

Perfil epigenético para la identificación del cáncer primario de origen desconocido

FICHA DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS NUEVAS Y EMERGENTES
AETSA

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN



MINISTERIO
DE SANIDAD, CONSUMO
Y BIENESTAR SOCIAL



Red Española de Agencias de Evaluación
de Tecnologías y Productos Sanitarios Emergentes



AETSA
Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Avanzada

Perfil epigenético para la identificación del cáncer primario de origen desconocido

FICHA DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS NUEVAS Y EMERGENTES
AETSA

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN

Llanos Méndez, Aurora

Perfil epigénico para la identificación del cáncer primario de origen desconocido / Aurora Llanos Méndez. — Sevilla: AETSA, Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía, 2018.

61 p; 24 cm. (Colección: Informes, estudios e investigación. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.)

1. Cáncer primario de origen desconocido 2. Técnicas y procedimientos diagnósticos I. Andalucía. Consejería de Salud y Familias. AETSA, Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía II. España. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.

Autores: Aurora Llanos-Méndez.

Este documento ha sido realizado por AETSA, Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía en el marco de la financiación del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social para el desarrollo de las actividades del Plan anual de Trabajo de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del SNS, aprobado en el Pleno del Consejo Interterritorial del SNS de 15 de noviembre de 2018 (conforme al Acuerdo del Consejo de Ministros de 7 de diciembre de 2018).

Edita: AETSA, Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía
Consejería de Salud y Familias

JUNTA DE ANDALUCÍA

Avda. de la Innovación s/n, Edificio Arena 1, s/n. Planta baja.
41020 Sevilla
España – Spain
Web: www.aetsa.org

ISBN: 978-84-17163-23-5

NIPO: en trámite

Cita sugerida: Llanos Méndez A. Perfil epigénico para la identificación del cáncer primario de origen desconocido. Sevilla: Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del SNS. AETSA Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía; 2018.

Este documento puede ser reproducido en todo o en parte, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia.

Perfil epigenético para la identificación del cáncer primario de origen desconocido

FICHA DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS NUEVAS Y EMERGENTES
AETSA

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN



Conflicto de interés

La autora declara que no tiene intereses que puedan competir con el interés primario y los objetivos de este informe e influir en su juicio profesional al respecto.

Contribución de los autores

- Planificación y diseño de la investigación: Dra. Aurora Llanos Méndez.
- Documentación: Dra. Aurora Llanos Méndez.
- Obtención de los datos: Dra. Aurora Llanos Méndez.
- Análisis y presentación de resultados: Dra. Aurora Llanos Méndez.
- Elaboración del manuscrito: Dra. Aurora Llanos Méndez.

Agradecimientos

Este trabajo se ha beneficiado de forma importante de las aportaciones de la Dra. María Teresa Vargas de los Monteros, Facultativo Especialista de Área de Genética Clínica del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

La Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía y la autora agradecen al revisor de este texto el esfuerzo realizado, su dedicación y sus aportaciones.

Los contenidos del informe son responsabilidad de la autora, procediendo la eximente habitual en el caso de los revisores.

Índice

Lista de tablas y figuras	13
Datos generales	15
Nombre de la tecnología	15
Compañía comercial o elaboradora del producto.....	15
Breve descripción de la tecnología	15
Población diana.....	17
Descripción de la patología a la que se aplica la tecnología	17
Área de especialización/abordaje	20
Documentos publicados por otras agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias.....	20
Desarrollo y uso de la tecnología	21
Grado de desarrollo de la tecnología	21
Tipo y uso de la tecnología	21
Lugar o ámbito de aplicación de la tecnología	21
Relación con tecnologías previas.....	21
Tecnología alternativa en uso actual	21
Aportación de la nueva tecnología en relación a la tecnología en uso actual	27
Licencia, reintegro de gastos u otras autorizaciones.....	27
Importancia sanitaria de la condición clínica o la población a la que aplica	29
Incidencia/prevalencia.....	29
Carga de la enfermedad	29
Requerimientos para usar la tecnología.....	31
Requerimiento de infraestructura y formación	31
Coste y precio unitario	31
Riesgos y seguridad	33
Eficacia/efectividad	35
Resultado de la búsqueda	35
Descripción y calidad de los artículos.....	35
Principales resultados	39
Evaluación económica	43
Impactos.....	45
Impacto en salud	45

Impacto ético, social, legal, político y cultural de la implantación de la tecnología	45
Impacto económico de la tecnología	45
Impacto en la organización	46
Difusión e introducción esperada de la tecnología	47
Recomendaciones e investigaciones en curso	47
Investigación en curso.....	47
Guías y directrices.....	47
Puntos clave.....	49
Bibliografía	51
Anexos.....	53
Anexo 1. Metodología empleada para la realización de la ficha técnica	53
Anexo 2. Principales perfiles fenotipos de los tumores más frecuentes.....	55
Anexo 3. Estrategia de búsqueda	57
Anexo 4. Diagrama de flujo	59
Anexo 5. Evaluación del riesgo de sesgo de los estudios	60

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Localización de las metástasis de los diferentes tumores primarios.....	18
Tabla 2. Marcadores usados para la localización del tumor primario después de la utilización de CK7 y CK20.....	24
Tabla 3. Principales plataformas de diagnóstico molecular para cáncer de origen desconocido	26
Tabla 4. Descripción de la población en la etapa de utilidad clínica	36
Tabla 5. Concordancia entre EPICUP™ y pruebas de referencia	39
Tabla 6. Evaluación del coste (€) por AVAC ganado del EPICUP™ con respecto a otras alternativas diagnósticas desde la perspectiva del Sistema Nacional de Salud Español	43
Figura 1. Manejo del cáncer de origen desconocido	19
Figura 2. Panel de inmunohistoquímica mínimo aconsejado en el tumor de origen desconocido	23
Figura 3. Evaluación de riesgo de sesgo según QUADAS-2	38
Figura 4. Curvas de supervivencia de los pacientes con cáncer de origen desconocido que recibieron tratamiento específico en función de la predicción del EPICUP™	40
Figura 5. Análisis multivariante de Cox para la supervivencia de los pacientes con cáncer de origen desconocido que recibieron tratamiento específico en función de la predicción del EPICUP™	41

Datos generales

Nombre de la tecnología

Prueba molecular para la detección del tumor primario de origen desconocido basado en el perfil epigenético tumoral. Comercialmente disponible con el nombre EPICUP™.

Compañía comercial elaboradora del producto

Desarrollado por Ferrer Hospitales bajo el nombre comercial EPICUP™.

Breve descripción de la tecnología

Prueba basada en el análisis de los perfiles de metilación del ADN en muestras de tejido metastásico, consistente en el estudio de los patrones de la metilación de las citosinas de las islas CpG (regiones de ADN donde el nucleótido citosina y guanina están unidos por un grupo fosfato), modificación epigenética que está relacionada con la actividad transcripcional locus específica. Estos grupos metilos actúan como señales de reconocimiento sobre el ADN, favoreciendo el reclutamiento de proteínas que participan en la regulación de la expresión génica¹. Utiliza micromatrices para identificar los perfiles epigenéticos de 38 tipos tumorales. Los resultados pueden estar disponibles en un plazo de 5 a 10 días^{2,3}.

Mecanismo de acción

Se basa en la identificación de las características epigenéticas propias que poseen las células de cada tejido. Aunque todas las células de un organismo contienen el mismo material genético, cada tipo celular tiene un programa de expresión diferente, de forma que únicamente se expresan los genes que necesita. De ahí la hipótesis de que la firma epigenética de las células tumorales metastásicas podría poner de manifiesto el origen del tejido del que provienen⁴.

El término epigenética ha sido definido como “los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin modificar la secuencia de nucleótidos del ADN.” Así, un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema de regulación génica, activando y desactivando diferentes genes. Las modificaciones epigenéticas incluyen la metilación del ADN, los

microRNAs y la modificación de Histonas. Sin embargo, la metilación de ADN es la marca epigenética que posee todas las propiedades consideradas por Bonasio *et al.* como intrínsecas⁴:

- No altera la secuencia del ADN
- Modifica la actividad génica
- Es reversible
- Es autoperpetuable
- Es heredable

La metilación del DNA es conocida por jugar un papel importante en la inhibición de la expresión génica y en la estabilidad del genoma. La metilación no es estática, sino que varía entre tejidos o condiciones fisiológicas y patológicas⁴, actuando como un potencial marcador estable para localizar el tumor primario².

Fases del procedimiento

1. Obtención de muestra de tejido metastásico del paciente.
2. Preparación de la muestra como cortes de tejido congelados o cortes de tejido embebidos en parafina.
3. Extracción del ADN de la muestra mediante los Kit comercialmente disponibles.
4. Procesado con el kit de metilación del ADN EZ-96 (Zymo Research Corp, Irvine, CA, USA).
5. Conversión del ADN con bisulfito para la detección de la metilación en las islas CpG del ADN y posterior hibridación utilizando el protocolo Illumina HumanMethylation450⁵. El tratamiento del ADN con bisulfito sódico transforma las citosinas no metiladas en uracilos, sin modificar las citosinas metiladas. Este tratamiento convierte un fenómeno epigenético en una diferencia genética, y por lo tanto, analizable por diferentes técnicas⁶.
6. Normalización de los datos de metilación para eliminar posibles fuentes de artefactos experimentales, así como el ruido aleatorio y la varianza técnica y sistemática⁶.
7. Nuevo filtrado para eliminar las sondas en los cromosomas sexuales⁶.
8. Análisis de metilación del ADN con entorno R utilizando un algoritmo de clasificación, utilizando los 38 tipos de tumores más frecuentes. El microarray detecta el estado de metilación de alrededor de un millón de islas CpG del genoma humano². Se consideró como resultado positivo una puntuación $\geq 0,12$.

Población diana

Pacientes con metástasis en los que no es posible la determinación del tumor primario, es decir, pacientes con cáncer primario de origen desconocido (CUP).

Descripción de la patología a la que se aplica la tecnología

Según la *European Society of Medical Oncology*, el CUP se define como un heterogéneo grupo de tumores metastásicos que, después de realizar el protocolo diagnóstico estándar, no es posible la identificación del origen del tumor en el momento del diagnóstico⁷.

El CUP se define clínicamente como tejido maligno histológicamente confirmado que es incompatible con una neoplasia primaria en el lugar de la biopsia, el origen del cual no es claro a pesar de la realización de la historia clínica, exploración física y estudios complementarios básicos como técnicas de imagen³. Esta definición no es estándar, lo que refleja la falta de consenso en la codificación diagnóstica. De hecho, después de un completo análisis inmunohistoquímico o examen post-mortem, el tumor primario se puede identificar en uno de cada 4 pacientes, quedando el 75% de los afectados sin la identificación del tumor primario^{3,8}.

Los pacientes con CUP tienen una sintomatología de corta evolución, enfermedad metastásica precoz en ausencia de masa tumoral fácilmente identificable y evolución clínica agresiva e impredecible⁸. La edad de presentación es rara vez inferior a 30 años, con un pico de incidencia alrededor de los 70 años³.

Dentro del diagnóstico diferencial del tumor primario habría que incluir pulmón, mama, riñón, ovario, útero, tracto gastrointestinal superior, tracto pancreático-biliar, tracto urinario, tiroides, próstata, hígado, glándula adrenal⁸.

En función del examen microscópico inicial realizado de la biopsia, se describen 4 categorías⁹:

1. Adenocarcinoma: bien diferenciado o moderadamente diferenciado, supone el 50-70% de los casos³.
2. Carcinoma de células escamosas: el 5-8% se corresponde con esta categoría³. La clínica de presentación depende del lugar predominante de localización de las metástasis⁹:
 - a. Linfadenopatía cervical superior y media: cáncer de cabeza y cuello.
 - b. Linfadenopatía inguinal: cáncer en área genital o anorectal.

- c. Adenopatías en otros sitios: normalmente relacionados con cáncer pulmonar primario.
3. Carcinoma neuroendocrino, bien diferenciado o pobremente diferenciado: representan el 1% de los CUPs. Se dividen en carcinoma neuroendocrino de bajo y alto grado.
4. Tumores pobremente diferenciados (20-25%). Aproximadamente en un 20% de ellos el linaje celular (carcinoma, linfoma, sarcoma, melanoma, tumor de células germinales) no se determina después de examen microscópico inicial.

En estos pacientes, los focos de metástasis se centran en el hígado en el 40-50% de los pacientes, seguido de nódulos linfáticos (35%), pulmones (31%), huesos (28%) y cerebro (15%)³. En función de la localización del tumor primario, los lugares más frecuentes de metástasis se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Localización de las metástasis de los diferentes tumores primarios

Tumor primario	Localización de la metástasis
Mama	Pulmón, hígado, huesos
Colon	Hígado, peritoneo, pulmón
Renal	Pulmón, hígado, huesos
Pulmón	Glándula adrenal, hígado, pulmón
Melanoma	Piel, músculo, hígado
Ovario	Hígado, peritoneo, pulmón
Páncreas	Hígado, pulmón, peritoneo
Próstata	Pulmón, hígado, huesos
Recto	Hígado, peritoneo, glándula adrenal
Estómago	Hígado, peritoneo, pulmón
Tiroides	Pulmón, hígado, huesos
Útero	Hígado, peritoneo, pulmón

Fuente: AHRQ 2013¹⁰

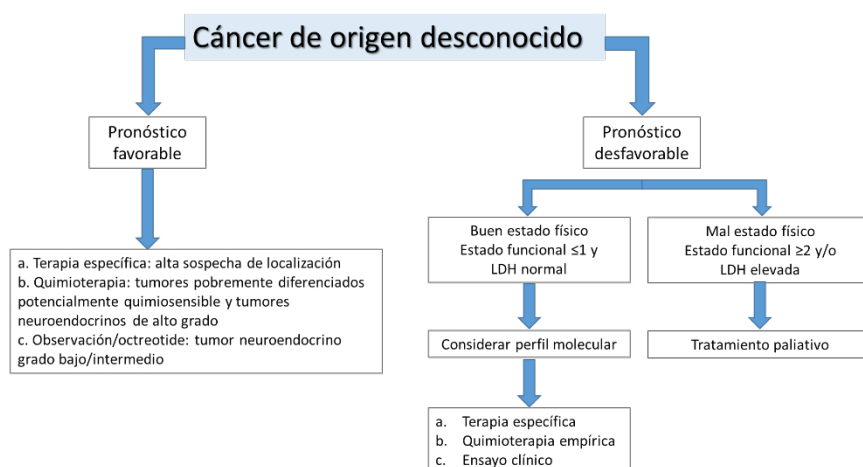
Los CUP se clasifican también en función del pronóstico favorable o desfavorable. Una escala que cuantifica el pronóstico es el I-SCOOP (*Ioannina Score for CUP Outpatient Oncologic Prognostication*), y tiene en cuenta el subgrupo clínico y patológico, el estado funcional y el recuento

leucocitario. En función de la puntuación obtenida, los pacientes pueden categorizarse en 3 niveles: bajo, intermedio, alto^{8,11}.

Otros marcadores pronósticos son el número de metástasis, la afectación hepática, niveles basales de albúmina en suero, lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (FA)⁸.

El manejo clínico de los pacientes viene determinando por la identificación del tumor primario. Para el 15-20% de los pacientes, la inmunohistoquímica identificaría el origen del tumor, lo que permitiría la administración de tratamientos específicos. Esto conduciría a una mejora de la supervivencia. Para el 80-85% restante, el tratamiento empírico, consistente en la combinación de agentes platinos más agentes citostáticos (taxanos, gencitabine, irinotecan), está asociado con una baja respuesta terapéutica³, con una mediana de supervivencia de entre 7 y 10 meses y un 20-25% de supervivencia a los 2 años⁹ (Figura 1).

Figura 1. Manejo del cáncer de origen desconocido



Fuente: Losa *et al.*¹¹

En relación a los perfiles moleculares, estos pacientes suponen un grupo muy heterogéneo en el que aún no se ha elucidado el mecanismo biológico que hace que el tumor se mantenga oculto después de una metástasis^{2,3}. No obstante, hay hipótesis al respecto. La primera contempla que la neoplasia podría proceder de células madre, sin que se produjera en su inicio una lesión premaligna o un tumor primario, mientras otra propone que el CUP representa una progresión rápida de las metástasis de un tumor primario en estadios tempranos¹¹. También se especula con la idea de que el tumor primario experimente regresión después de la metástasis o que se

mantenga tan pequeño que no se detecte. Es posible que un CUP quede comprendido en la gama continua de presentaciones de cáncer en las que el tumor primario se ha contenido o eliminado gracias a las defensas naturales del organismo¹².

La inestabilidad cromosómica ha sido sugerida como una de las posibles explicaciones, e incluso como un factor pronóstico, para las presentaciones más agresivas y resistentes a los tratamientos de este tipo de tumores⁷.

No se ha identificado una firma molecular común que produzca este particular fenotipo clínico, presentando una amplia variedad de anomalías génicas^{2,3}. Además, se caracterizan por activación de angiogénesis (50-89%), sobreexpresión de oncogenes (10-30%) y mayor presencia de hipoxia relacionada con proteínas y marcadores de transición epitelio-mesénquima (16-25%) y por último la activación de señales intracelulares como AKT o MAPK (20-35%)¹¹.

Área de especialización/abordaje

Oncología.

Documentos publicados por otras agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias

No se han recuperado estudios de evaluación de tecnologías sanitarias.

Desarrollo y uso de la tecnología

Grado de desarrollo de la tecnología

Producto comercialmente disponible en Europa.

Tipo y uso de la tecnología

Diagnóstico.

Lugar y ámbito de aplicación de la tecnología

Está indicado para uso profesional en asistencia hospitalaria de tercer nivel.

Relación con tecnologías previas

Prueba diagnóstica complementaria a las actualmente disponibles.

Tecnología alternativa en uso actual

La estrategia básica de identificación del tumor primario en pacientes con CUP ha sido la realización de un examen físico (incluyendo cabeza y cuello, rectal, pélvico y mamario), bioquímica y hematimetría y un TC de tórax, abdomen y pelvis⁷. Los signos y síntomas, así como las alteraciones encontradas podrían guiar hacia la realización de pruebas como el análisis inmunohistoquímico de una muestra de tejido³, la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RCP-RT), análisis citogenético, marcadores serológicos, microscopía óptica y electrónica, estudio histológico, y otras pruebas de imagen.

Las utilizadas más frecuentemente incluirían la microscopía óptica, la inmunohistoquímica y pruebas de imagen¹⁰.

Microscopía óptica

El examen de las muestras de tejido obtenidas con aspiración con aguja fina o biopsia conseguiría clasificar aproximadamente un 60% de los casos de CUP como adenocarcinomas y un 5% como carcinoma de células escamosas. En el 35% restante no se alcanzaría una conclusión definitiva¹⁰.

Microscopía electrónica

Es una técnica que puede ser recomendada en caso de tumores poco diferenciados. En ocasiones podría ser útil para diferenciar linfomas de carcinoma, adenocarcinoma de carcinoma escamoso y para diferenciar tumores neuroendocrinos o melanomas¹³.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que se aplica de manera común tanto en el ámbito de la investigación como en el diagnóstico clínico. Se trata de un procedimiento que se realiza sobre muestras de tejido canceroso fresco, congelado o parafinado. La técnica se basa en una reacción específica antígeno-anticuerpo que permite la identificación de una proteína (el antígeno -Ag-) mediante su unión a los marcadores (anticuerpos -Ac-). Por lo general, los Ac están unidos a una enzima (inmunoperoxidasa) o a un fluorocromo (inmunofluorescencia). La enzima o el tinte se activan cuando se une el Ac al Ag de la muestra de tejido, observándose, de esta manera, al microscopio¹⁰.

Algunos de los marcadores más utilizados son³:

- citokinas (CK) 7 y 20: la CK 20 es una queratina de bajo peso molecular que generalmente se expresa en el epitelio gastrointestinal, urotelio^{3,8} y células de Merckel. La CK 7 se encuentra en el cáncer de pulmón, ovario, endometrio, mama y tiroides^{3,8} y no en tumores del tracto gastrointestinal bajo¹³.
- marcadores tejido-específicos como el factor de transcripción tiroidea (TTF1): proteína nuclear que interviene en la activación de la transcripción durante la embriogénesis en el tiroides, diencefalo y epitelio respiratorio. Se expresa en carcinomas de tiroides y pulmón, aproximadamente en el 68% de los adenocarcinomas de pulmón y en el 25% de los carcinomas escamosos¹³.
- proteína caudal homeobox 2 (CDX-2).
- Ag-1 hepato-específico³: se expresa en los hepatocitos benignos y malignos, orientando hacia hepatocarcinoma¹³.
- GCDFP-15 o proteína inducida por la prolactina: marcador de diferenciación apocrina expresado específicamente en pacientes con cáncer de mama. También se expresa en glándulas salivales, piel, glándulas bronquiales, próstata y vesículas seminales¹³.
- URO III: CK de alto peso molecular, trombomodulina y CK 20 son marcadores del epitelio urotelial¹³.

No existe un panel consensuado de marcadores de inmunohistoquímica, por lo que se utilizan múltiples paneles. La limitada reproducibilidad es una de las limitaciones de la inmunohistoquímica, derivada fundamentalmente en la necesidad de interpretación de las preparaciones que implica subjetividad en la observación³. La cifra de éxito de este método diagnóstico en pacientes con CUP es de alrededor de un 25%.

El panel de inmunohistoquímica básico debería consistir en marcadores celulares epiteliales (CK AE1/AE3, CK Cam 5.2, EMA), S100, vimentina y antígeno común de leucocitos (LCA o CD45). Si se confirma el origen epitelial de la lesión (CK+, S100-, vimentina± y LCA-), a continuación se realizará la combinación de CK7 con CK20 para determinar el origen tumoral más probable¹¹ (Figura 2 y Tabla 2).

Figura 2. Panel de inmunohistoquímica mínimo aconsejado en el tumor de origen desconocido

CK- CD45+	S100- vimentina +	Linfoma
CK- CD45-	S100+ vimentina +	Melanoma
CK- CD45-	S100- vimentina +	Sarcoma
CK+ CD45-	S100- vimentina +/-	Carcinoma



CK7+/CK20+	CK7-/CK20-	CK7+/CK20-	CK7-/CK20+
Uroterial	Próstata	Mamario	Colon
Pancreático	Hepatocelular	Endometrial	Mucinosos de ovario
Mucinosos de ovario	Células renales	Seroso de ovario	Gástrico
Gástrico	Adrenocortical	Pulmón	
Colangiocarcinoma		Colangiocarcinoma	
Mucinoso de pulmón		Tiroides	
		Mesotelioma	
		Páncreas	

Fuente: Losa *et al.*¹¹

Tabla 2. Marcadores usado para la localización del tumor primario después de la utilización de CK7 y CK20

Localización del tumor primario	Marcador inmunohistoquímica
Urotelial	UROIII, THR, HMWCK
Mama	GCDFP-15, ER, PR
Pulmón (principalmente adenocarcinoma)	TTF-1, surfactante A y B
Carcinoma medular de tiroides	TTF-1, calcitonina
Carcinoma de células de Merckel	CD117
Carcinoma hepatocelular	Hep par-1
Carcinoma de próstata	PSA,PAP
Colangiocarcinoma	CK19
Mesotelioma	Calceptrin

ER: receptor de estrógeno; GCDFP-15: gross cystic disease fluid protein-15; HMWCK: citoqueratina de alto peso molecular; PAP: fosfatasa ácida prostática; PR: receptor de progesterona; PSA: antígeno prostático específico; THR: trombomodulina; TTF-1: factor de transcripción tiroideo-1; UROIII: uroplaquina III

Fuente: AHRQ 2013¹⁰

Pruebas de imagen

- TC con contraste de tórax, abdomen y pelvis^{8,11}, si hay adenopatías acompañar de TC de cuello.
- PET para diagnóstico y estadiaje:
 - Sensibilidad 87% y 71% de especificidad¹¹, ya que cualquier enfermedad inflamatoria, la actividad muscular, los ganglios linfáticos reactivos, etc, pueden dar un falso positivo¹³.
 - Moderada precisión sobre el lugar anatómico o anomalías funcionales debido a la baja captación de trazadores en algunos tejidos tumorales. En estos casos es mejor combinar PET con TC con una sensibilidad y especificidad de 84% en la detección del tumor primario¹¹.
- Resonancia magnética de la mama y/o mamografía en mujeres^{8,11}.

Técnicas invasivas

El uso de técnicas como broncoscopia, endoscopia y colonoscopia se valorará de forma individualizada según la presentación de la enfermedad de cada paciente. En caso de presentar adenopatías cervicales, estaría recomendada la realización de triple endoscopia que incluya laringoscopia, broncoscopia y esofagoscopia¹³.

Marcadores serológicos

Los marcadores serológicos son complementarios al examen clínico, inmunohistoquímica y a la biología molecular⁸.

- Antígeno carcinoembrionario (CEA): está elevado fundamentalmente en tumores de origen epitelial.
- Antígeno prostático específico (PSA): de utilidad en el cáncer oculto de próstata.
- CA-125: puede estar elevado en el cáncer de ovario.
- Gonadotropina coriónica humana β (β -HCG) y α -fetoproteína en hombres con masa mediastínica o en retroperitoneo puede ser sugestiva de tumor extragonadal de células germinales.

Otra estrategia en desarrollo es la biopsia líquida para la detección de células de ADN circulantes en sangre. En un estudio reciente esta técnica detectó alteraciones genómicas en el 65,6% de los casos¹⁴. También encontraron cambios en los genes de reparación de apareamiento incorrecto de bases (*mismatch repair*) en el 1,6% de los casos, dando la opción de utilizar inmunoterapia en estos pacientes¹¹.

Diagnóstico molecular

1. Plataformas para identificar el tumor primario

Existen diversas plataformas para evaluar la expresión génica o el perfil microRNA en el CUP. En general, estas plataformas son complementarias a la inmunohistoquímica^{8,11}, de especial utilidad cuando éstas fallan en la determinación del tumor primario, fundamentalmente en tumores pobremente diferenciados. El perfil molecular obtenido de la muestra se compara posteriormente con una base de datos en la cual se encuentran un amplio rango de localizaciones y tipos histológicos. De esta forma, el diagnóstico sugiere una o varias localizaciones con una probabilidad estimada (Anexo 2). Las principales plataformas para el CUP se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales plataformas de diagnóstico molecular para cáncer de origen desconocido

Plataforma	Método	Número de genes	Sensibilidad* (%)
Quest-Lab	RT-PCR	92	ND
Veridex	RT-PCR	6	76
Pathwork	cDNA array	2000	89
Cup-print	cDNA array	495	85
Rosetta genomics miRview mets2	miRNA array	64	90
CancerType	RT-PCR	92	89

ND: datos no disponibles

*Comparado con inmunohistoquímica como prueba de referencia

Fuente: Losa *et al.*¹¹

Las principales dificultades que presentan son:

- Detección de tumores inusuales o tipos histológicos no recogidos en las plataformas.
- Distinción entre tumores de morfología u origen similar, que pueden tener rasgos moleculares similares con diferente manejo oncológico.
- Los resultados dependen de la cantidad, calidad y porcentaje de células tumorales analizadas.
- Elevado coste, que puede alcanzar 3000-4000\$ americanos, en comparación con la inmunohistoquímica (100-200\$ americanos)⁸.

2. Secuenciación de nueva generación

Se utiliza para caracterizar el perfil genético del tumor. Además, la secuenciación con paneles de genes podrían identificar mutaciones asociadas con respuesta específica a fármacos¹¹.

Las principales estrategias de secuenciación de nueva generación (NGS) en el diagnóstico del cáncer son¹⁵:

- Secuenciación de paneles de genes: contienen cebadores o sondas para un grupo conocido de genes y permiten la secuenciación dirigida a una determinada patología. Su principal ventaja es que permite la secuenciación de los genes de interés con gran cobertura y profundidad de lectura, lo que hace factible la detección de variantes de muy baja frecuencia.

- Secuenciación del exoma: permite identificar genes y variantes potencialmente implicadas en la enfermedad no descritos anteriormente. Su principal inconveniente es que requiere un mayor número de lecturas, lo que conllevaría una profundidad de lectura menor y pérdida de capacidad para detectar mutaciones subclonales.
- Secuenciación del genoma: abarca el genoma completo. Es una estrategia menos accesible en la rutina diagnóstica, más utilizada en la investigación.
- Secuenciación del transcriptoma o RNA seq (en inglés, *whole transcriptome sequencing [WTS]*): permite estudiar los transcritos de ARN, sus isoformas, modificaciones y cambios en la expresión génica, aunque su análisis e interpretación es complejo y se recomienda utilizar la expresión en tejido sano como control.

Se desconoce el impacto que estos métodos diagnósticos puedan tener en la evolución del paciente por la administración del tratamiento específico en función de la localización del tumor primario⁷. Actualmente está en fase de investigación III (NCT01540058).

Aportación de la nueva tecnología en relación a la tecnología en uso actual

Esta tecnología podría aumentar el porcentaje de pacientes en los que se localiza el tumor primario.

Licencia, reintegro de gastos u otras autorizaciones

Esta tecnología cuenta con marcado CE, encontrándose comercialmente disponible en Europa, aunque no tiene autorización por la FDA.

Importancia sanitaria de la condición clínica o la población a la que aplica

Incidencia/prevalencia

El cáncer de origen desconocido supone entre 2% y 9% de todos los diagnósticos de cáncer^{2,11}. Esto supone el octavo tumor más frecuente, con una incidencia mayor entre los pacientes entre 60-75 años¹¹.

Carga de enfermedad

El cáncer de origen desconocido es la cuarta causa de mortalidad relacionada con cáncer en el mundo².

El pronóstico de la enfermedad es desalentador, con una supervivencia global de 2,7 a 11 meses después del diagnóstico, donde sólo un 15-20% alcanzan un año de vida^{2,3}. Solo el 22-23% de los pacientes con CUP tienen pronóstico favorable. Los restantes se categorizan como desfavorables, donde los factores de mal pronósticos son los siguientes¹¹:

- No localización del tumor primario, probablemente por la incapacidad de iniciar un tratamiento específico.
- Se presenta con múltiples metástasis, especialmente 3 o más sitios.
- Metástasis de localización hepática, ósea o adrenal.
- Afectación visceral frente a la afectación de nódulos linfáticos.
- Si la afectación es linfática, los de peor pronóstico son las localizaciones abdominal y pélvica.
- Mal estado funcional y pérdida de peso previa al diagnóstico.
- Aumento del LDH e hipoalbuminemia, probablemente relacionado con la pérdida de peso.
- Leucocitosis y anemia.
- Adenocarcinoma y los tumores poco diferenciados tienen peor pronóstico que los escamosos (supervivencia a 3 años de 3,5% vs. 41,6%, respectivamente).

Los pacientes con buen estado funcional (0-1) y valores normales de LDH, tienen una expectativa de vida de 1 año (mediana), mientras que aquellos con estos parámetros alterados tienen una supervivencia mediana total de 4 meses⁷.

Requerimientos para usar la tecnología

Requerimiento de infraestructura y formación

No se ha recuperado información.

Coste y precio unitario

Coste unitario estimado de 3000€¹⁶.

Riesgos y Seguridad

No se han identificado problemas de seguridad significativos asociados al uso de esta tecnología.

Eficacia/efectividad

Resultado de la búsqueda

Entre un total de 128 referencias se localizaron 84 documentos sin duplicados procedentes del total de bases de datos empleadas (Anexos 3). Se realizó una primera selección sobre título y resumen, descartándose inicialmente 75 documentos por no cumplir con los criterios de inclusión o por cumplir alguno de los criterios de exclusión. De los 9 documentos que fueron leídos a texto completo, finalmente se seleccionó uno de ellos para su análisis² (Anexo 4).

Descripción y calidad de los artículos

El trabajo recuperado es un estudio de pruebas diagnósticas en fase II que tuvo como objetivo la validación del EPICUP™ en muestras tumorales con diagnóstico conocido realizado por los métodos establecidos en los centros sanitarios. También aplicó la prueba a 216 casos de CUP bien caracterizados y se siguieron a los pacientes durante 6 meses para conocer la supervivencia de los mismos en función del tratamiento quimioterápico utilizado (utilidad clínica).

Población e intervención

Para la etapa de validación, la población estuvo compuesta por 1948 muestras de tejido tumoral de origen conocido obtenidas de la base de datos del Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC) del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL). También se incluyeron 5743 muestras procedentes del Atlas del Genoma del Cáncer (*National Cancer Institute and National Human Genome Research Institute*, Bethesda, MD, USA) de los 38 tipos tumorales que integran el EPICUP™.

Para el estudio de la supervivencia se obtuvieron de forma retrospectiva y prospectiva muestras de 216 pacientes con CUP de diferentes centros de USA, España, Alemania, Italia y Australia, cada uno con su propio protocolo diagnóstico. La edad fue de 63 años de mediana, con una distribución similar en mujeres y hombres y un diagnóstico predominante de adenocarcinoma y carcinoma. En esta cohorte, solo en el 42,6% (92 pacientes) de los casos estuvieron disponibles los datos clínicos suficientes para realizar el análisis de supervivencia (Tabla 4).

Se realizó cribado molecular de alteraciones en los principales oncogenes y los análisis inmunohistoquímicos de rutina.

Tabla 4. Descripción de la población en la etapa de utilidad clínica

Localización		11 centros sanitarios de USA, España, Alemania, Italia y Australia
Año de estudio		2016
Población (n)		216
Edad mediana en años (rango)		63 (26-89)
Hombre		56%
Metástasis en el momento del diagnóstico (%)	Múltiple	130 (60%)
	Única	49 (23%)
	No especificado	37 (17%)
Diagnóstico histológico (%)	Adenocarcinoma/ carcinoma	143 (66%)
	Carcinoma escamoso	39 (18%)
	Neoplasia indiferenciada	26 (12%)
	Sarcoma	1 (1%)
	No especificado	7 (3%)
Método diagnóstico (%)	Biopsia	109 (51%)
	Cirugía	30 (14%)
	Imagen	23 (11%)
	No especificado	51 (25%)
Lugar de la biopsia (%)	Nódulo linfático	63 (29%)
	Hígado	44 (20%)
	Hueso	19 (9%)
	Sistema nervioso central	16 (7%)
	Peritoneo	11 (5%)
	Piel	10 (5%)
	Tejido blando	8 (4%)
	Abdomen	6 (3%)
	Pulmón	6 (3%)
	Pleura	5 (2%)
	Intestino	4 (2%)
	Tórax	4 (2%)
	Ovario	3 (1%)
	Mama	2 (1%)
	Otros	8 (4%)
	No especificado	7 (3%)

Medidas de resultado

Validez diagnóstica

Medida como sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos. De las 38 puntuaciones similares correspondientes a los 38 tipos tumorales, se consideró como resultado como positivo si fue $\geq 0,12$.

- Verdadero positivo: la mayor puntuación obtenida coincidió con el diagnóstico registrado para la muestra.
- Verdadero negativo: valores por encima del umbral que no coincidieron con el diagnóstico registrado.
- Falsos positivos: resultado del algoritmo positivo que no coincidió con el diagnóstico establecido.
- Falso negativo: diagnóstico registrado entre las muestras en las que el algoritmo resultó negativo.

Reproducibilidad

Evaluada de tres formas:

1. En primer lugar, se analizaron 11 pacientes aleatorios diagnosticados de 3 tipos de tumores (carcinoma colorectal, carcinoma de mama y melanoma cutáneo) en 3 grupos y momentos en el tiempo diferentes.
2. En segundo lugar, se evaluó si la preparación de la muestra (cortes de tejido fresco congelado o cortes de tejido embebidos en parafina) afectó a la clasificación realizada por EPICUP™.
3. Finalmente, examinaron si la metástasis de un determinado tipo de tumor presentó un perfil de metilación del ADN diferente al del tumor primario lo que podría originar errores en la clasificación. Para ello se incluyeron 534 metástasis de tumores con origen primario conocido representando 21 localizaciones diferentes.

Se evaluó la concordancia entre la predicción del EPICUP™ y diferentes métodos diagnósticos utilizados, entre los que se encontraban la necropsia (n=1), apariencia del tumor primario (n=38), microscopía óptica (m=181) e inmunohistoquímica (n=43).

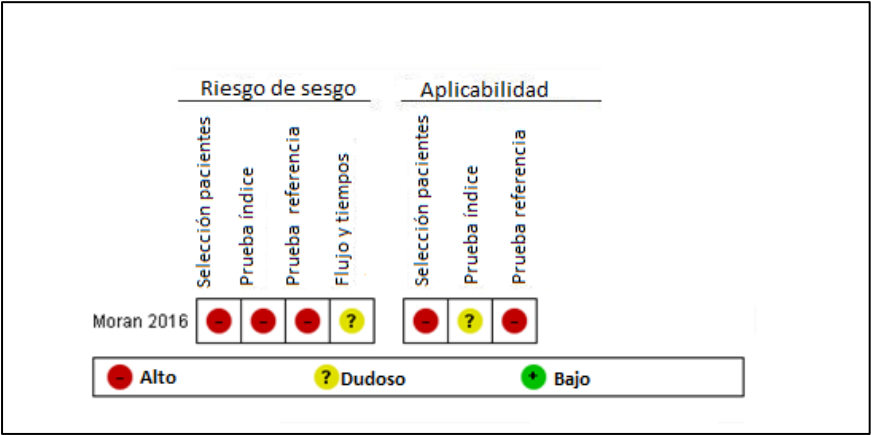
Supervivencia

Se realizó un análisis de Kaplan-Meier comparando pacientes que recibieron tratamiento específico según el tipo de tumor que predijo el EPICUP™ *versus* el tratamiento empírico. Así mismo, se evaluaron los factores de riesgo que de forma independiente influyeron en la mortalidad mediante un análisis multivariante de Cox.

Riesgo de sesgos

En general, el riesgo de sesgo del estudio analizado fue alto. El diseño fue retrospectivo (fase II), realizado sobre muestras de metástasis en las que se conocía la localización del tumor primario, por lo que el espectro de pacientes no sería el propuesto por los autores como la población diana de la prueba diagnóstica EPICUP™, es decir, sujetos en los que no se consigue localizar el tumor primario con los algoritmos diagnósticos utilizados en la práctica clínica habitual. La variabilidad en la prueba de referencia, así como la falta de un *gold estándar* supuso, de igual forma, un riesgo de sesgo elevado. Los datos aportados por los autores no permitieron completar la tabla 2x2.

Figura 3. Evaluación de riesgo de sesgo según QUADAS-2.



En la cohorte seleccionada para el estudio de la supervivencia, el análisis se realizó con el 42,6% de los 216 pacientes de la muestra, sin que los autores especificaran las causas de las pérdidas. No se especificó el cálculo del tamaño de la muestra, los criterios de inclusión ni la forma de selección de los participantes. Por el contrario, las fortalezas del estudio radicarían en que los autores pusieron medios para evitar el sesgo debido a factores de confusión mediante el análisis multivariante y la mortalidad fue el desenlace a evaluar, lo que garantizaría la objetividad en su medición.

Los autores declararon no tener conflicto de interés (Anexo 5 y 6. Figura 3).

Principales resultados

Validez diagnóstica

- Sensibilidad: 97,7% (IC95%: 96,1 a 99,2)
- Especificidad: 99,6% (IC95%: 99,5 a 99,7)
- Valores predictivos: positivo 88,6% (IC95%: 85,8 a 91,3) y negativo de 99,9% (IC95%: 99,9 a 100)
- Cocientes de probabilidad: calculados por la autora fueron 244,25 y 0,02 para el valor positivo y negativo, respectivamente, indicativo de prueba excelente.

Reproducibilidad

Los autores afirmaron que el análisis de los 3 lotes de las 11 muestras y realizados en 3 momentos diferentes obtuvieron los mismos resultados prediciendo el mismo tipo de tumor en todos los casos, con una desviación estándar media en la puntuación obtenida de 0,03. Del mismo modo, el método de preservación del ADN no afectó a la predicción realizada por el EPICUP™.

Encontraron que EPICUP™ predijo el tumor primario en el 94% de las 534 muestras de metástasis analizadas, sugiriendo que los patrones de metilación entre tumor primario y metástasis coincidieron en la mayoría de las ocasiones (Tabla 5).

Tabla 5. Concordancia entre EPICUP™ y pruebas de referencia					
Pruebas de referencia	Muestras evaluadas (n)	Compatible con EPICUP™	No compatible con EPICUP™	No informativa	Concordancia
Necropsia	1	1	0	0	100%
Seguimiento hasta la aparición del tumor primario	38	33	5	0	87%
Microscopio óptico	181	174	7	0	96%
Inmunohistoquímica	43	31	0	12	72%

Supervivencia

El EPICUP™ predijo la localización del tumor primario en 188 de los 216 de los pacientes seguidos (87%). Las 6 localizaciones más frecuentes representaron el 63% de los pacientes, siendo el carcinoma de pulmón de células pequeñas el más común (21% de los tumores detectados).

La mortalidad entre el grupo tratado empíricamente fue 51% en comparación con el 23% del grupo con tratamiento específico ($p=0,013$).

La mediana de supervivencia fue 8,1 meses (rango: 0,1-143,4) para los 114 pacientes de los que se dispuso de información, con un tiempo de seguimiento de 14,6 meses de mediana (rango: 0,1-143,4). Los pacientes en los que la quimioterapia se realizó empíricamente ($n=61$) tuvieron una mediana de supervivencia de 6 meses³. Cuando se realizó quimioterapia específica según la localización tumoral predicha por EPICUP™ ($n=31$), la mediana de supervivencia aumentó significativamente hasta 13,6 meses³ (log-rank $p=0,0029$) (Figura 4).

El tipo de tratamiento administrado se mantuvo como factor asociado a la mortalidad en el modelo de regresión multivariante de Cox, de forma que ajustando por el resto de las variables incluidas, las personas que recibieron terapia empírica sin tener en cuenta los resultados de EPICUP™ tuvieron un riesgo 3 veces superior de morir con respecto a aquellas con tratamiento específico de la localización del tumor primario (HR=3,14; IC95%: 1,35 – 7,30; $p=0,008$) (Figura 5).

Figura 4. Curvas de supervivencia de los pacientes con cáncer de origen desconocido que recibieron tratamiento específico en función de la predicción del EPICUP™

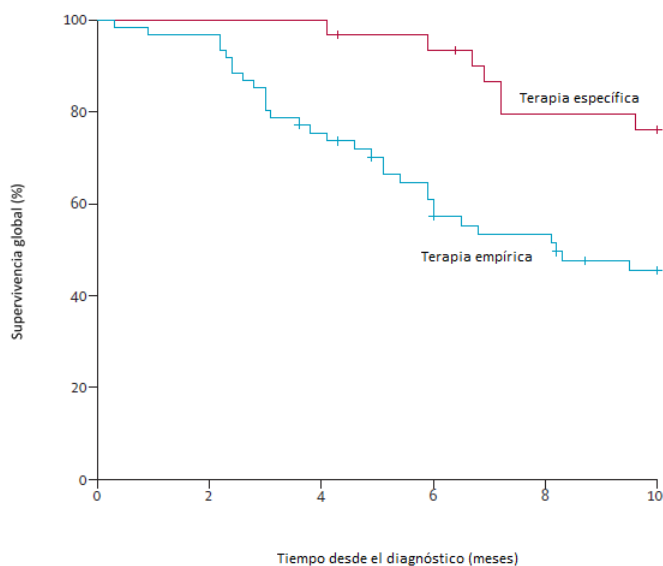
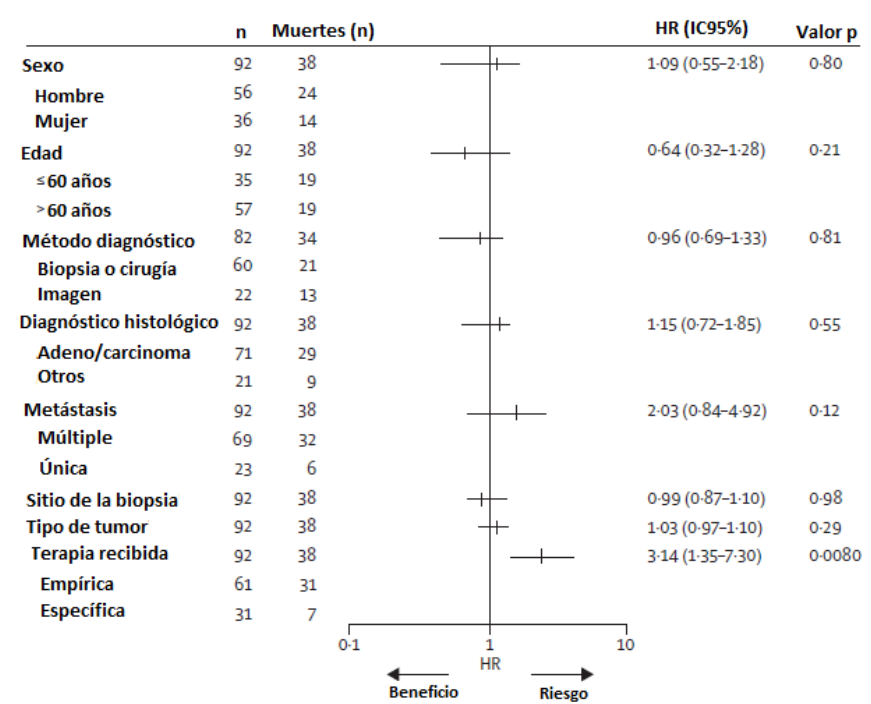


Figura 5. Análisis multivariante de Cox para la supervivencia de los pacientes con cáncer de origen desconocido que recibieron tratamiento específico en función de la predicción del EPICUP™.



Evaluación económica

Se han recuperado 2 comunicaciones a congreso que recogieron dos evaluaciones económicas, una de ellas desde la perspectiva del Sistema Sanitario Español¹⁶. Se realizó un análisis coste-efectividad mediante un modelo de decisión comparando la incorporación del EPICUP™ con la práctica clínica habitual y otros métodos moleculares (CancerTYPE ID, Cancer Origin Test y Responses DX). El análisis se limitó a 6 localizaciones para el subtipo histológico adenocarcinoma (mama, colon, páncreas, pulmón, hígado y próstata). Basado en un coste unitario de 3.000€ el coste incremental por año de vida ajustado por calidad (AVAC) fue dominante para el EPICUP™ en los tipos de tumor analizados (por debajo del umbral de 50.000€) (Tabla 6).

Los autores afirmaron haber realizado análisis de sensibilidad determinista y probabilístico para comprobar la solidez de los resultados obtenidos.

Tabla 6. Evaluación del coste (€) por AVAC ganado del EPICUP™ con respecto a otras alternativas diagnósticas desde la perspectiva del Sistema Nacional de Salud Español			
	Práctica clínica habitual	CancerTYPE ID	Cancer Origin Test
	ICER	ICER	ICER
Cáncer de mama	15.972€	3.878€	3.406€
Cáncer de colon	25.932€	5.889€	7.186€
Cáncer de páncreas	36.125€	4.294€	23.937€
NSCLC	41.571€	7.188€	16.840€
Carcinoma hepatocelular	28.881€	784€	20.444€
Cáncer de próstata	6.771€	1639€	2.116€
ICER: Ratio coste-efectividad incremental; NSCLC: Carcinoma de pulmón de células no pequeñas			

Impactos

Impacto en salud

- El diagnóstico del tumor primario optimiza la elección del tratamiento, evitando toxicidad de tratamientos inefectivos y mejorando el pronóstico de los pacientes.
- Un diagnóstico precoz disminuye la incertidumbre de los pacientes, evitando así los problemas derivados de la batería de procedimientos diagnósticos indicados en cada caso.
- Sin embargo, las diferencias encontradas en la supervivencia en función de la terapia empleada están basados en un solo estudio con una muestra de pacientes limitada.
- Según los autores², la determinación de la localización del tumor primario con EPICUP™ podría guiar el cribado de mutaciones de importancia terapéutica (efecto de un fármaco en presencia de una determinada mutación puede ser diferente). De esta forma, las decisiones clínicas podrían mejorar si estos datos se integrasen en la historia clínica (medicina de precisión)¹⁷.

Impacto ético, social, legal, político y cultural de la implantación de la tecnología

No se han identificado aspectos relacionados con el impacto ético, social, legal, político o cultural en esta tecnología.

Impacto económico de la tecnología

- Aunque el coste unitario del procedimiento ha sido estimado en 3.000€, la compañía estima un ahorro en tiempo y procedimientos diagnósticos específicos, traducido en un incremento en la supervivencia ajustada por calidad de vida¹⁶.
- Comparado con la práctica clínica habitual, el ICER fue de 15.882€ para el cáncer de mama, 25.858€ para el cáncer de colon y 35.374€ para el cáncer de páncreas¹⁶.
- El uso de ADN hace que la prueba sea estable, a diferencia de los métodos de ARN, molécula más frágil y de peor conservación en las muestras disponibles en los servicios de anatomía patológica de los hospitales.

Impacto en la organización

- El uso de la prueba EPICUP™ podría simplificar los algoritmos diagnósticos utilizados hasta ahora para la localización del tumor primario.
- Los autores destacan la posibilidad de la utilización de biopsia líquida como muestra para realizar el análisis epigenético en un futuro.

Difusión e introducción esperada de la tecnología

Este producto se encuentra comercialmente disponible en Europa.

Recomendaciones e investigación en curso

Investigación en curso

En el registro de ensayos clínicos clinicaltrials.gov no se han podido identificar estudios en marcha.

Guías y directrices

Las guías y recomendaciones localizadas se dirigen hacia el algoritmo diagnóstico de la enfermedad. No obstante, en ninguna de ellas se hace mención a la prueba a estudio.

- NICE clinical guideline. Metastatic malignant disease of unknown primary origin in adults: diagnosis and management (CG104). 2010¹⁸.
- European Society for Medical Oncology (ESMO). Cancers of unknown primary site: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. 2015⁷.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology for Occult Primary. 2011¹⁹.
- Consenso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y la Sociedad Española de Oncología Médica para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de origen desconocido. 2018¹¹.

Puntos clave

- La prueba EPICUP™ se basa en las características epigenéticas propias de las células de cada tejido y que podría identificar el origen del tejido del que proviene las metástasis en el tumor de origen desconocido.
- Los objetivos específicos de esta revisión se centraron en valorar la eficacia y seguridad del diagnóstico epigenético para la identificación del tumor primario en pacientes con tumor de origen desconocido.
- Se buscó en las bases de datos referenciales MedLine y Embase, así como en el registro de ensayos clínicos de la Cochrane Library, la Red Internacional de Agencias de Evaluación de Tecnologías y EuroScan. También se revisó manualmente diversos sitios WEB relacionados con el tema.
- Se seleccionaron los estudios de pacientes con tumor de origen desconocido en los que se utilizara el diagnóstico mediante perfiles epigenéticos, y cuyos resultados fueran seguridad y/o eficacia —en términos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos, cocientes de probabilidad, correlación, reproducibilidad.
- Sólo un estudio dio respuesta a la pregunta de investigación planteada. Se trató de un estudio de pruebas diagnósticas fase II con alto riesgo de sesgo, en el que se evaluaron 7691 muestras de pacientes con cáncer de origen desconocido en los que se pudo localizar el tumor primario. Los parámetros de validez diagnóstica obtenidos fueron altos, con sensibilidad y especificidad de 97,7% y 99,6%, respectivamente. Los autores afirmaron no alteración de la predicción en función del método de preservación de la muestra.
- En el análisis de supervivencia realizado sobre 216 pacientes se observó que las personas que recibieron terapia empírica sin tener en cuenta los resultados de EPICUP™ tuvieron un riesgo 3 veces superior de morir con respecto a aquellas con tratamiento específico de la localización del tumor primario, ajustando por posibles factores de confusión (HR=3,14; IC95%: 1,35 – 7,30; $p=0,008$).
- Si futuras investigaciones con diseños que minimicen posibles sesgos confirman los resultados obtenidos por la investigación de Moran *et al.*², esta prueba podría suponer un nuevo método diagnóstico para la identificación del tumor primario de forma precoz, de forma que se evitarían los problemas derivados de la batería de procedimientos diagnósticos y la toxicidad de tratamientos empíricos.

Bibliografía

1. Genética Médica. Epigenética [Internet]. Paterna: Genética Médica; 2016 [acceso 05/02/2019]. URL: <https://revistageneticamedica.com/epigenetica/>
2. Moran S, Martínez-Cardús A, Sayols S, Balañá C, Estival-González A, Moutinho C, et al. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2016;17: 1386-95.
3. Moran S, Martínez-Cardús A, Boussios S, Esteller M. Precision medicine based on epigenomics: the paradigm of carcinoma of unknown primary. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(11):682-94.
4. Lebrón R. Metilación diferencial en el genoma humano [Trabajo fin de máster]. Granada: Universidad de Granada; 2014 [acceso 04/02/2019]. URL: https://bioinfo2.ugr.es/Publicaciones/memoria_tfm_RL.pdf
5. Moran S, Vizoso M, Martínez-Cardús A, Gómez A, Matías-Guiu X, Chiavenna SM, et al. Validation of DNA methylation profiling in formalin-fixed paraffin-embedded samples using the Infinium HumanMethylation450 Microarray. *Epigenetics.* 2014; 9:829-33.
6. Soriano F. Análisis integrado de perfiles de metiloma [Trabajo de fin de Máster]. Granada: Universidad de Granada; 2017 [acceso 04/02/2019]. URL: http://masteres.ugr.es/moea/pages/curso201617/tfm1617/tfm_soriano/delgadofrancisco/
7. Fizazi K, Greco FA, Pavlidis N, Daugaard G, Oien K, Pentheroudakis G. Cancers of unknown primary site: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2015; 26:133-38.
8. Tomuleasa C, Zaharie F, Muresan MS, Pop L, Fekete Z, Dima D, et al. How to diagnose and treat a cancer of unknown primary site. *J Gastrointest Liver Dis.* 2017; 26:69-79.
9. Hainsworth JD, Greco FA. Overview of the classification and management of cancers of unknown primary site [Internet]. [s.l.]: UpToDate; 2017 [acceso 30/01/2019]. URL: https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-classification-and-management-of-cancers-of-unknown-primary-site?search=unknown%20primary%20site&source=search_result&selectedTitle=2~150&usage_type=default&display_rank=2
10. Meleth S, Whitehead N, Evans TS, Lux L. Technology assessment on genetic testing or molecular pathology testing of cancer with unknown primary site to determine origin. Technology assessment report [Internet]. Rockville (EE.UU): Agency for Healthcare Research and

Quality (AHRQ); 2013 [acceso 30/01/2019]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285003/>

11. Losa F, Iglesias L, Pané M, Sanz J, Nieto B, Fusté V, et al. 2018 consensus statement by the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology on the diagnosis and treatment of cancer of unknown primary. *Clin Transl Oncol*. 2018;20:1361-72.
12. Varadhachary GR, Abbruzzese JL. Carcinoma primario de origen desconocido. En: McGraw-Hill editor del libro. Harrison. Principios de Medicina Interna. 19ª ed. Columbus (EE.UU): McGraw-Hill; 2016.
13. Cantos B, Sánchez A, Maximiano C, Hurtado A, Sánchez MR. Carcinoma de origen desconocido: diagnóstico y manejo terapéutico. *Oncología*. 2006; 29:95-106.
14. Kato S, Krishnamurthy N, Banks KC, De P, Williams K, Williams C, et al. Utility of genomic analysis in circulating tumor DNA from patients with carcinoma of unknown primary. *Cancer Res*. 2017;77:4238-46.
15. Calabria I, Pedrola L, Berlanga P, Aparisi MJ, Sánchez-Izquierdo D, Cañete A, et al. El nuevo reto en oncología: la secuenciación NGS y su aplicación en la medicina de precisión. *An Pediatr (Barc)*. 2016;85:273.e1-273.e7.
16. Gracia A, Balañá C, Kaskens L, Chiavenna S, Matias-Guiu X, Rubio-Rodríguez D, et al. Economic analysis of EPICUP, an epigenetic test to predict the tissue of origin in cancer of unknown primary site, from the Spanish NHS perspective. *Value Health*. 2015;18:A356-7.
17. Horlings HM, Shah SP, Huntsman DG. Using somatic mutations to guide treatment decisions. *JAMA Oncol*. 2015; 1:275-6.
18. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Metastatic malignant disease of unknown primary origin in adults: diagnosis and management (CG104) [Internet]. Londres: NICE; 2010 [acceso 28/01/2019]. URL: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg104>.
19. Ettinger DS, Aquilnik M, Cates JM, Cristea M, Denlinger C, Eaton K, et al. Occult primary. Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011;9(12):1358-95.

Anexos

Anexo 1. Metodología empleada para la realización de la ficha técnica

Pregunta de investigación	¿Es seguro y/o eficaz —en términos de validez diagnóstica y precisión— el diagnóstico epigenético para la identificación del tumor primario en pacientes con tumor de origen desconocido?
Objetivos específicos	Se centraron en valorar la seguridad y/o la eficacia —en términos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos, cocientes de probabilidad, correlación, reproducibilidad— del diagnóstico epigenético para la identificación del tumor primario en pacientes con tumor de origen desconocido
Tipo de estudio	Revisión sistemática de la literatura siguiendo las recomendaciones recogidas por la declaración PRISMA ^a
Búsqueda bibliográfica	Fecha de búsqueda: hasta noviembre de 2018 Bases de datos referenciales: MedLine (OVID), EMBASE y el registro de ensayos clínicos de la Cochrane Library. Otras fuentes: <i>Centre for Reviews and Dissemination (CRD)</i>, <i>International Information Network on New and Emerging Health Technologies</i> (EuroScan), Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del SNS^b, Organización Mundial de la Salud (OMS), los <i>Centers for Disease Control and Prevention (CDC)</i>, <i>The National Institute for Health and Care Excellence (NICE)</i>, <i>The Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN)</i>, así como una revisión secundaria a partir de las referencias bibliográficas de los artículos recuperados. Bases de datos de estudios en marcha: ClinicalTrials.gov (http://clinicaltrial.gov/)
Criterio de inclusión	Población: pacientes con tumor de origen desconocido Intervención: diagnóstico epigenético Resultados: seguridad, eficacia —en términos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos, cocientes de probabilidad, correlación, reproducibilidad
Criterio de exclusión	Estudios no originales: revisiones narrativas, cartas al director, editoriales, notas Resúmenes de congresos Estudios preclínicos realizados sobre animales, <i>ex vivo</i> o <i>in vitro</i>

Extracción de los datos	La selección de los artículos y la extracción de los datos se realizó por un investigador experimentado. Las variables recogidas incluyeron información general como el autor, el país, el año de publicación, los objetivos, las características de los pacientes, así como de la intervención y el seguimiento. Variables específicas incluyeron indicadores de seguridad y eficacia.
Síntesis de la evidencia	La síntesis de los resultados se realizó de forma cualitativa
Evaluación del riesgo de la calidad	Para la valoración del riesgo de sesgo en el establecimiento de la calidad de los artículos originales se siguieron los criterios recomendados por Colaboración Cochrane ^c . La evaluación del riesgo de sesgo la realizó un investigador experimentado
^a Urrutia G, Bonfill X. Declaración PRISMA: una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y metanálisis. Med Clin (Barc). 2010;135(11):507-511 ^b http://www.redets.msssi.gob.es/ ^c Higgins JPT, Green S (editors). Assessing risk of bias in included studies. En: Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [Internet]. The Cochrane Collaboration; 2011. [acceso enero 2018]. URL: www.cochrane-handbook.org	

Anexo 2. Principales perfiles fenotípicos de los tumores más frecuentes

Mama	GATA3, mamoglobina, GCDFP-15, receptores hormonales (estrógenos, progesterona y andrógenos), CA 15-3, CK34BE12
Glándula salivar	Like breast, GFAP
Anejos cutáneos	Like breast, S100
Tiroides	PAX8, TTF1, tiroglobulina
Paratiroides	PTH, GATA3, sinaptofisina, cromogranina A
Pulmón (adenocarcinoma no mucinoso)	TTF1, napsina A, CEA
Pulmón (adenocarcinoma mucinoso)	TTF1, napsina A, CDX2, SATB2-, cadherina 17-, CEA
Cérvix (células escamosas)	p40, p63, p16, HPV + , PAX8, 34BE12
Endocérvix	CEA, p16, ER/PR-, HPV + , PAX8, vimentina-
Endometrio	PAX8, ER/PR, vimentina, CEA-, WT1-, CA 125
Ovario/ trompas de Falopio (seroso)	PAX8, WT1, ER/PR, vimentina, CA 125
Ovario (endometroide)	PAX8, ER/PR, vimentina, CA 125
Ovario (mucinoso)	PAX8, CDX2, WT1-, SATB2-, cadherina 17-, TTF1-
Mesotelioma	calretinina, WT1, CK5/6, vimentina, podoplanina (D2-40), CEA-
Colon/recto	CDX2, SATB2, cadherina 17, villina, AMACR, CEA, CA 19-9
Intestino delgado	CDX2, cadherina 17, SATB±
Páncreas/vías biliares	CDX2, CK17, cadherina 17, SATB2 ± , CEA, CA 19-9, DPC4-
Estómago	CDX2, CK17-, cadherina 17, SATB±
Hígado	arginasa-1, Hep Par1, glipicano 3
Riñón	PAX8, RCC, anhidrasa carbónica IX, glutatión reductasa, vimentina, CD10, AMACR, c-KIT
Adrenal	SF1, melan-A, inhibina alfa, sinaptofisina, cromogranina A, calretinina
Próstata	NKX3, PSA, AMACR , AR, fosfatasa ácida prostática

Carcinoma células escamosas	p40, p63, 34BE12, p16/p53, HPV, MMP-13
Carcinoma células transicional	p40, p63, GATA3, uroplaquina II, S100P, CK34BE12 + , CK8/18
Carcinoma mioepitelial	p63, CK34BE12, miosina, EMA, S100, GFAP, CD10
Tumores neuroendocrinos	sinaptofisina, cromogranina A, CD56/CD57, PGP9.5, neurofilamentos

Anexo 3. Estrategias de búsqueda

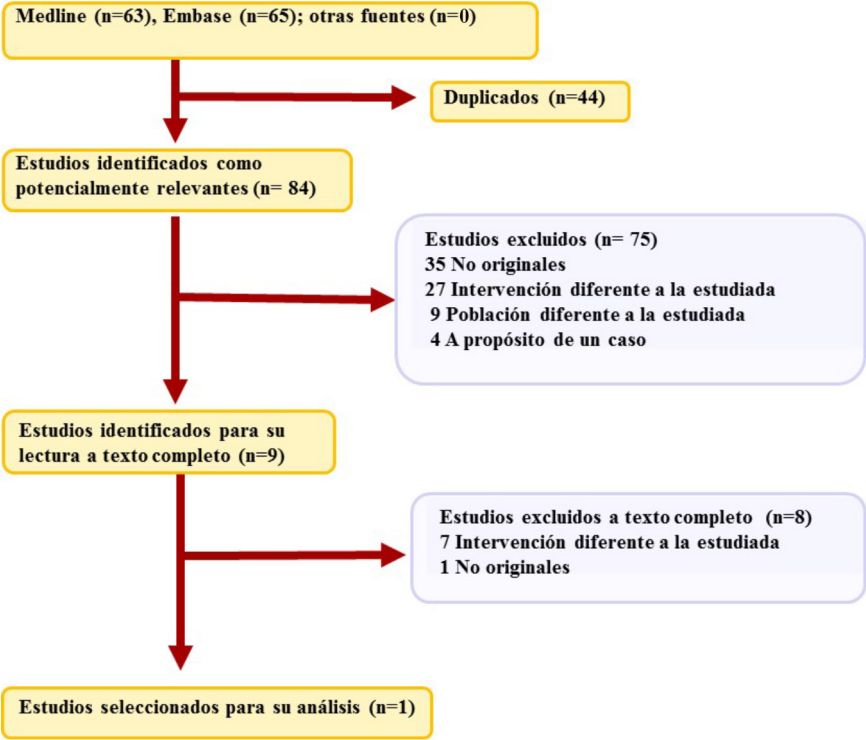
MEDLINE DATABASE: OVID MEDLINE(R) AND EPUB AHEAD OF PRINT, IN-PROCESS & OTHER NON-INDEXED CITATIONS, DAILY AND VERSIONS(R) <1946 TO NOVEMBER 28, 2018>

- 1 Neoplasms, Unknown Primary/
2 ((cancer or carcinoma or neoplasm* or tumour*) adj2 “unknown
primary”).ab,ti.
3 1 or 2
- 4 Gene Expression Profiling/
5 Genetic Testing/
6 DNA Methylation/
7 (epigenetic* or epigenomic* or “molecular gene expression” or
“molecular diagnosis” or “gene expression” or “DNA methylation” or
EPICUP).ab,ti.
8 4 or 5 or 6 or 7
9 3 and 8
- 10 “Sensitivity and Specificity”/
11 Observer Variation/
12 (sensitivity or specifi* or (value adj3 (predictive or positiv* or negativ*
or false or true)) or likelihood or ROC).ab,ti.
13 10 or 11 or 12
14 9 and 13
- 15 limit 14 to (((addresses or autobiography or bibliography or biography
or case reports or clinical conference or comment or congresses or
‘corrected) and republished article’) or dictionary or directory or
duplicate publication or editorial or historical article or interactive
tutorial or interview or lectures or legal cases or legislation or letter or
news or newspaper article or portraits or webcasts)
16 14 not 15
17 limit 16 to (english or french or italian or portuguese or spanish)

EMBASE

- #1 'cancer of unknown primary site'/exp OR 'cancer of unknown primary site'
- #2 ((cancer OR carcinoma OR neoplasm* OR tumour*) NEAR/2 'unknown primary'):ab,ti
- #3 #1 OR #2
- #4 'gene expression profiling'/exp
- #5 'dna microarray kit'/exp
- #6 epigenetic*:ti,ab OR epigenomic*:ti,ab OR 'molecular gene expression':ti,ab OR 'molecular diagnosis':ti,ab OR 'gene expression':ti,ab OR 'dna methylation':ti,ab OR epicup:ti,ab
- #7 #4 OR #5 OR #6
- #8 #3 AND #7
- #9 'sensitivity and specificity'/exp
- #10 'observer variation'/exp
- #11 sensitivity:ti,ab OR specifi*:ti,ab OR ((value NEAR/3 (predictive OR positiv* OR negativ* OR false OR true)):ti,ab
- #12 ((precision:ti,ab OR likelihood:ti,ab OR roc:ti,ab) AND curve:ti,ab OR variation:ti,ab) AND observer:ti,ab
- #13 #9 OR #10 OR #11 OR #12
- #14 #8 AND #13
- #15 #8 AND #13 AND ([article]/lim OR [article in press]/lim OR [review]/lim)

Anexo 4. Diagrama de flujo



Anexo 5. Evaluación del riesgo de sesgo del estudio incluido

Riesgo de sesgo según el QUADAS-2			Riesgo de sesgo
Sesgo de selección	La muestra fue consecutiva o aleatoria	No	ALTO
	Se evitó el diseño caso control	No	
	Se evitaron exclusiones inapropiadas	Incierto	
	Aplicabilidad	Baja	Altas dudas
Sesgo relacionado con la prueba a estudio	Interpretación de la prueba cegada a los resultados de la prueba de referencia	No	ALTO
	Se especificó el punto de corte	Si, aunque no la correlación de la puntuación con la localización	
	Aplicabilidad	Incierto	Dudoso
Sesgo relacionado con la prueba de referencia	El estándar de referencia clasifica correctamente a la enfermedad estudiada	No	ALTO
	Interpretación de la prueba cegada a los resultados de la prueba a estudio	Si	
	Aplicabilidad		Altas dudas
Sesgo relacionado con el flujo y cronograma	Intervalo entre prueba a estudio y prueba de referencia adecuado	Incierto	DUDOSO
	A todos los pacientes se les realizó la misma prueba de referencia	No	
	Se incluyeron a todos los pacientes en el análisis	Si	
Otros: financiación industria		No	BAJO

Riesgo de sesgo según el ROBINS-I			Riesgo de sesgo
	Pre intervención		
Sesgo debido a los factores de confusión	Se realiza análisis multivariante para el control de los posibles factores de confusión		Bajo
Sesgo en la selección de los participantes en el estudio	Diseño retrospectivo y prospectivo. No se especificaron los criterios de inclusión de los participantes ni la forma de selección de la muestra. Tampoco se ofrecieron detalles del cálculo de tamaño muestral		Alto
	En la intervención		
Sesgo en la clasificación de la intervención	La intervención se clasificó como tratamiento empírico o específico de la localización del tumor primario en base a los resultados de la prueba EPICUP		Bajo
	Post-intervención		
Sesgo debido a las desviaciones en las intervenciones	Se desconoce si hubo enmascaramiento de los profesionales sanitarios, aunque al tratarse de pacientes con mal pronóstico el riesgo de sesgo de provisión desigual de los cuidados sanitarios sería bajo		Bajo
Sesgo debido a las pérdidas	Se producen pérdidas que no se especifican. Realizan análisis por protocolo		Alto
Sesgo en la medición de los resultados	El desenlace estudiado es la mortalidad, por lo que la medición del resultado es inequívoco		Bajo
Sesgo en la selección de los resultados expuestos	No procede		No procede

