Perfilado somático ADN y ARN

El test se basa en un análisis exhaustivo del ADN y ARN del tumor. Para comprender a fondo la base molecular de la enfermedad neoplásica, es necesario realizar un test que contenga información sobre las mutaciones somáticas y germinales que aparecen en el tumor y las disfunciones genéticas a nivel de ARN. En el test presentado, ofrecemos un análisis de variantes en 523 genes a nivel de ADN y 55 genes a nivel de ARN. El test permite obtener información sobre las mutaciones detectadas en la secuencia de ADN y ARN. El análisis de ADN revela cambios en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inserciones y deleciones cortas y variaciones en el número de copias de ADN (CNV). El análisis de ARN incluye trastornos de la expresión de 55 genes. Algunos trastornos asociados a cambios neoplásicos se presentan en forma de cambios epigenéticos, cambios en el nivel de expresión génica y fusiones génicas. Estos trastornos no son visibles en la secuenciación de ADN, por lo que requieren análisis de ARN. Los estudios de fusión de ARN son particularmente importantes en la terapia dirigida en cáncer de pulmón y sarcomas.

La información sobre las mutaciones detectadas por sí sola no siempre conlleva la posibilidad de preparar un resultado claro y clínicamente significativo para el paciente. Por lo tanto, para proponer un régimen de terapia contra el cáncer más eficaz, en la prueba propuesta también ofrecemos realizar los siguientes análisis: HRD, TMB, MSI.

HRD (Homologous Recombination Deficiency) - trastornos de los genes de recombinación homóloga, asociados con la incapacidad de reparar roturas de ADN de doble cadena mediante genes de reparación de recombinación homóloga (HRR), es decir, BRCA1 y BRCA2. El análisis HRD permite la evaluación de la inestabilidad del genoma mediante la determinación de: pérdida de heterocigosidad (LOH), desequilibrio alélico telomérico (TAI) y aberraciones cromosómicas a gran escala (LST). El análisis HRD es particularmente importante antes de iniciar la terapia con inhibidores de PARP.

TMB (Tumor Mutation Burden) - carga mutacional tumoral. Este análisis permite una determinación más precisa del grado en que el paciente se beneficiará de la inmunoterapia. Se utiliza para determinar el número de mutaciones presentes en el genoma del tumor.

MSI (inestabilidad de microsatélites): marcadores de inestabilidad de microsatélites, indica la aparición de inconsistencias en el número de repeticiones de nucleótidos en las regiones de microsatélites del ADN. Estas inconsistencias son resultado de errores de replicación del ADN, resultantes de trastornos en la función de los genes de reparación de la clase MMR (MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6, MSH3). El análisis MSI está indicado en muchos cánceres, incluido el cáncer de colon y el cáncer de endometrio.

Cabe recordar que la decisión sobre la posibilidad de utilizar una terapia determinada depende de las condiciones clínicas y de la decisión del médico tratante.

Para realizar la prueba, necesitamos una muestra de tejido canceroso (bloque de parafina) y preparaciones histopatológicas (portaobjetos) realizadas a partir de él, así como una copia del diagnóstico histopatológico.

Metodología

Información sobre el método de prueba:

En primer lugar, se aísla el ácido desoxirribonucleico (ADN) de una muestra de sangre o de un bloque de parafina, cuya calidad y cantidad se determina mediante un análisis espectrofotométrico y fluorimétrico. Después de la fragmentación mecánica o enzimática, el ADN se utiliza para crear una biblioteca que permite el etiquetado, la posterior secuenciación y el análisis de los genes que se han seleccionado en el panel encargado. La biblioteca resultante se secuencia en un secuenciador de nueva generación.

Los resultados obtenidos se someten luego al análisis bioinformático e interpretación clínica. Las variantes genéticas se identifican utilizando Burrows-Wheeler Aligner. La prueba detecta el 100% de las sustituciones y el 95% de pequeñas inserciones y deleciones.

Información sobre la clasificación de variantes:

El informe del estudio proporciona información sobre variantes clasificadas como variantes "potencialmente patógenas" y "patógenas" debido a su posible relevancia clínica.

Las variantes identificadas se clasifican en las siguientes categorías:

Variante patogénica: el cambio en la secuencia genética encontrada está directamente relacionado con la aparición de la enfermedad. Se debe de tener en cuenta que algunos cambios patógenos pueden no tener una penetración completa, es decir, una sola lesión puede ser insuficiente para causar una enfermedad en toda regla.

Variante potencialmente patógena: el cambio en la secuencia genética encontrada probablemente esté relacionado con el desarrollo de la enfermedad, pero no es posible hacer esta relación basándose en los datos científicos actualmente disponibles. Se requieren investigaciones y pruebas adicionales para confirmar la patogenicidad de la variante: no se puede descartar que estudios posteriores demuestren que el cambio encontrado tiene poca o ninguna significación clínica.

Variante de patogenicidad desconocida: no es posible determinar la importancia del cambio encontrado basándose en los datos científicos actualmente disponibles.

Variante potencialmente benigna: lo más probable es que el cambio encontrado en la secuencia genética no esté relacionado con el desarrollo de la enfermedad.
Sin embargo, según los datos científicos disponibles actualmente, no es posible confirmar la levedad del cambio. Se requieren investigaciones y pruebas adicionales para confirmar la relevancia clínica de la variante.

No se puede descartar que nuevos estudios demuestren que el cambio encontrado tiene significación clínica y conduce al desarrollo de la enfermedad.

Variante leve: el cambio encontrado no está relacionado con el desarrollo de la enfermedad.

Las variantes genéticas identificadas se clasifican según las pautas desarrolladas por el Colegio Estadounidense de Genética y Genómica Médica y la Asociación Estadounidense de Patología Molecular (S. Richards, Genet Med. 2015 May; 17 (5): 405-24). Los siguientes criterios se tienen en cuenta en la clasificación de variantes:

- Identificación más temprana de la variante en personas con la enfermedad
- Impacto de la variante en la formación de un producto génico funcional:
  - Determinado en análisis bioinformáticos
  - Confirmado en pruebas *in vitro* / *in vivo*
- Ubicación de la variante (exón / intrón, dominio funcional)
- *de novo* / cambio hereditario
- La frecuencia de la variante en la población general (cualquier variante que ocurra con una frecuencia >5% de acuerdo con Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project o Exome Aggregation Consortium se clasifica como una lesión benigna)
- La frecuencia de aparición de la variante en la población general en relación con la población de pacientes

La clasificación final de variantes se realiza sobre la base de la suma de los criterios mencionados anteriormente. Las bases de datos buscadas incluyen: 1000GP, ClinVar, ConsensusPathDB, Exome Aggregation Consortium, Exome Variant Server, FATHMM, GO (Ontología genética), GTEx (Genotipo-Expresión tisular), GWAS (Estudio de asociación del genoma completo), HGMD, KEGG, MetaLR, MetaSVM, MutationAssessor, MutationTaster, OMIM, PolyPhen-2, PROVEAN, SIFT, SnpEff, dbNSFP, UniProt, VEP (Variant Effect Predictor).

Limitaciones del estudio:

Todas las tecnologías de secuenciación tienen sus limitaciones. El estudio se realiza usando la secuenciación de nueva generación (NGS) para investigar las regiones de codificación y empalme de los genes encargados. Si bien las técnicas de secuenciación utilizadas y los análisis bioinformáticos posteriores tienen como objetivo reducir la importancia de las secuencias de pseudogen, la presencia de secuencias de genes altamente homólogas puede

interferir esporádicamente con la capacidad de identificar alelos patógenos, así como deleciones / duplicaciones.

La secuenciación de Sanger es el método utilizado para confirmar variantes que han obtenido parámetros de menor calidad.Los análisis de deleción / duplicación indican cambios cuantitativos de ADN que involucran al menos un exón y siempre requieren confirmación por otros métodos (qPCR o MLPA).

Los análisis realizados no están destinados a detectar ciertos tipos de cambios genómicos, como translocaciones, inversiones, mutaciones dinámicas (por ejemplo, el aumento del número de repeticiones de tres nucleótidos), cambios en regiones reguladoras o intrónicas. Si se informa de un aumento en el número de repeticiones de dos o tres nucleótidos, se debe suponer que el número exacto de repeticiones es impreciso.

La prueba realizada no está destinada a detectar patrones de mosaico somático, y el análisis de mutaciones somáticas debe realizarse en el contexto de secuencias de ADN germinal.

No es posible excluir la presencia de mutaciones en genes y regiones distintas de las cubiertas por el estudio, así como cambios en el número de copias de genes. El informe del estudio proporciona información sobre los cambios en la secuencia de genes identificados basándose en una comparación con las secuencias de referencia actuales depositadas en las bases de datos NCBI Nucleotide y Ensembl.

Las pruebas se están desarrollando en *Warsaw Genomics* con fines clínicos. Todos los resultados de las pruebas obtenidos son interpretados y analizados por expertos científicos y médicos de *Warsaw Genomics*.