Identificación de biomarcadores en el contexto del tratamiento personalizado para pacientes oncológicos

María Mercedes Vásquez Bonilla[1,2] Sara Palacios Zambrano[2]

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. mercedes.vasquez@edu.uah.es **2** Laboratorio de Dianas Terapéuticas - Hospital Universitario HM Sanchinarro.

Resumen

El presente trabajo muestra el papel fundamental que desempeña el Laboratorio de Dianas Terapéuticas (LDT) del Hospital Universitario HM Sanchinarro en el diagnóstico molecular de pacientes oncológicos y la detección de biomarcadores genéticos. El objetivo del LDT es individualizar el tratamiento y mejorar el pronóstico de los pacientes mediante la aplicación de herramientas tecnológicas disponibles en sus instalaciones. Al hablar de medicina de precisión en oncología, es necesario disponer de suficientes biomarcadores (*EGFR, KRAS, IDH, BRAF*, entre otros), por un lado, porque brindan información sobre el tipo de mutación presente en el paciente, y, por otro, porque establecen en qué gen se encuentra y en qué cantidad. Este último, se correlaciona con la frecuencia alélica de la mutación de interés, pudiendo así, monitorizar al paciente. Asimismo, el estudio de biomarcadores permite evaluar la progresión de la enfermedad a través del estudio de la carga tumoral (biopsia liquida), conocer si hay respuesta molecular bajo el tratamiento elegido y, finalmente, evaluar la posible aparición de mutaciones de resistencia como consecuencia de dichas mutaciones. El avance tecnológico de técnicas como la secuenciación masiva (NGS) ha resultado una ventaja importante en cuanto a rapidez y precisión de detección. También, permite ampliar el conocimiento de las alteraciones genéticas de los tumores, de las personas que las portan y las principales vías de señalización celular implicadas. En esta revisión, se resumen los pasos en la detección de biomarcadores clínicamente relevantes en oncología junto con una serie de casos clínicos llevados a cabo dentro del Laboratorio de Dianas Terapéuticas. Entre los más representativos se destacan el cáncer de pulmón, glioma, colon y recto.

Palabras clave: diana terapéutica; oncología; biomarcadores; variantes genéticas.

Recibido: 8 de junio de 2022 A incluir en la edición del artículo

Copyright: © 2022 María Mercedes Vásquez Bonilla et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

Introducción

El cáncer es una enfermedad multifactorial causada por factores genéticos y ambientales, donde las células adquieren la capacidad de proliferar, migrar e invadir tejidos adyacentes y metastatizar tejidos distales a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático [1]. Dada la gran heterogeneidad en la respuesta clínica observada en pacientes oncológicos, ha sido necesaria la identificación y el estudio de dianas terapéuticas y biomarcadores, con el objetivo de beneficiar a los pacientes con un determinado tratamiento farmacológico.

En oncología, una diana terapéutica se puede definir como un componente celular que contribuye al inicio y progresión de la carcinogénesis que puede ser reconocido por un fármaco y producir una respuesta celular [2]. Es por esto, que la patología molecular y más concretamente el Laboratorio de Dianas Terapéuticas (LDT) cumple un papel fundamental en la medicina de precisión del cáncer, la cual se refiere al uso de terapias con mayor probabilidad de favorecer a un subgrupo de pacientes cuyo cáncer muestra ciertas características moleculares, en contraposición a la visión tradicional en la que todos los tumores originados en un mismo tejido se consideraban como biológicamente similares y se trataban con un mismo fármaco [3].

Por su parte, un biomarcador es una biomolécula objetivamente medible, pudiendo ser una proteína, un metabolito, ARN o ADN, que puede aportar información específica para cada paciente sobre su diagnóstico, su pronóstico o la respuesta a un determinado tratamiento. Los biomarcadores, por tanto, pueden categorizarse como diagnósticos, pronósticos y predictivos. Un biomarcador diagnóstico identifica a las personas con una enfermedad, pudiendo así clasificarla [4]. El biomarcador pronóstico determina la probabilidad de un evento clínico o recurrencia de la enfermedad en pacientes con una condición médica de interés. En oncología, permite predecir la evolución clínica del tumor independientemente del tratamiento que reciba el paciente. Por último, un biomarcador predictivo lo definen características del

tumor o del paciente que se asocian con el grado de respuesta a un determinado fármaco. En la Tabla 1 se describe una lista de algunos de los biomarcadores empleados en la práctica clínica en oncología.

Biomarcador	Tipo de cáncer	Metodología de detección
BRAF	Melanoma, colorrectal, NSCLC, tiroides, glioma	Mutaciones específicas (secuenciación, PCR en tiempo real, IHQ)
EGFR	NSCLC	Mutaciones específicas (secuenciación, PCR en tiempo real)
HER 2	Mama, pulmón, colorrectal, estómago, útero	Expresión de proteína, amplificación de genes o secuenciación de mutaciones (IHQ/ISH)
IDH1/IDH2	Sistema biliar, glioma	Mutaciones específicas (secuenciación, PCR en tiempo real)
KIT	Estroma gastrointestinal (GIST), melanoma	Mutaciones específicas (secuenciación)
RAS (KRAS/NRAS)	Colorrectal	Mutaciones específicas (secuenciación, PCR en tiempo real)
TML	Uso agnóstico	Secuenciación masiva (NGS)
ER	mama	IHQ
Ki-67	mama, pulmón	Perfil de expresión génica, IHQ
PD-L1	mama, pulmón, estómago	IHQ
TP53	estómago, colorrectal, pulmón	Mutaciones específicas (secuenciación, IHQ)

Tabla 1. Principales biomarcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos en tumores sólidos utilizados actualmente en la práctica clínica. NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas. IHQ: inmunohistoquímica. ISH: hibridación in situ. Adaptado de Werneck Da Cunha *et al*., Exp. Pathol. 2021; 4(1): 1-27.

Las pruebas moleculares para el diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer comienzan con la adquisición del material biológico. El tipo de muestra empleado suelen ser biopsias, ya sea una pequeña muestra de tejido o un órgano completo. Asimismo se pueden utilizar citologías (células sueltas), que se obtienen tras el raspado de superficie de un tejido o aspiraciones mediante aguja fina [5]. Generalmente, se usan biopsias de tejido fijadas en formaldehído e incluidas en parafina (FFPE), porque se obtienen como parte de la atención clínica de rutina. Sin embargo, este procedimiento conlleva una intervención altamente invasiva, que a pesar de utilizar una cantidad significativa de muestra, no representa la heterogeneidad tumoral [6]. La heterogeneidad se puede clasificar como intertumoral (entre distintos tumores) e intratumoral (pudiéndose detectar distintos clones tumorales con alteraciones moleculares diferentes dentro de un mismo tumor) que, en conjunto, determinan la progresión de la enfermedad, además de contribuir al fracaso terapéutico y la resistencia a medicamentos [7].

En la era actual de la oncología de precisión, cuando el tejido no se encuentra disponible, la muestra se haya agotado o se requiera realizar la monitorización de la enfermedad, se recomienda analizar los distintos biomarcadores a partir de biopsias líquidas. La biopsia líquida consiste en el aislamiento y análisis de analitos tumorales presentes en fluidos biológicos. Estos analitos son liberados por las células cancerígenas hacia el torrente sanguíneo y permiten evaluar mutaciones somáticas, alteraciones del número de copias y fusiones de genes mediante la aplicación de métodos altamente sensibles y específicos, como por ejemplo la PCR digital y NGS. La biopsia líquida es una alternativa rápida y mínimamente invasiva para monitorizar cambios moleculares en el tumor a lo largo de la evolución de la enfermedad [8]. A pesar de su potencial, el ADN tumoral circulante (ADNct) no es necesariamente aplicable a todos los cánceres; algunos tipos de tumores son malos excretores de ADN, como son los gliomas y sarcomas, siendo, por tanto, un obstáculo obvio para implementarla como metodología rutinaria en la clínica [9].

A la hora de trasladar el estudio de dianas terapéuticas y biomarcadores predictivos a la práctica clínica se requiere de un método sensible y específico para caracterizar la alteración genética o molecular subyacente. Los métodos de rutina para analizar biomarcadores celulares incluyen: inmunohistoquímica (IHQ), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la secuenciación Sanger y la secuenciación masiva (NGS). Cada método tiene su sensibilidad, especificidad, tiempo de

respuesta (TAT), nivel de automatización, y necesidad de equipo especializado y personal capacitado. En particular, el tiempo de respuesta es un parámetro importante, ya que los retrasos en TAT pueden conducir a un uso menos eficiente de las terapias dirigidas [10]. Por este motivo, según las pautas establecidas por el *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), se recomienda un TAT de 10 días para el caso de la aplicación de NGS entre la recepción de la muestra y el informe de los resultados obtenidos [11]. La Tabla 2 compara las técnicas comúnmente empleadas dentro de los laboratorios de patología molecular para la detección de biomarcadores.

	IHQ	**FISH**	**PCR**	**NGS**
Sensibilidad, especificidad y confiabilidad	Sensible, carece de especificidad (los casos positivos necesitan confirmación con FISH u otro método)	Alta sensibilidad y especificidad	Mayor sensibilidad	Sensibilidad y especificidad muy alta
N° de células tumorales necesarias para el análisis	Pocas células	50 células evaluables	600-1000 células	600-1000 células (3-5 láminas FFPE)
Variantes de un solo nucleótido (SNV) + indels (Sí/No)	?	No	Sí	Sí
Variantes del número de copias (CNV) (Sí/No)	Sí	Sí	No	Sí
Personal y experiencia requerida	La interpretación requiere un patólogo experimentado	Requiere dos lectores/patólogo experto	Requiere experiencia y mucha mano de obra	Requiere analista de datos
Tiempo de respuesta (TAT)	1 día	1 día	2 días	5-10 días

Tabla 2. Pros y contras del uso de marcadores únicos (IHQ, FISH, PCR) y marcadores múltiples (NGS) para la detección de alteraciones genéticas. Adaptado de Flodgren, G. M & Hamidi, V. 2021.

La aparición de la secuenciación masiva ha hecho posible el estudio sistemático de las alteraciones genéticas, y ha permitido comprender los procesos y conocer las vías de señalización celular implicadas en el cáncer [12]. La NGS se emplea cada vez más en oncología clínica, ya que es una tecnología rápida y de alto rendimiento que permite la secuenciación paralela masiva de ADN de genomas humanos completos, exomas o exones de genes seleccionados (panel de genes) [13]. A día de hoy, los laboratorios de patología molecular suelen utilizar estos últimos. Dentro de un panel de genes se pueden secuenciar regiones concretas de los mismos donde se localizan la mayor parte de las alteraciones descritas para cada uno de ellos (regiones *hotspot*) como es el caso del exón 15 de *BRAF*, los exones 18 al 21 de *EGFR*, los exones 2, 3 y 4 de los genes *KRAS* y *NRAS* o para cubrir la totalidad de las secuencias codificantes y relevantes para un gen determinado (*TP53*) [14]. Tras la obtención de resultados por NGS, la patogenicidad de las variantes deben ser informadas y clasificadas siguiendo las directrices del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) o del *Association for Molecular Pathology* (AMP). Las variantes pueden ser clasificadas como patogénica, probablemente patogénica, variante de significado incierto (VUS), probablemente benigna o benigna. Los laboratorios de diagnóstico molecular utilizan herramientas de visualización (IGV) y bases de datos (COSMIC, ClinVar, *My Cancer Genome*, cBioportal) para facilitar la interpretación de los resultados de NGS [15].

Más recientemente, la carga mutacional tumoral (TML) se ha empleado como biomarcador predictivo para identificar a los pacientes que serán candidatos a tratamiento con inmunoterapia. El TML representa el número de mutaciones por megabase (muts/Mb) que albergan las células tumorales en una neoplasia determinada y se puede calcular mediante la utilización de NGS. Los valores de TML varían dependiendo del tamaño de panel que se emplee y cómo se analicen los datos [16]. Otro factor importante a mencionar es que el LDT participa en los comités de tumores moleculares (MTB), los cuales representan una valiosa herramienta para respaldar el tratamiento personalizado de un paciente. El MTB es un equipo multidisciplinar que reúne diferentes especialistas, incluidos oncólogos, patólogos, genetistas y biólogos moleculares, con el objetivo de revisar, discutir e interpretar toda la información referente a la historia general del paciente en casos que se hayan realizado secuenciación masiva para así aumentar la eficiencia en el flujo de trabajo [17]. Las neoplasias malignas raras representan colectivamente casi una cuarta parte

de todos los cánceres, mucho más que cualquier cáncer común, por lo que representan el objetivo más importante para ser discutidos en el MTB.

Esta revisión tiene como objetivo resumir el trabajo realizado en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas en el Hospital Universitario HM Sanchinarro, su contribución durante la detección de biomarcadores genéticos clínicamente relevantes con fines diagnósticos, pronósticos y predictivos, mediante la aplicación de nuevas y tradicionales técnicas que permiten validar los resultados, para la individualización del tratamiento y mejorar el pronóstico de todos los pacientes con cáncer.

Materiales y métodos

Selección de la muestra

En primer lugar, un patólogo revisa y marca las áreas tumorales en portaobjetos teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) para determinar el porcentaje de células tumorales contenido por área. Para la extracción de ácidos nucleicos se puede emplear una o dos secciones de 5 µm de espesor de tejido FFPE [18]. El aislamiento de ADN se realiza utilizando el kit de extracción Cobas® DNA Sample Preparation (Roche Molecular Diagnostics) y para la extracción de ARN se emplea el kit High pure FFPET RNA Isolation (Roche Molecular Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Pruebas moleculares para detectar alteraciones genéticas

Varias técnicas están disponibles para la detección de alteraciones genéticas en una muestra de tumor con fines clínicos en el escenario de diagnóstico molecular.

PCR en tiempo real

COBAS

El sistema Cobas® 4800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) es un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real capaz de detectar variantes genéticas específicas. El ADN diana se amplifica y se analiza utilizando los reactivos proporcionados en el kit BRAF/NRAS Mutation Test (LSR), capaz de detectar 11 mutaciones puntuales en los exones 11 y 15 en el gen del protooncogén B-Raf (*BRAF*) y 25 mutaciones en los exones 2, 3 y 4 en el gen *NRAS*, mientras que el kit KRAS Mutation Test v2 (LSR), detecta 28 mutaciones en los exones 2, 3 y 4 en el gen homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten (*KRAS*). Los análisis mutacionales se realizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Idylla

El sistema Idylla™ (Biocartis, Mechelen, Bélgica) es una técnica automatizada de PCR en tiempo real que emplea cartuchos de un solo uso para detectar 51 mutaciones clínicamente relevantes de *EGFR*. Los cartuchos desechables se cargan con secciones de tejido FFPE sin necesidad de preparar previamente la muestra ni extraer el ADN y a continuación se insertan en el Instrumento Idylla™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Varios ensayos se multiplexan dentro de cada cámara con seis fluoróforos, lo que permite el análisis simultáneo del ADN para las variantes y el EGFR total como control de procesamiento de muestras endógenas [19]. Durante la amplificación y detección específicas, las señales fluorescentes se generan y analizan de manera automática mediante el software específico para EGFR (Paquete de Tipo Test, EGFR TTP) versión 1.2 (Biocartis, Mechelen, Bélgica) reportando finalmente el tipo de mutación detectada. Los resultados se informan de la siguiente manera: i) mutación detectada, ii) mutación no detectada, o iii) no válido (es decir, no se obtuvo ningún resultado en la prueba)

PCR específica de metilación

El patrón de metilación del ADN en la isla CpG del gen *MGMT* se determina mediante PCR específica de metilación (MSP) con ADN tratado con bisulfito. La conversión de ADN con bisulfito se realiza utilizando el kit EpiTect Bisulfito (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN se trata con bisulfito de sodio para convertir todos los residuos de citosina no metilados en uracilo, mientras que la citosina metilada permanece sin cambios. Para la MSP se requieren cebadores específicos de metilación (metilados y no metilados), seguido de un gel de agarosa al 3% para visualizar los resultados.

Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger, se lleva a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), mediante el sistema ABI Prism (Applied Biosystems) de terminadores fluorescentes Big Dye™ y el instrumento de electroforesis multicapilar ABI 3730.

NGS y análisis de variantes

El panel Oncomine™ Comprehensive Assay v3 (OCAv3) está diseñado para el análisis de variantes en 161 genes relevantes en el desarrollo del cáncer en tumores sólidos mediante la plataforma Ion S5™ (ThermoFisher Scientific). Para la secuenciación, las librerías se preparan con el sistema Ion Chef™ y se cargan en chips Ion 540™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realiza con el secuenciador Ion S5™. Las alteraciones que cubre el panel se dividen en mutaciones puntuales (análisis de ADN: sustituciones, inserciones o deleciones), alteraciones en el número de copias (análisis de ADN) y reordenamientos (análisis de ARN). Los datos se analizan mediante el programa Ion Reporter v5.18 (ThermoFisher Scientific). El análisis bioinformático incluye: (1) el alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia (GRCh37/hg19) para los genes diana tras filtrado según criterios de calidad; (2) la identificación de variantes; y (3) anotación de las variantes.

El panel Oncomine™ Tumor Mutation Load (TML) analiza 409 genes relevantes para la carcinogénesis de tumores sólidos, los cuales representan 1.7Mb del genoma. El cálculo de la carga mutacional se realiza con el programa Ion Reporter v5.18, empleando un algoritmo específico, e informa el número de mutaciones puntuales somáticas no sinónimas por megabase, tras descartar polimorfismos y mutaciones consideradas conductoras (*driver*).

Resultados

El cáncer es una enfermedad genética muy heterogénea por lo que resulta imprescindible la búsqueda de marcadores moleculares para cada tipo de cáncer en el contexto de la medicina de precisión [20]. A la hora de realizar cualquier prueba molecular es de gran importancia considerar el porcentaje tumoral de la muestra, así como la cantidad disponible de la misma. Por ejemplo, en el entorno de atención médica a pacientes con cáncer de pulmón, los oncólogos y patólogos deben establecer qué pruebas y biomarcadores emplear con el fin de promover el correcto aprovechamiento de la muestra, ya que estos pacientes poseen una cantidad limitada de tejido tumoral. Dentro del LDT del Hospital Universitario HM Sanchinarro se ha establecido un flujo de trabajo similar al esquema representado en la Figura 1 para favorecer la búsqueda de biomarcadores empleando la menor cantidad de muestra posible en un determinado tiempo.

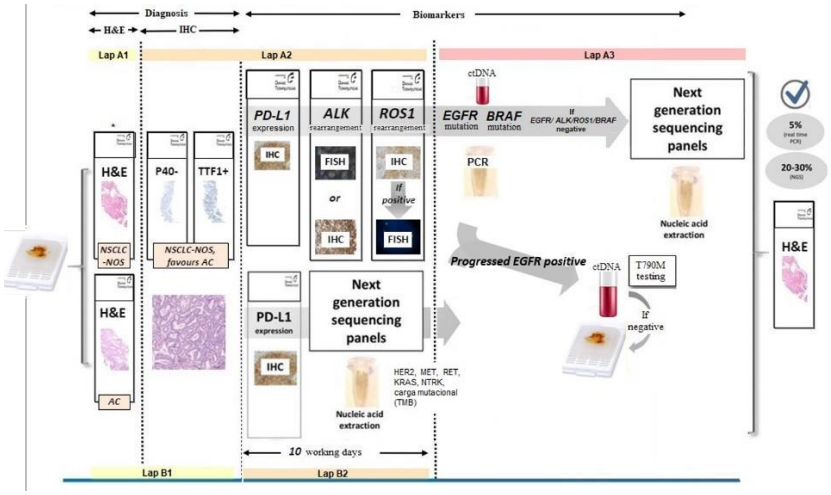

Figura 1. Diagrama de flujo para la priorización de muestras en el estudio de biomarcadores predictivos en pacientes con adenocarcinoma pulmonar avanzado. La ruta A es para los casos que requieren IHQ clasificatoria, mientras que la ruta B es para los casos que se diagnostican basándose únicamente en la H&E. * Adenocarcinomas (AC) o carcinomas escamosos (SCC) de pacientes no fumadores o menores de 50 años. Adaptado de Conde E *et al*. Clin Transl Oncol. 2020; 22(7): 989–1003.

Diariamente al Laboratorio de Dianas Terapéuticas llegan diversas solicitudes por parte de médicos oncólogos que requieren el análisis de marcadores moleculares para pacientes con diferentes tipos de cáncer. Entre los más comunes se encuentran: cáncer de pulmón, mama, melanoma y colon. A continuación, se describen algunos de los casos más relevantes que se han recibido entre los meses de marzo y junio del año 2022.

Paciente 1: mujer de 49 años que presenta carcinoma epidermoide pulmonar (carcinoma no microcítico). Se realizó el aislamiento de ADN a partir de bloque FFPE que contenía aproximadamente 60% de celularidad tumoral. Para determinar la presencia de mutaciones en el gen *EGFR*, el cual se encuentra mutado en aproximadamente el 10% de los carcinomas epidermoides de pulmón, se utilizó el kit cobas EGFR Mutation Test v2 y se observó una mutación puntual c.2573T>G, p.Leu858Arg en el exón 21 y la sustitución c.2369C>T, p.Thr790Met en el exón 20. Posteriormente, la muestra se analizó mediante secuenciación masiva confirmando así el resultado de positividad dual para el gen *EGFR*.

Paciente 2: varón de 43 años, diagnosticado con adenocarcinoma de pulmón. Se solicitó realizar una prueba de *EGFR*, *BRAF* y *KRAS*; la muestra exhibe un porcentaje tumoral aproximadamente del 60%. Usando el kit Idylla™ se analizó el gen *EGFR* y se observó una deleción en el exón 19 (del19). Aproximadamente entre el 10%-30% de los adenocarcinomas de pulmón presentan mutaciones en *EGFR*, siendo la deleción en el exón 19 una de las alteraciones más frecuentes, con una incidencia aproximada del 50% del total de mutaciones descritas [21]. Mediante la utilización del sistema Cobas se determinó la ausencia de mutaciones en los genes *BRAF* y *KRAS*.

Paciente 3: mujer de 45 años, presenta tumoración cerebral en el lóbulo temporal. A través del informe patológico se describe la presencia de un posible oligodendroglioma grado II. Para el diagnóstico definitivo se recomienda determinar el estatus de los genes *IDH1* e *IDH2*, y analizar la metilación del promotor *MGMT* para evaluar un posible tratamiento adyuvante, de acuerdo a las guías de diagnóstico y manejo de tumores cerebrales de bajo grado (grado II y III). El ADN se extrajo a partir de un bloque FFPE que contenía un porcentaje tumoral aproximado del 100%. Mediante secuenciación Sanger se determinó la presencia de mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*. Se evidenció una mutación en el exón 4 del gen *IDH1* c.395G>A, p.Arg132His (Figura 2), que representa >90% de todas las mutaciones de *IDH1* [22], mientras que el gen *IDH2* no mostró mutación en el exón 4 (secuencia de tipo salvaje). Posteriormente se efectuó el estudio de metilación del promotor *MGMT* mediante MSP, donde se observó la presencia de metilación del gen *MGMT* (Figura 3).

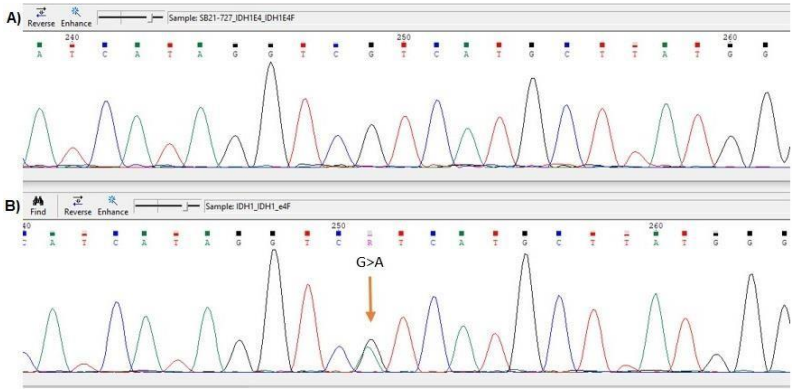

Figura 2. Análisis mediante secuenciación de Sanger del exón 4 de *IDH1*. (A) muestra salvaje (WT), (B) muestra de tejido tumoral (*IDH1*, c.395G>A). IDH: isocitrato deshidrogenasa.

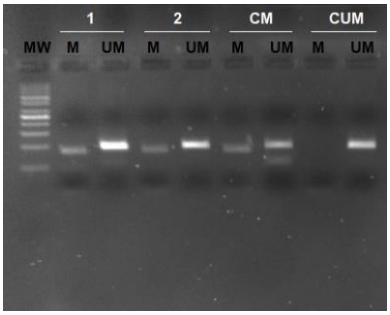

Figura 3. PCR específica de metilación (MSP). El producto de PCR indica la presencia de metilación. MW, marcador de peso molecular (50 pb). Como controles internos se aplican muestras de ADN metilado (CM) y no metilado (CUM). 1, muestra de ADN de la paciente (1000ng), 2, muestra de ADN de la paciente duplicada (1500ng). M, promotor de *MGMT* metilado; UM, promotor de *MGMT* no metilado.

Paciente 4: varón de 57 años con adenocarcinoma de colon. El médico propone iniciar un tratamiento adyuvante con capecitabina y oxalplatino (CAPOX) tras cirugía y solicita un estudio molecular para los genes *BRAF*, *NRAS* y *KRAS*. El análisis molecular se realizó a partir de un bloque FFPE que contenía un 40% de celularidad tumoral y mediante la utilización del kit KRAS Mutation Test v2 (LSR), se detectó la presencia de mutación p.Gly12X en el gen *KRAS* localizada en el exón 2. La mutación p.Gly12X puede representar cualquiera de las siguientes mutaciones en el codón 12: Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Arg, Gly12Ser, Gly12Val ya que el kit utilizado no discrimina entre cada una de ellas. Se ha observado que entre el 30% al 50% de los carcinomas de colon presentan mutado el codón 12 de *KRAS* [23]. Para los genes *BRAF* y *NRAS* no se observó ninguna mutación empleando el kit BRAF/NRAS Mutation Test (LSR).

Paciente 5: mujer de 77 años con adenocarcinoma de recto. El médico solicita una caracterización molecular mediante secuenciación masiva (paneles OCAv3 y TML). La biopsia utilizada presenta un 70% de celularidad tumoral. Tras la realización de NGS se identificaron variantes patogénicas en los genes *MRE11* (frecuencia alélica: 50%) y *TP53* (frecuencia alélica: 31%), así como un aumento en el número de

copias (5,14 copias) en la región cromosómica 13q12.2(28578185-28636095), donde se localiza el gen *FLT3*. Asimismo, mediante el análisis del ARN se confirmó la ausencia de reordenamientos (fusiones) en los genes cubiertos por el panel. Adicionalmente se detectaron dos variantes genéticas en los genes *FGFR4* y *NF1* que, en base a información proporcionada en distintas bases de datos están clasificadas como variantes de significado incierto (VUS) (https://varsome.com/, https://franklin.genoox.com/, https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/), por lo que su papel oncogénico no sería concluyente. En la Tabla 3 se proporciona información detallada sobre las variantes. Por último, mediante el panel TML se obtuvo un valor de 7,61 muts/Mb.

Gen	Variante genética (transcrito, proteína)	Frecuencia alélica	Clasificación de variantes
MRE11	c.215delT, p.Leu72Tyrfs*8	50%	Patogénica
TP53	c.742C>T, p.Arg248Trp	31%	Patogénica
FGFR4	c.233G>A, p.Arg78His	51%	VUS
NF1	c.586G>C, p.Val1957Leu	30%	VUS
Gen	**Región cromosómica**	**Número de copias (CNV)**	**Interpretación**
FLT3	13q12.2(28578185-28636095)	5,14 copias	Aumento

Tabla 3. Caracterización molecular del tumor mediante estudio de secuenciación masiva: Oncomine™ Comprehensive Assay v3 (OCAv3)

Discusión

En la actualidad, los notables avances en oncología molecular han dado como resultado tratamientos más efectivos y una mejor supervivencia para pacientes con cáncer en un estado avanzado. A pesar de estos beneficios, la resistencia a las terapias dirigidas aún son inevitables y las terapias inmunológicas continúan sin biomarcadores predictivos sólidos. Es por esto, que el trabajo que desempeña el Laboratorio de Dianas Terapéuticas es fundamental a la hora de determinar biomarcadores predictivos con el objetivo de mejorar la precisión del diagnóstico y recomendar un tratamiento individualizado a los pacientes con cáncer.

El trabajo conjunto entre patólogos y biólogos dentro del laboratorio de dianas terapéuticas es esencial para llevar a cabo las pruebas moleculares. El patólogo proporciona el porcentaje de células tumorales dentro de cada muestra para su posterior análisis, teniendo en cuenta que cada metodología presenta un límite de sensibilidad, y cuando se encuentra por debajo del valor establecido se efectúa una macrodisección para el enriquecimiento de células tumorales [14]. Por ejemplo, para la detección de alteraciones genéticas mediante PCR en tiempo real (Cobas® 4800 o Idylla) se necesita al menos un 10% de células tumorales, mientras que para la secuenciación Sanger es necesario partir de un mayor porcentaje tumoral (entre 30-50%) [24]. Además, los patólogos y oncólogos deben conocer la cantidad de tejido necesaria para realizar cada una de las pruebas moleculares con el objetivo de preservar el material biológico en caso de requerir más análisis a futuro.

Para los pacientes 1 y 2, la presencia de mutaciones en el exón 21 y la deleción del exón 19, respectivamente, confieren sensibilidad a inhibidores de tirosina kinasa (TKI) dirigidos frente a *EGFR*. Las mutaciones activadoras en dicho gen ocurren principalmente en los exones 18 a 21 ya que codifican el dominio intracelular de tirosina quinasa (TK) [25]. Por otro lado, la presencia de la mutación p.Thr790Met en el paciente 1, representa un mecanismo de resistencia a los inhibidores de primera generación, haciendo necesaria la utilización de inhibidores de segunda o tercera generación, los cuales son eficaces para el tratamiento de tumores con esta mutación [26]. El estudio de Soria *et al.* [27], demuestra que el uso de osimertinib, un TKI de tercera generación, presenta una mayor eficacia al inhibir selectivamente tanto las mutaciones de sensibilización de EGFR-TKI como las de resistencia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Por otro lado, los resultados observados en el paciente 2, coinciden con el estudio realizado por Singh *et al* [28], ya que establecen que la coexistencia de mutaciones para *EGFR* y *KRAS* en el mismo paciente se observan en baja proporción (4 de 125 pacientes analizados). Para ambos casos al detectar la presencia de mutación de *EGFR* en tejido se recomienda valorar la monitorización en plasma con el fin de controlar la evolución de los pacientes e identificar posibles mecanismos de resistencia, contribuyendo así a un mejor manejo clínico del mismo. Igualmente, se recomienda valorar la realización de una caracterización molecular más completa del tumor mediante el empleo de abordajes de secuenciación

masiva con paneles dirigidos, ya que permitiría conocer la existencia de otras alteraciones moleculares con valor predictivo.

En relación al paciente 3, según estudios previos se cree que una de las vías que permiten el desarrollo del glioma comienza con la mutación de *IDH1* o *IDH2* seguida de la pérdida de los cromosomas 1p y 19q. Como se observa en el caso de la paciente 3, la presencia de mutación en *IDH1* junto con la codeleción 1p/19q (estudiado mediante IHQ), confirma la clasificación del tumor como oligodendroglioma de grado II. Este tipo de glioma puede sufrir otras alteraciones genéticas y convertirse en un oligodendroglioma anaplásicos (grado III), cuya característica fundamental es el crecimiento celular acelerado. La importancia pronóstica de la mutación *IDH1* es independiente de otros factores pronósticos conocidos, como la edad y el estado de metilación del promotor *MGMT* [29]. Además, la determinación del estado de metilación del promotor *MGMT* tiene un valor pronóstico y predictivo clínicamente relevante, ya que el paciente posee mayor probabilidad de beneficiarse del tratamiento con temozolomida (TMZ), puesto que varios estudios han demostrado que la metilación del promotor compromete la reparación del ADN, promoviendo, por tanto, la muerte de las células tumorales [30].

En el caso del paciente 4, la presencia de mutación en el gen de *KRAS* resulta en la activación constitutiva de la vía RAS-RAF-MEK-ERK, lo que confiere resistencia a la terapia anti-EGFR. Por este motivo, las directrices de la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), la *European Society for Medical Oncology* (ESMO) y la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomiendan la determinación ampliada de mutaciones RAS antes de la administración de inhibidores de *EGFR*. Se debe incluir al menos los exones 2, 3 y 4 de *KRAS* (codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146) y los exones 2, 3 y 4 de *NRAS* (codones 12, 13, 59, 61 y 117) [31]. Además, se puede considerar el uso de CAPOX como quimioterapia adyuvante para pacientes con cáncer de colon o recto localmente avanzados que previamente no han sido tratados con terapia preoperatoria (quimioterapia o radioterapia) [32].

Finalmente, en relación a la paciente 5, es importante destacar que mutaciones germinales en *MRE11* se asocian al síndrome de predisposición a cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHCNP) [33]. Por ello, la detección de la variante patogénica en *MRE11* con una alta frecuencia alélica (50%) podría ser indicativo de ser una variante de origen germinal en lugar de somático. Por este motivo, este caso se presentó ante el comité de tumores (MTB) y se derivó a consejo genético para confirmar la naturaleza somática o germinal de dicha alteración. En la actualidad se está llevando a cabo el estudio de la variante detectada en *MRE11* en sangre. Por otro lado, generalmente entre el 40-50% de los carcinomas de colon esporádicos presentan mutaciones en *TP53* [34], por lo que no es de extrañar que se haya detectado esta alteración en dicho paciente. Por último, la presencia de la amplificación de la región cromosómica 13q12.2 donde se localiza *FLT3* puede ser considerado un marcador de peor pronóstico en cáncer colorrectal tal y como describe Lim *et al*. [20]. Además, el incremento en el número de copias detectado (5,14) puede no ser un indicativo de una verdadera amplificación génica, ya que el número de copias estimado por el programa Ion Reporter v5.18 se encuentra en el límite de los parámetros del programa para la detección de alteraciones en el número de copias, siendo necesario el uso de otras metodologías (p. ej. FISH) para confirmar o descartar esta amplificación. Por otro lado, en lo relativo al valor de TML obtenido (7,61 muts/Mb), a la hora de establecer un tratamiento aún no existe un punto de corte óptimo para el cáncer colorrectal. Pese a que en 2020 la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó la terapia anti-PD-1 para tumores sólidos con TML $\geq$ 10 muts/Mb (ensayo Keynote158) [16], todavía se requieren más estudios para establecer un valor de TML ideal para cada tipo de cáncer. Casos como estos resaltan la importancia de la participación de LDT en el comité de tumores, ya que promueven la evaluación de los resultados en conjunto con otras variables clínicas. Por lo que, una vez definida la carga mutacional, los médicos podrían plantearse o no la posibilidad de tratar a la paciente con inhibidores del punto de control inmunitario (p. ej. pembrolizumab) [35], o considerar la opción de incluirla dentro de un ensayo clínico. Actualmente, existen algunos ensayos clínicos en curso registrados en ClinicalTrials.gov, los cuales investigan el bloqueo del punto de control inmunitario en relación con el marcador TML. Por ejemplo, uno de los ensayos que se encuentra en fase II emplea el anticuerpo PD-1 (BAT1306/pembrolizumab) combinado con el inhibidor de la ciclooxigenasa (COX) (aspirina) (NCT03638297).

Los ensayos moleculares tradicionales han utilizado la tecnología de secuenciación masiva con paneles de genes pequeños, a menudo dirigidos a un tipo de tumor específico. Los paneles pequeños ofrecen algunos beneficios, como una interpretación relativamente simple, pero pueden tener inconvenientes importantes. Específicamente, los paneles de genes pequeños pueden no incluir todas las variantes requeridas para la identificación de terapias o diagnósticos apropiados en los distintos tipos de tumores. El uso secuencial de paneles pequeños puede provocar el agotamiento de la muestra. Por lo tanto, el empleo de paneles más grandes ofrecen una mayor cobertura de genes que son clínicamente relevantes para varios tipos de tumores, especialmente si son compatibles con cantidades mínimas de entrada de ácidos nucleicos [36].

Referencias

[1] Stratton, M. R. 2011. Exploring the genomes of cancer cells: Progress and promise. Science *(80).*,

331 (6024):1553–1558.

[2] McGranahan, N., and Swanton, C. 2015. Biological and Therapeutic Impact of Intratumor Heterogeneity in Cancer Evolution. Cancer Cell, 27(1):15–26.

[3] Yates, L. R., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., and Bigner, D. D. 2018. The European Society for Medical Oncology (ESMO) Precision Medicine Glossary. Ann. Oncol., 29(1):30–35.

[4] Califf, R. M. 2018. Biomarker definitions and their applications. Exp. Biol. Med. (Maywood)., 243(3):213–221

[5] Gomes, A. and Korf, B. R. 2018. Genetic Testing Techniques, Pediatr. Cancer Genet., pp. 47–64.

[6] Wu, F. Fan, J., He, Y., Xiong, A., Yu, J., Li, Y., Zhang, Y., Zhao, W., Zhou, F., Li, W., Zhang, J., Zhang, X., Qiao, M., Gao, G., Chen, S., Chen, X., Li, X., Hou, L., Wu, C., and Zhou, C. 2021. Single-cell profiling of tumor heterogeneity and the microenvironment in advanced non-small cell lung cancer. Nat. Commun. 2021, vol. 12(1):1–11.

[7] McGranahan, N., and Swanton, C. 2017. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. Cell, 168(4):613–628.

[8] Mathai, R. A., Vidya, R. V. S., Shrikar, B., Thomas, L., Udupa, K., Kolesar, J., and Rao, M. 2019. Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology. J. Clin. Med, 8(3).

[9] Alix-Panabières, C. 2020. The future of liquid biopsy. Nature, 579(7800), S9.

[10] Dietel, M., Bubendorf, L., Dingemans, A. M. C., Dooms, C., Elmberger, G., García, R. C., Kerr, K. M., Lim, E., López-Ríos, F., Thunnissen, E., Van Schil, P. E., and Von Laffert, M. 2016. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. Thorax, 71(2), 177–184.

[11] Lindeman, N. I., Cagle, P. T., Aisner, D. L., Arcila, M. E., Beasley, M. B., Bernicker, E. H., Colasacco, C., Dacic, S., Hirsch, F. R., Kerr, K., Kwiatkowski, D. J., Ladanyi, M., Nowak, J. A., Sholl, L., and Yatabe, Y. 2018. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. Journal of Thoracic Oncology, 13(3), 323–358.

[12] Frampton, G. M., Fichtenholtz, A., Otto, G. A., Wang, K., Downing, S. R., He, J., Schnall-Levin, M., White, J., Sanford, E. M., An, P., Sun, J., Juhn, F., and Yelensky, R. 2013. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. Nature Biotechnology, 31(11), 1023–1031G. M.

[13] Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K., and Mardis, E. R. 2013. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. Cell, 155(1), 27–38.

[14] Jennings, L. J., Arcila, M. E., Corless, C., Kamel-Reid, S., Lubin, I. M., Pfeifer, J., Robyn Temple-Smolkin, Lurie, R. H., Basehore, M. J., Crow, J., and Viswanatha, D. S. 2017. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. The Journal of Molecular Diagnostics, 19(3), 341–365.

[15] Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., and Rehm, H. L. 2015. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics, 17(5), 40530.

[16] Marabelle, A., Fakih, M., Lopez, J., Shah, M., Shapira-Frommer, R., Nakagawa, K., Chung, H. C., Kindler, H. L., Lopez-Martin, J. A., Miller, W. H., Italiano, A., Kao, S., Piha-Paul, S. A., and Bang, Y. J. 2020. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. The Lancet. Oncology, 21(10), 1353–1365.

[17] Fumagalli, C., Guerini-Rocco, E., and Barberis, M. 2021. Making the Most of Complexity to Create Opportunities: Comprehensive Genomic Profiling and Molecular Tumor Board for Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). Cancers, 13(4), 1–5.

[18] Anvari, M. S., Gharib, A., Abolhasani, M., Azari-Yam, A., Gharalari, F., Safavi, M., Mirzaie, A. Z., and Vasei, M. 2021. Pre-analytical Practices in the Molecular Diagnostic Tests, A Concise

Review. Iranian Journal of Pathology, 16(1), 1.

[19] Delgado-García, M., Weynand, B., Gómez-Izquierdo, L., Hernández, M. J., Blanco, Á. M., Varela, M., Matias-Guiu, X., Nadal, E., Alarcaõ, A., De Álava, E., and Biscuola, M. (2020). Clinical performance evaluation of the Idylla™ EGFR Mutation Test on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of non-small cell lung cancer. BMC Cancer, 20(1), 1–10.

[20] Lim, S. H., Kim, S. Y., Kim, K., Jang, H., Ahn, S., Kim, K. M., Kim, N. K. D., Park, W., Lee, S. J., Kim, S. T., Park, S. H., Park, J. O., and Lee, J. 2017. The implication of FLT3 amplification for FLT targeted therapeutics in solid tumors. Oncotarget, 8(2), 3237–3245.

[21] Sankar, K., Gadgeel, S. M., & Qin, A. 2020. Molecular therapeutic targets in non-small cell lung cancer. Expert Review of Anticancer Therapy, 647–661.

[22] Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., and Bigner, D. 2009. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas . New England Journal of Medicine, 360(8), 765–773

[23] Santini, D., Loupakis, F., Vincenzi, B., Floriani, I., Stasi, I., Canestrari, E., Rulli, E., Maltese, P. E., and Ruzzo, A. 2008. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. The Oncologist, 13(12), 1270–1275.

[24] Vansteenkiste, J., De Ruysscher, D., Eberhardt, W. E. E., Lim, E., Senan, S., Felip, E., and Peters, S. 2013. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, 24.

[25] Paliogiannis, P., Attene, F., Cossu, A., Defraia, E., Porcu, G., Carta, A., Sotgiu, M. I., Pazzola, A., and Colombino, M. 2015. Impact of tissue type and content of neoplastic cells of samples on the quality of epidermal growth factor receptor mutation analysis among patients with lung adenocarcinoma. Molecular Medicine Reports, 12(1), 187–191.

[26] Remon, J., Ahn, M. J., Girard, N., Johnson, M., Kim, D. W., Lopes, G., Pillai, R. N., Solomon, B., Villacampa, G., and Zhou, Q. 2019. Advanced-Stage Non–Small Cell Lung Cancer: Advances in Thoracic Oncology 2018. Journal of Thoracic Oncology, 14(7), 1134–1155.

[27] Soria, J.-C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., and Ramalingam, S. S. 2018. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. New England Journal of Medicine, 378(2), 113–125.

[28] Singh, V., Guleria, P., Malik, P., Mohan, A., Thulkar, S., and Jain, D. 2019. Epidermal growth factor receptor (EGFR), KRAS, and BRAF mutations in lung adenocarcinomas: A study from India. Current Problems in Cancer, 43(5), 391–401.

[29] Murphy, S. F., Varghese, R. T., Lamouille, S., Guo, S., Pridham, K. J., Kanabur, P., Osimani, A. M., Sharma, S., and Sheng, Z. 2016. Connexin 43 inhibition sensitizes chemoresistant glioblastoma cells to temozolomide. Cancer Research, 76(1), 139–149.

[30] Alnahhas, I., Alsawas, M., Rayi, A., Palmer, J., Raval, R., Ong, S., Giglio, P., and Murad, M. 2020. Characterizing benefit from temozolomide in MGMT promoter unmethylated and methylated glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. Neuro-Oncology Advances, 2(1), 1–7.

[31] Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., and Arnold, D. 2016. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. Annals of Oncology, 27(8), 1386–1422.

[32] Liu, F., Yang, L., Wu, Y., Li, C., Zhao, J., Keranmu, A., Zheng, H., and Xu, Y. 2016. CapOX as neoadjuvant chemotherapy for locally advanced operable colon cancer patients: a prospective single-arm phase II trial. Chinese Journal of Cancer Research, 28(6), 589.

[33] Belhadj, S., Terradas, M., Aiza, G., and Valle, L. 2020. Candidate genes for hereditary colorectal cancer: Mutational screening and systematic review. Human Mutation, 41(9), 1563–1576.

[34] Muzny, D. M., Bainbridge, N., Chang, K., Dinh, H., A., and Thomson., E. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature, 487(7407), 330–337.

[35] Li, Y., Ma, Y., Wu, Z., Zeng, F., and Wu, M. 2021. Tumor Mutational Burden Predicting the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Frontiers in Immunology, 12, 751407.

[36] Boyle, T. A., Mondal, A., Saeed-Vafa, D., Ananth, S., Ahluwalia, P., Kothapalli, R., and Kolhe, R. 2021. Guideline-Adherent Clinical Validation of a Comprehensive 170-Gene DNA/RNA Panel for Determination of Small Variants, Copy Number Variations, Splice Variants, and Fusions on a Next-Generation Sequencing Platform in the CLIA Setting. Frontiers in Genetics, 12, 725.