

Artículo Original

Secuenciación paralela masiva en tumores sólidos: implicancias actuales y experiencia de un centro terciario chileno

Francisco J. Pérez, PhD (c)
Daniel E. Carvajal, MD

Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Biomarcadores
Servicio de Anatomía Patológica
Departamento de Laboratorio Clínico, Banco de Sangre y Anatomía Patológica
Clínica Alemana de Santiago, Facultad de Medicina Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

Contacto: frperezb@alemana.cl

Abreviaciones

NGS: secuenciación paralela masiva.

Resumen

La medicina de precisión ha mejorado la evolución clínica de los pacientes. La secuenciación paralela masiva (NGS) posibilita el análisis simultáneo de un gran número de genes relevantes en cáncer, potenciando la selección de terapias personalizadas. En Chile el estudio de alteraciones en genes individuales constituye la práctica clínica habitual en diagnóstico oncológico. Clínica Alemana de Santiago ofrece desde 2017, el primer test NGS de aplicación clínica del país.

Entre mayo de 2017 y abril de 2019 se realizaron 83 exámenes, con un promedio de 3 casos mensuales. Los tipos tumorales más frecuentes fueron colon (49%) y pulmón (24%). El 96% de los casos fue secuenciado exitosamente y todos presentaron al menos una mutación, siendo TP53 el gen con mayor frecuencia de alteraciones (90%). Mutaciones de relevancia clínica fueron detectadas en 91%, siendo 64% alteraciones potencialmente accionables. BRAF presentó alteraciones en la mayor variedad de tipos histológicos, con

mutaciones en tiroides, GIST, piel, pulmón y colon. KRAS presentó la mayor prevalencia de alteraciones drogables (38%). A un costo de MM\$ 1,5 este test es la opción más rápida y costo-efectiva para evaluar alteraciones en tres o más genes, en comparación al estudio secuencial de genes individuales en pacientes con tumores sólidos.

Introducción

Durante los últimos años, el tratamiento del cáncer ha evolucionado desde el paradigma de un esquema terapéutico seleccionado de acuerdo a las características histopatológicas del tumor, hacia la utilización de fármacos dirigidos molecularmente para tratar alteraciones genéticas presentes en una gama de tipos tumorales⁽¹⁾. Este método de tratamiento, conocido como medicina personalizada o de precisión, ha permitido mejorar la evolución clínica de los pacientes y reducir los efectos secundarios.

Las terapias dirigidas han sido utilizadas durante años en la práctica clínica mediante el estudio de fragmentos de ADN en genes individuales, como EGFR en cáncer de pulmón

de células no pequeñas⁽²⁾ y RAS en cáncer colorrectal⁽³⁾. Sin embargo, estudios sugieren necesidad de caracterizar más exhaustivamente las alteraciones genéticas para identificar correctamente los pacientes que podrían beneficiarse de estas terapias^(1,4-6).

El desarrollo de la secuenciación paralela masiva (NGS), ha incrementado la capacidad de generación de datos, permitiendo analizar simultáneamente gran número de genes con relevancia en cáncer, constituyendo una poderosa herramienta en diagnóstico molecular y potenciando la selección de terapias personalizadas⁽⁶⁾.

Hasta 2017, el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Biomarcadores de Clínica Alemana de Santiago, ofrecía el estudio de mutaciones en 9 genes: BRAF, EGFR, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, NRAS, PDGFRA y PIK3CA. En mayo de 2017 fue lanzado el panel NGS ONCO-50. Este test, el primer panel NGS de aplicación clínica del país, evalúa en forma simultánea variantes de nucleótido simple (SNV) y pequeñas inserciones y deleciones (INDELS) presentes en 50 oncogenes y genes supresores de tumores.

Este trabajo describe nuestra experiencia utilizando el panel ONCO-50 para el diagnóstico de alteraciones genéticas en tumores sólidos, luego de dos años de implementación.

Descripción del test

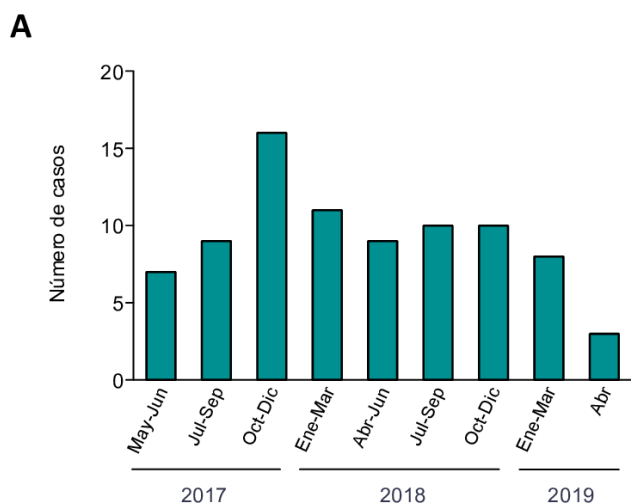
El panel ONCO-50 utiliza la tecnología de secuenciación paralela masiva de Ion Torrent, está basado en el panel Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (ThermoFisherScientific)

y ha sido optimizado para su utilización con muestras de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE), que es el estándar de procesamiento de tejido en Anatomía Patológica. El test permite generar 207 fragmentos de ADN (amplicones) a partir de 10 ng de ADN total aislado de la muestra y está diseñado para producir amplicones de un tamaño promedio de 154 pares de bases, lo que permite su uso incluso con muestras parcialmente degradadas. Una vez producidos, los fragmentos de ADN son marcados con una secuencia pre-definida de nucleótidos a modo de código de barras molecular, formando una librería de amplicones que luego es amplificada mediante reacción de la polimerasa en cadena en emulsión (emPCR). Las librerías amplificadas son secuenciadas en un secuenciador masivo Ion PGM™ y los datos de secuenciación son evaluados con el programa Torrent Suite. Finalmente las variantes detectadas son analizadas usando el programa Ion Reporter, utilizando filtros informáticos estandarizados durante la validación analítica del examen. Para el estudio de mutaciones fue utilizado como referencia el genoma humano GRCh37/hg19.

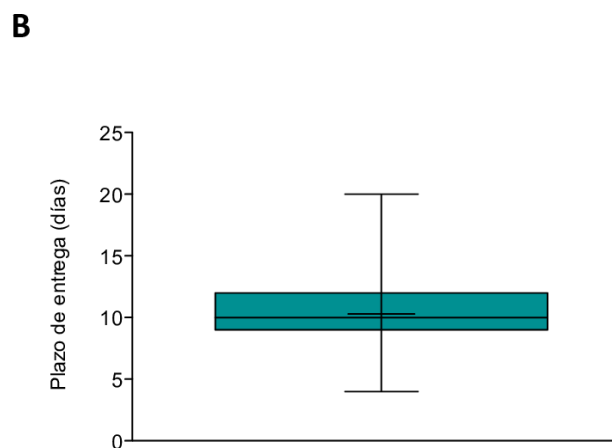
Resultados

En el período comprendido entre mayo de 2017 y abril de 2019 se realizaron 83 exámenes ONCO-50. La demanda se ha mantenido relativamente estable en el tiempo, con un promedio de tres casos mensuales (**Figura 1A**). El tiempo de entrega de los resultados ha promediado los 10 días hábiles, con un rango intercuartil de 9-12 días (**Figura 1B**). Este tiempo es calculado desde la solicitud del test hasta la publicación del informe y no considera el tiempo empleado en el diagnóstico histopatológico.

Figura 1. A. Número de casos del panel ONCO-50 realizados por intervalo de tiempo.



B. Diagrama de caja y bigote (box-plot) del plazo de entrega de resultados del panel ONCO-50. N=83.



Los tipos tumorales más frecuentemente testeados, de acuerdo a su clasificación histopatológica de origen, fueron colon (49%) y pulmón (24%) (**Figura 2**). El 96% de los casos (80/83) fue secuenciado exitosamente y en todos ellos se obtuvo resultados analizables. En tres casos (4%) no se contó con la cantidad y/o calidad suficiente de muestra para la secuenciación y estudio de las variantes. En todos los casos válidamente secuenciados se detectó al menos una mutación, siendo TP53 el gen con la mayor frecuencia de alteraciones, detectándose mutaciones en el 90% de

los casos (72/80). Otros genes frecuentemente mutados fueron PIK3CA (30%), KDR (26%), KRAS (24%) y APC (23%) (**Figura 3A**).

De acuerdo a su efecto biológico, se evidenció una amplia gama de variantes en los genes con alteraciones, predominando polimorfismos en TP53 (68/106), KDR (22/22) y PIK3CA (15/26), mientras que los genes con la más alta frecuencia de variantes con efecto patogénico fueron KRAS (18/19), BRAF (12/12) y NRAS (4/4) (**Figura 3B**).

Figura 2. Distribución de casos testeados con el panel ONCO-50 de acuerdo con su clasificación histopatológica de origen. N=83.

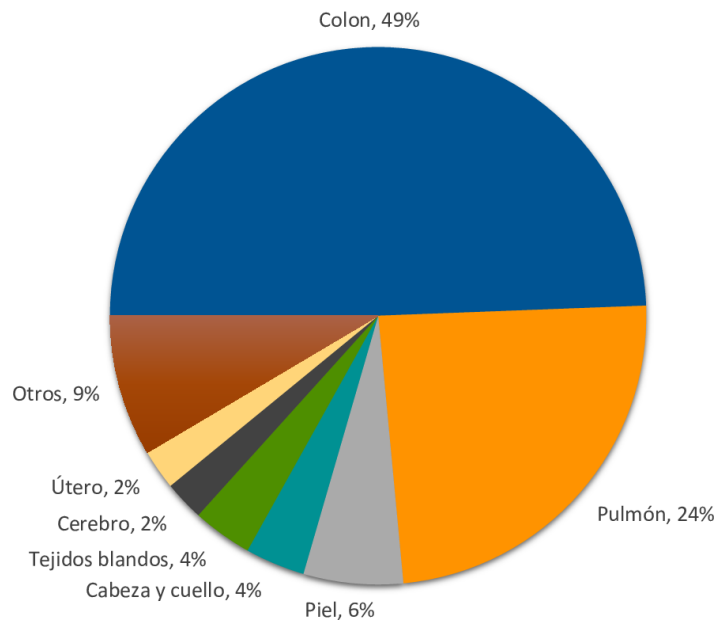
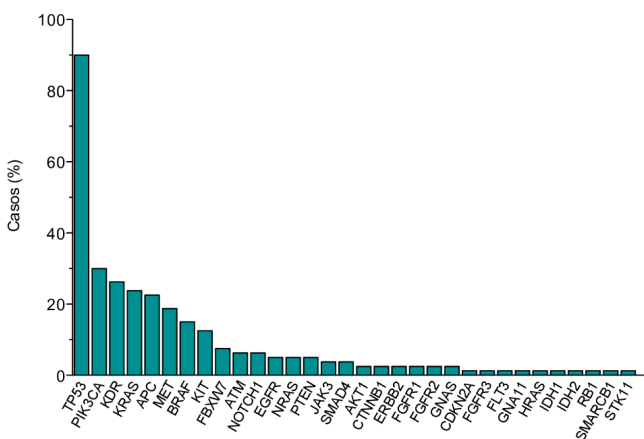
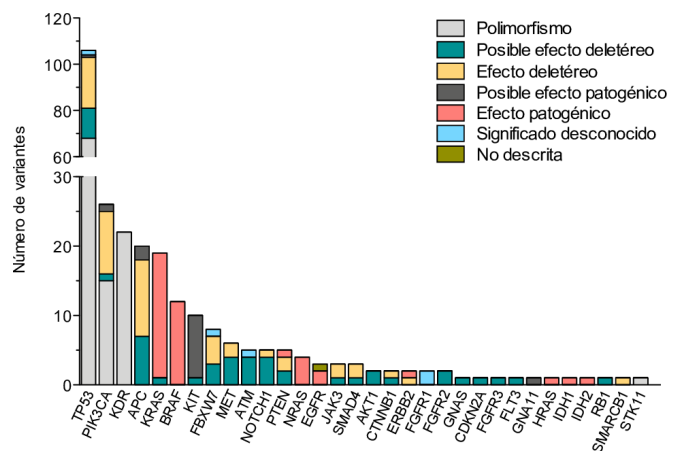


Figura 3.

A. Frecuencia de mutaciones en los genes del panel ONCO-50 en los casos con alteraciones detectadas. N=80.



B. Frecuencia del tipo de variantes, clasificadas de acuerdo con su efecto biológico, de los genes del panel ONCO-50 en los casos con alteraciones detectadas. N=80.

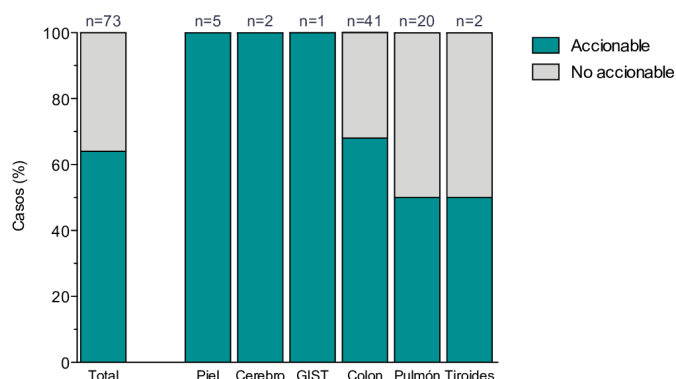


Se detectaron mutaciones de relevancia clínica conocida en el 91% de los casos (73/80), siendo un 64% de ellas (47/73) alteraciones potencialmente drogables, esto es, alteraciones que podrían predecir respuesta a terapias dirigidas⁷⁾. De acuerdo a la clasificación histológica del tumor, se evidenciaron mutaciones accionables en el 100% de las muestras de piel (5/5), cerebro (2/2) y GIST (1/1); en el 68% de las muestras de colon (28/41) y en el 50% de las muestras de pulmón (10/20) y tiroides (1/2) (**Figura 4A**).

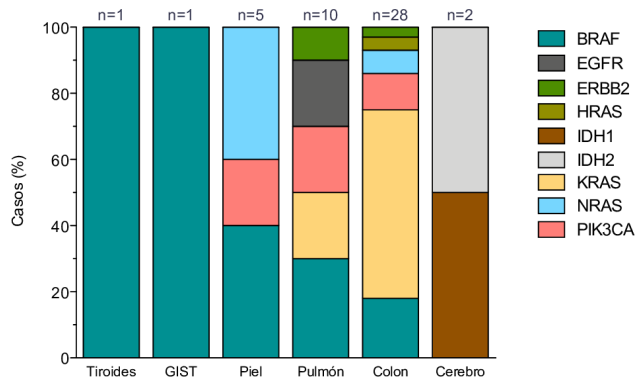
Las alteraciones accionables fueron detectadas en un conjunto de 9 genes: BRAF, EGFR, ERBB2, HRAS, IDH1, IDH2, KRAS, NRAS y PIK3CA. De este grupo, BRAF fue el gen que presentó alteraciones en la mayor variedad de tipos histológicos, con mutaciones detectadas en el 100% de los casos de tiroides (1/1) y GIST (1/1), en el 40% de los casos de piel (2/5), en el 30% de los casos de pulmón (3/10) y en el 18% de los casos de colon (5/28), (**Figura 4B**).

Figura 4.

A. Frecuencia de variantes accionables y no accionables detectadas de acuerdo con la clasificación histopatológica del tumor.

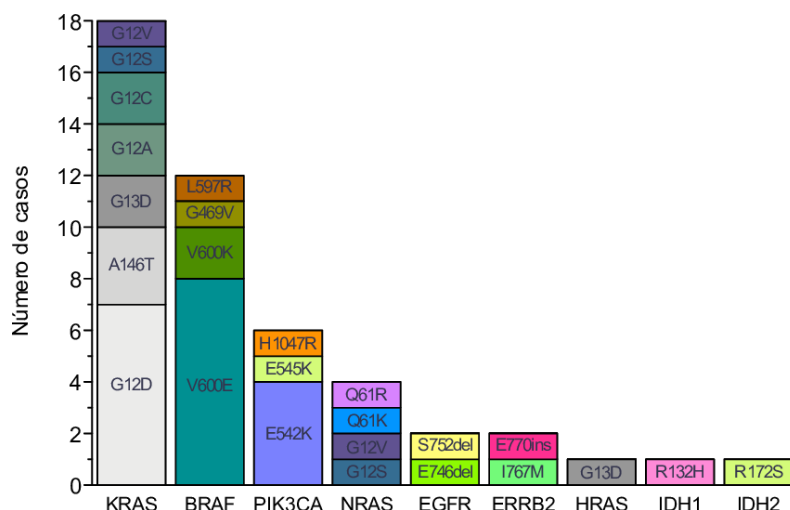


B. Distribución de genes con variantes accionables detectadas de acuerdo con la clasificación histopatológica del tumor.



Los tipos histológicos con mayor diversidad de genes con alteraciones drogables fueron colon y pulmón (6 y 5 genes, respectivamente). KRAS fue el gen con la mayor prevalencia de alteraciones predictivas, detectándose mutaciones en el 38% (18/47) de los casos, siendo las mutaciones del codón 12 las más frecuentes (13/18, 72%). Asimismo, NRAS presentó también una elevada frecuencia de mutaciones en el codón 12 (2/4, 50%). Otros genes con elevada prevalencia de alteraciones fueron BRAF, PIK3CA y NRAS, con 25% (12/47), 13% (6/47) y 9% (4/47) de los casos, respectivamente (**Figura 5**). EN BRAF, las mutaciones en el codón 600 fueron las más frecuentemente detectadas (10/12, 83%).

Figura 5. Distribución del número de variantes detectadas en los genes con alteraciones accionables. N=47.



El arancel de los tests de estudio de mutaciones en genes individuales está comprendido entre MM\$0,56 para BRAF, IDH1, IDH2, KRAS, NRAS ó PDGFRA, y MM\$0,72 para EGFR (**Tabla 1**). Considerando que en la práctica clínica habitual es necesario el estudio de más de un gen, el costo del estudio

de alteraciones en el tumor se eleva entre MM\$1,68 y 1,84 dependiendo del tipo histológico tumoral. En comparación, el estudio simultáneo de los 50 genes incluidos en el panel de secuenciación paralela masiva ONCO-50 tiene un arancel de MM\$1,5.

Tabla 1. Detalle de aranceles del año 2019 para estudios de mutaciones en genes blancos terapéuticos potenciales. MM\$: Millones de pesos chilenos.

Blancos terapéuticos potenciales					Costo por caso (MM\$)
Genes individuales					
cobas EGFR					0,72
Secuenciación Sanger: KIT					0,70
Secuenciación Sanger: BRAF, IDH1, IDH2, KRAS, NRAS ó PDGFRA					0,56
Combinaciones por tipo de tumor					
Colon (KRAS, NRAS, BRAF)					1,68
Melanoma (BRAF, NRAS, KIT)					1,82
Pulmón (EGFR, BRAF, KRAS)					1,84
Panel de secuenciación ONCO-50					
ABL1	EGFR	GNAS	KRAS	PTPN11	1,50
AKT1	ERBB2	GNAQ	MET	RB1	
ALK	ERBB4	HNF1A	MLH1	RET	
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4	
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1	
BRAF	FGFR1	JAK2	NPM1	SMO	
CDH1	FGFR2	JAK3	NRAS	SRC	
CDKN2A	FGFR3	IDH2	PDGFRA	STK11	
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53	
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN	VHL	

Conclusiones

En conclusión, el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Biomarcadores de Clínica Alemana de Santiago tiene a disposición de la comunidad médica el primer panel de secuenciación paralela masiva de uso clínico del país. A dos años desde su implementación el test ha sido realizado con éxito en 80/83 (96%) pacientes, llevando a la identificación de mutaciones de relevancia clínica en el 91% (73/80) y permitiendo evidenciar un 64% (47/73) de alteraciones potencialmente accionables, demostrando su utilidad para impactar en el manejo clínico de pacientes con diversos tipos de cáncer.

Nuestros resultados muestran que el empleo de un panel de secuenciación masiva constituye una herramienta efectiva para el diagnóstico y selección de tratamientos en oncología de precisión. Considerando la práctica clínica actual, respecto a la necesidad de la evaluación exhaustiva de las alteraciones genéticas presentes en el tumor para la correcta identificación de pacientes que podrían beneficiarse de terapias dirigidas, la utilización del panel ONCO-50 es la opción más rápida y costo-efectiva si se compara al estudio secuencial de genes individuales en pacientes con cáncer. Finalmente, desde principios de 2019 se encuentra disponible el test ONCO-161, el cual comprende el análisis de mutaciones en hotspots y gen completo, alteración de número de copias y reordenamientos relevantes en 161 oncogenes y genes supresores de tumores, y que complementa el portafolio de estudios genómicos para nuestros pacientes

Referencias

1. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 31, 1023–1031 (2013). <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2696>
2. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139 (2004). <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa040938>
3. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 369, 1023–1034 (2013). <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1305275>
4. Von Hoff DD, Stephenson JJ, Rosen P, et al. Pilot study using molecular profiling of patients' tumors to find potential targets and select treatments for their refractory cancers. *J. Clin. Oncol.* 28, 4877–4883 (2010). <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.26.5983>
5. Takeda M, Sakai K, Terashima M, et al. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer. *Ann. Oncol.* 26, 2477–2482 (2015).
6. Kou T, Kanai M, Yamamoto Y, et al. Clinical sequencing using a next-generation sequencing-based multiplex gene assay in patients with advanced solid tumors. *Cancer Sci.* 108, 1440–1446 (2017). <http://dx.doi.org/10.1111/cas.13265>
7. Carr TH, McEwen R, Dougherty B, et al. Defining actionable mutations for oncology therapeutic development. *Nat. Rev. Cancer* 16, 319–329 (2016). <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.35>