



SECUENCIACIÓN MASIVA vs ESTUDIOS MOLECULARES GEN A GEN. RESULTADOS DE UNA SERIE DE VALIDACIÓN EN 263 GENES DE 51 PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS.

Natalia Rodón¹, Olga Díaz¹, Ruth Román¹, Montse Verdú^{1,2}, Yessica No Garbarino¹, Isabel Trias^{1,2,3}, Melina Lozano¹ y Xavier Puig^{1,2,3}.

¹BIOPAT, Biopatología Molecular SL, Grup Assistència, Barcelona; ²Histopat Laboratoris, S.L. Barcelona; ³Hospital de Barcelona, SCIAS, Grup Assistència.

INTRODUCCIÓN

Los perfiles moleculares obtenidos de DNA y RNA tumoral pueden guiar el manejo clínico de los pacientes con cáncer. En la actualidad, el estudio del perfil molecular de neoplasias como las de pulmón o colon requieren la caracterización de varios genes diferentes. Los estudios se realizan con una técnica específica para cada gen, lo que hace imprescindible disponer de suficiente tejido tumoral de partida para realizar todos los estudios y supone una elevada inversión de tiempo en la realización, análisis e interpretación de cada uno de ellos. Las nuevas técnicas de secuenciación masiva teóricamente permiten escapar de estas limitaciones, conseguir mejorar los tiempos de respuesta y evitar que la escasa disponibilidad de DNA y/o RNA impida el estudio completo de todos los genes implicados en cada neoplasia (Figura 1). Presentamos los resultados del estudio comparativo realizado en BIOPAT para valorar la implementación de una plataforma de secuenciación masiva en sustitución de los estudios convencionales, gen a gen, para la caracterización del perfil molecular de distintas neoplasias.

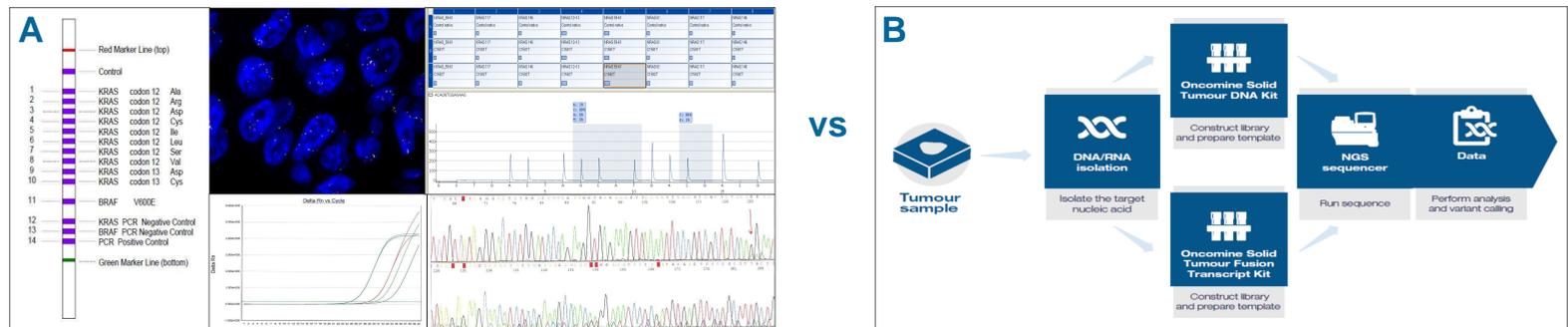


Figura 1. A) Resultados de 5 técnicas diferentes de estudio gen a gen. B) Flujo de trabajo de los kits OncoPrint Solid Tumor que permiten el estudio simultáneo de 26 genes.

PACIENTES Y MÉTODOS

La serie incluyó 19 carcinomas colorrectales, 26 de pulmón, 5 de páncreas y 1 melanoma, correspondientes a 51 pacientes. Se compararon los resultados de 263 genes estudiados previamente mediante técnicas convencionales con los obtenidos por secuenciación masiva (NGS). Los genes KRAS exón 2 y BRAF exón 15 se estudiaron mediante PCR alelo específica e hibridación reversa (StripAssay KRAS/BRAF, ViennaLab), las mutaciones en los exones 3 y 4 de KRAS y 2, 3 y 4 de NRAS mediante pirosecuenciación (RasExtension PyroKit, Qiagen), las mutaciones de EGFR mediante real-time PCR (Therascreen EGFR RGQ, Qiagen), las mutaciones de PIK3CA y TP53 por secuenciación directa y los reordenamientos de los genes ALK, ROS1 y RET mediante hibridación in-situ fluorescente (FISH con sondas Vysis y Zytovision). El estudio de DNA mediante NGS se realizó con un kit para detectar 500 variantes, incluyendo deleciones, inversiones, inserciones y sustituciones en 22 genes: EGFR, ALK, ERBB2, ERBB4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, DDR2, KRAS, PIK3CA, BRAF, AKT1, PTEN, NRAS, MAP2K1, STK11, NOTCH1, CTNNB1, SMAD4, FBXW7 y TP53 (OncoPrint™ Solid Tumor DNA kit). El estudio de RNA por NGS se realizó con un kit que analiza la presencia de reordenamientos en los genes ALK, ROS1, RET y NTRK1 (OncoPrint™ Solid Tumor Fusion Transcript kit), se aplicó únicamente en los carcinomas de pulmón.

RESULTADOS

La concordancia entre los dos estudios fue del 100% para todos los genes excepto para ROS1 (91%) debido a que en un caso se detectó una translocación de ROS1 mediante NGS que no fue detectada por FISH y, de manera inversa, en otro caso la NGS no detectó una translocación de ROS1 positiva por FISH (Tabla 1). La concordancia global entre los resultados de la serie fue del 99,2% lo que supuso una pérdida de información del 0,4% atribuible únicamente al gen ROS1. En el 53% de los casos el estudio mediante NGS detectó mutaciones en genes no analizados anteriormente, además del ya mencionado caso con un reordenamiento de ROS1 no detectado por FISH (Tabla 2). Cuatro de los 51 (7,8%) estudios de DNA y 4 de los 26 (15,4%) de RNA fueron no valorables mediante NGS debido a problemas técnicos que se resolvieron posteriormente.

GEN	N	CONCORDANCIA ENTRE LAS DOS TÉCNICAS (%)
KRAS	50	100
BRAF	51	100
NRAS	20	100
EGFR	26	100
TP53	19	100
PIK3CA	19	100
ALK	26	100
ROS1	26	91
RET	26	100

Tabla 1. Concordancia entre los resultados de las técnicas gen a gen y la NGS (N = 263).

TIPO DE TUMOR	DNA O RNA	N	CASOS NO VALORABLES	CONCORDANCIA (%)	Nº DE CASOS CON MUTACIONES NUEVAS NO TESTADAS GEN A GEN (%)	GENES, NO TESTADOS PREVIAMENTE, CON MUTACIONES
COLORRECTAL	DNA	19	2	17/17 (100)	9/17 (53)	SMAD4, MAP2K1
PANCREAS Y MELANOMA	DNA	6	0	6/6 (100)	2/6 (33,3)	TP53
PULMÓN	DNA	26	2	24/24 (100)	13/24 (54,2)	TP53, MET, ERBB4
	RNA	26	4	20/22 (91)	0/22 (0)	-

Tabla 2. Concordancia entre los resultados de las técnicas gen a gen y la NGS (DNA: N = 51. RNA: N = 26).

CONCLUSIONES

- La concordancia global entre los resultados de la serie fue del 99,2%.
- La pérdida de información del 0,4% fue únicamente atribuible al gen ROS1.
- En el 53% de los casos el estudio mediante NGS detectó mutaciones en genes no analizados anteriormente.
- La NGS detectó una fusión de ROS1 no detectada previamente por FISH.
- Los resultados obtenidos validan la técnica de NGS como alternativa a las técnicas convencionales de estudio gen a gen, aunque se requiere un seguimiento prospectivo con mayor volumen de casos.