

EVOLUCIÓN DE LA GENÓMICA TUMORAL

Andrés F. Cardona^{1 2 3}, Oscar Arrieta⁴, Zyania Lucia Zatarain-Barron⁴, Christian Rolfo⁵, Camila Ordoñez⁶, Alejandro Ruiz-Patiño^{1 3}

Resumen

La comprensión de que la progresión del cáncer requería la interacción de múltiples genes proporcionó una de las razones fundamentales, para embarcarse en 1986, en el proyecto genoma humano. Solo con una secuencia del genoma de referencia podría entenderse el espectro completo de cambios somáticos que conducen al cáncer. Desde su finalización en 2003, la secuencia del genoma humano de referencia ha cumplido su promesa como herramienta fundamental para esclarecer la patogénesis de diversas neoplasias. Los recientes avances biotecnológicos han llevado a la identificación de características biológicas complejas y únicas asociadas con la carcinogénesis. La perfilación del ADN tumoral libre circulante y de las células neoplásicas, así como de factores relacionados con inmunidad, análisis de proteínas y del ARN, permiten optimizar el diagnóstico y tratamiento del cáncer. En consecuencia, la búsqueda de respuestas con base en experimentos clínicos ha evolucionado, pasando de los estudios centrados en un tipo específico de tumor a una o muchas características genómicas, independientes de la histología, y con base en diseños innovadores y adaptativos. A continuación, revisamos los hitos y conceptos históricos clave en la genómica del cáncer y algunos de los descubrimientos novedosos en esta área.

Palabras clave: *Cáncer; genómica; medicina de precisión; biomarcador; ADN; mutación.*

-
- 1 MD MSc PhD. Fundación para la Investigación Clínica y Molecular Aplicada del Cáncer – FICMAC, Bogotá, Colombia.
 - 2 Grupo Oncología Clínica y Traslacional, Clínica del Country, Bogotá, Colombia.
 - 3 Grupo de Investigación en Oncología Molecular y Sistemas Biológicos (FoxG), Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.
 - 4 Sección Oncología Torácica y Laboratorio de Medicina Personalizada del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología – INCaN, Ciudad de México, México.
 - 5 Departamento Oncología Clínica, Marlene and Stewart Greenebaum Comprehensive Cancer Center, Facultad de Medicina Universidad de Maryland, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.
 - 6 MD. Fundación para la Investigación Clínica y Molecular Aplicada del Cáncer – FICMAC, Bogotá, Colombia.

CANCER GENOMICS EVOLUTION

Abstract

The realization that cancer progression required the interaction of multiple genes provided one of key rationales, in 1986, for embarking on the human genome project. Only with a reference genome sequence could the full spectrum of somatic changes leading to cancer be understood. Since its completion in 2003, the human reference genome sequence has fulfilled its promise as a foundational tool to illuminate the pathogenesis of diverse neoplasms. In recent years, biotechnological breakthroughs have led to identification of complex and unique biologic features associated with carcinogenesis. Tumor and cell-free DNA profiling, immune markers, and proteic and RNA analyses are used to identify these characteristics for optimization of anticancer therapy in individual patients. Consequently, clinical trials have evolved, shifting from tumor type-centered to gene-directed, histology-agnostic, with innovative adaptive design tailored to biomarker profiling with the goal to improve treatment outcomes. Herein, we review the key historical milestones and concepts in cancer genomics, and some of the novel discoveries in this area.

Keywords: *Cancer; genomics; precision medicine; biomarker; DNA; mutation.*

Introducción

En 1971, la clonación del ADN recombinante, la técnica más novedosa para la época, estaba todavía en su infancia y aún no era capaz de lidiar con la tarea de desentrañar toda la complejidad de la célula humana. Sin embargo, no fue sino hasta 1985 cuando Dulbecco presentó la prueba de que las mutaciones en los genes podrían causar cáncer, un hecho que hoy damos por sentado, brindando el valor de la secuencia genómica como base para comprender la enfermedad (1). La discusión contemporánea sobre la generación de la secuencia humana completa representó un salto asombroso ya que, en ese momento, secuenciar un solo gen de aproximadamente 1 kilobase era digno de una tesis, y el genoma humano era 3 millones de veces más grande. La estructura repetida del genoma estaba bien caracterizada y algunos también la consideraban

un obstáculo insuperable para tal esfuerzo y una base para la resistencia temprana al proyecto (2). A pesar de estos obstáculos, un esfuerzo internacional condujo a la finalización del genoma de referencia humano en 2003 (International Human Genome Sequencing Consortium 2004), y con esta reseña completa, fue posible probar el valor de la genómica para descifrar los cambios que conducen al cáncer. Los datos que han surgido desde 2003 respaldan de manera abrumadora el valor de esta visión y han cambiado la forma en que se investiga y se comprenden las neoplasias.

Durante el período de secuenciación del genoma humano (1990-2003) (http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/about.shtml), la investigación continuó acumulando conocimiento sobre la clonación, permitiendo mejorar la capacidad de secuenciación lo que llevó a identificar la mayoría de los onco-

genes y genes supresores de tumor. Un inventario de las alteraciones asociadas al cáncer determinó la presencia de 291 genes conductores, lo que corresponde al ~1% de la secuencia codificante (3). Los primeros estudios en profundidad observaron que el 90% de estos genes presentaban mutaciones somáticas, cerca del 20% tenía alteraciones germinales, y el 10% contenía ambas categorías. Las formas más comunes de variación en el repertorio mutaciones contenido hasta 2004, fueron las traslocaciones que conducían a la generación de proteínas de fusión con carácter oncogénico. Hasta ese año, nadie había estudiado más de un puñado de genes tumorales, lo que representó el cambio más significativo en el conocimiento para la oncología actual.

Ese fue el estado de la investigación en el umbral de la “era genómica” del cáncer, un tiempo anunciado por la disponibilidad del genoma de referencia y la espectacular explosión de datos, alimentado por la introducción de sistemas operativos para el control masivo de información y el desarrollo de instrumentos de secuenciación paralela más económicos. Este año es el vigésimo aniversario de la publicación de ese notable hito en la ciencia: la finalización del genoma humano de referencia. En esta coyuntura, recopilamos algunos de los hallazgos y desafíos clave que han surgido del análisis de la secuencia del genoma del cáncer.

Nomenclatura de las alteraciones genómicas

La genómica, en lo que respecta al cáncer, es el estudio de cómo las alteraciones en el código genético dan lugar a células anormales. Aunque ciertamente no está tan rígidamente instalado como antes, es importante considerar el dogma central de la biología molecular que describe el flujo jerárquico de información genética desde el ADN hasta la proteína. La información genética codificada en el ADN se transcribe a ARN mensajero (ARNm) por la ARN polimerasa, y el ARNm

se traduce posteriormente a la proteína a través de los ribosomas, lo que da como resultado una expresión fenotípica del gen subyacente. Este proceso de transferencia de información del ADN a la proteína funcional se conoce como expresión génica. Casi el 90% del ADN genómico humano se transcribe en ARN; sin embargo, solo del 1% al 2% de las transcripciones se expresan como proteínas. La mayoría de estas transcripciones son ARN no codificantes (ncRNA), que apenas estamos comenzando a reconocer por su importancia como reguladores de las funciones celulares. Los errores en el procesamiento y transferencia de información genética conducen al desarrollo de mutaciones que dan lugar a una variabilidad significativa en el genoma pudiendo llegar a la génesis del cáncer (4).

El ADN es la unidad básica de información de todos los organismos. Está compuesto de nucleótidos purina (adenina, guanina) y pirimidina (citosina, timina). Estos se organizan en secuencias para formar genes, que son las unidades estructurales y funcionales de información hereditaria dispuestas por combinaciones variadas de los cuatro nucleótidos. El ADN se envuelve alrededor de las histonas y se agrupa como cromatina dentro del núcleo celular. Este material genético está organizado en cromosomas que se transportan por duplicado (diploide) con la excepción de los cromosomas sexuales, en la combinación XY. Estas dos versiones separadas del mismo gen en las células diploides se conocen como alelos, que se encuentran en forma homocigótica (dos alelos idénticos) o heterocigótica (dos alelos diferentes). Los cambios en esta secuencia de ADN afectan potencialmente la función y el desarrollo de un organismo (5).

Las mutaciones son omnipresentes en las células neoplásicas (6). Estos cambios en la secuencia de ADN pueden conducir a una expresión o función proteica alterada. Hay múltiples tipos que pueden estar relacionadas con el desarrollo del cáncer, y estas ocurren a través de varios mecanismos, que incluyen

agresiones extrínsecas y defectos intrínsecos. Las agresiones extrínsecas o mutágenos, son agentes naturales o artificiales que producen alteraciones en la secuencia del ADN. Estos mutágenos pueden ser biológicos (por ejemplo, virus de Epstein-Barr o el virus del papiloma humano), químicos (por ejemplo, bromuro de etidio, etc.) o radiológicos (por ejemplo, radiación ultravioleta [UV], radiación ionizante). Los defectos intrínsecos incluyen fallas en la replicación o reparación del ADN. Dependiendo del tipo de células en las que ocurren estas mutaciones, se clasifican en línea germinal (heredables y en células reproductoras) o somáticas (no heredables y no reproductivas). La acumulación de mutaciones es un factor clave y responsable del desarrollo, crecimiento, metástasis y resistencia al tratamiento del cáncer (4).

Las mutaciones a menudo se clasifican según el grado de alteración del ADN. Por ejemplo, las mutaciones puntuales o pequeños cambios suelen afectar a un solo gen, mientras que las anomalías cromosómicas alteran grandes segmentos del ADN. Las mutaciones puntuales son el resultado de sustituciones, inserciones o deleciones de un solo par de bases. Las sustituciones de bases pueden provocar transiciones o transversiones. Se produce una transición cuando una pirimidina se cambia por una pirimidina diferente o una purina se cambia por una purina alternativa después de una sustitución de base, y una transversión, ocurre cuando una pirimidina se convierte en una purina o viceversa. Si estas alteraciones resultan en la sustitución de un aminoácido diferente al esperado en una secuencia codificante para una proteína, se conoce como una mutación de cambio de sentido o *missense* como es conocida en inglés. Las inserciones o deleciones (*indels*) pueden dar como resultado desplazamiento en el marco en las que la lectura se desplaza de modo que se altera la secuencia de aminoácidos que se está codificando (*frameshift*). Si el marco de codificación de aminoácidos es alterado por cualquier mutación de una manera que conduce a la introducción prematura

de un codón de terminación (parada), resulta en una proteína truncada. Estas mutaciones, al igual que las puntuales que ocasionan el mismo resultado se conocen como mutaciones sin sentido (*non-sense*).

Las grandes alteraciones del ADN, como las anomalías cromosómicas o rearrreglos, modifican la estructura de los cromosomas a través de la pérdida, la ganancia o el reordenamiento de segmentos. Estas anomalías ocurren cuando los cromosomas sufren procesos de ruptura y reunión, lo que resulta en el intercambio o la pérdida de material genético dentro del mismo o entre diferentes cromosomas (**Figura 1**). Si bien algunas anomalías cromosómicas son hereditarias, muchas ocurren de manera espontánea o como consecuencia de factores ambientales como la exposición a medicamentos, rayos X, rayos UV, u otros factores carcinogénicos. Hay cuatro rearrreglos estructurales cromosómicos comunes que incluyen las inversiones, deleciones, duplicaciones y translocaciones (4).

Las inversiones ocurren cuando el segmento de un cromosoma se desprende y luego se vuelve a unir en la orientación inversa al mismo cromosoma (7). Como sugiere el nombre, una deleción es la pérdida de un segmento cromosómico (como en el síndrome de Cri-du-chat) de manera que el material genético perdido no se puede recuperar. La duplicación de un segmento cromosómico puede ocurrir cuando una parte del cromosoma se copia y se inserta junto al segmento original en tándem o en orientación inversa (7). Las translocaciones implican la transferencia de un segmento de un cromosoma a una parte diferente del mismo cromosoma o a un cromosoma completamente diferente. Genéticamente, sobre todo si los puntos donde se da la ruptura o la reunión comprometen regiones críticas, puede dar como resultado el cambio de secuencia, posición y orden de algunos genes, lo que a menudo en cáncer, resulta en varias anomalías funcionales que implican una consecuencia biológica. La leucemia mielógena crónica (LMC), una de las neoplasias rela-

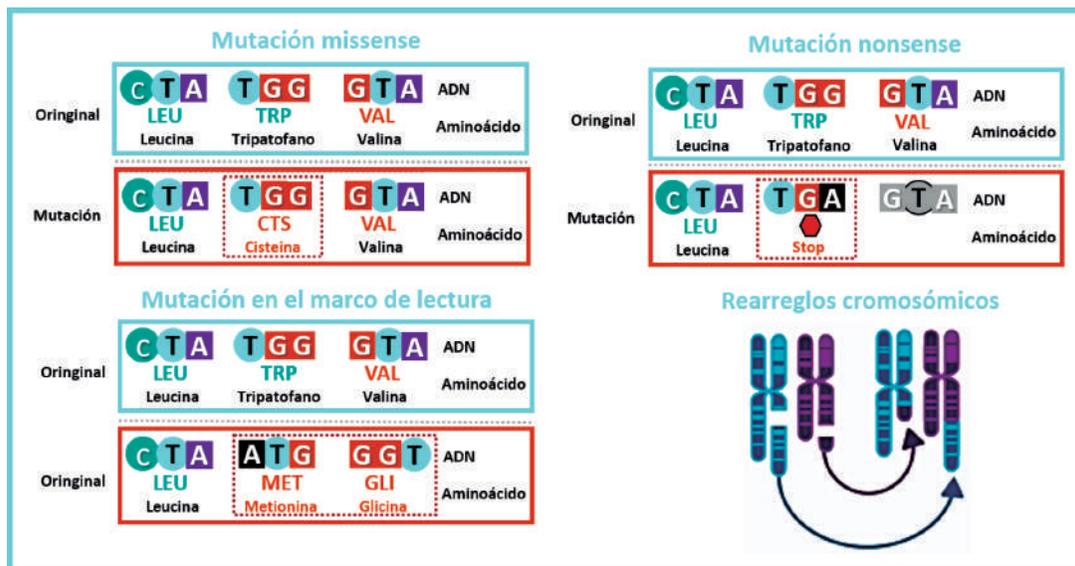


Figura 1. Clasificación de las mutaciones en cáncer.

cionadas con una translocación mejor caracterizadas, se inicia cuando la porción del cromosoma 9 que alberga el código genético de la tirosina-quinasa, el gen de la *leucemia murina de Abelson (ABL)*, se une al gen de la proteína de la *región de clúster de punto de ruptura (BCR)* ubicada en el cromosoma 22, formando el gen de fusión BCR-ABL, conocido como cromosoma Filadelfia. El producto proteico de este rearreglo, exhibe una actividad tirosina-quinasa patológicamente incrementada, fomentando la proliferación celular. Conociendo este mecanismo esta translocación se convirtió en el objetivo de algunas de las primeras terapias contra el cáncer dirigidas molecularmente (8).

Además de las variaciones estructurales, también se producen aberraciones numéricas de los cromosomas que se denominan aneuploidía (una pérdida o una ganancia de uno o más cromosomas) y polisomías (uno o más genomas completos en una célula que pueden ser idénticos o distintos entre sí) (7). Estos se han asociado con el desarrollo de algunas neoplasias como el neuroblastoma, los astrocitomas pediátricos y los condrosarcomas (9-11).

Modificaciones epigenéticas

El término epigenética denota cambios en el fenotipo de una célula sin afectar el genotipo, o la secuencia de la misma (12). Más recientemente, la epigenética se ha definido como todos los cambios hereditarios en la expresión génica y en la estructura de la cromatina que no están codificados en la secuencia propia del ADN (5). En todos los organismos multicelulares eucariotas, los procesos de diferenciación están controlados a través de estos mecanismos, con la excepción de la maduración de las células T y B (5). La regulación epigenética de los fenotipos incluye la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y la expresión de micro-ARN (miARN). Los cambios en cualquiera de estos reguladores epigenéticos pueden provocar una alteración de la expresión génica y el desarrollo de cáncer y otras enfermedades crónicas (5).

La metilación del ADN es la adición de un grupo metilo a las citosinas ubicadas en secuencias de ADN conocidas como islas CpG (repeticiones de citosina seguida de guanina). Es una de las primeras modifi-

caciones epigenéticas descritas, y aproximadamente del 70% al 80% de las citosinas en estas estructuras están metiladas en células somáticas humanas (13). La adición de grupos metilo está mediada por un complejo de enzimas catalíticas conocidas como ADN metiltransferasas (DNMT). Para contrarrestar la acción de las DNMT, las demetilasas eliminan estos grupos metilo, resultando en un balance homeostático de activación e inactivación de transcripción. Es entonces que los procesos de metilación del ADN juegan un papel crucial en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, la inactivación del cromosoma X femenino, así como en la regulación de la expresión génica y los procesos de desarrollo (14,15). Las alteraciones en estos patrones fueron las primeras alteraciones epigenéticas identificadas en el cáncer. En las neoplasias se han identificado fenómenos de hipometilación, una disminución general de los patrones de metilación del ADN, así como la hipermetilación, un aumento global de la metilación de las islas CpG (15). Un ejemplo del segundo se ha identificado en los promotores del gen *CDKN2A*, el cual lleva a la pérdida de la expresión de los supresores tumorales p16 y p14arf y por ende, promueve el proceso oncogénico por pérdida de tan importantes reguladores del ciclo celular (16). Alternativamente, la hipometilación se ha identificado especialmente a nivel de los promotores de protooncogenes y factores de crecimiento, fomentando la proliferación e inmortalización de células malignas (15).

Otro cambio epigenético importante que puede conducir al cáncer implica la modificación postraduccional de las histonas. Vale la pena mencionar, que, al contener la cadena de ADN empaquetada, los cambios que involucren especialmente residuos que interactúan por diversas fuerzas electroquímicas sobre la misma, van a repercutir directamente en esta relación, fomentando o inhibiendo la condensación de la hebra. Los principales cambios sobre estas moléculas son la metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitilación y sumoilación. La metilación de regula varios procesos

celulares como el procesamiento del ARN, la biosíntesis de ribosomas, la reparación del ADN, la transducción de señales y la regulación transcripcional. Se sabe adicionalmente que la metilación sobre residuos lisina/arginina es directamente responsable de la activación o represión transcripcional (5). La acetilación y deacetilación, que están mediadas por enzimas conocidas como histonas acetiltransferasas (HAT) e histonas deacetilasas (HDAC), respectivamente, son fundamentales para regular la dinámica de la cromatina, la transcripción, el silenciamiento de genes, la progresión del ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación, la replicación del ADN y la reparación del mismo. Un de-sequilibrio en la ponderación de la acetilación y desacetilación de histonas está directamente relacionado con la tumorigénesis y la progresión de la enfermedad. Se han observado alteraciones de los genes que codifican las enzimas HAT y HDAC en leucemias y cánceres de colon, útero y pulmón, y se han desarrollado de este proceso para atacar estas aberraciones en las células cancerosas (12).

La fosforilación de histonas es menos común en comparación con la acetilación y metilación. Sin embargo, este proceso sobre un residuo de serina inicia la respuesta al daño del ADN y sobre una treonina controla la estructura de la cromatina mediante la señalización de las proteínas modificadoras de marcas epigenéticas (12).

Los ncARN, como el miARN y el ARN de interferencia corta (siARN), se han identificado como reguladores clave adicionales de la expresión génica. Al interferir con procesos como la traducción de ARNm, la metilación del ADN y las modificaciones de histonas, los miARN regulan procesos celulares como el desarrollo, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Estos miARN están constituidos por 20 a 22 nucleótidos de longitud y están ubicados en sitios frágiles que son susceptibles a amplificaciones, o ganancia en el número de copias. Diferentes estudios han mostrado evidentes diferencias en los perfiles de

expresión de miARN en tejidos normales frente a los tumorales. Adicionalmente, estos afectan a los genes supresores tumorales, los oncogenes y los genes de reparación del ADN (17). Datos recientes han demostrado una utilidad emergente de los miARN como herramientas en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer (18), pero aún queda mucho por dilucidar con respecto a la diversidad de funciones que desempeñan estos reguladores epigenéticos.

Mecanismos de reparación del ADN

Las células son desafiadas constantemente por agresiones al genoma que podrían resultar en mutaciones. Existen varias vías de reparación y respuesta al daño del ADN para reconocer estos efectos relativamente comunes, y mantener la estabilidad e integridad genómica. Cuando estos procesos fallan es que puede originarse las diferentes alteraciones mencionadas previamente, iniciando el proceso oncogénico. Dentro de los mecanismos involucrados en este proceso están la reparación por escisión de bases, la reparación por escisión de nucleótidos, la reparación por desajustes (MMR), y la reparación por escisión bicatenaria (19). El primero hace referencia a la corrección de una o dos bases las cuales se encuentran alteradas, generalmente por cambios químicos tales como oxidaciones que a su vez no modifican la estructura helicoidal de la cadena. Este mecanismo retira la base afectada al igual que un pequeño fragmento adyacente el cual es reparado por medio de una polimerasa. En caso de que haya distorsión de la estructura de la hélice, ya sea por radiación ultravioleta, mutágenos ambientales o exposición a agentes quimioterapéuticos, a menudo se elimina mediante reparación por la vía NER o de escisión de nucleótidos. Los defectos en este mecanismo de reparación se asocian con envejecimiento prematuro y el cáncer. NER consiste en el reconocimiento del daño, el desenrollamiento del ADN alrededor de la lesión, la escisión y la modificación de la hebra alterada para generar la síntesis del nuevo ADN incluido

con una ligadura final simultánea (20). La reparación por la vía NER defectuosa relacionada con el xeroderma pigmentoso (XP) da como resultado la presentación de múltiples cánceres de piel inducidos por rayos UV (20). Esta es una rara enfermedad hereditaria con carácter autosómico recesivo en la que el afectado muestra una marcada tendencia a desarrollar lesiones neoplásicas cutáneas dependientes de la exposición al sol; los heterocigotos son frecuentemente asintomáticos y no desarrollan la enfermedad. La lesión más significativa que produce la luz ultravioleta sobre el ADN consiste en la formación de dímeros de timina, es decir, dos timinas adyacentes (en una misma cadena de ADN) las cuales se unen covalentemente, causando alteraciones en el proceso de replicación del ADN. En humanos, varios complejos enzimáticos (fotoliasas y su cofactor FADH2) se hallan implicados en la reparación de este fenómeno por medio de un complejo enzimático que absorbe la luz y utiliza esta energía para romper el enlace que une el dímero, separando las dos timinas. Es entonces que esta enfermedad es consecuencia de la mutación de cualquiera de los siete genes implicados en este mecanismo de reparación (21).

El sistema MMR (del inglés mismatch repair) mantiene la estabilidad genómica corrigiendo las bases mal emparejadas formadas debido a la mutación, sustitución, delección o inserción de nucleótidos. El MMR ocurre durante la fase S del ciclo celular en donde se da una corrección por un proceso de escisión de la base anómala e inserción de la correcta. Algunas de las proteínas clave necesarias para el correcto funcionamiento del sistema MMR son MSH2, MLH1 y ADN polimerasas δ y ϵ . Las mutaciones en MSH2 y MLH1 están relacionadas con un fenotipo hipermutado y con la inestabilidad del genoma, evento relativamente frecuente en el cáncer de colon (22). Durante una fase de replicación eficaz, las ADN polimerasas δ y ϵ son necesarias para la actividad de corrección y, si se produce una mutación en estas enzimas, los desajustes de las

bases aumentan, dando lugar a mutaciones complejas (23,24). La pérdida de la función de la vía de reparación MMR está relacionada con cánceres esporádicos y hereditarios (25).

Las roturas de doble cadena del ADN son lesiones considerablemente lesivas y están relacionadas con la pérdida de grandes regiones cromosómicas, lo que conduce a un desgaste de la integridad genómica. La falta de reparación de las roturas de doble hebra a menudo conduce a la pérdida de información genética, inestabilidad y fragmentación del genoma, reordenamiento cromosómico y muerte celular (25). Una célula de mamífero emplea dos vías diferentes para restaurar las rupturas bicatenarias: recombinación homóloga y unión de extremos no homólogos. La recombinación homóloga requiere homología de la secuencia de ADN para reparar la lesión de ADN y está activa en las fases media S y G2 del ciclo celular. Los cánceres hereditarios de seno y ovario están asociados con mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2*. Ambas proteínas BRCA son necesarias para la reparación de roturas bicatenarias del ADN competente mediante recombinación homóloga. La unión o reparación de extremos no homólogos no requiere paralelismo de secuencia para reparar roturas de doble cadena y es activa durante todo el ciclo celular, pero es dominante en las fases G0/G1 y G2 (24,25).

Además de los mecanismos de reparación mencionados existe una serie de componentes que revierten directamente algunas lesiones del ADN en un proceso de un solo paso denominado reversión directa. Por ejemplo, el daño inducido por los rayos UV se repara mediante enzimas conocidas como fotoliasas. Las lesiones oxidativas son reparadas directamente por la enzima metilguanina-metiltransferasa (MGMT) (24). Los datos clínicos emergentes proporcionan evidencia de que la sobreexpresión de los factores de reparación del ADN puede tener un significado pronóstico y predictivo en diversas neoplasias, y la inhibición de la

reparación del ADN se ha convertido en un objetivo prometedor para el cáncer de seno, próstata y ovario.

Métodos básicos para genotipificación en cáncer

Tradicionalmente, los tipos de cáncer se han definido y asociado con la edad de aparición, el origen anatómico, la histología, y las características inmunohistoquímicas. Actualmente, se emplean varias técnicas moleculares para detectar aberraciones genéticas, como la PCR, la secuenciación Sanger, la secuenciación de próxima generación (NGS), la hibridación por fluorescencia in situ (FISH), y otros (26). La elección del método de detección utilizado depende de una variedad de factores, como el tipo de muestra (tejido, sangre, fluidos), volumen de la muestra, genes a analizar y tipo de mutaciones en el gen de interés (27). La PCR o reacción de cadena de polimerasa, por sus siglas en inglés, es una técnica molecular de uso común para amplificar directamente segmentos específicos de ADN mediante ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y alargamiento. El producto amplificado se puede utilizar posteriormente para diversas aplicaciones. La PCR alelo-específica es un método basado en tiempo real que detecta mutaciones conocidas con alta sensibilidad. Requiere dos sondas fluorescentes, una para el alelo de tipo salvaje y otra para el alelo mutante. Puede detectar ADN mutante incluso si el contenido de tumor en una muestra es solo del 1 a 5%. Por otro lado, y similar a su contraparte previamente mencionada, la PCR de microfluído digital (digital droplet PCR, ddPCR) se usa para detectar mutaciones conocidas, incluida las variaciones de un solo nucleótido, pequeñas inserciones, deleciones, y reordenamientos con alta sensibilidad y especificidad. La ddPCR permite un análisis más preciso y cuantitativo que la PCR convencional o en tiempo real. Su función en la detección de mutaciones en el ctADN (circulating tumor DNA) ha sido esencial en el desarrollo de la biopsia líquida, como estrategia diagnóstica y para el

seguimiento. A diferencia de la PCR, la secuenciación Sanger se utilizó para detectar nuevas alteraciones. Esta técnica utiliza un producto de PCR para detectar mutaciones nuevas o establecidas, incluida la variación de un solo nucleótido, pequeñas duplicaciones, inserciones y deleciones, pero no detecta cambios en el número de copias. Requiere que el ADN mutante esté presente en al menos el 20 a 25% de las células de la muestra. La lógica detrás de esta radica en replicar los productos de la PCR por medio de una polimerasa. Con el fin de determinar que nucleótido es incluido se emplean didesoxinucleótidos (ddNTP) marcados con un tinte fluorescente único, los cuales al carecer de un grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo de ribosa, inhiben el proceso de replicación. De esta manera, se generan fragmentos de diferentes tamaños cuyo extremo contiene precisamente ese marcaje fluorescente. Al separar estos fragmentos de ADN por tamaño y leer el tinte fluorescente cuando cada uno pasa por un detector, los nucleótidos se pueden leer de forma secuencial con una alta precisión, estableciendo la secuencia (27). Debido a la complejidad del proceso, los costos y la velocidad de reacción se desarrollaron nuevas técnicas, conocidas como secuenciación de próxima generación.

Las plataformas de NGS permiten una secuenciación profunda y paralela masiva de cadenas de oligonucleótidos durante una sola serie de secuenciación, necesitando menos material para el análisis, lo que es útil para los entornos tumorales donde la muestra de tejido es limitada. Se basa en la fragmentación del ADN; sin embargo, en lugar de requerir una configuración separada para cada reacción como en la secuenciación Sanger, la NGS utiliza bibliotecas de ADN molde fijadas en una superficie que permite la amplificación por PCR paralela a gran escala con una cantidad relativamente pequeña de reactivo. Dependiendo de la plataforma NGS, se utilizan varios mecanismos bioquímicos diferentes para determinar la secuencia del fragmento. La NGS puede detectar simultáneamente sustituciones de bases únicas, duplicaciones, insercio-

nes, deleciones, y variaciones en el número de copias de múltiples genes en un solo ensayo. Al considerar los resultados de los estudios actuales, es importante comprender que se puede realizar estudios del genoma completo, del exoma (la totalidad del material codificante) o genes específicos de interés en muestra tumoral. La interpretación de estos hallazgos es un poco más compleja que las otras técnicas debido a que por la química de reacción pueden introducirse artefactos que pueden ser anómalamente interpretados como mutaciones con impacto sobre la biología tumoral. Sobre este aspecto al igual que analizar la gran cantidad de datos involucrados en obtener secuencias de forma masiva, se requirieron grandes avances en la bioinformática y biología computacional.

Para la detección de rearrelos o cambios en el número de copias, el FISH es un buen método diagnóstico. Este utiliza sondas marcadas con fluorescencia unidas a secuencias de interés los cuales se van a hibridar con su región correspondiente en el genoma a indagar. En el caso de obtener aumento de las señales de fluorescencia sobre lo esperado, se podría estimar una ganancia de número de copias. Por otro lado, las pérdidas de información se traducirían en ausencia de la señal de interés. Adicionalmente, mediante el diseño de sondas específicas como sondas de fusión o de ruptura, se pueden identificar estos tales como el cromosoma Filadelfia (27).

Las micromatrices de ADN (DNA microarrays) o microarreglos se utilizan para identificar múltiples alteraciones conocidas, usando un chip sólido que contiene miles de cadenas simples de ADN para hibridar con la muestra de ADN del tumor. Es importante destacar que el ADN monocatenario es sintético y puede prepararse para cualquier secuencia de ADN deseada, por tanto, se puede crear una matriz con diferentes objetivos de interés. La muestra de ADN se etiqueta con un tinte fluorescente y se hibrida con las hebras de ADN del chip. Se utiliza detección fluorescente para la

detección y cuantificación, más un sistema operativo especializado para determinar la expresión, cantidad y secuencia de la muestra de ADN proveniente del tumor (27).

Alteraciones genómicas más frecuentes

La frecuencia media de mutaciones puntuales varía en más de tres órdenes de magnitud en los cánceres más comunes; dentro de un tipo de tumor particular, la variación en la frecuencia mutacional es de un orden de magnitud (**Figura 2**). La variación en la frecuencia de las mutaciones es una función del número de divisiones de las células somáticas antes de la iniciación del tumor. En el extremo inferior de la escala se encuentran las neoplasias pediátricas, seguidas de las leucemias agudas en adultos y de los tumores sólidos. Los tumores que superan las 10 mutaciones por Megapares de bases (Mbp) a menudo tienen deficiencias en la reparación de errores propios del apareamiento, ya sea por una mutación o silenciamiento epigenético (por ejemplo, MLH1). Los tumores con más de 100 mutaciones por Mbp suelen tener mutaciones en la exonucleasa POLE, una de las dos enzimas de replicación del ADN (The Cancer Genome Atlas Research Network). Estos patrones pueden tener implicaciones importantes para la clínica, como ocurre para los pacientes con carcinoma colorrectal que tienen disfunción replicativa por daños en la reparación, evento que condiciona un mejor pronóstico en especial tras la exposición a la inmunoterapia. En el otro extremo de la escala, se encuentran la mayoría de los tumores pediátricos que presentan pocas mutaciones, hallazgo que limita las posibilidades terapéuticas.

El censo inicial de los genes relacionados con el desarrollo del cáncer dio paso a COSMIC, el Catálogo de mutaciones somáticas en el cáncer (28). En los tumores sólidos más comunes un promedio de 33 a 65 genes presenta mutaciones somáticas que modifican sus

productos proteicos. Aproximadamente el 95% de estas mutaciones son sustituciones de una sola base (como C> G), mientras que el resto son deleciones o inserciones de una o pocas bases (como CTT> CT). De las sustituciones de bases, el 91 % dan como resultado cambios sin sentido, el 7,6% dan como resultado cambios sin sentido, y el 1,7% generan alteraciones de los sitios de empalme o regiones no traducidas inmediatamente adyacentes a los codones de inicio y finalización. Información actualizada ha permitido elucidar que la mejor manera de identificar genes mutados que actúan como conductores es valorando el patrón mutacional en lugar de su frecuencia de alteración. Los patrones de mutaciones entre los oncogenes y genes supresores de tumores bien estudiados son característicos y no aleatorios; los oncogenes mutan de manera recurrente en las mismas posiciones de aminoácidos, mientras que los genes supresores de tumores mutan a través de alteraciones que truncan proteínas en toda su longitud. Sobre la base de estos patrones de mutación en lugar de frecuencias, ha sido posible determinar cuáles de los 18.306 genes mutados que contienen un total de 404.863 alteraciones registradas en COSMIC actúan como conductores. Para ser clasificado como un oncogén es necesario que más del 20% de las mutaciones registradas en el gen estén en posiciones recurrentes y no tengan sentido. Por otra parte, para ser clasificado como un gen supresor de tumores, análogamente se requiere que más del 20% de las mutaciones registradas en el gen sean inactivadoras. Esta regla 20/20 es indulgente en el sentido de que todos los genes del cáncer bien documentados superan con creces estos criterios (4,29).

El inventario más reciente de mutaciones en cáncer incluidas en COSMIC (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>) incluye más de 900.000 eventos somáticos.

Sin embargo, hasta la fecha solo se han descubierto 125 genes con mutaciones conductoras, 71 son genes supresores de tumor y 54 son oncogenes (4). Cada tipo

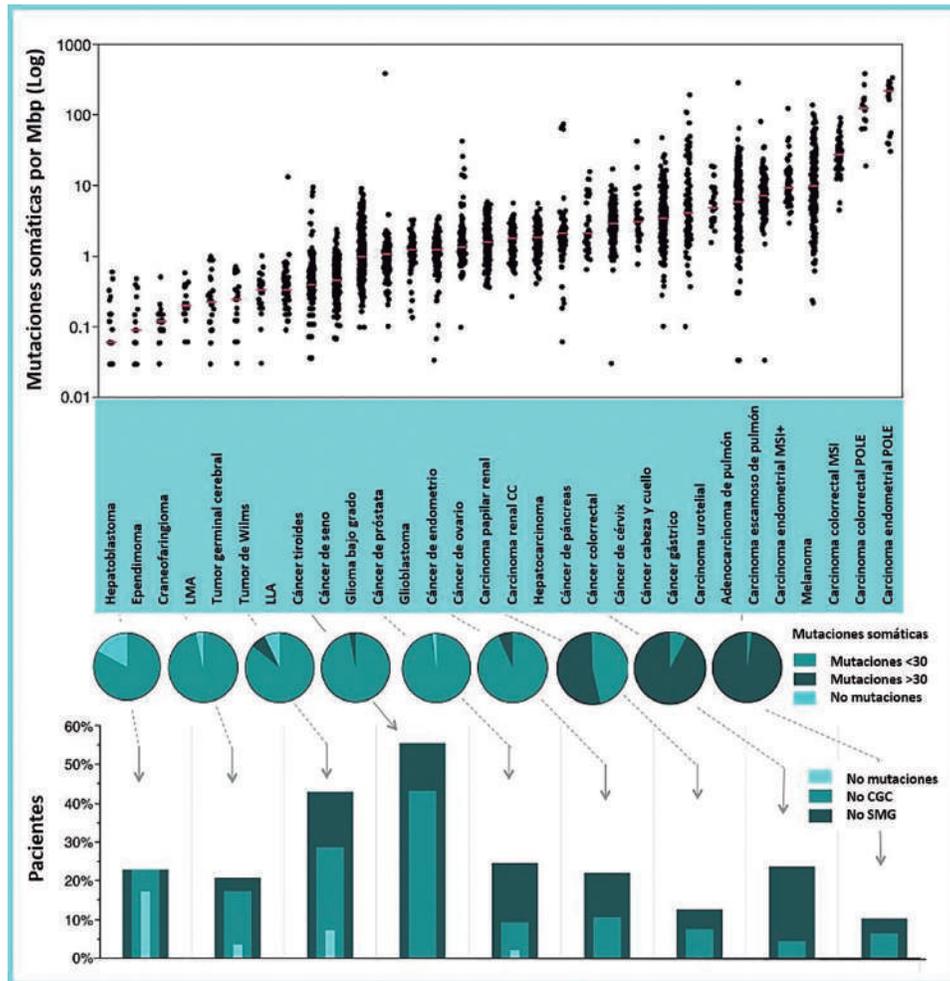


Figura 2. Frecuencias de mutaciones somáticas en pacientes con cáncer. Todos los datos representan tumores primarios. Solo se contaron las mutaciones deletéreas (sin sentido, por desplazamiento del marco y sitio de empalme). Arriba se observan las frecuencias generales de las mutaciones somáticas donde cada punto negro representa un tumor. El grupo sombreado en azul claro denomina los tumores pediátricos y el sombreado en azul profundo indica las neoplasias de los adultos. Las líneas horizontales rojas dentro de cada grupo de puntos indican la mediana para el valor de la frecuencia de mutaciones de cada neoplasia. (LLA) Leucemia linfocítica aguda; (LMA) leucemia mieloide aguda; (CRC) carcinoma colorrectal; (MSI) inestabilidad microsatelital; (POLE) pacientes con mutaciones somáticas en el dominio de nucleasas del gen POLE. En la porción inferior de la figura se observa la clasificación de frecuencia de los tumores por mutación. Los gráficos circulares dividen a los pacientes en tres grupos según la frecuencia de las mutaciones deletéreas: 0 mutaciones somáticas detectables, menos de 30, y mayores o iguales a 30 para los tipos de tumores seleccionados (30 mutaciones representan una frecuencia de 1 por Mbp). Los histogramas anidados debajo de los gráficos circulares muestran el porcentaje de pacientes sin genes mutados de manera significativa (SMG, calculado por MutSig, $q \leq 0,1$), sin genes en el censo de cáncer (CGC) o sin mutaciones en absoluto. Los datos de secuenciación de todos los tumores pediátricos, el CCR y el carcinoma hepatocelular se generaron del Centro de secuenciación del genoma humano del Baylor College of Medicine. Los datos de secuenciación de todos los demás tumores adultos proceden del Centro de análisis de datos del genoma de TCGA (<https://confluence.broadinstitute.org/display/GDAC/Home>). Los datos para la LMA pediátrica, la LLA y el tumores de Wilms se obtuvieron del proyecto TARGET (<http://www.targetproject.net/>) (Figura modificada con autorización de Wheeler DA. *Genome Res.* 2013 Jul;23(7):1054–1062.).

de neoplasia tiene una colección característica de genes alterados, como lo ejemplifica el cáncer colorrectal (**Figura 3**). El patrón establecido desde la primera evaluación exómica del cáncer colorrectal y de seno demostró desde 2007 que un tercio de los genes están mutados en más del 20% de los tumores. De estos, un 10% tienen mayor compromiso, y el resto generan una menor carga genómica. Los proyectos a gran escala como el TCGA y el ICGC han tenido como objetivo secuenciar más de 500 pacientes por cada tipo de tumor, con la expectativa de recolectar una fracción considerable de los genes mutados en un rango menor al 3% (**Figura 3**). Los genes alterados en menor frecuencia tienen gran importancia para la comprensión de la biología tumoral dado que pueden presentar redundancia mutacional en una vía específica de señalización. Esta característica se hace evidente en el cáncer colorrectal donde APC es el mayor impulsor de la vía canónica WNT; sin embargo, otros 10 genes presentan cambios deletéreos en el 1-15%, hallazgo que influye en la regulación positiva de MYC y de múltiples factores de transducción relacionados con PI3K (**Figura 4**). Los genes alterados con baja frecuencia revelan una complejidad adicional en relación a la heterogeneidad clonal que favorece la resistencia a medicamentos como los inhibidores de tirosin-quinasa, hallazgo común en los adenocarcinomas de pulmón EGFR (receptor para el factor de crecimiento epidérmico) positivos.

Cuando se amplía la secuenciación del ADN incluyendo análisis del número de copias, de expresión de ARN, y perfiles epigenéticos, se modifica la información basal que se obtiene. En general, la mayoría de los perfiles mutacionales (como el que se muestra en la Figura 3) identifican entre 15 y 20 genes mutados, el análisis del número de copias agrega otros 20 genes amplificados o con deleciones focales recurrentes, y los perfiles epigenéticos y de expresión anormal refuerzan los datos sobre las mutaciones somáticas agregando usualmente algunos genes más. Según los resultados obtenidos hasta ahora, parece probable que el reperto-

rio de genes implicados en cualquier tipo de cáncer sea del orden de 50 a 100, en lugar de 500 a 1.000 como se creía previamente.

Nuevas alteraciones genómicas de alta y baja frecuencia

Desde el 2004 se han encontrado una multiplicidad de alteraciones de baja frecuencia (menor del 20%) que promueven la generación y sostenibilidad de neoplasias sólidas y hematológicas. Los avances más notables proporcionaron información sobre el papel de la remodelación de la cromatina en la tumorigénesis. La isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1 y 2) fueron adiciones significativas a la lista de impulsores del glioblastoma, la LMA y el colangiocarcinoma (30-32). Ambas enzimas convierten el isocitrato en α -cetoglutarato (α -KG), un cofactor de las dioxigenasas α -KG, incluidas las ADN demetilinas de la familia TET, las histonas demetilinas de la familia KDM y muchas otras proteínas (33). Cuando IDH1 o 2 están mutados producen 2-oxiglutarato, un análogo estructural del α -KG que actúa como potente inhibidor de enzimas dependientes de α -KG, las metiltransferasas involucradas en la metilación del ADN y la cromatina. Estos inhibidores dan como resultado una modificación epigenética aberrante que se transfiere a la desregulación de muchas vías celulares.

La ADN demetilasa, DNMT3A, está mutada en el 22% de los pacientes con LMA, lo que sugirió que su papel era importante para la regulación transcripcional a través de la modificación epigenética del ADN (34). Las mutaciones en este gen son clínicamente importantes en los pacientes con LMA, ya que se asocian a reducción en la supervivencia global. Desde su descubrimiento inicial, las alteraciones en DNMT3A se han relacionado con la transformación de casi todas las neoplasias mieloides. De manera similar, las alteraciones en el gen PBRM1 se documentaron en el 41% de los carcinomas renales de células claras, y este

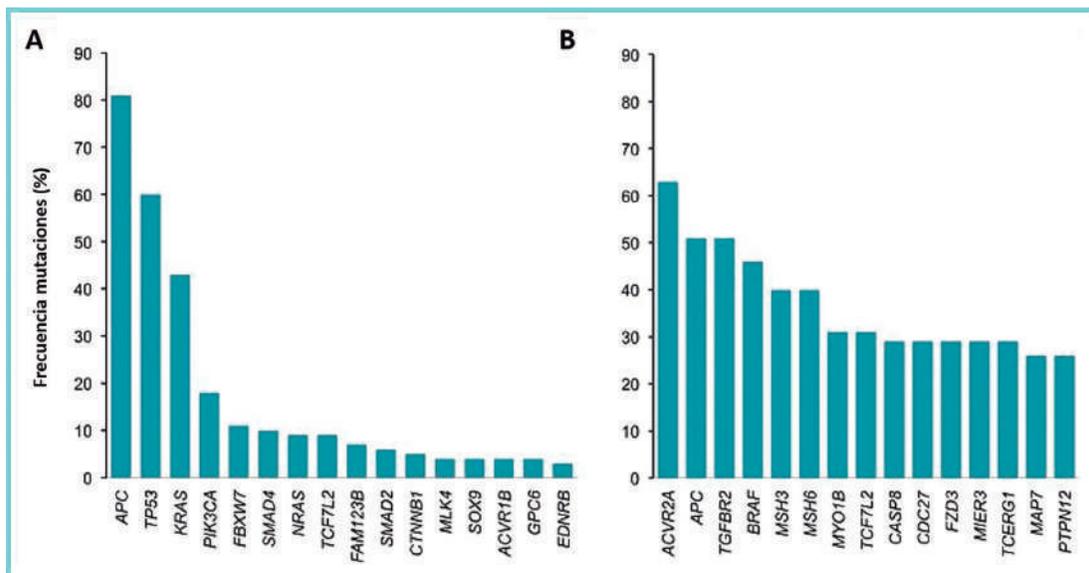


Figura 3. Genes mutados y principales vías desreguladas por mutaciones somáticas en el carcinoma colorrectal humano. Los pacientes se dividen en dos grupos según la tasa de mutación. Todos los genes mostrados están mutados significativamente con una tasa de descubrimiento $<0,1$. A. Perfil mutacional en 193 pacientes con inestabilidad microsatelital; subgrupo con baja tasa mutacional (CRC estabilidad de microsatélites). B. Perfil mutacional en 29 pacientes con CRC positivo para inestabilidad microsatelital, más 7 con mutación POLE (The Cancer Genome Atlas Research Network).

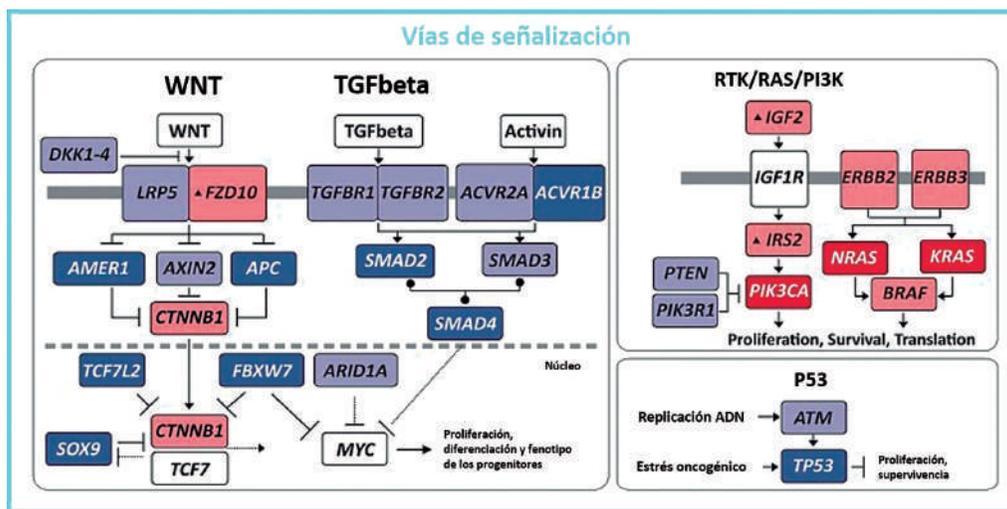


Figura 4. Principales vías desreguladas en carcinoma colorrectal. Las alteraciones se definen por la presencia de mutaciones somáticas, deleciones homocigotas, amplificaciones focales de alto nivel y, en algunos casos, por regulación de la expresión génica hacia arriba o hacia abajo. Todos los genes de la señalización de WNT se interrumpen por una o más mutaciones en el 93% de los pacientes, y la de TGFbeta se interrumpen en el 26% de los pacientes, y la de RTK/RAS/PI3K se limita en más del 80% de los pacientes. En rojo se encuentran los genes activados y en azul los inactivados. Los genes más claros no presentan mutaciones significativas, pero contribuyen con la alteración de la vía en algunos de los pacientes (The Cancer Genome Atlas Research Network).

fue el primer miembro del complejo para remodelado de cromatina SWI/SNF que se encontró alterado en cáncer (35). Desde entonces, las mutaciones en muchos de los otros componentes de SWI/SNF se han ido acumulando de manera constante en muestras de pacientes con cáncer de ovario, hepatocelular, gástrico y otros (36).

El gen para la proteína 1 asociada a BRCA (BAP1) tiene una función enzimática que desubiquitina la histona H2A y otras proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina. Presenta mutaciones inactivantes en el 23% de los mesoteliomas (37) y en los melanomas uveales, donde el 84% de los pacientes portadores tiene alto riesgo de metástasis (38). También se encuentra mutado en el 15% de los carcinomas renales de células claras, en los que está anticorrelacionado con las mutaciones más frecuentes de PBRM1, mencionadas anteriormente. Una mutación inactivante en BAP1 define una subclase molecular de tumores agresivos de alto grado.

En el otro extremo del perfil mutacional están los genes del cáncer que contribuyen al 10% o menos de los tumores. Quizás los más interesantes en el ámbito de la baja carga y frecuencia son aquellos relacionados con el procesamiento del ARN. Descubiertos por primera vez en el síndrome mielodisplásico, los genes U2AF1, U2AF2, SF3B1 y SRSF2 (39), están involucrados en el reconocimiento del aceptor de empalme en la maquinaria del ARN, mutaron acumulativamente en más del 50% de los pacientes.

Heterogeneidad tumoral

La naturaleza estocástica del cáncer refuerza la noción de que el desarrollo y progresión del cáncer no sigue un curso lineal fijo, sino más bien, una desestabilización integrada de múltiples procesos celulares clave. Incluso después de la transformación maligna, el cáncer permanece dinámico y continúa evolucionando para generar un ecosistema heterogéneo con

elementos formes que albergan formas moleculares distintas, con niveles diferenciales de sensibilidad a las terapias. Esta heterogeneidad puede resultar de cambios genéticos, transcriptómicos, epigenéticos y/o fenotípicos. A nivel poblacional, la heterogeneidad tumoral puede dividirse en intertumoral e intratumoral; la heterogeneidad intertumoral se refiere a los cambios entre pacientes que tienen tumores del mismo linaje histológico y se relacionan con variaciones germinales, en el perfil de mutaciones somáticas, y factores ambientales. Por otra parte, la heterogeneidad intratumoral puede manifestarse como cambios a nivel espacial, que describen la distribución desigual de subpoblaciones tumorales genéticamente diversas en diferentes sitios de la enfermedad o dentro de una sola enfermedad, sitio o tumor, y como heterogeneidad temporal, un término aplicado a la diversidad genética de un tumor individual a lo largo del tiempo (procesos endógenos (como la replicación del ADN y/o errores de reparación, estrés oxidativo) (40). La **Figura 5** describe gráficamente los diferentes tipos de heterogeneidad tumoral.

En conjunto, las principales causas de heterogeneidad tumoral son la inestabilidad genómica y la evolución y selección clonal. La primera, puede variar en magnitud, desde las sustituciones de una sola base hasta duplicaciones completas del genoma. Tal inestabilidad puede resultar de la exposición a mutágenos exógenos (como radiación UV o humo por combustión de tabaco) y aberraciones en los procesos endógenos (como la replicación del ADN y/o errores de reparación, estrés oxidativo) (40). Por ejemplo, la inestabilidad microsatelital, relacionada a deficiencias en la reparación del ADN (MMR), impulsa la transformación neoplásica y aumenta sustancialmente la carga de mutaciones somáticas de un subconjunto de cáncer colo rectal (CCR) y otros cánceres con este fenotipo distintivo. Estudios que involucran el análisis del genoma completo han permitido la identificación de firmas genéticas caracte-

rísticas asociadas con algunos de estos procesos mutagénicos que favorecen la heterogeneidad. Por ejemplo, las neoplasias de pulmón ligadas a la exposición al humo por combustión del tabaco están enriquecidas con transversiones C>A y, de manera similar, los CCR deficientes en MMR son más propensos a las transiciones C>T. Además, aunque no contribuye a la inestabilidad genómica basal, la exposición a la quimioterapia también puede aumentar el espectro mutacional un tumor generando deregulación genómica. Según ciertas teorías, la tumorigénesis es dependiente de una elevada tasa de mutaciones espontáneas (41). Esta hipótesis no ha sido probada definitivamente y puede que no sea aplicable a todos los cánceres, aunque los datos de múltiples estudios han demostrado que los cánceres a menudo tienen procesos homeostáticos endógenos con el fin de aumentar la carga mutacional global. Por ejemplo, la deaminación de citosinas del ADN, resultante de la regulación al alza del mismo a través de la dC → dU-enzima de edición (APOBEC3B) contribu-

ye con la mutagénesis. La firma mutacional de APOBEC, que se caracteriza por la presencia de mutaciones C>T y C>G en los sitios TpC, está particularmente enriquecida en las etapas avanzadas del desarrollo del tumor, y se hace más prevalente después de la exposición a la quimioterapia. Los altos niveles de expresión de APOBEC3B presagian un peor resultado entre pacientes con ciertas neoplasias sólidas; por ejemplo, un estudio sobre el análisis de 1.500 muestras de cáncer de seno reveló una asociación entre los altos niveles de expresión de APOBEC3B y una menor supervivencia libre de enfermedad y global. La inhibición de estas enzimas podría reducir la inestabilidad genética y mejorar así los resultados de los pacientes, en particular, en tumores cerebrales. La inestabilidad genómica también puede conducir a inestabilidad cromosómica por errores de segregación que ocurren durante la división celular, alterando el equilibrio entre la activación de los oncogenes y los genes supresores de tumor (42). La evolución clonal también puede darse por dese-

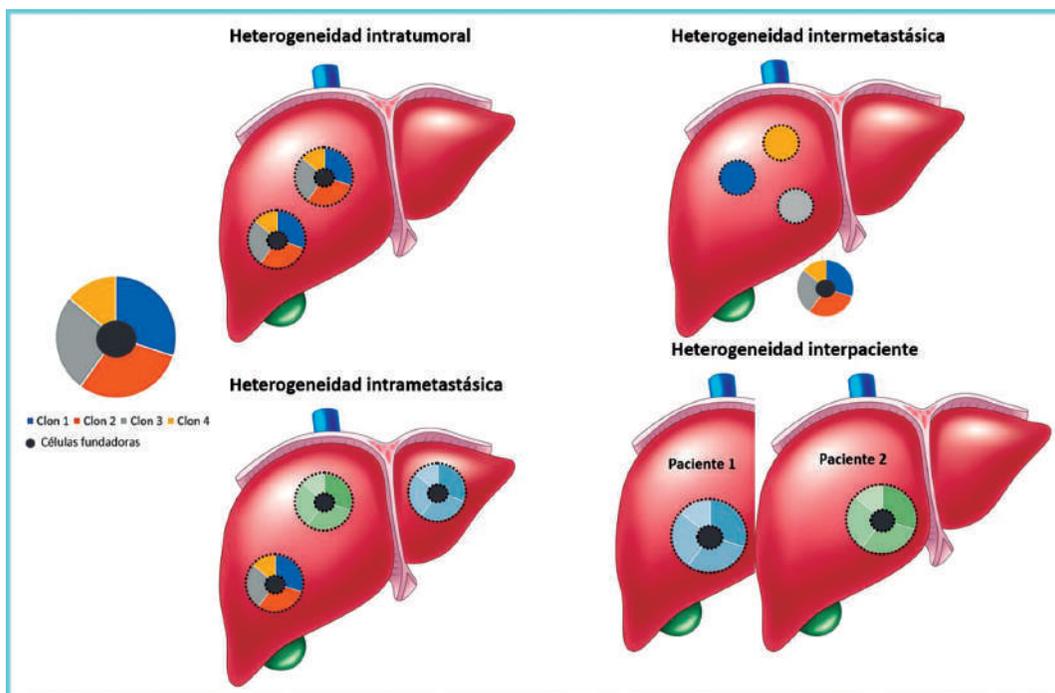


Figura 5. Manifestaciones gráficas de la heterogeneidad tumoral.

quilibrío en el número de copias y por la pérdida uniforme de segmentos cromosómicos que albergan segmentos génicos específicos. Estos hallazgos permiten documentar variaciones intratumorales de orden subclonal que capacitan a las células en derivados más competitivos. Se han propuesto varios modelos para explicar cómo la diversidad clonal se genera y mantiene, aunque la mayoría continúan utilizando el marco de selección propuesto por Peter Nowell en 1976, basado en la hipótesis de que la iniciación del cáncer ocurre gracias a la ventaja de crecimiento selectivo que conduce a la rápida proliferación. Posteriormente, la inestabilidad genómica de la población de tumores en expansión crea más diversidad genética que está sujeta a presiones de selección evolutiva, lo que resulta en la emergencia secuencial de células cada vez más anormales genéticamente. La evolución lineal de la enfermedad permite la adquisición sucesiva de mutaciones que proporcionan superioridad sobre el ancestro común. Alternativamente, la evolución ramificada denota la aparición y propagación divergente de múltiples poblaciones de células tumorales subclonales que comparten un ancestro común. La evolución ramificada permite un mayor nivel de oportunidad para crear un tumor heterogéneo. La mayoría de las neoplasias sólidas optan por un patrón ramificado de evolución, mientras las hematológicas invocan la secuencia lineal. Curiosamente, estos supuestos han sido desafiados por la necesidad de cooperación celular entre distintos subclones para la propagación tumoral (43).

Vías de señalización

A pesar de la inmensa complejidad de los genomas tumorales, progresivamente hemos adquirido la capacidad de controlar algunos de los genes conductores, como lo demuestran las respuestas en pacientes con alteraciones particulares en EGFR (receptor para el factor de crecimiento epidérmico), ALK (quinasa del linfoma anaplásico) y BRAF (homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-Raf), entre otros (44).

Aunque transitorias, significan que la interferencia con un solo producto génico mutado es suficiente para detener temporalmente la evolución de la enfermedad. Hay dos conceptos esenciales al momento de considerar esta información para sustentar el uso de la oncología de precisión. Primero, el 99% de las alteraciones genéticas del cáncer (incluidas las mutaciones puntuales, alteraciones en el número de copias, translocaciones y cambios epigenéticos distribuidos a lo largo del genoma, no solo en las regiones codificantes), como se expuso previamente, son irrelevantes para la neoplasia. Son simplemente cambios pasajeros que marcan el tiempo que ha transcurrido entre las sucesivas expansiones clonales. Sin embargo, las células normales están programadas para ejecutar la muerte celular en respuesta a tales alteraciones, quizás como mecanismo protector contra el cáncer. Por el contrario, las células tumorales han evolucionado para tolerar la complejidad estructural del genoma mediante la adquisición de cambios en genes como TP53 (45). Por tanto, la complejidad genómica es, en parte, el resultado del cáncer, más que la causa.

También hay cierto orden en el caos de las neoplasias. Las mutaciones en los genes conductores causan una ventaja de crecimiento selectivo, ya sea directa o indirectamente, y siempre a través de un número limitado de vías de señalización celular (todos se pueden clasificar en 12 vías). El descubrimiento de los componentes moleculares de estas vías es uno de los mayores logros de la investigación biomédica, un tributo a los investigadores que trabajan en campos que abarcan la bioquímica, la biología celular, y el cáncer. Estas vías pueden organizarse en sí mismas en tres procesos celulares centrales incluyendo el devenir celular, la supervivencia, y el mantenimiento del genoma. Numerosos estudios han demostrado la relación opuesta entre la división y diferenciación celular. Las células activas que son responsables de poblar los tejidos normales no se diferencian, y viceversa. La ventaja de crecimiento selectivo esta favorecida por la actividad de vías que

incluyen APC, HH y NOTCH, que son bien conocidas por controlar el destino celular. Los genes que codifican las enzimas modificadoras de la cromatina también pueden incluirse en esta categoría (46). En el desarrollo normal, el cambio hereditario de la división a la diferenciación no está determinado por la mutación, como ocurre en el cáncer, sino por las alteraciones epigenéticas que afectan al ADN y las proteínas de la cromatina.

Aunque las células neoplásicas se dividen de forma anormal debido a sus alteraciones autónomas, las células estromales que las rodean son perfectamente normales y no siguen el mismo ritmo. La ramificación más obvia de esta asimetría es la vasculatura anormal de los tumores (47). A diferencia de la red bien ordenada de arterias, venas y linfáticos que controlan las concentraciones de nutrientes en los tejidos normales, el sistema vascular en los cánceres es tortuoso y carece de uniformidad estructural. Las células normales están siempre a menos de 100 μm de un capilar, pero esto no es cierto para las células tumorales (48). Como resultado, una célula neoplásica que adquiriera una mutación que le permita proliferar bajo concentraciones limitantes de nutrientes y oxígeno tendrá una ventaja de crecimiento selectivo, prosperando en entornos claramente hostiles que exigen adaptación. Las mutaciones que sustentan la supervivencia a través de vías de señalización están relacionadas con los genes *EGFR*, *HER2*, *FGFR2*, *PDGFR*, *TGF β R2*, *MET*, *KIT*, *RAS*, *RAF*, *PIK3CA* y *PTEN*. Algunos de estos genes codifican receptores para los propios factores de crecimiento, mientras que otros transmiten la señal directamente al interior de la célula, estimulando el crecimiento cuando se activa. Por ejemplo, las mutaciones en los genes *KRAS* o *BRAF* confieren a las células anormales la capacidad de crecer en concentraciones de glucosa inferiores a las requeridas para el crecimiento de células normales (49). La progresión a través del ciclo celular (y su antítesis, la apoptosis) puede controlarse directamente mediante metabolitos intracelulares,

y los genes impulsores que regulan directamente el ciclo celular o la apoptosis, como *CDKN2A*, *MYC* y *BCL2*, a menudo están mutados en paralelo. Otro gen cuyas mutaciones potencian la supervivencia celular es *VHL*, cuyo producto estimula la angiogénesis mediante la secreción del factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*) y con el relacionado con la hipoxia (*HIF1*). Las vías de conducción intracelular relacionadas con el mantenimiento del genoma son esenciales para mantener el microambiente interno de la célula tumoral y su estabilidad genómica. Por tanto, no es de extrañar que mutaciones en los genes que mantienen o anulan puntos de control, como *TP53* y *ATM*, favorecen la proliferación (50).

Conclusiones

Aunque la secuenciación del genoma del cáncer es un esfuerzo relativamente nuevo, ha tenido un enorme impacto en la atención clínica de los pacientes con diversas neoplasias. El reconocimiento de que ciertos tumores contienen mutaciones activadoras en genes conductores que codifican proteínas quinasas ha llevado al desarrollo de fármacos inhibidores específicos (51). Ejemplos representativos de este tipo de medicina basada en el genoma incluyen el uso de inhibidores del *EGFR*, *BRAF* y *ALK* antes mencionados. Solo una fracción de los pacientes con cáncer de pulmón tienen mutaciones en el gen *EGFR* o translocaciones de *ALK*, y responderán a los medicamentos blanco dirigidos. Sin embargo, la genómica ha identificado 16 blancos potenciales en desarrollo para la misma enfermedad, alcanzando diferentes líneas para cada ámbito (52). Un segundo tipo de medicina basada en la genómica se centra en los efectos secundarios y el metabolismo de los agentes terapéuticos, más que en las alteraciones genéticas a las que se dirigen. En la actualidad, la dosis de los medicamentos contra el cáncer se basa en el área de superficie, pero la proporción terapéutica o biológica efectiva depende de la interacción génica.

De manera óptima, la evaluación del genoma permitirá realizar mediciones farmacocinéticas de las concentraciones biológicamente activas en cada paciente (53). El costo adicional de tales análisis sería menor en comparación con los costos exorbitantes de los medicamentos, que se estima en US\$200.000 - US\$300.000 por año de calidad de vida ganado con calidad.

Referencias

- Dulbecco R. A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science*. 1986; 231(4742): 1055-6.
- Robertson M. The proper study of mankind. *Nature*. 1986; 322(6074):11.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(3):177-83.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013; 339(6127): 1546-1558.
- Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Mol Oncol*. 2007;1(1):26-41.
- Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire JA, Zielenska M. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Curr Genomics*. 2008;9(6):394-408.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*. 2010;61:437-455.
- Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini G, Guilhot BJ et al. Imatinib induces durable hemato-logic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002;99(6):1928-1937.
- Eckschlager T, Pilat D, Kodet R, et al. DNA ploidy in neuroblastoma. *Neo-plasma*. 1996;43(1):23-26.
- Mandahl N, Gustafson P, Mertens F, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic impact in chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33(2):188-200.
- Orr LC, Fleitz J, McGavran L, et al. Cytogenetics in pediatric low-grade astrocytomas. *Med Pediatr Oncol*. 2002;38(3):173-177.
- Biswas S, Rao CM. Epigenetics in cancer: fundamentals and beyond. *Pharmacol Ther*. 2017;173:118-134.
- Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem*. 2011;286(21):18347-18353.
- Chakravarthi BV, Nepal S, Varambally S. Genomic and epigenomic alterations in cancer. *Am J Pathol*. 2016;186(7):1724-1735.
- Weisenberger DJ. Characterizing DNA methylation alterations from The Cancer Genome Atlas. *J Clin Invest*. 2014;124(1):17-23.
- Zhao R, Choi BY, Lee MH, et al. Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in cancer. *EBioMedicine*. 2016;8:30-39.
- Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int*. 2015;15:38.
- Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, et al. The novel strategies for next-generation cancer treatment: miRNA combined with chemotherapeutic agents for the treatment of cancer. *Oncotarget*. 2018;9(11):10164-10174.
- Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;763:212-245.
- Feinberg AP, Koldobskiy MA, Gondor A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet*. 2016;17(5):284-299.
- Wallace SS, Murphy DL, Sweasy JB. Base excision repair and cancer. *Cancer Lett*. 2012;327(1-2):73-89.
- Kim YJ, Wilson DM, 3rd. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(1):3-13.
- Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357(6349):409-413.
- Li SKH, Martin A. Mismatch repair and colon cancer: mechanisms and therapies explored. *Trends Mol Med*. 2016;22(4):274-289.
- Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet*. 2014;15(9):585-598.
- Aparicio T, Baer R, Gautier J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst)*. 2014;19:169-175.
- Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(8):495-506.
- Katsanis SH, Katsanis N. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nat Rev Genet*. 2013;14(6):415-426.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2004 ; 4(3):177-83.
- Tokheim CJ, Papadopoulos N, Kinzler KW, et al. Evaluating the evaluation of cancer driver genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(50):14330-14335..
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008; 321(5897):1807-12.
- Hou AH, Tien HF. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies. *J Biomed Sci*. 2020;21(1):81.

33. Chen G, Cai Z, Dong X, et al. Genomic and Transcriptomic Landscape of Tumor Clonal Evolution in Cholangiocarcinoma. *Front Genet.* 2020;11:195.
34. Yang H, Ye D, Guan KL, et al. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res.* 2012;18(20):5562-71.
35. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2424-33.
36. Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature.* 2011;469(7331):539-42.
37. Shain AH, Pollack JR. The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. *PLoS One.* 2013; 8(1):e55119.
38. Kobrinski DA, Yang H, Kittaneh M. BAP1: role in carcinogenesis and clinical implications. *Transl Lung Cancer Res.* 2020;9(Suppl 1):S60-S66.
39. Li Y, Shi J, Yang J, et al. Uveal melanoma: progress in molecular biology and therapeutics. *Ther Adv Med Oncol.* 2020 Oct 22;12:1758835920965852.
40. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature.* 2011;478(7367):64-9.
41. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(2):81-94.
42. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature.* 2013;501(7467):338-45.
43. Turner NC, Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol.* 2012 ;13(4):e178-85. Mar 30.
44. Venkatesan S, Swanton C, Taylor BS, Costello JF. Treatment-Induced Mutagenesis and Selective Pressures Sculpt Cancer Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(8):a026617.
45. Zhang Y, Ma Y, Li Y, et al. Comparative analysis of co-occurring mutations of specific tumor suppressor genes in lung adenocarcinoma between Asian and Caucasian populations. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(3):747-757.
46. Ljungman M, Lane DP. Transcription - guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(9):727-37.
47. Perrimon N, Pitsouli C, Shilo BZ. Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(8):a005975.
48. Baish JW, Stylianopoulos T, Lanning RM, Kamoun WS, Fukumura D, Munn L et al. Scaling rules for diffusive drug delivery in tumor and normal tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(5):1799-803.
49. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(2):116-29.
50. Yun J, Rago C, Cheong I, et al. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science.* 2009; 325(5947):1555-9.
51. Medema RH, Macûrek L. Checkpoint control and cancer. *Oncogene.* 2012; 31(21):2601-13.
52. Bertier G, Carrot-Zhang J, Ragoussis V, Joly Y. Integrating precision cancer medicine into healthcare—policy, practice, and research challenges. *Genome Med.* 2016; 8(1):108.
53. Malone ER, Oliva M, Sabatini PJB, Stockley TL, Siu LL. Molecular profiling for precision cancer therapies. *Genome Med.* 2020;12(1): 8.
54. McLeod HL. Cancer pharmacogenomics: early promise, but concerted effort needed. *Science.* 2013; 339(6127):1563-6.

Recibido: Noviembre 26, 2020
Aceptado: Noviembre 26, 2020

Correspondencia:
Andrés F. Cardona
cardona@clinicadelcountry.com