



*WHOLE GENIX*

---

INFORME DE SECUENCIACIÓN  
DEL GENOMA TUMORAL



## INFORME DE SECUENCIACIÓN DEL GENOMA TUMORAL

---

|                             |             |
|-----------------------------|-------------|
| Identificación del paciente | xxx xxx xxx |
| Nombre del paciente         | xxx xxx xxx |
| Fecha de nacimiento         | xxx xxx xxx |
| Número de Biopsia           | xxx xxx xxx |
| Doctor solicitante          | xxx xxx xxx |
| Institución                 | xxx xxx xxx |

Fecha de recepción de la muestra: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Fecha de emisión del informe: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Historia clínica

---

Mujer de 52 años con cáncer de mama estadio IV. Se analiza biopsia de tumor primario incluida en parafina, con diagnóstico previo de carcinoma triple negativo (TNBC) y un grado de infiltración tumoral del 85%

### Pruebas realizadas

---

1. Secuenciación completa del exoma (“profundidad media >200x”)
2. Análisis de alteraciones somáticas en el número de copias

Nota: Para una explicación más detallada de los métodos, ver el anexo 2 del informe



## Resultados Relevantes

| GEN   | ESTATUS | ALTERACIÓN                           | RELEVANCIA CLÍNICA   |
|-------|---------|--------------------------------------|--|
| BRCA1 | Mutado  | p.E23fs*8<br>(mutación inactivadora) | <p>Las mutaciones inactivadoras de BRCA1/2 se asocian con respuesta a inhibidores de PARP (refs 1-5) y a platinos (refs 5, 6). Existen ensayos clínicos abiertos para pacientes con este tipo de mutaciones.</p> <p>Además, se recomienda estudio en leucocitos aislados de sangre periférica para determinar si se trata de una mutación germinal</p> |

## Resultados de otros Genes IMPORTANTES en TNBC

| GEN    | ESTATUS               | COMENTARIOS  |
|--------|-----------------------|--|
| BRAF   | wt                    | --   |
| CDKN2A | wt                    | --   |
| FGFR1  | wt. Sin amplificación | --   |
| FGFR2  | wt. Sin amplificación | --   |
| HER2   | wt. Sin amplificación | Resultado esperado en un TNBC  |
| KRAS   | wt                    | --   |
| NRAS   | wt                    | --   |
| PTEN   | wt                    | --   |
| RB1    | wt                    | --   |
| TP53   | Mutación c.993+1G>T   | Mutación de significado incierto. Podría afectar al splicing de TP53, produciendo una proteína truncada. |

En el estudio se encontraron otras mutaciones de relevancia terapéutica incierta, que se detallan en el anexo 1.



## Discusión

---

### Resultados relevantes: Mutación activadora en BRCA1

---

La secuenciación del genoma tumoral ha determinado la presencia de una mutación en el gen *BRCA1*, que codifica para una proteína de reparación del DNA. La mutación detectada es una inserción en el codón 23 del gen, que provoca un corrimiento del marco de lectura y la producción de una proteína truncada, totalmente inactiva.

La proteína BRCA1 tiene un papel clave en dos mecanismos de reparación del DNA. El primero es la reparación por recombinación homóloga, que elimina las roturas en la doble cadena del DNA originadas por diversos agentes ambientales (como las radiaciones). El segundo es la llamada reparación por escisión de nucleótidos, que corrige los daños provocados en una cadena de DNA y es especialmente importante en la eliminación de los dímeros de timina provocados por la radiación ultravioleta. Las mutaciones inactivadoras de *BRCA1* alteran de forma significativa el mecanismo de reparación por recombinación homóloga del DNA.

Las mutaciones de *BRCA1* pueden ser somáticas o germinales. En el primer caso sólo se detectan en el tumor; en el segundo caso, aparecen en cualquier célula corporal (por ejemplo, leucocitos sanguíneos). La mayoría de mutaciones de *BRCA1* en cáncer de mama triple negativo (TNBC) son germinales, aunque existe un pequeño porcentaje de mutaciones somáticas.

Las mutaciones germinales de *BRCA1* están ligadas a predisposición hereditaria a cáncer de mama. De hecho, *BRCA1* es el gen mutado con más frecuencia (24%) en las familias afectadas por el síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario (HBOC) (ref 7). En el estudio más extenso publicado hasta el momento (ref 8), se estudiaron 1824 pacientes de cáncer de mama triple negativo, sin seleccionar por antecedentes familiares o por una aparición temprana de la enfermedad. Se detectaron mutaciones de *BRCA1* en un 8,5% de los casos, y mutaciones en otros genes de la vía de reparación por recombinación homóloga (como *BRCA2*, *PALB2*, *RAD51*) en un 6,1% adicional.

Finalmente, en cuanto a la frecuencia de las mutaciones somáticas en TNBC, podría estar entre el 1 y el 2% de las pacientes de TNBC (ref 9).

### Implicaciones Terapéuticas

---

La presencia de una mutación inactivadora en el gen *BRCA1* indica que la paciente puede obtener un beneficio terapéutico de la administración de un inhibidor de ADP-ribosa polimerasa (PARP), así como de derivados del platino (cisplatino o carboplatino).

La ADP-ribosa polimerasa (PARP) es otro de los enzimas implicados en la reparación del DNA, en concreto de roturas monocatenarias en el DNA ("single-strand breaks"). Diversos estudios y ensayos clínicos han demostrado la correlación entre la presencia de mutaciones en genes de la vía de recombinación homóloga (como *BRCA1* y *BRCA2*) y la respuesta a inhibidores de PARP, como olaparib (Lynparza). La FDA aprobó a fines del 2014 el uso de olaparib en el carcinoma de ovario avanzado con mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* a partir del resultado de un ensayo clínico en fase II en el cual las pacientes mutadas tratadas con olaparib obtuvieron un beneficio de 7 meses en términos de supervivencia libre de enfermedad. La aprobación se convertirá en definitiva cuando se disponga de los resultados de dos ensayos en fase III que comparan olaparib contra la terapia estándar y evalúan su uso como terapia de mantenimiento frente a placebo.



En el caso del TNBC con mutaciones de *BRCA1/2*, un primer ensayo clínico fase I, cuyos resultados se publicaron en 2010 (ref 1), demostró que el tratamiento con olaparib era bien tolerado y las pacientes obtenían beneficio en términos de tasa de respuesta objetiva (“objective response rate, ORR”). En un ensayo clínico más reciente, donde se ensayó el olaparib en monoterapia en diversos tumores con mutaciones de *BRCA1/2*, la tasa de respuesta más estabilización de la enfermedad fue del 60% en TNBC (ref 4). Finalmente, otro ensayo en fase I/Ib demostró que la combinación de olaparib más carboplatino es bien tolerada. De las 8 pacientes con cáncer de mama incluidas, una tuvo una respuesta completa (de 23 meses) y 7 una respuesta parcial (con PFS mediana de 10 meses) (ref 2). Debemos también señalar que estudios recientes de secuenciación completa han revelado numerosas similitudes moleculares entre el TNBC y el carcinoma seroso de ovario de alto grado, hasta el extremo de sugerir que se debería desarrollar un algoritmo común para el tratamiento de ambas enfermedades (ref 10).

Aunque el olaparib aún no se ha aprobado para uso en pacientes de cáncer de mama, se puede solicitar su uso compasivo o incluir a la paciente en alguno de los ensayos clínicos actualmente abiertos que admiten casos de TNBC avanzado con mutaciones de *BRCA1/2*. Entre ellos se encuentran ensayos de olaparib monoterapia frente a quimioterapia en TNBC mutado para *BRCA1/2* (ensayo OlympiAD, NCT02000622, que se desarrolla a nivel mundial, incluyendo México o Perú) o de radioterapia y olaparib en carcinoma mamario no operable (NCT02227082).

Finalmente, diversos estudios preclínicos y clínicos indican que las mutaciones de *BRCA1/2* se asocian a una mayor probabilidad de obtener beneficio del tratamiento con platinos en tumores ginecológicos (ref 5, 6). En el caso de los tumores mamarios, diversos ensayos clínicos han demostrado que la combinación de cisplatino o carboplatino con gemcitabina es más efectiva en pacientes de TNBC que en el resto, probablemente debido a la mayor frecuencia de alteraciones en genes de la vía de reparación homóloga como *BRCA1* (ref 11, 12). Existen actualmente ensayos clínicos abiertos para evaluar la eficacia de la terapia basada platinos en pacientes de cáncer de mama con mutaciones de *BRCA1*. Entre ellos se encuentra un ensayo en fase II de cisplatino frente a antraciclinas/doxorubicina (NCT01670500).

#### Recomendación de análisis en línea germinal y posible consejo genético familiar .....

Existe una elevada probabilidad de que la mutación detectada en el gen *BRCA1* sea germinal, por lo que se recomienda la extracción de sangre de la paciente y el análisis de dicha mutación en DNA purificado a partir de leucocitos. Un resultado positivo indicaría que la paciente sufre un síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario (HBOC). En tal caso, se recomendaría incluir en consejo genético a las mujeres de la familia de la paciente y repetir en ellas la determinación de la mutación, a fin de determinar si también sufren predisposición a desarrollar tumores ginecológicos.



## ANEXO 1: OTRAS Mutaciones de significado Terapéutico INCIERTO

| GEN                   | FUNCIÓN   | MUTACIÓN            |
|-----------------------|---|---------------------|
| <i>ABHD2</i>          | Regulador negativo de la migración celular  | p.P283L             |
| <i>ALS2CR8 (CARF)</i> | Regulador de la senescencia y apoptosis   | p.H237R             |
| <i>ARAP3</i>          | Reordenaciones del citoesqueleto.<br>Mutaciones en este gen se han relacionado con la metástasis del carcinoma mamario a ganglios cercanos (ref 13)       | p.P129A             |
| <i>BID</i>            | Regulador clave de la apoptosis.  | p.K203_A206 delKKVA |
| <i>CAD</i>            | Iniciación y regulación de la síntesis de pirimidinas. Promueve la división celular   | p.D791H             |
| <i>DDP4</i>           | Invasividad y angiogénesis<br>Se ha descrito la expresión aberrante de la proteína en numerosos tumores, incluido mama.                                   | p.G741E             |
| <i>EPHB3</i>          | Receptor tirosina quinasa<br>Mutaciones en receptores de la familia EPH aparecen en numerosos tipos de tumores.   | p.R649P             |
| <i>MDN1 (MINA)</i>    | Histona demetilasa<br>Se ha propuesto que mutaciones en este gen se relacionan con resistencia a terapia hormonal en el cáncer de mama luminal B (ref 14) | p.V211L             |
| <i>NSMCE4A</i>        | Componente del complejo SMC5-SMC6, que interviene (al igual que <i>BRCA1</i> ) en la reparación del DNA por recombinación homóloga.                       | p.L218V             |
| <i>TLE2</i>           | Represor de la transcripción inducida por la vía del wnt  | p.E52K              |



## ANEXO 2: METODOLOGÍA

El DNA genómico se purificó a partir de tejido normal y tumoral con el kit de Qiagen para muestras de parafina y se verificó su calidad por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. El DNA genómico se utilizó para generar librerías, que se enriquecieron con el kit de Agilent para exones humanos (50 Mb). Las librerías se cuantificaron, normalizaron y validaron.

A continuación, se secuenciaron con la Plataforma “Hiseq” de Illumina, siguiendo las instrucciones del fabricante, para generar lecturas de 2 x 150 pb “paired-end”, que se alinearon con el genoma humano de referencia obteniendo un fichero BAM. Las variantes somáticas se identificaron mediante diversas herramientas bioinformáticas (“GATK Unified Genotype, samtools mpileup, SHORE, Annovar, Indelocator”). Se obtuvieron así tres predicciones independientes que se combinaron y filtraron con dos herramientas adicionales (“GATK VariantFiltration and intersected with GATK CombineVariants”) para obtener la lista final de alteraciones somáticas presentes en el tumor.

Finalmente, las dos alteraciones más relevantes (mutaciones de BRCA1 y TP53) que se validaron por PCR y secuenciación estándar (método de Sanger) en la muestra tumoral original.



## Referencias

1. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, Carmichael J. Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010; 376(9737): 235-44.
2. Lee JM, Hays JL, Annunziata CM, Noonan AM, Minasian L, Zujewski JA, Yu M, Gordon N, Ji J, Sissung TM, Figg WD, Azad N, Wood BJ, Doroshow J, Kohn EC. Phase I/Ib study of olaparib and carboplatin in BRCA1 or BRCA2 mutation-associated breast or ovarian cancer with biomarker analyses. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(6):089.
3. Lee JM, Ledermann JA, Kohn EC. PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Ann Oncol*. 2014; 25(1):32-40.
4. Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmaña J, Mitchell G, Fried G, Stemmer SM, Hubert A, Rosengarten O, Steiner M, Loman N, Bowen K, Fielding A, Domchek SM. Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline BRCA1/2 Mutation. *J Clin Oncol* 2015;33(3):244-50.
5. Narod SA. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(12):702-7.
6. Muggia F, Safra T. 'BRCAness' and its implications for platinum action in gynecologic cancer. *Anticancer Res*. 2014 Feb;34(2):551-6. Review.
7. Morris, Joi L.; Gordon, Ora K. (Ora Karp) (2010). Positive results: making the best decisions when you're at high risk for breast or ovarian cancer. Amherst, N.Y.: Prometheus Books. pp.337–340. ISBN978-1-59102-776-8.
8. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, Olson JE, Godwin AK, Pankratz VS, Olswold C, Slettedahl S, Hallberg E, Guidugli L, Davila JI, Beckmann MW, Janni W, Rack B, Ekici AB, Slamon DJ, Konstantopoulou I, Fostira F, Vratimos A, Fountzilas G, Pelttari LM, Tapper WJ, Durcan L, Cross SS, Pilarski R, Shapiro CL, Klemp J, Yao S, Garber J, Cox A, Brauch H, Ambrosone C, Nevanlinna H, Yannoukakos D, Slager SL, Vachon CM, Eccles DM, Fasching PA. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(4):304-11.
9. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, Lanchbury JS, Stemke-Hale K, Hennessy BT, Arun BK, Hortobagyi GN, Do KA, Mills GB, Meric-Bernstam F. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Mar 1;17(5):1082-9
10. Herold CI, Anders CK. New targets for triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)*;27(9):846-54.
11. Koshy N, Quispe D, Shi R, Mansour R, Burton GV. Cisplatin-gemcitabine therapy in metastatic breast cancer: Improved outcome in triple negative breast cancer patients compared to non-triple negative patients. *Breast*. 2010;19(3):246-8.





12. Zhang J1, Wang Z, Hu X, Wang B, Wang L, Yang W, Liu Y, Liu G, Di G, Hu Z, Wu J, Shao Z. Cisplatin and gemcitabine as the first line therapy in metastatic triple negative breast cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(1):204-11.
13. Blighe K, Kenny L, Patel N, Guttery DS, Page K, Gronau JH, Golshani C, Stebbing J, Coombes RC, Shaw JA. Whole genome sequence analysis suggests intratumoral heterogeneity in dissemination of breast cancer to lymph nodes. *PLoS One*. 2014; 9(12):e115346.
14. Cornen S, Guille A, Adélaïde J, Addou-Klouche L, Finetti P, Saade MR, Manai M, Carbuccia N, Bekhouche I, Letessier A, Raynaud S, Charafe-Jauffret E, Jacquemier J, Spicuglia S, de The H, Viens P, Bertucci F, Birnbaum D, Chaffanet M. Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. *PLoS One*. 2014 Jan 9;9(1):e81843.