

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR
Y GENÓMICA
DE CÁNCERES
CON MALA EVOLUCIÓN
MEDIANTE
SECUENCIACIÓN
MASIVA NGS

PATRICIA
POSE
LAPAUSA

OCTUBRE 2022

DIRIGIDA POR
NATALIA
CAMARASA
LILLO
E
INMACULADA
MAESTU
MAIQUES

FACULTAD DE MEDICINA
Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO
3139 EN MEDICINA





UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA. PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 EN MEDICINA

TESIS DOCTORAL

Caracterización molecular y genómica de cánceres con mala evolución mediante secuenciación masiva NGS

Patricia Pose Lapausa

Licenciada en Medicina

Directoras:

NATALIA CAMARASA LILLO

INMACULADA MAESTU MAIQUES

Tutora:

AMPARO RUIZ SAURÍ

OCTUBRE 2022

INFORME DIRECTORAS Y TUTORA PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (as) / Codirector (as):

1.- Apellidos y nombre: CAMARASA LILLO, NATALIA, N.I.F. 52763744L, Departamento/Instituto: ANATOMÍA PATOLÓGICA, FACULTATIVA ESPECIALISTA. Centro: HOSPITAL LLUÍS ALCANYÍS.

2.- Apellidos y nombre: MAESTU MAIQUES, INMACULADA N.I.F.24330054X, Departamento/Instituto: ONCOLOGÍA, JEFA DE SERVICIO. Centro: HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCTOR PESET.

Tutora:

Apellidos y nombre: RUIZ SAURÍ, AMPARO. N.I.F.73539315N, Departamento/Instituto: DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA, PROFESORA TITULAR DE HISTOLOGÍA Centro: UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Directoras y tutora, respectivamente, de la tesis doctoral: "Caracterización molecular y genómica de cánceres con mala evolución mediante secuenciación masiva NGS" de Dª PATRICIA POSE LAPAUSA, estudiante del Programa de Doctorado 3139 Medicina (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe **favorable** para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: Valencia, a 10 octubre de 2022.

Fdo.: Dra Camarasa

Fdo.: Dra Maestu

Fdo.: Dra Ruiz

Directora

Directora

Tutora

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

A mis padres, José Antonio y Encarna,
que siempre ponen el mundo a mi alcance.

Os quiero.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Jerónimo Forteza, que dirigió el inicio de esta tesis y me hizo partícipe de su visión del futuro de la Patología.

Su entusiasmo por este campo y sus investigaciones en el campo de la medicina personalizada han dado lugar al nacimiento de este estudio. Descanse en paz.

A la Dra Camarasa, codirectora, por enlazarme al Dr Forteza y a la Patología Molecular mediante este estudio. Reconozco el esfuerzo que debió suponer iniciar a alguien como yo, sin experiencia en la investigación, en este súper-trabajo. Gracias, Natalia.

A la Dra Maestu, codirectora, por rescatarme cuando estaba perdida. Inma, me has ayudado incluso con lo que podía parecer desdeñable. Has sido guía y motivación. Sin ti no habría conseguido dar forma y fin a este estudio. Gracias.

A los servicios de Oncología y Anatomía Patológica que han participado. Gracias, compañeros.

A Lara Navarro, por regalarme su tiempo y traer claridad a mi biología molecular. Ha sido estupendo conocerte y aprender de ti.

A Teresa Soria, por ayudarme con la Oncología desde la paciencia infinita. Teresa, has sido amiga, directora y tutora. Muchos mercis.

A Ana Forés, por su ayuda incondicional. Y al equipo PB, que no cojea nunca cuando me apoyo en él.

A Núria Santonja y Gloria Pérez, por hacer de “balda” para mis risas y llantos. ¡Adoro el equipo que formamos!

A Raquel García, por ser y estar. X-WOMEN.

A Xavi Sanmartín, por sus herramientas vitales.

Muchas gracias a todos los profesionales que habéis invertido tiempo en mí, ayudando a que esta tesis se hiciese realidad.

Y a todos los que de una forma u otra habéis sufrido mi “humor de tesis” y aún así os habéis quedado, GRACIAS.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS, 7

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS, 12

INTRODUCCIÓN, 17

 1. CÁNCER. GENERALIDADES, 18

 1.1. DEFINICIÓN, 18

 1.2. EPIDEMIOLOGÍA, 18

 2. CARCINOGÉNESIS, 22

 2.1. CARCINOGÉNESIS A NIVEL MOLECULAR, 22

 2.2. MUTACIONES *DRIVER* VS *PASSENGER*, 23

 2.3. GENES IMPLICADOS, 25

 2.3.1. GENES SUPRESORES DE TUMORES, 28

 2.3.2. ONCOGENES, 35

 2.4. LOCALIZACIÓN Y FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES, 58

 2.5. PRINCIPALES VÍAS MOLECULARES ALTERADAS EN EL CÁNCER, 61

 3. EVOLUCIÓN EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER, 71

 3.1. ENFOQUE CLÁSICO, 71

 3.2. TRANSICIÓN, 73

 3.3. ENFOQUE ACTUAL: ENFOQUE MOLECULAR, 74

 3.4. EJEMPLO DE LA EVOLUCIÓN, 80

 4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR. SECUENCIACIÓN, 82

 4.1. SECUENCIACIÓN. DEFINICIÓN Y GENERALIDADES, 82

 4.2. SECUENCIACIÓN SANGER, 82

 4.3. EVOLUCIÓN DE LA SECUENCIACIÓN, 83

 4.4. COMPARATIVA SANGER VS. NGS, 85

 4.5. NEXT GENERATION SEQUENCING – NGS, 87

 5. APLICACIÓN CLÍNICA, 103

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS, 114

MATERIAL Y MÉTODOS, 118

 1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS, 119

 2. SELECCIÓN DEL PANEL DE GENES, 125

3. METODOLOGÍA, 130

4. VALIDACIÓN FINAL DE LA CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LAS VARIANTES, 135

RESULTADOS, 141

1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA, 142

2. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE CARCINOMAS MAMARIOS, 143

3. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE CARCINOMAS NO-MAMARIOS, 172.

4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA, 205

DISCUSIÓN, 206

1. DISCUSIÓN DE LOS CASOS CON DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA MAMARIO, 207

2. DISCUSIÓN DE LOS CASOS CON DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA NO-MAMARIO,
224

 2.1. CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO, 224

 2.2. CARCINOMAS UROLÓGICOS, 230

 2.2.1. CARCINOMA DE PRÓSTATA, 230

 2.2.2. CARCINOMA DE VEJIGA URINARIA, 233

 2.3. OTROS, 237

 2.3.1. ADENOCARCINOMA DE ESÓFAGO DISTAL, 237

 2.3.2. CARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES, 242

 2.3.3. CARCINOMA DE ENDOMETRIO, 248

3. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO, 252

CONCLUSIONES, 259

BIBLIOGRAFÍA, 262

ANEXO, 290

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

A

A: años/edad

ABI: Abiraterona

ACMG/AMP: *American College of Medical Genetics/Molecular Pathology Association* (Colegio Americano de Genética Médica y Genómica, y la Asociación de Patología Molecular)

ADC: Adenocarcinoma

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

ARN: Ácido ribonucleico

ATA: *American Thyroid Association*

ATP: Adenosina trifosfato

B

BAM: *Binary Alignment Map* (mapa de alineación binaria)

BER: *Base Excision Repair* (reparación por escisión de bases)

BSGC: Biopsia selectiva de ganglio centinela

C

C: Carcinoma

CDI: Carcinoma ductal infiltrante

CF: Clasificación funcional

CI: Consentimiento informado

CNV: *Copy Number Variation* (variación en el número de copias)

D

Dx: Diagnóstico

DDR: *DNA damage repair* (reparación del daño del ADN)

E

ECOG: Escala diseñada por el *Eastern Cooperative Oncology Group*, que mide el estado funcional del paciente oncológico.

EDR: Estratificación dinámica de riesgo

Ej.: Ejemplo

EMA: *European Medicines Agency* (agencia europea del medicamento)

ESMO: *European Society for Medical Oncology* (Sociedad europea de oncología médica)

EUS: *Endoscopic Ultrasound* (ecoendoscopia).

F

FDA: *Food and Drug Administration* (agencia americana del medicamento y alimento)

FFPE: *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* (fijado en formol y embebido en parafina)

FIGO: Federación internacional de ginecología y obstetricia

FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization* (Hibridación in situ fluorescente)

G

GHN: Grado histológico de Nottingham

GIST: Tumor del estroma gastrointestinal

H

HPV: *Human papilomavirus* (virus del papiloma humano)

HR: Hazard Ratio

H&E: Hematoxilina-Eosina

I

IC: Intervalo de confianza

IHQ: Técnicas inmunohistoquímicas

Indels: Pequeñas inserciones y delecciones

INE: Instituto Nacional de Estadística

iPARP: Inhibidores de las proteínas PARP

ISO: *International Organization for Standardization* (organización internacional de normalización)

ITK: Inhibidores de las proteínas tirosina cinasa o kinasa

L

LA: Luminal A

LB: Luminal B

M

ME: Motivo principal por el que se estudió la inclusión de este paciente en este trabajo

MLPA: *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (Amplificación de la sonda dependiente de la ligadura multiple)

MMR: Sistema *mismatch repair* (sistema de reparación de desajuste)

MP: Grados de Miller y Payne.

MPS: *Massive Parallel Sequencing* (secuenciación masiva en paralelo)

MS: Momento en que el material fue secuenciado en relación al tratamiento sistémico de primera línea o neoadyuvante

MSI: Inestabilidad de microsatélites

MSK-IMPACT: *Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets* (Perfiles de mutación integrados de dianas cancerígenas procesables)

N

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network* (Red Nacional Integral del Cáncer)

NER: *Nucleotide Escision Repair* (reparación por escisión de nucleótidos)

NGS: *Next Generation Sequencing* (secuenciación de siguiente generación)

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

P

P: Paciente

PAAF: Punción-aspiración con aguja fina

PARP: Proteína poli-ADP-ribosa-polimerasa

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PET-CT: Positron emission tomography - computed tomography

PSA: Antígeno específico de la próstata

Px: Pronóstico

Q

QT: Quimioterapia

QT-NEO: Quimioterapia neoadyuvante

Qx: Cirugía

R

RE o ER: Receptor estrogénico o *estrogen receptor*

REDECAN: Red española de registros de cáncer

RH: Receptor hormonal o receptores hormonales

RH+: Receptores hormonales positivos

RP o PR: Receptor de progesterona o *progesterona receptor*

RT: Radioterapia

RTK: Receptores tirosina cinasa o kinasa

S

SAM: *Sequence Alignment Map* (Mapa de alineación de secuencias)

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

SNV: *Single Nucleotide Variant* (variantes de nucleótido único respecto al genoma de referencia)

ST: Subtipo

T

TC: Tomografía computarizada

TCGA: *The Cancer Genome Atlas* (el atlas del genoma del cáncer)

TDA: Terapia deprivación androgénica

TH: Terapia hormonal/hormonoterapia

TEM: Transición epitelio-mesénquima

TK: Proteína tirosina cinasa o kinasa

TN: Triple negativo

T-RR: Terapia durante la que se produjo la recaída o resistencia

Tto: Tratamiento

U

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer

UMI: *Unique molecular index o molecular barcode* (identificador de molécula única)

V

VAF: *Variant Allele Frequency* (frecuencia alélica de la variante)

VCF: *Variant Call Format* (formato de llamada de variantes)

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (factor de crecimiento del endotelio vascular)

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1: Representación de la incidencia y mortalidad, por cáncer, que se obtuvo en el año 2020 en el mundo, y la incidencia y mortalidad, calculadas para el año 2040 a nivel mundial (figura realizada por la autora)

Figura 2: Representación de la estimación de la incidencia de cáncer que habrá en España, en el año 2022 y 2040, así como la mortalidad por cáncer que se registró en España en el año 2021, y la estimación para el año 2040 (figura realizada por la autora).

Figura 3: Representación de la estimación del número de casos de cáncer, que serán diagnosticados en los hombres españoles en el año 2022, de los cánceres más frecuentes (figura realizada por la autora).

Figura 4: Representación de la estimación del número de casos de cáncer, que serán diagnosticados en las mujeres españolas en el año 2022, de los cánceres más frecuentes (figura realizada por la autora).

Figura 5: Un factor de crecimiento (FC) activa al receptor de tirosin-cinasa (RTK) pudiendo activar vías aguas abajo, como la vía PI3K o la vía RAS/MAP-Kinasas (figura realizada por la autora).

Figura 6: Vía de señalización Wnt/β-catenina (figura realizada por la autora).

Figura 7: Las lecturas que ha realizado el secuenciador se posicionan en relación con la secuencia de referencia.

Fuente: Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant - Calling Dale Muzzey, Eric A. Evans, Caroline Lieber.

Figura 8: Explicación gráfica de la cobertura y la profundidad de lectura.

Fuente: Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. Santiago Rubio et al.)

Figura 9: ESMO scale for clinical actionability of molecular target (ESTAT).

Fuente: SEOM-GETTHI clinical guideline for the practical management of molecular platforms (2021); Juan de la Haba-Rodriguez et al.

Figura 10: Pantalla inicial del visor Alamunt. Fuente: Alamunt.

Figura 11: Selección del tránscribo. Fuente: Alamunt.

Figura 12: Datos de la variante. Fuente: Alamunt.

Figura 13: Datos de la variante. Fuente: Alamunt.

Figura 14: Datos de la variante. Se sustituye la Adenina por Guanina, en la posición 3140 del ADN celular. Fuente: Alamunt.

Figura 15: Datos finales con los cambios proteicos y la clasificación funcional. Fuente: Alamunt.

Figura 16: Cinco pacientes fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión y/o cumplir los de exclusión (figura realizada por la autora) (*a: años*).

Figura 17: SNV en PIK3CA.

Figura 18: Imagen a mayor aumento de la localización de la SNV sobre el gen.

Figura 19: Imagen a mayor aumento de la SNV en PIK3CA.

Figura 20: Se observa, en el cromosoma 7, la amplificación del gen EGFR (redondeado en verde).

Figura 21: Amplificación del gen EGFR a mayor aumento (redondeado en verde).

Figura 22: Genes en los que se observaron alteraciones en nuestra serie de carcinomas de mama.

TABLAS

Tabla 1: Resumen de los biomarcadores moleculares más relevantes en la práctica clínica. Fuente: *SEOM-GETTHI clinical guideline for the practical management of molecular platforms (2021); Juan de la Haba-Rodríguez et al.*

Tabla 2: Definición de las puntuaciones del estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). Fuente: Comparing Physician and

Nurse Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS)

Ratings as Predictors of Clinical Outcomes in Patients with Cancer; Elad Neeman et al.

Tabla 3: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Resection Specimens from Patients with Invasive Carcinoma of the Breast*

Tabla 4: Características de los carcinomas mamarios. *P: paciente; ST: subtipo, LA: luminal A, LB: luminal B, TN: triple negativo, GHN: grado histológico de Nottingham, ME: motivo principal por el que se estudió la inclusión de este paciente en este trabajo, TH: terapia hormonal, QT-NEO: quimioterapia neoadyuvante, MS: momento en que el material fue secuenciado en relación al tratamiento sistémico de primera línea o neoadyuvante, TTO: tratamiento, T-RR: terapia durante la que se produjo la recaída o resistencia.*

Tabla 5: Descripción de SNVs. *P: paciente; VAF: Variant allele frequency (frecuencia alélila de la variante); CF: clasificación funcional; SNV: single-nucleotide variants.*

Tabla 6: CNVs sugeridas por el análisis bioinformático basado en los resultados de la secuenciación.

Tabla 7: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Resection Specimens from Patients with Cancers of the Larynx*

Tabla 8: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Resection Specimens from Patients with Carcinoma of the Esophagus*

Tabla 9: Clasificación de la regresión tumoral tras el tratamiento neoadyuvante según Mandard. Fuente: *Histomorphological tumor regression grading of esophageal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: which score to use?; R.M.Hermann*

Tabla 10: Sistema modificado (año 2015) de estratificación de riesgo de la ATA.

Tabla 11: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinomas of the Thyroid Gland*

Tabla 12: AJCC 8^a edición, TNM. Sistema de estadificación del cáncer de tiroides.

Tabla 13: Estadio FIGO actualizado del año 2018.

Tabla 14: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma and Carcinosarcoma of the Endometrium.*

Tabla 15: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Radical Prostatectomy Specimens From Patients With Carcinoma of the Prostate Gland.*

Tabla 16: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Cystectomy Specimens From Patients With Carcinoma of the Urinary Bladder*

Tabla 17: Características de los carcinomas no-mamarios. P: paciente, ME: motivo principal por el que se estudió la inclusión de este paciente en este trabajo, MS: momento en que el material fue secuenciado en relación al tratamiento, TTO: tratamiento, C: carcinoma, ADC: adenocarcinoma, RT: radioterapia, Qx: cirugía, ABI: abiraterona, TDA: terapia deprivación androgénica.

Tabla 18: Descripción de SNVs. P: paciente; VAF: Variant allele frequency (frecuencia alélila de la variante); CF: clasificación funcional; SNV: single-nucleotide variants.* En el paciente 13, la alteración identificada no se traduce en una proteína, sino que altera el splicing o ayuste.

Tabla 19: CNVs sugeridas por el análisis bioinformático basado en los resultados de la secuenciación.

Tabla 20: Grados de Miller y Payne: respuesta patológica local a la quimioterapia.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER. GENERALIDADES

1.1. DEFINICIÓN

El cáncer es una disrupción biológica y genética de las células. El genoma se altera y las células pierden el control sobre su biología y comportamiento, siendo capaces por ejemplo de diseminar a distancia y proliferar en tejidos distintos al de origen (1). Las células normales se dividen y mueren durante un periodo de tiempo programado. En cambio, la célula cancerosa “pierde” la capacidad para morir de forma programada y se divide casi sin límite, hasta formar una masa denominada tumor o neoplasia. Estos grupos de células cancerosas van acumulando alteraciones genéticas (en la secuencia de ADN) y epigenéticas (en la expresión de los genes), con las que adquieren habilidades extraordinarias que, en última instancia, los capacitan para diseminar a distancia o metastatizar (2).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer es una de las primeras causas de morbimortalidad a nivel mundial. La *International Agency for Research on Cancer* estimó que en el año 2020 se diagnosticaron unos 18,1

millones de casos nuevos de cáncer en el mundo (excluyendo los tumores de piel no-melanoma), y se ha considerado que esta cifra aumentará en los próximos 20 años hasta los 27 millones. Lo mismo ocurre con la mortalidad. Esta agencia calcula 9,9 millones de muertes, aproximadamente, en relación con el cáncer, en el año 2020; previendo un aumento a más de 16 millones en el año 2040 (Figura 1).

Los cánceres que fueron responsables de la mayoría de fallecimientos, a nivel mundial, en ambos sexos, fueron: el de pulmón (18% del total de muertes por cáncer), colorrectal (9,4%), el hepático (8,3%), el de estómago (7,7%) y el de mama (6,9%) (3).

Dado que la pandemia de la COVID-19 ha afectado el número de diagnósticos de cáncer en muchos países, es probable que el número de cánceres estimados varíe (3).

INCIDENCIA MUNDIAL



MORTALIDAD MUNDIAL

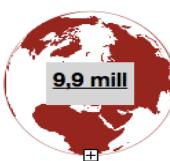


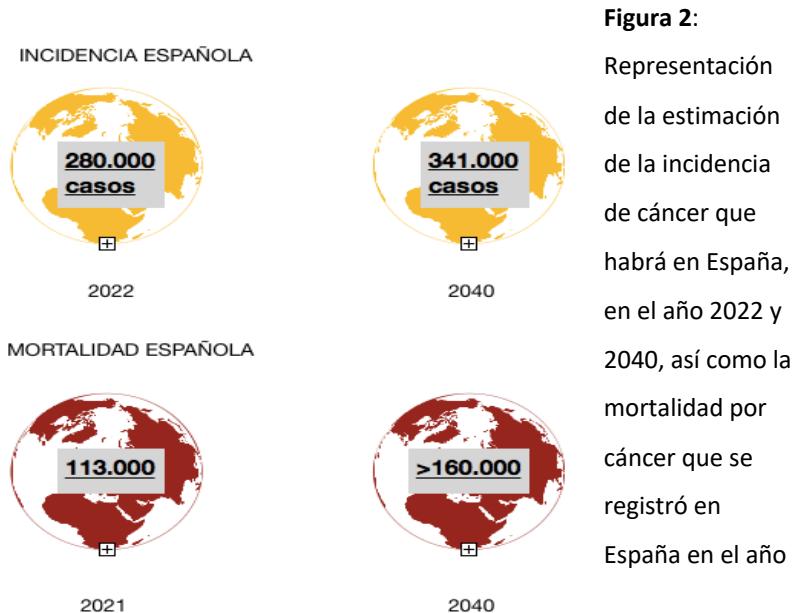
Figura 1:

Representación de la incidencia y mortalidad, por cáncer, que se obtuvo en el año 2020 en el mundo, y la incidencia y mortalidad, calculadas para el año

2040 a nivel mundial (figura realizada por la autora).

También en España el cáncer es una de las primeras causas de morbimortalidad. Según los datos del INE (Instituto Nacional de Estadística), en 2020 fue la segunda causa de muerte.

Se considera que el número de casos que se diagnosticará en este país en el año 2022 será de 280.100, según los cálculos de REDECAN (red española de registros de cáncer). Se espera que la incidencia alcance los 341.000 casos en el año 2040. En cuanto a la mortalidad, se calcula que se incrementará de 113.000 casos en 2021 a más de 160.000 en el año 2040. Sin embargo, estos datos pueden variar, ya que esta estimación no incluye el posible efecto de la pandemia (3) (Figura 2).



2021, y la estimación para el año 2040 (figura realizada por la autora).

Los cálculos de REDECAN estiman que los cánceres que serán diagnosticados con más frecuencia en los hombres españoles, en 2022 serán: de próstata (30.884 casos), de colon y recto (26.862 casos), de pulmón (22.316 casos) y de vejiga urinaria (17.992 casos). Y en mujeres: de mama (34.750 casos) y de colon y recto (16.508 casos) (Figuras 3 y 4).

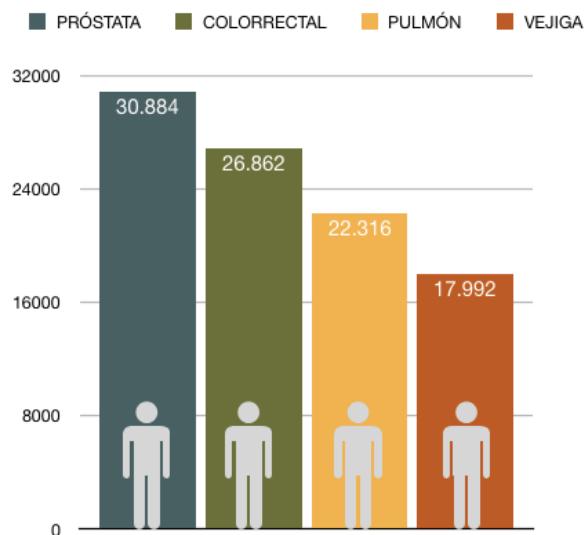


Figura 3: Representación de la estimación del número de casos de cáncer, que serán diagnosticados en los hombres españoles en el año 2022, de los cánceres más frecuentes (figura realizada por la autora).

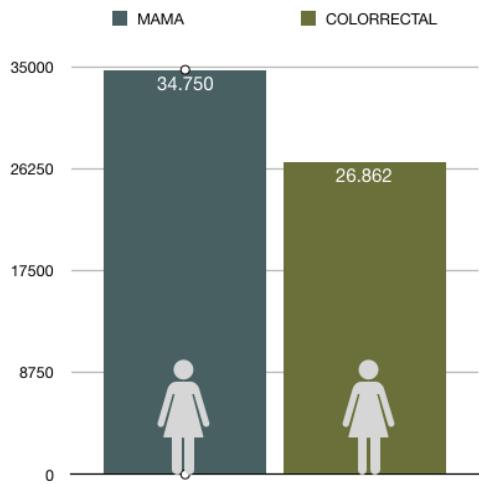


Figura 4: Representación de la estimación del número de casos de cáncer, que serán diagnosticados en las mujeres españolas en el año 2022, de los cánceres más frecuentes (figura realizada por la autora).

2.CARCINOGENESIS

2.1. CARCINOGENESIS A NIVEL MOLECULAR

La génesis del cáncer comienza con una mutación en una célula somática del organismo. La progenie de ésta, para llegar a ser cancerosa, irá acumulando mutaciones adicionales y cambios epigenéticos que le proporcionarán ventajas selectivas de crecimiento, directa o indirectamente, frente a las células normales. Por ello el cáncer es una enfermedad genética monoclonal y esporádica, de las células somáticas, en la mayoría de los casos (4).

Cuando dichas alteraciones se encuentran en células de la línea germinal, se transmiten a la descendencia. Pero el cáncer hereditario no es objeto de este estudio.

Para comprender mejor la transformación maligna que sufre un tumor, es representativo el modelo de Bert Vogelstein para el carcinoma colorrectal no hereditario. Se basa en que este cáncer se inicia con un primer evento, que consiste en la mutación del gen APC, confiriendo mayor tasa de proliferación a la mucosa colorrectal, dando lugar a un clon microscópico. El segundo evento suele ser en el gen KRAS, y desencadena una segunda ronda de crecimiento clonal, que ayuda a que en la mucosa se construya un adenoma. Este proceso continuará con mutaciones en otros genes que, si siguen confiriendo ventajas a las células, el tumor terminará teniendo capacidad infiltrante (adenocarcinoma infiltrante), y posteriormente metastatizante. Estas mutaciones que confieren ventajas al tumor se denominan mutaciones conductoras o *driver* (4).

2.2. MUTACIONES *DRIVER* VS *PASSENGER*

Algunos autores sugieren que hay 140 genes aproximadamente cuyas mutaciones conducen a la génesis del tumor. Son los llamados genes *driver* o conductores. Estos confieren ventajas selectivas de crecimiento a las células tumorales (4).

Algunos estudios creen que se está alcanzando una meseta en el conocimiento de estos genes, porque con asiduidad se redescubren los mismos, en diferentes tipos de tumores.

Por otra parte, todos los genes *driver* que se conocen, pueden encasillarse en una o más vías de señalización molecular encargadas de la progresión del ciclo celular, apoptosis, crecimiento celular, etc (ver apartado “principales vías desreguladas en cáncer, y genes implicados en ellas”) (5).

Los estudios epidemiológicos han sugerido que los cánceres sólidos suelen requerir para su génesis, de 2 a 8 mutaciones *driver* y el resto de mutaciones que ha sufrido son las llamadas *passenger*. Éstas no ofrecen ventajas al tumor, no tienen efecto en el proceso neoplásico y suelen ser preneoplásicas. Por ello, si se diagnostica un tumor en un paciente de 87 años, es probable que contenga muchas más mutaciones *passenger* que el mismo tumor diagnosticado en un paciente de 40 (4).

Identificar esos drivers moleculares del cáncer es fundamental para la oncología de precisión, como veremos más adelante. Pero es complejo diferenciar qué mutaciones somáticas son *driver* y cuáles *passenger*. Hoy hay muchos algoritmos para identificar drivers, por ejemplo, el equipo de Bailey hizo un análisis *PanCancer* y *PanSoftware*, empleando más de 9000 exones tumorales del proyecto PanCancer de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y utilizó más de 26 de dichos algoritmos o herramientas computacionales para identificar genes *driver* y mutaciones *driver* (6). Estas herramientas eran variadas, por

ejemplo, ocho estaban basadas en la frecuencia de mutación (ej. MuSiC2), cuatro de ellas en la estructura (ej. HotSpot3D) y dos estaban basadas en eventos clínicamente accionables (ej. PHIAL), etc. Finalmente, consiguió identificar casi 300 genes *drivers* del cáncer.

2.3. GENES IMPLICADOS

De manera genérica, dentro de los principales genes implicados en la larga cascada de mutaciones que sufren las células para llegar a formar un tumor maligno, están descritos dos grupos principales desde 1997, por Kinzler y Bert Vogelstein: (4)

- ▽ En primer lugar, los genes vigilantes (*gatekeeper*) que, a modo de porteros, regulan la entrada de la célula a la vía tumorigénica, y así iniciar el crecimiento celular. Estos genes suponen el 1% del genoma humano, y son los oncogenes y genes supresores de tumores, que controlan directamente el crecimiento tumoral funcionando respectivamente como aceleradores y frenos de la proliferación celular.
- ▽ En segundo lugar, los genes cuidadores (*caretaker*), que no controlan directamente el crecimiento del tumor, sino la integridad del genoma, corrigiendo daños que se produzcan en él. El ADN está constantemente sometido a modificaciones por agentes exógenos y endógenos, por lo

que es esencial que las células dispongan de distintos sistemas de reparación que mantengan la integridad del genoma. Dentro de los mecanismos de reparación del ADN, del inglés DDR (*DNA damage repair*), se involucran múltiples genes, como BRCA1, BRCA2, BLM, FANCA, TP53, RAD51C y MSH2. Los principales mecanismos de reparación del ADN son (7,8):

A. Mecanismos de reparación por escisión:

- Escisión de bases (*base excision repair o BER*). Se lleva a cabo por enzimas glicosilasas que eliminan la base dañada, y posteriormente la proteína poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP) participa en la reparación.
- Escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair o NER*). En este caso se precisa de helicasas que abren la doble hélice del ADN y de enzimas que cortan el fragmento en el que están los nucleótidos dañados y lo eliminan, para que la ADN polimerasa pueda rehacerlo bien.

B. Sistema mismatch repair (MMR):

También llamado sistema de reparación del apareamiento erróneo o reparador de los errores de deslizamiento. Es esencial para mantener la estabilidad del genoma. Se activa una vez la ADN-Polimerasa ya ha replicado la hebra molde de ADN, y ha colocado en sitio erróneo un nucleótido, y no lo ha podido solucionar. Se activa un complejo de enzimas que

reconoce el daño, retira el nucleótido mal posicionado, y de nuevo la ADN-Polimerasa añade el nucleótido correcto.

Es relativamente frecuente que haya errores de apareamiento en unas secuencias repetidas de 1 a 6 nucleótidos llamadas microsatélites o secuencias cortas en tándem. Tanto es así que la inestabilidad genómica más estudiada y mejor caracterizada es la inestabilidad de microsatélites (*microsatellite instability - MSI*). Puede haber un alto grado de inestabilidad (*microsatellite instability-high / MSI-H*) o bajo grado de inestabilidad (*microsatellite instability-low / MSI-L*). Los principales genes que codifican las proteínas de estas secuencias repetitivas son MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2.

La alteración del sistema MMR otorga a las células inestabilidad genómica intrínseca que les hace aumentar la tasa de error durante la replicación. Por lo general son tumores con menor agresividad y el pronóstico del paciente es favorable; con la excepción de los carcinomas mamarios y endometriales, donde se asocia a peor pronóstico (9).

C. Mecanismos de reparación de rotura de la doble

cadena (10):

- Por recombinación no-homóloga. Participan las proteínas PARP. En este caso el daño rompe una hebra, y ésta se vuelve a “pegar” en esa misma zona, gracias a la proteína PARP, aunque los extremos sean no-homólogos.

- Por recombinación homóloga. Utiliza la información del cromosoma homólogo, para reparar al dañado. En este caso, son importantes como proteínas mediadoras las codificadas por los genes BRCA1 y 2.

2.3.1. GENES SUPRESORES DE TUMORES

Son genes cuyos productos proteicos mantienen la homeostasis de las células, evitando el mal funcionamiento de las mismas. Cuando alguno de estos genes se ve alterado, su expresión se ve reducida, por lo que su producto proteico no se fabrica o no funciona correctamente.

Según el modelo *two-hit* de Knudson, también llamado doble *hit* o doble evento, para que estos genes vean suprimida su función, se tienen que truncar los dos alelos del gen.

De entre los muchos genes supresores de tumores conocidos, sólo serán comentados los más relevantes según la literatura:

2.3.1.1. Gen de la proteína tumoral p53 (*tumor protein p53 – TP53*) (11,12)

Es el gen supresor de tumores conocido como “el guardián del genoma”. Codifica para la proteína supresora de tumores p53, un factor de transcripción que se une, en forma de tetramero, al ADN y activa programas de reparación, detención del ciclo celular, o activación de la apoptosis, en respuesta a daños en

ADN y otras señales de estrés; actuando como mecanismo de seguridad. Por ello, las mutaciones en el gen TP53 se asocian a una mayor inestabilidad cromosómica. Los tumores con mutaciones en TP53 muestran una mayor expresión de genes y proteínas de progresión del ciclo celular.

En algunos tipos de carcinomas, como el prostático, el adenocarcinoma de esófago o el carcinoma escamoso de cabeza y cuello se correlaciona con la reducción de la supervivencia, por lo que, de estar mutado, se le considera biomarcador de mal pronóstico. Pero éste es un tema controvertido, ya que el estado de la mutación del gen TP53 no siempre es indicativo del estado de la señalización de la vía TP53 en una célula cancerosa ([13–15](#)).

En el momento actual no existe tratamiento dirigido frente a esta alteración.

2.3.1.2. Homólogo de fosfatasa y tensina (*phosphatase and tensin homolog* - PTEN) ([16](#))

PTEN es el segundo gen supresor de tumores más mutado, después de p53.

Codifica una fosfatasa lipídica que actúa como principal supresora de la vía carcinogénica PI3K/AKT/mTOR, al eliminar un grupo fosfato de la molécula PI3K (fosfatidilinositol 3-

kinsasa). Por tanto, la pérdida de PTEN funcional conduce a la activación constitutiva de la vía, y con ello, al crecimiento tumoral (17–19).

2.3.1.3. Genes que codifican la proteína de susceptibilidad al cáncer de mama (*Breast Cancer susceptibility protein – BRCA*) (20)

Familia de genes que participa en el mantenimiento de la integridad del genoma, reparando la doble hebra de ADN, mediante recombinación homóloga. Cuando alguno de los genes está mutado o alterado, su expresión se ve reducida, y su producto proteico no se fabrica o no funciona correctamente, por lo que el daño del ADN puede no repararse adecuadamente. Como resultado, aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama y ovario, entre otros (21–24). Son genes de susceptibilidad para el cáncer de mama y de ovario, ya que cuando se encuentran en la línea germinal, aumenta el riesgo de desarrollar dichos cánceres (25).

Ya desde el año 2018 se dispone de fármacos activos en cáncer de mama con mutación BRCA: Los inhibidores de PARP (iPARP) como olaparib, rucaparib, niraparib. Partiendo de la base de que las proteínas BRCA1 y BRCA2 reparan el ADN mutado por recombinación homóloga, se ha visto que, si el paciente ya tiene una mutación BRCA, esa función reparadora se lleva a

cabo por otra vía, en la que están implicadas las proteínas PARP. Por lo que al inhibir a PARP, la célula queda sin mecanismos de reparación y muere (7).

2.3.1.4. Genes que codifican proteínas de remodelación de la cromatina.

Las proteínas de remodelación de la cromatina pueden subdividirse en cinco clases que incluyen SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80 y ATRX.

Estas proteínas utilizan la energía de la hidrólisis del ATP (adenosina-trifosfato) para alterar el posicionamiento de la cromatina y están implicadas en muchos procesos celulares (26).

▽ El complejo proteico SWI-SNF:

Está constituido por múltiples subunidades. Desempeña un papel importante en muchas funciones centrales celulares, como la regulación de la expresión génica y la reparación del ADN (27,28). La pérdida de su función se asocia con inestabilidad genómica y a menudo resulta en cáncer (29).

Está descrito que más del 20% de todas las neoplasias humanas presentan defectos en este complejo (29,30).

Dos de los genes implicados son ARID1A y PBMR1:

⇒ **Dominio de interacción rico en AT de la proteína A1
(AT-rich interactive domain-containing protein 1A –
ARID1A) (31)**

ARID1A es uno de los genes del complejo, más frecuentemente mutados y codifica la proteína ARID1A (30,32,33).

En el cáncer, la pérdida de función de este gen se ha asociado con el descenso de la supervivencia libre de enfermedad en algunos carcinomas, como el de mama y ovario, pudiendo actuar en estos tumores como biomarcador de mal pronóstico (32,34).

En cuanto a su uso potencial como biomarcador de tratamiento, se ha visto el papel de ARID1A en la regulación de los puntos de control del daño del ADN en las roturas de doble cadena, que sensibilizan a las células tumorales a los inhibidores de PARP. Además, las mutaciones de ARID1A se asocian comúnmente con la fosforilación de la proteína cinasa B (codificada por el gen AKT) y, en consecuencia, con la activación de la vía carcinogénica PI3K-AKT-mTOR. Así, la pérdida de expresión de ARID1A aumenta la sensibilidad de las células cancerosas a los inhibidores de PI3K y AKT (30).

⇒ **Gen de la proteína polibromo 1 (*polybromo1* –
PBRM1) (35)**

Codifica la proteína polibromo-1 (PBRM1/BAF180). Las mutaciones que alteran al gen, resultan en la pérdida de la proteína, por lo que se pierde su papel como reguladora negativa de la proliferación celular. La pérdida de este gen se considera un posible biomarcador pronóstico en carcinoma mamario asociado con malos resultados clínicos (36).

▽ **Remodelador de cromatina ATRX (ATRX chromatin remodeler)** (37,38)

Codifica una proteína remodeladora de cromatina que contiene un dominio ATPasa/helicasa que, en combinación con el cofactor de transcripción, DAXX (*death domain associated protein*), participa en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

La pérdida de ATRX se ha correlacionado con el alargamiento alternativo de los telómeros (un mecanismo no dependiente de la telomerasa), con el daño al ADN, el estrés replicativo y otras funciones celulares relacionadas con la regulación epigenética. Esta pérdida de ATRX puede ocurrir por mutaciones puntuales, delecciones o fusiones de genes.

Los estudios moleculares sobre ATRX apenas están empezando a revelar las numerosas funciones críticas de esta proteína en

el cáncer, por lo que se prevé el surgimiento de nuevos tratamientos y enfoques clínicos para los cánceres con este gen alterado (37).

2.3.1.5. Genes que codifican la cadherina E (*cadherin 1- CDH1*)

El gen CDH1 codifica la cadherina E, una proteína de adhesión celular que consta de una parte extracelular, otra transmembrana y una cola citoplasmática (39).

Las mutaciones somáticas en este gen están relacionadas con el cáncer gástrico, principalmente el difuso, el cáncer de mama, el colorrectal, el de tiroides y el de ovario. Se cree que su pérdida de función contribuye a la progresión del cáncer porque aumentar la proliferación, la invasión y la capacidad metastásica (40,41) .

Por otro lado, las mutaciones en línea germinal de éste aumentan el riesgo de cáncer gástrico difuso hereditario (41) así como de carcinoma lobulillar infiltrante de mama (39).

Actualmente no hay tratamiento dirigido, pero hay evidencia preclínica de la accionabilidad este gen (42).

2.3.1.6. Genes que codifican el receptor de estrógenos 1 y 2 (*estrogen receptor 1 – ESR1; estrogen receptor 2- ESR2*)

Estos genes codifican el receptor de estrógenos y un factor de transcripción nuclear activado por un ligando. Desempeñan un papel clave en el cáncer de mama, el cáncer de endometrio y la osteoporosis (42–44).

Una de las conclusiones del estudio PEARL sobre el carcinoma mamario con receptores hormonales positivos es que las mutaciones en el gen ESR1 podrían etiquetarse de biomarcador de mal pronóstico con supervivencia global significativamente peor que las pacientes con ESR1-wild type (no-mutado), independientemente del tratamiento dirigido; y como biomarcador predictivo de resistencia al tratamiento hormonal (45).

2.3.2. ONCOGENES

Son genes que, al sufrir mutaciones activadoras, sus productos proteicos aumentan las ventajas biológicas de las células portadoras (4).

De forma habitual están bajo estricta regulación. Cuando un protooncogén sufre una mutación, le otorga ganancia de función y pasan a ser oncogénicos. Sus productos proteicos intervienen en las rutas de señalización celular, haciendo las funciones similares a las de sus homólogos normales, pero sobre-expresadas. Pueden dotar a la célula de autosuficiencia, ya sea funcionando como receptor de un factor de crecimiento

activado constitutivamente, o como ligando que haga la función de factor de crecimiento.

Los oncogenes pueden codificar factores de crecimiento, receptores tirosina-quinasa (RTK), receptores sin actividad tirosina-quinasa, proteínas que intervienen en las vías de señalización mitógenas (de proliferación) y factores de transcripción.

De entre los muchos oncogenes conocidos, sólo serán comentados los más relevantes según la literatura:

2.3.2.1. FAMILIA RAS (las siglas provienen de “*rat sarcoma virus*” – oncogén viral del sarcoma de la rata)

Codifican proteínas GTPasas que, en condiciones normales se anclan a la parte citoplasmática de la membrana celular.

Cuando esa célula es estimulada por factores de crecimiento que se unen a su receptor transmembrana, la proteína RAS hace su función GTPasa, transformando GDP en GTP. Éste último queda unido a RAS y forman un complejo activo útil en muchas vías de transducción de señal, como la vía MAP-Kinasa o la vía PI3K/AKT/mTOR; lo cual se comentará posteriormente en el apartado de las vías de señalización celular (46).

La mutación puntual de los genes de la familia RAS (H-RAS, K-RAS, N-RAS, M-RAS), que conduce a la activación constitutiva de la proteína, se observa ampliamente en el cáncer (47,48).

Hay infinidad de publicaciones que describen cuán frecuente es la mutación de RAS en el cáncer humano, algunos describen un 30%, pero publicaciones recientes de metaanálisis describen que aproximadamente el 19% de los pacientes con cáncer albergan mutaciones de Ras, lo que equivale a unos 3,4 millones de casos nuevos al año en todo el mundo.

El 28 de mayo de 2021 la FDA otorgó la aprobación acelerada para el uso de sotorasib, el primer inhibidor de KRAS en caso de mutación G12C en pacientes con cáncer de pulmón. Prosigue la investigación con éste y otros fármacos (49).

2.3.2.2. Oncogén RAF

Codifica proteínas cinasa serina/treonina, A-Raf, B-Raf y C-Raf, que forman homodímeros o heterodímeros activos, cuando se les une el complejo Ras-GTP comentado en el apartado anterior. Estos dímeros catalizan la fosforilación y activación del siguiente participante de la vía MAP-Cinasas, es decir, de MEK1 y MEK2 (cinasas mitógeno-activadas) que, a su vez, catalizan la fosforilación y activación de ERK1 y ERK2. Estas

últimas catalizan la fosforilación reguladora de decenas de proteínas citosólicas y nucleares.

Los estudios han sido amplios sobre BRAF, y se ha descrito la existencia de mutaciones BRAF-V600E en aproximadamente el 8% de todos los cánceres. Existen tratamientos dirigidos para esta diana. Los dos primeros inhibidores de BRAF-V600E aprobados fueron vemurafenib y el dabrafenib, para su uso en melanomas con dicha mutación.

Actualmente, los estudios han descubierto que el acoplamiento de los inhibidores de MEK1/2 a los inhibidores de B-Raf es más eficaz en el tratamiento de estos melanomas, por lo que la terapia dual es el estándar de atención. Vemurafenib y cobimetanib, dabrafenib y trametinib, y encorafenib más binimetinib son las combinaciones aprobadas por las agencias reguladoras para el tratamiento de los melanomas BRAF-V600E (48).

2.3.2.3. Oncogén MYC

Este gen se expresa en prácticamente todas las células eucariotas y pertenece a los genes que se inducen rápidamente cuando las células reciben una señal para dividirse. La proteína MYC funciona en el núcleo celular, como factor de transcripción que regula la expresión de cientos de genes (hasta un tercio del genoma) en una gran variedad de tipos celulares, para promover la proliferación y crecimiento celular.

Participa en la activación del ciclo celular e inhibición de la apoptosis.

La alteración de la proteína MYC se encuentra en la mayoría de tumores humanos (hasta el 70%), esto puede dar lugar a una transcripción sostenida de sus genes diana, como son los de la ornitina descarboxilasa y el de la ciclina D2 (asociados ambos con la proliferación celular), o genes relacionados con la adhesión celular reducida o la movilidad celular aumentada.

Muchas vías de señalización celular terminan llegando a la proteína MYC en el núcleo celular, y desacoplan su expresión de sus restricciones normales. Algunas de esas vías son wnt/ β-catenina, TGF-Beta o PI3K. Las alteraciones en estas vías son mutuamente excluyentes con las mutaciones en MYC, tal como se describirá posteriormente en el apartado de las vías de señalización celular (50–53).

2.3.2.4. Oncogén de la subunidad alfa catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha* – PIK3CA) (54)

Es un gen que codifica la subunidad catalítica, p110-alfa, de la cinasa lipídica PI3K. Ésta es el primer eslabón de la vía carcinogénica PI3K/AKT/mTOR (Ver apartado “1.La vía de

señalización PI3K/AKT/mTOR” de las vías de señalización celular) (55).

Cuando PIK3CA está mutado, la vía se activa de forma constitutiva, y dado que es una de las principales vías de regulación del crecimiento y proliferación celular, esto se descontrola. Se han descrito puntos recurrentes (*hotspot*) de mutación en este gen, y son E545K, E542K y H1047R (55).

La alteración del gen PIK3CA es un evento frecuente en el cáncer de vejiga, y promueve la proliferación, la invasión y la metástasis (56). Además, es uno de los genes que muta con mayor frecuencia en la cohorte de los tumores pan-gyn (cáncer ginecológico y de mama) identificados por Berger et al. como parte del proyecto Pan-Cancer de TCGA (57). Concretamente en el carcinoma mamario, la mutación en PIK3CA es un biomarcador pronóstico, que implica agresividad tumoral con el consiguiente riesgo de recaída/recurrencia y progresión del tumor (58). En el cáncer de próstata, la alteración de PIK3CA se ha visto asociada con la resistencia a la terapia hormonal (59).

Actualmente disponemos de fármacos como Alpelisib que han demostrado actividad en caso de mutaciones de PIK3CA (60).

2.3.2.5. Familia de oncogenes de la cinasa serina/treonina AKT (*AKT serine/threonine kinase*) (61)

Codifica la proteína cinasa serina/treonina AKT también conocida como proteína cinasa B (PKB), es mediadora de muchas vías de señalización, como PI3K/AKT/mTOR. Una vez activada, la AKT modula la función de muchas proteínas aguas abajo, implicadas en la supervivencia celular, la proliferación, la migración, el metabolismo, la angiogénesis, etc.

En el genoma de los mamíferos se han identificado tres genes AKT (AKT1, AKT2 y AKT3), y aunque el estado de los activadores, moduladores y efectores descendentes de AKT tengan una función importante en el desarrollo de los tumores, la activación aberrante de esta familia de genes, en sí misma es altamente oncogénica y considerada como uno de los iniciadores del proceso carcinogénico en una amplia variedad de cánceres humanos, como los carcinomas de pulmón, mama, ovario, gástrico y páncreas.

La activación de AKT se ha visto relacionada con la resistencia adquirida a la quimioterapia y a las terapias dirigidas como el trastuzumab, gefitinib y tamoxifeno. Por ello, AKT está descrita como una diana atractiva para la terapia del cáncer. En estudios preclínicos ya hay una amplia gama de inhibidores potenciales de AKT (62).

2.3.2.6. Genes que codifican las enzimas isocitrato deshidrogenasa (*isocitrate dehydrogenase* – IDH) (63,64)

Los genes **IDH1** e **IDH2** codifican las enzimas isocitrato deshidrogenasa 1, localizada en el citoplasma celular y en los peroxisomas, y la isocitrato deshidrogenasa 2, localizada en las mitocondrias. Están involucradas en el metabolismo celular y en la respuesta al estrés oxidativo.

Se han relacionado frecuentemente con cánceres de diversos orígenes, como la leucemia mieloide aguda (20%), el colangiocarcinoma (20%), el linfoma angioinmunoblastico de células T (32%), el carcinoma sinonasal indiferenciado (49-82%), el condrosarcoma (80%) y el glioma (80%) (65). En estos últimos se ha descrito como la primera mutación que comienza su carcinogénesis. En estos casos suponen un mejor pronóstico, mayor supervivencia y mejor respuesta a la quimioterapia.

(66,67)

Las mutaciones de IDH constituyen objetivos terapéuticos atractivos, debido a su alta prevalencia y su aparición en una fase temprana de la tumorigénesis. Por ello está activo el desarrollo de inhibidores de la IDH mutante, de inmunoterapia dirigida a la IDH mutante y de agentes dirigidos a los metabolitos inducidos por la IDH mutante. Ya se han desarrollado varios inhibidores específicos, como es el IDH305.

(65)

2.3.2.7. Oncogén de la diana mecánica de la rapamicina cinasa (mechanistic target of rapamycin kinase - mTOR) (68)

Es uno de los últimos participantes de la vía PI3K/AKT/mTOR, que será comentada posteriormente en las vías de señalización celular. Forma parte de un complejo que activa el anabolismo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La mayoría de las alteraciones y mutaciones, se encuentra aguas arriba de mTOR. En general, la propia mutación del gen es un evento infrecuente. Por ejemplo, son activadores claves de la vía, las mutaciones activadoras en el gen PIK3CA, la alteración o mutación en AKT y la pérdida de PTEN (69).

2.3.2.8. Oncogén de la transcriptasa inversa de la telomerasa (telomerase reverse transcriptase - TERT) (70)

TERT codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa, una enzima que mantiene la longitud de los telómeros en cada división celular.

La actividad de la telomerasa está incrementada en el 90% de los tumores, y da lugar a la elongación aberrante de los telómeros, lo que probablemente contribuye a la inmortalidad de las células cancerosas (71–73). Entre los mecanismos que conducen a la activación aberrante de la telomerasa, se encuentran las mutaciones del promotor de TERT, que hacen que desarrolle sitios de unión ectópicos para factores de

transcripción específicos y así induce la sobreexpresión del gen. Esto se asocia con un aumento de la agresividad y el potencial metastásico en varios escenarios tumorales (73).

2.3.2.9. Gen del grupo de histonas 1 H3h (HIST1H3H) (74)

Las histonas son proteínas nucleares sobre las que se engarza en ADN, para la compactación de la cromatina. El gen HIST1H3H codifica un miembro de la familia de las histonas H3. Las modificaciones de las histonas tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama, donde se ha asociado con una pobre supervivencia global y supervivencia libre de progresión (75).

Con respecto al gen HIST1H3H, un artículo de 2016 lo describe como un factor de cromatina frecuentemente alterado en muchos cánceres, sin embargo, parece que son escasos los trabajos publicados sobre ello, siendo difícil reconocer si pueden servir como biomarcador para los pacientes con cáncer (76).

2.3.2.10. Oncogén de la β-catenina 1 (*catenin beta 1 - CTNNB1*)

Es un oncogén que proporciona instrucciones para hacer una proteína llamada β-catenina. Esta proteína desempeña un papel importante en la adhesión celular y en la comunicación

entre las células. También participa en la señalización celular como una parte esencial de la vía de señalización Wnt, que será explicado posteriormente en el apartado “2.5. principales vías moleculares alteradas en el cáncer”.

Los estudios sugieren que las mutaciones de ganancia de función en el gen CTNNB1 impiden la descomposición de la β-catenina por un complejo en el que participa la proteína APC, cuando ya no es necesaria, lo que permite que la β-catenina se acumule dentro de las células, se traslade al núcleo celular y promueva la proliferación incontrolada de las células (77) (Figura 5).

Tiene especial importancia en el cáncer de endometrio. Por un lado, se ha asociado de forma significativa la mutación en el exón 3 del gen CTNNB1 con la recidiva en los carcinomas endometrioides de estadio temprano, FIGO I-II (Federación internacional de ginecología y obstetricia - FIGO) (78). Por otro lado, en la clasificación molecular pronóstica realizada por TCGA, uno de los cuatro subtipos genómicos es el grupo con mutación en CTNNB1. (78–80)

2.3.2.11. Oncogenes que codifican receptores de tirosina cinasa

Las mutaciones en estos genes conllevan a alteraciones en su

producto, que son proteínas transmembrana con actividad tirosina cinasa (receptores de tironisa cinasa - *tyrosine kinase receptors* - RTK). La unión de ligandos cambia la configuración del receptor y, mediante una cascada de fosforilación de sus socios de unión, permite que se activen las vías de señalización posteriores que desempeñan un papel en la diferenciación, el crecimiento, la migración y la supervivencia de las células. Las mutaciones en estos genes alteran los RTK que codifican, pudiendo activarlos constitutivamente, y con ello, a las vías de señalización celular a las que se hayan asociado, como pueden ser RAS/MAP-kinasa, o PI3K (Figura 5). (ESTO LO PONÍA EN EL FGFR (81).

Actualmente existe tratamiento dirigido a dichos RTK, y son los inhibidores de las tirosina cinasas (ITK), como el imatinib, gefitinib, erlotinib, afatinib, osimertinib, alectinib, sunitinib y dasatinib, entre otros muchos.

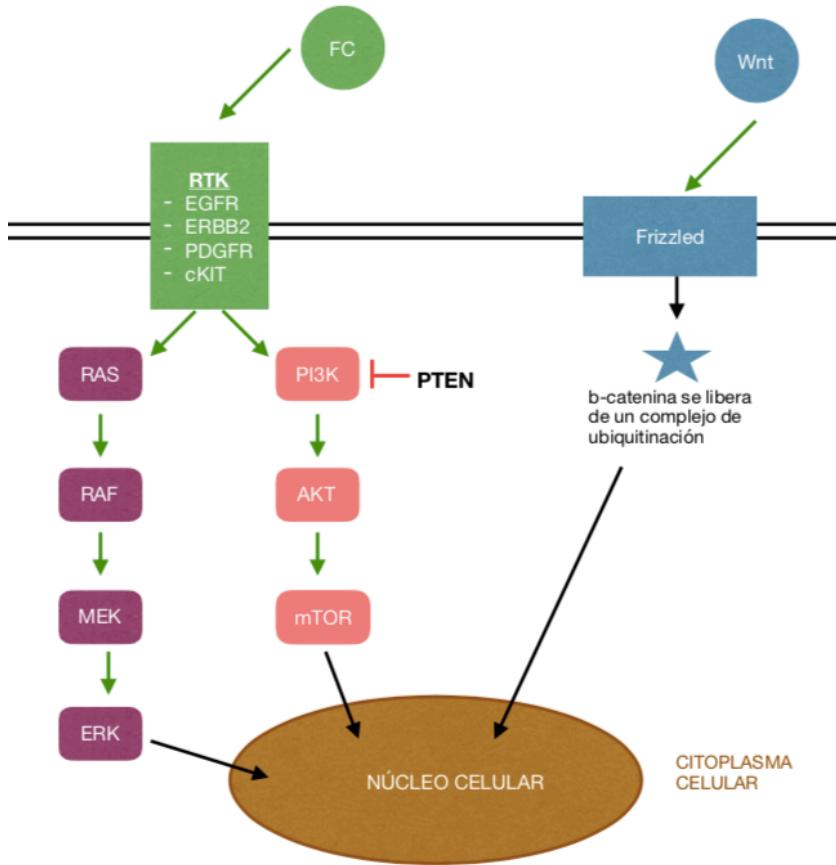


Figura 5: Un factor de crecimiento (FC) activa al receptor de tirosin-cinasa (RTK) pudiendo activar vías aguas abajo, como la vía PI3K o la vía RAS/MAP-Kinasas (figura realizada por la autora).

⇒ **Familia EGFR (HER 1 (EGFR), HER2 (c-erbB-2, HER2-neu), HER3 y HER4)**

Los dos miembros de la familia más conocidos son EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) y HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano).

- **Oncogén del receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor - EGFR) (82)**

Suele sufrir mutaciones en *hotspots* (zonas recurrentes), conduciendo a la activación del RTK de forma constitutiva. También puede sufrir amplificaciones, conduciendo al aumento de la expresión de la proteína en la membrana celular. A día de hoy existen inhibidores de EGFR muy potentes, entre los que se encuentran anticuerpos monoclonales como cetuximab y panitumumab, o ITK como gefitinib, erlotinib, afatinib, osimeritinib, comentados anteriormente. Esta terapia dirigida supuso una revolución en la evolución del manejo del cáncer de pulmón de célula no pequeña metastásico ya que el 15-20% alberga mutaciones en los exones 19 o 21 del gen EGFR, haciéndoles candidatos a dichos tratamientos (83).

-**Oncogén de la tirosina cinasa 2 del receptor erb-b2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 – ERBB2) (84)**

ERBB2, también conocido como HER2, c-ERB2 y HER-2/neu entre otros, está sobreexpresado y/o amplificado en el 15-20% de los cánceres de mama tempranos, donde se asocia a una evolución clínica agresiva de la enfermedad y en el 20% de carcinomas esofágicos (85,86).

En el cáncer de mama HER2+, la adición del anticuerpo monoclonal anti-HER2, Trastuzumab, a la quimioterapia neoadyuvante duplica, aproximadamente, la proporción de pacientes con cáncer de mama HER2-positivo que logran una respuesta patológica completa. Hoy se sabe que añadir pertuzumab da lugar a una tasa de RPC de aproximadamente el 50-70% (ensayo KATHERINE) (87).

HER2 se encuentra sobreexpresado en cáncer gástrico y de la unión gastroesofágica, con una frecuencia que oscila entre el 7 y el 34%, lo cual ha permitido la adición de antiHER2 (Trastuzumab) a la quimioterapia (85).

⇒ **Oncogén KIT, receptor de tirosina cinasa (*KIT oncogene, receptor tyrosine kinase*) (88)**

Tras la unión del ligando al RTK codificado por este gen, se produce su dimerización y autofosforilación, con la consiguiente activación de las vías de señalización que comienzan en él.

El 80% de los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) tiene mutado este gen, y los exones más comúnmente afectos son el 9, 11, 13 y 17. Como tratamiento dirigido se pueden emplear los ITK descritos anteriormente (ej. imatinib, sunitinib, dasatinib) (89).

- ⇒ **Oncogén del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas alfa (*platelet derived growth factor receptor alpha* - PDGFRA) (90)**

Gen que codifica para un RTK cuyas mutaciones se han asociado con el 5-10% de los GIST, siendo la más frecuente la mutación en D842V del exón 18 (89).

- ⇒ **Oncogén MET (91)**

Participa en la supervivencia, la proliferación y la migración de las células (92). Su expresión aberrante juega un papel fundamental en el origen del cáncer, principalmente de pulmón, gastrointestinal y hepatocelular.

En los cánceres gástricos y esofágicos, la mutación en MET se ha descrito como biomarcador de mal pronóstico (85,92).

En el cáncer de pulmón no microcítico, las mutaciones en el exón 14 de MET han abierto un campo terapéutico con fármacos como capmatinib o savolitinib (93).

- ⇒ **Oncogén del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor receptor - FGFR*) (94)**

La mayoría (66 %) de las alteraciones del gen FGFR implican amplificaciones del gen, seguidas de mutaciones (26 %) y reordenamientos que producen proteínas de fusión (8 %) (95). Dichas alteraciones se han descrito en una amplia variedad de cánceres, incluidos los de vejiga urinaria, mama, ovario, próstata, endometrio, pulmón y estómago.

Dentro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFR), los dos más relevantes son FGFR1 y FGFR3. La amplificación de FGFR1 se ha observado en el 15% de los casos de carcinoma de mama con receptores hormonales positivos, donde actúa como biomarcador pronóstico y predictivo (96). La mutación en FGFR3 está presente en el 70-85% de carcinomas uroteliales de bajo grado y en el 15-20% de los metastásicos (97-99).

En 2019 la FDA aprobó el uso del primer antagonista de molécula pequeña de FGFR, Erdafitinib, para los carcinomas uroteliales localmente avanzados o metastásicos, no respondedores a terapia con platino, y portadores de alteración en FGFR3 o FGFR2 (97).

Potencialmente, la alteración de esta familia serviría como biomarcador pronóstico, ya que la desregulación de este eje de señalización se ha implicado en la progresión tumoral y la

resistencia a la terapia anticancerosa en muchos tipos de tumores, por ejemplo, en el GIST con la resistencia a Imatinib (81).

⇒ **Receptor tirosina cinasa neurotrófico (*neurotrophic tyrosine receptor kinase - NTRK*) (100)**

Hay tres genes de RTK neurotróficos, NTRK1, NTRK2 y NTRK3, que codifican los receptores tirosina cinasa (RTK o TRK), TRKA, TRKB y TRKC respectivamente. Cuando la neurotrofina (factor de crecimiento) se une a uno de ellos, éste se fosforila y activa la cascada de fosforilación de los miembros de la vía MAPK. La señalización a través de esta cinasa conduce, de forma fisiológica a la diferenciación celular, señalización del dolor, termorregulación, regulación del movimiento, memoria, el estado de ánimo, el apetito, el peso corporal y la propiocepción (101).

Las mutaciones y fusiones en estos genes están fuertemente asociadas con los cánceres sólidos. En la mayoría se encuentran con una frecuencia baja (<5%) pero hay un pequeño grupo de tumores en los que la frecuencia es muy alta (>80%), como son el carcinoma secretor de glándula salival y de mama. Por lo general, las mutaciones en estos genes son mutuamente excluyentes de otros *drivers* oncogénicos comunes (101).

Las fusiones de NTRK se describieron por primera vez en el carcinoma colorrectal (fusión LMNA-NTRK1) en el año 1982. En 1998 se describió que la translocación t(12;15)(p13; q25) da lugar a la fusión ETV6-NTRK3, característica del fibrosarcoma infantil, y posteriormente se describió en los carcinomas secretores de mama y de glándula salival. De forma reciente, también se han identificado fusiones NTRK en una variedad amplia de neoplasias malignas como el colangiocarcinoma (fusión PLEKHA6-NTRK1) (102).

Las fusiones oncogénicas de la tirosina cinasa neurotrófica NTRK1, NTRK2 y NTRK3, con uno de sus múltiples socios de unión, dan lugar a genes de fusión que actúan como *drivers* oncogénicos que causan la activación constitutiva de la vía RTK o TRK y conduce a la tumorigénesis.

Los datos de los ensayos clínicos han sido prometedores, por lo que la FDA ya ha aprobado el uso de dos inhibidores de Trk, como son Larotrectinib y Entrectinib, siendo el primero selectivo. Ambos han demostrado una actividad asombrosa y duradera contra los tumores sólidos localmente avanzados y metastásicos con fusiones NTRK (102–104).

Dado que hay tres genes NTRK diferentes, una variedad de posibles socios de fusión y unos cuantos puntos de rotura posibles en los que diferentes exones de la tirosina quinasa NTRK se unirían al socio de fusión, el cribado de las fusiones

NTRK es algo complejo. Los ensayos utilizados habitualmente para identificar las fusiones de NTRK incluyen la detección de los genes de fusión NTRK en el ADN o ARN mediante secuenciación o la detección de las proteínas TRAK, TRKB y TRKC con inmunohistoquímica pan-Trk (101,102).

El equipo de J.P.Solomon describió una sensibilidad global del 81,1% y especificidad global del 99,9% para la secuenciación NGS a nivel de ADN en comparación con ARN, y una sensibilidad global del 87,9% y especificidad global del 81,1% con las técnicas de inmunohistoquímica; concretamente siendo la sensibilidad para en NTRK1 del 96% y del 100% para NTRK2, así como la especificidad del 100% para el carcinoma de colon y de pulmón, entre otros (102).

Ante tales diferencias entre sensibilidad y especificidad en los distintos genes y distintos tumores dentro de la misma técnica, parece que elegir la correcta forma de detección de la fusión dependerá del gen problema, y del tipo de tumor, así como de la necesidad de realizar la detección de forma exhaustiva y simultánea en distintas muestras (102).

⇒ **Receptor de tirosina cinasa ALK (*ALK receptor tyrosine kinase - ALK*) (105)**

Este gen codifica un receptor tirosina cinasa, que pertenece a la familia de receptores de insulina. Está alterado en tumores como los linfomas anaplásicos de células grandes, el neuroblastoma, el cáncer de pulmón de célula no pequeña, y el carcinoma anaplásico de tiroides (106)

Dicho linfoma anaplásico es la entidad en la que se describió por primera vez el reordenamiento de ALK, dando lugar a una nueva entidad en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de neoplasias hematopoyéticas y linfoides. En este caso el gen ALK se fusiona con el gen NPM (107).

Por otro lado, los reordenamientos de ALK se producen en el 3-8% de la población total de cáncer de pulmón de célula no pequeña (108). El más común es su fusión con el gen de la proteína asociada a los microtúbulos 4 (EML4), dando lugar a la proteína quimérica EML4-ALK. Esto da lugar a la activación constitutiva del dominio cinasa, que conduce a la activación de las vías de señalización descendentes, incluyendo las vías PI3K-AKT-mTOR y MAP-Kinasas, impulsando la proliferación celular, la supervivencia y la migración incontroladas. Además de EML4, se han descrito **socios de fusión** menos comunes, como el gen RANBP2, ATIC, TFG o NPM1, entre otros (105,109).

Su importancia pronóstica en el adenocarcinoma de pulmón sigue siendo contradictoria. Uno de los equipos que apoya la mejoría en el pronóstico es el de Huan Zhang, que hace un estudio retrospectivo en pacientes con reordenamiento ALK sometidos a cirugía radical (110).

Los ITK han mejorado rotundamente la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña ALK-positivo, convirtiéndose en la terapia estándar actual para este subgrupo. El primero en aprobarse como tratamiento de primera línea fue Crizotinib, seguido de Alectinib o Brigatinib. Y hoy también existen de tercera generación como Lorlatinib (108).

⇒ **Receptor de tirosina cinasa ROS1 (*ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase – ROS1*)**

Este gen codifica un RTK que, al igual que ALK, pertenece a la familia de receptores de insulina (111).

En el cáncer de pulmón de célula no pequeña la incidencia de los reordenamientos ROS1 es aproximadamente del 1% al 2%. Esta alteración genómica es una diana terapéutica para la que se aprobaron dos ITK, crizotinib y el entrectinib (108).

2.3.2.12. Oncogenes que codifican subunidades catalíticas de la AND polimerasa delta 1 (*DNA polymerase delta 1, catalytic*

subunit – POLD1) y de la AND polimerasa épsilon (DNA polymerase epsilon, catalytic subunit – POLE) (112,113)

POLD1 codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa delta y POLE codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa épsilon.

Ambas enzimas, están implicadas en la reparación y en la replicación del ADN cromosómico. Por tanto, su alteración puede conducir a errores en la reparación del ADN y con ello a la génesis de tumores con un fenotipo molecular hipermutador (114).. Esto supone que tendrán una elevada carga mutacional, haciéndoles productores de gran cantidad de antígenos. Por ello, se les ha propuesto como potenciales biomarcadores predictivos de respuesta a los inhibidores de puntos de control inmunitario (115).

Toripalimap, un anticuerpo anti PD1 en estudio, pretende demostrar su eficacia en pacientes con cáncer sólido y mutaciones POLE/POLD1 que no son MSI-H (ej. NCT03810339) (114).

POLE y POLD1 se han visto relacionados con múltiples cánceres sólidos, como el de endometrio, el colorrectal, el esofagogástrico, el vesical o el de pulmón, entre otros. Y han sido reconocidos recientemente como genes hereditarios

predisponentes al cáncer colorrectal, endometrial y otras neoplasias malignas (115,116)

2.3.2.13. Oncogenes que codifican la subunidad alfa q de la proteína G (*G protein subunit alpha q* – GNAQ) y la subunidad alfa 11 de la proteína G (*G protein subunit alpha 11* – GNA11) (117,118)

Ambos oncogenes codifican subunidades que forman parte de la familia de las proteínas G. Éstas actúan en varios sistemas de señalización transmembrana, funcionando como moduladores y transductores de señales. Las mutaciones en estos genes conllevan una activación de muchas vías de señalización, incluyendo la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). Su trascendencia justifica que sean genes actualmente en investigación, pese a que aún no cuentan con tratamiento dirigido (119).

La mutación de GNAQ o GNA11 suele ser la iniciadora de los melanomas uveales (120). Además, GNAQ mutado se ha encontrado en casos de colangiocarcinoma intrahepático, hepatocarcinoma, carcinoma gástrico, cáncer de próstata y cáncer de pulmón de célula no pequeña, entre otros (119).

2.4. LOCALIZACIÓN Y FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES

En los estudios moleculares de la génesis del cáncer se repiten los mismos genes alterados una y otra vez, pero no siempre lo hacen en la misma localización o residuo molecular, ni con la misma frecuencia. Por ejemplo, uno de los genes más mutados en el cáncer es RAS, donde, casi todas las mutaciones detectadas, que aportan ganancia de función, se han localizado en tres puntos calientes en los codones 12, 13 y 61.

Concretamente en el adenocarcinoma colorrectal, existe la mutación de KRAS, y es predominante en el residuo G12, mientras que en el cáncer gástrico, aunque también muta KRAS, es más común en el residuo G13 y Q61.

Otro ejemplo clásico de mutaciones en diferentes localizaciones lo proporciona el adenocarcinoma de pulmón, donde la mutación en EGFR casi siempre ocurre en el dominio tirosina cinasa del receptor codificado, mientras que en el glioblastoma las mutaciones de este gen se dan en el dominio extracelular (5).

Por otro lado, en los cánceres sólidos con mutación POLE/POLD1 se ha visto que ésta ocurre en el dominio exonucleasa con más frecuencia. En este caso, estudios publicados en el año 2020 descartan la patogenicidad de las mutaciones fuera del dominio exonucleasa de la polimerasa, definiéndolas como *passenger* (116,121). En cambio, hay estudios anteriores que describen supervivencias globales

similares para ambos supuestos, proponiendo el estudio de todos los exones de los genes POLE y POLD1 (114).

En cuanto a la regularidad de las mutaciones, los genes de las vías *driver* del cáncer, no se alteran con la misma frecuencia. Unos se modifican de forma recurrente y son bien conocidos en el cáncer, mientras que otros se alteran ocasionalmente o nunca (5).

En cáncer colorrectal, los genes APC y KRAS son los que mutan más frecuentemente mientras que en el melanoma lo es el gen BRAF, pero también se encuentran mutaciones en APC y KRAS, pero a una frecuencia menor. Esto podría indicar que, en cada tipo de tejido, el camino molecular preferente que conduce al cáncer, es distinto. Por tanto, parece que en la mucosa colónica es más ventajosa para el tumor la mutación del gen APC que en otro tejido.

También se sabe que la tasa de mutación en diferentes tumores es muy distinta. Puede ir desde 0,001 mutaciones por megabase (ej. tumor rabdoide), hasta 1000 mutaciones por megabase (ej. melanoma y cáncer de pulmón). Si se analizan las mutaciones que dan lugar a un cambio de aminoácido, se observa hipomutación en los tumores pediátricos y en el cáncer hematológico. En cambio, los tumores inducidos por agentes

carcinógenos, como el melanoma y el cáncer de pulmón, tienen una alta tasa de mutación.

Un resumen de todo esto lo muestra *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), trasladándolo a las vías *driver* del cáncer. Tal y como se describe, algunas de las vías descontroladas en los tumores, se alteran de forma frecuente, y lo hacen en muchos tipos diferentes de tumores. En cambio, otras vías se alteran sólo en grupos tumorales determinados. Se ha observado asociación entre la alteración de la vía de respuesta al estrés oxidativo y la histología escamosa, ya que es una vía frecuentemente alterada en los carcinomas escamosos (5).

En cualquier caso, la importancia de la localización de las mutaciones y su frecuencia, es objeto de estudio actual mediante ingeniería genética en ratones gracias al CRISPR pero, hasta el momento la literatura resalta que, pese a la relevancia que puedan tener las distintas alteraciones moleculares en sí mismas, lo verdaderamente importante es conocer las vías *driver* a las que pertenecen, porque son las verdaderas opciones terapéuticas que cambiarán la supervivencia de los pacientes (5,47).

2.5. PRINCIPALES VÍAS MOLECULARES ALTERADAS EN EL CÁNCER

Una vía de señalización celular o vía de transducción de señales es una red de flujo de información que se inicia cuando las moléculas de señalización extracelular se unen a los receptores de la superficie de la célula. Las moléculas de señalización se modifican, provocando un cambio en su capacidad funcional, que afecta a moléculas posteriores de la red. Este proceso en cascada culmina en una respuesta celular (122).

Una de las necesidades más urgentes de la investigación básica del cáncer ha sido conocer y comprender, las vías de señalización celular en las que participan los genes *driver*, ya sean oncogenes o genes supresores de tumores.

Es importante porque dichas vías regulan procesos esenciales de las células, como el destino de las mismas, su supervivencia y el mantenimiento del genoma.

En cuanto al destino celular, en el cáncer se rompe el equilibrio entre la división celular y la diferenciación, favoreciendo la primera y con ello el crecimiento celular.

En relación a la supervivencia celular, hay mutaciones que favorecen la angiogénesis, y con ello el crecimiento; y hay mutaciones que lo que permiten es el crecimiento en condiciones de escasos nutrientes, como es el caso de las mutaciones en EGFR, HER2, FGFR2, PDGFR, TGFbetaR2, MET, KIT, RAS, RAF, PIK3CA y PTEN; porque algunos de estos genes

codifican receptores para sus factores de crecimiento, y otros transmiten las señales de los factores de crecimiento por el interior de la célula.

Por último, en lo que respecta al mantenimiento del genoma, las células tumorales que sobrevivan al daño en el ADN y no les perturbe la complejidad de su genoma, tendrán ventaja selectiva de crecimiento. Algunas mutaciones que favorecen esto, son las que anulan a TP53, porque anulan puntos de control (4).

Descifrar todas estas vías está permitiendo y permitirá a los investigadores desarrollar enfoques de manejo del cáncer más eficaces en la reducción de la morbilidad y mortalidad del cáncer (4).

Existe una base de datos, KEGG PATHWAY (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que contiene una colección de mapas de múltiples vías, que representa el conocimiento de la interacción molecular y las reacciones en los siguientes campos:

1. Metabolismo: Global, Carbohidratos, Energía, Lípidos, Nucleótidos, Aminoácidos, Glicano, Cofactores/vitaminas, Terpenoide/PK, Xenobióticos, Estructura química, etc.
2. Procesamiento de la información genética

3. Procesamiento de la información ambiental

4. Procesos celulares

5. Sistemas del organismo

6. Enfermedades humanas

Dentro de este último apartado hay un subapartado titulado “*pathways in cancer*” (vías en el cáncer), constituido por un mapa con las vías participantes en la carcinogénesis. Estas vías terminan en “proliferación celular, evasión de apoptosis, angiogénesis sostenida, inestabilidad genómica, bloqueo de la diferenciación, inmortalidad, daño genómico, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, resistencia a la quimioterapia” (50).

Según los expertos sólo hay un número limitado de genes que participan en las vías, y un número limitado de vías de señalización celular y han visto que algunas son más significativas que otras (4). Estas vías explican gran parte de los mecanismos del cáncer, y la investigación ya ha establecido conexiones entre muchas de estas vías y el tipo de cáncer correspondiente (122).

Algunas de estas vías de señalización más importantes son:

1. La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR

Ésta vía está frecuentemente alterada en los tumores humanos. Controla la mayoría de las características del cáncer,

como el ciclo celular, la supervivencia, el metabolismo, la motilidad celular y la inestabilidad genómica, la angiogénesis y el reclutamiento de células inflamatorias. La vía culmina en el complejo mTOR, que activa el anabolismo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Algunos tipos de tumores, como el carcinoma de células escamosas de pulmón, el cáncer esofagogastrico positivo al virus de Epstein-Barr y el cáncer de útero no hipermutado, presentan altas tasas de alteraciones en la vía PI3K, alteradas en el 68%, 80%, 86% y 95% de las muestras estudiadas, respectivamente (5).

El principal inhibidor de esta vía es el producto proteico del gen PTEN, un gen supresor de tumores (Figura 5). La alteración de este gen, así como la de PIK3CA, son los mecanismos principales de alteración de esta vía en cánceres como el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de mama, los tumores gastrointestinales y los ginecológicos.

Dada la importancia de la vía, la investigación sobre los fármacos dirigidos a PI3K fue muy potente, hasta que finalmente se aprobó el fármaco Alpelisib en el cáncer de mama, una neoplasia donde el 30% de los casos tiene alteración de la vía. En cambio, en el carcinoma de endometrio, el éxito de los agentes inhibidores de PI3K está limitado por varios factores como la toxicidad, la selección de pacientes y los

mecanismos compensatorios, entre otros. Por tanto, se necesitan estrategias para superar estas limitaciones.

Actualmente hay ensayos clínicos en curso al respecto (ej. NCT01536054, NCT01522820) ([123](#)).

En otras neoplasias como el carcinoma vesical no se ha aprobado el uso de fármacos dirigidos a la vía PI3K, pero hay grupos de trabajo que proponen estrategias farmacológicas anti-PI3K sin concretar el órgano específico propietario del carcinoma ([55](#)).

2. La vía de señalización MYC

Las alteraciones de la vía Myc existe en la mayoría de tumores humanos, y es la causa de numerosos rasgos definitorios del cáncer. Pese a su importante papel en esta enfermedad, en la actualidad no se ha aprobado ningún tratamiento dirigido para su uso en humanos. Muchos equipos de investigación están en busca de un inhibidor de MYC, y en el año 2021 se aprobó, concretamente, el uso de Omomyc en ensayos clínicos de fase I/IIa. Es un homólogo de MYC que permite bloquear la transcripción de los genes que están bajo su control, haciendo que la célula tumoral no se divida con normalidad y muera. Se ha validado como estrategia terapéutica para el astrocitoma en modelos de ratón in vivo y en células progenitoras de estos tumores in vitro, según un estudio de Soucek y Whitfield ([124](#)).

3. La vía de señalización RAS/MAP-cinasa

La cascada de señalización RAS/RAF/MEK/ERK (RAS-MAPcinasa) es esencial para la comunicación inter e intracelular, que regula funciones fundamentales como el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación.

Esta vía se ve estimulada por la unión del EGF (factor de crecimiento epidérmico) al receptor de tirosincinasa EGFR. Estimula la activación de RAS, porque aumenta su estado de unión a GTP. RAS hace de transductor de señales, y así el Ras activado puede entonces interactuar físicamente con RAF y encender la cascada de señalización que continuará activando a MEK, y éste fosforilará a ERK, que generará la respuesta a la señal. Es más, las células cancerosas necesitan una señalización óptima de ERK para crecer.

Todas son proteínas cinasas citosólicas y RAF es la primera cinasa de la vía, por lo que se ha considerado una diana ideal para el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Los inhibidores de RAF de primera generación, Vemurafenib, Dabrafenib y Encorafenib, se desarrollaron y aplicaron al tratamiento de cánceres portadores de BRAF (V600E) como agentes únicos o junto con inhibidores de MEK. Estos fármacos alcanzaron una eficacia prometedora en la fase terapéutica inicial, aunque esta eficacia quedó anulada por la rápida aparición de resistencias al fármaco. Para superar estas resistencias, se desarrollaron los

inhibidores de segunda generación, pero su índice terapéutico es menor, ya que inhiben fuertemente esta vía de señalización también en las células normales.

Actualmente se están desarrollando nuevos inhibidores de esta vía, para mejorar la inhibición con una mayor especificidad y eficacia del fármaco (125).

La búsqueda de inhibidores específicos de RAS condujo a la aprobación acelerada del primer inhibidor de KRAS, Sotorasib, ya comentado en el punto 2.3.2.1. (49).

4. La vía de señalización TGF-beta (factor de crecimiento transformante beta)

TGF-beta es un regulador que inhibe o estimula la proliferación celular (126). La alteración de esta vía está relacionada con el cáncer, principalmente con los cánceres de páncreas y los gastrointestinales (5).

5. La vía de señalización Wnt/ β -catenina

Esta vía promueve el crecimiento y división de las células, siendo esencial en la proliferación celular. También participa en la diferenciación celular y, en los tejidos adultos, esta vía juega

un papel en el mantenimiento y la renovación de las células madre (127).

Las alteraciones en la vía Wnt son muy variables entre los distintos tipos de cáncer. El cáncer colorrectal tiene una activación casi universal de esta vía, mientras que otros, como los carcinomas de células renales y el cáncer de mama, presentan frecuencias muy bajas de alteración en la misma. (5).

En ausencia de una señal Wnt, la β -catenina es degradada por un complejo de proteínas que incluye a APC. En el núcleo, el factor de células T permanecerá en un estado inactivo como consecuencia de la unión al represor, por lo que no se producirá la transcripción de determinados genes (Figura 6). En caso contrario, la unión de Wnt a sus receptores (Frizzled) induce que el complejo de destrucción se deshaga y la β -catenina se estabilice, pudiendo entrar en el núcleo celular, y unirse posteriormente al TCF en el para regular la transcripción de los genes diana. En el estado activo de Wnt, la participación de β -catenina convierte, de forma temporal, al TCF en un activador transcripcional (127,128).

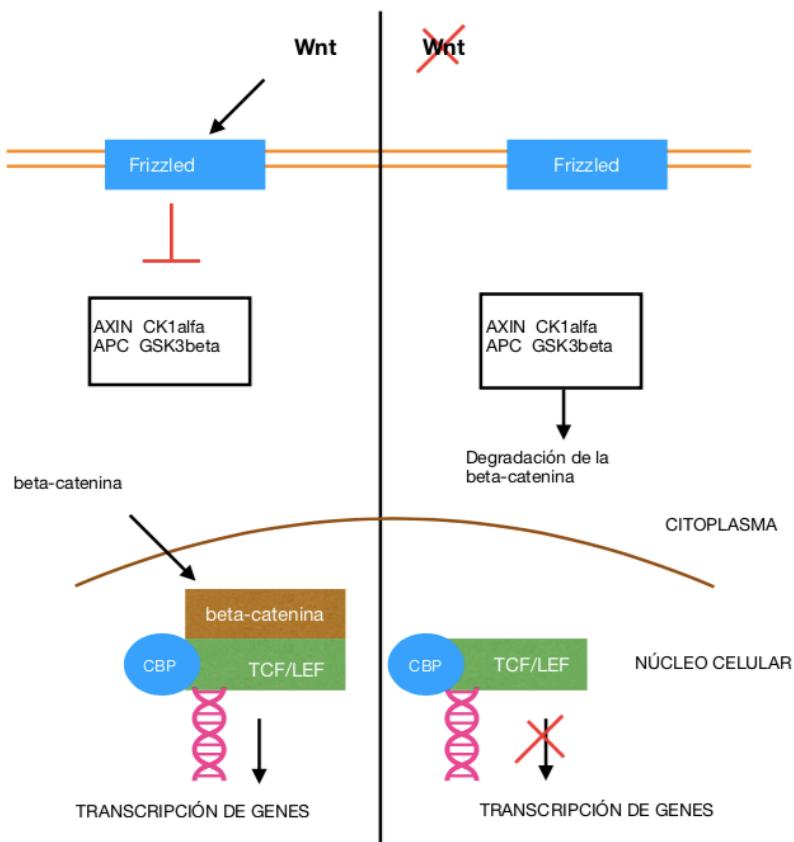


Figura 6: Vía de señalización Wnt/β-catenina (figura realizada por la autora).

La vía ha sido objeto de intervenciones en evaluaciones preclínicas y ensayos clínicos, porque su desregulación está estrechamente relacionada con el inicio y la progresión de varios tipos de cáncer. Se han diseñado inhibidores, antagonistas y agonistas dirigidos a esta cascada y hay infinidad de ensayos clínicos que se detallan en el artículo de Ya Zhang et al. Estos elementos dirigidos ya estudiados, han demostrado

ser candidatos prometedores, por lo que se esperan nuevas investigaciones que confirmen su seguridad, eficacia, y demás características para que sea posible su administración como terapia dirigida (127).

6. La vía de señalización TP53

Actúa como mecanismo de seguridad en respuesta a daños en el ADN y otras señales de estrés, y activa programas de reparación, detención del ciclo celular, o activación de la apoptosis. Esta vía ha sido explicada en el apartado “2.3.1.1. Gen de la proteína tumoral p53 (*tumor protein p53 – TP53*)”

3. EVOLUCIÓN EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER

3.1. ENFOQUE CLÁSICO

En el manejo clásico del cáncer, el diagnóstico definitivo lo determinaba la histología y el tratamiento se basaba en terapias no dirigidas cuyo mecanismo de acción afecta a múltiples subtipos celulares y era válido para grandes grupos de pacientes.

El diagnóstico tradicional parte de una base anatómica. Se apoya en la localización y en la histología, que aporta la

nomenclatura y datos de pronóstico, como son el grado de diferenciación, la necrosis, la invasión vasculolinfática, y la perineural y el índice mitótico. Desde la invención del microscopio óptico en el siglo XVI y el descubrimiento de las tinciones de hematoxilina y eosina hace más de un siglo, el proceso ha ido enriqueciéndose con mejoras como el desarrollo de la inmunohistoquímica, la hibridación *in situ* y la patología digital, permitiendo diagnósticos más completos.

El diagnóstico también debe incorporar un sistema de clasificación para el estadiaje patológico de tumores, siendo el más extendido el TNM (pTNM), que tiene importante valor pronóstico (129). Es el sistema de clasificación del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC), y se basa en el examen macroscópico y microscópico. Valora el tamaño tumoral (T), número de ganglios regionales afectos (N) y la presencia de enfermedad metastásica a distancia (M). Finalmente, con todos los datos anteriores, el diagnóstico se completa asignando el estadio general del tumor que, para la mayoría de los cánceres va del I al IV, donde la etapa IV es la más alta y por tanto la más avanzada. El estadio tiene un importante valor clínico, porque el correcto tratamiento depende de una correcta estadificación.

En este enfoque clásico, el tratamiento, desde la Segunda Guerra Mundial, se apoyaba en tres pilares: la cirugía, la radioterapia, y la quimioterapia. Pronto se introdujo en la clínica diaria el uso de las primeras dianas terapéuticas, como los receptores de estrógenos y de progesterona, en el carcinoma de mama. Pero pasó mucho tiempo hasta que aparecieron otras dianas, por lo que los profesionales clínicos percibieron un punto de estancamiento terapéutico: la experiencia clínica mejoraba, pero la mortalidad cambiaba poco, lo que llevaba a la necesidad de buscar nuevos enfoques.

3.2. TRANSICIÓN

Las nuevas tecnologías tuvieron mucho que ver en el impulso hacia el cambio. La secuenciación del genoma del cáncer empezó a tener consecuencias en la clínica, concretamente gracias al descubrimiento de mutaciones activadoras en los genes codificantes de proteínas tirosina cinasas (TK). Éstas fueron ampliamente estudiadas a nivel bioquímico, estructural y fisiológico, hasta que se desarrollaron los inhibidores de la tirosina cinasa (ITK), lo cual fue uno de los eslabones más estimulantes de la medicina moderna (4).

Un ejemplo primordial nace con la leucemia mieloide crónica. Desde que se descubrió que en su génesis estaba implicada una TK constitutivamente activa, producto de un gen de fusión

(BCR-ABL), originado de la translocación t(9;22)(q34;q11), la comprensión de la biología molecular de esta entidad condujo al desarrollo de fármacos dirigidos a dicha TK. Estos fármacos se han convertido en el tratamiento inicial de elección para la gran mayoría de pacientes con leucemia mieloide crónica, porque aumentan la supervivencia global de estos. El imatinib fue el primer ITK aprobado con este objetivo (130).

Otros ejemplos representativos de ITK son los dirigidos a EGFR o a ALK (cinasa del linfoma anaplásico). Obviamente esto ha tenido consecuencias en el diagnóstico, porque para iniciar el tratamiento con estos agentes, es imprescindible determinar si el cáncer en cuestión alberga las mutaciones a las que se dirige el fármaco, de lo contrario sería perjudicial, ya que estos pacientes desarrollarían los efectos secundarios tóxicos de los fármacos mientras sus tumores progresan (4).

3.3. ENFOQUE ACTUAL: ENFOQUE MOLECULAR

Hoy se dispone de tecnología de alto rendimiento, que permite caracterizar el material genético deseado. Esto ha conducido a la concepción de mejores métodos de diagnóstico y, en paralelo, al desarrollo de agentes moleculares altamente selectivos, y por tanto más efectivos. Se ha conseguido que se adapten las estrategias de prevención y tratamiento, en

función de la variabilidad individual, integrando los datos clínicos, histológicos y moleculares. El enfoque actual del cáncer pertenece a la era de la medicina de precisión.

Aunque "medicina de precisión" y "medicina personalizada" se superponen, el Consejo Nacional de Investigación (NRC) de EEUU aprobó y prefirió el término "medicina de precisión".

En el momento actual los expertos describen un cambio de paradigma, en el que el manejo del cáncer ha pasado a ser molecular e individuo-dependiente (131).

El principal impulsor de esta nueva era de manejo del cáncer, fue *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), un programa que sistematizó la investigación del cáncer a gran escala basada en la genómica. Nació en 2006, y caracterizó molecularmente más de 20.000 cánceres primarios, que abarcaban hasta 33 tipos de cáncer (132). De él surgieron muchos otros programas que proporcionan ideas y recursos para contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer. Por ejemplo, *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* de Nueva York llevó a cabo un ensayo con muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded - FFPE) de tumores sólidos, secuenciando exones e intrones seleccionados, con un panel genético de elaboración propia, llamado *Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets* (MSK-IMPACT), y obtuvo el perfil mutacional de sus

dianas accionables. Tras validar dicho panel, lo implementaron en su laboratorio clínico para hacer secuenciación dirigida prospectiva y así orientar las decisiones terapéuticas (133).

3.3.1. FÁRMACOS DIRIGIDOS A DIANAS MOLECULARES

Gracias a estos proyectos, y a todos los que han seguido sus pasos, en la actualidad hay múltiples tratamientos dirigidos a dianas moleculares, es decir, se han descubierto multitud de dianas accionables. Y recientes ensayos clínicos tienen resultados tan prometedores que provocan la aprobación acelerada por parte de la FDA de los inhibidores selectivos de las dianas en cuestión. Esto refleja la magnitud de la terapéutica dirigida a dianas moleculares (102).

Algunos ejemplos de fármacos dirigidos a dianas moleculares que ya han sido aprobados, así como los cánceres para los que tienen indicación, serán comentados a continuación sin profundizar en sus características. Se ha recurrido a las fichas técnicas de cada fármaco accesibles desde la Agencia Europea del Medicamento (*European Medicines Agency - EMA*), así como a bibliografía basada en las aprobaciones de la FDA. Las indicaciones exactas para cada tumor pueden consultarse en la bibliografía.

Imatinib, Dasatinib y Nilotinib, aprobados para su uso en leucemia mieloide crónica con cromosoma Filadelfia positivo

(Ph+), que es producto de la translocación (9;22). Imatinib y Dasatinib también están indicados para la leucemia linfoblástica aguda Ph+, y además el Imatinib fue aprobado para el síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo asociado con el reordenamiento del gen PDGFR, síndrome hipereosinofílico y /o leucemia eosinofílica crónica con reordenamiento de los genes FIP1L1-PDGFR α ; así como en tumores del estroma gastrointestinal y en el dermatofibrosarcoma protuberans. Vemurafenib y Dabrafenib están indicados en melanoma con mutación BRAF V600E, y el último también en el cáncer de pulmón de célula no pequeña. Los anticuerpos dirigidos a EGFR, como el Cetuximab, actúan en el dominio extracelular del receptor transmembrana, y las pequeñas moléculas en el dominio intracelular. El Cetuximab está indicado en cáncer colorrectal con RAS nativo y en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Erlotinib, gefitinib, afatinib están aprobados para su uso en cáncer de pulmón de célula no pequeña con EGFR alterado. Para este mismo tumor existen fármacos dirigidos a ALK que han demostrado beneficio, como crizotinib, ceritinib, alectinib y lorlatinib (134,135).

El uso de erdafitinib fue aprobado en 2019 por la FDA para el carcinoma urotelial con FGFR mutado (136).

El carcinoma de mama con mutación en PIK3CA puede ser candidato a tratamiento con alpelisib. Y aquel carcinoma mamario HER2 positivo se beneficiará de los anticuerpos monoclonales trastuzumab y pertuzumab. Este primero también se emplea en cáncer gástrico HER2 positivo. Existen inhibidores de MEK como trametinib y binimetinib que están indicados en melanoma, y el primero también en cáncer de pulmón de célula no pequeña.

Los carcinomas de mama, los tumores neuroendocrinos de origen pancreático, de origen pulmonar o gastrointestinal y los carcinomas de células renales, con mutación en mTOR, se pueden beneficiar de su inhibidor, everolimus.

Hay dos inhibidores de Trk aprobados en adultos y pacientes pediátricos con tumores sólidos que presenten una fusión del gen NTRK; son entrectinib y larotrectinib. Este último es selectivo, mientras que el primero también inhibe a ROS1 y ALK.

3.3.2. FARMACOGENÓMICA

Por otro lado, existe otra forma de emplear la medicina basada en el genoma y se centra en los polimorfismos genéticos, es decir, variantes alélicas, de los genes que codifican las proteínas involucradas en la farmacocinética y farmacodinámica. Estos polimorfismos pueden condicionar la respuesta del individuo al fármaco. Conocer el estado de la

Línea germinal de estos genes podría predecir el comportamiento farmacológico del individuo. Esto se conoce como farmacogenómica (137).

Actualmente no se realiza el genotipado de forma sistemática. Los estudios farmacogenómicos llevan mucho tiempo, y la técnica gold standard todavía no se ha establecido (138).

Tres ejemplos ampliamente conocidos de farmacogenómica en Oncología Médica son el 5-Fluoracilo, el tamoxifeno o la ciclofosfamida:

5-Fluoracilo/Capécitabina - DPYD

El 5-Fluoracilo es un agente antitumoral que se puede administrar intravenoso (5-Fluoracilo) o por vía oral en forma de profármaco (capécitabina o tegafur). En su eliminación interviene el gen de la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD). Si éste está mutado se altera la detoxificación del fármaco, dando lugar a una sobredosificación y a efectos adversos muy graves. Existe una guía del “Consorcio para la Implementación de la Farmacogenética en la Clínica” (CPIC) sobre cómo actuar según el genotipo que se encuentre del gen DPYD, y la ficha técnica del fármaco explica que las contraindicaciones se dan cuando hay una deficiencia de DPYD (139).

Tamoxifeno - CYP2D6

El tamoxifeno es un antiestrógeno que se utiliza en el cáncer de mama. En el organismo se metaboliza a través del CYP2D6 en endoxifeno, su principal metabolito activo.

El gen CYP2D6 tiene relevancia porque algunos de sus alelos dan lugar a un fenotipo de metabolizador pobre (140).

Ciclofosfamida - CYPB6 y CYP2C19

La ciclofosfamida es agente alquilante empleado en el tratamiento de neoplasias y como agente inmunosupresor. Es un profármaco que debe metabolizarse en su forma activa para generar efecto. Este paso inicial de bioactivación se ve catalizado por las enzimas codificadas por los genes CYPB6 y CYP2C19. Dependiendo de los polimorfismos del paciente, éste será metabolizador rápido, intermedio o lento (141).

3.4. EJEMPLO DE LA EVOLUCIÓN

Hasta hace no mucho, ante un nuevo diagnóstico de carcinoma pulmonar, la simple diferenciación patológica entre carcinoma de célula pequeña y de célula no pequeña, junto con el estadio, era adecuada para tomar decisiones de tratamiento.

Desde 2008 se demostró que, dentro del diagnóstico del carcinoma de célula no pequeña, la separación entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso, determinaría la quimioterapia adecuada para el estadio IV.

Actualmente hay subconjuntos definidos de carcinoma de pulmón de célula no pequeña, con diferentes pronósticos, en los que la terapia dirigida se ha convertido en terapia estándar, dando lugar a respuestas mejores en comparación con la quimioterapia habitual (142).

Con las nuevas tecnologías y los mayores conocimientos en la biología molecular tumoral, la caracterización molecular se ha convertido en una herramienta obligatoria previa al tratamiento de este tipo de carcinoma pulmonar. El estudio de las mutaciones EGFR, BRAF y MET, así como la detección de las translocaciones ALK, ROS1, RET y NTRK, forman parte de los estándares de diagnóstico del carcinoma pulmonar de célula no pequeña, ya que los inhibidores de estas cinasas son de uso clínico rutinario (143).

Además del examen genético, estos tumores suelen someterse al análisis de la expresión de la proteína PD-L1 para orientar el uso de los inhibidores del punto de control inmunitario (143).

A esto se añaden los biomarcadores emergentes, como la alteración de KRAS y las mutaciones activadoras de HER2, que probablemente entrarán en las pautas del cáncer de pulmón de célula no pequeña tras la aprobación de los fármacos correspondientes (143).

4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR.

SECUENCIACIÓN

4.1. SECUENCIACIÓN. DEFINICIÓN Y GENERALIDADES

Secuenciar consiste en determinar el orden exacto, o secuencia exacta, de nucleótidos (Adenina, Timina, Citosina y Guanina) de un fragmento de ácido nucleico.

Hace años, secuenciar el genoma humano podía parecer ciencia ficción, en cambio hoy forma parte de la actividad asistencial. En algunos escenarios clínicos, la secuenciación del ADN tumoral ya es una prueba complementaria para el diagnóstico del cáncer, la valoración de su pronóstico y la selección del tratamiento.

Desde el descubrimiento de la estructura del ADN en 1953 y la toma de conciencia de que el código genético es el mapa del funcionamiento del ser vivo, ha existido la necesidad de secuenciar el ADN, para reconocer los genes responsables de rasgos y patologías humanas. No obstante, no fue hasta los años 70, cuando se desarrolló la primera generación de técnicas de secuenciación (144).

4.2. SECUENCIACIÓN SANGER

La secuenciación de primera generación, Sanger o método por terminación de cadena, fue desarrollada en 1977 y consiste en sintetizar copias del fragmento problema de ADN, a partir de cadenas simples del mismo, combinándolo con ADN-Polimerasa, cebadores, los cuatro deoxinucleótidos que componen la secuencia de ADN (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), y cuatro terminadores de cadena, que son versiones dideoxi de los cuatro nucleótidos (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), marcados cada uno con un fluoróforo distinto dependiendo de la base que lleve. La adición de uno de estos por la ADN-Polimerasa supone la interrupción de la síntesis de la nueva hebra. Esto conduce a la obtención de fragmentos de diferentes tamaños, que permiten la utilización de la electroforesis capilar en gel, que separa las secuencias en función del tamaño, al mismo tiempo que detecta el color del dideoxinucleótido que permite asignar el nombre a la base correspondiente y el orden de las emisiones de la fluorescencia revela la secuencia de ADN (145).

4.3. EVOLUCIÓN DE LA SECUENCIACIÓN

Iniciado en 1990, el Proyecto Genoma Humano, estaba destinado a leer el genoma completo de una persona, mediante la secuenciación de su ADN con el método Sanger. Se convirtió en uno de los mayores retos científicos y tecnológicos del momento y proporcionó las primeras pistas sobre el

potencial que podía tener conocer el genoma en el campo de la medicina. Secuenciar los tres mil millones de pares de bases del genoma humano llevó más de una década y costó miles de millones de dólares. A él le han seguido varios proyectos genómicos como el Proyecto 1000 Genomas (*1000 Genomes Project*) y el Atlas del Genoma del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas -TCGA*) (146).

El Proyecto Genoma Humano catalizó el desarrollo de numerosas tecnologías genómicas cruciales y dio lugar a importantes innovaciones en biología molecular, química, física, robótica y computación, así como a estrategias para utilizar las herramientas y los métodos de forma innovadora (146).

Al final del Proyecto Genoma Humano, en 2001-2002, la secuenciación Sanger, hoy conocida como “secuenciación de primera generación”, había alcanzado el máximo de su eficiencia, un umbral técnico y teórico. Llevar a cabo la secuenciación genómica de forma rutinaria, rápida y asequible, no era realista. Se necesitaba un salto en la tecnología de secuenciación. Con este objetivo, los avances tecnológicos condujeron al desarrollo y nacimiento en 2007 de una nueva era de métodos, conocidos como secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing - NGS*) (144). Se puede

emplear el término Secuenciación Masiva en Paralelo por su descripción inglesa *Massive Parallel sequencing*- MPS, pero la expresión que más se utiliza es *Next Generation Sequencing* o NGS (147).

4.4. COMPARATIVA SANGER VS. NGS

NGS ha revolucionado la investigación genómica de tal modo que permite secuenciar un genoma humano completo en tres días, a un menor coste. Esto es porque, mientras Sanger es capaz de sintetizar sólo un gen por reacción, NGS es una técnica de secuenciación masiva, capaz de realizar entre millones y miles de millones de reacciones de secuenciación individuales, al mismo tiempo. Por tanto, en comparación con Sanger, NGS ha reducido el tiempo y el coste de la secuenciación, y ha aumentado la producción de secuencias, es decir, es más eficiente (144).

Es cierto que Sanger aporta secuencias de alta calidad para segmentos relativamente largos de ADN (900 pb aproximadamente), pero es lenta y costosa. Por ello se suele limitar a un número relativamente reducido de muestras y a un pequeño número de genes candidatos (148). En cambio, NGS puede secuenciar regiones más amplias del genoma y de forma más exhaustiva, dando además la opción de múltiples enfoques

(secuenciación dirigida al genoma, al exoma o a genes específicos) (144).

Mientras Sanger depende del conocimiento previo del gen o zona a investigar, NGS no necesariamente tiene que ser selectiva. Tiene la opción de interrogar todo el genoma o exoma completo, y así descubrir mutaciones nuevas; siendo así un recurso útil para proyectos de investigación. Además, esta secuenciación masiva capta un espectro más amplio de mutaciones, ya que permite valorar variantes de nucleótido único, variaciones en el número de copias e inestabilidad de microsatélites, mientras que Sanger se limita a descubrir variantes de nucleótido único y pequeñas inserciones y delecciones (indels), obligando a la realización de otras técnicas, como FISH (hibridación *in situ* fluorescente /*fluorescence in situ hybridization*), para evaluar otro tipo de alteraciones. NGS permite obviar la realización de esas otras técnicas porque recoge un amplio espectro de variación genómica en un solo experimento (148).

En cualquier caso, la tecnología de secuenciación Sanger sigue siendo muy útil para aplicaciones en las que no se requiere un alto rendimiento (145). Por ejemplo, aunque su enfoque limitado es costoso e ineficiente para la secuenciación genómica a gran escala, sigue siendo el medio más aceptado en

caso de que se requiera validar las variantes identificadas por las metodologías de NGS, en particular para los hallazgos clínicamente notificables (144).

Un inconveniente común a ambas tecnologías es que ninguna de las dos resuelve de forma fiable la detección de homopolímeros (144).

Por otro lado, en cuanto a los principales inconvenientes de NGS a tener en cuenta en el ámbito clínico, es la necesidad de infraestructura, de la capacidad informática y el almacenamiento de datos (*bigdata*), la experiencia del personal para analizar e interpretar exhaustivamente los datos obtenidos y la rentabilidad, porque hay que hacer un elevado número de muestras al mismo tiempo (148).

4.5. NEXT GENERATION SEQUENCING - NGS

4.5.1. GENERALIDADES

NGS abarca una diversa colección de tecnologías de alto rendimiento, también llamadas “de segunda generación”, aplicables a cualquier ácido nucleico. En este caso nos centraremos en el ADN (144).

Esta nueva secuenciación permite detectar diferentes tipos de mutaciones o variantes:

- Variantes de nucleótido único respecto al genoma de referencia (*single nucleotide variants* o ***SNV***).
- Pequeñas inserciones o delecciones (llamadas ***indels***).
- Variantes **estructurales**:
 - ▽ Con ganancia o pérdida de material genético:
 - ⇒ Variación en el número de copias (*copy number variation* o ***CNV***), que pueden ser:
 - Variaciones cortas: de binucleótidos, de trinucleótidos... (ej. El triplete CAG se repite más de 36 veces en el gen huntingtina, y ocurre en la Enfermedad de Huntington).
 - Variaciones largas: amplificaciones, ganancias o pérdidas de genes enteros o cromosomas completos (ej. Amplificación del gen FGFR1, ganancia del cromosoma 5...).
 - ⇒ Otras: grandes delecciones, duplicaciones, etc.
 - ▽ Sin ganancia o pérdida de material genético:
 - ⇒ Translocaciones, inversiones y cualquier tipo de reordenamiento.

A nivel de ADN, su versatilidad ofrece el estudio del genoma completo o del exoma o de genes determinados mediante un

panel. La elección dependerá del diseño del estudio que se vaya a realizar.

Secuenciación del genoma completo (*Whole Genome Sequencing - WGS*):

La secuenciación WGS abarca el genoma completo de un individuo, incluyendo las regiones codificantes y no codificantes. Esto ha permitido secuenciar miles de millones de pares de bases y ha aportado numerosas asociaciones entre variantes y patologías, tanto enfermedades de herencia mendeliana, como enfermedades mitocondriales o neoplasias. Pero en esta técnica la cobertura de todas las secuencias es similar, por lo que la profundidad de lectura es escasa, no permitiendo detectar variantes a baja frecuencia. En la actualidad, esta estrategia se utiliza principalmente en el ámbito de la investigación ya que es poco coste-efectiva. Resulta en una gran cantidad de información, difícil de analizar y almacenar, y aporta un elevado número de variantes de significado incierto (149).

Secuenciación del exoma (*Whole Exome Sequencing - WES*):

Es un tipo de secuenciación dirigida a obtener la información genómica de los exones, es decir, las regiones codificantes del

genoma, que corresponden aproximadamente al 1-2% del mismo.

Cubre la gran mayoría de las variantes que causan enfermedades hereditarias, principalmente monogénicas. Por lo que es útil cuando se desconoce la causa de la enfermedad del paciente en estudio o se han descartado los genes clásicos asociados con la enfermedad. También se puede emplear para el estudio de desórdenes complejos en los que existe un gran número de genes implicados, o para llevar a cabo un diagnóstico diferencial en enfermedades cuya clínica es solapante.

Que algunos estudios hayan empleado esta técnica, ha permitido descubrir mutaciones recurrentes en neoplasias, y ha contribuido a la detección de mutaciones conductoras (*drivers*), así como al desarrollo de terapias dirigidas y al diseño de paneles según patologías.

Según su aplicación en la investigación o en el ámbito clínico, se puede optar por el estudio del exoma completo (aproximadamente 20.000 genes) o bien el estudio de un exoma dirigido (una selección concreta de genes), respectivamente.

Aunque el “exoma clínico” estudia la región codificante de unos 5000 genes con relevancia clínica, en el ámbito asistencial sigue siendo una estrategia poco coste-efectiva (149).

Secuenciación con paneles de genes:

Es el tipo de secuenciación dirigida más utilizado en el ámbito asistencial en la actualidad. Permite el estudio de un número concreto de genes o regiones genéticas importantes, asociados a la patología de interés.

En el estudio de enfermedades hereditarias se utiliza cuando las patologías son relativamente frecuentes y cuyo fenotipo puede estar explicado por variantes de secuencia en un número limitado de regiones genómicas.

La búsqueda de mutaciones somáticas en el estudio de neoplasias, suele ser más complejo que la patología germinal, porque en el tejido tumoral coexisten células tumorales y normales. A su vez, dichas células tumorales pueden contar con aneuploidías, coexistencia de mutaciones *driver* y *passenger*, distintas subclonas tumorales con alteraciones diferentes, etc.

Uno de los puntos fuertes de esta estrategia en el estudio de tumores, es que, al ser un estudio acotado, permite una profundidad de secuenciación elevada, pudiendo reconocer variantes somáticas a baja frecuencia, a la vez que agiliza el estudio bioinformático y la posterior interpretación de resultados. Además, evita detectar genes o variantes no relacionadas con la patología de estudio que generen gran

complejidad de análisis debido a la dificultad de su interpretación.

Para llevar a cabo esta técnica, se emplean cebadores o sondas dirigidos a las secuencias problema, reduciendo así la cantidad de material a evaluar, facilitando el diagnóstico rápido y dirigido de la patología. Sin embargo, no permite descubrir nuevos genes potencialmente implicados en la enfermedad (149).

Hay dos tipos de paneles, los que se diseñan en función de las necesidades del estudio o muestra problema (paneles *custom*). Y los paneles comerciales basados en distintas estrategias de enriquecimiento. Estos últimos tienen la ventaja de que su diseño está muy optimizado por lo que permiten la secuenciación de los genes de interés con una gran cobertura y profundidad de lectura; en cambio puede que no incluya las regiones relevantes para el estudio en cuestión.

4.5.2. FLUJO DE TRABAJO DE NGS

El flujo de trabajo de NGS sigue en gran medida tres pasos generales empezando por la preparación de la muestra, la secuenciación del ácido nucleico y finalmente el análisis de los datos (144).

En este estudio nos centramos en la secuenciación de ADN.

Extracción de ADN y cuantificación del material obtenido:

De la muestra problema se extrae el ADN mediante métodos manuales o automáticos, y se caracteriza la cantidad, la calidad y la estabilidad del mismo.

Generación de librerías y enriquecimiento de las mismas:

- ▽ **Generar la librería (traducción errónea de la palabra en inglés “library”):**

El ADN genómico extraído de la muestra problema se debe fragmentar en trozos pequeños apropiados para el secuenciador.

El tamaño de los fragmentos puede variar en función de la plataforma utilizada, pero habitualmente rondan las 150-400 pares de bases (pb). Y la fragmentación se puede llevar a cabo con métodos mecánicos (sonicación), químicos (temperatura y pH) o enzimáticos (tagmentación). Para muestras FFPE el proceso recomendable es la sonicación, ya que el ADN de muestras parafinadas ya está algo fragmentado o deteriorado por el proceso de fijación en formol y la inclusión en parafina, y no suele contar con más de 200 pb.

Los fragmentos quedan con extremos anfractuosos que hay que reparar. Una vez reparados, se añade **adaptadores**

compatibles con la plataforma de secuenciación que vaya a emplearse. Su función es doble, porque permiten el anclaje de los fragmentos al soporte sólido del secuenciador, y además cuentan con una zona complementaria al cebador o *primer* que se usará para la secuenciación del fragmento (150). También se añade **índices** (*index* o *barcodes*) específicos de cada muestra. Son secuencias nucleotídicas que actúan a modo de “etiqueta” o “código de barras”. Cada índice es secuenciado tras cada fragmento y asociado informáticamente al mismo, de forma que, al terminar la secuenciación, se pueden agrupar las moléculas que tengan el mismo índice. Aumenta la eficiencia de la secuenciación porque ayuda a identificar a qué muestra o paciente pertenecen esos fragmentos. Existe la opción de marcar cada fragmento original de ADN, además, con un índice único (*molecular barcode* o *unique molecular index -UMI-*). La presencia de estos **UMIs** permite identificar y eliminar durante el análisis, los duplicados generados en la preparación de las librerías, aumentando la sensibilidad del proceso (151).

Finalmente, se consigue una librería o genoteca, constituida por una colección de fragmentos de ADN genómico de la muestra problema (150).

▽ Enriquecimiento

En la secuenciación selectiva, no interesa secuenciar la totalidad de los fragmentos de ADN, por lo que es esencial emplear estrategias de enriquecimiento (marcaje o selección), para que la secuenciación se enfoque en áreas específicas del genoma de la muestra (145).

Los dos métodos de enriquecimiento más prevalentes son:

POR CAPTURA:

Partiendo de la biblioteca de secuencias estándar anteriormente descrita, este método consiste en agregar **sondas** específicas que se unen a las regiones de interés. Las sondas tienen una molécula (biotina) unida con la que capturan las áreas de interés de la muestra problema. Tras hacer lavados, la librería quedará con lo que se ha capturado.

POR AMPLIFICACIÓN CON PCR (AMPLICONES):

En este caso no se parte de la librería sino del ADN genómico de la muestra. Se emplean cebadores (*primers*) que ayudarán a **amplificar** únicamente las regiones de interés, por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) multiplex. Para terminar la librería, se debe añadir los adaptadores, para obtener una molécula secuenciable con la tecnología en cuestión (150).

Secuenciación:

En cuanto a las plataformas de secuenciación, las más empleadas actualmente son Illumina e Ion Torrent:

▽ ILLUMINA:

La librería es cargada en una superficie de celdas de flujo.

Cada inserto de la librería es amplificado clonalmente mediante PCR en puente, para generar clones o *clusters* unidos a un soporte sólido (*bead*), produciendo de millones a miles de millones de grupos de fragmentos de ADN que pueden secuenciarse simultáneamente.

Finalmente se realizan múltiples ciclos de secuenciación por síntesis. Se van haciendo ciclos de adición de nucleótidos marcados con fluorocromos diferentes. La fluorescencia representativa se registra mediante imágenes ópticas de alta resolución. Cada uno de estos nucleótidos incorpora un grupo terminador (en el extremo 3') marcado con fluorescencia; así la incorporación del siguiente nucleótido a la cadena no se efectúa hasta que el terminador haya sido retirado tras la lectura de la señal fluorescente. De este modo, la secuencia en formación sólo puede añadir un nucleótido por ciclo y se elimina el error de homopolímero. Este bloqueo es reversible porque entre ciclo y ciclo se añade un reactivo que desbloquea el extremo 3' para que se pueda seguir con la lectura (145). La secuenciación se realiza en ambos sentidos (*forward* y *reverse*), desde sendos adaptadores, es decir, desde 3' → 5' y 5' → 3', obteniendo lecturas de extremos pareados (*paired-end*

reads). Este tipo de lecturas facilita el alineamiento contra el genoma de referencia, porque permite estimar el tamaño del fragmento original y situarlo con más precisión en el genoma, mejorando así la cobertura de las zonas de interés (144).

▽ ION TORRENT:

La librería se hibrida a unas nanoesferas o perlas, de modo que a cada perla queda unida una secuencia, sobre la que se realizará amplificación en emulsión hasta cubrir a la perla. Esta tecnología se realiza sobre un chip semiconductor a través del cual fluirá cada perla hasta depositarse en uno de sus pocillos, debajo del cual hay un sensor de pH que transforma a éste en voltaje.

Para realizar la secuenciación, el chip se inunda con uno de los 4 nucleótidos, y si la polimerasa lo incorpora a algún pocillo, un ion de hidrógeno será liberado, cambiando el pH del medio. Los pocillos capturan esa información química y la traducen en información digital. Entre cada ciclo se realiza un lavado, para continuar haciendo ciclos de secuenciación (145,150).

La parte negativa de este proceso es que, con la adición de un solo nucleótido, si hay 8 iguales seguidos, el secuenciador no diferencia bien si son 6, 7 u 8. Esto se llama alto error de homopolímero (144)

Varios estudios han comparado el rendimiento de ambos sistemas, y han concluido que ambos secuenciadores, Illumina e Ion Torrent, producen resultados comparables (152).

Análisis bioinformático:

La generación de datos tras la secuenciación con NGS procede de cuatro fuentes principales (153):

- **Llamada de bases:** identificación del nucleótido específico presente en cada posición de una sola lectura de secuenciación. Esto suele estar integrado en el *software* del secuenciador que, partiendo de las lecturas crudas, de forma automática genera un archivo FASTQ por cada lectura. Este archivo contiene la secuencia de cada una de ellas, y el valor de calidad para cada nucleótido (*Phred score*).
- **Alineación de lecturas:** posicionar correctamente las lecturas que ha realizado el secuenciador, en relación con la secuencia de referencia, previa eliminación de las lecturas de baja calidad (Figura 7). Este mapeado o alineamiento da como resultado un archivo SAM (*Sequence Alignment/Map*) con información de la posición exacta para cada una de las lecturas en el genoma referencia. Antes de llevar a cabo ningún

proceso sobre el fichero de mapeo, el archivo SAM se comprime en forma binaria (BAM, *Binary Alignment/Map*). Este archivo BAM contiene la secuencia y mapeo/alineamiento de cada una de las lecturas.

- **Llamada de variantes:** identificación de las diferencias de secuencia entre la muestra y la secuencia de referencia. Aporta un archivo VCF (*Variant Call Format*), que contiene todas las diferencias de la muestra problema con el genoma de referencia, sin que esto signifique patogenicidad. También incluye información sobre el genoma de referencia, coordenadas cromosómicas de las variantes, tipo de cambio de secuencia y valores de calidad de la llamada de las variantes.
- **Anotación de variantes:** asocia la variante con información contextual relevante. Utiliza bases de datos, y puede incluir información genómica, información funcional, frecuencia poblacional, predicciones bioinformáticas de patogenicidad, información fenotípica o clínica vinculada a la variante, etc. Debe realizarse en función de los requerimientos de cada estudio o proyecto, y teniendo en cuenta la

cobertura y profundidad con la que se han obtenido las variantes.



Figura 7: Las lecturas que ha realizado el secuenciador se posicionan en relación con la secuencia de referencia Fuente: Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant - Calling Dale Muzzey, Eric A. Evans, Caroline Lieber. (*Depth*: profundidad; *SNP*: *single-nucleotide polymorphism*; *INDEL*: pequeña inserción o delección) (154).

▽ COBERTURA:

La cobertura es la cantidad de información genómica que representan las lecturas que se han obtenido en el ensayo, en función de una referencia. Coloquialmente es la superficie de ADN que se ha valorado (Figura 8). Es un término que suele expresarse como porcentaje de lecturas mapeadas contra la referencia. Cuanto mayor es el porcentaje, mejor está representado el objetivo del ensayo.

Hay un porcentaje de lecturas que realiza el secuenciador que quedan fuera de nuestro objetivo y, por tanto, aunque sea ADN que se ha secuenciado, no es informativo para el ensayo o trabajo. Reciben el nombre de “lecturas fuera de diana” (*off-target*).

▽ PROFUNDIDAD:

La profundidad o cobertura vertical hace referencia al número de veces que una base nitrogenada del ADN de la muestra es leída durante el proceso de secuenciación. Se expresa en x, por ejemplo, 70x hace referencia a que el nucleótido en cuestión ha sido leído o encontrado 70 veces (Figura 8). Determina la confianza con la que se llama a una base. Esto también determina si las variantes detectadas pueden considerarse real o un error. Por ejemplo, una variante de un solo nucleótido (SNV) en el genoma nuclear debe aparecer en más de 10 lecturas únicas, es decir, la profundidad de lectura debe ser como mínimo de 10x para proporcionar la suficiente confianza de que es una variante genómica genuina y no un error técnico del proceso de secuenciación. Este parámetro específico de la plataforma de secuenciación define el tipo de variantes genéticas que pueden identificarse y la confianza con la que pueden determinarse (144).

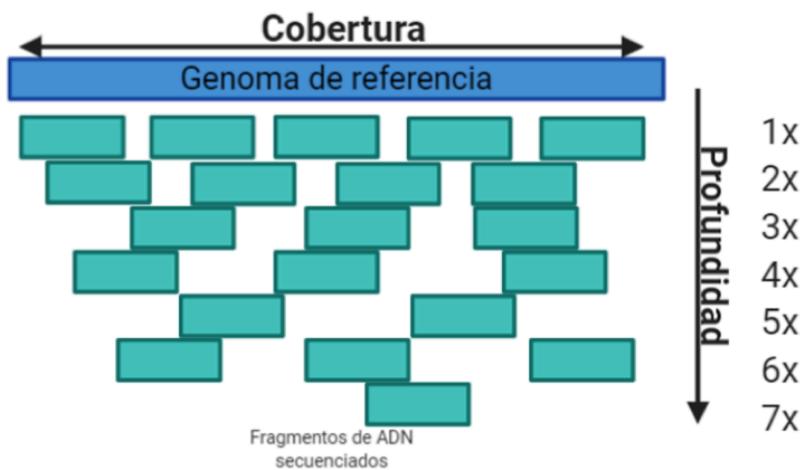


Figura 8: Explicación gráfica de la cobertura y la profundidad de lectura.

Fuente: Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. Santiago Rubio et al. (155).

4.5.3. INTERPRETACIÓN DE LAS VARIANTES OBTENIDAS CON NGS

La interpretación clínica de las variantes de la secuencia de ADN es un paso clave en la valoración de los resultados de la secuenciación. Las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica, y la Asociación de Patología Molecular (ACMG/AMP) han sido ampliamente adoptadas por los laboratorios clínicos de todo el mundo para guiar la interpretación clínica de las variantes de secuencia de una manera estandarizada y común. A pesar de estos esfuerzos por estandarizar la interpretación de variantes en la práctica clínica, los diferentes laboratorios pueden utilizar subjetivamente el

juicio profesional para determinar qué criterios son aplicables al clasificar una variante (153,156).

Dichas recomendaciones o guías del ACMG/AMP definieron un marco de cinco niveles para clasificar las variantes como "patógenas", "probablemente patógenas", "de importancia incierta", "probablemente benignas" o "benignas" de acuerdo con los criterios que abordan los niveles de evidencia de patogenicidad (156).

Desde que el ACMG hizo su publicación por primera vez en 2013, se ha ido revisando y evolucionando, y es que la validación clínica y el uso de la NGS en muchos contextos están establecidos, pero existen desafíos continuos a medida que las tecnologías y la informática asociada evolucionan.

En 2015 publicaron recomendaciones actualizadas para las normas y directrices en la interpretación de variantes de secuencia, y en 2021 han publicado otra revisión, en la que ha desarrollado normas técnicas para la validación de los métodos y plataformas de NGS, la supervisión continua de las pruebas de NGS para garantizar la calidad de los resultados, y la interpretación y notificación de las variantes encontradas mediante estas tecnologías (153).

5. APLICACIÓN CLÍNICA

El impacto clínico del estudio genómico del cáncer ya ha sido reconocido gracias a la identificación y uso de biomarcadores moleculares de diagnóstico, pronóstico y aquellos que se emplean como diana terapéutica.

Los biomarcadores son la piedra angular de la medicina de precisión (131).

La definición de biomarcador ha evolucionado durante la última década, con una descripción especialmente amplia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que sugiere que "un biomarcador es cualquier sustancia, estructura o proceso que se puede medir en el cuerpo, o en sus productos, e influyen o predicen la incidencia de resultados o enfermedades " (157).

Estas sustancias se conocen desde hace décadas, como por ejemplo el antígeno específico de la próstata (PSA), y se emplean para intentar prever el pronóstico y orientar las decisiones terapéuticas. Otro ejemplo estandarizado y extendido lo encontramos en el carcinoma de mama, donde la sobreexpresión de HER2, el estado de los receptores hormonales y el grado tumoral histológico, son biomarcadores imprescindibles para establecer el estadio y tratamiento adecuados (131). Hoy, la revolución de la biología molecular, con el auge de la secuenciación de alto rendimiento, está impulsando el descubrimiento y desarrollo de nuevos biomarcadores, en este caso moleculares. Estos deben

interrogar a las principales vías aberrantes del cáncer, potencialmente vulnerables o accionables con terapias moleculares dirigidas (131).

La guía clínica del año 2021 de la SEOM-GETTHI (Sociedad Española de Oncología Médica – Grupo Español de Oncología Transversal y Tumores Huérfanos e Infrecuentes) publicó los biomarcadores más relevantes y útiles en la práctica clínica, teniendo en cuenta las recomendaciones que han sido publicadas por las sociedades científicas (158). Han tenido en cuenta la escala ESTAT (ESMO scale for clinical actionability of molecular target), una escala de acciónabilidad clínica de dianas moleculares en cáncer definida por la ESMO en el año 2018 (Figura 9) (158).

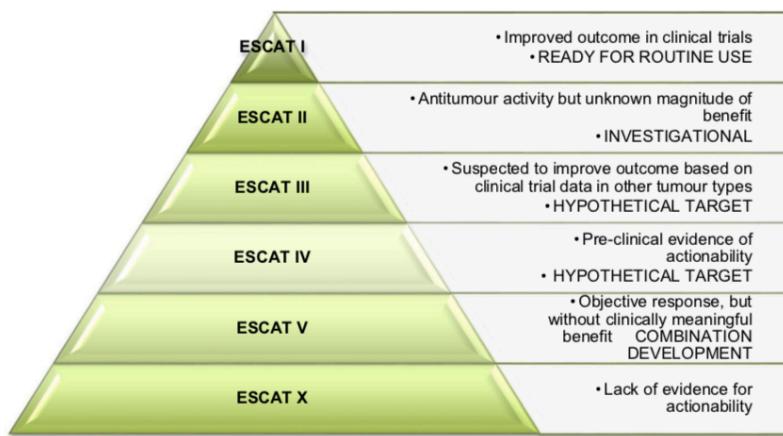


Figura 9: ESMO scale for clinical actionability of molecular target (ESTAT).
Fuente: SEOM-GETTHI clinical guideline for the practical management of molecular platforms (2021); Juan de la Haba-Rodriguez et al. (158).

En la tabla 1 se resumen los biomarcadores moleculares más relevantes en la práctica clínica para las terapias de precisión en el cáncer, separados por tipo de tumor. Delante de cada biomarcador aparece el porcentaje en el que se encuentran en ese tipo, según la literatura. En cuanto a la ESCAT, se han propuesto unos niveles en relación con las directrices del tipo de tumor específico de la SEOM, ya que no se disponía de la ESCAT específica.

	ESCAT I	ESCAT II	ESCAT III
NSCLC	EGFR 15% del 19, L858R 60% EGFR mutant: acquired T790M exon 20 2-10% uncommon EGFR mutations (exon 18,20,21) 5% ALK 3% MET ex skipping 2% BRAF ^{V600E} 1-2% ROS1 0.2-3% NTRK fusions 1-2% RET fusions	3% MET focal amplifications 12% KRAS ^{G12C} 2-5% ERBB2	1.2% BRCA 1/2 1.2-7% PI3K 1.7% NRG1
CRC	44% KRAS 4% NRAS 8.5% BRAF ^{V600E} 4-5% MSI-H 0.5% NKTR1	2% ERBB2	17% PI3K hotspot mutations 5% ATM mutations 1.7% MET amplifications 1% AKT1 ^{E17K} 1% TMB-High in MSS 0.3% RET fusions 0.2% ALK fusions
BREAST CANCER	15-20% ERBB2 amplification ER, PR 30-40% PI3K 1% MSI-H 1% NTRK fusions 4% BRCA 1/2 germline mutation androgen receptor and PDL-1 (Triple negative BC)	4% ERBB2 hotspot mutation 3% BRCA 1/2 somatic mutation 10% ESR1(mutation mechanism resistance) 7% PTEN 5% AKT1 ^{E17K}	6% NF1?? 1% MDM2 2% ERBB3
PROSTATE CANCER	9% BRCA1/2 somatic mutations/ deletions 1% MSI-H	40% PTEN 5% ATM 1% PALB2	3% PI3K 1% AKT1 ^{E17K}

ENDOMETRIAL CANCER*	2-5% MSI-H, PMS2	ESR1	POLE-aberrant BRAF KRAS PIK3CA PTEN?
OVARIAN*	BRCA 1/2 germline, somatic		ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2, RAD51C, RAD 51B
CHOLANGIOPANCREATIC CANCER	20% IDH1 mutations 15% FGFR2 mutations 2% MSI-H 2% NKTR fusions	5% BRAF ^{V600E} mutations	10% ERBB Amplifications 2% ERBB2 mutations 7% PI3CA hotspot mutations 3% BRCA1/2 mutations 2% MET amplifications
CENTRAL NERVOUS SYSTEM*			1p19q co-deletions IDH1, IDH2 MGMT
SARCOMAS*			MDM2, CDK4 IDH1/IDH2
GIST	KIT, PDGFRA		
PANCREATIC CANCER	1-4% BRCA1/2 germline mutation 1-3% MSI -H <1% NTRK		3% BRCA 1/2 somatic mutations 90% KRAS mutations 3% PI3CA 3% BRAF ^{V600E} 2% MDM2 amplifications 1-2% ERBB2 amplifications/ mutations 1% NRG1 fusions <1% ALK fusions <1% RET fusions <1% ROS1 fusions
GASTROESOPHAGEAL ADENO-CARCINOMA	16% ERBB2 amplifications 8% MSI-H 2% NTRK fusions	6% EGFR amplifications 3% MET amplifications	3% ERBB2 hotspots mutations 1.3% MET Mutations 7% PI3KCA hotspot mutations 4% FGFR2 amplifications 3% ATM mutations 1-5% BRCA 1/2 mutations <1% ROS 1 fusions <1% RET fusions 3% ERBB3 hotspot mutations
MELANOMAS	50% BRAF ^{V600E}		KIT
HEPATOCELLULAR CARCINOMA	1% NTRK fusions 1% MSI- H		4% PI3CA hotspot mutations 4% MET amplifications 2% RAS mutations

Tabla 1: Resumen de los biomarcadores moleculares más relevantes en la práctica clínica. Fuente: *SEOM-GETTHI clinical guideline for the practical management of molecular platforms (2021); Juan de la Haba-Rodríguez et al. (158)*.

Los biomarcadores pueden ser divididos, teniendo en cuenta su utilidad clínica:

- **Biomarcador diagnóstico:**

Identifica si un paciente tiene un cáncer específico. Por ejemplo, la translocación cromosómica EWS/FLI1 confirma el diagnóstico de sarcoma de Ewing.

- **Biomarcador pronóstico:**

Es una característica clínica o biológica asociada a un resultado probable a largo plazo o el curso de la enfermedad, independientemente del tratamiento (159).

En el cáncer de mama, los marcadores de pronóstico de uso común son el tamaño del tumor, el estado ganglionar, el grado y la presencia o ausencia de invasión linfovascular (83). Pero también se utilizan diversas firmas basadas en genes, para obtener información pronóstica, en los estadios tempranos, como es la firma *MammaPrint*® con 70 genes. Está adaptada a muestras FFPE, para predecir la recurrencia del cáncer de mama después de la quimioterapia. Su utilidad clínica para identificar pacientes con cáncer de mama temprano a las que se les podría evitar la administración de quimioterapia, fue confirmada por el *MINDACT-trial* (131,160). Existen otros test similares, como el *Oncotype Dx® Breast Cancer Assay*. Éste evalúa 21 genes que predicen la recurrencia del cáncer de mama en mujeres con enfermedad invasiva con ganglios negativos, que tienen RE positivos y son negativos para HER2; y

se puede emplear también en pacientes postmenopáusicas con afectación ganglionar (131,158).

Otro ejemplo del desarrollo creciente de biomarcadores pronóstico se encuentra en la patología digestiva. Para el cáncer colorrectal (CCR) en estadio II el uso de la quimioterapia adyuvante es controvertido, por lo que también se han desarrollado firmas multigénicas para identificar a los pacientes con mayor riesgo de recurrencia, y que por tanto pueden beneficiarse de la quimioterapia adyuvante. Actualmente el test de cáncer de colon *Oncotype Dx® Colon Recurrence Score* y *GeneFx® Colon* han sido validados en el CCR en estos casos. También *Immunoscore®* ha sido validado en pacientes con CCR en estadio I-III y podría considerarse para establecer el pronóstico de los pacientes junto con la puntuación TNM y así apoyar el proceso de toma de decisiones de quimioterapia en el estadio II e incluso en pacientes de bajo riesgo en el estadio III (158).

- **Biomarcador predictivo:**

Aporta información sobre la probabilidad de respuesta a una terapia concreta. Por ello, estos biomarcadores guían la toma de decisiones terapéuticas. (159). Por ejemplo, la sobreexpresión o amplificación de HER2, predice la respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales como Trastuzumab,

en el cáncer de mama y en el esofagogástrico (83). En el cáncer colorrectal, la mutación activadora de KRAS, predice la resistencia al tratamiento con inhibidores de EGFR, como el Cetuximab (131). Otro ejemplo es el cáncer de pulmón de célula no-pequeña, donde las mutaciones en los exones 19 o 21 de EGFR permiten ofrecer terapia dirigida contra EGFR; así como la fusión EML4-ALK permite el uso de terapia anti-ALK; ambas, terapias más eficaces que la quimioterapia citotóxica. Estos biomarcadores se emplean de forma rutinaria, por el beneficio que conllevan, ya que, por ejemplo, el 15-20% de cáncer de pulmón de célula no pequeña presenta mutaciones en EGFR, y el 3-5% la translocación de ALK (83).

Por otro lado, existen plataformas moleculares aprobadas para predecir la respuesta a la terapia dirigida. Una de las plataformas es *Test Oncomine Dx Target*, útil en el cáncer de pulmón de célula no pequeña no-escamoso. Detecta 46 variantes de genes *driver* de este cáncer como EGFR, BRAF, ALK y ROS1, entre otros que ya han sido detallados en el apartado “2.3.2. ONCOGENES”.

Otro ejemplo actual lo aporta el cáncer colorrectal con *Praxis Extended RAS Panel*, que emplea NGS en estadios IV para evaluar 56 mutaciones KRAS/NRAS y así determinar la

elegibilidad del paciente para el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR.

La evaluación del sistema MMR y la inestabilidad de microsatélites (MSI) está aprobada para todos los estadios. Por ejemplo, los pacientes en estadio II con MSI-H podrían tener un buen pronóstico y no se benefician del tratamiento adyuvante con 5-FU. Así mismo, se benefician del tratamiento anti PD-L1 en estadios avanzados (161).

Por otro lado, existen plataformas para la evaluación del estado de BRCA para predecir la respuesta a los inhibidores de PARP. Así, *BRACAnalysis CDx®* es una plataforma que detecta, en sangre periférica, el estado de la línea germinal de BRCA1 y BRCA2 en pacientes con tumores de ovario, próstata, páncreas y mama. Ayuda a identificar a los pacientes que son o pueden llegar a ser elegibles para el tratamiento con iPARP.

Otras plataformas son *Foundation-FocusTM CDxBRCA®* y *Myriad myChoice CDx®*. Mediante NGS realizan la detección cualitativa de alteraciones en BRCA1 y BRCA2 en tejido tumoral ovárico FFPE. *Myriad myChoice CDx®* además estudia otros genes que intervienen en la reparación del ADN por recombinación homóloga, en los carcinomas serosos de ovario, de trompas de Falopio y peritoneales de alto grado, etiquetando las muestras como “deficientes” o “competentes” en reparación por recombinación homóloga (162).

Resulta de gran ayuda porque la deficiencia está asociada a la sensibilidad al tratamiento con inhibidores de PARP. Esta plataforma también determina la puntuación de inestabilidad genómica (163) .

En otro orden de cosas, hay plataformas validadas para todo tipo de tumores sólidos. *FoundationOne CDx®* fue el primer complemento diagnóstico de base tisular aprobado por la FDA que está validado clínica y analíticamente para pacientes con carcinoma sólido (164). En el centro Memorial de Nueva York utilizan el *Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT)*, una plataforma NGS basada en la captura por hibridación para la secuenciación profunda dirigida de todos los exones e intrones seleccionados de 341 genes clave en tumores FFPE (133).

Por tanto, como se evidencia en la literatura, la reciente aparición de fármacos altamente selectivos que se dirigen a dianas moleculares y tecnologías de secuenciación genómica de alto rendimiento, pone en relieve la necesidad de tener más biomarcadores de cánceres sólidos bien validados. No sólo para el uso clínico, también para los ensayos. En 2020, ESMO estableció unas recomendaciones del uso de NGS en ámbito asistencial e investigador (165). Por otro lado, la FDA ha reconocido que el adecuado uso de los biomarcadores

desempeña un papel importante para minimizar el riesgo de fracaso de los ensayos clínicos, porque ayudan a enriquecer las poblaciones de los mismos con subtipos moleculares específicos que responden mejor a las terapias que se están probando (159,166).

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la práctica clínica habitual, se observa que algunos pacientes adultos desarrollan tumores sólidos cuya evolución no se adecúa al estadio tumoral o las características histológicas, siendo más agresiva de lo esperada a priori. Sin existir sospecha previa, recaen o progresan y ven su supervivencia libre de progresión y/o supervivencia global disminuidas.

Estos casos que *a priori*, no deberían haber tenido una tórpida evolución, son difíciles de comprender, sus características moleculares siguen siendo, en gran parte, desconocidas, por lo que su manejo resulta complejo, con limitadas opciones terapéuticas.

El panorama actual de efervescencia de la caracterización molecular de los tumores empleando la secuenciación masiva (NGS), se refleja en proyectos como TCGA, estudios como los del Centro Memorial de Nueva York, ensayos clínicos basados en biomarcadores y aprobaciones de tratamientos dirigidos a dianas moleculares muy concretas (132,133,167,168).

La **hipótesis** del presente estudio es que los tumores con un comportamiento más agresivo del esperado por sus características morfológicas poseen determinadas

características moleculares responsables de dicha evolución. El uso de la NGS permite la caracterización molecular de las mismas.

El **objetivo principal** de este estudio es **demostrar**, en un grupo de pacientes con carcinomas que han presentado una evolución clínica y supervivencia peor de las esperadas por sus características clínico-patológicas, las **alteraciones genéticas driver** que explican dicha evolución, mediante su caracterización molecular con secuenciación masiva (NGS).

Los **objetivos secundarios** son:

- Comprobar si dichos *drivers* se corresponden con biomarcadores pronóstico y/o predictivos ya descritos en la literatura.
- Evaluar si los *drivers* hallados son dianas moleculares sobre las que se pueda emplear fármacos existentes actualmente o que estén siendo estudiados en ensayos clínicos.
- Analizar si el conocimiento de dichas alteraciones *driver* podría haber ofrecido alternativas individuales en el manejo de cada paciente, con la influencia que ello suponga sobre el curso de la enfermedad.

- Observar si los casos seleccionados tienen *drivers* comunes que marquen una peor evolución, aunque la localización del origen tumoral sea diferente, permitiendo hacer de este tipo de pacientes un subgrupo pronóstico y/o predictivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS

Este es un estudio retrospectivo, descriptivo y multicéntrico, en el que fueron incluidos, de forma retrospectiva, los pacientes diagnosticados de carcinoma que habían mostrado, según criterio clínico y anatomopatológico, un comportamiento no esperado por su progresión temprana o recaída precoz, debido a resistencia o refractariedad al tratamiento, entre febrero de 2016 y agosto de 2019.

Tras contactar con los respectivos Servicios de Oncología que proporcionaron los datos de los casos incluibles, se realizó la búsqueda del material archivado en los Servicios de Anatomía Patológica, mediante el programa PAT-Win. Se identificó una serie de 24 casos, cinco de los cuales habían sido identificados con anterioridad por los clínicos como casos de evolución extremadamente tórpida, sin embargo, fueron excluidos finalmente por no cumplir los criterios de inclusión del estudio retrospectivo. De los 19 casos seleccionados de forma retrospectiva, once procedían del Hospital Universitario Doctor Peset ($n = 11$), siete del Hospital General de Castellón ($n = 7$) y uno del Hospital de Sagunto ($n = 1$); todos de la Comunidad Valenciana.

De todos los casos se obtuvieron las muestras parafinadas, las laminillas con los cortes histológicos y los informes patológicos completos, en los que estaba consignado el tipo de tumor, el grado histológico, y la clasificación del estadio patológico (pTNM) de la 8^a edición de la AJCC. Los oncólogos nos facilitaron las historias clínicas oncológicas del programa Orion, con los tratamientos recibidos, los estadios clínicos (cTNM) y las evoluciones de los pacientes.

En los tres centros se siguieron los mismos criterios de selección de pacientes y las mismas directrices clínicas. Finalmente, todos los casos se enviaron a la investigadora principal antes de incluirlos en el estudio. Se confirmaron los tipos histológicos, grados y estadiajes diagnosticados en origen, y se revisaron las historias clínicas oncológicas.

Para hacer la secuenciación genética, una vez confirmado que no se iba a comprometer posibles estudios futuros para el paciente, se obtuvo el consentimiento informado (CI) por escrito (ver anexo, página 324), de los pacientes. El CI se elaboró de acuerdo con las directrices recogidas en la Declaración de Derechos Humanos y Conferencia de Helsinki y los requisitos establecidos por la legislación valenciana y española en el ámbito de investigación biomédica, según la Ley

Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), hasta 2018, y posteriormente la Ley Orgánica 3/2018 de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Además, el proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Finalmente, el seguimiento se realizó hasta el fallecimiento de todos los pacientes.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes mayores de 18 años, de cualquier sexo, sin tener en cuenta si habían fallecido o no.
- Diagnóstico histológico de carcinoma.
- Progresión temprana o recaída precoz de la enfermedad, post-cirugía o debido a resistencia o refractariedad al tratamiento sistémico.
La precocidad se estableció clínicamente por los oncólogos responsables de los casos. Se apoyaron en que los pacientes tenían supervivencias libres de progresión menores a las publicadas en revisiones y artículos actuales, así como las guías clínicas de Oncología Médica y las guías de supervivencia de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (169).

La supervivencia libre de progresión se midió desde el inicio del tratamiento, ya fuese médico y/o quirúrgico, hasta la fecha de progresión, recaída, refractariedad o resistencia, en su caso.

- Existencia de cantidad suficiente de tejido útil para realizar la secuenciación genética en los bloques de parafina de las muestras. Se determinó como suficiente $\geq 6 \text{ mm}^2$ de muestra tumoral y lo mismo de no-tumoral.
- Pacientes con buen estado funcional, es decir, ECOG 0-1 al diagnóstico (La escala *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status* (ECOG-PS) es utilizada en oncología dada su correlación con la morbilidad del cáncer, la mortalidad y las complicaciones del tratamiento quimioterápico (ver tabla 2)) (170).
- Ausencia de proceso comórbido asociado que hubiera condicionado alguna modificación en el tratamiento comprometiendo la supervivencia.

GRADO	ESTADO FUNCIONAL ECOG
0	Totalmente activo; capaz de realizar todas las actividades anteriores a la enfermedad sin restricciones
1	Restringido en la actividad físicamente extenuante pero ambulatorio y capaz de realizar trabajos de naturaleza ligera o sedentaria, por ejemplo, trabajos domésticos ligeros, trabajos de oficina

2	Ambulatorio y capaz de realizar todos los cuidados personales, pero incapaz de llevar a cabo cualquier actividad laboral; se levanta más del 50% de las horas de vigilia
3	Capaz de un autocuidado limitado; confinado en la cama o en una silla más del 50% de las horas de vigilia
4	Completamente discapacitado; no puede realizar ningún autocuidado; totalmente confinado a la cama o a la silla
5	Muerte

Tabla 2: Definición de las puntuaciones del estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). Fuente: Comparing Physician and Nurse Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS) Ratings as Predictors of Clinical Outcomes in Patients with Cancer; Elad Neeman et al. ([170](#)).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Personas menores de 18 años.
- Diagnóstico histológico distinto de carcinoma.
- Variantes histológicas de carcinoma que supusieran mal pronóstico en sí mismas, como por ejemplo la variante sarcomatoide o anillo de sello.
- Pacientes que presentaban inmunodeficiencias o comorbilidades graves que pudieran provocar una gran aceleración de la historia natural del curso de su cáncer.
- Pacientes que no acudieron a su tratamiento programado.

- Cantidad de muestra insuficiente ($< 6 \text{ mm}^2$ tanto tumoral como no-tumoral) o no útil (tejido necrosado o autolisado).

TAMAÑO MUESTRAL

Dado que el estudio tenía como objetivo la descripción de las alteraciones moleculares detectadas mediante NGS en pacientes con evoluciones no esperadas por criterios clínicos o morfológicos, se consideró que el objeto era el instrumento y no la población. Por dicho motivo no pudo establecerse a priori un cálculo del tamaño muestral de pacientes.

Tras la búsqueda de casos archivados mediante el programa PAT-Win, se identificó una serie de 19 casos que cumplía los criterios de inclusión y no de exclusión. Once procedían del Hospital Universitario Doctor Peset (n = 11), siete del Hospital General de Castellón (n= 7) y uno del Hospital de Sagunto (n = 1); todos de la Comunidad Valenciana.

VARIABLES DE ESTUDIO

Variables principales:

- Supervivencia libre de progresión y supervivencia global

Variables secundarias:

- Los genes *driver* en los que se ha encontrado mutación.

- El panel de NGS con todo el listado de genes.
- El estadio tumoral: localizado (I-II), locorregional y/o metastásico (III-IV).
- Localización anatómica del tumor.
- Tipo histológico de tumor.
- Características morfológicas
- Edad
- Administración de tratamiento neoadyuvante o adyuvante.

2. SELECCIÓN DEL PANEL DE GENES

De los casos que cumplieron los criterios de inclusión, se remitió un bloque de parafina con tejido tumoral y otro con tejido no-tumoral, al Instituto de Medicina Genómica de Valencia, donde procedieron a la extracción del ADN, preparación de librerías, secuenciación, y análisis bioinformático.

Previamente se realizó una búsqueda de laboratorios de genómica que tuviesen un panel de genes con el que realizasen secuenciación NGS, y capacidad bioinformática para el posterior análisis de las variantes. El panel debía incluir genes

driver de los carcinomas de adulto cuyo valor pronóstico, predictivo y/o en el tratamiento, estuviese reconocido en la literatura. Además, debía tener una profundidad de lectura, cobertura, uniformidad (cómo de estable es la cobertura en todo el genoma), especificidad, sensibilidad y reproducibilidad, altas.

El instituto de medicina genómica de Valencia (IMEGEN) cuenta con Action OncoKitDX, un panel NGS que estudia los genes más relevantes en tumores sólidos de adultos, en base a las guías clínicas y la literatura científica del periodo de tiempo en que se realizó la recogida de casos. Muchos de los genes eran considerados accionables según la NCCN y la SEOM, o estaban relacionados con tratamientos aprobados por la FDA o EMA, así como genes relacionados con la génesis tumoral y posibles dianas terapéuticas que se estaban probando en ensayos clínicos.

El panel secuenció las regiones codificantes completas de los genes siguientes: AKT1, AKT2, AKT3, ALK, ARID1A, ATRX, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDH1, CTNNB1, EGFR, ERBB2/HER2, ESR1, ESR2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GNA11, GNAQ, HIST1H3H, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MET, MTOR, MYC, NRAS, NTRK1,

NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, PBRM1, PTEN, POLD1, POLE, ROS1, TERT, TP53.

También comprobó la existencia de fusiones de los genes ALK, EGFR, NTRK1, ROS1, BRAF, RET, ETV6, NTRK2 y BCR con cualquier otro gen.

Además, comparado con otros paneles, éste aportaba el estudio de microsatélites y, empleando un *software* comercial propio, hacía una aproximación del número de copias a lo largo de todo el genoma, pudiendo sugerir CNVs en la muestra problema.

Otra ventaja era que únicamente empleaba ADN, evitando la meticulosidad que requiere la inestabilidad del ARN.

Así mismo, incluía UMIs (identificadores de molécula única), que aumentaban la sensibilidad del panel porque permitían aumentar la profundidad de secuenciación y eliminar los duplicados (dos lecturas que tengan el mismo UMI), para evitar VAF alteradas por la presencia de los mismos.

Sus parámetros técnicos fueron los siguientes:

- Profundidad de lectura media: 1900X.
- Profundidad de lectura media tras análisis de UMIs: 430X.

- Cobertura: el 96.2% de las bases se cubre a una profundidad de lectura mínima de 100X.
- Uniformidad: el 95.72% de las bases se cubre a >20% de la media de cobertura.
- Especificidad: > 99 %
- Sensibilidad: > 99 %
- Repetibilidad: > 99 %
- Reproducibilidad: >98%

LÍMITES DE DETECCIÓN PARA MUESTRAS PARAFINADAS

Los límites de detección, descritos a continuación, se establecieron a partir de muestras con los siguientes parámetros de calidad:

- Celularidad tumoral > 50%
- Concentración de ADN: 200 ng/ul

Los límites de detección fueron:

- Límites de detección para variantes en la secuencia de ADN: VAF > 5%
- Límites de detección para variantes en el número de copias (CNVs). La estimación del número de copias se estableció en función del porcentaje de celularidad tumoral:
 - Ganancias > 3 copias

- Deleciones <1 copia
- Límites de detección para variantes estructurales (fusiones y reordenamientos). La fiabilidad de las variantes estructurales detectadas se determinó teniendo en cuenta parámetros relacionados con el mapeo de lecturas y se clasificó estas variantes en:
 - Alta calidad (≥ 5 lecturas)
 - Calidad media (entre 1 y 5 lecturas)
 - Baja calidad (0 lecturas).
- Límites de detección para la inestabilidad de microsatélites (MSI). Se analizaron 110 microsatélites, siendo necesarios, al menos 100 informativos. El nivel de inestabilidad de acuerdo al porcentaje de marcadores analizados fue:
 - Para un alto grado de inestabilidad (MSI-ALTO/*MSI-High*): 31-100%
 - Para un bajo grado de inestabilidad (MSI-BAJO/*MSI-Low*): 21-30%
 - Para los microsatélites estables (MSS: Stable): 0-20%

Es decir, en función de la frecuencia de la MSI se pudo distinguir entre los tres tipos descritos. Aunque, en la actualidad, la investigación clínica tiende a clasificar MSI-L y MSS como un solo tipo (9).

El panel ya estaba validado en muestras FFPE para detectar variantes a partir de una frecuencia alélica del 5%, en caso de que la muestra cumpla los parámetros de cantidad celular y concentración de ADN.

El análisis bioinformático que se nos aportó estaba validado, ya que todo el proceso lo estaba, cumplía las condiciones estándar y óptimas de calidad, las normas ISO (*International Organization for Standardization*), y el Marcado CE-IVD (certificado otorgado por la Unión Europea que garantiza la calidad de un producto sanitario para diagnóstico in vitro y su correcto funcionamiento).

3. METODOLOGÍA

3.1. PREANALÍTICA Y ANALÍTICA

Los bloques de parafina seleccionados de los Servicios de Anatomía Patológica de los tres hospitales, se habían realizado siguiendo los estándares nacionales de preanalítica y analítica (171). En primer lugar, las muestras de los pacientes habían sido fijadas en formol a una concentración de 10% v/v en una solución tamponada a pH 7, durante 6-48 horas (tiempo óptimo de fijación). Se habían tallado para obtener fragmentos de 0,2-0,3 cm de grosor que pudiesen ser incluidos en cassetes de plástico. Estos se habían introducido en los procesadores

automáticos que deshidratan el tejido con alcoholes de graduación ascendente (etanol), que posteriormente disuelven las grasas (con xileno) y finalmente realizan baños de parafina a 60 grados centígrados para obtener bloques parafinados.

La investigadora principal realizó una revisión exhaustiva de todo el material parafinado de cada paciente, para seleccionar el bloque de parafina más adecuado en términos de superficie de tejido a estudio (se determinó como suficiente $\geq 6 \text{ mm}^2$ de muestra tumoral y lo mismo de no-tumoral).

3.2. FLUJO DE TRABAJO DEL LABORATORIO

3.2.1. Extracción del ADN y control de calidad.

El ADN genómico (ADNg), del tumor y del tejido control, se extrajo utilizando los kits de extracción comerciales RecoverAllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit para FFPE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen).

3.2.2. Preparación de la librería y secuenciación.

El panel NGS utilizado se basó en la tecnología SureSelect XT HS de Agilent. Fué diseñado para detectar variantes a frecuencias alélicas del 5%, partiendo de pequeñas cantidades de ADN procedente de tejido FFPE.

La preparación de la librería siguió la guía del usuario de Action OncoKitDx (*Imegen-Health in Code Group*).

Las librerías se validaron y se cargaron en el secuenciador NextSeq 550 (Illumina) para hacer 2×75 lecturas *paired-end* (lectura de extremos pareados gracias a que se realizó en ambos sentidos: *forward* y *reverse*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. Análisis bioinformático

Todo el análisis bioinformático se realizó a través de la plataforma DataGenomics (*Imegen – Health in Code Group*), incluyendo:

- la alineación de las lecturas con la secuencia de referencia, donde, en este estudio, se utilizó la versión GRCh37 (*Genome Reference Consortium Human Build 37*)
- la llamada de variantes
- la anotación de variantes

La plataforma DataGenomics es una herramienta informática que seleccionó y priorizó los resultados de la secuenciación, en base a criterios de utilidad clínica, accionabilidad y evidencia clínica, apoyándose sobre todo en FDA, ESMO, ASCO, SEOM, PharmaGKB, entre otros.

3.2.4. Variantes:

- **Variantes de un nucleótido en la secuencia de ADN (SNVs).**

Las variantes somáticas se clasificaron teniendo en cuenta su relevancia, tomando como referencia los datos disponibles en diferentes bases de datos fiables.

Se descartaron del análisis las variantes consideradas polimorfismos, cambios sin relevancia clínica o posibles falsos positivos: variantes con una profundidad de lectura <20x, frecuencia alélica (VAF) inferior al 5%, variantes en regiones no codificantes (excepto regiones intrónicas hasta a 10 nucleótidos del exón), sinónimas (excepto en los 4 primeros o últimos nucleótidos del exón), con frecuencia poblacional elevada, y aquellos cambios clasificados como benignos o probablemente benignos por fuentes fiables. Para nombrar las variantes se empleó la nomenclatura estándar de la *Human Genomic Variation Society- HGVS*) ([172](#)). La relevancia de una variante, se consideró teniendo en cuenta su frecuencia alélica (VAF) y el porcentaje de celularidad de la muestra tumoral analizada ([173](#)).

- **Variantes del número de copias (CNVs).**

El análisis de variantes de número de copias se calculó utilizando un método propio desarrollado por el Instituto de

Medicina Genómica (IMEGEN) basado en la estimación de diferencias en la profundidad de lecturas, de secuenciación de alta calidad y de mapeo único. Presenta alta fiabilidad en las CNVs que abarcan varios exones o más, siempre que exista menos de un 40% de contaminación germinal o que la inestabilidad cromosómica sea menor del 30% de los genes estudiados.

La detección de CNVs mediante NGS tiene una sensibilidad y especificidad inferior a cualquier método de cuantificación directa, por lo que no se considera de validez diagnóstica. Dicha variante debe ser confirmada mediante un método cuantitativo específico para CNVs como son FISH o MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification* - Amplificación de la sonda dependiente de la ligadura múltiple).

- **Variantes estructurales.**

Para alinear y caracterizar los posibles eventos de translocación o reordenamientos se utilizó un programa bioinformático específico (LUMPY *software version* 0.2.13).

Es un programa que permite identificar cualquier variante estructural que implique a los genes ALK, BCR, BRAF, EGFR, NTRK1, NTRK2, ETV6, ROS1 y RET.

- **Inestabilidad de Microsatélites (MSI).**

Se analizaron 110 microsatélites, de los cuales al menos 100 debían ser informativos para categorizar el grado de inestabilidad.

3.2.5. Clasificación funcional de las variantes

Se clasificaron como patógenas, probablemente patógenas, de significado desconocido, probablemente benignas o benignas, siguiendo las guías del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) ([174](#)). La evidencia de patogenicidad se apoyó en las bases de datos COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer), ClinVar, GenomeAD y Varsome, guías clínicas como NCCN y ESMO, ensayos clínicos y literatura científica.

4. VALIDACIÓN FINAL DE LA CLASIFICACIÓN

FUNCIONAL DE LAS VARIANTES

Finalmente, pese a que los informes bioinformáticos emitidos por el Instituto de Medicina Genómica estaban validados, se decidió realizar una última comprobación, en un centro distinto, ajeno a este estudio, porque corroborar la reproducibilidad de dichos análisis bioinformáticos es un determinante crítico de la traducción clínica exitosa de los biomarcadores encontrados ([131](#)).

Se empleó el visualizador genómico Alamut Visual Plus, versión 1.4. (Figura 10).

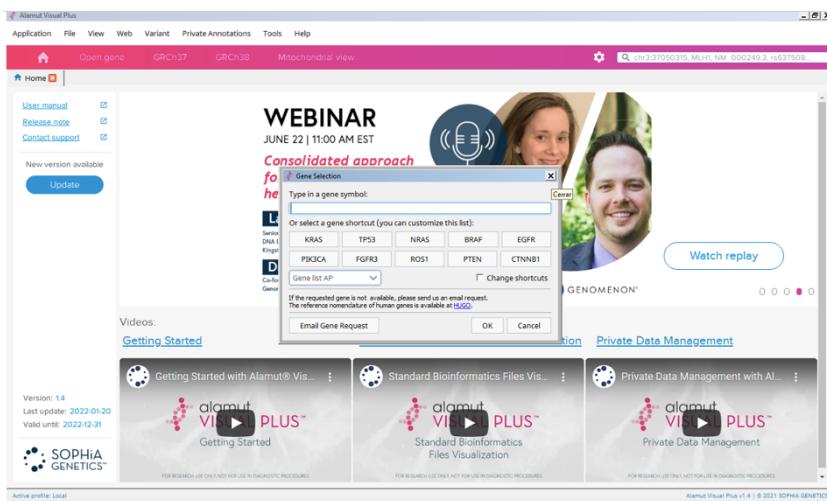


Figura 10: Pantalla inicial del visor Alamut. Fuente: Alamut.

Se siguieron los siguientes pasos: En la pantalla de inicio se insertó el gen problema en la pestaña *Gene Selection*. A continuación, de una lista, se seleccionó el tránskrito de ese gen sobre el que el secuenciador había identificado la variante (Figura 11). Seguidamente, en la pestaña *Variant Properties* se incluyó la variación encontrada, y el programa aportó todos los datos de los que disponía, como el cromosoma al que pertenece el gen, el exón, el cambio que provoca sobre el ADN y sobre la proteína, y también, la clasificación funcional.

Transcript list [Show extended list of transcript versions](#)

Build	Transcripts	Exons	AAs	MANE Class
GRCh37	NM_181042.4	30	1582	
GRCh37	NM_018313.5	30	1582	
GRCh37	NM_018313.4	30	1582	
GRCh37	NM_001394875.1	29	1582	

Description:

Chromosome 3: GRCh37 Preferred Transcript

Figura 11: Selección del tránscribo. Fuente: Alamunt.

A continuación, se describen dos ejemplos:

En la paciente 5, con una variante de significado clínico incierto en el gen mTOR, se corroboraron los datos aportados.

- Se seleccionó el tránscribo NM_004958.4
- Se aportaron las características de la variante. En este caso, una sustitución de la Timina por Adenina, en la posición 7643 del ADN celular (Figura 12)

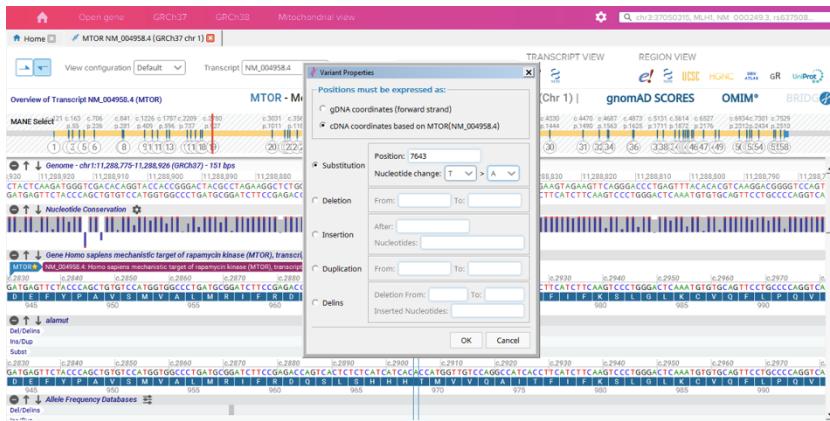


Figura 12: Datos de la variante. Fuente: Alamut.

Finalmente se obtuvieron los cambios que generaban a nivel de la proteína, así como la clasificación funcional, que en este caso coincidió con los datos que ya se tenían: Significado clínico incierto (Figura 13)

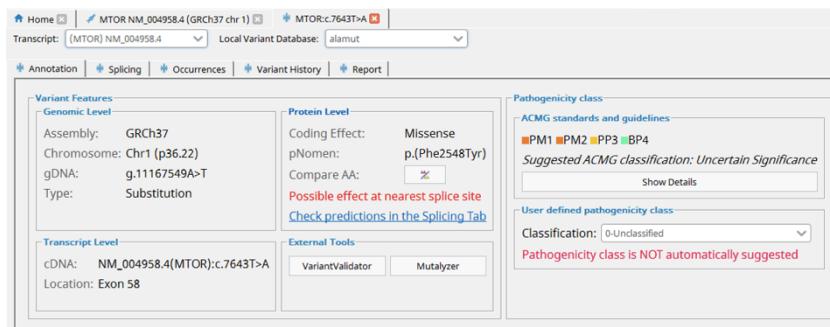


Figura 13: Datos de la variante. Fuente: Alamut.

El siguiente ejemplo es la paciente número 2, con una variante en PIK3CA de significado clínico patogénico.

Se realizaron los mismos pasos (figura 14 y, figura 15) y de nuevo, se corroboraron los resultados que ya se habían aportado por el Instituto de Medicina Genómica.

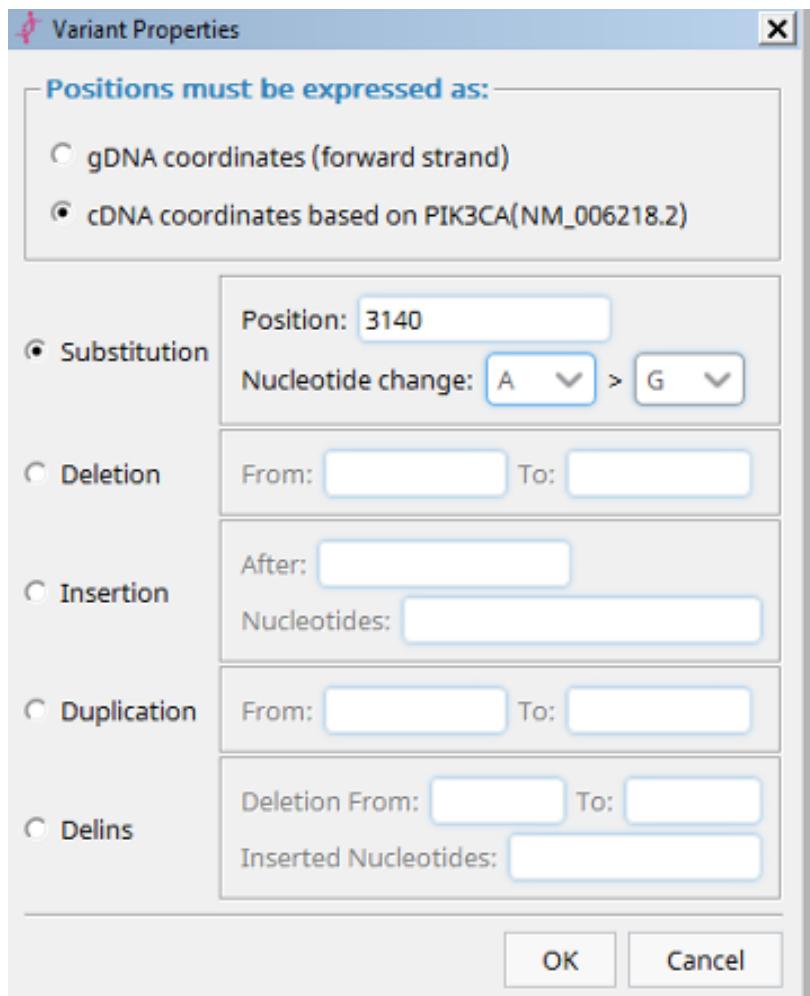


Figura 14: Datos de la variante. Se sustituye la Adenina por Guanina, en la posición 3140 del ADN celular. Fuente: Alamunt.

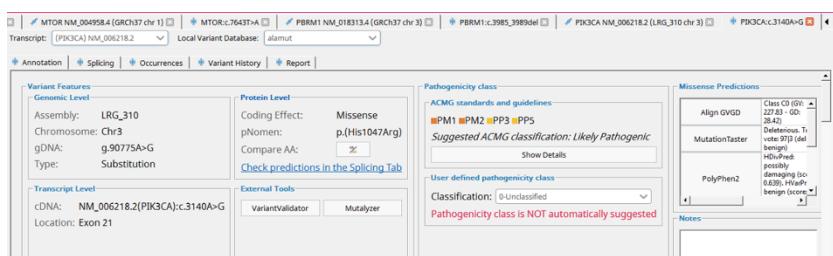


Figura 15: Datos finales con los cambios proteicos y la clasificación funcional. Fuente: Alamunt.

Se realizó la comprobación, de forma manual, con todos los pacientes y todas las variantes halladas, siguiendo los pasos arriba descritos. Los resultados obtenidos coincidieron con los aportados por el Instituto de Medicina Genómica.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

En el periodo de tiempo considerado, se identificaron 24 casos, pero los que cumplieron todos los requisitos fueron 19 (ver figura 16). Doce mujeres con carcinoma ductal infiltrante de mama, dos hombres con carcinoma escamoso de cabeza y cuello, un hombre con adenocarcinoma de esófago distal, otro con carcinoma folicular de tiroides, una mujer con adenocarcinoma endometrioide de endometrio, un varón con carcinoma acinar prostático y otro con carcinoma urotelial infiltrante.

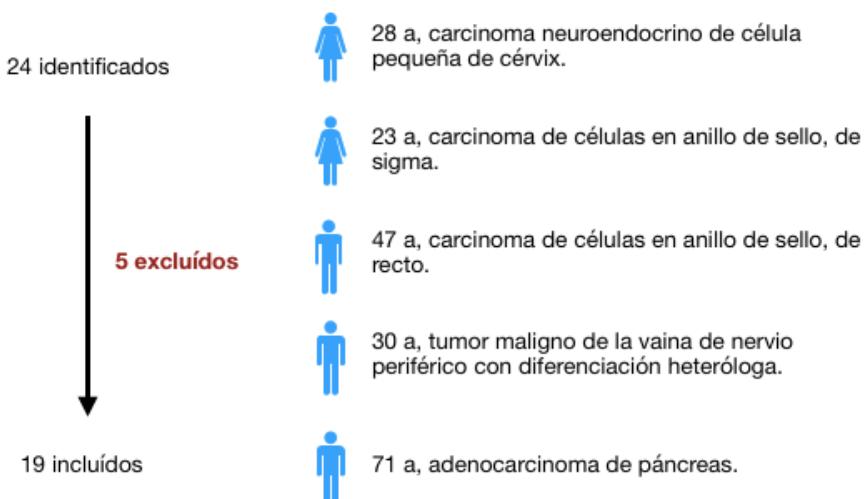


Figura 16: Cinco pacientes fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión y/o cumplir los de exclusión (figura realizada por la autora) (*a*: años). El caso del carcinoma de cérvix presentaba datos clínicos e

histológicos de mal pronóstico y cumplía la supervivencia libre de progresión descrita en la literatura (175), la histología de carcinoma en anillo de sello supone en sí misma un pronóstico pobre (176), por lo que entra dentro de los criterios de exclusión, así como el caso de páncreas y el sarcoma.

Durante el seguimiento realizado en el estudio todos los pacientes han fallecido.

2. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE CARCINOMAS MAMARIOS

• CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS

Grado histológico de Nottingam, el cual asigna puntuación (1, 2 ó 3) a tres características morfológicas (la diferenciación glandular, el grado nuclear y el recuento mitótico) para obtener una puntuación total (de 3 a 9) que permita clasificar al cáncer en uno de tres grados (1,2,3).

Subtipo intrínseco subrogado inmunohistoquímicamente, siguiendo los criterios del Consenso de St Gallen 2013:

- Luminal A: receptor estrogénico (RE) positivo (+), receptor de progesterona (RP) >20%, HER2 (*human epidermal growth factor receptor*) negativo (-) e índice proliferativo Ki67 <20%

- Luminal B: RE+, HER2 negativo, RP <20% ó Ki67>20%
- Enriquecido con HER2
- Triple negativo: ER-, PR-, HER2-

Clasificación del estadio TNM según la 8^a edición de la AJCC

(177): T valora el tamaño del tumor primario, N el número de ganglios afectos y M la existencia de metástasis. Si se precede de la letra “c” significa que la clasificación es clínica. Si se precede de la letra “p” significa que la clasificación es patológica y ha sido aportado con el examen anatomo-patológico. Y si además se precede con la letra “y” significa que la clasificación patológica se realiza tras tratamiento neoadyuvante (ver la clasificación del estadio patológico en la tabla 3).

CATEGORÍA pT	
pT no asignado	No puede ser determinado con la información patológica disponible
pT0	No hay evidencia de tumor primario
pTis (CDIS)	Carcinoma ductal in situ
pTis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón NO asociada a carcinoma invasivo y/o carcinoma in situ (CDIS) en el parénquima mamario subyacente
pT1	Tumor menor o igual a 20 mm en su mayor dimensión
pT1mi	Tumor menor o igual a 1 mm en su mayor dimensión
pT1a	pT1a: Tumor mayor de 1 mm pero menor o igual a 5 mm en su mayor dimensión
pT1b	Tumor mayor de 5 mm pero menor o igual a 10 mm en su mayor dimensión
pT1c	Tumor mayor de 10 mm pero menor o igual a 20 mm en su mayor dimensión

pT2	Tumor mayor de 20 mm pero menor o igual a 50 mm en su mayor dimensión
pT3	Tumor de más de 50 mm en su mayor dimensión
pT4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o a la piel (ulceración o nódulos cutáneos)
pT4a	Extensión a la pared torácica; la invasión o adherencia al músculo pectoral en ausencia de invasión de las estructuras de la pared torácica no se califica como T4
pT4b	Ulceración y/o nódulos satélites ipsilaterales y/o edema (incluyendo piel de naranja) de la piel que no cumplen los criterios de carcinoma inflamatorio
pT4c	Tanto T4a como T4b están presentes
pT4d	Carcinoma inflamatorio
CATEGORÍA pN	
pN0	No se han identificado metástasis en los ganglios linfáticos regionales o sólo hay aisladas células tumorales
pN0 (i+)	Grupos de células malignas no mayores de 0,2 mm en los ganglios linfáticos regionales
pN0 (mol+)	Resultados moleculares positivos por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)
pN1mi	Micrometástasis (aproximadamente 200 células, mayores de 0,2 mm, pero ninguna mayor de 2,0 mm)
pN1a	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares, al menos una metástasis mayor de 2,0 mm
pN1b	Metástasis en los ganglios centinela mamarios internos ipsilaterales, excluyendo las células aisladas
pN1c	pN1a y pN1b combinados
pN2a	Metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral mayor de 2,0 mm)
pN2b	Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos detectados clínicamente con o sin confirmación microscópica; con ganglios axilares patológicamente negativos
pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral mayor de 2,0 mm); o metástasis en los ganglios infraclaviculares (nivel linfático axilar III)
pN3b	pN1a o pN2a en presencia de cN2b (ganglios mamarios internos positivos por imagen); o pN2a en presencia de pN1b

pN3c	Metástasis en los ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales
CATEGORÍA pM	
No aplicable	no se puede determinar la categoría pM
pM1	Metástasis histológicamente probadas mayores de 0,2 mm

Tabla 3: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Resection Specimens from Patients with Invasive Carcinoma of the Breast* (178).

Paciente 1:

Mujer de 45 años que en abril de 2014 fue diagnosticada, mediante biopsia con aguja gruesa (BAG), de carcinoma ductal infiltrante, grado 2 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue luminal A, con RE 95%, RP 90%, HER2 negativo y Ki67 del 10%. Se estadificó como pT2N0M0.

Se le realizó estudio genómico con *MammaPrint*®, con resultado de bajo riesgo/luminal A.

Ese mismo mes se le practicó mastectomía con biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC). El estudio histológico mostró la misma histología que en la BAG y con los mismos marcadores hormonales y en los mismos porcentajes. El estadio TNM en este caso fue pT2 pN1mic, con micrometástasis en el ganglio centinela. En mayo de 2014 inició tratamiento con hormonoterapia adyuvante (Tamoxifeno). En

agosto de 2016, en el curso de la hormonoterapia, se confirmó mediante biopsia, recidiva ganglionar mediastínica con metástasis pulmonares. Se añadió goserelina al tratamiento, pero en diciembre de 2016 se objetivó progresión metastásica en ovario. Siguió una evolución tórpida con repetidas progresiones. Falleció en junio de 2021.

Su supervivencia libre de progresión fue de 27 meses y su supervivencia global de 58 meses.

El motivo de su inclusión en el estudio fue la recaída precoz en paciente con cáncer de mama luminal A.

Paciente 2:

Mujer de 76 años que en junio de 2018 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 2 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue luminal A, con RE 90%, RP 40%, ki67 17% y HER2 negativo. Presentaba afectación ganglionar y metástasis óseas en vértebras y hemisacro izquierdo (metástasis no-viscerales). Se estadificó como pT2N1M1.

En julio de 2018 inició tratamiento de primera línea con palbociclib-letrozol, pero se observó progresión de la enfermedad en septiembre de 2018. Inició tratamiento de

segunda línea con paclitaxel, pero la evolución no fue buena y falleció en abril de 2019.

Su supervivencia libre de progresión fue de 2 meses y su supervivencia global de 9 meses.

El motivo de inclusión fue la refractariedad al tratamiento hormonal en paciente luminal A.

Paciente 3:

Mujer de 37 años que en julio de 2015 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 1 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue luminal A, con RE 95%, RP 85%, ki67 5% y HER2 negativo. Presentaba afectación ganglionar. Se estadificó como pT2N1M0.

En noviembre de 2015 inició quimioterapia neoadyuvante con adriamicina/ciclofosfamida (4 ciclos), seguido de paclitaxel (12 infusiones). En abril de 2016 se le realizó mastectomía radical modificada con linfadenectomía, donde el estudio histológico mostró la misma histología que en la biopsia, de nuevo subtipo intrínseco subrogado luminal A con RE 99%, RP 70%, HER2 negativo, ki67 17%. Se objetivaron 3 ganglios linfáticos con metástasis, de 18 aislados. El estadio fue ypT2 ypN1a. En mayo

de 2016 inició tratamiento con tamoxifeno y goserelina. Dada la afectación ganglionar, tras confirmar la castración con la goserelina se sustituyó el tamoxifeno por exemestano. La paciente permaneció libre de enfermedad durante tres años hasta que en mayo de 2019 fue diagnosticada de recaída ósea multinivel. Inició tratamiento con fulvestrant y palbociclib, pero en agosto de 2019 de nuevo hizo progresión ósea. Falleció por otra causa distinta a la enfermedad.

El motivo de la inclusión fue la refractariedad a tratamiento hormonal en paciente luminal A.

Paciente 4:

Mujer de 44 años que en enero de 2018 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 3 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue luminal B, con RE 20%, RP 25% y HER2 negativo, con ki67 del 80%. La biopsia selectiva de ganglio centinela resultó negativa con el método OSNA. Se estadificó como pT2N0M0.

En febrero de 2018 inició quimioterapia neoadyuvante con adriamicina/ciclofosfamida hasta completar 4 ciclos. Posteriormente inició quimioterapia con taxol semanal. En el curso de la misma, en julio de 2018, fue diagnosticada de

progresión de enfermedad. En agosto de 2018 se le realizó mastectomía, con diagnóstico patológico de carcinoma ductal infiltrante grado 3, triple negativo, con índice proliferativo ki67 del 80%. El estadio fue ypT2 ypN0. Recibió tratamiento adyuvante con radioterapia y posterior quimioterapia con capecitabina. La evolución posterior fue tórpida.

Falleció por otra causa distinta a la enfermedad.

Su supervivencia libre de progresión fue de 5 meses.

El motivo de inclusión fue la resistencia al tratamiento quimioterápico neoadyuvante con refractariedad al tratamiento con taxanos.

Paciente 5:

Mujer de 44 años que en marzo de 2018 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 3 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue luminal B, con RE 30%, RP 40%, HER2 negativo y Ki67 del 70%. Presentaba metástasis en una adenopatía confirmada mediante BAG. Se estadificó como pT2N1M0.

El mismo mes comenzó tratamiento con quimioterapia neoadyuvante con adriamicina/ciclofosfamida hasta completar

4 ciclos. Posteriormente debía recibir 12 dosis de Paclitaxel, pero en la octava infusión se detectó, en pruebas de imagen, progresión locorregional. Se observó un nuevo nódulo en la misma mama, y se etiquetó por tanto de refractaria al tratamiento. Se interrumpió la quimioterapia y se realizó mastectomía radical modificada izquierda con linfadenectomía axilar, con el mismo resultado histológico que en la biopsia previa, con invasión vascular y linfática. En este caso con clasificación ypT2 ypN3. La paciente fue seguida hasta su fallecimiento en febrero de 2019.

Su supervivencia libre de progresión fue de 5 meses y su supervivencia global 11 meses.

El motivo de inclusión fue la resistencia a la quimioterapia neoadyuvante con refractariedad al tratamiento con taxanos.

Paciente 6:

Mujer de 38 años que en enero de 2016 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 2 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue luminal B, con RE 100%, RP 60%, HER2 negativo, y ki67 del 25%. Se estadificó como pT2N0M0.

En marzo de 2016 se le practicó mastectomía con linfadenectomía, cuyo diagnóstico patológico fue de carcinoma ductal infiltrante grado 3 de Nottingam, Luminal B, con RE 90%, RP 60%, HER2 negativo, y ki67 del 50%. Se objetivó metástasis en 12 ganglios linfáticos de 20 aislados. Se estadificó como pT2N3M0. Recibió quimioterapia adyuvante con 6 ciclos de esquema TAC (docetaxel + adriamicina + ciclofosfamida) (último ciclo el 14 de agosto de 2016), seguido de radioterapia locorregional (50 Gy) y hormonoterapia con tamoxifeno (iniciada en julio 2017). En febrero de 2018 se objetivó recaída de la enfermedad en forma de metástasis única en la vértebra T11. Fue confirmada histológicamente, y en este caso los marcadores hormonales fueron RE 100%, RP 3%, HER2 negativo. Comenzó hormonoterapia de primera línea con inhibidor de la aromatasa y se le practicó resección de la T11. Posteriormente, en abril 2019 se objetivó otra progresión ósea de la enfermedad, por lo que inició quimioterapia de primera línea con capecitabina (14 ciclos). En febrero 2020 ante una nueva progresión, esta vez hepática y ósea, inició hormonoterapia de segunda línea con fulvestrant y palbociclib (3 ciclos) pero en mayo del mismo año volvió a objetivarse progresión hepática y ósea.

Se le fueron administrando las siguientes líneas de quimioterapia según la enfermedad iba progresando, hasta que la paciente falleció en marzo de 2021.

Su supervivencia libre de progresión fue de 2 meses y supervivencia global de 60 meses.

El motivo de la inclusión, a razón del criterio clínico, es la rápida progresión, en 2 meses, de un grado histológico G2 con un estadio sin ganglios, a un grado G3 con metástasis en 12 ganglios linfáticos. A lo que se añade la recaída de la enfermedad a los 19 meses del inicio de la hormonoterapia, pese a ser un carcinoma con receptores hormonales a porcentajes muy altos.

Paciente 7:

Mujer de 42 años que en diciembre de 2017 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 3 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue luminal B con RE 10%, RP 5%, HER2 negativo y ki67 del 80%. No presentaba afectación ganglionar, dato que se comprobó mediante BAG de adenopatía. Se estadificó como pT2N0M0.

Previo al comienzo con la quimioterapia neoadyuvante a principios de enero de 2018, se realizó biopsia selectiva de

ganglio centinela, resultando negativa para metástasis. Inició el tratamiento con adriamicina/ciclofosfamida hasta completar 4 ciclos y posteriormente 12 dosis de Paclitaxel. En el curso de los taxanos se observó escasa respuesta, con un ganglio sospechoso de metástasis. Éste se biopsió a finales de enero de 2018, resultando negativo para metástasis.

Al término del tratamiento con taxanos, en julio de 2018, se observó rápida progresión de la enfermedad con crecimiento tumoral y ulceración. El 3 de septiembre 2018 se le practicó mastectomía sin linfadenectomía axilar. El diagnóstico histológico fue de carcinoma grado 3 histológico, triple negativo, con Ki67 del 80%. Ese mismo mes, ante el rápido crecimiento del tumor y la resistencia al tratamiento con quimioterapia, se decidió radioterapia y posteriormente quimioterapia con capecitabina. Durante el curso de esta última, se detectó recidiva ganglionar de la enfermedad, confirmada histológicamente mediante una BAG de adenopatía axilar izquierda en enero de 2019. La paciente hizo una rápida progresión sistémica con adenopatías e implantes musculares y viscerales múltiples. Fue evaluada de forma exhaustiva y se descartó toda posibilidad de curación, por lo que se inició quimioterapia con intención paliativa. Se notificó éxitus en septiembre de 2019.

Su supervivencia libre de progresión fue de 6 meses y supervivencia global 21 meses.

El motivo de inclusión fue la escasa respuesta durante el tratamiento con taxanos y la rápida progresión al terminar los mismos.

Paciente 8:

Mujer de 44 años que en septiembre de 2016 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 3 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue Triple Negativo con RE, RP y HER2 negativos, y ki67 del 30%. El ganglio centinela no evidenció tumor. Se estadificó como pT2N0M0.

En octubre inició quimioterapia neoadyuvante con adriamicina/ciclofosfamida hasta completar 4 ciclos y posteriormente paclitaxel (12 infusiones). En abril de 2017, en curso de los taxanos, en pruebas de imagen, se objetivó progresión locorregional con aparición de un nuevo nódulo en la misma mama. Se interrumpió la quimioterapia y se realizó mastectomía conservadora, con el mismo resultado histológico que en la biopsia previa, salvo un aumento del índice proliferativo (ki67 70%). El grado de respuesta a la neoadyuvancia fue grado 1, con sólo un leve cambio celular, sin

cambio en el tamaño ni en otros aspectos. Se estadificó como ypT2. En TC postquirúrgico no se objetivó enfermedad residual. Recibió radioterapia adyuvante, y se mantuvo sin evidencia de enfermedad hasta enero de 2018, cuando tuvo recaída metastásica a nivel de mediastino, pulmón e hígado. Se incluyó en un ensayo clínico, pero progresó de forma negativa en reiteradas ocasiones, hasta que falleció el 6 de agosto de 2018.

Su supervivencia libre de progresión fue de 6 meses y su supervivencia global de 22 meses.

El motivo de la inclusión en el estudio fue la progresión durante el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante con refractariedad a los taxanos.

Paciente 9:

Mujer de 43 años que en marzo de 2017 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 1 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue Triple Negativo con RE, RP y HER2 negativos, y ki67 del 20%. Presentó positividad para metástasis en la biopsia selectiva del ganglio centinela. Se estadificó como pT3N1micM0

A finales de marzo inició neoadyuvancia con quimioterapia basada en 4 ciclos de adriamicina/ciclofosfamida y posterior

paclitaxel (12 infusiones). En octubre de 2017, en curso de taxanos, se objetivó progresión local de la enfermedad, por lo que en noviembre se le practicó mastectomía radical modificada cuyo diagnóstico patológico aumentó el grado (grado 2 Nottingam) y el índice proliferativo (ki67 50%), sin modificar nada más. Se siguió estadificando como ypT3 ypN1a. Recibió radioterapia adyuvante y posterior capecitabina complementaria. En julio de 2018 hizo progresión cerebral metastásica y posteriormente pulmonar. Fue éxitus en noviembre de 2018.

Su supervivencia libre de progresión fue de 7 meses y supervivencia global de 20 meses.

El motivo de inclusión en el estudio fue la refractariedad al tratamiento en curso de taxanos.

Paciente 10:

Mujer de 36 años que en noviembre de 2015 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 3 de Nottingam. El subtipo intrínseco subrogado fue Triple Negativo, con RE, RP y HER2 negativos, y ki67 del 80%. No se realizó ganglio centinela, pero en pruebas de imagen se diagnosticó de N1. Se estadificó como cT2N1M0.

A principio de diciembre inició quimioterapia neoadyuvante con dosis densas de antraciclinas (4 ciclos), seguidos de docetaxel (4 ciclos), pero en el curso de estos, en febrero de 2016, se constató progresión de la enfermedad. En marzo se le practicó mastectomía con linfadenectomía, cuyo diagnóstico fue el mismo que en la BAG. El grado de respuesta a la neoadyuvancia fue G1 (mínimos cambios celulares sin reducción significativa de la celularidad invasiva), y respuesta regional B con ganglios linfáticos positivos sin cambios post-quimioterapia. Se estadificó como ypT3 ypN1a. Recibió radioterapia adyuvante.

En abril de 2017 se confirmó histológicamente recaída con metástasis pulmonares múltiples, por lo que recibió quimioterapia con capecitabina y bevacizumab. En enero de 2018 de nuevo, la enfermedad progresó con metástasis óseas, ganglionares, pleurales y suprarrenales, resultando en deterioro clínico llamativo y terminando en éxitus el 9 de septiembre de 2018.

Su supervivencia libre de progresión fue de 2,5 meses y su supervivencia global de 32 meses.

El motivo de inclusión en el estudio fue la refractariedad al tratamiento en curso de taxanos.

Paciente 11:

Mujer de 69 años que en marzo de 2018 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 3 de Nottingham. El subtipo intrínseco subrogado fue triple negativo, con RE, RP y HER2 negativos, y ki67 del 80%. Presentaba un ganglio axilar con metástasis. Se estadificó como pT2N1M0. En abril inició quimioterapia neoadyuvante con dosis densas de adriamicina/ciclofosfamida (4 ciclos), seguido de paclitaxel y carboplatino (12 infusiones). Durante el tratamiento, el juicio clínico del oncólogo fue de ausencia de respuesta a las antraciclinas y respuesta parcial a paclitaxel/carboplatino, objetivando progresión de la enfermedad en septiembre del mismo año. Se le practicó mastectomía radical con vaciamiento axilar, cuyo diagnóstico fue el mismo que en la biopsia, salvo por el índice proliferativo (ki67 30%). Se estadificó como ypT2 ypN2a yM0. Recibió radioterapia adyuvante y posteriormente permaneció libre de enfermedad 7 meses, hasta que presentó progresión metastásica de enfermedad pulmonar y hepática, confirmada con histología. El empeoramiento clínico fue llamativo hasta su fallecimiento en junio de 2020.

Su supervivencia libre de progresión fue de 5 meses y supervivencia global de 26 meses.

El motivo de inclusión en el estudio fue la ausencia de respuesta a las antraciclinas según juicio clínico, y la refractariedad al tratamiento en curso de paclitaxel y carboplatino.

Paciente 12:

Mujer de 51 años que en septiembre de 2016 fue diagnosticada, mediante BAG, de carcinoma ductal infiltrante grado 2 de Nottingam. El subtipo intrínseco subrogado fue Triple Negativo, con RE, RP y HER2 negativos, y ki67 del 70%. Presentaba afectación ganglionar confirmada histológicamente mediante BAG. En el TC tóraco-abdómino-pélvico se identificaron metástasis óseas en vértebras, así como un pequeño nódulo satélite ipsilateral. Se estadificó clínicamente como cT4bN3M1.

El mismo mes recibió quimioterapia de primera línea con paclitaxel (sin bevacizumab por trombosis reciente), pero se suspendió en diciembre del mismo año por progresión precoz. Recibió quimioterapia de segunda línea con el esquema FEC-100 (5-fluorouracilo + epirrubicina + ciclofosfamida) (8 ciclos), pero se objetivó progresión locorregional, por lo que se comenzó tercera línea de quimioterapia. De nuevo se identificó progresión locorregional y se procedió a realizar mastectomía

paliativa sin linfadenectomía. El diagnóstico fue el mismo que en la biopsia inicial, con grado de respuesta a la neoadyuvancia G1 (mínimos cambios celulares sin reducción significativa de la celularidad invasiva). Se estadificó como ypT4b ypNx. Posteriormente el deterioro clínico y las progresiones recurrentes, condujeron a la paciente al éxitus el 18 de noviembre de 2018.

Su supervivencia libre de progresión fue de 3 meses y su supervivencia global 23 meses.

El motivo de inclusión en el estudio fue la progresión precoz de la enfermedad durante el tratamiento con taxanos.

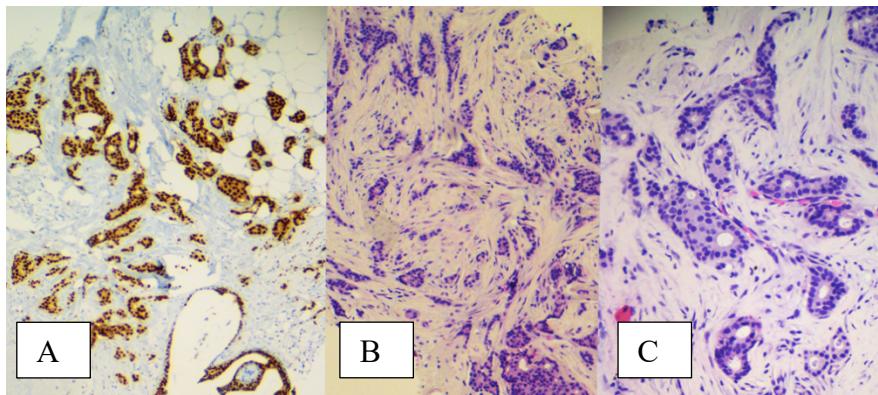
En la tabla 4 se resumen las características de los casos mamarios para una mejor visualización.

P	A	ST	GHN	TNM	ME	MS	T-RR
1	45	LA	2	T2N0M0	Progresión en curso de TH	Pre-TTO	Tamoxifeno
2	76	LA	2	T2N1M1	Progresión en curso de TH	Pre-TTO	Palbociclib-Letrozol
3	37	LA	1	T2N1M0	Progresión en curso de TH	Post-TTO	Palbociclib-Letrozol

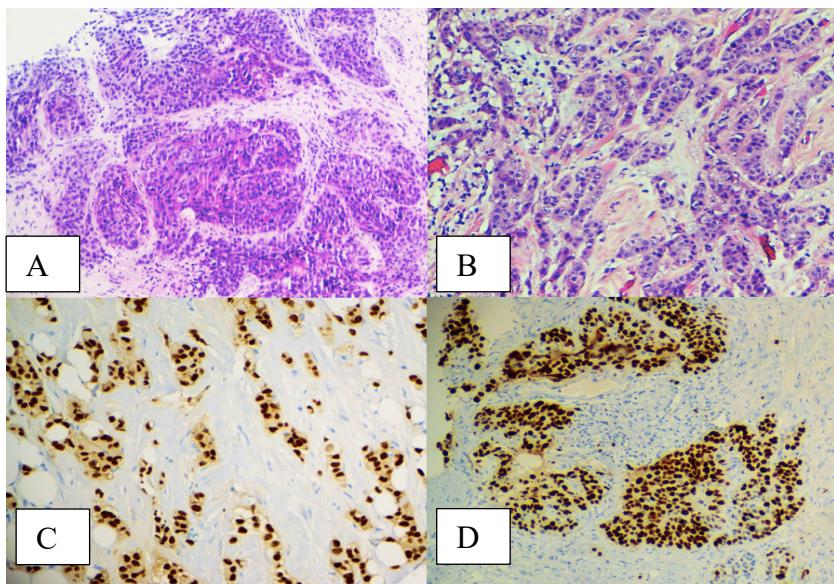
4	44	LB	3	T2N0M0	Refractario a QT-NEO	Post-QT	
5	44	LB	3	T2N1M0	Refractario a QT-NEO	Post-QT	
6	38	LB	2	T2N0M0	Progresión en curso de TE	Pre-TTO	Palbociclib-Letrozol
7	42	LB	3	T2N0M0	Refractario a QT-NEO	Post-QT	
8	44	TN	3	T2N0M0	Refractario a QT-NEO	Post-QT	
9	43	TN	1	T3N1micM0	Refractario a QT-NEO	Post-QT	
10	36	TN	3	T2N1M0	Refractario a QT-NEO	Post-QT	
11	69	TN	3	T2N1M0	Refractario a QT-NEO	Post-QT	
12	51	TN	2	T4bN3M1	Refractario a QT-NEO	Post-QT	

Tabla 4: Características de los carcinomas mamarios. *P: paciente, A: años, ST: subtipo, LA: luminal A, LB: luminal B, TN: triple negativo, GHN: grado histológico de Nottingham, ME: motivo principal por el que se estudió la inclusión de este paciente en este trabajo, TH: terapia hormonal, QT-NEO: quimioterapia neoadyuvante, MS: momento en que el material fue secuenciado en relación al tratamiento sistémico de primera línea o neoadyuvante, TTO: tratamiento, T-RR: terapia durante la que se produjo la recaída o resistencia.*

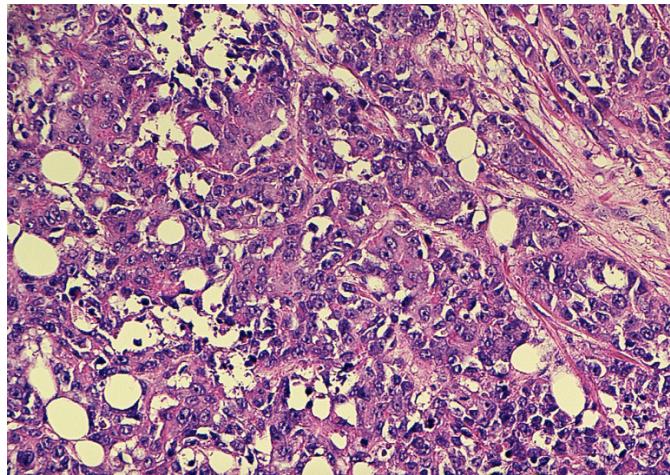
- IMÁGENES HISTOLÓGICAS



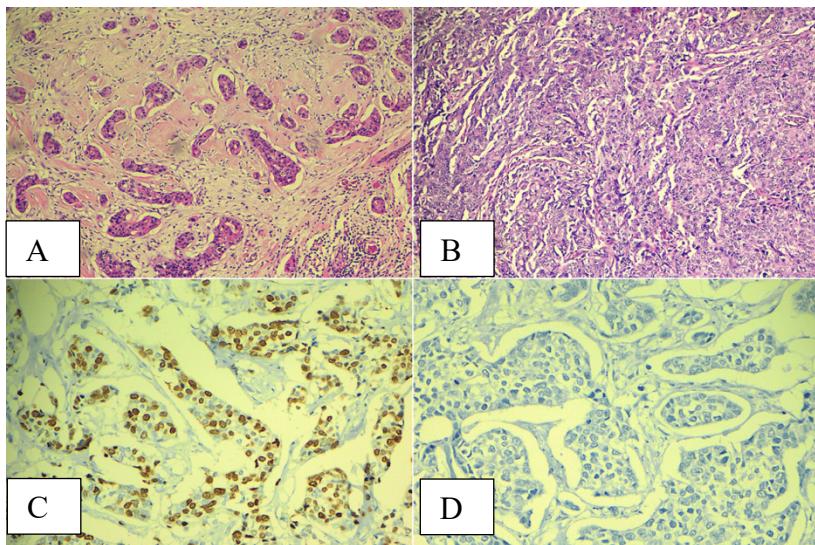
Pacientes 1-3 (luminales A): **A** (caso 1) receptores estrogénicos 95% (100x); **B** (caso 2) H&E (100x); **C** (caso 3) H&E (200x).



Pacientes 4-7 (luminales B): **A** (caso 4) H&E (100x); **B** (caso 5) H&E (200x); **C** (caso 6) receptores estrogénicos 100% (200x); **D** (caso 7) índice proliferativo ki67 del 80% (100x).



Paciente 8 (triple negativa): H&E (200x).



Pacientes 9-12 (triples negativas): **A** (caso 9) H&E (100x); **B** (caso 10) H&E (100x); **C** (caso 11) índice proliferativo ki67 del 80% (200x); **D** (caso 12), receptores estrogénicos negativos (200x).

- DATOS MOLECULARES OBTENIDOS MEDIANTE NGS

Tras la secuenciación del ADN, los resultados observados fueron variaciones de nucleótido único (SNV) y variaciones en el número de copias (CNV), todas de origen somático. Las SNV se definieron por el cromosoma en el que se localizaban, la posición de la base nitrogenada en el mismo, la frecuencia alélica, la variante en el tránscrito y las posiciones en el ADN complementario y en la proteína, así como por la clasificación funcional acorde con la ACMG (Tabla 5).

P	GEN CON SNV	POSICIÓN	VARIANTE	VAF	CF
1	<i>PIK3CA</i>	3:178936091	NM_006218.2 c.1633G>A p.Glu545Lys	42% (136X)	Patogénica
2	<i>PIK3CA</i>	3: 178952085	NM_006218.2 c.3140A>G p.His1047Arg	36% (129X)	Patogénica
3	<i>PIK3CA</i>	3: 178952085	NM_006218.2 c.3140A>G p.His1047Arg	47.3% (205X)	Patogénica
4	<i>BRCA1</i>	17:41228617	NM_007294.3 c.4372C>T p.Gln1458Ter	69.9% (522X)	Patogénica
	<i>TP53</i>	17:7577109	NM_000546.5	64.4%	Patogénica

			c.829T>G p.Cys277Gly	(153X)	
5	mTOR	1:11167549	NM_004958.4 c.7643T>A p.Phe2548Tyr	28.3% (106X)	Significado incierto
	TP53	17:7576853	NM_000546.5 c.993G>C p.Gln331His	67.4% (175X)	Patogénica
6	ARID1A	1: 27101195	NM_006015.4 c.4477C>T p.Gln1493Ter	9% (204X)	Patogénica
7	PIK3CA	3:178952085	NM_006218.2 c.3140A>G p.His1047Arg	47.3% (205X)	Patogénica
	TP53	17: 7578190	NM_000546.5 c.659A>G p.Tyr220Cys	64.55% (110X)	Patogénica
8	TP53	17:7577099	NM_000546.5 c.839G>C p.Arg280Thr	71,1% (246X)	Patogénica
9	TP53	17: 7574021	NM_000546.5 c.1004_1006delinsT p.Arg335LeufsTer11	16.56% (163x)	Patogénica
10	TP53	17:7577121	NM_000546.5 c.817C>T p.Arg273Cys	48,35% (393X)	Patogénica
11	TP53	17: 7578394	NM_000546.5 c.536A>G p.His179Arg	76.61% (124X)	Patogénica

	HRAS	11: 534286	NM_005343.2 c.37G>C p.Gly13Arg	48.28% (203X)	Patogénica
	PTEN	10: 89685287	NM_000314.4 c.182A>T p.His61Leu	29.33% (75%)	Patogénica
12	TP53	17:7577121	NM_000546.5 c.817C>T p.Arg273Cys	48.35% (393X)	Patogénica

Tabla 5: Descripción de SNVs. *P: paciente; VAF: Variant allele frequency (frecuencia alélila de la variante); CF: clasificación funcional; SNV: single-nucleotide variants.*

A continuación, en la figura 17, se muestra un ejemplo de variante de nucleótido único (SNV). En la parte superior de la imagen, en posición horizontal, puede verse el cromosoma 3. En la posición 3q26.32 es donde se encuentra el gen PIK3CA, representado en la parte inferior. La primera sección de lecturas (*reads*) en color gris, pertenece a la muestra normal, y la sección inferior, a la muestra tumoral, en la que se observa cómo, en lugar de la A (adenina), las lecturas han visualizado G (guanina). En la figura 18 puede verse a mayor aumento la localización de la alteración, y en la figura 19 se muestra a mayor aumento la SNV.



Figura 17: SNV en PIK3CA.

FIGURA 18

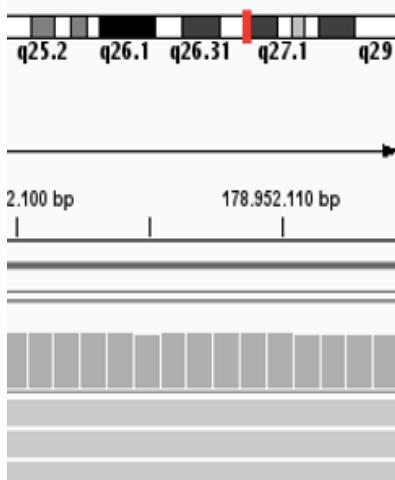
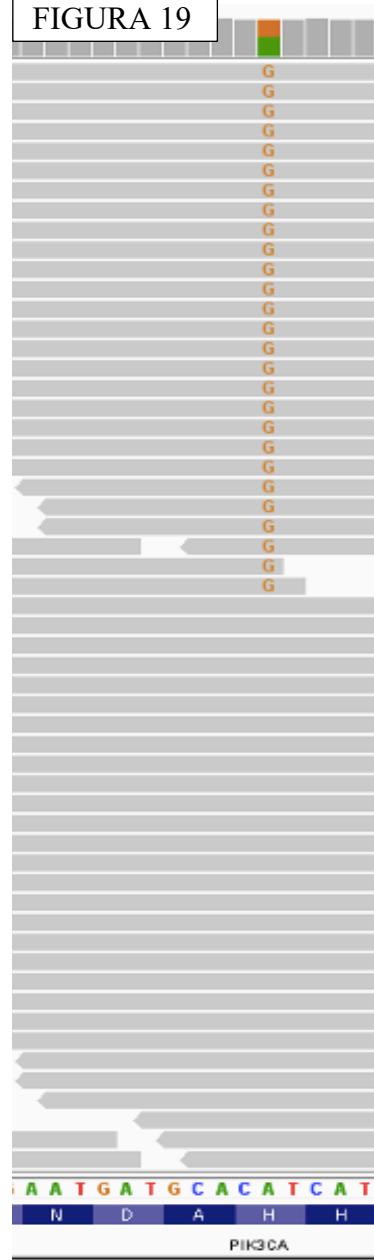


Figura 18: Imagen a mayor aumento de la localización de la SNV sobre el gen.

Figura 19: Imagen a mayor aumento de la SNV en PIK3CA.

FIGURA 19



Por otro lado, el análisis de variaciones en el número de copias (CNVs) se ha calculado utilizando un método propio desarrollado por el Instituto de Medicina Genómica (IMEGEN).

En siete pacientes se detectaron ganancias y pérdidas cromosómicas con diferente número de copias, tanto focales, como de brazos cromosómicos y de cromosomas completos.

Las CNV más relevantes, sugeridas por el análisis bioinformático, se muestran en la tabla 6.

PACIENTE	GENES Y TIPO DE CNV
1	PBMR1: Pérdida completa del gen.
2	MYC, FGFR1, BRAF, MET: Ganancia parcial HIST1H3H: Ganancia completa ATRX: Pérdida completa
3	TP53: Pérdida completa
6	FGFR1: Amplificación
7	EGFR (HER1): Amplificación
8	TP53: Pérdida

Tabla 6: CNVs sugeridas por el análisis bioinformático basado en los resultados de la secuenciación.

A continuación, en la figura 20 se muestra un ejemplo de CNV, concretamente la amplificación del gen EGFR. Se representa a mayor aumento en la figura 21.

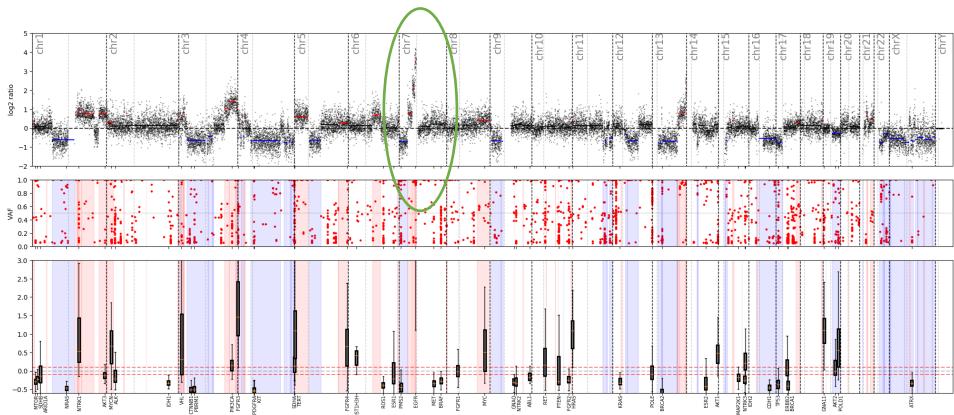


Figura 20: Se observa, en el cromosoma 7, la amplificación del gen EGFR (redondeado en verde).

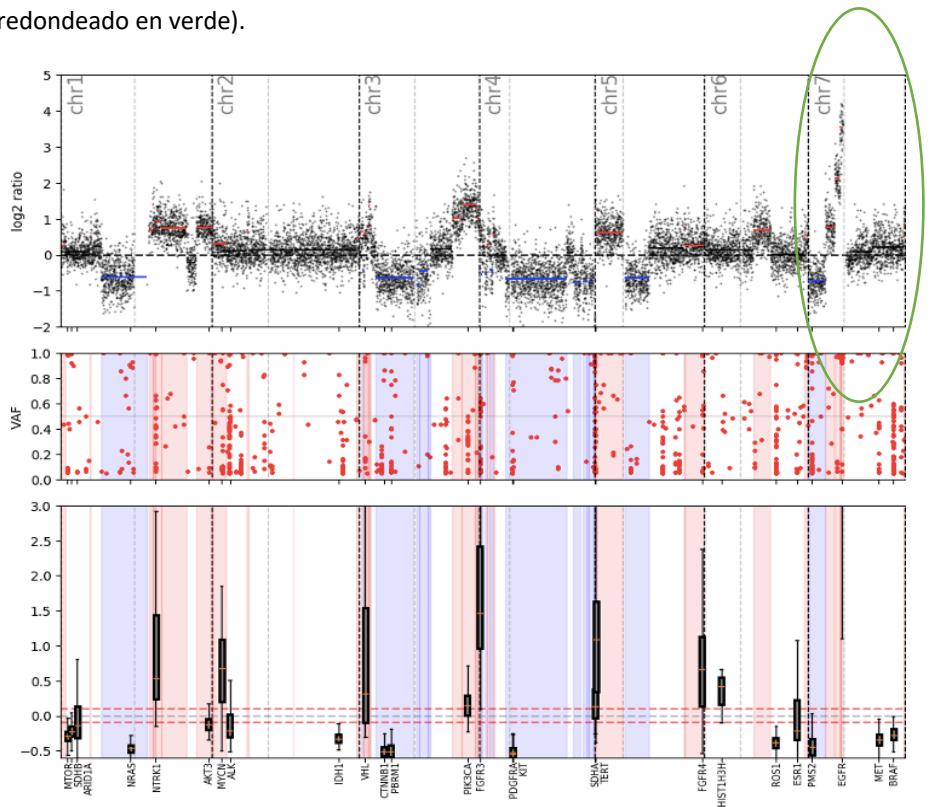


Figura 21: Amplificación del gen EGFR a mayor aumento (redondeado en verde).

Como resumen de los resultados, se identificaron alteraciones en genes *driver* en el 100% de las muestras, viéndose alteración del gen TP53 en el 75% de las pacientes. Las alteraciones accionables más destacables se describieron en el gen PIK3CA en el 33,3%, tres pacientes LA y una LB; en el gen mTOR en el 8,3%, comprendido por un caso LB; y la disfunción de PTEN en el 8,3%, un caso TN.

En ninguno de los casos se identificó genes de fusión, inestabilidad de microsatélites, o alteraciones en la línea germinal.

En el 50% de las pacientes se identificó dianas terapéuticas.

3. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE CARCINOMAS NO-MAMARIOS

- **CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS**

CARACTERÍSTICAS DE LOS CARCINOMAS DE LARINGE

- **Tipo histológico:** Los dos casos de carcinoma de laringe que incluye este estudio son carcinomas escamosos.
- **Grado histológico, en función del grado de diferenciación:** 3 grados, desde bien diferenciado (G1) hasta pobremente diferenciado (G3).
- **Escala ECOG-PS.** Valora el estado funcional del paciente (ya comentada en los “criterios de inclusión”, página 121-123).

- **Clasificación del estadio tumoral (TNM) de la 8^a edición de la AJCC:** T en función de los tejidos que van siendo invadidos, desde T1 hasta T4. N en función de la afectación ganglionar, desde N0 a N3. M si hay metástasis a distancia (M1). Si se precede de la letra “c” significa que la clasificación es clínica (cTNM). Si se precede de la letra “p” significa que la clasificación es patológica (pTNM) y ha sido aportado con el examen anatomo-patológico. Y si además se precede con la letra “y” significa que la clasificación patológica se realiza tras tratamiento neoadyuvante (ver clasificación del estadio patológico en tabla 7) ([169](#)).

CATEGORÍA pT	
pTx	El tumor primario no puede ser evaluado
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor limitado a un sitio de la supraglotis con movilidad normal de las cuerdas vocales
pT2	El tumor invade la mucosa de más de un sitio adyacente de la supraglotis o la glotis o la región fuera de la supraglotis (por ejemplo, la mucosa de la base de la lengua, la vallécula, la pared medial del seno piriforme) sin fijación de la laringe
pT3	Tumor limitado a la laringe con fijación a las cuerdas vocales y/o invade alguno de los siguientes: área postcricoidea, espacio preepiglótico, espacio paraglótico y/o corteza interna del cartílago tiroides
pT4	Moderadamente avanzado o muy avanzado
pT4a	Enfermedad local moderadamente avanzada. El tumor invade a través de la corteza externa del cartílago tiroides y/o invade los tejidos más allá de la laringe
pT4b	Enfermedad local muy avanzada. El tumor invade el espacio prevertebral, envuelve la arteria carótida o invade estructuras mediastínicas.

CATEGORÍA pN	
pNx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
pN0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
pN1	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral, de 3 cm o menos en su mayor dimensión y extensión extraganglionar negativa
pN2a	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral, de 3 cm o menos en su dimensión mayor y extensión extraganglionar positiva; o metástasis en un solo ganglio ipsilateral, mayor de 3 cm pero no mayor de 6 cm en su dimensión mayor y extensión extraganglionar negativa.
pN2b	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales, ninguno mayor de 6 cm en su mayor dimensión y extensión extraganglionar negativa
pN2c	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) bilateral(es) o contralateral(es), ninguno mayor de 6 cm en su mayor dimensión y extensión extraganglionar negativa
pN3a	Metástasis en un ganglio linfático de más de 6 cm de dimensión mayor y extensión extraganglionar negativa
pN3b	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral, mayor de 3 cm en su mayor dimensión y extensión extraganglionar positiva; o múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, contralaterales o bilaterales y cualquiera con extensión extraganglionar positiva; o un único ganglio contralateral de cualquier tamaño y extensión extraganglionar positiva (Los ganglios de la línea media se consideran ganglios ipsilaterales).
CATEGORÍA pM	
pM1	Metástasis a distancia

Tabla 7: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Resection Specimens from Patients with Cancers of the Larynx* (179).

Paciente 13:

Hombre de 62 años, exfumador desde hacía 20 meses que, en junio de 2017, mediante biopsia, se diagnosticó de carcinoma

escamoso de epiglotis bien diferenciado (Grado 1). Presentaba buen estado funcional (ECOG-PS: 0). Se estadificó como cT1aN0M0.

En julio del mismo año recibió radioterapia radical hasta alcanzar 66 Gy en 33 fracciones que finalizaron en agosto de 2017. En diciembre 2017 (5 meses después) se diagnosticó de recaída local y regional, por lo que se le practicó laringuectomía con linfadenectomía izquierda, en febrero de 2018. En esta pieza quirúrgica el diagnóstico fue de carcinoma escamoso moderadamente diferenciado (G2), supraglótico, con extensión bilateral, afectación de ambas cuerdas vocales, con invasión linfovascular y perineural. La expresión inmunohistoquímica para p16 resultó negativa. Se estadificó como pT3N3bM0.

Comenzó tratamiento con cisplatino y radioterapia concurrente (60 Gy). En abril de 2018, ante empeoramiento clínico, se realizó un PET-CT y se objetivó un nódulo pulmonar cuya biopsia se diagnosticó de carcinoma escamoso. La inoperabilidad hizo que la lesión se asumiera como metástasis, y se le administraron hasta 4 líneas de tratamiento, pero el paciente recayó de forma reiterada, con empeoramiento clínico. Su evolución fue tórpida, hasta el fallecimiento el 9 de abril de 2020.

Su supervivencia libre de progresión fue de 5 meses y supervivencia global de 33 meses.

El motivo de inclusión fue la recaída precoz.

Paciente 14:

Hombre de 62 años, exfumador desde hacía 24 meses que, en agosto de 2017, mediante biopsia, se diagnosticó de carcinoma escamoso de banda ventricular de laringe, bien diferenciado (Grado 1). Presentaba buen estado funcional (ECOG-PS: 1). Se estadificó como cT3N2aM0.

En octubre del mismo año recibió el esquema TPF (docetaxel, cisplatino y 5-FU) como neoadyuvancia. Tres semanas después del último TPF inició tratamiento con cetuximab-radioterapia.

En febrero de 2018 durante el curso del mismo, se objetivó progresión locorregional y sistémica (pulmonar y hepática) mediante TC. En marzo, en comité de tumores se decidió la administración de nivolumab. En noviembre del mismo año se registró, mediante TC, progresión durante el tratamiento en forma de metástasis pulmonares, hepáticas y ganglionares. En ese momento se le planteó la opción quirúrgica pero el paciente decidió esperar, pero un mes después, el 4 de enero de 2019, el paciente falleció.

Su supervivencia libre de progresión fue 4 meses y supervivencia global 14 meses.

El motivo de inclusión fue la refractariedad al tratamiento en curso de cetuximab-radioterapia.

CARACTERÍSTICAS DE LOS CARCINOMAS DE ESÓFAGO DISTAL

- **Tipo histológico:** El único caso con carcinoma gastrointestinal reclutado se trataba de un adenocarcinoma de esófago distal.
- **Grado histológico en función del grado de diferenciación:** 3 grados, desde bien diferenciado (G1) hasta pobremente diferenciado (G3).
- **Clasificación del estadio tumoral (TNM) de la 8^a edición de la AJCC:** T en función de los tejidos que van siendo invadidos, desde T1 hasta T4. N en función de la afectación ganglionar, desde N0 a N3. M si hay metástasis a distancia (M1). Si se precede de la letra “c” significa que la clasificación es clínica (cTNM). Si se precede de la letra “p” significa que la clasificación es patológica (pTNM) y ha sido aportado con el examen anatomo-patológico. Y si además se precede con la letra “y” significa que la clasificación patológica se realiza tras

tratamiento neoadyuvante (ver estadio patológico en tabla 8) (169).

CATEGORÍA pT	
pT no asignado	No se puede determinar en base a la información patológica disponible
pT0	Sin evidencia de tumor primario
pTis	Displasia de alto grado, definida como células malignas confinadas al epitelio por la membrana basal
pT1	El tumor invade la lámina propia, la mucosa muscular o la submucosa
pT1a	El tumor invade la lámina propia o la mucosa muscular
pT1b	El tumor invade la submucosa
pT2	El tumor invade la muscularis propria
pT3	El tumor invade la adventicia
pT4	El tumor invade las estructuras adyacentes
pT4a	El tumor invade la pleura, el pericardio, la vena ácigos, el diafragma o el peritoneo
pT4b	El tumor invade otras estructuras adyacentes, como la aorta, el cuerpo vertebral o las vías respiratorias
CATEGORÍA pN	
pN no asignado	No se ha encontrado ganglios o no se puede determinar en base a la información patológica disponible
pN0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
pN1	Metástasis en uno o dos ganglios linfáticos regionales
pN2	Metástasis en tres a seis ganglios linfáticos regionales
pN3	Metástasis en siete o más ganglios linfáticos regionales
CATEGORÍA pM	
pM1	Metástasis a distancia

Tabla 8: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Resection Specimens from Patients with Carcinoma of the Esophagus* ([180](#)).

Paciente 15:

Paciente de 55 años que en julio de 2018 fue diagnosticado, mediante biopsia endoscópica de adenocarcinoma de esófago distal, de tipo intestinal, grado 2. Se estadificó como cT3N2M0 mediante PET-CT y confirmación ganglionar con EUS (*endoscopic ultrasound - ecoendoscopia*).

En agosto inició quimioterapia neoadyuvante con esquema EOX (epirubicina, oxaliplatino, capecitabina) y tras tres ciclos fue sometido, en noviembre del mismo año, a esofaguectomía subtotal con linfadenectomía y gastroplastia de Akiyama (técnica de McKeown), sin incidencias inmediatas. El examen de la pieza quirúrgica fue de adenocarcinoma ypT3N2M0 con grado de regresión tumoral de Mandard de 1 (ver tabla 9), sobre esofagectomía con bordes quirúrgicos libres de neoplasia (R0), con complicaciones quirúrgicas (fístula cervical y estenosis esofágica). Recibió dos ciclos de quimioterapia adyuvante según esquema XELOX (oxaliplatino y capecitabina). Seis meses después de la cirugía, en mayo de 2019, se objetivó progresión pulmonar, pleural, hepática y ósea, terminando en éxitus al mes siguiente.

Su supervivencia libre de progresión fue de 6 meses y supervivencia global de 7 meses.

El motivo de inclusión fue la recaída precoz pese a la radicalidad del tratamiento local (R0 quirúrgico) con posterior adyuvancia, y la persistencia de enfermedad según el grado de regresión tumoral de Mandard (*Mandard tumour regression grading-TRG*) (ver tabla 9) (181).

GRADO DE REGRESIÓN TUMORAL	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
1	Regresión completa: Histológicamente no hay células cancerosas, sólo fibrosis
2	Aisladas células cancerosas residuales dispersas por la fibrosis
3	Más células cancerosas, pero sigue predominando la fibrosis
4	El cáncer residual supera la fibrosis
5	Ausencia de cambios regresivos

Tabla 9: Clasificación de la regresión tumoral tras el tratamiento neoadyuvante según Mandard. Fuente: Histomorphological tumor regression grading of esophageal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: which score to use?; R.M.Hermann (181).

CARACERÍSTICAS DE LOS CARCINOMAS DE TIROIDES

- **Tipo histológico:** en este estudio únicamente se pudo reclutar un caso de carcinoma de tiroides, y su diagnóstico fue de carcinoma folicular.
- **Clasificación de riesgo establecida por la “American Thyroid Association (ATA)”** (182): Establece el riesgo de

recurrencia de la enfermedad en pacientes que han sido tiroidectomizados y receptores de radioyodo. Los clasifica como riesgo bajo, intermedio o alto. En el caso del carcinoma folicular la clasificación es la siguiente:

Riesgo bajo
Cárcinoma folicular bien diferenciado, intratiroideo, con invasión capsular, sin invasión vascular o mínima (menos de 4 focos).
Riesgo intermedio
<ul style="list-style-type: none"> - Invasión microscópica a tejidos blandos peritiroideos. - Focos metastásicos captantes de yodo radiactivo en el cuello en el primer RTC postratamiento con radioyodo. - Histología agresiva. - N1 clínico o N1 patológico >5, con todos los ganglios afectos (de menos de 3 cm)
Riesgo alto
<ul style="list-style-type: none"> - Invasión macroscópica a tejidos blandos peritiroideos (extensión extratiroidea llamativa). - Resección incompleta del tumor. - Metástasis a distancia. - Tiroglobulina sérica postoperatoria sugestiva de metástasis a distancia. - N1 patológico con algún ganglio metastásico de más de 3 cm. - Cáncer folicular de tiroides con invasión vascular extensa (más de 4 focos).

Tabla 10: Sistema modificado (año 2015) de estratificación de riesgo de la ATA.

- **Estratificación dinámica de riesgo (EDR) (182):** Tiene en cuenta la respuesta al tratamiento, y hace la siguiente clasificación:
 - Respuesta excelente: no hay evidencia clínica, bioquímica o estructural de enfermedad.
 - Respuesta bioquímica incompleta: niveles anormales de tiroglobulina o anticuerpos anti-tiroglobulina que se elevan en ausencia de enfermedad localizable.
 - Respuesta estructural incompleta: metástasis persistentes o nuevamente identificadas, locales o a distancia.
 - Respuesta indeterminada: cambios estructurales o bioquímicos no específicos que no pueden clasificarse con certeza como benignos o malignos.
Incluye pacientes con niveles de anticuerpos anti-tiroglobulina estables o que disminuyen sin evidencia de enfermedad estructural.
- **Clasificación del estadio tumoral (TNM) de la 8^a edición de la AJCC:** T en función del tamaño de la lesión y la localización de la invasión, desde T1 hasta T4. N en función de la afectación ganglionar, desde N0 a N3. M si hay metástasis a distancia (M1). Si se precede de la letra "c" significa que la clasificación es clínica (cTNM). Si se

precede de la letra “p” significa que la clasificación es patológica (pTNM) y ha sido aportado con el examen anatomicopatológico. Y si además se precede con la letra “y” significa que la clasificación patológica se realiza tras tratamiento neoadyuvante (ver clasificación del estadio patológico en tabla 11) (169).

CATEGORÍA pT	
pT no asignado	No se puede determinar en base a la información patológica disponible
pT0	Sin evidencia de tumor primario
pT1	Tamaño del tumor menor o igual a 2 cm en su mayor dimensión, limitado a la tiroides
pT1a	Tumor menor o igual a 1 cm en su mayor dimensión, limitado a la tiroides
pT1b	Tumor mayor de 1 cm pero menor o igual a 2 cm en su mayor dimensión, limitado a la tiroides
pT2	Tumor mayor de 2 cm pero menor o igual a 4 cm en su mayor dimensión, limitado a la tiroides
pT3a	Tumor de más de 4 cm limitado a la tiroides
pT3b	Extensión extratiroidea bruta que invade sólo los músculos de la cintura (esternohioideo, esternotiroideo tirohioideo o omohioideo) de un tumor de cualquier tamaño
pT4	Incluye la extensión extratiroidea macroscópica más allá de los músculos de la correa (STRAP MUSCLES)
pT4a	Extensión extratiroidea macroscópica que invade los tejidos blandos subcutáneos, la laringe, la tráquea, el esófago o nervio laríngeo recurrente de un tumor de cualquier tamaño
pT4b	Extensión extratiroidea macroscópica que invade la fascia prevertebral o envuelve la arteria carótida o los vasos mediastínicos de un tumor de cualquier tamaño
CATEGORÍA pN	
pN no asignado	No se ha encontrado ganglios o no se puede determinar en base a la información patológica disponible
pN0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
pN1	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales

pN1a	Metástasis a los ganglios linfáticos de nivel VI o VII (pretraqueal, paratraqueal o prelaringeo / delfiano, o mediastínico superior). Puede ser una enfermedad unilateral o bilateral.
pN1b	Metástasis a los ganglios linfáticos laterales del cuello unilateral, bilateral o contralateral (niveles I, II, III, IV, o V) o a los ganglios linfáticos retrofaríngeos
CATEGORÍA pM	
pM1	Metástasis a distancia

Tabla 11: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinomas of the Thyroid Gland* ([183](#))

Paciente 16:

Hombre de 47 años que fue sometido, en agosto de 2016, a tiroidectomía total por nódulo tiroideo con PAAF (punción-aspiración con aguja fina) sospechosa de malignidad. El diagnóstico en la pieza quirúrgica fue de carcinoma folicular mínimamente invasor, de 3 x 2,6 cm, que afectaba focalmente la glándula paratiroides. Además, se objetivó un foco de invasión vascular. Se estadificó como pT3bN0M0. Según la agrupación de la AJCC por estadios, se trataba de un estadio III (ver tabla 12) ([183](#)). En noviembre de 2016 se realizó tratamiento posterior con Yodo 131, a dosis ablativa (100mCi) por restos en lecho tiroideo según PET-CT. Tras el mismo, la cifra de Tiroglobulina en sangre era menor de 0,2 ng/mL y no existía evidencia de enfermedad.

En febrero de 2017, mediante PET-CT, se diagnosticó recaída de la enfermedad. Se objetivaron metástasis hepáticas, óseas

(vértebra C2) y ganglionares (laterocervical bilateral). Se inició radioterapia paliativa sobre la vértebra C2. Durante la misma, se constató progresión ósea en pelvis y calota con afectación epidural e infiltrando el seno longitudinal superior. De nuevo, se administró radioterapia paliativa.

El caso fue etiquetado como “progresión extraordinariamente rápida y sintomática tras el tratamiento con radioyodo” haciendo sospechar resistencia al mismo. Añadiendo que las lesiones metastásicas eran altamente metabólicas en el PET, se decidió iniciar tratamiento con lenvatinib. Por otro lado, la realización de TC con contraste yodado no dejó opción para nuevo tratamiento con radioyodo.

El paciente falleció por progresión de la enfermedad tras 23 meses desde el diagnóstico, en enero de 2019.

< 55 años	
Estadio I	Cualquier T, N, M1
Estadio II	Cualquier T, N, M1
> 55 AÑOS	
Estadio I	T1-2 N0 M0
Estadio II	T3 N0 M0
Estadio III	T4a, cualquier N, M0
Estadio IVa	T4b, cualquier N, M0
Estadio IVb	Cualquier T/N, M1

Tabla 12: AJCC 8^a edición, TNM. Sistema de estadificación del cáncer de tiroides.

Su supervivencia libre de progresión fue de 6 meses y supervivencia global 23 meses.

El motivo de inclusión fue la recaída precoz y agresiva con resistencia al tratamiento con radioyodo.

CARACTERÍSTICAS DE LOS CARCINOMAS DE ENDOMETRIO

- **Tipo histológico:** en este estudio únicamente hubo un caso de carcinoma de endometrio, y fue diagnosticado como carcinoma endometrioides.
- **Grado histológico** en función de la arquitectura glandular, siguiendo el sistema de clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) para los carcinomas del cuerpo uterino que sólo se designa oficialmente para los carcinomas endometrioides y se basa en las características arquitectónicas siguientes ([184](#)):
 - Grado 1: ≤ 5% de crecimiento sólido no glandular y no escamoso
 - Grado 2: patrón de crecimiento sólido no escamoso del 6% al 50%
 - Grado 3: >50% de patrón de crecimiento sólido no escamoso
- **Estadio FIGO actualizado del año 2018** (tabla 13) ([185](#)):

I	Tumor confinado al cuerpo uterino
IA	No invade miometrio, o menos del 50%
IB	Invade más o igual al 50% del miometrio
II	Invade estroma del cérvix, pero no se extiende más allá del útero
III	Diseminación local y/o regional
IIIA	Invade serosa uterina y/o anejos
IIIB	Invade vagina y/o parametros
IIIC	Metástasis en ganglios pélvicos y/o paraórticos
IIIC1	Ganglios pélvicos positivos
IIIC2	Ganglios paraórticos positivos con o sin IIIC1
IV	Invade vejiga y/o mucosa intestinal, y/o metástasis a distancia
IVA	Invade vejiga y/o mucosa intestinal
IVB	Metástasis a distancia, incluyendo metástasis intraabdominal y/o ganglios inguinales

Tabla 13: Estadio FIGO actualizado del año 2018.

- **Clasificación del estadio tumoral (TNM) de la 8^a edición de la AJCC:** T en función de la profundidad de la infiltración, desde T1 hasta T4. N en función de la afectación ganglionar, desde N0 a N2. M si hay metástasis a distancia (M1). Si se precede de la letra “c” significa que la clasificación es clínica (cTNM). Si se precede de la letra “p” significa que la clasificación es patológica (pTNM) y ha sido aportado con el examen anatomo-patológico. Y si además se precede con la letra “y” significa que la clasificación patológica se realiza tras

tratamiento neoadyuvante (ver clasificación del estadio patológico en tabla 14) (169).

CATEGORÍA pT	
pT no asignado	No se puede determinar en base a la información patológica disponible
pT0	Sin evidencia de tumor primario
pT1	Tumor limitado al cuerpo uterino, incluida la afectación glandular endocervical
pT1a	Tumor limitado al endometrio o que invade menos de la mitad del miometrio
pT1b	Tumor que invade la mitad o más del miometrio
pT2	Tumor que invade el tejido conectivo estromal del cuello uterino, pero no se extiende más allá del útero
pT3	Tumor que afecta a la serosa, los anexos, la vagina o el parametrio
pT3a	Tumor que afecta a la serosa y/o al anexo (extensión directa o metástasis)
pT3b	Afectación de la vagina (extensión directa o metástasis) o afectación del parametrio
pT4	Tumor invade mucosa vesical y/o mucosa intestinal
CATEGORÍA pN	
pN no asignado	No se ha encontrado ganglios o no se puede determinar en base a la información patológica disponible
pN0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
pN0 (i+)	Células tumorales aisladas en ganglios linfáticos regionales no mayores de 0,2 mm
pN1mi	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales (mayor de 0,2 mm, pero no mayor de 2,0 mm de diámetro) a los ganglios linfáticos de la pelvis
pN1a	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales (mayor de 2,0 mm de diámetro) a los ganglios linfáticos pélvicos
pN2	Metástasis ganglionar regional a los ganglios linfáticos paraaórticos, con o sin ganglios linfáticos pélvicos positivos
pN2mi	Metástasis de los ganglios linfáticos regionales (mayor de 0,2 mm, pero no mayor de 2,0 mm de diámetro) a los ganglios linfáticos paraaórticos, con o sin ganglios linfáticos pélvicos positivos
pN2a	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales (mayor de 2,0 mm de diámetro) en los ganglios linfáticos paraaórticos, con o

	sin ganglios linfáticos pélvicos positivos paraórtica, con o sin ganglios linfáticos pélvicos positivos
CATEGORÍA pM	
pM1	Metástasis a distancia

Tabla 14: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma and Carcinosarcoma of the Endometrium.* (185)

Paciente 17:

Mujer de 81 años que fue diagnosticada mediante biopsia, en julio de 2015, de adenocarcinoma endometrioide de endometrio bien diferenciado grado 1. En agosto se le practicó histerectomía total con doble anexectomía sin linfadenectomía y resultó confirmativa para adenocarcinoma endometrioide de endometrio, G1, sobre pólipos endometriales, sin invasión linfovascular. Infiltraba focal y mínimamente el miometrio. Estadio FIGO IA. Se trataba de un carcinoma de endometrio de bajo riesgo (186). No recibió tratamiento adyuvante. En mayo de 2016 se identificó carcinomatosis peritoneal. Se realizó biopsia e informó de adenocarcinoma pobemente diferenciado con inmunofenotipo concordante con origen ginecológico. Recibió quimioterapia de primera línea con carboplatino-paclitaxel, observándose respuesta parcial (normalizó los marcadores) tras 6 ciclos. Se le pautó letrozol de mantenimiento, pero en abril de 2017 se observó recaída

pélvica de la enfermedad (masa pélvica y adenopatías inguinales) e hidronefrosis grado IV. Un mes después inició quimioterapia de segunda línea con carboplatino-paclitaxel. Respondió parcialmente tras 3 ciclos y de nuevo en febrero de 2018 progresó con enfermedad peritoneal y ascitis, por lo que recibió quimioterapia de tercera línea con adriamicina liposomal y bevacizumab. De nuevo se constató progresión de la enfermedad pélvica, así como comorbilidades renales principalmente (insuficiencia renal). La paciente entró en situación terminal y falleció en marzo de 2018.

Su supervivencia libre de progresión fue de 9 meses y supervivencia global 31 meses.

El motivo de inclusión fue precocidad de la recaída ante ausencia de infiltración profunda de miometrio e invasión linfovascular.

CARACTERÍSTICAS DE LOS CARCINOMAS DE PRÓSTATA

- **Tipo histológico:** en este estudio únicamente hay un caso de carcinoma de próstata y fue diagnosticado de adenocarcinoma acinar.
- **Grado histológico combinado de Gleason:** se basa en el grado de diferenciación glandular, en el cual se tienen

en cuenta 5 patrones, en el que el 1 es el mejor diferenciado y 5 es el peor. El patrón o grado combinado de Gleason se obtiene sumando los dos patrones predominantes en el tumor (187).

- **Clasificación del estadio tumoral (TNM) de la 8^a edición de la AJCC:** T en función de si el tumor está confinado a próstata o los órganos que invade, desde T2 hasta T4. N en función de la afectación ganglionar, desde N0 a N1. M si hay metástasis a distancia (M1). Si se precede de la letra “c” significa que la clasificación es clínica (cTNM). Si se precede de la letra “p” significa que la clasificación es patológica (pTNM) y ha sido aportado con el examen anatomico-patológico. Y si además se precede con la letra “y” significa que la clasificación patológica se realiza tras tratamiento neoadyuvante (tabla 15 clasificación del estadio patológico) (169).

CATEGORÍA pT	
pT2	Tumor confinado al órgano
pT3a	Extensión extraprostática o invasión microscópica del cuello vesical
pT3b	Tumor invade vesícula seminal
pT4	Tumor invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales, como el esfínter externo, el recto, la vejiga, los músculos elevadores y/o la pared pélvica
CATEGORÍA pN	

pN no asignado	No se ha encontrado ganglios o no se puede determinar en base a la información patológica disponible
pN0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
pN1	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales
CATEGORÍA pM	
pM1a	Metástasis en ganglios linfáticos no-regionales
pM1b	Metástasis ósea/s
pM1c	Metástasis en otras localizaciones con o sin enfermedad ósea

Tabla 15: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Radical Prostatectomy Specimens From Patients With Carcinoma of the Prostate Gland* ([188](#)).

Paciente 18:

Hombre de 82 años que en abril de 2018 fue diagnosticado de cáncer de próstata hormonosensible (CPHS) con metástasis óseas múltiples en gammagrafía ósea desde inicio (estadio M1b). En el estudio de extensión se realizó TC toraco-abdomino-pélvico sin hallazgos relevantes. Mediante 12 biopsias cilíndricas de próstata se constató adenocarcinoma acinar en 11 de ellas. El grado combinado de Gleason en la mayoría fue de 7 (3+4). No presentaba invasión vasculolinfática, pero sí perineural. Se estadificó como cT2N0M1b.

El 28 de mayo de 2018 inició tratamiento con terapia combinada (terapia deprivación androgénica y abiraterona) por decisión tomada en el comité de tumores, pese a que sólo

cumplía el criterio de metástasis óseas múltiples y el estudio de registro (189). Por tanto, no cumplía criterios de peor pronóstico, como un grado Gleason igual o mayor de 8, ni tampoco existía afectación visceral. En octubre del mismo año se observó deterioro clínico general, con metástasis hepáticas cuya biopsia fue diagnosticada de carcinoma con índice proliferativo ki67 cercano al 100%, sin objetivar diferenciación sarcomatoide ni neuroendocrina. Las técnicas inmunohistoquímicas descartaron otros orígenes distintos al prostático. En el estudio de imagen realizado (TC con contraste intravenoso) se descartó cualquier origen primario a otro nivel. Con todos los datos obtenidos, se asumió el origen prostático de la metástasis. Se decidió actitud paliativa ante el estado funcional y el rápido deterioro generalizado. Falleció en noviembre de 2018.

Su supervivencia libre de progresión fue de 5 meses y su supervivencia global 6 meses.

El motivo de inclusión fue la progresión precoz de enfermedad con resistencia temprana a la castración.

CARACTERÍSTICAS DE LOS CARCINOMAS DE VEJIGA

- **Tipo histológico:** en este estudio el único caso de carcinoma urotelial de vejiga que cumplió los criterios fue un carcinoma urotelial infiltrante.
- **Grado histológico:** bajo o alto, en función de la atipia citológica, el desorden arquitectural y las mitosis.
- **Clasificación del estadio tumoral (TNM) de la 8^a edición de la AJCC:** T en función del nivel de infiltración del tumor, desde T1 hasta T4. N en función de la afectación ganglionar, desde N0 a N3. M si hay metástasis a distancia (M1). Si se precede de la letra “c” significa que la clasificación es clínica (cTNM). Si se precede de la letra “p” significa que la clasificación es patológica (pTNM) y ha sido aportado con el examen anatomo-patológico. Y si además se precede con la letra “y” significa que la clasificación patológica se realiza tras tratamiento neoadyuvante (tabla 16 clasificación del estadio patológico) ([169](#)).

CATEGORÍA pT	
pT no asignado	No se puede determinar en base a la información patológica disponible
pT0	Sin evidencia de tumor primario
pTa	Carcinoma papilar no-invasor
pTis	Carcinoma urotelial in situ
pT1	Tumor invade lámina propia
pT2a	Tumor invade muscular propia superficial
pT2b	Tumor invade muscular propia profunda
pT3a	Tumor invade tejidos blandos perivesicales, microscópicamente

pT3b	Tumor invade tejidos blandos perivesicales, macroscópicamente
pT4a	Tumor extravesical invade próstata, útero o vagina.
pT4b	Tumor extravesical invade pared pélvica o abdominal..
CATEGORÍA pN	
pN no asignado	No se ha encontrado ganglios o no se puede determinar en base a la información patológica disponible
pN0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos
pN1	Metástasis de un solo ganglio linfático regional en la pelvis verdadera (ganglio perivesical, obturador, interno e ilíaca externa o sacra)
pN2	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos regionales en la pelvis verdadera (ganglio perivesical, obturador, interno e ilíaca externa o sacra)
pN3	Metástasis en los ganglios linfáticos ilíacos comunes
CATEGORÍA pM	
pM1a	Metástasis distantes limitadas a los ganglios linfáticos más allá de las ilíacas comunes
pM1b	Metástasis a distancia (no ganglionares)

Tabla 16: Clasificación del estadio patológico (pTNM, AJCC 8^a edición).

Fuente: *College of American Pathologists; Protocol for the Examination of Cystectomy Specimens From Patients With Carcinoma of the Urinary Bladder (190)*.

Paciente 19:

Varón de 67 años diagnosticado en septiembre de 2018, tras resección transuretral vesical, de carcinoma urotelial de alto grado, con infiltración de la capa muscular propia. En las pruebas de imagen (TC) no se identificaron otros hallazgos relevantes. Se estadificó como pT2N0M0.

En octubre del mismo año se le practicó cistoprostatectomía radical con linfadenectomía ilíaca y obturatrix bilateral. El

resultado del estudio de las piezas quirúrgicas fue de carcinoma urotelial de alto grado con infiltración microscópica de la grasa perivesical, sin infiltración de ninguno de los 44 ganglios linfáticos aislados (28 izquierdos y 16 derechos). En este caso se estadificó como pT3aN0M0. El 25 de noviembre del mismo año se realizó TC por empeoramiento clínico, identificando carcinomatosis peritoneal. Se decidió actitud paliativa por el estado funcional deteriorado. El paciente falleció el 28 de noviembre de 2018.

Su supervivencia libre de progresión fue de 1 mes y supervivencia global 1 mes y 3 días.

El motivo de inclusión fue la recaída precoz y comportamiento agresivo del tumor, no esperable ante los hallazgos clínico-patológicos.

En la tabla 17 se resumen las características de todos los pacientes con carcinomas no-mamarios para una mejor visualización.

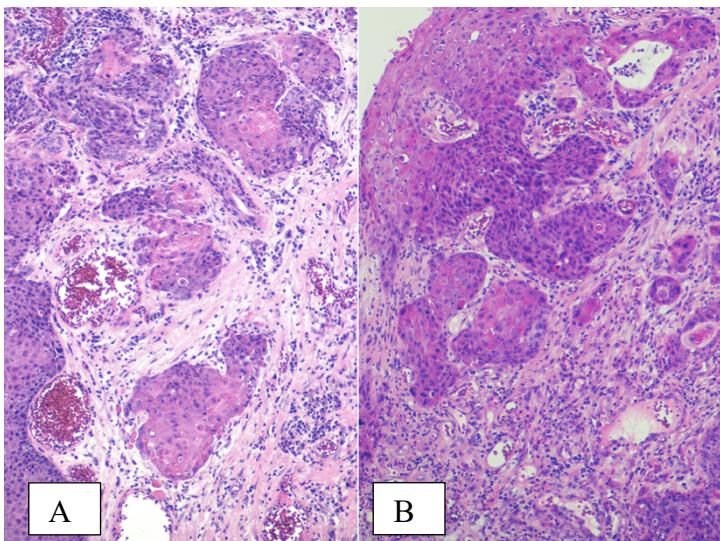
P	EDAD	DIAGNÓSTICO	GRADO	ESTADIO	ME	MS
13	62	C.Escamoso de epiglotis	1	T1aN0M0	Recaída temprana	Pre-tto

					post-RT curativa	
14	62	C.Escamoso de banda ventricular	1	T3N2aM0	Progresión durante RT, tras cetuximab	Pre-tto
15	55	ADC de esófago distal	2	T3N2M0	Recaída temprana tras Qx curativa	Post-Qx
16	47	C. Folicular (tiroides)		T3bN0M0	Recaída temprana post-tiroidectomía y radioyodo	Pre-tto
17	81	ADC endometrioides (endometrio)	1	No se puede obtener	Recaída temprana tras Qx	Pre-tto
18	82	ADC prostático	Gleason 7	T2N0M1b	Recaída a los 5m del inicio ABI+TDA	Pre-tto
19	67	C. Urotelial infiltrante (vejiga)	Alto grado	T2N0M0	Recaída tras cistectomía	Pre-tto

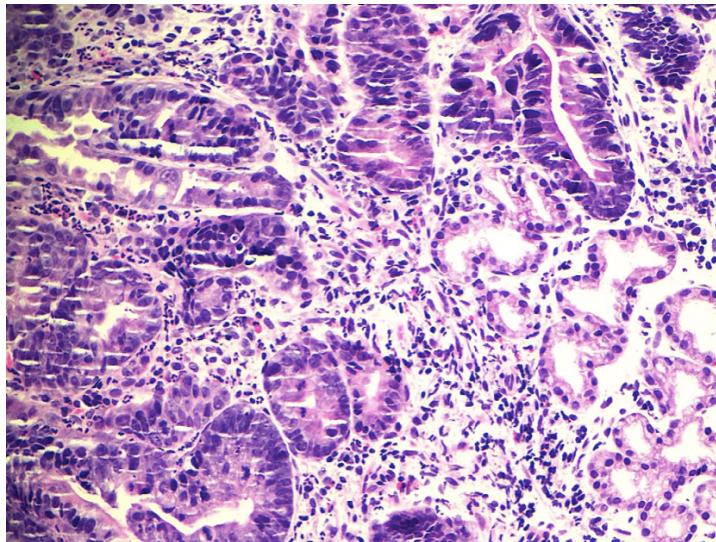
Tabla 17: Características de los carcinomas no-mamarios. P: paciente, ME: motivo principal por el que se estudió la inclusión de este paciente en este trabajo, MS: momento en que el material fue secuenciado en relación al tratamiento, TTO: tratamiento, C: carcinoma, ADC: adenocarcinoma, RT:

radioterapia, Qx: cirugía, ABI: abiraterona, TDA: terapia deprivación androgénica.

- **IMÁGENES HISTOLÓGICAS**

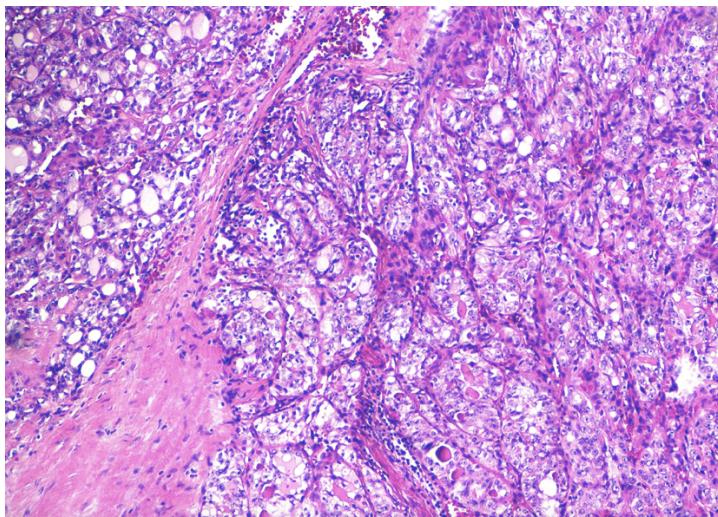


Pacientes 13 y 4 (carcinoma escamoso de laringe): Imagen con H&E a 100x (A; paciente 13, epiglotis. B; paciente 14, banda ventricular laríngea).



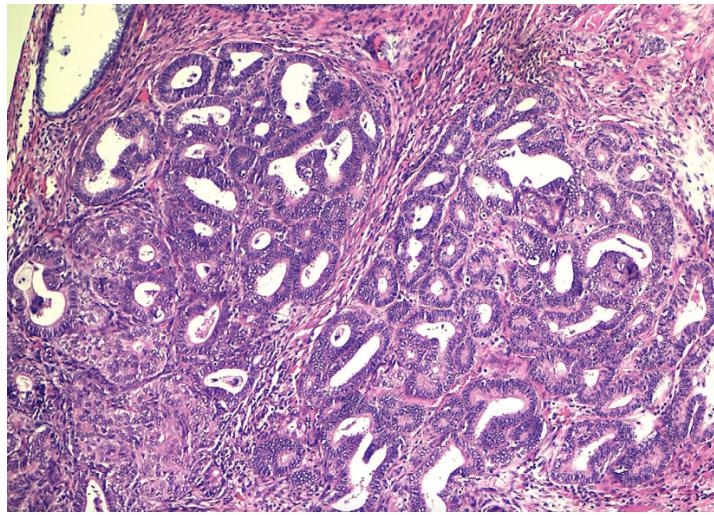
Paciente 15 (adenocarcinoma de esófago distal): Imagen con

H&E a 200x



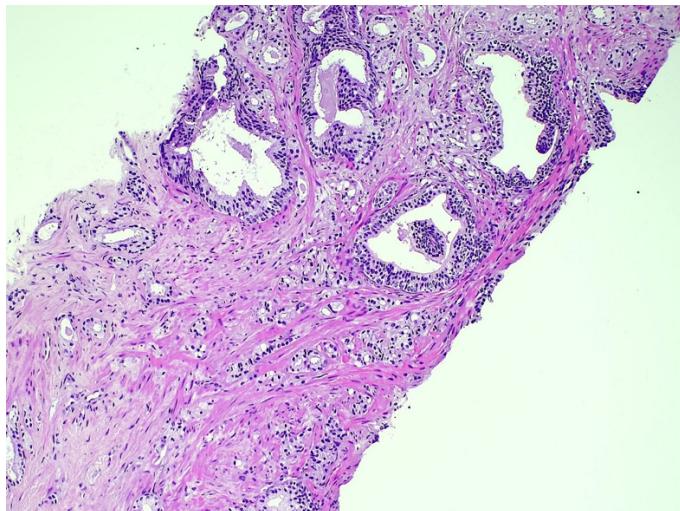
Paciente 16 (carcinoma folicular de tiroides): Imagen con H&E a

100x



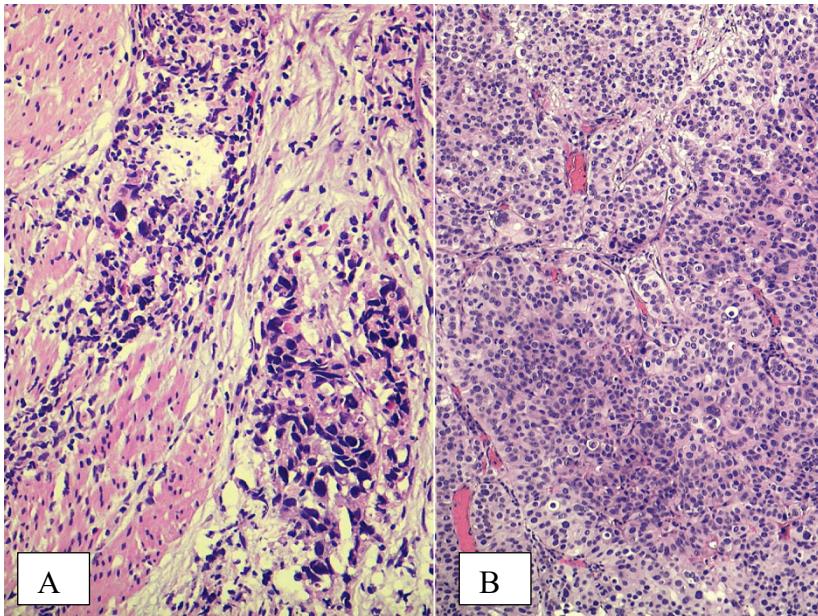
Paciente 17 (adenocarcinoma endometrioid de endometrio):

Imagen con H&E a 100x



Paciente 18 (adenocarcinoma acinar de próstata): Imagen con

H&E a 100x



Paciente 19 (carcinoma urotelial papilar de vejiga): Imagen con H&E (A: invasión de capa muscular propia a 200x) (B: parte superficial del tumor a 100x)

- **DATOS MOLECULARES OBTENIDOS MEDIANTE NGS**

Tras la secuenciación del ADN, los resultados observados fueron variaciones de nucleótido único (SNV) y variaciones en el número de copias (CNV), todas de origen somático. Las SNV se definieron por el cromosoma en el que se localizaban, la posición de la base nitrogenada en el mismo, la frecuencia alélica, la variante en el tránskrito y las posiciones en el ADN complementario y en la proteína, así como por la clasificación funcional acorde con la ACMG (Tabla 18).

P	GEN CON SNV	POSICIÓN	VARIANTE	VAF	CF
13	<i>TP53</i>	17:7578370	NM_000546.5 c.559+1G>T No se traduce a proteína	42% (332X)	Patogénica
	<i>PBMR1</i>	3: 52595925	NM_018313.4 c.3985_3989del p.Ile1329HisfsTer10	26% (186x)	Patogénica
14	<i>TP53</i>	17:7578271	NM_000314.4 c.578A>G p.His193Arg	47.22% (36X)	Patogénica
	<i>BRAF</i>	7:140508706	NM_004333.4 c.594C>G p.Tyr198Ter	18.18% (44X)	Patogénica
15	<i>ARID1A</i>	1: 27105517	NM_006015.4 c.5130_5164del p.Gly1711MetfsTer4	48.12% (133X)	Patogénica
	<i>TP53</i>	17:7578527	NM_000546.5 c.403T>G p.Cys135Gly	41.49% (388X)	Patogénica
16	<i>PTEN</i>	10:89717672	NM_000314.4 c.697C>T p.Arg233Ter	69.6% (79x)	Patogénica

	<i>TP53</i>	17: 7577559	NM_000546.5 c.722C>T p.Ser241Phe	53.8% (104x)	Patogénica
17	<i>PIK3CA</i>	3:178927457	NM_006218.2 c.1220G>T p.Cys407Phe	5.67% (247X)	Patogénica
	<i>CTNNB1</i>	3:41266125	NM_001904.3 c.122C>T p.Thr41Ile	21.15% (279X)	Patogénica
18	<i>PIK3CA</i>	3:178936082	NM_006218.2 c.1624G>A p.Glu542Lys	10.6% (151x)	Patogénica
	<i>TP53</i>	17: 7577094	NM_000546.5 c.844C>T p.Arg282Trp	10.41% (269x)	Patogénica
19	<i>PIK3CA</i>	3:178936091	NM_006218.2 c.1633G>A p.Glu545Lys	24,41% 299X	Patogénica
	<i>FGFR3</i>	4: 1803568	NM_000142.4 c.746C>G p.Ser249Cys	36,81% 864X	Patogénica

Tabla 18: Descripción de SNVs. *P*: paciente; *VAF*: Variant allele frequency (frecuencia alélila de la variante); *CF*: clasificación funcional; *SNV*: single-nucleotide variants.

*En el paciente 13, la alteración identificada no se traduce en una proteína, sino que altera el splicing o ayuste.

Por otro lado, tal y como se realizó en los carcinomas mamarios, el análisis de variaciones en el número de copias detectó ganancias y amplificaciones (más de 3 copias) en tres pacientes.

Las CNV más relevantes, sugeridas por el análisis bioinformático realizado en el Instituto de Medicina Genómica, se muestran en la tabla 19.

PACIENTE	GENES Y TIPO DE CNV
15	MET: Amplificación EGFR: Ganancia
16	Cromosoma 5 y 7: Ganancia TERT: Amplificación
17	1q: Ganancia

Tabla 19: CNVs sugeridas por el análisis bioinformático basado en los resultados de la secuenciación.

Como resumen de los resultados, se identificaron alteraciones en genes *driver* en el 100% de las muestras de carcinomas no-mamarios, viéndose alteración del gen TP53 en más del 65% de los pacientes.

En ninguno de los casos se identificó genes de fusión, inestabilidad de microsatélites, o alteraciones en la línea germinal.

4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

El análisis de la supervivencia de los pacientes con carcinomas no-mamarios no fue aplicable dada la casuística insuficiente. El grupo de pacientes más numeroso fue el conformado por los casos con carcinoma mamario, por lo que es del que se puede realizar el análisis.

Entre los carcinomas mamarios, dos pacientes murieron por causas distintas al cáncer y sus datos fueron censurados en el análisis de supervivencia. Además, dos de las pacientes fueron diagnosticadas de enfermedad en estadio IV, y su supervivencia se presenta por separado.

Los análisis de la supervivencia global por causas específicas para los pacientes sin metástasis mostraron una mediana de supervivencia global de 58 meses para los casos con cáncer luminal, y de 16 meses para los casos con enfermedad triple negativa. Por otro lado, de los dos pacientes con metástasis, el paciente número dos (luminal A) tuvo una supervivencia de nueve meses, y el paciente número 12 (triple negativo) tuvo una supervivencia de 23 meses.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El presente estudio describe las mutaciones somáticas detectadas mediante secuenciación NGS, empleando un panel customizado, en una serie de 19 casos de carcinoma que han recaído o sido resistentes o refractarios, precozmente, a la terapia aplicada según la práctica clínica habitual.

Ante los resultados obtenidos, y con el fin y con el fin de facilitar la discusión y la comprensión de la misma, se distinguirá en su desarrollo según el diagnóstico del tumor primario entre casos con diagnóstico de carcinoma mamario y casos con diagnóstico diferente al mismo.

1. DISCUSIÓN DE LOS CASOS CON DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA MAMARIO

La inclusión de las pacientes 1, 2 y 3 fue inducida porque las pacientes con tumores del tipo luminal A tienen el pronóstico más favorable de todos los subtipos de carcinoma mamario con tasas de recaída local y regional de sólo 8% y 3% a los 10 años, respectivamente (191).

Además, a la paciente 1 se le debería añadir la reducción en la recurrencia debida a la adición de tamoxifeno adyuvante tal y como se refleja en la literatura ya que, tras su estudio durante más de 10 años, se ha visto una reducción en la recurrencia de

0,53 durante los primeros 4 años y de 0,68 entre el quinto y noveno año; siendo estadísticamente significativa en ambos casos. Así, el promedio de la tasa de reducción durante todos los períodos de tiempo ha sido del 39% (reducción en la recurrencia de 0,61 estadísticamente significativa) para cualquier tipo de recurrencia. Estos mismos datos justifican la inclusión de la paciente 6, con carcinoma luminal B con receptores estrogénicos del 100% que recayó durante dicha adyuvancia. Hay que tener en cuenta para estas pacientes con tumores positivos para receptores estrogénicos, que la reducción en la recurrencia se ha visto independiente de otros factores como el receptor de progesterona, edad o situación ganglionar ([192](#)).

De forma general, las micrometástasis ganglionares presentan una supervivencia libre de recaída a los dos años cercana al 95%. Este dato mejora en caso de positividad hormonal y tratamiento adyuvante, como es el caso de la paciente 1 ([193](#)). La precoz recurrencia de la enfermedad alejaba la evolución de este caso de las cifras publicadas en la literatura, lo cual, justificó su inclusión ([194,195](#)).

La paciente 2 había iniciado tratamiento con palbociclibo-letrozol, tratamiento que, en el brazo experimental del estudio en fase III que demostró el beneficio de la combinación, había

permitido una supervivencia libre de progresión, según intención de tratamiento y con revisión independiente, de 30,5 meses (I.C. 95% , 24.7 - no alcanzado) entre las 444 pacientes tratadas (196). Por tanto, la refractariedad al tratamiento tras 2 meses con dicha combinación, sin características clínicas adversas, se alejaba, de nuevo, de lo esperado según los resultados de la literatura.

Por otro lado, en los carcinomas de mama con receptores estrogénicos positivos, recidivados o metastásicos de novo, el metaanálisis de J.L.Caswell-Jin et al estima una mediana de supervivencia no ajustada de 57 meses (IC 95% 37-87). La supervivencia global de 9 meses de la paciente 2 reforzaba su inclusión. (197).

La consideración del caso 3 quedaba justificada gracias al estudio aleatorizado en pacientes con cáncer de mama avanzado con receptores hormonales positivos y HER2 negativo, sin tratamiento previo, en situación metastásica y con criterios de sensibilidad a endocrinoterapia (198). El grupo de pacientes que recibió fulvestrant-palbociclib mostró una supervivencia libre de progresión de 27,9 meses (IC 95%, 24,2-33,1). El haber recibido tratamiento hormonal adyuvante, de acuerdo con los criterios de hormonosensibilidad para la inclusión, no mostró resultados diferentes al realizar el análisis

por subgrupos. Por tanto, a tenor de lo referido, una supervivencia libre de progresión de 3 meses quedaba fuera de toda expectativa.

En un estudio retrospectivo publicado en 2010 sobre factores predictores de progresión tumoral durante el tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama, se constató estabilización de enfermedad en el 6% de las pacientes y progresión de enfermedad durante el tratamiento en sólo el 3% (199). Se identificaron como factores independientes, es decir, predictores de progresión más importantes en el análisis multivariante, la raza diferente a la blanca (OR 2,07; IC 95% 1,12-3,84; p= 0,02), estadio T3 pretratamiento (OR 6,31; IC 95% 1,81-21,97; p =0,004) y la negatividad para RE (RE positivo con OR 0,24; IC 95% 0,13-0,44; p < 0,001). Así, aunque la negatividad de los receptores de progesterona, el elevado Ki67 y el tratamiento con taxanos se identificaron como factores predictores en el análisis univariante, no demostraron valor independiente en el análisis multivariante.

En las pacientes 4 y 5, cuya supervivencia libre de progresión fue de 5 meses, y en la paciente 7 que fue de 6 meses, no se dio ninguna de las tres circunstancias mencionadas, lo cual motivó su inclusión en el estudio. Además, la literatura describe que la supervivencia libre de progresión a 12 meses en carcinomas mamarios luminales no-metastásicos es del 90% y

la supervivencia global a 10 años es del 62% en la enfermedad locorregional y del 89% en la enfermedad localizada (194,200), reforzando la inclusión de las pacientes.

Las pacientes 8 y 9 se encontraban en tratamiento neoadyuvante con taxanos en el momento de la progresión. El corto tiempo a dicha progresión resultó llamativo, dado que en la literatura se han descrito, en pacientes con cáncer de mama triple negativo no-metastásico y sometidas a neoadyuvancia con antraciclinas y taxanos, supervivencias libres de progresión cercanas a los 12 meses en más del 90 % de los pacientes que recibieron este esquema (200,201).

Por otro lado, sus supervivencias globales se han visto acortadas, mostrándose en trabajos publicados supervivencias globales a 10 años del 89% en el cáncer de mama localizado y del 62% en la enfermedad locorregional (194).

Los tumores de las pacientes 10 y 11 contaban con índices de proliferación (ki67) del 80%, y la paciente 12 del 70%, pero mostraron refractariedad al tratamiento con progresión precoz de la enfermedad durante el tratamiento con taxanos, así como unas supervivencias libres de progresión de 2, 5 y 3 meses respectivamente. Qi-Xin Tan y su equipo demostraron en un análisis multivariante que los tumores con alta expresión de Ki67 tienen una importante tendencia hacia una mayor tasa de

respuesta patológica completa (OR 2,58; IC 95% 1,24-9,18; P = 0,006) (202). Por ello resultó sorprende la evolución de los pacientes. A esto se añade la relación, estadísticamente significativa, entre el índice ki67 previo a la quimioterapia y la respuesta patológica en grados de Miller y Payne (MP) (ver tabla 20), establecida por Ruo-Xi Wang y su equipo. Los valores medios de Ki67 de los carcinomas mamarios triple negativos que estudiaron fueron del 52,8% para el MP 5, del 47,4% para el MP 4, del 30,9% para el MP 3, del 29,5% para el MP 2 y del 13,5% para el MP 1. Hubo una diferencia significativa entre una respuesta completa y una respuesta parcial (MP 5 frente a MP 3, P < 0,001) y entre una respuesta parcial y ninguna respuesta (MP 3 frente a MP 1, P = 0,002) (203). Por tanto, hubiera sido esperable una mayor respuesta a la quimioterapia en nuestros casos.

1	sin cambios en la celularidad infiltrante
2	reducción del 30% de la celularidad infiltrante
3	reducción del 30-90% de la celularidad infiltrante
4	reducción >90% de la celularidad infiltrante
5	no se objetiva celularidad infiltrante

Tabla 20: Grados de Miller y Payne: respuesta patológica local a la quimioterapia.

En las pacientes 10 y 11 se añade que las supervivencias libres de progresión, en los carcinomas triple negativos no-metastásicos, descritas en la literatura están próximas a los 12 meses en más del 90 % de los pacientes que recibieron este esquema de tratamiento (200,201).

Por otro lado, el metaanálisis de J.L.Caswell-Jin et al estima una mediana de supervivencia no ajustada en los carcinomas de mama metastásicos de novo negativos para receptores estrogénicos, de 33 meses (IC 95% 21-51). La paciente 12, que cumplía con estas características tuvo una supervivencia de 23 meses (197).

En cuanto a la discusión global del carcinoma mamario cabe destacar que fue la neoplasia diagnosticada con más frecuencia en el mundo, en el año 2020, con un total de 2.261.419 casos. En España se estima que este carcinoma será el más diagnosticado en el año 2022, entre las mujeres, con más de 34.000 casos. Además de su alta incidencia, el 20-30% de las pacientes recae, a pesar de las terapias adecuadas, debido a complejos mecanismos moleculares implicados en su progresión y resistencia (3,204).

Estas altas frecuencias descritas en la literatura quedan reflejadas en este estudio en el que, de una muestra de 19

pacientes, 12 de los casos con criterios de inclusión en el periodo de tiempo estudiado fueron carcinomas mamarios en mujeres.

Las mutaciones obtenidas en nuestra serie, tras la secuenciación masiva, se localizaron en los genes TP53, PIK3CA, PTEN y ARID1A, entre otros (Figura 21). Se correlacionan con los genes que mutan con mayor frecuencia en los tumores pan-gyn (cáncer ginecológico y de mama) identificados por Berger et al. como parte del proyecto TCGA Pan-Cancer Atlas. (57)



Figura 22: Genes en los que se observaron alteraciones en nuestra serie de carcinomas de mama.

En ocho de los casos, se identificaron variantes del gen TP53, lo que supuso el 66,7% del total de la serie de carcinomas mamarios. Estos pacientes recayeron precozmente, después -o durante- el tratamiento, por tanto, constituyeron un grupo de mal pronóstico. El TP53 es un gen supresor de tumores, conocido como "el guardián del genoma", y las mutaciones en este gen son una de las más frecuentes en el carcinoma de

mama, identificándose en casi el 30% de los casos (205). La literatura muestra resultados contradictorios en cuanto a la relevancia clínica de su estado mutado, ya que se ha asociado a resultados negativos, positivos y neutros, por lo que sigue siendo objeto de debate (205). Por tanto, no parece que el curso agresivo observado en nuestras pacientes pueda explicarse únicamente por la alteración de este gen.

Un alto porcentaje de estas pacientes (50%) tenía una alteración en la vía PTEN-PI3K-AKT-mTOR. Esta vía tiene un papel fundamental en la proliferación, crecimiento y supervivencia celular, siendo un biomarcador de mal pronóstico que puede haber participado en el comportamiento de los casos que la presentaron (206). En concreto, se detectaron variantes activadoras de los oncogenes PIK3CA y mTOR en el 33,3% (tres luminales A, y un luminal B que resultó triple negativo en la muestra quirúrgica post-tratamiento) y en el 8,3% (un luminal B), respectivamente, y variantes inhibidoras de la función del gen supresor tumoral PTEN en el 8,3% (un triple negativo). Es especialmente relevante que PIK3CA y mTOR sean biomarcadores predictivos de resistencia a diversos tratamientos: PIK3CA a la terapia hormonal en cáncer de mama con receptores hormonales positivos, a los quimioterápicos en general, y a las terapias anti-HER2 en los carcinomas HER2-positivos, y mTOR a múltiples fármacos, particularmente al

tamoxifeno (modulador selectivo de receptores de estrógenos). Son tan relevantes que la FDA y la EMA aprobaron el uso del inhibidor de PI3K, alpelisib, en combinación con fulvestrant en mujeres posmenopáusicas y hombres, con cáncer de mama positivo para receptores estrogénicos, HER2 negativos, metastásicos o avanzados, que son refractarios a hormonoterapia y tienen una alteración en el gen PIK3CA (estudio SOLAR-1); así como el uso de everolimus, un inhibidor de mTOR, en combinación con exemestano (un inhibidor de la aromatasa) en pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama luminal o metastásico refractario al tratamiento con inhibidores de la aromatasa (ensayo BOLERO-2) (207,208).

Siguiendo estos criterios, la paciente 2, una mujer de 76 años con carcinoma luminal refractario a terapia hormonal y metastásico, habría sido candidata a recibir terapia dirigida con alpelisib, lo que justificaría haber estudiado previamente el estado del gen PIK3CA.

Del mismo modo, dado que PTEN es el principal inhibidor de la vía PI3K, se podría pensar que la paciente 11, con disfunción del mismo, podría beneficiarse también de los inhibidores de la vía. Sin embargo, hay equipos que ya han evaluado a los inhibidores de mTOR y de AKT para este propósito y no se ha encontrado evidencia suficiente para recomendar un fármaco específico en presencia de mutación de PTEN (19).

Por otro lado, el 16,7% de estas pacientes con enfermedad mamaria presentó alteración en genes que codifican proteínas del complejo SWI-SNF remodelador de la cromatina. La paciente 1 sufrió pérdida completa del gen PBMR1 y la paciente 6 una SNV en el gen ARID1A.

Está descrito que, aproximadamente el 20% de todos los tumores humanos, contiene alteraciones en este complejo, y el que muta más frecuentemente en el cáncer de mama positivo para receptores estrogénicos es el gen ARID1A (32,36).

La paciente 6, que tenía el subtipo luminal B, presentaba una mutación inactivadora de ARID1A. La pérdida de función de este gen se ha asociado con la resistencia a la hormonoterapia y a una mala supervivencia libre de enfermedad (32). Esta paciente tuvo una evolución extremadamente rápida, progresó al tratamiento con quimio-radioterapia y volvió a progresar con la combinación de palbociclib-fulvestrant, lo que podría explicarse por los hallazgos descritos anteriormente, y estaría en línea con lo descrito en un estudio del año 2020 sobre la pérdida de función de ARID1A y la resistencia al degradador selectivo de receptores estrogénicos, fulvestrant (32). Por otro lado, la inestabilidad genómica asociada a defectos en algunas subunidades de SWI-SNF, como ARID1A o PBMR1, sugiere una mayor generación de neoantígenos por parte de las células

portadoras, lo que indica que estos tumores son mejores dianas para la inmunoterapia. Por tanto, el conocimiento previo de esta alteración podría permitir un plan terapéutico diferente, orientando dicho plan específicamente a esa mutación.

Siguiendo con las alteraciones del complejo SWI-SNF, la pérdida de PBMR1 podría haber participado en el mal resultado del paciente 1, ya que se considera un posible biomarcador pronóstico en carcinoma mamario asociado a malos resultados clínicos (36).

Continuando con los genes que codifican proteínas de remodelación de cromatina, además del complejo SWI-SNF, en esta serie de casos de mama se ha identificado la pérdida completa del gen ATRX en la paciente 2. La pérdida de ATRX se ha correlacionado con el alargamiento alternativo de los telómeros (un mecanismo no dependiente de la telomerasa), con el daño al ADN, con el estrés replicativo y con otras funciones celulares relacionadas con la regulación epigenética. No obstante sus funciones críticas en el cáncer y por tanto su relevancia clínica en este caso, están por descubrir (37).

También en la paciente 2 se identificó la ganancia completa del gen HIST1H3H. Como gen codificador de histonas, su alteración

tiene un papel importante en el desarrollo y pronóstico del cáncer. Sin embargo, sigue siendo difícil saber la relevancia clínica que tiene. Se sospecha que la alteración de los genes de la familia de las histonas puede ser útil como biomarcador de mal pronóstico, pero se han hecho muy pocos análisis para comprobarlo (75,76).

Más del 16% de esta serie de carcinomas de mama ha presentado alteraciones en los genes de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK): Vía RAS-RAF-MEK-ERK. La paciente 2 presentaba una ganancia parcial de BRAF, y el paciente 11 tenía una SNV en HRAS.

Esta vía desempeña un papel importante en la fisiopatología del cáncer de mama, y su activación persistente se ha asociado con el crecimiento y la actividad metastásica de este cáncer (209). A su vez, se ha reportado que las mutaciones en los miembros de la familia RAS y RAF son eventos muy raros en el carcinoma mamario (210,211). Según COSMIC, la frecuencia de mutaciones en RAS es inferior al 1% (210).

Por otro lado, se ha descrito que la mutación de un miembro de la familia RAS conduce a la activación constitutiva de algunas de las vías que modula, como la vía PI3K, ya alterada en el paciente 11 debido a la disfunción de PTEN, lo que sugiere que ambas alteraciones podrían haber participado en la

evolución irregular del caso. Su potencial terapéutico sigue siendo objeto de investigación (209).

En el caso de los genes RAF en el carcinoma mamario, las mutaciones BRAF no V600E no se han estudiado ampliamente en la literatura. Hay un estudio del año 2020 que examinó la asociación de la vía BRAF/MEK con el riesgo de recidiva del cáncer de mama. Propuso que esta vía podría ser un biomarcador de recurrencia basado en el estado de los receptores estrogénicos, lo que sugeriría su implicación en la recaída de la paciente 2 (211).

La paciente 2 también tenía una ganancia parcial de MYC y MET, genes cuyas mutaciones están descritas como biomarcadores de mal pronóstico, y apoyarían la mala evolución de la paciente (53). La amplificación de MYC podría explicar la resistencia de la paciente a la terapia hormonal que recibió, en este caso al letrozol (un inhibidor de la aromatasa), que se administró en combinación con palbociclib (53). Aunque un tratamiento dirigido a MYC existe y parecería la estrategia lógica, diferentes estudios destacan su ineeficacia en estos casos (212,213). En su lugar, se podría reflexionar sobre el papel que podría tener el receptor tirosina cinasa (RTK) codificado por el gen MET, propuesto en trabajos recientes como potencial diana terapéutica en el cáncer de mama avanzado (212,213).

También existen otras alteraciones genéticas que, aunque no hayan llegado aún a la práctica clínica, son relativamente frecuentes en el cáncer de mama. Por ejemplo, la sobreexpresión del EGFR, que se asocia a un mal resultado clínico, está descrita en el 15-30% de los casos de cáncer de mama (214), pero en nuestro estudio, que incluyó a pacientes con mal resultado, sólo se observó en un caso luminal B en biopsia diagnóstica, que en la pieza quirúrgica fue diagnosticada como triple negativa (la paciente 7). A pesar de la existencia de la terapia anti-EGFR, no se habría utilizado en esta paciente, porque los ensayos clínicos han mostrado resultados decepcionantes en el cáncer de mama triple negativo. Pese a ello, para futuros casos sería conveniente tener en cuenta que algunos equipos han informado de que la eficacia de dicha terapia aumentaría si los anticuerpos monoclonales anti-RTK se combinaran con inhibidores del punto de control inmunitario, como PD1 o CTLA-4 (214).

Las aberraciones genéticas en el FGFR también son frecuentes en el cáncer de mama. La literatura muestra que la amplificación de FGFR1 se ha observado en el 15% de los casos de carcinoma con receptores hormonales positivos (96). La paciente 6 tenía la amplificación de este gen, lo que podría explicar la rápida evolución y desarrollo de la enfermedad

metastásica, causada por la falta de respuesta a la hormonoterapia, ya que actúa como biomarcador pronóstico y predictivo (96). La paciente 2 presentaba una ganancia parcial del gen, sin llegar a la amplificación, por lo que no tendría, en principio, relevancia clínica, por lo que requeriría la confirmación con MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), la técnica estándar para CNVs (215). En un futuro próximo, las pruebas del FGFR abrirán la posibilidad de una terapia dirigida (96).

Por último, cabe destacar la detección de una mutación en genes de susceptibilidad para el cáncer de mama, como el BRCA, ya que constituyen un factor pronóstico, un factor predictivo para el tratamiento con terapias dirigidas y, cuando se encuentran en la línea germinal, un factor de riesgo para el desarrollo de diferentes neoplasias (25). En nuestra muestra, sólo se encontró un caso con una alteración en el gen BRCA1, una paciente luminal B cuyo espécimen quirúrgico fue diagnosticado como triple negativo; la paciente 4. No cumplía los criterios para recibir la terapia dirigida aprobada, pero sí para la mastectomía profiláctica de la mama contralateral (25).

Por otra parte, la mediana de la supervivencia global causa-específica de las pacientes con enfermedad local y regional fue inferior a la descrita en las publicaciones: en nuestras pacientes

con carcinoma de mama luminal localizado la mediana de la supervivencia global fue inferior a 5 años; sin embargo, las directrices europeas informan de que la supervivencia global a 10 años es aproximadamente del 70% en estos tumores (194). En cuanto a la enfermedad triple negativa, la supervivencia global a 3 años es de alrededor del 74%; sin embargo, la mediana de la supervivencia global en nuestro estudio no supera los 16 meses (200). Aunque la supervivencia de los pacientes con enfermedad avanzada también es inferior en nuestra investigación, no se pueden extraer conclusiones porque sólo se pudieron analizar dos pacientes con dos subtipos biológicos diferentes de cáncer de mama. Sin embargo, globalmente estos resultados evidencian un peor pronóstico de los pacientes de nuestro estudio en comparación con estudios anteriores.

2. DISCUSIÓN DE LOS CASOS CON DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA NO-MAMARIO

2.1. CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO

En este grupo de pacientes con adecuada estadificación previa y dosificación de radioterapia (dosis de RT mayores de 65 Gy), el control local esperado a 5 años es del 95% (216). En los casos en que se produce la recaída, ésta ocurre en los dos primeros

años, sin que dispongamos de claros factores clínicos de riesgo, como es el caso del paciente 13, en el cual, fue llamativa la recidiva tan precoz (a los 6 meses). Además su supervivencia global de 2 años y 9 meses no coincide con la literatura actual, que describe una tasa de curación del 80-90% y supervivencia global a cinco años del 70-90%; en pacientes con enfermedad localizada (217,218).

En el caso de pacientes con carcinoma de laringe que reciben tratamiento de inducción seguido de radioterapia concurrente con cetuximab, la supervivencia esperable a 3 años está alrededor del 70% (219), no siendo habitual que se produzcan las recaídas antes de los 9 meses (220), lo cual confiere la excepcionalidad al paciente 14, que se mostró refractario al tratamiento con cetuximab-radioterapia a los 4 meses y motivó su estudio. A esto se añade que en la literatura se describe una tasa de supervivencia global de aproximadamente el 44% y una supervivencia media en torno a los 40-50 meses en los pacientes con carcinoma laríngeo localmente avanzado (T3 o T4), con o sin metástasis (217,218)

En cuanto a la discusión global de los carcinomas de cabeza y cuello cabe destacar que presentan una mortalidad a nivel mundial del 5,7%. Representan la sexta neoplasia más

frecuente en todo el mundo, siendo su incidencia del 5% entre los adultos españoles.

Concretamente, de cáncer de laringe se producen más de 180.000 nuevos casos y unas 100.000 muertes al año, en todo el mundo.

En cuanto a la histología, de todas las lesiones de la cavidad oral y la laringe, el 90-95% son carcinomas de células escamosas (221,222).

Resulta alarmante que, a pesar de los avances terapéuticos, la tasa de recaída de los carcinomas de cabeza y cuello es del 10-20% en los estadios tempranos y del 50% en los localmente avanzados (223).

En los dos pacientes incluidos en este estudio se cumple la premisa de que aproximadamente el 80 - 90% de las recidivas se producen en los primeros dos a cuatro años tras el diagnóstico (223).

A pesar de los avances recientes en terapias antitumorales para este tipo de pacientes, sólo se han observado ligeras mejoras en el pronóstico, con la persistencia del contexto de enfermedad recurrente con tasas de supervivencia acortadas.

Esto resalta la necesidad del estudio de biomarcadores en este campo (221,224).

Una de las mejoras terapéuticas fue el esquema EXTREME, que supuso la mejora de la supervivencia, en este tipo de pacientes.

Fue autorizado en 2004 por la EMA y en 2006 por la FDA.

Consiste en añadir cetuximab (un anticuerpo monoclonal dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para inhibirlo) al tratamiento en primera línea. Se apoya en que más del 80% de los casos de carcinoma escamoso de cabeza y cuello tiene sobreexpresión de EGFR, un gen cuya activación facilita el crecimiento del tumor al promover la angiogénesis y la proliferación, así como la metástasis al aumentar la motilidad y la adhesión de las células tumorales (225,226)

Los pacientes de nuestro estudio no formaban parte de ese 80%, ya que no tenían alterado EGFR. Esto plantea que tal vez sería conveniente valorar la existencia de alteraciones en este gen antes de comenzar el tratamiento con cetuximab, pero equipos como el de Olivia Leblanc, describen que la expresión elevada de EGFR no predice la sensibilidad al cetuximab (226).

Por otro lado, el paciente 14, que recibió cetuximab en combinación con radioterapia, tenía mutado el gen BRAF, un

gen perteneciente a la vía MAPK. La activación constitutiva de esta vía, por mutaciones como la del paciente, está relacionada con la resistencia a los fármacos anti-EGFR (ej. Cetuximab) dando una explicación factible a la temprana progresión locorregional y sistémica del paciente (227). De nuevo, esto plantea que tal vez, buscar alteraciones en la vía MAPK antes de comenzar el tratamiento con cetuximab sería oportuno. Sin embargo, la ficha técnica del fármaco aprobada por la FDA y las directrices de la NCCN, no recomiendan el estudio del gen RAS antes de iniciar el tratamiento (227). Esto probablemente sería extrapolable a otros genes de la vía MAPK, como RAF, pero se tendría que estudiar en profundidad para poder sacar conclusiones relevantes.

Una mejora reciente en el tratamiento fue proporcionada por el ensayo Keynote 048, que demostró la superioridad de pembrolizumab (un anticuerpo monoclonal dirigido a PD1) sobre el esquema EXTREME, consiguiendo mayor supervivencia global.

Hace dos años la FDA (228) y la EMA aprobaron su uso como tratamiento de primera línea junto a quimioterapia, en carcinoma escamoso de cabeza y cuello metastásico o recurrente (229). Dado que BRAF se ha visto envuelto en aspectos de la regulación inmune, ésta parece que podría

haber sido una posible opción terapéutica para nuestros pacientes (230,231).

Siguiendo con las alteraciones encontradas, en el paciente 13 se describió una SNV en el gen supresor de tumores PBMR1. Éste forma parte de un complejo proteico con funciones centrales celulares, como la regulación de la expresión génica y la reparación del ADN. Su pérdida se asocia a inestabilidad genómica y a menudo resulta en cáncer, pero no se ha descrito en carcinoma escamoso de cabeza y cuello, aunque sí en el carcinoma escamoso de esófago (27,28).

Basándonos en los estudios realizados sobre este gen en el carcinoma de mama y en su asociación con el aumento de neoantígenos que favorece el uso de la inmunoterapia, consideramos que la investigación sobre PBMR1 debe ir ganando interés, para que en un futuro se pueda tomar decisiones clínicas en base a él (36).

Por otro lado, estos dos pacientes tenían variantes del gen TP53, un gen mutado en el 75-85% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello no asociados con HPV (15). Esta alteración se ha asociado a altas tasas de recurrencia locorregional, resistencia al tratamiento y reducción de la supervivencia, haciendo de él un posible biomarcador de mal

pronóstico, así como un importante actor en la evolución de los dos pacientes. En el momento actual no existe un tratamiento dirigido al mismo, por lo que el estudio de este gen sólo podría ser de utilidad con valor pronóstico, lo que probablemente modificase el seguimiento de los pacientes, o facilitase su inclusión en determinados ensayos clínicos (15,228).

2.2. CARCINOMAS UROLÓGICOS

2.2.1. CARCINOMA DE PRÓSTATA

El adenocarcinoma del paciente aquí presentado, formaba parte del grado 2 de la ISUP (*International Society of Urological Pathology*), también llamados grados de grupos pronóstico. Este sistema de clasificación establece cinco categorías de riesgo basadas en la recidiva bioquímica, y en el patrón Gleason, con incremento del riesgo de mortalidad conforme aumenta el grado (187). Los grados varían del 1 al 5, siendo el grado 1 el de mejor pronóstico. Ello implicaba una HR de 2,8 respecto al grupo 1 para el evento fallecimiento (232). Por otro lado, el paciente había iniciado un tratamiento optimizado, que había demostrado una mediana de supervivencia libre de progresión de 33 meses, con una HR de 0.47 (IC 95% 0,39-0,55; p < 0.001) frente al bloqueo hormonal convencional en pacientes con dos de tres factores de peor pronóstico (Gleason igual o mayor de 8, más de tres metástasis óseas o afectación

visceral). Además, la mediana de supervivencia de los pacientes que recibieron dicho tratamiento fue de 53,2 meses (IC 95% 48,2-no alcanzada) (233). Contradiclando estos datos, el paciente 18 mostró resistencia a la castración a los 5 meses y una supervivencia global de 6 meses.

La diferenciación neuroendocrina también puede surgir en tumores de pacientes que han recibido previamente terapia deprivación de andrógenos para el adenocarcinoma de próstata avanzado sensible a la castración (234). Estos tumores a veces llamados cánceres de próstata neuroendocrinos relacionados con el tratamiento o cánceres de próstata con variantes agresivas, se detectan cada vez más en las fases resistentes a la castración de la progresión de la enfermedad. Transformación que no se objetivó en el paciente.

Por tanto, el inesperado y agresivo comportamiento de la enfermedad, sin que mediara transformación, motivó su inclusión en el estudio.

En cuanto a la discusión global del cáncer de próstata cabe destacar que es el tumor más frecuente entre los hombres de todo el mundo y sigue siendo la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer. A pesar de las mejoras en el tratamiento, el cáncer de próstata resistente a la castración y

metastásico sigue siendo una enfermedad letal, siendo responsable de más de 350.000 muertes anuales en todo el mundo (233,235).

En la mala evolución del paciente presentado han podido participar las dos alteraciones genéticas encontradas mediante NGS, ya que ellas y las vías de señalización a las que pertenecen, se asocian a carcinomas prostáticos más agresivos y con menor supervivencia, y que por tanto podrían tenerse en cuenta como biomarcadores pronóstico (59,235). Se trata de una SNV en el gen PIK3CA y otra en el gen TP53. La primera se ha visto asociada con la resistencia a la terapia hormonal y la segunda se ha relacionado con escasa sensibilidad a dicha terapia (13,235). Por tanto, parece importante plantear terapias alternativas. Con respecto a TP53, algunos equipos describen que la combinación de iPARP con inhibidores de una proteína reparadora llamada ATR produciría respuestas significativas en pacientes con pérdida de TP53 (235). Con respecto a PIK3CA, hay que destacar la frecuencia (50%) con la que los cánceres de próstata resistentes a la castración metastásicos tienen alterada la vía PI3K-AKT-mTOR, pero el 40-60% de los casos se debe a la disfunción de PTEN. La prevalencia de la alteración de PIK3CA como motor de la alteración de la vía no está clara, pero se cree que ocurre entre

el 2-6% (233,236). En la actualidad no hay fármacos dirigidos a la alteración de PIK3CA en cáncer prostático, pero haber sido conocedores de que este gen estaba alterado habría convertido a nuestro paciente en un potencial candidato para ensayos clínicos (ej. NCT02465060). Por otro lado, como la vía PI3K tiene un valor pronóstico muy importante en el carcinoma de próstata, se está investigando diversas terapias dirigidas, como el ipatasertib, un potente inhibidor de la cinasa AKT, estudiado en ensayos clínicos en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración que presentan alteración de la vía por disfunción de PTEN (237). Los resultados han sido prometedores, pero a fecha de septiembre de 2022 aún no estaba aprobado por la FDA, y tampoco por la EMA (238).

2.2.2. CARCINOMA DE VEJIGA URINARIA

De forma general y en ausencia de neoadyuvancia, en el carcinoma urotelial de vejiga, los resultados tras la cistectomía radical se correlacionan con el grado de invasión local y con la presencia o ausencia de afectación de los ganglios linfáticos (239,240). Respecto a lo primero, el caso incluido presentaba como único factor a considerar, la infiltración microscópica de la grasa perivesical, no obstante, incluso en los casos intervenidos T3 y T4 con N0, se estiman medianas de tiempo hasta la recurrencia de 8,77 meses (IC 95% 6,04- 11,50).

En relación a los ganglios linfáticos, la extirpación de más de 10 ganglios linfáticos se asoció en la literatura con un aumento de la supervivencia general (HR 0,52; IC 95% 0,43-0,64) (241). Por otro lado, incluso en el caso de afectación ganglionar, las cifras son más favorables que las presentadas en el caso, con medianas de tiempo hasta la recurrencia de 11,9 meses (IC 95% 10,46-13,53) (239). Conviene tener en cuenta también la ausencia de márgenes afectos, la cual se ha relacionado con medianas de 13.37 meses (IC 95% 11.96- 14.79) hasta la recurrencia, produciéndose el fallecimiento tras la recurrencia en 5.78 meses de mediana (IC 95% 4.81- 6.76). Así, un metaanálisis de 2017 de 36 estudios asoció un margen quirúrgico positivo con una supervivencia más pobre después de la cistectomía radical para el cáncer de vejiga (242).

Dadas las expectativas mencionadas, la precoz recurrencia y rápida evolución, hicieron que se tuviera en consideración este caso en el estudio.

En cuanto a la discusión global del carcinoma urotelial cabe destacar que se ha convertido en la novena neoplasia más frecuente del mundo (97) y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se espera que el número de casos y muertes por cáncer de vejiga aumente en el futuro (98).

En cuanto a sus mutaciones, los esfuerzos independientes de múltiples grupos han identificado mutaciones comunes en los carcinomas de vejiga no-músculo-invasivos de bajo grado (FGFR3, PIK3CA, STAG2 y genes de la vía RAS/RAF) y en los carcinomas de vejiga músculo-invasivos de alto grado y/o enfermedad avanzada (HER2, TP53, RB1, MDM2, CDKN2A, KDM6A y ARID1A), no coincidiendo con la paciente 19 que presentaba el gen PIK3CA mutado y una SNV en FGFR3 (243).

La alteración del gen PIK3CA es un evento frecuente en el cáncer de vejiga, y promueve la proliferación, la invasión y la metástasis (56). Ante esta implicación clínica, parece que PIK3CA puede servir como un objetivo potencial para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de vejiga. Aún no se ha aprobado el uso de fármacos dirigidos a la vía PI3K en este cáncer, pero hay grupos de trabajo que proponen nuevas estrategias farmacológicas anti-PI3K sin concretar el órgano específico propietario del carcinoma para facilitar su uso (55). Ser conocedores de esta mutación en nuestro paciente tal vez habría ayudado en el seguimiento del paciente, ya que la vigilancia activa de estos pacientes es esencial para el diagnóstico precoz de la progresión, la metástasis y para optimizar el tratamiento (244).

Por otro lado, el paciente tenía una SNV en el gen FGFR3, que forma parte de la familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos. Se estima que alrededor del 15-20% de los pacientes con cáncer de vejiga albergan alteraciones del FGFR3, que se enriquecen aún más en los tumores uroteliales del tracto superior (136).

Además, se ha descrito que se encuentran en el 70-85% de los carcinomas uroteliales de bajo grado y concretamente FGFR2 y FGFR3 en el 15-20% de los metastásicos (97-99).

La activación del receptor FGFR inicia una cascada de eventos intracelulares que activan las principales vías de señalización de supervivencia y proliferación, como la vía RAS, la vía PI3K, la familia de las proteína cinasas C y la vía JAK-STAT entre otras (81). Actualmente existe tratamiento dirigido con erdafitinib, un inhibidor de FGFR aprobado para el tratamiento del carcinoma urotelial localmente avanzado o metastásico, no respondedor a terapia con platino, que presente alteración en FGFR3 o FGFR2 (97). Es el primer antagonista de molécula pequeña de FGFR aprobado por la FDA (2019). Se une a los receptores FGFR2 y FGFR3 e inhibe la actividad del FGF (factor de crecimiento fibroblástico), lo que provoca la muerte celular (95,245). En el trabajo de Alhalabi et al. se evidencia el beneficio clínico del erdafitinib, apoyando el abordaje de las

alteraciones genómicas en el carcinoma urotelial metastásico (99). Es un fármaco que fue aprobado de forma acelerada, por la FDA, en 2019, y está pendiente de un ensayo de fase III que lo confirme (136). La EMA aún no lo ha aprobado.

2.3. OTROS

2.3.1. ADENOCARCINOMA DE ESÓFAGO DISTAL

Al tomar como referencia lo acontecido en el estudio UK MRC OE05 como base para valorar la evolución del paciente número 15, pudimos observar que su evolución distaba mucho de lo publicado en dicho estudio. Así, al utilizar un tratamiento neoadyuvante con epirubicina, platino y capecitabina, la mediana de supervivencia alcanzada era de 26,1 meses (IC 95% 22,5-29,7 meses), pese a que se observó regresión tumoral según el *Mandard tumour regression grading (TRG)* en sólo el 29% de los especímenes (246). Sin embargo, un 66% de los pacientes había alcanzado resección R0. La supervivencia libre de progresión descrita, era de 21,4 meses (IC 95% 19,4-24 meses). Por tanto, la evolución del paciente incluido, pese a la edad y al buen estado general al diagnóstico, se alejaba mucho de lo esperado (247).

En cuanto a la discusión global del cáncer de esófago cabe destacar que es el octavo tumor maligno más frecuente en

todo el mundo y es una de las neoplasias más mortíferas del mundo occidental (30). Su tasa de supervivencia a 5 años, en EEUU, es del 20% (85) y ha permanecido prácticamente inalterada en los últimos años (30), siendo la mediana de supervivencia global de 9-11 meses (92). Esto se debe a las limitadas opciones de tratamiento eficaces en caso de enfermedad avanzada.

Sin embargo, el futuro parece prometedor, gracias al uso de nuevos fármacos. Entre ellos el pembrolizumab, un inhibidor de PD1 que se aprobó en el año 2017 para el tratamiento de tercera línea en los adenocarcinomas esofágicos PDL1 positivos y en el año 2019 para el tratamiento de segunda línea en los carcinomas escamosos avanzados o metastásicos, PDL1 positivos. Por otro lado, el ramucirumab, un anticuerpo dirigido al VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) para el tratamiento del adenocarcinoma avanzado de esófago y de la unión gastroesofágica que han progresado con la quimioterapia con fluoropirimidina/platino (ensayo clínico REGARD y ensayo RAINBOW). Y finalmente el trastuzumab, un anticuerpo monoclonal anti-HER2, aprobado como primera línea junto a la quimioterapia, para los casos HER2 positivos (suponen el 20% de los carcinomas de esófago, aproximadamente) (85).

Con estas terapias dirigidas se han descrito mejoras significativas en las poblaciones específicas de pacientes

positivos para estos biomarcadores, apoyando la utilidad de los mismos, que pueden contribuir a personalizar el tratamiento.

(85)

Histológicamente, el cáncer de esófago se divide entre carcinoma escamoso y adenocarcinoma. El primero es más común en todo el mundo, y el segundo en el mundo occidental, donde se está viendo aumentar su incidencia de forma alarmante (85). El paciente número 15 presentaba un adenocarcinoma de esófago distal con algunas alteraciones moleculares que, potencialmente, habrían cambiado el manejo del tratamiento de haberlas tenido en consideración. Por ejemplo, contaba con una SNV en ARID1A, un gen supresor tumoral codificante para una proteína que forma parte del complejo SWI/SNF remodelador de cromatina. Este complejo desempeña un papel importante en muchos procesos celulares, como la transcripción, el control del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación y la reparación de las lesiones del ADN (30). Los equipos que lo han estudiado, coinciden en que los adenocarcinomas de esófago con pérdida de función del complejo SWI/SNF, pueden representar un subgrupo tumoral relevante clínicamente, debido a su uso potencial como biomarcadores pronóstico y de terapia. Schallenberg et al, estudiaron mediante IHQ la pérdida de función de cuatro

subunidades del complejo (ARID1A, BRM, BRG1 e INI1) en más de 600 pacientes con adenocarcinoma de esófago y halló la pérdida homogénea de estas proteínas en muchos de ellos, siendo la de ARID1A la más frecuente (10,4% de sus casos). Ellos no encontraron correlación entre dichas pérdidas de función y una menor supervivencia global (30), y tampoco lo hicieron Drage et al, quienes vieron una tendencia hacia un mayor riesgo de metástasis ganglionar en los adenocarcinomas de esófago con pérdida de ARID1A, sin observar ningún efecto sobre la supervivencia global (248). No ocurre lo mismo en otros órganos, como el ovario, donde el equipo de Katagiri sí correlacionó la pérdida de expresión de ARID1A con una menor supervivencia global (34).

En cuanto a su uso potencial como biomarcador de tratamiento, se ha visto el papel de ARID1A en la regulación de los puntos de control del daño del ADN en las roturas de doble cadena, que sensibilizan a las células tumorales a los inhibidores de PARP.

Por otro lado, las mutaciones de ARID1A se asocian comúnmente con la fosforilación de la proteína cinasa B (codificada por el gen AKT) y, en consecuencia, con la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR. Así, la pérdida de expresión de ARID1A aumenta significativamente la respuesta de las células cancerosas a los inhibidores de PI3K y AKT (30).

De todos modos, serán necesarios estudios futuros para demostrar si los adenocarcinomas esofágicos que muestran una pérdida de función del complejo SWI/SNF pueden beneficiarse de terapias personalizadas.

Actualmente, pacientes con tumores sólidos con mutaciones en ARID1A podrían tener acceso a ensayos clínicos en fase 2 (ej. NCT03297424).

Este paciente también contaba con una mutación en el gen TP53. Éste se ha descrito alterado en el 70% de los adenocarcinomas esofágicos, donde se ha etiquetado como biomarcador de mal pronóstico, ya que supone una reducción en la supervivencia global al compararlo con tumores TP53 wild-type (no-mutado) (14). Parece por tanto que, aunque la alteración de este gen no habría servido actualmente como diana terapéutica, sí es útil como biomarcador pronóstico, de hecho, parece que podría relacionarse con el mal pronóstico de nuestro paciente, que hizo una recaída a los 6 meses del inicio del tratamiento, y tuvo una supervivencia de 7 meses (92).

Por otro lado, en esta muestra tumoral se describió la amplificación de MET un oncogén que codifica para el receptor tirosina cinasa de transición mesenquimal-epitelial (MET), que regula la supervivencia, la proliferación y la migración de las

células (92). Esta amplificación se ha notificado en el 2-10% de los pacientes con cánceres gástricos y esofágicos, y se ha descrito como biomarcador de mal pronóstico en este mismo grupo (85,92). Así, la inhibición de MET representa una estrategia terapéutica lógica para nuestro paciente.

Desgraciadamente, los ensayos con anticuerpos anti-MET, como METGastric y RILOMET-1, que trabajan con onartuzumab y rilotumumab, no han logrado demostrar ningún beneficio en la supervivencia (ej. NCT02016534). (92)

Por último, la alteración de EGFR de nuestro paciente es muy frecuente. El 30-90% de carcinomas esofágicos demuestran EGFR regulado al alza. Esto justificaría el estudio de terapia dirigida, pero de momento no se ha demostrado que la terapia anti-EGFR mejore la supervivencia (85).

2.3.2. CARCINOMA FOLICULAR DE TIROIDES

Pese a que el paciente presentaba un tumor T3b y estadio II, según los sistemas TNM y AJCC (249) respectivamente, se consideró la precoz recurrencia y la rápida progresión del tumor como inesperada. Ambos sistemas se utilizan para establecer el riesgo de mortalidad, pero no predicen el riesgo de recurrencia (182). Por otro lado, la clasificación de riesgo establecida por la “American Thyroid Association (ATA)”,

permite establecer el riesgo de recurrencia a la hora de tomar decisiones terapéuticas, pero al igual que la anterior, no tiene en cuenta la respuesta a tratamiento y, por tanto, no tiene en cuenta el mismo en la evaluación del riesgo de recidiva o muerte (250). Aún así, si se consideraba esta clasificación, el paciente se encontraba en el grupo de riesgo intermedio (invasión microscópica de tejidos blandos peritiroideos y focos cervicales captantes de yodo), no siendo esperable la recidiva precoz, dado que, en este grupo sin persistencia de enfermedad tras cirugía y radioyodo (entre un 57 % y un 63 % de pacientes) el riesgo de recaída esperada en este paciente sería menor del 10% a los 5 años.

Es por ello, que para establecer la precocidad en la recidiva, nos apoyamos en la estratificación dinámica de riesgo (EDR), la cual integra el riesgo inicial con datos clínicos, radiológicos y de laboratorio durante el seguimiento (251). Al conjuntar el riesgo establecido por la clasificación ATA con la respuesta al tratamiento, se identificó enfermedad estructural persistente o recurrencia en el 3% de los de bajo riesgo, el 21% del riesgo intermedio, y el 68% de los pacientes de alto riesgo (p<0,001). Se realizó seguimiento cada 6 meses y re-estratificación durante dos años para establecer el riesgo de recidiva. La probabilidad de encontrar enfermedad estructural persistente o recurrencia fue del 2% en riesgo bajo, 2% en riesgo

intermedio, y 14% en pacientes de alto riesgo, demostrando una excelente respuesta al tratamiento (Tiroglobulina estimulada <1 ng/mL sin evidencia estructural de enfermedad). Por el contrario, una respuesta incompleta al tratamiento inicial (Tiroglobulina suprimida > 1 ng/ml, Tiroglobulina estimulada > 10 ng/mL, aumento de los valores de Tiroglobulina o identificación de enfermedades estructurales dentro de los primeros 2 años de seguimiento) aumentó la probabilidad de enfermedad estructural persistente o recurrencia al 13% en casos de bajo riesgo, 41% en riesgo intermedio, y 79% en pacientes de alto riesgo (252). A la vista de estos plazos temporales, quedaba claro el comportamiento excepcional del tumor en este paciente.

En cuanto a la discusión global de los carcinomas de tiroides cabe destacar que son la neoplasia endocrina más frecuente. Menos del 10% presenta comportamiento agresivo y/o metastásico. El tratamiento clínico estos pacientes va desde la vigilancia hasta la tiroidectomía total con linfadenectomía cervical y/o la ablación con radioyodo (73). Sin embargo, del 5% al 15% de los carcinomas tiroides diferenciados y el 50% de los diferenciados metastásicos, son refractarios al tratamiento con radioyodo, con tasas de supervivencia específica de la enfermedad a 5 años del 60-70% en los primeros y con una tasa

de supervivencia a 10 años del 10% en los segundos (253).

Estas cifras reflejan la falta de marcadores fiables para predecir el comportamiento agresivo de estos tumores y así hacer una estratificación precisa basada en el riesgo de esta enfermedad (73).

En este paciente, seis meses después de la cirugía, se diagnosticó una recaída temprana con múltiples metástasis en varios órganos, haciendo sospechar resistencia al radioyodo y anunciando un mal pronóstico (253). Mediante NGS se le identificaron 3 alteraciones genéticas, una SNV en el gen PTEN y otra en TP53, y una amplificación de TERT.

De las tres alteraciones, parece que la que podría estar más implicada en la mala evolución de este paciente es la alteración de TERT (transcriptasa inversa de la telomerasa). Es cierto que la mayoría de publicaciones ponen en valor la mutación del promotor de TERT, y lo describen como uno de los marcadores pronósticos de agresividad más acreditados en los carcinomas de tiroides, porque se asocia a una baja supervivencia global de los pacientes; pero estas mismas publicaciones describen que, generalmente, el resultado final de la alteración del promotor es un aumento en la expresión de TERT y la actividad de la telomerasa, por eso hay equipos que también asocian la agresividad de estos carcinomas con la amplificación de TERT. Y es que en última instancia se describe a la proteína TERT como

participante de procesos como la regulación de la respuesta al daño del ADN, la represión de la apoptosis, la regulación del estado de la cromatina y el aumento de la proliferación celular. Además, hay pruebas que señalan el papel de TERT en la agresividad temprana de los carcinomas diferenciados tiroideos, en su carácter invasor, y en su propagación metastásica mediante la activación de la transición epitelio-mesénquima (TEM), desencadenada entre otras vías por la activación de la vía MAPK y PI3K; y llevada a cabo entre otros factores por el TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) (73,254). Hay equipos que otorgan a la alteración de este gen la etiqueta de “perfil génico agresivo”, y proponen que se incluya entre los criterios para la estratificación del riesgo de los pacientes a hacerse resistentes al yodo radiactivo, siendo por tanto un potencial biomarcador pronóstico (253). Estos datos animan a investigar las vías de regulación de la telomerasa para fomentar la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Ya hay ensayos clínicos trabajando con péptidos derivados de TERT, tanto *in vivo* como *ex vivo*, con respuestas alentadoras (73).

Por otro lado, la inactivación de PTEN en casos como éste es un evento poco frecuente (5%) (255), por lo que a priori, su estudio no sería muy eficiente en este tipo de tumor, pero es

conveniente incluirlo en los paneles de NGS porque se ha descrito que, contrarrestar su inactivación, podría recapacitar a las células para la captación de yodo. No hay que olvidar que PTEN es el principal inhibidor fisiológico de la vía PI3K-AKT-mTOR, una vía que, junto con la de las MAPK, es un motor importante para la tumorigénesis del carcinoma de tiroides, así como para su agresividad y resistencia a tratamientos. Hay ensayos clínicos que han estudiado fármacos dirigidos a esta vía, y han comprobado que la inhibición de mTOR promueve la rediferenciación de las células del carcinoma tiroideo, pero aún no se conoce su papel en la inducción de la avidez por el radioyodo, por lo que son necesarios más estudios (253). Actualmente, pacientes con tumores sólidos con mutaciones en PTEN, como este caso, podrían tener acceso a ensayos clínicos en fase 2 (ej. NCT02465060, NCT03297606).

Al contrario que las otras dos, la mutación de TP53 no parece haber sido clave en la evolución del paciente, ya que es infrecuente en el carcinoma diferenciado de tiroides siendo uno de los sellos genéticos del carcinoma anaplásico (256,257).

Entre las CNV de este caso, se describió la ganancia de los cromosomas 7 y 5. La literatura no las relaciona con los carcinomas sino con los adenomas tiroideos; siendo en los primeros más frecuentes las pérdidas (258). En cualquier caso,

no hay equipos de trabajo que actualmente estén estudiando la relevancia clínica de estas alteraciones.

2.3.3. CARCINOMA DE ENDOMETRIO

La paciente incluida no presentaba ninguno de los dos factores que han mostrado, en la literatura, una fuerte influencia pronóstica, como son la profunda invasión miometrial y la invasión linfovascular. Guntupalli et al, en un estudio con 628 pacientes intervenidas de carcinoma endometrial, demostró, mediante un análisis multivariante el valor predictivo de ambos factores para el desarrollo de afectación ganglionar y evolución desfavorable (259). Por otro lado, no sólo la invasión vascular en sí misma, sino más bien si ésta es focal o es difusa, es lo que ha demostrado interés pronóstico, tanto para la supervivencia libre de progresión (HR 1,61, p = 0.01) como para la supervivencia global (HR 1,71, p = 0.03). En pacientes sin invasión linfovascular, la tasa de recurrencia local o a distancia gira en torno al 6,9%, siendo esperable menor del 5% antes de los dos años (260,261).

El único factor adverso que podría tener la paciente era la edad, aunque el valor referido en la literatura puede ser controvertido, puesto que puede estar relacionado con otros factores. Así, las pacientes mayores de 65 años suelen tener mayor y más frecuente invasión miometrial, un alto grado

tumoral y un estadio tumoral más avanzado (262,263).

Además, una terapia menos agresiva también podría explicar algunos de los malos resultados observados en pacientes mayores (263).

Como se señaló anteriormente, la edad se utiliza para clasificar a las pacientes con enfermedad de riesgo intermedio en un grupo de riesgo intermedio alto o bajo, lo que puede influir en las decisiones de tratamiento. No obstante, a igualdad de tratamiento, parece haberse observado una mayor tendencia a la recaída. Sin embargo, sigue siendo muy llamativa la precocidad de la recaída, lo cual, justificó la inclusión en el estudio.

En cuanto a la discusión global del cáncer de endometrio cabe destacar que es el sexto cáncer femenino más frecuente en todo el mundo, con aproximadamente 417.000 nuevos casos y 97.000 muertes en 2020 (264). El carcinoma endometrioide es el tipo histológico más común, y suelen tener un pronóstico favorable (265).

La paciente 17, con adenocarcinoma endometrioide de endometrio mostraba una SNV en el exón 3 del gen CTNNB1, un evento *driver* que provoca la translocación de la proteína β-catenina al núcleo de la célula, donde induce la actividad transcripcional aguas abajo de la vía de señalización Wnt/β-

catenina (77). Algunos equipos de trabajo, como el de Travaglino, ya han etiquetado esta alteración como biomarcador de mal pronóstico, describiendo asociación significativa entre la mutación en el exón 3 de CTNNB1 con la recidiva en los carcinomas endometrioides de endometrio de estadio temprano (FIGO I-II), especialmente en los casos sin perfil molecular específico (78). Por tanto, este hallazgo explicaría el curso de nuestra paciente. Parece que habría sido útil identificar el alto riesgo de recurrencia de esta paciente, ya que probablemente se habría beneficiado de un tratamiento adyuvante o una estadificación quirúrgica más extensa, es decir se habría optimizado la atención individualizada (266,267).

Hay evidencia sustancial de que las pruebas moleculares podrían mejorar significativamente la estratificación del riesgo y el pronóstico del cáncer de endometrio, basándose en la clasificación molecular realizada por TCGA, en la que se divide al cáncer de endometrio en cuatro subtipos con diferente pronóstico. Los marcadores moleculares que definieron estos subtipos genómicos incluyeron inestabilidad de microsatélites, la mutación en CTNNB1, la mutación en TP53 y mutaciones de puntos críticos de POLE (79,80). Algunos autores proponen realizar un cribado inicial de la mutación del exón 3 de CTNNB1, utilizando la inmunohistoquímica como marcador subrogado

de dicha alteración, ya que tiene una sensibilidad del 91% Y una especificidad del 89% (77,268).

El tratamiento inhibidor de la vía Wnt/β-catenina, está en estudio, para comprobar su seguridad, eficacia, y demás características, como ya se ha comentado en el apartado “principales vías alteradas en el cáncer”.

Por otro lado, le fue descrita una alteración somática en PIK3CA, uno de los genes que muta con mayor frecuencia en la cohorte de los tumores pan-gyn (cáncer ginecológico y de mama) identificados por Berger et al. como parte del proyecto TCGA Pan-Cancer Atlas (57). PIK3CA está frecuentemente alterado en los adenocarcinomas endometrioides de endometrio (40-56%) y es participante de la vía PI3K-AKT-mTOR, comúnmente turbada en este tipo de tumor (80-95%) (267,269). Como ocurre en otros tumores, esta alteración de la vía PI3K también podría haber actuado como biomarcador pronóstico y predictivo, en nuestra paciente. Hay que añadir que estas elevadas frecuencias hacen de ella un objetivo terapéutico atractivo, pero el éxito de los agentes inhibidores de PI3K actualmente está limitado por varios factores como la toxicidad, la selección de pacientes y los mecanismos compensatorios, entre otros. Por tanto, se necesitan estrategias para superar estas limitaciones. Ahora hay ensayos

clínicos en curso (ej. NCT01536054, NCT01522820), que tal vez en un futuro hagan de esta alteración una diana (123).

Esta paciente también tiene una ganancia en 1q como CNV, relativamente frecuente en el adenocarcinoma endometrioides de endometrio, pero sin relevancia clínica por el momento.

En esta paciente resulta extraño no haber identificado mutaciones en PTEN. Por un lado, la literatura ha demostrado que la mutación de PTEN es la mutación somática más frecuente entre los adenocarcinomas endometrioides de endometrio, que resulta ser un evento temprano si bien insuficiente para el inicio de la tumorigénesis. Por otro lado, las mutaciones de PTEN comúnmente concurren con mutaciones de PIK3CA, alteración que la paciente sí tiene (270).

3. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

En cuanto a las limitaciones del presente estudio, en primer lugar hay que tener en cuenta que el diseño del mismo puede ser la principal fuente de sesgo, debido a que los estudios prospectivos a gran escala son considerados el estándar de oro de la investigación observacional (271,272). Como alternativa, en este estudio se presenta un análisis retrospectivo de muestras archivadas, por lo que se hablará de causalidad

potencial. Este tipo de estudio evita el encarecimiento y la prolongación en el tiempo (271).

Por otro lado, la secuenciación de nueve de los casos se realizó sobre muestras de pacientes que habían recibido tratamiento sistémico, y esto ha podido suponer otro sesgo, ya que existe la posibilidad de que sea una fuente de enriquecimiento con mutaciones clonales, o que los clones supervivientes hayan podido ejecutar un mecanismo adaptativo que impulse su resistencia y heterogeneidad tumoral (273). Sin embargo, no hay estudios relevantes que hayan analizado a fondo los resultados de la secuenciación antes y después del tratamiento sistémico. Un grupo japonés, que también realizó caracterización molecular de muestras tumorales, informó de que todos los pacientes de su estudio habían recibido tratamiento, pero era quirúrgico. Por otro lado, un grupo de trabajo del MD-ANDERSON llevó a cabo un ensayo similar, pero en él todos los pacientes habían fracasado en el tratamiento sistémico convencional, y lo comparaban con los resultados tras administrar una terapia dirigida a una diana molecular (167,168).

La heterogeneidad tumoral también podría haber sido un sesgo a la hora de elegir zonas de la pieza quirúrgica para su

secuenciación, pero ya hay equipos que han evaluado la viabilidad de los estudios moleculares en biopsias pequeñas (<1,5 mm) y han concluido que existe una correlación con los resultados en piezas quirúrgicas grandes (274).

La propia secuenciación NGS podría haber participado como sesgo, especialmente con las CNVs sugeridas, ya que no es el método estándar para analizarlas. Por lo tanto, para tomar decisiones clínicas basadas en la identificación de CNVs, se recomienda su confirmación con técnicas como MLPA (215). Por otro lado, el panel elegido incluía menos de 50 genes, pese a que la literatura apoya la idea de que se identifican más variantes procesables cuanto mayor es el panel (168).

Cabe la posibilidad de que alguna variante de interés clínico no sea detectada, aunque sí pueda estar presente en la muestra tumoral. Esto puede ocurrir porque la variante se encuentre por debajo de los límites de detección de la técnica, por cuestiones propias de la muestra tumoral (su calidad, su celularidad o porcentaje de tejido tumoral frente a tejido normal, el proceso de parafinado, etc.) o por causas intrínsecas a la tecnología NGS (que se trate de regiones con alta homología de secuencia con otras zonas del genoma, homopolímeros, regiones repetitivas, etc) (144,148,153).

Continuando con la parte de metodología, como se ha descrito anteriormente en la discusión, hay equipos que han empleado la inmunohistoquímica para evaluar las alteraciones sobre el tejido e incluso han propuesto que pueda ser método subrogado de cribado. Otros grupos de trabajo pese a valorarlo, se mantienen imparciales, como es el equipo de J.P.Solomon que, estudiando las fusiones de NTRK, describe sensibilidades y especificidades muy altas para la inmunohistoquímica como marcador proteico de las proteínas TRK, siendo algo que abogaría por su uso como cribado, pero las asocia con variaciones dependientes del tipo de tumor (102). Teniendo en cuenta la disponibilidad de esta técnica en los laboratorios de Anatomía Patológica, cabe pensar que en este estudio también se podría haber realizado. En nuestro caso, durante el periodo de tiempo que duró el estudio, no dispusimos de recursos para poder conseguir los marcadores inmunohistoquímicos correspondientes a todos los genes del panel elegido.

En cualquier caso, tampoco podemos olvidar que, aunque habría sido interesante comprobar si se obtenían los mismos resultados con la secuenciación que con la inmunohistoquímica, en algunos estudios ya se propone el uso de plataformas moleculares (paneles de genes validados o test genéticos validados) para reemplazar el uso de

inmunohistoquímica, FISH y PCR en los casos en que sea posible, para aumentar la rentabilidad y ahorrar tejido; a lo que se añade que múltiples estudios como el “Consenso canadiense para las pruebas de biomarcadores y el tratamiento del cáncer con fusión TRK en adultos” afirman que los resultados inmunohistoquímicos positivos o no concluyentes, deben seguirse del estudio con NGS ([30](#),[101](#),[158](#)).

En otro orden de cosas, en la inclusión de pacientes se ha seguido en todo momento los protocolos y guías clínicas nacionales e internacionales, tanto para la clasificación y tratamiento, como para la evaluación de la enfermedad de los pacientes incluidos. Por tanto, el estudio utiliza una muestra que representa un rango reproducible de casos que pueden encontrarse en la práctica clínica de otros centros. Sin embargo, este hecho condujo a un tamaño muestral bajo.

En cuanto a los puntos fuertes de este proyecto, cabe destacar el hallazgo de alteraciones genéticas en todas las muestras. Hemos identificado más de 40 alteraciones con relevancia clínica, siendo todas somáticas. Muchas de ellas se pueden emplear como biomarcadores pronóstico y/o predictivos, por lo que podrían haber repercutido en el curso clínico de los pacientes. También hemos identificado dianas terapéuticas

para tratamientos dirigidos, tanto aprobados como en ensayos clínicos, aportando alternativas terapéuticas para este tipo de pacientes.

La inestabilidad genómica más estudiada en la actualidad y mejor caracterizada, es la inestabilidad de microsatélites (MSI), en cambio no se ha demostrado en ninguno de los pacientes de este estudio. La literatura expone que la mayoría de cánceres con MSI-H tienen un pronóstico favorable, como son el cáncer de vejiga y próstata, así como el carcinoma folicular de tiroides, donde se ha relacionado con una prolongada supervivencia. Esto da sentido a nuestros hallazgos. En cambio, también se ha descrito su relación con el mal pronóstico en los carcinomas de mama y en los de endometrio (9).

En este estudio garantizamos la reproducibilidad del análisis bioinformático, que es un determinante crítico de la traducción clínica exitosa de los biomarcadores genéticos (131). El proceso de secuenciación con el panel está validado y cumple las condiciones estándar y óptimas de calidad, las normas ISO (*International Organization for Standardization*) y el Marcado CE-IVD (certificado otorgado por la Unión Europea que garantiza la calidad de un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* y su correcto funcionamiento). Además, hemos realizado una comprobación de la clasificación funcional

mediante el visualizador genómico Alamunt Visual Plus, de forma manual.

Actualmente, los resultados de los agentes dirigidos demuestran mejores resultados que los tratamientos clásicos, debido a que aumentan las tasas de supervivencia. En este estudio aportamos una firme justificación para mejorar la atención de los pacientes con cáncer sólido que recae o progresan de forma injustificada a priori, a través de estrategias de tratamiento personalizadas (275).

Estas observaciones deben entenderse como pistas que han de ser validadas en estudios prospectivos de gran envergadura.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En 15 de los 19 pacientes se ha identificado **alteraciones genéticas *driver*** que explican su **mala evolución**. Las más relevantes han sido localizadas por orden de frecuencia en la vía PTEN/PI3K, el gen FGFR, los genes codificantes del complejo SWI-SNF remodelador de cromatina y la vía RAS/MAPK. La excepción han sido las pacientes 8, 9, 10 y 12, en las que únicamente se hallaba mutado el gen TP53, cuya relevancia clínica en carcinoma mamario sigue siendo confusa.
2. Todos los pacientes con carcinoma no-mamario, y la mitad de los mamarios, han mostrado mutaciones *driver* etiquetadas por la literatura como **biomarcadores pronóstico**, y en el 42% del total de los pacientes se ha demostrado **biomarcadores predictivos de resistencia al tratamiento**.
3. En el 50% de los carcinomas mamarios y el 43% de los no-mamarios, se ha identificado **dianas moleculares** para fármacos aprobados o en ensayo clínico.
4. El estudio molecular con **NGS** de los carcinomas seleccionados nos habría hecho conocedores de mutaciones *driver* que habrían permitido el **manejo individual** de cada paciente. Habría proporcionado una **mejor estratificación del**

riesgo y pronóstico de los pacientes, y el **plan terapéutico y/o de seguimiento** podría haber sido modificado a día de hoy, ya sea administrando fármacos dirigidos o con la inclusión a ensayos clínicos.

5. No se han identificado variantes génicas comunes a todos los pacientes de la serie estudiada que permitan clasificarlos en un subgrupo de mala evolución.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hausman DM. What Is Cancer? Perspect Biol Med [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 May 29];62(4):778–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31761807/>
2. Puent J, de Velasco G. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 [Internet]. [cited 2022 Mar 20]. Available from: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
3. Sociedad española de oncología médica. Las cifras del cáncer en España. 2022 [Internet]. 2022. 1–38 p. Available from: https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf
4. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes NIH Public Access. Science (80-) [Internet]. 2013 [cited 2022 Mar 19];339(6127):1546–58. Available from: www.sciencemag.org/cgi/content/full/339/6127/1546/DC1TablesS1toS5
5. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila W, Luna A, La K, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. Cell [Internet]. 2018 Apr 5 [cited 2021 Aug 8];173(2):321-337.e10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29625050/>
6. Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Sengupta S, Bertrand D, Weerasinghe A, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. Cell [Internet]. 2018 Apr 5 [cited 2022 Mar 19];173(2):371-385.e18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.060>
7. Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, Yap TA. Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. Cancer Discov [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 Mar 19];7(1):20–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28003236/>
8. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. Environ Mol Mutagen [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2022 Mar 19];58(5):235–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28485537/>
9. Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. Cancer Cell Int [Internet]. 2020 Jan 13 [cited 2022 Apr 24];20(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31956294/>
10. Tafurt Y, Marin MA. Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. 2015;13(2):95–110.
11. Donehower LA, Soussi T, Korkut A, Liu Y, Schultz A, Cardenas M, et al. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. Cell Rep [Internet]. 2019 Jul 30 [cited 2022 Mar 19];28(5):1370-1384.e5. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31365877/>
12. Proteína tumoral TP53 p53 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>
13. Maughan BL, Guedes LB, Boucher K, Rajoria G, Liu Z, Klimek S, et al. p53 status in the primary tumor predicts efficacy of subsequent abiraterone and enzalutamide in castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Mar 19];21(2):260–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29302046/>
14. Fisher OM, Lord SJ, Falkenback D, Clemons NJ, Eslick GD, Lord R V. The prognostic value of TP53 mutations in oesophageal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Gut* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2022 Mar 19];66(3):399–410. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26733670/>
15. Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J Cell Biochem* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 Mar 19];117(12):2682–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27166782/>
16. PTEN homólogo de fosfatasa y tensina [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5728>
17. Sansal I, Sellers W. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* [Internet]. 2004 [cited 2021 Jul 26];22(14):2954–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15254063/>
18. JR M, V S. BMI1 and PTEN are key determinants of breast cancer therapy: A plausible therapeutic target in breast cancer. *Gene* [Internet]. 2018 Dec 15 [cited 2021 Jul 26];678:302–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30096458/>
19. Xing Y, Lin N, Maurer M, Chen H, Mahvash A, Sahin A, et al. Phase II trial of AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced breast cancer who have tumors with PIK3CA or AKT mutations, and/or PTEN loss/PTEN mutation. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2019 Jul 5 [cited 2021 Jul 26];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31277699/>
20. Reparación del ADN BRCA1 BRCA1 asociada [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>
21. Azim H, Kassem L, Azim H. Integrating PARP inhibitors into the management of breast cancer: where are we? *Chinese Clin Oncol* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 6];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33440946/>
22. Dalenc F, Sarradin V, Nicolaï V, Franchet C, Ung M. Recent therapeutic trends in

- triple-negative metastatic breast cancers: PARP inhibitors, immunotherapies and antibody-drug conjugates. *Bull Cancer* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Aug 6];108(1):67–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33422340/>
23. Romagnolo A, Romagnolo D, Selmin O. BRCA1 as target for breast cancer prevention and therapy. *Anticancer Agents Med Chem* [Internet]. 2015 Dec 9 [cited 2021 Aug 6];15(1):4–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25329591/>
24. Narod S, Salmena L. BRCA1 and BRCA2 Mutations and Breast Cancer [Internet]. Discovery Medicine. [cited 2021 Aug 6]. Available from: <https://www.discoverymedicine.com/Steven-A-Narod/2011/11/25/brca1-and-brca2-mutations-and-breast-cancer/>
25. Lee A, Moon B, Kim T. BRCA1/ BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Ann Lab Med* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 6];40(2):114–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31650727/>
26. Timpano S, Picketts DJ. Neurodevelopmental Disorders Caused by Defective Chromatin Remodeling: Phenotypic Complexity Is Highlighted by a Review of ATRX Function. *Front Genet* [Internet]. 2020 Aug 11 [cited 2022 Mar 19];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849845/>
27. Hopson S, Thompson MJ. BAF180: Its Roles in DNA Repair and Consequences in Cancer. *ACS Chem Biol*. 2017;12(10):2482–90.
28. Brownlee P, Chambers A, Oliver A, Downs J. Cancer and the bromodomains of BAF180. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2012 Apr [cited 2021 Jul 29];40(2):364–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22435813/>
29. Mashtalar N, D'Avino AR, Michel BC, Luo J, Pan J, Otto JE, et al. Modular Organization and Assembly of SWI/SNF Family Chromatin Remodeling Complexes. *Cell* [Internet]. 2018 Nov 15 [cited 2022 Mar 19];175(5):1272-1288.e20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30343899/>
30. Schallenberg S, Bork J, Essakly A, Alakus H, Buettner R, Hillmer AM, et al. Loss of the SWI/SNF-ATPase subunit members SMARCF1 (ARID1A), SMARCA2 (BRM), SMARCA4 (BRG1) and SMARCB1 (INI1) in oesophageal adenocarcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2020 Jan 6 [cited 2022 Mar 19];20(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31906887/>
31. ARID1A Dominio de interacción rico en AT 1A [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8289>
32. Xu G, Chhangawala S, Cocco E, Razavi P, Cai Y, Otto J, et al. ARID1A determines luminal identity and therapeutic response in estrogen-receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Jul 29];52(2):198–207. Available

- from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31932695/>
33. THE HUMAN GENE DATABASE. ARID1A Gene - GeneCards | ARI1A Protein | ARI1A Antibody [Internet]. [cited 2022 Mar 20]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARID1A>
34. Katagiri A, Nakayama K, Rahman M, Rahman M, Katagiri H, Nakayama N, et al. Loss of ARID1A expression is related to shorter progression-free survival and chemoresistance in ovarian clear cell carcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2021 Jul 29];25(2):282–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22101352/>
35. PBRM1 polibromo 1 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55193>
36. Mo D, Li C, LIANG J, Shi Q, Su N, Luo S, et al. Low PBRM1 identifies tumor progression and poor prognosis in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2015 [cited 2021 Jul 29];8(8):9307. Available from: <https://pmc/articles/PMC4583913/>
37. Haase S, Garcia-Fabiani MB, Carney S, Altshuler D, Núñez FJ, Méndez FM, et al. Mutant ATRX: uncovering a new therapeutic target for glioma. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2018 Jul 3 [cited 2022 Mar 19];22(7):599–613. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29889582/>
38. ATRX Remodelador de cromatina ATRX [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/546>
39. Luo W, Fedda F, Lynch P, Tan D. CDH1 Gene and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: Molecular and Histological Alterations and Implications for Diagnosis And Treatment. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 Dec 5 [cited 2022 May 21];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30568591/>
40. National Library of Medicine. CDH1 cadherin 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/999>
41. Usui G, Matsusaka K, Mano Y, Urabe M, Funata S, Fukayama M, et al. DNA Methylation and Genetic Aberrations in Gastric Cancer. *Digestion* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 May 21];102(1):25–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33070127/>
42. Aftimos P, Oliveira M, Irrthum A, Fumagalli D, Sotiriou C, Gal-Yam EN, et al. Genomic and Transcriptomic Analyses of Breast Cancer Primaries and Matched Metastases in AURORA, the Breast International Group (BIG) Molecular Screening Initiative. *Cancer Discov* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 May 21];11(11):2796–811. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34183353/>

43. National Library of Medicine. ESR1 estrogen receptor 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2099>
44. National Library of Medicine. ESR2 estrogen receptor 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2100>
45. Martin M, Zielinski C, Ruiz-Borrego M, Carrasco E, Turner N, Ciruelos EM, et al. Palbociclib in combination with endocrine therapy versus capecitabine in hormonal receptor-positive, human epidermal growth factor 2-negative, aromatase inhibitor-resistant metastatic breast cancer: a phase III randomised controlled trial-PEARL. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 May 21];32(4):488-99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33385521/>
46. Murugan A, Grieco M, Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 5];59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31255772/>
47. Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2020 Jul 15 [cited 2022 Mar 20];80(14):2669–974. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32209560/>
48. Roskoski R. Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Mar 20];135:239–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30118796/>
49. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Jun 24 [cited 2022 Jul 20];384(25):2371–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34096690/>
50. KEGG PATHWAY Database. KEGG PATHWAY: Pathways in cancer - Homo sapiens (human) [Internet]. [cited 2022 Mar 20]. Available from: <https://www.genome.jp/pathway/hsa05200>
51. Schaub FX, Dhankani V, Berger AC, Trivedi M, Richardson AB, Shaw R, et al. Pan-cancer Alterations of the MYC Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas. *Cell Syst* [Internet]. 2018 Mar 28 [cited 2022 Mar 20];6(3):282-300.e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29596783/>
52. Liu Y, Zhu C, Tang L, Chen Q, Guan N, Xu K, et al. MYC dysfunction modulates stemness and tumorigenesis in breast cancer. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 5];17(1):178–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33390842/>
53. Fallah Y, Brundage J, Allegakoen P, Shahajan-Haq A. MYC-Driven Pathways in Breast

- Cancer Subtypes. *Biomolecules* [Internet]. 2017 Jul 11 [cited 2021 Aug 5];7(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28696357/>
54. PIK3CA fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa catalítica subunidad alfa [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5290>
55. Zhang M, Jang H, Nussinov R. PI3K inhibitors: review and new strategies. *Chem Sci* [Internet]. 2020 Jun 21 [cited 2021 Jul 26];11(23):5855–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32953006/>
56. Wang Z, Shang J, Li Z, Li H, Zhang C, He K, et al. PIK3CA Is Regulated by CUX1, Promotes Cell Growth and Metastasis in Bladder Cancer via Activating Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Dec 3 [cited 2022 Mar 20];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33344221/>
57. Berger AC, Korkut A, Kanchi RS, Hegde AM, Lenoir W, Liu W, et al. A comprehensive Pan-Cancer molecular study of gynecologic and breast cancers. *Cancer Cell* [Internet]. 2018 Apr 9 [cited 2021 Oct 30];33(4):690. Available from: [/pmc/articles/PMC5959730/](https://pmc/articles/PMC5959730/)
58. Wang S, Liu M, Lian S, Liu N, Zhang G, Zhao Q, et al. Which Is the Most Appropriate PI3K Inhibitor for Breast Cancer Patients with or without PIK3CA Status Mutant? A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Biomed Res Int* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 26];2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33376736/>
59. Pearson HB, Li J, Meniel VS, Fennell CM, Waring P, Montgomery KG, et al. Identification of *Pik3ca* Mutation as a Genetic Driver of Prostate Cancer That Cooperates with *Pten* Loss to Accelerate Progression and Castration-Resistant Growth. *Cancer Discov* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Mar 20];8(6):764–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29581176/>
60. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo H, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2019 May 16 [cited 2021 Jul 29];380(20):1929–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31091374/>
61. AKT1 AKT serine/threonine kinase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/207>
62. Revathidevi S, Munirajan AK. Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 20];59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31173856/>
63. National Library of Medicine. IDH1 isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3417>

64. National Library of Medicine. IDH2 isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3418>
65. Pirozzi CJ, Yan H. The implications of IDH mutations for cancer development and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2022 May 21];18(10):645–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34131315/>
66. Ortiz B, Jimenez MJ, Correa LN. Caracterización molecular del glioblastoma multiforme de un paciente con larga sobrevida. *Acta Neurológica Colomb.* 2021 Mar 1;37(1):27–32.
67. Ricaurte O, Neita K, Valero D, Ortega-Rojas J, Arboleda-Bustos CE, Zubieta C, et al. Estudio de mutaciones en los genes IDH1 e IDH2 en una muestra de gliomas de población colombiana. *Biomédica* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 May 21];38:86–92. Available from: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3708>
68. Objetivo mecánico de MTOR de la rapamicina quinasa [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2475>
69. Hare SH, Harvey AJ. mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2017 [cited 2021 Jul 26];7(3):383. Available from: [/pmc/articles/PMC5385631/](https://pmc/articles/PMC5385631/)
70. Transcriptasa inversa de la telomerasa TERT [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7015>
71. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hemminki K, Kumar R. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2014 Feb [cited 2022 Mar 20];24(1):30–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24657534/>
72. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 1997 Apr [cited 2022 Mar 20];33(5):787–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9282118/>
73. Donati B, Ciarrocchi A. Telomerase and Telomeres Biology in Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jun 2 [cited 2022 Mar 20];20(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31200515/>
74. H3C10 H3 clustered histone 10 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8357>
75. Xie W, Zhang J, Zhong P, Qin S, Zhang H, Fan X, et al. Expression and potential prognostic value of histone family gene signature in breast cancer. *Exp Ther Med* [Internet]. 2019 Oct 25 [cited 2021 Aug 5];18(6). Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31772649/>
76. Karim S, Al-Maghribi JA, Farsi HMA, Al-Sayyad AJ, Schulten HJ, Buhmeida A, et al. Cyclin D1 as a therapeutic target of renal cell carcinoma- a combined transcriptomics, tissue microarray and molecular docking study from the Kingdom of Saudi Arabia. *BMC Cancer* [Internet]. 2016 [cited 2022 Apr 24];16(Suppl 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27766950/>
77. Kim G, Kurnit KC, Djordjevic B, Singh C, Munsell MF, Wang WL, et al. Nuclear β-catenin localization and mutation of the CTNNB1 gene: a context-dependent association. *Mod Pathol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Mar 20];31(10):1553–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29795437/>
78. Travaglino A, Raffone A, Raimondo D, Reppuccia S, Ruggiero A, Arena A, et al. Prognostic significance of CTNNB1 mutation in early stage endometrial carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2022 [cited 2022 Mar 20]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35034160/>
79. Raffone A, Travaglino A, Mascolo M, Carbone L, Guida M, Insabato L, et al. TCGA molecular groups of endometrial cancer: Pooled data about prognosis. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Mar 20];155(2):374–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31472940/>
80. Travaglino A, Raffone A, Gencarelli A, Mollo A, Guida M, Insabato L, et al. TCGA Classification of Endometrial Cancer: the Place of Carcinosarcoma. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2022 Mar 20];26(4):2067–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32472441/>
81. Babina IS, Turner NC. Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Mar 20];17(5):318–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28303906/>
82. Receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956>
83. OncologyPRO. Predictive Biomarkers | OncologyPRO [Internet]. [cited 2022 Mar 20]. Available from: <https://oncologypro.esmo.org/education-library/esmo-handbooks/translational-research/Predictive-Biomarkers>
84. ERBB2 erb-b2 receptor tirosina quinasa 2 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>
85. Barsouk A, Rawla P, Hadjinicolaou A V., Aluru JS, Barsouk A. Targeted Therapies and Immunotherapies in the Treatment of Esophageal Cancers. *Med Sci* (Basel, Switzerland) [Internet]. 2019 Sep 26 [cited 2022 Mar 20];7(10):100. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31561465/>
86. Wuerstlein R, Harbeck N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. *Rev Recent Clin Trials* [Internet]. 2017 Feb 23 [cited 2022 Mar 20];12(2):81–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28164759/>
87. Takada M, Toi M. Neoadjuvant treatment for HER2-positive breast cancer. *Chinese Clin Oncol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Mar 20];9(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32527117/>
88. KIT KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3815>
89. Cheng H, Qiu T, Shi S-S. Analysis of clinicopathologic features and gene mutations in gastrointestinal stromal tumor: a series of 58 patients. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 24];14(12):1128. Available from: [/pmc/articles/PMC8748011/](https://pmc/articles/PMC8748011/)
90. PDGFRA platelet derived growth factor receptor alpha [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5156>
91. MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4233>
92. Van Cutsem E, Karaszewska B, Kang YK, Chung HC, Shankaran V, Siena S, et al. A Multicenter Phase II Study of AMG 337 in Patients with MET-Amplified Gastric/Gastroesophageal Junction/Esophageal Adenocarcinoma and Other MET-Amplified Solid Tumors. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2019 Apr 15 [cited 2022 Mar 20];25(8):2414–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30366938/>
93. Socinski MA, Pennell NA, Davies KD. MET Exon 14 Skipping Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: An Overview of Biology, Clinical Outcomes, and Testing Considerations. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 2021 Nov [cited 2022 Jul 20];5(5):653–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34036238/>
94. Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos FGFR3 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2261>
95. Roskoski R. The role of fibroblast growth factor receptor (FGFR) protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment of cancers including those of the urinary bladder. *Pharmacol Res* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Mar 20];151. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31770593/>
96. Santolla M, Maggiolini M. The FGF/FGFR System in Breast Cancer: Oncogenic Features and Therapeutic Perspectives. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited

- 2021 Aug 6];12(10):1–20. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33081025/>
97. Bansal P, Dwivedi DK, Hatwal D, Sharma P, Gupta V, Goyal S, et al. Erdafitinib as a Novel and Advanced Treatment Strategy of Metastatic Urothelial Carcinoma. Anticancer Agents Med Chem [Internet]. 2021 Jan 31 [cited 2022 Mar 20];21(18):2478–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33475078/>
98. Siracusano S, Rizzetto R, Porcaro AB. Bladder cancer genomics. Urologia [Internet]. 2020 May [cited 2022 Mar 20];87(2):49–56. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31942831/>
99. Alhalabi O, Hahn AW, Msaouel P, Andreev-Drakhlin AY, Meric-Bernstam F, Naing A, et al. Molecular Profiling of Metastatic Bladder Cancer Early-Phase Clinical Trial Participants Predicts Patient Outcomes. Mol Cancer Res [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 Mar 20];19(3):395–402. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33323389/>
100. National Library of Medicine. NTRK1 neurotrophic receptor tyrosine kinase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 28]. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4914>
101. Bebb DG, Banerji S, Blais N, Desmeules P, Gill S, Grin A, et al. Canadian Consensus for Biomarker Testing and Treatment of TRK Fusion Cancer in Adults. Curr Oncol [Internet]. 2021 [cited 2022 May 28];28(1):523–48. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33467570/>
102. Solomon JP, Linkov I, Rosado A, Mullaney K, Rosen EY, Frosina D, et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. Mod Pathol [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 May 28];33(1):38–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31375766/>
103. EMA.EUROPA. Rozlytrek-Entrectinib - FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO.
104. ema.europa.eu. Vitrakvi-Larotrectinib/ FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO.
105. National Library of Medicine. ALK ALK receptor tyrosine kinase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 24]. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/238>
106. Abe I, Lam AK yin. Anaplastic Thyroid Carcinoma: Current Issues in Genomics and Therapeutics. Curr Oncol Rep [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 May 24];23(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33582932/>
107. Leventaki V, Bhattacharyya S, Lim MS. Pathology and genetics of anaplastic large cell lymphoma. Semin Diagn Pathol [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 May 24];37(1):57–

71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31882178/>
108. Remon J, Pignataro D, Novello S, Passiglia F. Current treatment and future challenges in ROS1- and ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 May 24];95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33743408/>
109. Luk PP, Selinger CI, Mahar A, Cooper WA. Biomarkers for ALK and ROS1 in Lung Cancer: Immunohistochemistry and Fluorescent In Situ Hybridization. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 May 24];142(8):922–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29902067/>
110. Zhang H, Shan G, Cai B, Bi G, Chen Z, Liang J, et al. Clinicopathological and prognostic implications of ALK rearrangement in patients with completely surgically resected lung adenocarcinoma. *Thorac cancer* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 May 24];12(22):3011–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34596344/>
111. National Library of Medicine. ROS1 ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6098>
112. National Library of Medicine. POLD1 DNA polymerase delta 1, catalytic subunit [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5424>
113. National Library of Medicine. POLE DNA polymerase epsilon, catalytic subunit [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5426>
114. Wang F, Zhao Q, Wang YN, Jin Y, He MM, Liu ZX, et al. Evaluation of POLE and POLD1 Mutations as Biomarkers for Immunotherapy Outcomes Across Multiple Cancer Types. *JAMA Oncol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 May 21];5(10):1504–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31415061/>
115. Magrin L, Fanale D, Brando C, Fiorino A, Corsini LR, Sciacchitano R, et al. POLE, POLD1, and NTHL1: the last but not the least hereditary cancer-predisposing genes. *Oncogene* [Internet]. 2021 Oct 7 [cited 2022 May 21];40(40):5893–901. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34363023/>
116. Mur P, García-Mulero S, del Valle J, Magraner-Pardo L, Vidal A, Pineda M, et al. Role of POLE and POLD1 in familial cancer. *Genet Med* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 May 21];22(12):2089–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32792570/>
117. National Library of Medicine. GNAQ G protein subunit alpha q [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2776>

118. National Library of Medicine. GNA11 G protein subunit alpha 11 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2767>
119. Choi E, Park SJ, Lee G, Yoon SK, Lee M, Lee SK. The GNAQ T96S Mutation Affects Cell Signaling and Enhances the Oncogenic Properties of Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Mar 2 [cited 2022 May 21];22(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33807071/>
120. Jager MJ, Shields CL, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH, Grossniklaus HE, Stern MH, et al. Uveal melanoma. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 May 21];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32273508/>
121. León-Castillo A, Britton H, McConechy MK, McAlpine JN, Nout R, Kommoos S, et al. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Jul 24];250(3):323–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31829442/>
122. Neapolitan R, Horvath CM, Jiang X. Pan-cancer analysis of TCGA data reveals notable signaling pathways. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 Jul 14 [cited 2022 Mar 20];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26169172/>
123. Oaknin A, Leon-Castillo A, Lorusso D. Progress in the management of endometrial cancer (subtypes, immunotherapy, alterations in PIK3CA pathway): data and perspectives. *Curr Opin Oncol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Mar 20];32(5):471–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32740093/>
124. Whitfield JR, Soucek L. The long journey to bring a Myc inhibitor to the clinic. *J Cell Biol* [Internet]. 2021 Aug 22 [cited 2022 Apr 24];220(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34160558/>
125. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells* [Internet]. 2020 Jan 13 [cited 2022 Mar 20];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31941155/>
126. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2022 Mar 20];8(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27141051/>
127. Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Mar 20];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33276800/>
128. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2022 Mar 20];169(6):985–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28575679/>

129. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017 Mar [cited 2022 Jul 20];67(2):93–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28094848/>
130. Kantarjian H, O’Brien S, Jabbour E, Garcia-Manero G, Quintas-Cardama A, Shan J, et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2022 Mar 20];119(9):1981–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22228624/>
131. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2022 Mar 20];4(3):256–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26213686/>
132. Ding L, Bailey M, Porta-Pardo E, Thorsson V, Colaprico A, Bertrand D, et al. Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. *Cell* [Internet]. 2018 Apr 5 [cited 2021 Aug 8];173(2):305–320.e10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29625049/>
133. Cheng D, Mitchell T, Zehir A, Shah R, Benayed R, Syed A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *J Mol Diagn* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 Jul 26];17(3):251–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25801821/>
134. EMA.EUROPA.EU. CRIZOTINIB. ANEXO I FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO.
135. Elsayed M, Christopoulos P. Therapeutic Sequencing in ALK+ NSCLC. *Pharm* 2021, Vol 14, Page 80 [Internet]. 2021 Jan 21 [cited 2022 Aug 27];14(2):80. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/2/80/htm>
136. Koshkin VS, Osbourne AS, Grivas P. Treatment options for advanced urothelial cancer after progression on chemotherapy and immune checkpoint inhibitors: a literature review. *Transl Androl Urol* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2022 Jun 15];10(10):4022–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34804845/>
137. Pierna Álvarez M, Marcos-Vadillo E, García-Berrocal B, Isidoro-García M. Farmacogenómica: la medicina personalizada. *Rev del Lab Clínico* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 May 22];12(3):147–54. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-farmacogenomica-medicina-personalizada-S1888400818300576>
138. Morán González D, Cabrera SJ, Hurlé ADG. [Pharmacogenetics in oncology]. *Med Clin*

- (Barc) [Internet]. 2008 Jul 5 [cited 2022 May 22];131(5):184–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18674490/>
139. Patel JN. Cancer pharmacogenomics, challenges in implementation, and patient-focused perspectives. *Pharmgenomics Pers Med* [Internet]. 2016 Jul 12 [cited 2022 May 22];9:65–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27471406/>
140. Cacic M, Krivokuća A, Boljević I, Brotto K, Jovanović K, Tanić M. Pharmacogenetics in cancer therapy - 8 years of experience at the Institute for Oncology and Radiology of Serbia - PubMed. JBUON [Internet]. 2016 [cited 2022 May 22]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27837635/>
141. Helsby NA, Yong M, van Kan M, de Zoysa JR, Burns KE. The importance of both CYP2C19 and CYP2B6 germline variations in cyclophosphamide pharmacokinetics and clinical outcomes. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 2019 [cited 2022 May 22];85(9):1925–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31218720/>
142. Sholl LM. Biomarkers in lung adenocarcinoma: a decade of progress. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Mar 20];139(4):469–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255293/>
143. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EN. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Jul 24];157. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33316418/>
144. Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 20];45(7):661–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31096307/>
145. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Mar 20];122(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29851291/>
146. Green ED, Watson JD, Collins FS. Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature* [Internet]. 2015 Sep 30 [cited 2022 Mar 20];526(7571):29–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26432225/>
147. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 May 22];17(6):333–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27184599/>
148. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* [Internet]. 2013 Dec [cited 2022 Mar 20];98(6):236–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23986538/>
149. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* [Internet].

- 2013 Sep [cited 2022 Mar 20];15(9):733–47. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23887774/>
150. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 May 15];9(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30478097/>
151. Willey JC, Morrison TB, Austermiller B, Crawford EL, Craig DJ, Blomquist TM, et al. Advancing NGS quality control to enable measurement of actionable mutations in circulating tumor DNA. Cell reports methods [Internet]. 2021 Nov 22 [cited 2022 May 15];1(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35475002/>
152. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics [Internet]. 2012 Jul 24 [cited 2022 Mar 20];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22827831/>
153. Rehder C, Bean LJH, Bick D, Chao E, Chung W, Das S, et al. Next-generation sequencing for constitutional variants in the clinical laboratory, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 Mar 20];23(8):1399–415. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33927380/>
154. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. Curr Genet Med Rep [Internet]. 2015 Dec [cited 2022 Jul 23];3(4):158–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26566462/>
155. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. Univ Medica [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 23];61(2). Available from: [https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2\(2020\)/231062391008/231062391008_visor_jats.pdf](https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2(2020)/231062391008/231062391008_visor_jats.pdf)
156. Zhang J, Yao Y, He H, Shen J. Clinical Interpretation of Sequence Variants. Curr Protoc Hum Genet [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 Mar 20];106(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32176464/>
157. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Curr Opin HIV AIDS [Internet]. 2010 Nov [cited 2022 Apr 24];5(6):463–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20978388/>
158. de la Haba-Rodriguez J, Lloret FF, Salgado MAV, Arce MO, Gutiérrez AC, Jiménez JG-D, et al. SEOM-GETTHI clinical guideline for the practical management of molecular platforms (2021). Clin Transl Oncol [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2022 May 28];24(4):693–702. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35362851/>
159. Sechidis K, Papangelou K, Metcalfe PD, Svensson D, Weatherall J, Brown G.

- Distinguishing prognostic and predictive biomarkers: an information theoretic approach. *Bioinformatics* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Mar 20];34(19):3365–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29726967/>
160. Cardoso F, Piccart-Gebhart M, Van't Veer L, Rutgers E. The MINDACT trial: the first prospective clinical validation of a genomic tool. *Mol Oncol* [Internet]. 2007 [cited 2022 Mar 20];1(3):246–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19383299/>
161. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Jul 20];18(9):1182–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28734759/>
162. Myriad Genetics. BRACAnalysis CDx® Technical Information [Internet]. [cited 2022 May 15]. Available from: www.myriad.com/technical-specifications
163. Miller RE, Leary A, Scott CL, Serra V, Lord CJ, Bowtell D, et al. ESMO recommendations on predictive biomarker testing for homologous recombination deficiency and PARP inhibitor benefit in ovarian cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 May 11];31(12):1606–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33004253/>
164. Milbury CA, Creeden J, Yip WK, Smith DL, Pattani V, Maxwell K, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne®CDx, a comprehensive genomic profiling assay for solid tumors. *PLoS One* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2022 May 15];17(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35294956/>
165. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Jul 20];31(11):1491–505. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32853681/>
166. Oldenhuis CNAM, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EGE. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer* [Internet]. 2008 May [cited 2022 May 15];44(7):946–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18396036/>
167. Nagashima T, Yamaguchi K, Urakami K, Shimoda Y, Ohnami S, Ohshima K, et al. Japanese version of The Cancer Genome Atlas, JCGA, established using fresh frozen tumors obtained from 5143 cancer patients. *Cancer Sci* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Aug 6];111(2):687–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31863614/>
168. Tsimberidou A, Hong D, Ye Y, Cartwright C, Wheler J, Falchook G, et al. Initiative for

- Molecular Profiling and Advanced Cancer Therapy (IMPACT): An MD Anderson Precision Medicine Study. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 2017 Nov [cited 2021 Aug 6];2017(1):1–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29082359/>
169. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Schilsky RL, Brookland RK, Washington MK, et al. American Joint Committee on Cancer (AJCC). *AJCC Cancer Staging Manual* [Internet]. AJCC Cancer Staging Manual. 2017 [cited 2022 Mar 20]. 211–212 p. Available from: <https://link.springer.com/book/9783319406176>
170. Neeman E, Gresham G, Ovasapians N, Hendifar A, Tuli R, Figlin R, et al. Comparing Physician and Nurse Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS) Ratings as Predictors of Clinical Outcomes in Patients with Cancer. *Oncologist* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Aug 15];24(12):e1460–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31227648/>
171. Tresserra F, Martinez Lanao MA, Soler MT. Manejo de las muestras para test inmunohistoquímicos, moleculares y genéticos en el cáncer de mama. *Rev Senol y Patol Mamar* [Internet]. 2016 [cited 2022 Aug 13]; Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-pdf-S0214158215001206>
172. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 May 22];37(6):564–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26931183/>
173. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 May 22];19(1):4–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27993330/>
174. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. 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. *Genet Med* [Internet]. 2015 May 8 [cited 2021 Aug 8];17(5):405–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25741868/>
175. Tempfer CB, Tischhoff I, Dogan A, Hilal Z, Schultheis B, Kern P, et al. Neuroendocrine carcinoma of the cervix: a systematic review of the literature. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 May 4 [cited 2022 Aug 28];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29728073/>
176. An Y, Zhou J, Lin G, Wu H, Cong L, Li Y, et al. Clinicopathological and Molecular

- Characteristics of Colorectal Signet Ring Cell Carcinoma: A Review. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2021 Jul 26 [cited 2022 Aug 28];27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34381313/>
177. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2021 Sep 11];472(5):697–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29380126/>
178. College of American Pathologists. Protocol for the Examination of Resection Specimens from Patients with Invasive Carcinoma of the Breast. 2022 [cited 2022 Aug 15]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols
179. College of American Pathologists. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Cancers of the Larynx. 2021 [cited 2022 Aug 15]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols
180. Burgart LJ, Chopp W V, Jain D. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma of the Esophagus With guidance from the CAP Cancer and CAP Pathology Electronic Reporting Committees. 2022 [cited 2022 Aug 15]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols
181. Hermann RM, Horstmann O, Haller F, Perske C, Christiansen H, Hille A, et al. Histomorphological tumor regression grading of esophageal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: which score to use? *Dis esophagus Off J Int Soc Dis Esophagus* [Internet]. 2006 Oct [cited 2022 Aug 15];19(5):329–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16984527/>
182. Iglesias-lópez RA, Villanueva-alvarado HS, Corrales-hernández JJ, Sánchez-marcos AI, Recio-córdova JM, Mories-álvarez MT. Seguimiento posterapéutico del paciente con carcinoma tiroideo. 2020;329–39.
183. Mete O, Asa SL, Bullock MJ, Carty SE, Hodak S, Mchugh JB, et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinomas of the Thyroid Gland With guidance from the CAP Cancer and CAP Pathology Electronic Reporting Committees. 2021 [cited 2022 Aug 15]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols
184. Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, et al. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice: Recommendations of the International Society of Gynecological Pathologists. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Apr 25];38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S64–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30550484/>
185. Krishnamurti UG, Crothers BA. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma and Carcinosarcoma of the Endometrium With guidance from the CAP Cancer and CAP Pathology Electronic Reporting Committees. 2022 [cited 2022 Aug 15]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols

186. Van Den Heerik ASVM, Horeweg N, De Boer SM, Bosse T, Creutzberg CL. Adjuvant therapy for endometrial cancer in the era of molecular classification: radiotherapy, chemoradiation and novel targets for therapy. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Aug 21];31(4):594. Available from: /pmc/articles/PMC8020082/
187. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2022 Sep 3];69(3):428–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26166626/>
188. Paner GP, Srigley JR, Pettus J, Giovanna ;, Giannico A, Sirintrapun J, et al. Protocol for the Examination of Radical Prostatectomy Specimens From Patients With Carcinoma of the Prostate Gland With guidance from the CAP Cancer and CAP Pathology Electronic Reporting Committees. 2021 [cited 2022 Aug 15]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols
189. Fizazi K, Tran NP, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone acetate plus prednisone in patients with newly diagnosed high-risk metastatic castration-sensitive prostate cancer (LATITUDE): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2022 Sep 3];20(5):686–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987939/>
190. Paner GP, Zhou M, Srigley JR, Harik LR, Amin MB, Allan R, et al. Protocol for the Examination of Cystectomy Specimens From Patients With Carcinoma of the Urinary Bladder. 2021 [cited 2022 Aug 15]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols
191. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kenneke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2022 Aug 30];28(10):1684–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20194857/>
192. Abe O, Abe R, Enomoto K, Kikuchi K, Koyama H, Masuda H, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* [Internet]. 2011 Aug 27 [cited 2022 Aug 27];378(9793):771–84. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673611609938/fulltext>
193. Galimberti V, Cole BF, Zurrida S, Viale G, Luini A, Veronesi P, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2022 Sep 4];14(4):297–305. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23491275/>
194. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio I, et al. Early

- breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Aug 22];30(8):1194–220. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31161190/>
195. Allemani C, Minicozzi P, Berrino F, Bastiaannet E, Gavin A, Galceran J, et al. Predictions of survival up to 10 years after diagnosis for European women with breast cancer in 2000–2002. *Int J Cancer* [Internet]. 2013 May 15 [cited 2022 Aug 27];132(10):2404–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23047687/>
196. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im S-A, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Nov 17 [cited 2022 Aug 30];375(20):1925–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27959613/>
197. Caswell-Jin JL, Plevritis SK, Tian L, Cadham CJ, Xu C, Stout NK, et al. Change in Survival in Metastatic Breast Cancer with Treatment Advances: Meta-Analysis and Systematic Review. *JNCI cancer Spectr* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Apr 24];2(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30627694/>
198. Llombart-Cussac A, Pérez-García JM, Bellet M, Dalenc F, Gil-Gil M, Ruíz-Borrego M, et al. Fulvestrant-Palbociclib vs Letrozole-Palbociclib as Initial Therapy for Endocrine-Sensitive, Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Advanced Breast Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Sep 4];7(12):1791–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34617955/>
199. Caudle AS, Gonzalez-Angulo AM, Hunt KK, Liu P, Pusztai L, Symmans WF, et al. Predictors of tumor progression during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Apr 10 [cited 2022 Sep 4];28(11):1821–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20231683/>
200. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275–81.
201. Untch M, Jackisch C, Schneeweiss A, Schmatloch S, Aktas B, Denkert C, et al. NAB-Paclitaxel Improves Disease-Free Survival in Early Breast Cancer: GBG 69-GeparSepto. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 Sep 18];37(25):2226–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31082269/>
202. Tan QX, Qin QH, Yang WP, Mo QG, Wei CY. Prognostic value of Ki67 expression in HR-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 18];7(10):6862. Available from: [/pmc/articles/PMC4230098/](https://pmc/articles/PMC4230098/)
203. Wang RX, Chen S, Jin X, Shao ZM. Value of Ki-67 expression in triple-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy with weekly paclitaxel plus

- carboplatin. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jul 18 [cited 2022 Sep 18];6. Available from: [/pmc/articles/PMC4948023/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4948023/)
204. Ayala de la Peña F, Andrés R, García-Sáenz J, Manso L, Margelí M, Dalmau E, et al. SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer (2018). *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2019 Jan 25 [cited 2021 Jul 26];21(1):18–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30443868/>
205. Shahbandi A, Nguyen HD, Jackson JG. TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines. *Trends in cancer* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Aug 4];6(2):98. Available from: [/pmc/articles/PMC7931175/](https://pmc/articles/PMC7931175/)
206. Nunnery S, Mayer I. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Hormone-Positive Breast Cancer. *Drugs* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Aug 4];80(16):1685–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32894420/>
207. Narayan P, Prowell T, Gao J, Fernandes L, Li E, Jiang X, et al. FDA Approval Summary: Alpelisib Plus Fulvestrant for Patients with HR-positive, HER2-negative, PIK3CA-mutated, Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Jul 26];27(7):1842–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33168657/>
208. Piccart M, Hortobagyi G, Campone M, Pritchard K, Lebrun F, Ito Y, et al. Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2†. *Ann Oncol* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2021 Jul 29];25(12):2357–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25231953/>
209. Kruger D, Opdam M, Sanders J, van der Noort V, Boven E, Linn S. Hierarchical clustering of PI3K and MAPK pathway proteins in breast cancer intrinsic subtypes. *APMIS* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Aug 5];128(4):298–307. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31976581/>
210. Suárez-Cabrera C, de la Peña B, González L, Page A, Martínez-Fernández M, Casanova M, et al. The Ras-related gene ERAS is involved in human and murine breast cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Aug 5];8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30158566/>
211. Liu D, Zhou K. BRAF/MEK Pathway is Associated With Breast Cancer in ER-dependent Mode and Improves ER Status-based Cancer Recurrence Prediction. *Clin Breast Cancer* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Aug 5];20(1):41-50.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31547956/>
212. Mo H, Liu P. Targeting MET in cancer therapy. *Chronic Dis Transl Med* [Internet]. 2017 Sep [cited 2021 Aug 6];3(3):148–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29063069/>

213. Motomura H, Nozaki Y, Onaga C, Ozaki A, Tamori S, Shiina T, et al. High Expression of c-Met, PKC λ and ALDH1A3 Predicts a Poor Prognosis in Late-stage Breast Cancer. *Anticancer Res* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 6];40(1):35–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31892551/>
214. Hsu J, Hung M. The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2021 Aug 6];35(4):575–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27913999/>
215. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012 Mar [cited 2021 Aug 6];13(3):3245–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22489151/>
216. Okubo M, Itonaga T, Saito T, Shiraishi S, Mikami R, Sakurada A, et al. Predictive factors for local control of early glottic squamous cell carcinomas after definitive radiotherapy. *Mol Clin Oncol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Aug 13];12(6):541–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32337036/>
217. Tamura Y, Tanaka S, Asato R, Hirano S, Yamashita M, Tamaki H, et al. Therapeutic outcomes of laryngeal cancer at Kyoto University Hospital for 10 years. *Acta Otolaryngol Suppl* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2022 Mar 28];127(557):62–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17453448/>
218. Forastiere AA, Ismaila N, Wolf GT. Use of Larynx-Preservation Strategies in the Treatment of Laryngeal Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update Summary. *J Oncol Pract* [Internet]. 2018 Feb [cited 2022 Mar 28];14(2):123–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29172913/>
219. Lefebvre JL, Pointreau Y, Rolland F, Alfonsi M, Baudoux A, Sire C, et al. Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: the TREMLIN randomized phase II study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2022 Aug 13];31(7):853–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23341517/>
220. Larizadeh MH, Mohammadi F, Shabani M, Damghani MA. Induction Chemotherapy Followed by either Chemoradiotherapy or Bioradiotherapy in Laryngeal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Aug 13];22(5):1633–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34048195/>
221. Yu SS, Cirillo N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Mar 21];235(1):65–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31206697/>
222. Organization WH. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2022 Mar 28]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>

223. Mesia R, Iglesias L, Lambea J, Martínez-Trufero J, Soria A, Taberna M, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2020). *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2022 Mar 21];23(5):913–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33635468/>
224. Swiecicki PL, Brennan JR, Mierzwa M, Spector ME, Brenner JC. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Detection and Surveillance: Advances of Liquid Biomarkers. *Laryngoscope* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Mar 27];129(8):1836. Available from: /pmc/articles/PMC6586546/
225. Concu R, Cordeiro MNDS. Cetuximab and the Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2018 Jan 15 [cited 2022 Mar 27];18(3):192–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29332581/>
226. Leblanc O, Vacher S, Lecerf C, Jeannot E, Klijanienko J, Berger F, et al. Biomarkers of cetuximab resistance in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Med* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Mar 27];17(1):208–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32296588/>
227. Dean L, Kane M, Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, Esquivel B. Cetuximab Therapy and RAS and BRAF Genotype - PubMed [Internet]. [cited 2022 Mar 27]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33237690/>
228. Hutchinson MKND, Mierzwa M, D'Silva NJ. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene* [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2022 Mar 27];39(18):3638–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32157215/>
229. Gavrielatou N, Doumas S, Economopoulou P, Foukas PG, Psyrra A. Biomarkers for immunotherapy response in head and neck cancer. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Mar 27];84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32018128/>
230. Yu L, Gong C. Pancancer analysis of a potential gene mutation model in the prediction of immunotherapy outcomes. *Front Genet*. 2022;13(August):1–12.
231. Avery TY, Köhler N, Zeiser R, Brummer T, Ruess DA. Onco-immunomodulatory properties of pharmacological interference with RAS-RAF-MEK-ERK pathway hyperactivation. *Front Oncol*. 2022;12(July):1–30.
232. Berney DM, Beltran L, Fisher G, North B V., Greenberg D, Møller H, et al. Validation of a contemporary prostate cancer grading system using prostate cancer death as outcome. *Br J Cancer* [Internet]. 2016 May 5 [cited 2022 Sep 3];114(10):1078. Available from: /pmc/articles/PMC4865975/
233. Pisano C, Tucci M, Di Stefano RF, Turco F, Scagliotti GV, Di Maio M, et al. Interactions between androgen receptor signaling and other molecular pathways in prostate

- cancer progression: Current and future clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Mar 27];157. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33341506/>
234. Tanaka M, Suzuki Y, Takaoka K, Suzuki N, Murakami S, Matsuzaki O, et al. Progression of prostate cancer to neuroendocrine cell tumor. *Int J Urol* [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2022 Sep 3];8(8):431–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11555007/>
235. Nyquist MD, Corella A, Coleman I, De Sarkar N, Kaipainen A, Ha G, et al. Combined TP53 and RB1 Loss Promotes Prostate Cancer Resistance to a Spectrum of Therapeutics and Confers Vulnerability to Replication Stress. *Cell Rep* [Internet]. 2020 May 26 [cited 2022 Mar 27];31(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32460015/>
236. Herberts C, Murtha AJ, Fu S, Wang G, Schönlau E, Xue H, et al. Activating AKT1 and PIK3CA Mutations in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Mar 27];78(6):834–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32451180/>
237. Bachmann S, Iding H, Lautz C, Thomé-Pfeiffer I, Maierhofer C, Mondière R, et al. Development of the Commercial Manufacturing Process for Ipatasertib. *Chimia (Aarau)* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 Mar 27];75(7):605–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34523401/>
238. Chau V, Madan RA, Aragon-Ching JB. Protein kinase inhibitors for the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 15];22(14):1889–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33989112/>
239. Mitra AP, Quinn DI, Dorff TB, Skinner EC, Schuckman AK, Miranda G, et al. Factors influencing post-recurrence survival in bladder cancer following radical cystectomy. *BJU Int* [Internet]. 2012 Mar [cited 2022 Sep 3];109(6):846–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21812902/>
240. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Grossen S, Feng AC, Boyd S, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2022 Sep 3];19(3):666–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11157016/>
241. Wright JL, Lin DW, Porter MP. The association between extent of lymphadenectomy and survival among patients with lymph node metastases undergoing radical cystectomy. *Cancer* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2022 Sep 3];112(11):2401–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18383515/>
242. Hong X, Li T, Ling F, Yang D, Hou L, Li F, et al. Impact of surgical margin status on the outcome of bladder cancer treated by radical cystectomy: a meta-analysis.

- Oncotarget [Internet]. 2017 [cited 2022 Sep 3];8(10):17258–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27791991/>
243. Lenis AT, Lec PM, Chamie K. Bladder Cancer: A Review. JAMA [Internet]. 2020 Nov 17 [cited 2022 Mar 27];324(19):1980–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33201207/>
244. Christensen E, Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, Høyer S, van der Keur K, van Kessel K, et al. Liquid Biopsy Analysis of FGFR3 and PIK3CA Hotspot Mutations for Disease Surveillance in Bladder Cancer. Eur Urol [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2022 Mar 27];71(6):961–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28069289/>
245. Roubal K, Myint ZW, Kolesar JM. Erdafitinib: A novel therapy for FGFR-mutated urothelial cancer. Am J Health Syst Pharm [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Mar 27];77(5):346–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32073123/>
246. Alderson D, Cunningham D, Nankivell M, Blazeby JM, Griffin SM, Crellin A, et al. Neoadjuvant cisplatin and fluorouracil versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine followed by resection in patients with oesophageal adenocarcinoma (UK MRC OE05): an open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol [Internet]. 2017;18(9):1249–60. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30447-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30447-3)
247. Table S, Lowering P, Comparing T, Intervention A, Cad MI. Supplementary appendix Supplementary Appendix : Lancet Oncol. 2015;6736(15):1–24.
248. Drage MG, Tippayawong M, Agoston AT, Zheng Y, Bueno R, Hornick JL, et al. Morphological Features and Prognostic Significance of ARID1A-Deficient Esophageal Adenocarcinomas. Arch Pathol Lab Med [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Mar 27];141(7):970–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28440661/>
249. Haddad RI, Bischoff L, Ball D, Bernet ; Victor, Blomain E, Naifa ;, et al. Thyroid Carcinoma, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Cancer Netw [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2022 Aug 13];20(8):925–51. Available from: <https://jccn.org/view/journals/jccn/20/8/article-p925.xml>
250. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Thyroid [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Aug 13];26(1):1–133. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26462967/>
251. Momesso DP, Vaisman F, Yang SP, Bulzico DA, Corbo R, Vaisman M, et al. Dynamic Risk Stratification in Patients with Differentiated Thyroid Cancer Treated Without Radioactive Iodine. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2022 Aug 13];101(7):2692–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27023446/>

252. Tuttle RM, Tala H, Shah J, Leboeuf R, Ghossein R, Gonen M, et al. Estimating risk of recurrence in differentiated thyroid cancer after total thyroidectomy and radioactive iodine remnant ablation: using response to therapy variables to modify the initial risk estimates predicted by the new American Thyroid Association st. Thyroid [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2022 Aug 13];20(12):1341–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21034228/>
253. Aashiq M, Silverman DA, Na'ara S, Takahashi H, Amit M. Radioiodine-Refactory Thyroid Cancer: Molecular Basis of Redifferentiation Therapies, Management, and Novel Therapies. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 Mar 27];11(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31533238/>
254. Yoo SK, Song YS, Lee EK, Hwang J, Kim HH, Jung G, et al. Integrative analysis of genomic and transcriptomic characteristics associated with progression of aggressive thyroid cancer. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Mar 27];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31235699/>
255. Sweeney SM, Cerami E, Baras A, Pugh TJ, Schultz N, Stricker T, et al. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov* [Internet]. 2017 [cited 2022 Mar 27];7(8):818–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28572459/>
256. Haroon AI, Rasheed MR, Xu B. Molecular Alterations in Thyroid Carcinoma. *Surg Pathol Clin* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Mar 27];12(4):921–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31672298/>
257. Poller DN, Glaysher S. Molecular pathology and thyroid FNA. *Cytopathology* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Mar 27];28(6):475–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29165888/>
258. Hemmer S, Wasenius VM, Knuutila S, Joensuu H, Franssila K. Comparison of benign and malignant follicular thyroid tumours by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* [Internet]. 1998 [cited 2022 Mar 27];78(8):1012–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9792143/>
259. Guntupalli SR, Zighelboim I, Kizer NT, Zhang Q, Powell MA, Thaker PH, et al. Lymphovascular space invasion is an independent risk factor for nodal disease and poor outcomes in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2022 Sep 4];124(1):31–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22030404/>
260. Restaino S, Tortorella L, Dinoi G, Zannoni GF, Baroni A, Capasso I, et al. Semiquantitative evaluation of lymph-vascular space invasion in patients affected by endometrial cancer: Prognostic and clinical implications. *Eur J Cancer* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Sep 4];142:29–37. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33217679/>
261. Bosse T, Peters EEM, Creutzberg CL, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Mens JWM, et al. Substantial lymph-vascular space invasion (LVSI) is a significant risk factor for recurrence in endometrial cancer--A pooled analysis of PORTEC 1 and 2 trials. *Eur J Cancer* [Internet]. 2015 Aug 8 [cited 2022 Sep 4];51(13):1742–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26049688/>
262. Jolly S, Vargas CE, Kumar T, Weiner SA, Brabbins DS, Chen PY, et al. The impact of age on long-term outcome in patients with endometrial cancer treated with postoperative radiation. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2022 Sep 4];103(1):87–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16545441/>
263. Mundt AJ, Waggoner S, Yamada D, Rotmensch J, Connell PP. Age as a prognostic factor for recurrence in patients with endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2000 [cited 2022 Sep 4];79(1):79–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11006036/>
264. Gallo A, Catena U, Saccone G, Sardo ADS. Conservative Surgery in Endometrial Cancer. *J Clin Med* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Mar 27];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35011924/>
265. León-Castillo A, Gilvazquez E, Nout R, Smit VTHBM, McAlpine JN, McConechy M, et al. Clinicopathological and molecular characterisation of “multiple-classifier” endometrial carcinomas. *J Pathol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Apr 25];250(3):312–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31829447/>
266. Moroney MR, Davies KD, Wilberger AC, Sheeder J, Post MD, Berning AA, et al. Molecular markers in recurrent stage I, grade 1 endometrioid endometrial cancers. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Mar 28];153(3):517–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30910249/>
267. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martín A, Ledermann J, et al. ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference on endometrial cancer: Diagnosis, treatment and follow-up. *Radiother Oncol* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2022 Mar 27];117(3):559–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26683800/>
268. Costigan DC, Dong F, Nucci MR, Howitt BE. Clinicopathologic and Immunohistochemical Correlates of CTNNB1 Mutated Endometrial Endometrioid Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Mar 27];39(2):119–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30702464/>
269. Bell DW, Ellenson LH. Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 27];14:339–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30332563/>
270. Urick ME, Bell DW. Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer.

- Nat Rev Cancer [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 Jul 24];19(9):510–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31388127/>
271. Thiese MS. Observational and interventional study design types; an overview. Biochem medica [Internet]. 2014 [cited 2022 Jun 18];24(2):199–210. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24969913/>
272. Ranganathan P, Aggarwal R. Study designs: Part 1 – An overview and classification. Perspect Clin Res [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Jun 18];9(4):184. Available from: [/pmc/articles/PMC6176693/](https://pmc/articles/PMC6176693/)
273. Guillou J, Petit C, Toutain B, Guette C, Lelièvre E, Coqueret O. Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. Cell Cycle [Internet]. 2019 Oct 2 [cited 2021 Aug 6];18(19):2385–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31397193/>
274. Oki M, Yatabe Y, Saka H, Kitagawa C, Kogure Y, Ichihara S, et al. Feasibility and accuracy of molecular testing in specimens obtained with small biopsy forceps: comparison with the results of surgical specimens. Respiration [Internet]. 2015 Mar 19 [cited 2021 Aug 6];89(3):235–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25676841/>
275. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. JAMA [Internet]. 2014 May 21 [cited 2022 Jun 15];311(19):1998–2006. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24846037/>

ANEXO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE PARA LA UTILIZACIÓN DE EXCEDENTE DE MUESTRA TUMORAL Y TEJIDO SANO PARA DETERMINACIÓN DE MUTACIONES GENÉTICAS

Propósito del estudio:

Esta institución está participando en un proyecto ambicioso realizado en el Instituto Valenciano de Patología y Unidad Mixta de Investigación Oncológica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (IVP-CIPF). El proyecto se centra en el estudio de la complejidad genética de los cánceres con el objetivo de estudiar mutaciones que permitan emplear una terapia dirigida y personalizada en pacientes con cáncer.

Riesgos y molestias relacionadas con la participación

Si usted está de acuerdo en participar en este estudio debe de saber que NO va a ser sometido a ninguna prueba adicional. Sólo necesitamos que nos permita utilizar parte del excedente de su tejido tumoral y sano, procedente de la intervención quirúrgica de su cáncer, que ya le han realizado.

Participación en el proyecto

Su participación en el proyecto es completamente voluntaria. Tanto si acepta como si rechaza la participación, no existirá ningún cambio en el diagnóstico de su enfermedad ni plan de tratamiento que está recibiendo.

Confidencialidad en la manipulación de las muestras

La muestra de tejido será enviada a un laboratorio externo (IVP-CIPF). Su muestra será identificada por un código que asegurará su anonimato en el laboratorio donde se analicen.

Los datos obtenidos en este estudio quedarán controlados por el equipo investigador quien se encargará de publicarlos si así se considera. Por supuesto, nunca aparecerán sus datos personales.

Obtención del Consentimiento

Para su participación en el estudio usted, o su representante legal, deberá firmar y fechar la página que se le proporcionará a continuación. Mediante dicha firma se autoriza la recogida y análisis de las muestras de tejido. La información médica recogida podría ser divulgada en medios de comunicación científica.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA UTILIZACIÓN DE EXCEDENTE DE MUESTRA TUMORAL Y TEJIDO SANO PARA DETERMINACIÓN DE MUTACIONES GENÉTICAS

Yo,

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el proyecto propuesto.

He hablado con el Dr.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo negarme:

- Cuando quiera
- Sin tener que justificarme
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para la utilización de excedente de muestra tumoral/sana.

Nombre del paciente

Firma

Fecha

“Lo imposible cuesta un poco más”

P. Mujica