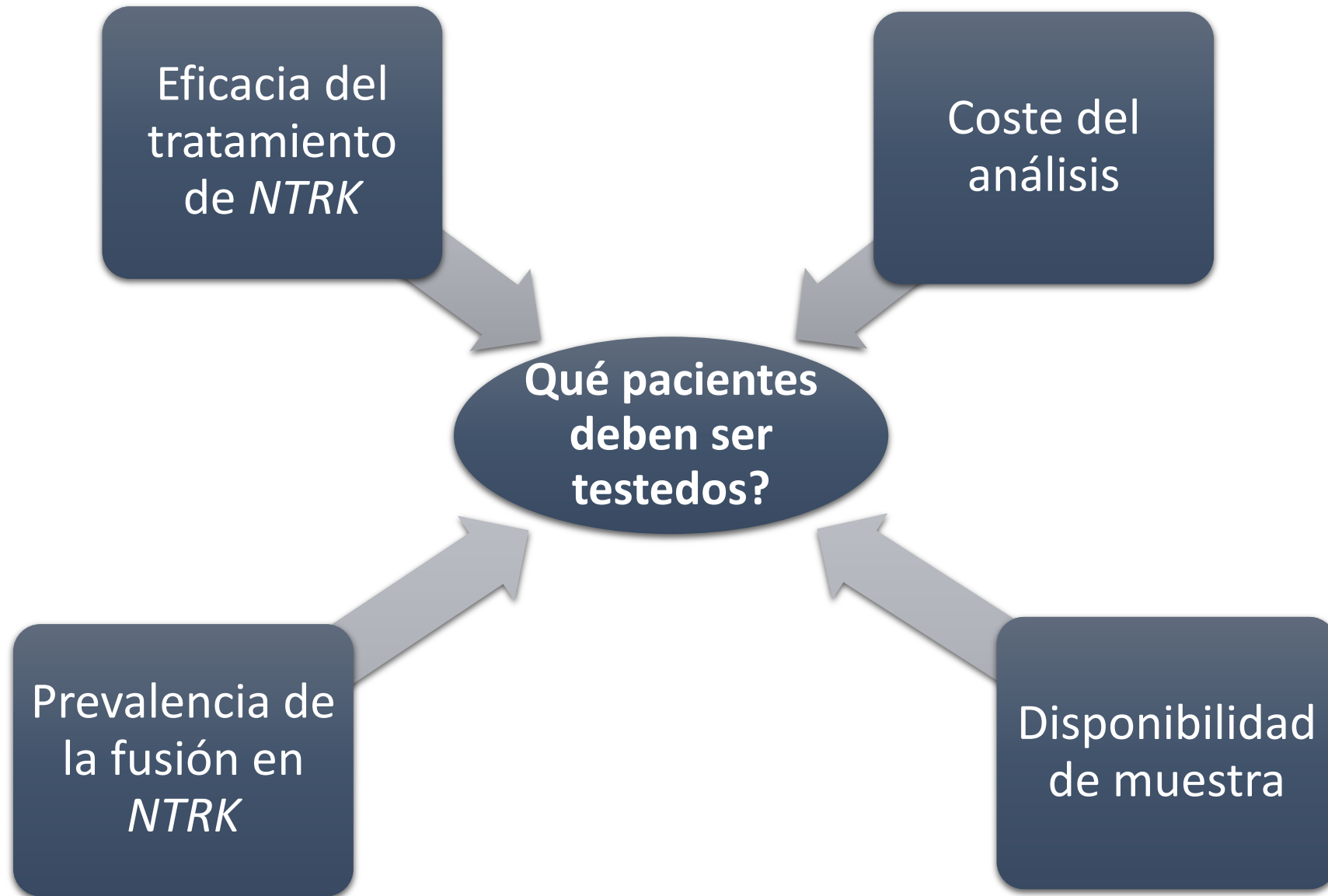


**I Reunión
Gallega**
de consenso sobre
**la fusión
pantumor NTRK**

TÉCNICAS DE DETECCIÓN POBLACIONES ENRIQUECIDAS

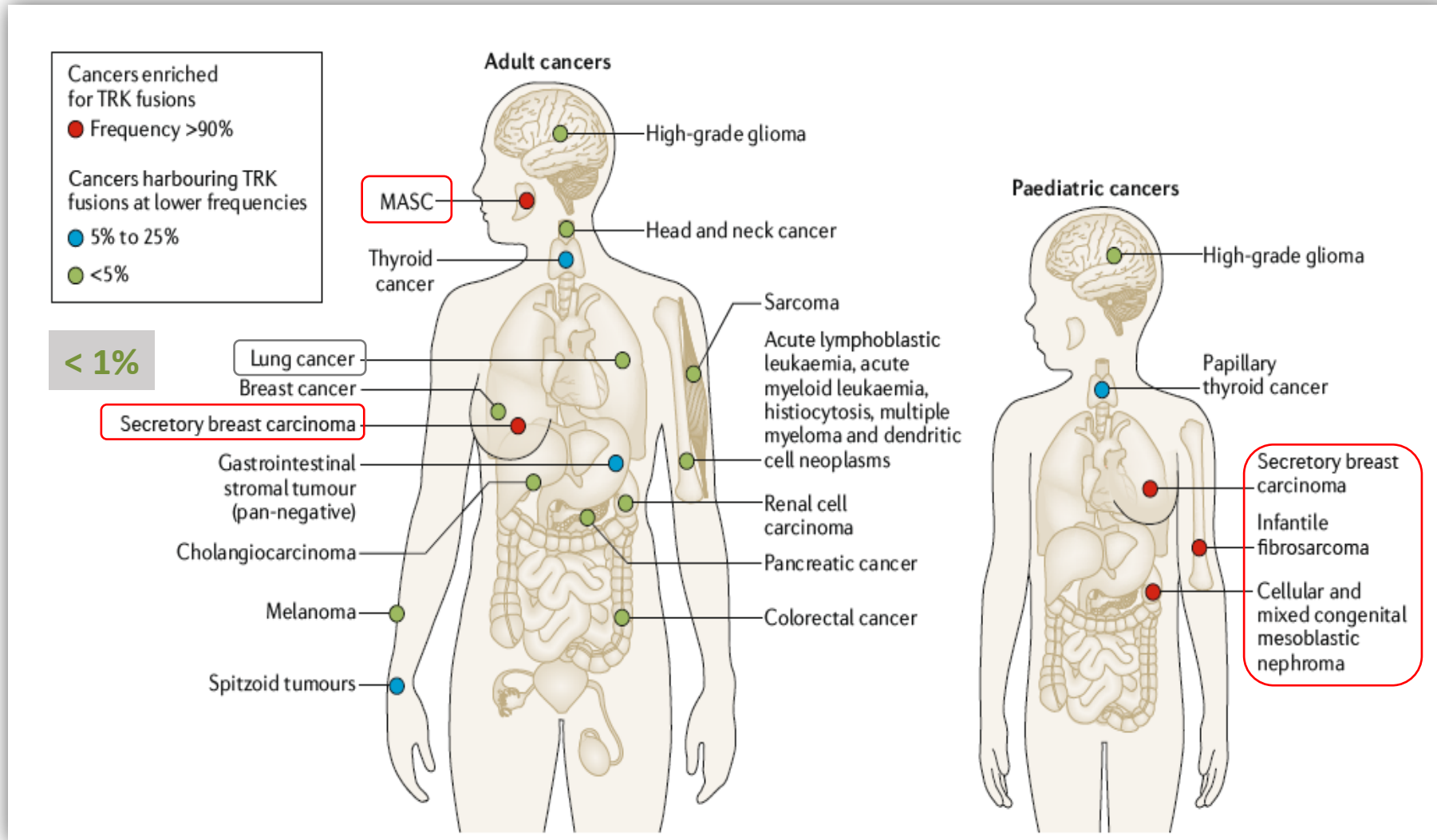
Dr Ihab Abdulkader Nallib
Servicio de Anatomía Patológica
Complejo Hospitalario Universitario
Santiago de Compostela





Prevalencia de fusiones de *NTRK* en tumores pediátricos y de adultos

Comunes en tumores raros, raras en tumores comunes



Prevalencia de fusiones en *NTRK* en tumores sólidos

Variable según el estudio, la cohorte y el método de análisis de fusiones

Solomon JP et al. Mod Pathol. 2019

- 38.095 muestras analizadas por NGS basada en ADN → 107 casos positivos para fusión en *NTRK* (**0.28%**).
- 2189 muestras analizadas por NGS basada en ARN → 87 casos positivos para fusión en *NTRK* (3.97%).
- La secuenciación basada en ADN mostró una sensibilidad y especificidad de 81,1% y 99,9%, respectivamente, para la detección de fusiones *NTRK* en comparación con la secuenciación basada en ARN.

Gatalica Z et al. Mod Pathol. 2019

- Se analizaron 11.502 muestras de tejido FFPE de diversos tipos de tumores sólidos mediante el panel de 53 genes de ArcherDx FusionPlex.
- Fueron detectados 31 casos (**0.27%**) positivos para fusión en *NTRK*.

Okamura R et al. JCO Precis Oncol. 2018

- Se analizaron 9.966 tumores adultos (33 tipos distintos) y 3.501 tumores pediátricos (17 tipos distintos) procedentes del TCGA mediante NGS basada en el análisis de ARN.
- En tumores adultos el porcentaje de positividad para *NTRK* fue del **0.31%**.
- En tumores pediátricos el porcentaje de positividad fue del **0.34%**

Tumores mesenquimales con reordenamiento de *NTRK*

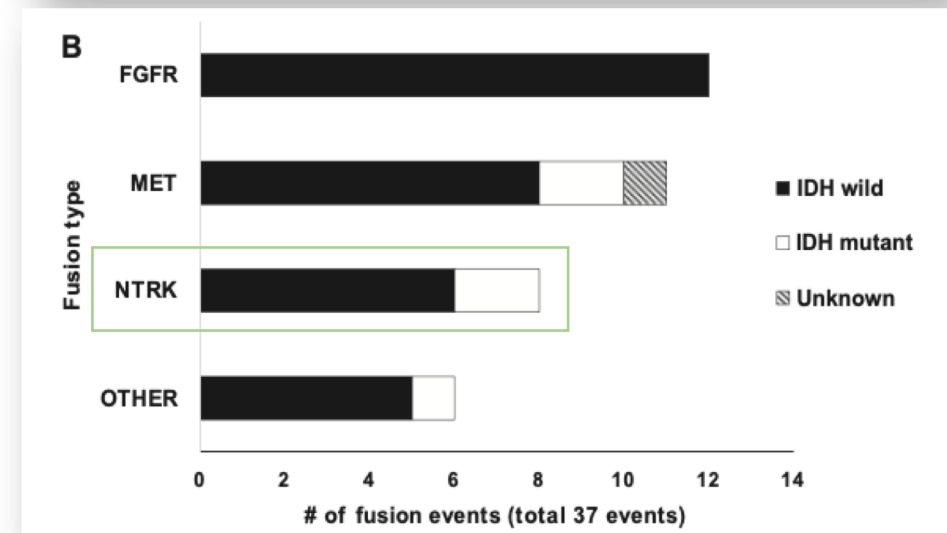
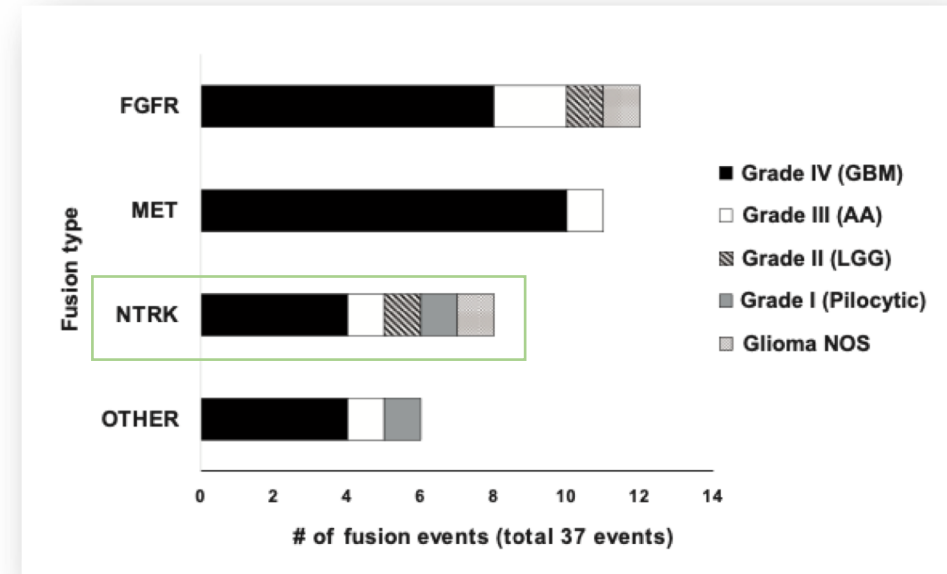
- ❑ Prevalencia de fusión de *NTRK* del 0.8%.
- ❑ Pan-TRK positivo en 3.2% (16/494):
 - 5 casos con tinción difusa.
 - 11 casos con tinción focal.
- ❑ Presente en lesiones benignas y malignas de bajo y alto grado.
- ❑ 90% muestran más de un patrón morfológico.
- ❑ Inmuno-fenotipo: : co-expresión al menos focal de S100 y CD34 y, con expresión negativa de SOX10 y H3K27me.
- ❑ Tumores con fusión en *NTRK1* muestran tinción citoplasmática difusa y fuerte . Los que presentan fusión en *NTRK3* poseen tinción nuclear.

Carcinoma de mama con reordenamiento de *NTRK*

- ❑ Análisis de fusiones en un cohorte de 4854 pacientes usando los paneles MSK-IMPACT (ADN) y/o MSK-Fusion targeted RNAseq.
- ❑ Son extremadamente raras 0.08% (4/4854).
- ❑ Carcinomas metastásicos resistentes a hormonas.
- ❑ Progresión después de la terapia endocrina.
- ❑ *ESR1* wild-type.

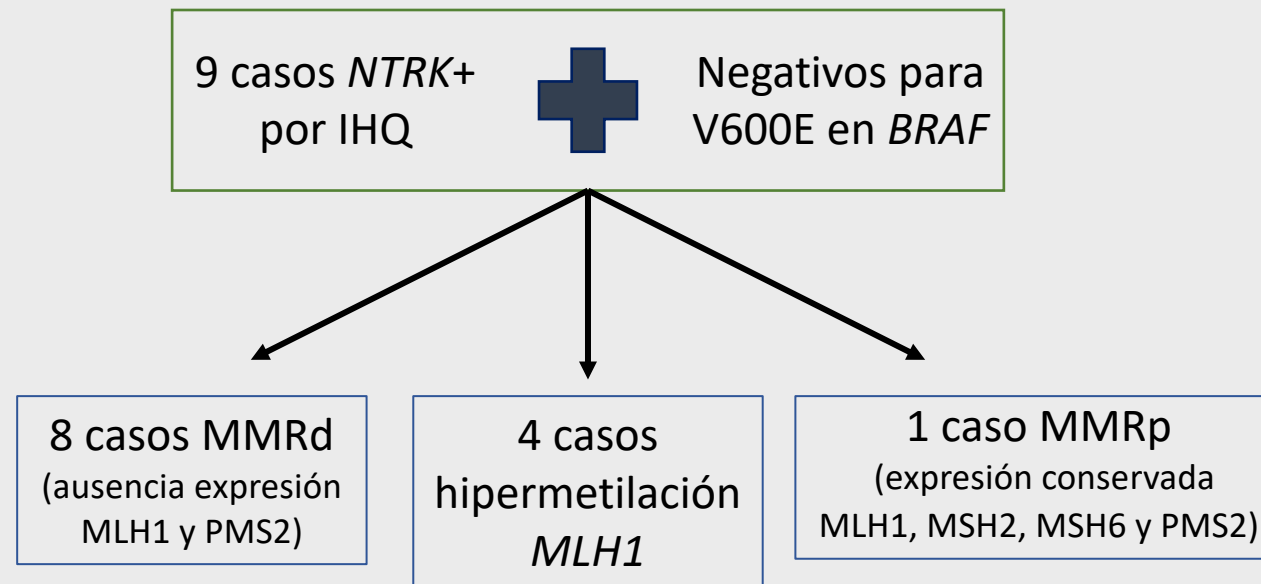
Tumores del SNC con reordenamiento de *NTRK*

- ❑ Análisis de fusión de *NTRK* en 390 muestras de gliomas (FFPE) mediante NGS basada en ARN (Archer FusionPlex Solid Tumor panel).
- ❑ Prevalencia 2.05% (8/390).
- ❑ Tumores astrocitarios de alto grado.
- ❑ *IDH* wild-type.
- ❑ La mayoría presentan fusión en *NTRK2* (6/8), cada uno con una pareja distinta.



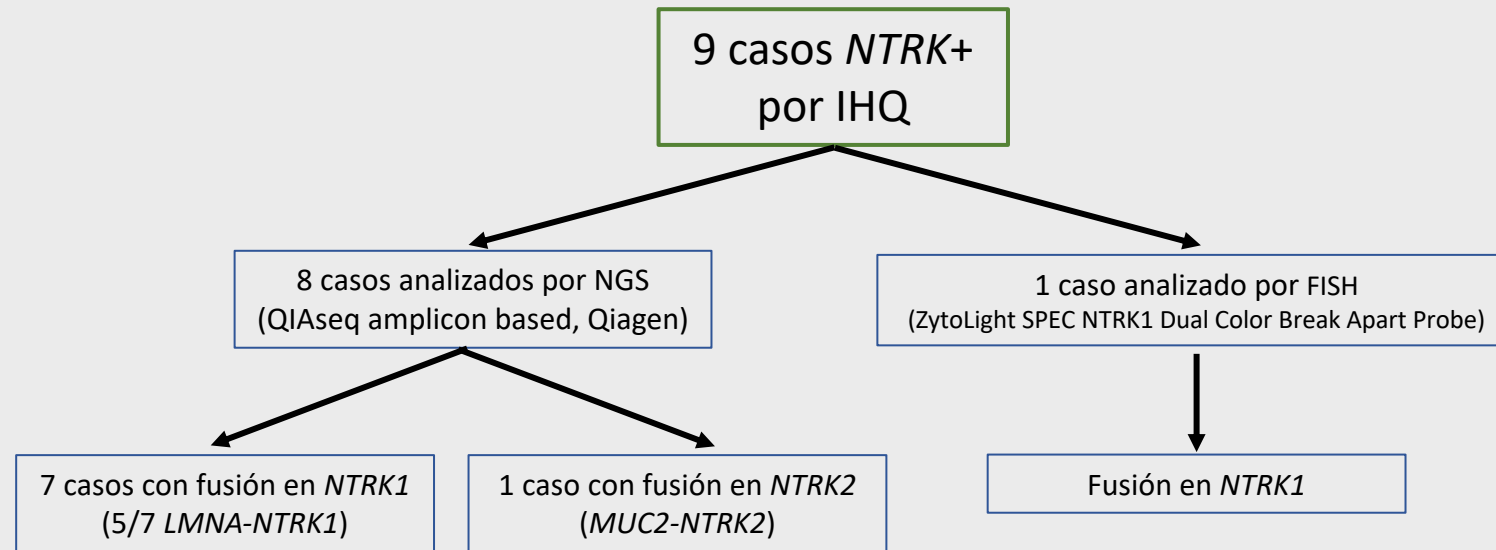
Carcinoma colorrectal con reordenamiento de *NTRK*

- ❑ La frecuencia de fusión en *NTRK* se sitúa entre el 0.16% y 0.3% en CRC.
- ❑ No histología específica en *NTRK* + (patrón sólido-cribiforme, diferenciación mucinosa y prominente infiltrado linfocitario).
- ❑ En una cohorte de 4569 pacientes con CRC analizados por IHQ (pan-TRK), el 0.2% (9/4569) de los casos mostraron una tinción citoplasmática difusa fuerte.



Carcinoma colorrectal con reordenamiento de *NTRK*

- ❑ 4569 se seleccionaron los MMRd → análisis NTRK por IHQ → 0.9% expresión positiva.
- ❑ 4569 se seleccionaron los MMRd sin la mutación V600E en *BRAF* → 5.3% expresión positiva para NTRK.



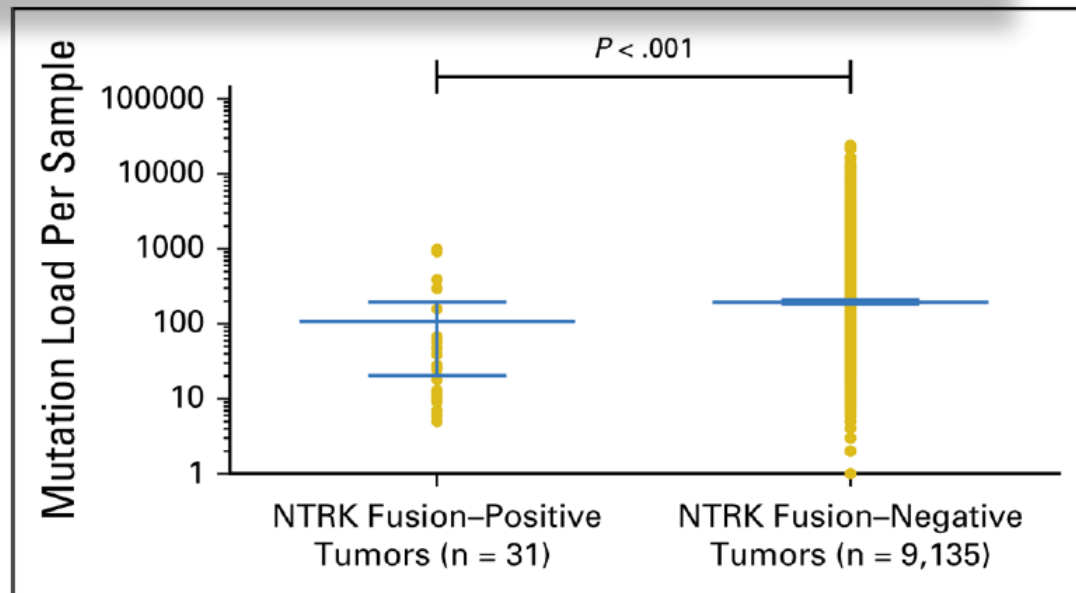
- ❑ Los CRCs triple negativos (PMS2/MLH1/*BRAFV600E*) o cuádruple negativos (PMS2/MLH1/*BRAF/V600E/RAS*) mostraron ↑positividad para NTRK por IHQ.

Cáncer de tiroides con reordenamiento de *NTRK*

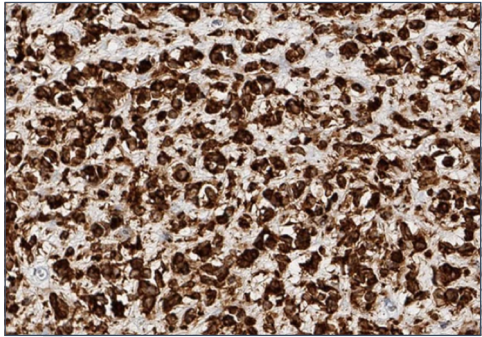
- ❑ Carcinoma papilar y anaplásico.
- ❑ Carcinoma papilar expuestos a radiación.
- ❑ Fusión *NTRK3*:
 - Patrón de crecimiento folicular o mixto (folicular y papilar).
 - Cambios de células claras y oncocíticas.
 - Mayor prevalencia de metástasis ganglionar.
 - Antecedentes de tiroiditis linfocítica crónica
- ❑ Fusión *NTRK1*:
 - Pacientes jóvenes.
 - Enfermedad localmente avanzada.

Carcinomas con reordenamiento de *NTRK*

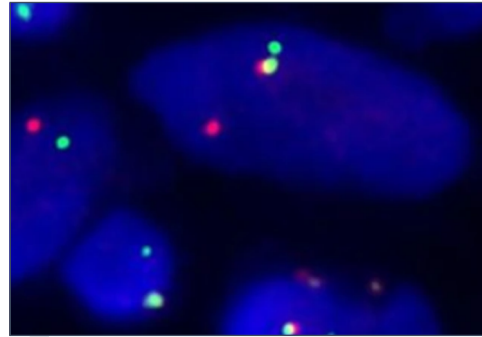
- ❑ Histologías poco comunes.
- ❑ Ausencia de mutaciones driver alternativas.
- ❑ Carga mutacional tumoral generalmente más baja (TMB).



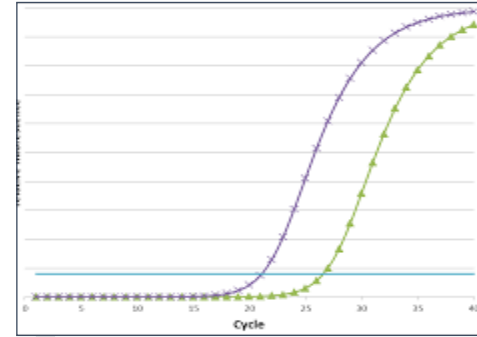
Metodologías para el análisis de NTRK



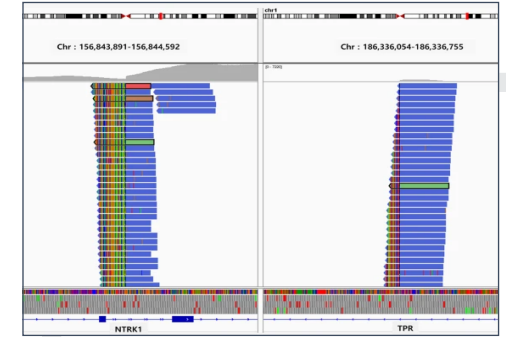
Inmunohistoquímica



FISH



RT-PCR



NGS

Table 1. Summary of main features, strengths and weaknesses of all available techniques to detect *NTRK* rearrangements

Method	Sensitivity	Specificity	Detection of all fusion genes	Detection of partner	Detection of expression	Screening
IHC	High ^a	High ^b	Yes	No	Yes	Yes
FISH ^c	High	High	One per probe	No	No	No
RNA seq NGS	High	High	Yes	Yes	Yes	Yes
DNA seq ^c	Moderate	High	Yes	Yes	No	Yes

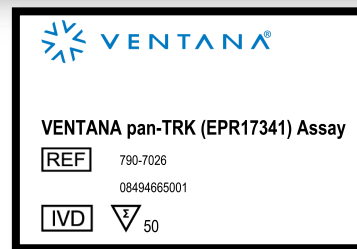
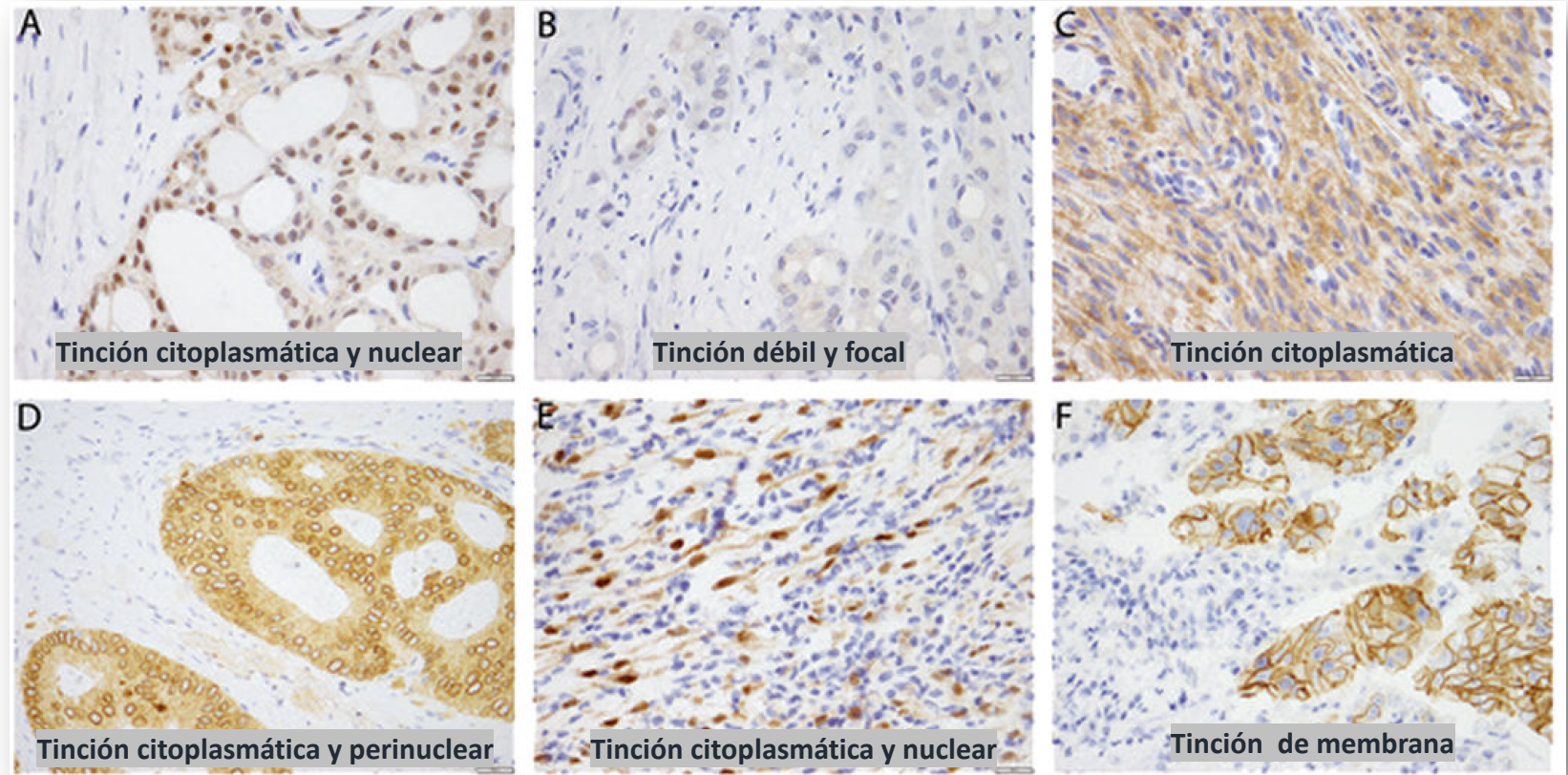
^aFalse negatives reported mainly in *NTRK3* fusions.

^bIn the absence of smooth muscle/neuronal differentiation.

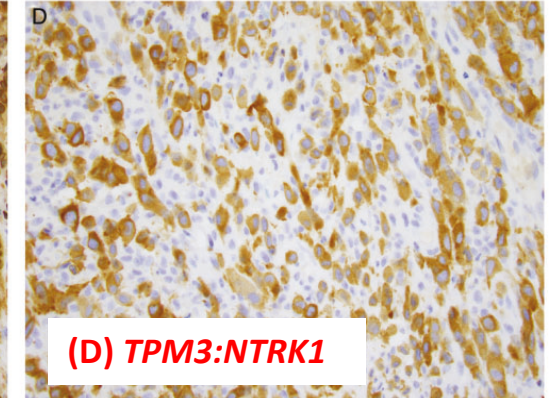
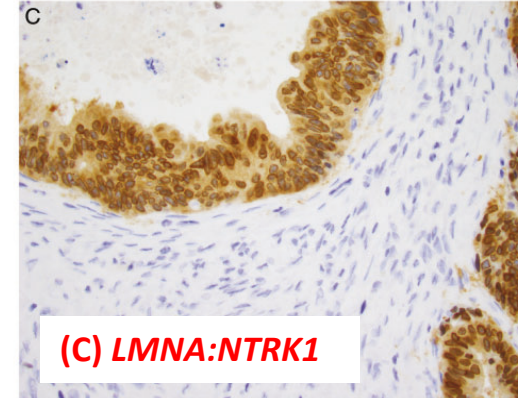
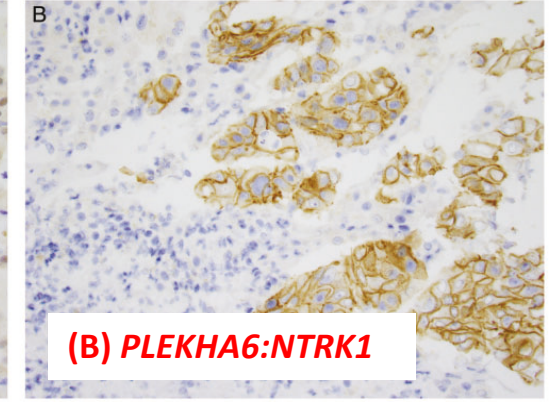
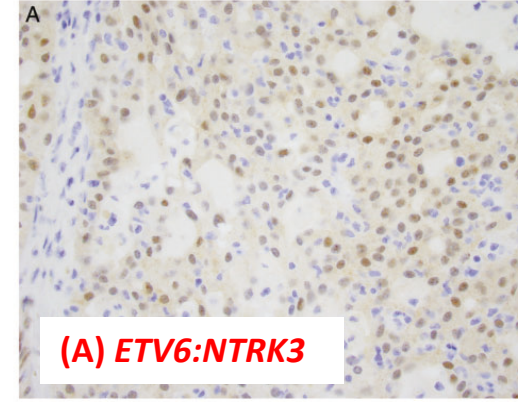
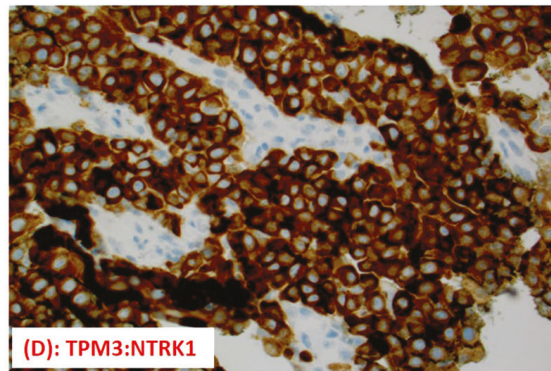
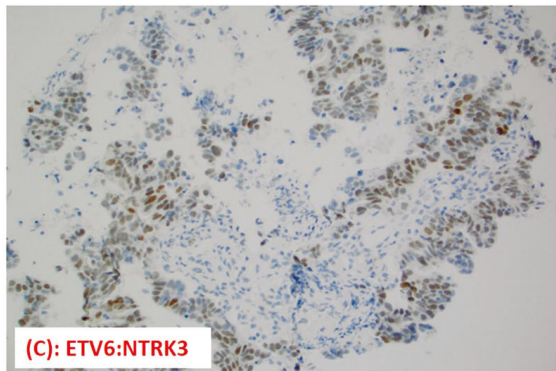
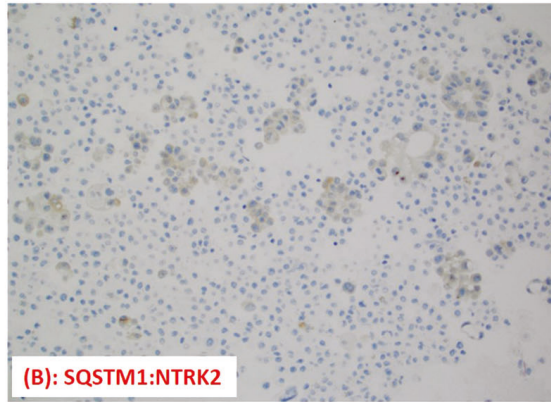
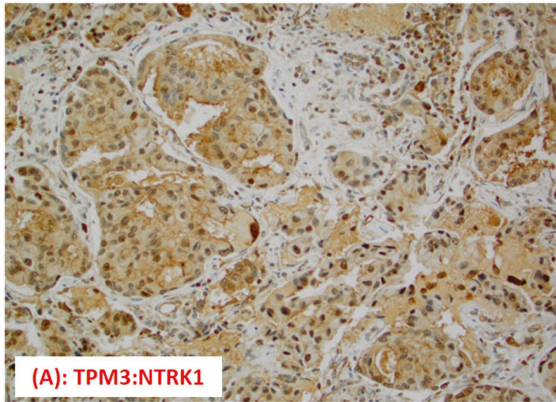
^cDetected rearrangements by DNA-based assays may not result in fusions, correlation with surgical pathology and predicted transcript (for sequencing) is needed.

Inmunohistoquímica

- Bajo coste.
- “Tiempo rápido de respuesta.”
- Requiere poca muestra.
- Anticuerpo pan-Trk.
- Definición de positividad: 1% de células tumorales con tinción.
- Diversos patrones de tinción.
- La localización de la proteína nos da indicios sobre la fusión.
- La sensibilidad se sitúa entre el 96% y 100% para las fusiones de NTRK1 y 2, mientras que para NTRK3 se sitúa en un 79%.
- La especificidad se encuentra entre el 92%-100%. Dependiente del tipo de tumor.
- Falsos positivos.



Inmunohistoquímica

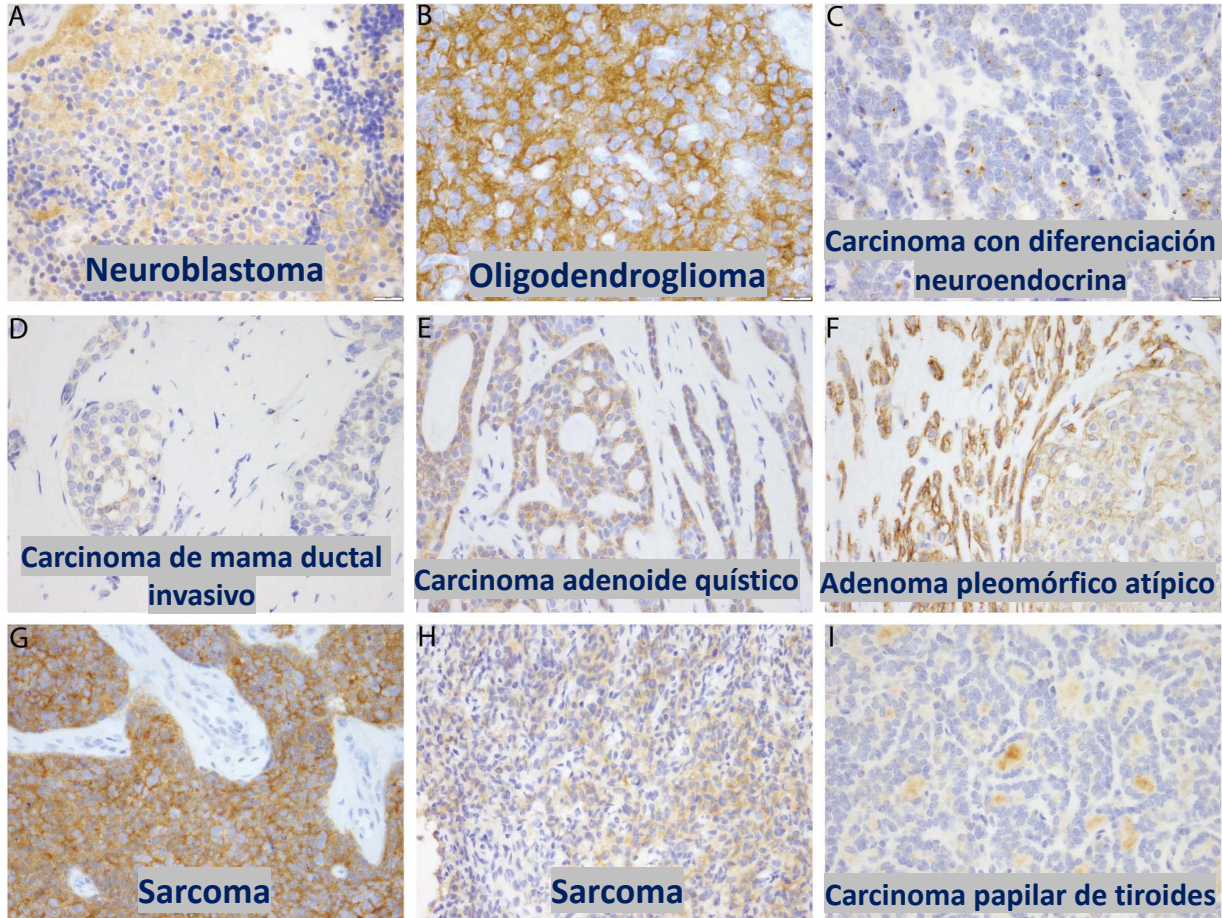


➤ Los patrones de tinción se relacionan con la pareja de fusión:

- Tumores con reordenamiento en *NTRK1* y *2*: tinción citoplasmática.
- Tumores con fusión en *NTRK3* muestran tinción nuclear, acompañada en ocasiones por tinción citoplasmática.
- Fusión *TPM3/4-NTRK1/3*: tinción de membrana citoplasmática.
- Fusiones *ETV6-NTRK3* y *EML4-NTRK3*: tinción nuclear.
- Fusión *LMNA-NTRK1*: tinción membrana perinuclear.

Inmunohistoquímica

Falsos positivos



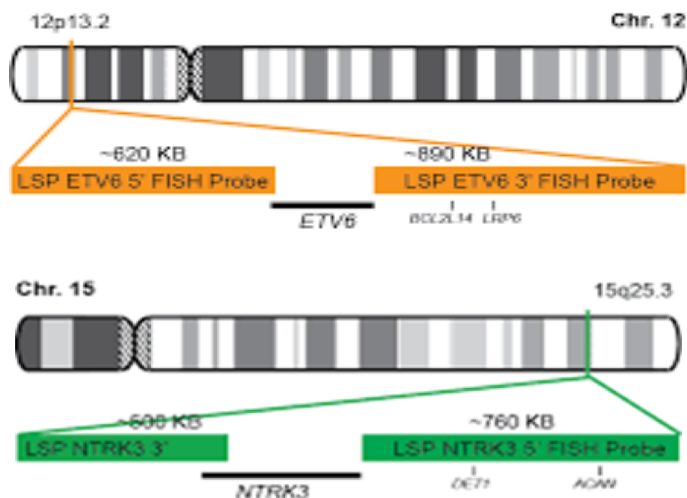
Sensitivity and specificity of pan-Trk immunohistochemistry for detecting *NTRK* fusions

	Sensitivity	
<i>NTRK1</i>	96.2% (26/27)	
<i>NTRK2</i>	100% (5/5)	
<i>NTRK3</i>	79.4% (27/34)	
	Sensitivity	Specificity
Total	87.9% (58/66)	81.1% (257/317)
Colon	87.5% (7/8)	100% (25/25)
Lung	87.5% (7/8)	100% (24/24)
Thyroid	81.8% (9/11)	100% (27/27)
Salivary	88.9% (8/9)	52% (13/25)
Breast	80% (4/5)	82.1% (23/28)
Inflammatory myofibroblastic tumor	100% (3/3)	100% (5/5)
Sarcoma	80% (8/10)	74.4% (29/39)
Pancreas	(0/0) ^a	100% (20/20)
Appendix	100% (1/1)	100% (1/1)
Cholangio	100% (2/2)	100% (19/19)
Glioma	100% (6/6)	20.8% (5/24)
Melanoma	100% (3/3)	100% (17/17)
Neuroendocrine	(0/0) ^a	88.9% (8/9)
Small round cell tumor ^b	(0/0)	45.8% (11/24)
Other ^c	(0/0)	100% (30/30)

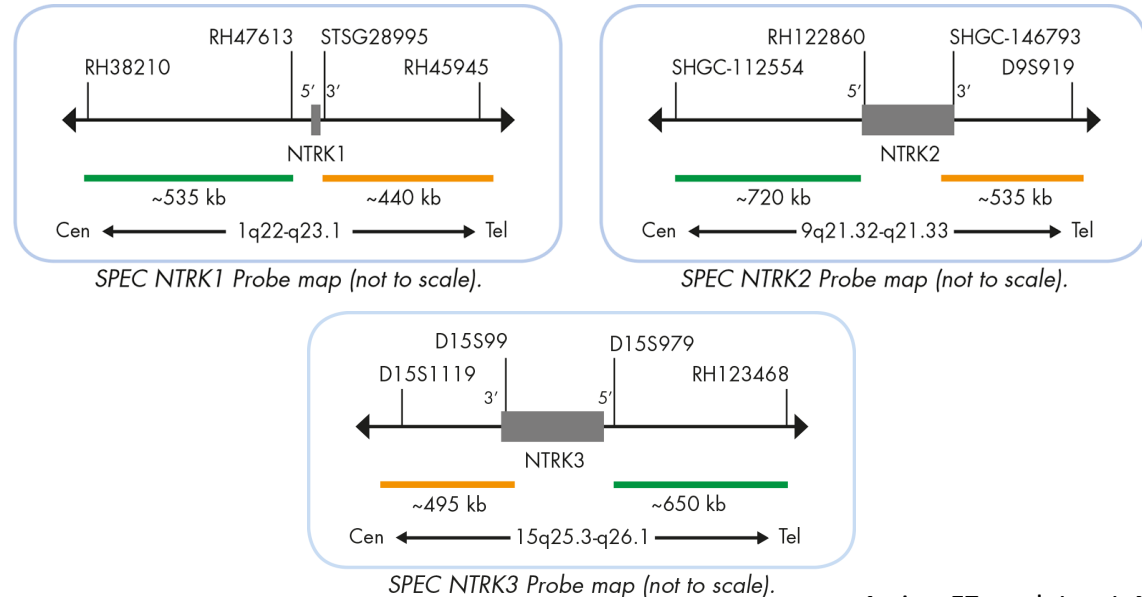
FISH

- Método comúnmente usado para detección de fusiones.
- Tiempo de respuesta rápido.
- 3 FISH distintos para *NTRK*.
- Uso de sondas de fusión o break-apart.
- Método estándar para detectar la fusión ETV6-NTRK3 en tumores donde esta traslocación es común.
- No permite detectar la pareja 5', ni saber si el reordenamiento genera un transcrito.

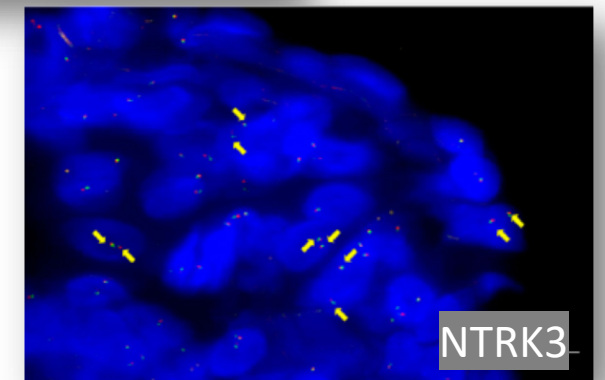
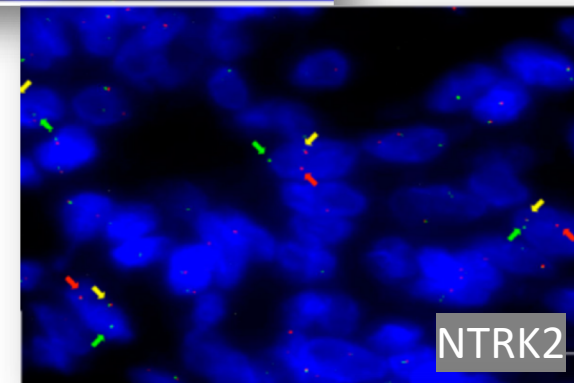
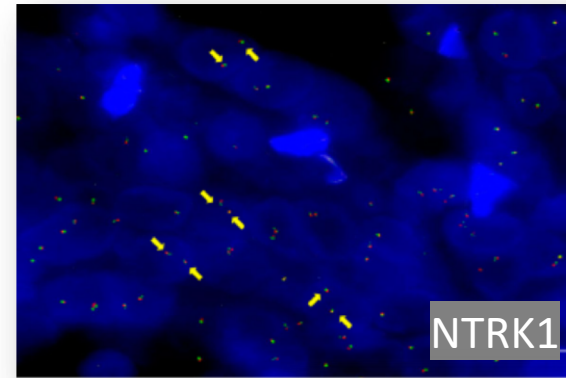
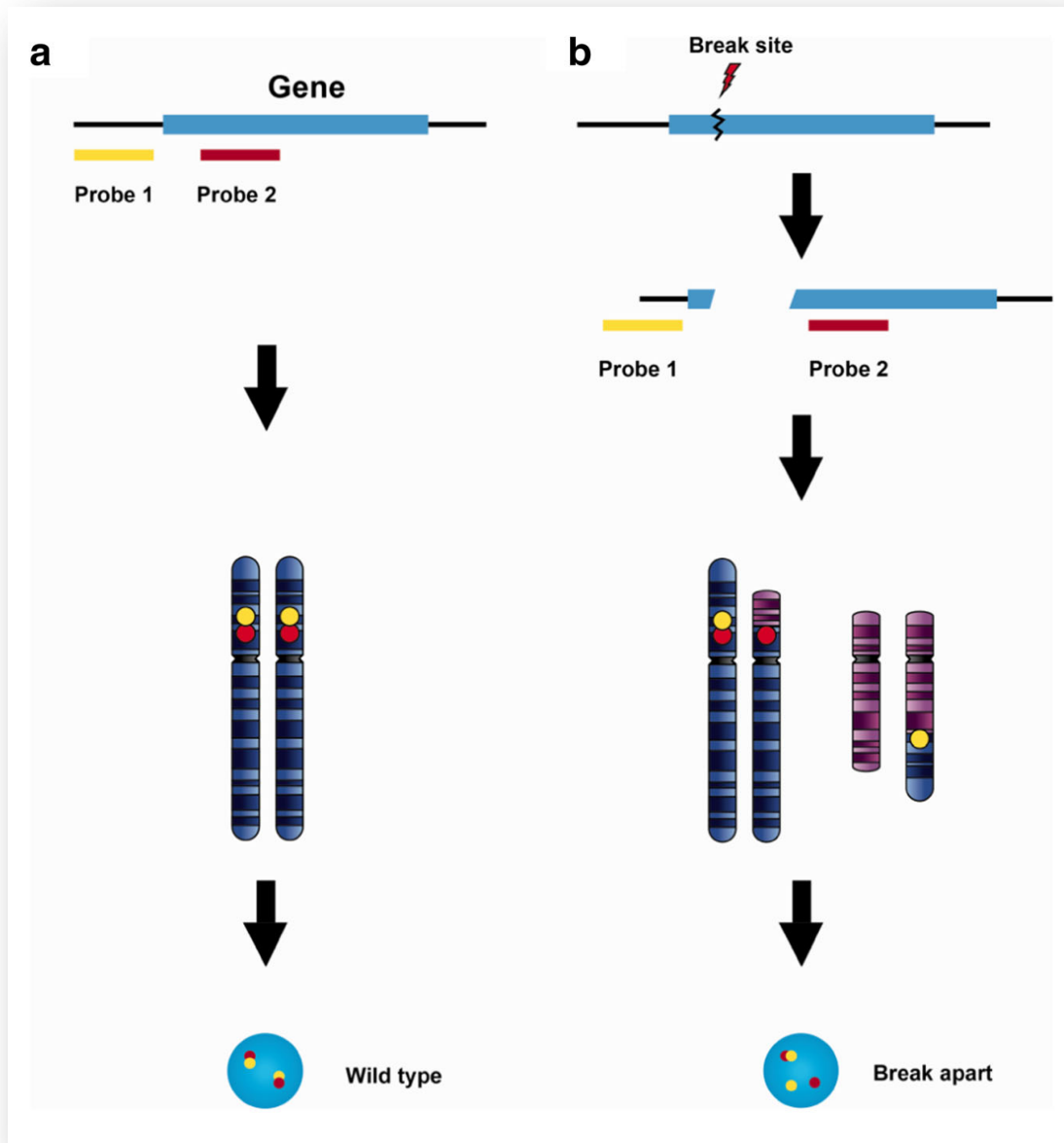
ETV6-NTRK3 Dual Fusion/Translocation FISH Probe Kit - CytoTest



ZytoLight[®] SPEC NTRK Dual Color Break Apart Probe

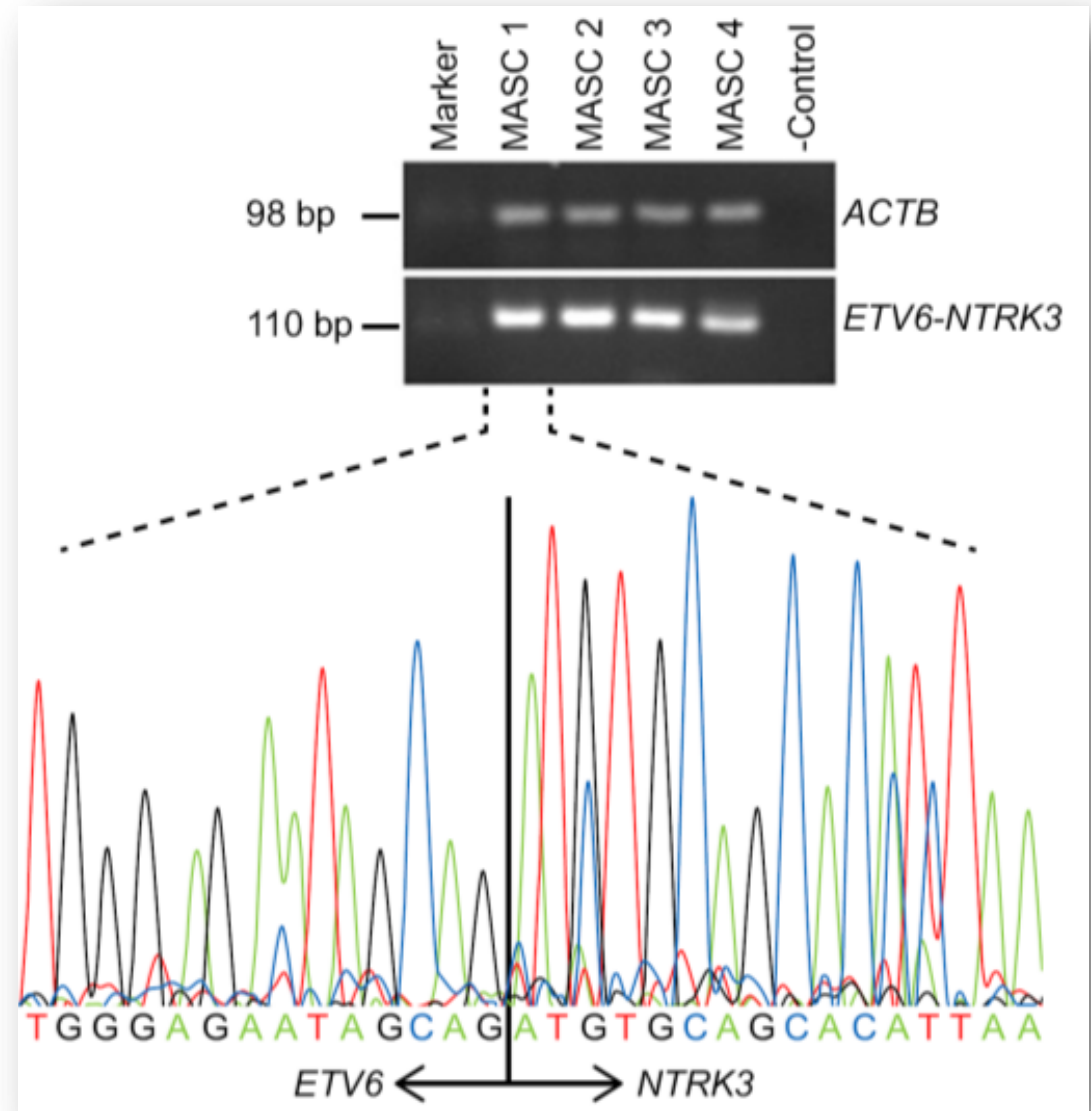


FISH



RT-PCR (Transcripción inversa)

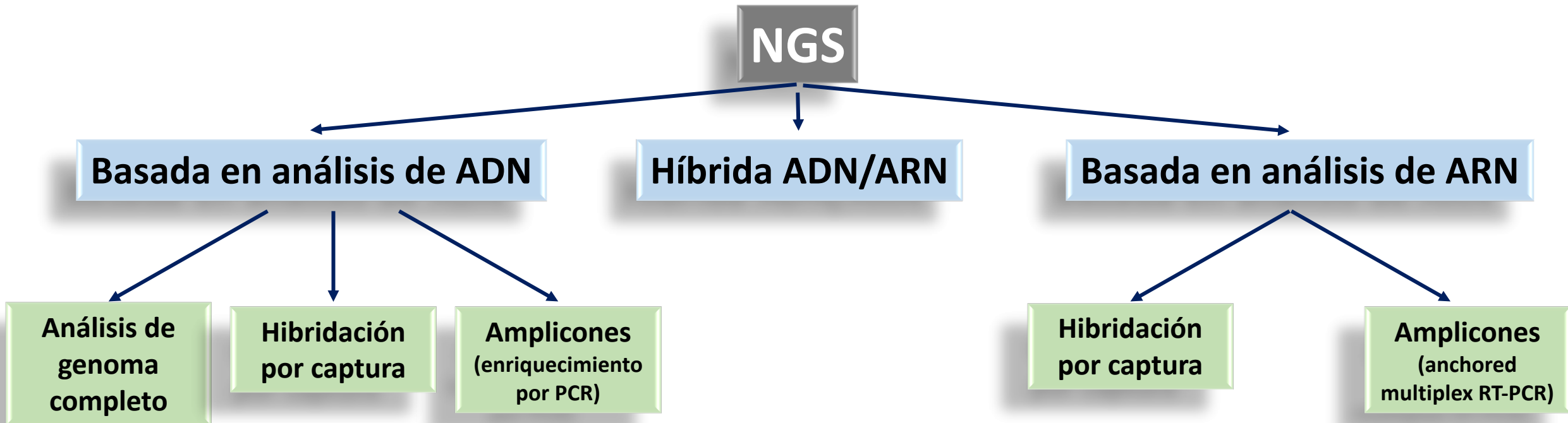
- Método basado en el análisis de ARN.
- Relativamente rápido y de bajo coste.
- Es necesario conocer ambas parejas y el punto de ruptura de la fusión para el diseño del ensayo.
- No permite detectar nuevas parejas de fusión.
- Debido al gran número de parejas existentes y puntos de ruptura su utilidad para analizar *NTRK* es limitada.
- Usada para detectar la fusión *ETV6-NTRK3* en tumores donde esta traslocación es común.



		Tumor	Pareja de fusión			
			NTRK1	NTRK2	NTRK3	
Tumores adultos	Elevada frecuencia (>80%)	Carcinoma análogo secretor de mama (MASC)			ETV6	
		Carcinoma secretor de mama			ETV6	
	Frecuencia intermedia (5-25%)	Carcinoma papilar de tiroides	TFG, SSBP2, SQSTM1, TPR, PPL			ETV6, RBPMS
		Cáncer de apéndice	LMNA			
	Baja frecuencia (<5%)	Glioma/glioblastoma	ARHGEF2, BCAN, CHTOP, NFASC	BCR, AFAP1, SQSTM1		
		Astrocitoma		QK1, NACC2		
		GIST				ETV6
		Cáncer de cabeza y cuello		PAN3		LYN
		Cáncer de pulmón	CD74, GRPAP1, IRF2BP2, MPRIP, P2RY8, SQSTM1, TPM3	TRIM24		
		Sarcoma	TPM3, LMNA			
		Cáncer de mama	CGN, GATAD2B, LMNA, MDM4, PEAR1, TPM3			ETV6
		Leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, histiocitosis, mieloma múltiple, neoplasma de células dendríticas				ETV6
		Sarcoma uterino	LMNA, TPM3, TPR			RBPMS
		Colangiocarcinoma	LMNA, RABGAP1L			
	Cáncer de páncreas	CTRC				
Melanoma	DDR2, GON4L, TRIM63					
Cáncer colorrectal	LMNA, TPM3, SCYL3			ETV6		
Tumores pediátricos	Elevada frecuencia (>80%)	Carcinoma secretor de mama			ETV6	
		Fibrosarcoma infantil y otros tumores mesenquimales	SQSTM1, TPM3, LMNA		EML4, ETV6	
		Nefroma mesoblástico congénito celular o mixto	TPR, LMNA		EML4, ETV6	
	Frecuencia intermedia (5-25%)	Carcinoma papilar de tiroides	TPR, IRF2BP2, TPM3			ETV6
		Tumor de spitz	TP53, LMNA			ETV6, MYH9, MYO5A
	Baja frecuencia (<5%)	Gliomas pediátricos de algo grado	TPM3	AGBL4, VCL		ETV6, BTB1
		Ganglioglioma		TLE		
	Astrocitoma		NACC2, QK1			

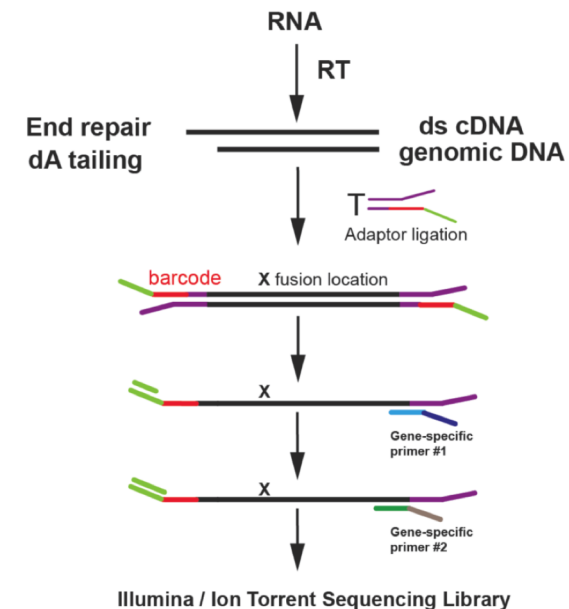
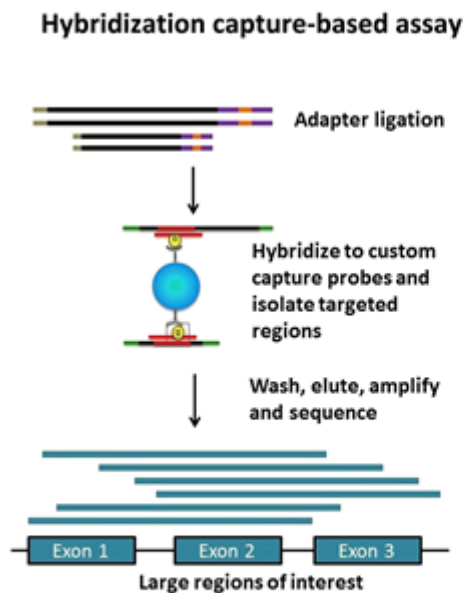
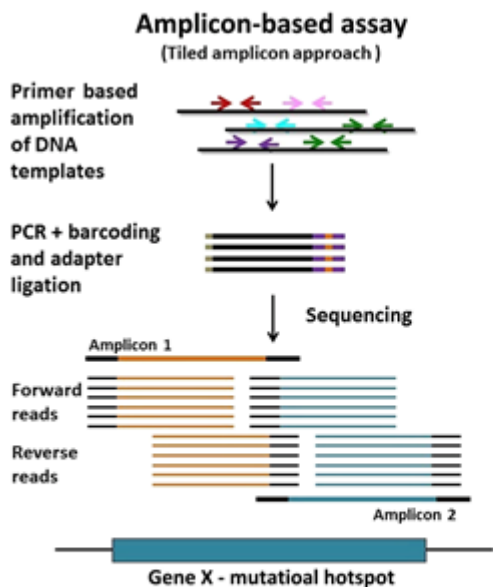
NGS para el análisis de *NTRK*

- Elevada sensibilidad y especificidad.
- Análisis simultáneo de múltiples genes.
- Permite detectar nuevas fusiones en *NTRK*.



Métodos de NGS

Detección de reordenamientos



	Basada en amplicones	Hibridación por captura	Basada en ARN mediante Anchored Multiplex PCR
Variantes detectadas	Variantes conocidas/fusiones de interés.	Detección de todas las mutaciones accionables además de nuevas parejas de fusión.	Detección de todas las mutaciones accionables además de nuevas parejas de fusión.
Ventajas	Requiere poca cantidad de ácidos nucleicos de partida.	Permite detectar nuevas parejas de fusión.	Permite detectar nuevas parejas de fusión.
Desventajas	Es necesario conocer ambas parejas de fusión.	Requiere mayor cantidad de ácidos nucleicos que los amplicones.	Uso de ARN que podría no tener una calidad y cantidad aceptables.

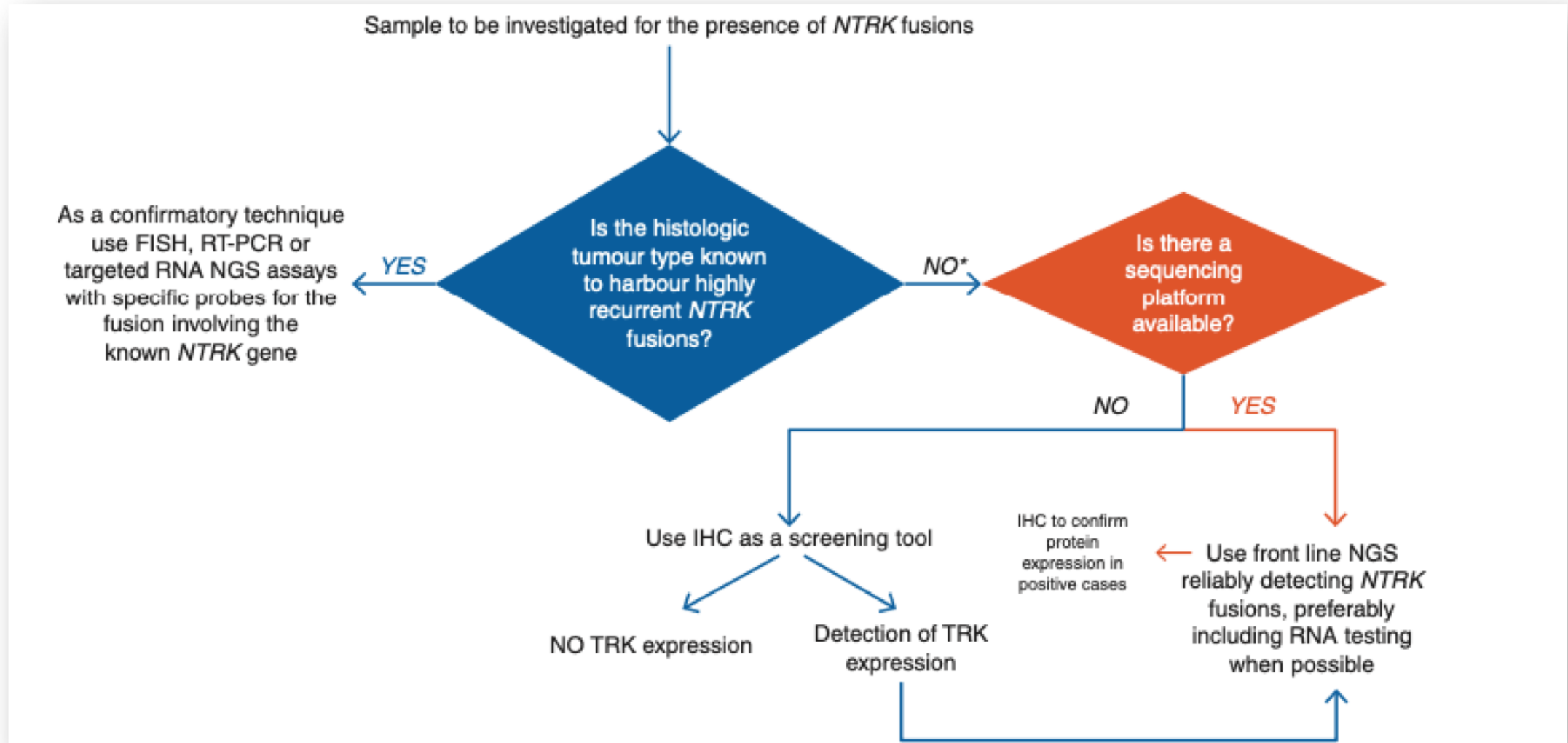
Comparación de métodos de detección

Método de análisis		¿Permite detectar nuevas parejas de fusión?	Especificidad	Material necesario	Tiempo de respuesta	Coste	
IHQ				Al menos 1 corte			
FISH				Al menos 3 cortes			
RT-PCR				1 µg de ARN			
NGS	ANÁLISIS DE ADN	Amplicones			250 ng de ADN		
		Hibridación por captura					
	ANÁLISIS DE ARN	Amplicones			200 ng de ARN		
		Hibridación por captura					
		Anchored Multiplex PCR					
	HÍBRIDOS ADN/ARN	Amplicones			10-40 ng de ARN de un contenido tumoral de al menos 20%		
Hibridación por captura							

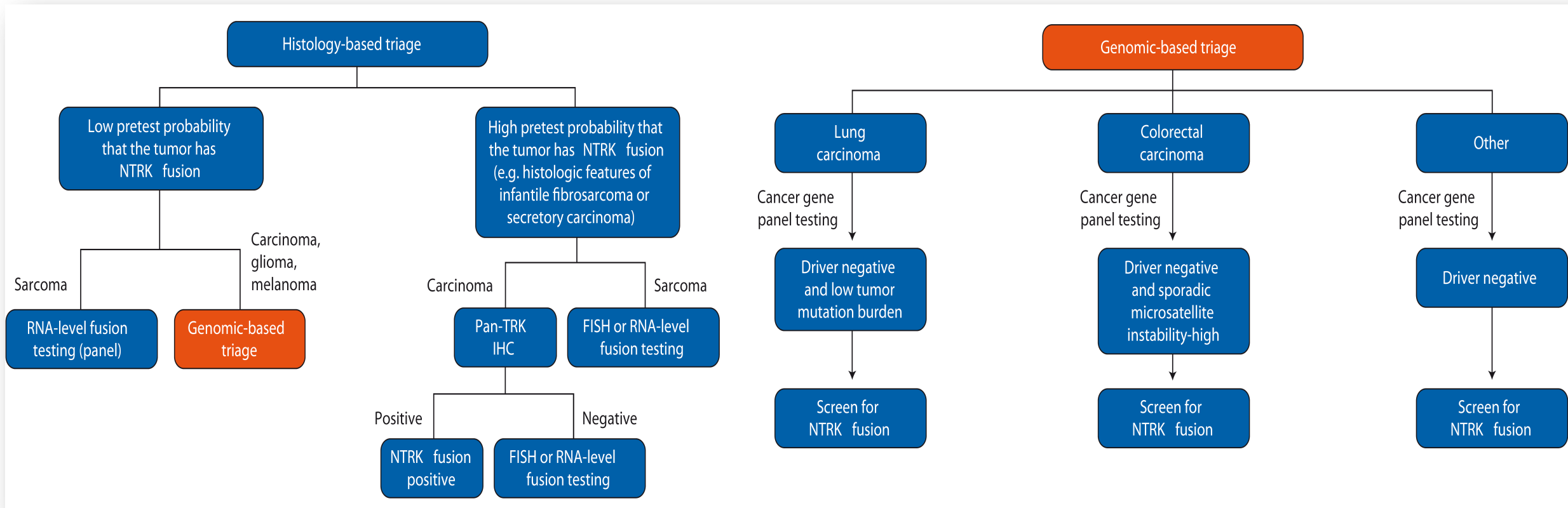
Consideraciones para el algoritmo diagnóstico

- ❑ Hecho: las fusiones de *NTRK* son comunes en tumores raros y raras en tumores comunes.
- ❑ Punto a considerar:
 - Disponibilidad de varios métodos de análisis.
 - Consideraciones económicas.
 - Pros y contras de las metodologías de análisis.
- ❑ Varios algoritmos recomendados pero no hay pautas definidas.

Recomendaciones de ESMO para la detección de *NTRK*



Algoritmo recomendado por MSKCC



Recomendaciones de la NCCN para la detección de *NTRK*

- ❑ Las fusiones en los genes *NTRK1/2/3* son poco frecuentes en el NSCLC así como en otro tipo de tumores.
- ❑ Generan una desregulación en la señalización.
- ❑ Se han identificado diversas parejas de fusión para cada gen.
- ❑ Hasta la fecha, con la excepción de la ausencia de otras mutaciones driver, no se han identificado otras características clínico-patológicas asociadas a estas fusiones.
- ❑ Metodologías de análisis: IHQ, FISH, PCR y NGS. Pueden generar FALSOS NEGATIVOS.
 - FISH: son necesarias al menos 3 sondas para un análisis completo.
 - IHQ: expresión nativa en algunos tejidos.
 - NGS: puede detectar un amplio rango de alteraciones.
 - La NGS basada en análisis de ADN puede no detectar todas las fusiones en *NTRK1* y *NTRK3*.



National Comprehensive
Cancer Network®

***NTRK* Gene Fusions**

NTRK gene fusions encode tropomyosin receptor kinase (*TRK*) fusion proteins (eg, *TRKA*, *TRKB*, *TRKC*) that act as oncogenic drivers for solid tumors including lung, salivary gland, thyroid, and sarcoma.^{269,270} A diverse range of solid tumors in children and adults may be caused by *NTRK* gene fusions (eg, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*). It is estimated that *NTRK* fusions occur in 0.2% of patients with NSCLC and do not typically overlap with other oncogenic drivers such as *EGFR*, *ALK*, or *ROS1*.²⁶⁹ Various methods can be used to detect *NTRK* gene fusions, including FISH, IHC, NGS, and PCR assays. In a recent clinical trial, *NTRK* gene fusions were detected with NGS (50 patients) and FISH (5 patients).²⁷⁰ Larotrectinib and entrectinib are oral TKIs that inhibit TRK across a diverse range of solid tumors in younger and older patients with *NTRK* gene–fusion positive disease.^{269,270} For the 2019 update (Version 3), the NCCN NSCLC Panel added a recommendation for *NTRK* gene fusion testing in patients with metastatic NSCLC based on clinical data and the approval of larotrectinib for patients with *NTRK* gene fusion–positive disease.^{270,271} The NCCN NSCLC Panel recommends larotrectinib and entrectinib (both are category 2A) as either first-line or subsequent therapy options for patients with *NTRK* gene fusion–positive metastatic NSCLC based on data and the FDA approvals (see *Larotrectinib* and *Entrectinib* in this Discussion).^{259,261,272}

Muchas gracias por vuestra atención

