGFR3 E17-AES E2	VTI1A E2-TCF7L2 E5
AKAP9 E8-BRAF E9	FGFR3 E17-ELAVL3 E2	VTI1A E2-TCF7L2 E6
KIAA1549 E15-BRAF E9	FGFR3 E17-LETM1 intron10	VTI1A E3-TCF7L2 E4
KIAA1549 E14-BRAF E9	FGFR3 E17 intron-TACC3 E4	VTI1A E3-TCF7L2 E5
KIAA1549 E15-BRAF E11	FGFR3 E17-BAIAP2L1 E2	VTI1A E3-TCF7L2 E6
BAG4 E2-FGFR1 E6	FGFR3 E17-TACC3 E10	VTI1A E4-TCF7L2 E4
ERLIN2 E10-FGFR1 E4	FGFR3 E17-TACC3 E11	VTI1A E4-TCF7L2 E5
FGFR1 E17-TACC1 E7	FGFR3 E17-TACC3 E4	VTI1A E4-TCF7L2 E6
FGFR2 E17-AFF3 E8	FGFR3 E17-TACC3 E8	CCDC6 E1-RET E12
FGFR2 E17-AHCYL1 E2	RANBP17 E28-FGFR3 E14	KIF5B E15-RET E12
FGFR2 E17-ATE1 E12	EGFR vIII (E1-E8)	KIF5B E16-RET E12
FGFR2 E17-BICC1 E3	RSPO1	KIF5B E22-RET E12
FGFR2 E17-CASP7 E4	RSPO2	NCOA4 E8-RET E12
FGFR2 E17-CCDC147 E2	RSPO3	PRKAR1A E7-RET E12
FGFR2 E17-CIT E23	RSPO4	TPM3 E7-NTRK1 E10
FGFR2 E17-FAM76A E2	EIF3E E1-RSPO2_E1	TPR E21-NTRK1 E10
FGFR2 E17-GAB2 E2	EIF3E E1-RSPO2_E2	ETV6 E5-NTRK3 E15
FGFR2 E17-KIAA1967 E5	EIF3E E5-RSPO2_E1	ETV6 E4-NTRK3 E14
FGFR2 E17-MCU E2	EIF3E E5-RSPO2 E2	CD74 E6-ROS1 E34
FGFR2 E17-OFD1 E3	PTPRK E13-RSPO3 E2	SLC34A2 E4-ROS1 E32
FGFR2 E17-VCL E15	PTPRK E1-RSPO3 E2	
FGFR2 E2-WDR11 E20	PTPRK E2-RSPO3 E2	
FGFR2 E16-KIAA1598 E7	PTPRK E6-RSPO3 E2	
FGFR2 E16-TACC3 E11	PTPRK E7-RSPO3 E2	
FGFR2 E17-NOL4 E7	NAV2 E1-TCF7L1 E4	

**Tabla 5.** Panel de genes analizados por Nanostring (nCounter versión 4)

EML4 E13-ALK E20	CD44 E1-FGFR2 E3	EIF3E E5-RSPO2_E1
EML4 E20-ALK E20	SLC45A3 E1-FGFR2 E2	EIF3E E5-RSPO2 E2
EML4 E6-ALK E20	FGFR3 E17-AES E2	PTPRK E13-RSPO3 E2
AKAP9 E8-BRAF E9	FGFR3 E17-ELAVL3 E2	PTPRK E1-RSPO3 E2
KIAA1549 E15-BRAF E9	FGFR3 E17-LETM1 intron10	PTPRK E2-RSPO3 E2
KIAA1549 E14-BRAF E9	FGFR3 E17 intron-TACC3 E4	PTPRK E6-RSPO3 E2
KIAA1549 E15-BRAF E11	FGFR3 E17-BAIAP2L1 E2	PTPRK E7-RSPO3 E2
BAG4 E2-FGFR1 E6	FGFR3 E17-TACC3 E4	NAV2 E1-TCF7L1 E4
ERLIN2 E10-FGFR1 E4	FGFR3 E17-TACC3 E8	NAV2 E3-TCF7L1 E4
FGFR1 E17-TACC1 E7	FGFR3 E17-TACC3 E10	VTI1A E2-TCF7L2 E4
FGFR2 E17-AFF3 E8	FGFR3 E17-TACC3 E11	VTI1A E2-TCF7L2 E5
FGFR2 E17-AHCYL1 E2	RANBP17 E28-FGFR3 E14	VTI1A E2-TCF7L2 E6
FGFR2 E17-ATE1 E12	EGFR vIII (E1-E8)	VTI1A E3-TCF7L2 E4
FGFR2 E17-BICC1 E3	MET E13-E15	VTI1A E3-TCF7L2 E5
FGFR2 E17-CASP7 E4	LMNA E2- NTRK1 E10	VTI1A E3-TCF7L2 E6
FGFR2 E17-CCDC147 E2	LMNA E2- NTRK1 E11	VTI1A E4-TCF7L2 E4
FGFR2 E17-CIT E23	LMNA E10- NTRK1 E12	VTI1A E4-TCF7L2 E5
FGFR2 E17-FAM76A E2	LMNA E10- NTRK1 E13	VTI1A E4-TCF7L2 E6
FGFR2 E17-GAB2 E2	TPM3 E7-NTRK1 E10	CCDC6 E1-RET E12
FGFR2 E17-KIAA1967 E5	TPR E21-NTRK1 E10	KIF5B E15-RET E12
FGFR2 E17-MCU E2	ETV6 E5-NTRK3 E15	KIF5B E16-RET E12
FGFR2 E17-OFD1 E3	ETV6 E4-NTRK3 E14	KIF5B E22-RET E12
FGFR2 E17-VCL E15	PAX8 E8-PPARG E2	NCOA4 E8-RET E12
FGFR2 E2-WDR11 E20	PAX8 E9-PPARG E2	PRKAR1A E7-RET E12
FGFR2 E16-KIAA1598 E7	PAX8 E10-PPARG E2	CD74 E6-ROS1 E34
FGFR2 E16-TACC3 E11	EIF3E E1-RSPO2_E1	EZR E10-ROS1 E34
FGFR2 E17-NOL4 E	EIF3E E1-RSPO2_E2	SLC34A2 E4-ROS1 E32