

Revolución de la era de la genómica:

Análisis de variantes somáticas en tumores

Por: Ana Clara Lugones y David Muñoz

El cáncer es una enfermedad que surge de la alteración biológica y genética de las células propias del organismo. Implica un proceso de multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales. A pesar de que todos los tumores son diferentes, hace algunos años, Hanahan y Weinberg, dos científicos muy reconocidos de Estados Unidos, en sus publicaciones han enumerado una serie de características comunes llamadas los "Hallmarks of cancer", que consisten en un conjunto de características distintivas que son adquiridas durante el desarrollo de los tumores.

Estas son: mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir a la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, activar la invasión y la metástasis, reprogramar el metabolismo energético, y evadir la respuesta inmunológica. Más recientemente, a principios del 2022, se incorporó además el hecho de que las células tumorales adquieren la capacidad de desbloquear la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética, la senescencia celular y la participación del microbioma.

Uno de estos hitos llamado "**Inestabilidad genómica y sus mutaciones**", nos resulta particularmente interesante para profundizar. Una célula tumoral crecerá, y en su desarrollo irá acumulando mutaciones que la harán diferente a una célula normal, lo que le permitirá ir adquiriendo capacidades competitivas para poder progresar. A su vez, en todo este entorno de mutaciones y con el afán ambicioso de crecer descontroladamente, las células tumorales exhiben inestabilidad genómica, esto es, la incapacidad de su genoma para mantener su integridad estructural, y por ende, su información genética.

Por lo tanto, cobra relevancia en este punto, la genómica enfocada en el estudio del cáncer. Esto consiste en hacer una foto del ADN y conocer qué variaciones o cambios que provocan la enfermedad. Esto contribuye tanto a nivel de diagnóstico, cómo de la prevención y el tratamiento oncológico. El estudio genético del cáncer, se puede enfrentar desde dos perspectivas: a través de un perfil somático o a través de un perfil germinal. Los objetivos de ambos enfoques serán diferentes; para el somático será principalmente la terapéutica y el

pronóstico; Y para el germinal será básicamente determinar la causalidad, además del asesoramiento genético oncológico. Asimismo, existen dos tipos básicos de variantes genéticas relacionadas con el cáncer; por un lado **las variantes de la línea germinal**, que se encuentran en todas las células del organismo, desde la concepción del individuo y se transmiten directamente de padres a hijos, aunque en algunos casos pueden originarse de novo. El cáncer causado por mutaciones de la línea germinal se denomina **cáncer hereditario**, y representa alrededor del 5% al 20% de todos los tipos de cáncer. Por otro lado, y el foco de este escrito, encontramos las **variantes somáticas**. Son aquellas variantes adquiridas durante la vida de un individuo en ciertas células que originarán el tumor, y que por lo tanto constituyen la causa más frecuente de cáncer esporádico. Los factores que causan estas mutaciones incluyen: el tabaco, la radiación ultravioleta (UV), los virus, la edad. Sólo afectan a las células que descienden de la que sufrió la variante y no se transmiten a la descendencia. Las variantes somáticas están en todos los tumores, algunas de ellas condicionan la posibilidad de invasión local, de metastatizar, de sobrevivir, etc. y a pesar de que un tumor en general se inicia de un clon celular, luego estas variantes se van acumulando y pueden generar subpoblaciones con perfiles mutacionales diferentes.

A la hora de estudiar variantes somáticas, la muestra a diferencia del estudio germinal que puede ser sangre o saliva generalmente, debe ser sí o sí el tejido tumoral, ya sea fresco o a partir de tacos de parafina. Esto conlleva, obviamente, una dificultad adicional en el experimento de secuenciación, ya que partimos de una muestra en que la mayoría de las veces tiene su ADN un tanto degradado. Por otro lado, existe tanto heterogeneidad entre tumores como dentro del mismo tumor, es decir, el tumor no es todo igual, habrá diferente composición de células, debido a la dominancia de diferentes clones celulares. Básicamente coexisten en un mismo tumor diferentes subpoblaciones de células neoplásicas, que difieren en sus características genéticas (o sea las variantes que presentan), fenotípicas o de comportamiento. Por lo tanto, las variantes que buscaremos en este estudio se encontrarán en muy baja proporción. Sumado a esto, el perfil tumoral, a diferencia del testigo germinal, puede variar en el tiempo, por la misma progresión del tumor y los nuevos clones que se van generando.

Más allá de las dificultades y limitaciones descritas anteriormente, el testeo somático es un desafío que amerita ser resuelto. Esto permite identificar mutaciones específicas, mejorando el diagnóstico del tipo y subtipo de cáncer y seleccionando de esta manera, tratamientos dirigidos más efectivos, lo que incrementa las tasas de respuesta y reduce los efectos secundarios. Además, ayuda a predecir el curso de la enfermedad y a planificar el tratamiento, identificando mutaciones que confieren resistencia a ciertos

fármacos y permitiendo ajustar la estrategia terapéutica. Básicamente, facilita una medicina personalizada adaptada a las características genéticas únicas del tumor de cada paciente.

En Bitgenia, ya desde hace algunos años, venimos transitando este apasionante camino incorporando nuevos avances asociados a la temática. Por eso, en este breve documento les compartimos nuestros principales desarrollos en el área.

Llamado de variantes somáticas

Como se indicó anteriormente, el foco de este estudio, más allá de un diagnóstico, es encontrar un blanco terapéutico o algún marcador que nos oriente sobre cómo progresará un tumor. Por lo tanto, tiene un enfoque distinto al estudio germinal, que busca un diagnóstico. En este caso, las variantes germinales, no son el foco de interés, por lo tanto no interesa estudiarlas, más bien entorpecen de alguna manera el análisis, introduciendo ruido en el mismo. Una buena estrategia, para poder eliminar estas variantes, es a través del estudio "pareado" de muestras somáticas con su correspondiente muestra germinal, de forma tal de eliminar lo que no es objetivo de este estudio. Si bien esta táctica es la ideal, es poco utilizada en la clínica, ya que el costo de secuenciar dos muestras

en paralelo es excesivo hoy en día. Para bien de muchos, surgió una gran idea para sortear esta dificultad, que consiste en generar un gran conjunto de muestras, representativas de variantes germinales, combinadas en el llamado "pool of normals" o "PON". De esta manera, mucho más económica, se pueden eliminar las variantes que se presumen germinales sin necesidad de contar con dos secuencias. Utilizando esta maniobra informática "tumor only" para eliminar las variantes germinales y comparando con la referencia, se "llamarán" únicamente las variantes somáticas. Brevemente, en la Figura 1. se describen los pasos para el alineado y llamado de variantes, es decir la detección de cambios en el ADN del tumor respecto a una referencia, siguiendo las buenas prácticas de GATK. Los cambios evidenciados son las variantes.

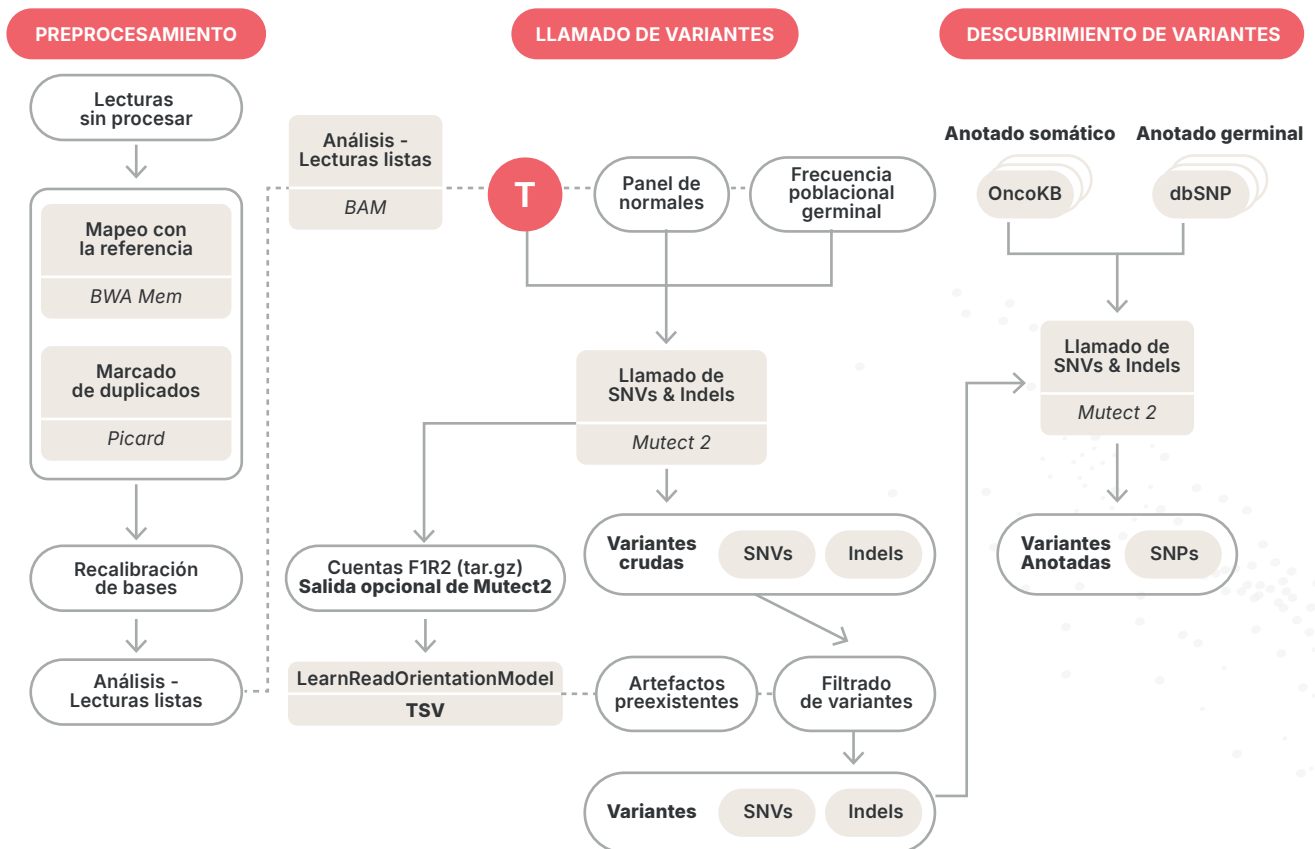


Figura 1. Pipeline de procesamiento bioinformático

Anotado de variantes somáticas

Una vez que las variantes fueron llamadas en la muestra en estudio, deben ser anotadas. Este proceso consiste en adicionarles a cada una información funcional, clínica y de impacto, de manera tal que, posteriormente se puedan priorizar las mismas según la evidencia disponible. Si bien muchas bases de datos se comparten con aquellas utilizadas en el proceso de anotación de las variantes germinales (dbSNP, ClinVar, GnomAD, predictores computacionales, etc.), hay algunas de ellas que aportan información oncológica que vale la pena presentarlas y profundizar un poco en ellas:

-OncokB: Es la primera base de datos de mutaciones de tumores somáticos reconocida por la FDA. Esta herramienta integral y actualizada reúne la experiencia clínica de médicos y científicos del Memorial Sloan Kettering, que contiene información biológica y clínica sobre las alteraciones genómicas en el cáncer (<https://www.oncokb.org/>).

-PMKB (Precision Medicine Knowledge Base): Se trata de una base de datos diseñada en estrecha colaboración con patólogos para garantizar una terminología precisa y estandarizada y flujos de trabajo compatibles con el uso clínico (<https://pmkb.weill.cornell.edu/>).

-CIViC: Consiste en una base de interpretación clínica de variantes del cáncer. Tiene como objetivo facilitar un ecosistema colaborativo entre científicos y clínicos

Clasificación de variantes somáticas

Para avanzar en el análisis y reporte, las variantes identificadas como relevantes deben clasificarse según guías y estándares para informar sobre ellas en un "lenguaje universal" y preciso, tanto a nivel diagnóstico, pronóstico como terapéutico. La Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) y la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) son dos de las organizaciones más destacadas en el campo de la investigación y el tratamiento del cáncer. Estas sociedades han propuesto armonizar y estandarizar el informe y la interpretación de los datos genómicos clínicamente relevantes en oncología, de manera similar a lo realizado por ACMG para variantes germinales asociadas a patologías mendelianas.

ESMO propuso la Escala de accionabilidad clínica para dianas moleculares (ESCAT), que define seis niveles de evidencia clínica para dianas moleculares según sus implicaciones para el manejo del paciente:

- **Tier I:** Target adecuado para implementar en decisiones clínicas de rutina.
- **Tier II:** Targets en investigación que probablemente benefician a una población específica de pacientes, pero se necesitan datos adicionales.
- **Tier III:** Beneficio clínico previamente demostrado en otros tipos de tumores o para dianas moleculares similares.
- **Tier IV:** Evidencia de actividad antitumoral relevante que no resulta en un beneficio clínico significativo como tratamiento único, pero apoya el desarrollo de enfoques de co-objetivo.
- **Tier V:** Evidencia que respalda los enfoques de co-objetivo.
- **Tier X:** Falta de evidencia para accionar.

para crear una base de conocimientos precisa y curada (<https://civicdb.org/>).

-COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer): Proporciona datos sobre variantes somáticas en cáncer, respaldada por un conjunto integral de herramientas para interpretar datos genómicos, discernir el impacto de las alteraciones somáticas en la enfermedad y facilitar la investigación traslacional (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

-Cancer Hotspots: Proporciona información sobre mutaciones recurrentes estadísticamente significativas identificadas en datos genómicos del cáncer a gran escala (<https://www.cancerhotspots.org/>).

-My Cancer Genome: Brinda información actualizada sobre qué mutaciones hacen que los cánceres se desarrollen y las implicaciones terapéuticas relacionadas, incluidos los ensayos clínicos disponibles (<https://www.mycancergenome.org/>).

-Oncotree: Es una plataforma dinámica y flexible, impulsada por la comunidad, para la clasificación de los distintos tipos de cáncer. Abarca tanto cánceres raros como comunes, proporcionando una clasificación clínicamente relevante y detallada (<https://oncotree.mskcc.org/>).

Gracias a toda esta información adicionada a las variantes, las mismas ahora pueden ser priorizadas de manera tal de identificar aquellas relevantes clínicamente, según su evidencia, impacto y tipo de tumor.

Por su parte, las guías de ASCO propusieron un sistema similar basado en los mismos principios:

- **Tier I:** Variantes de gran importancia clínica.
- **Tier II:** Variantes con significado clínico potencial.
- **Tier III:** Variantes de significado clínico desconocido.
- **Tier IV:** Variantes consideradas benignas o probablemente benignas, con subniveles para los tiers 1 y 2.

Por otro lado, el grupo de expertos de ClinGen (que actualmente especifica los criterios para variantes germinales) propuso un abordaje diferente, argumentando que las guías existentes no brindan información directa, sistemática ni normas claras para clasificar la oncogenicidad de una variante somática, lo que conduce a una clasificación inconsistente de las variantes somáticas raras en el cáncer y afecta la atención del paciente. Propusieron un enfoque de consenso para clasificar la oncogenicidad de las variantes somáticas, evaluando la evidencia de acuerdo a diferentes categorías (o etiquetas) como: Muy Fuerte, Fuerte, Moderada o de Apoyo. En función de la evidencia, luego las variantes se clasifican en cinco niveles: oncogénicas, probablemente oncogénicas, VUS (variantes de significado incierto), probablemente benignas o benignas, de manera similar al sistema ACMG.

Dicho esto, es recomendable informar la oncogenicidad de las variantes junto a su capacidad de acción clínica. Esto es útil, por ejemplo, para una variante somática *missense* no incluida directamente en las aprobaciones de la FDA o en las pautas de práctica. Una clasificación de oncogenicidad puede justificar la asignación de dicha variante al tier III (VUS), tier IV (benigno) o potencialmente al tier I o tier II.

Adaptación de la B_Platform

En los últimos meses, hemos dedicado un esfuerzo considerable para implementar los avances más recientes y las bases de datos específicas en nuestra conocida plataforma de análisis, la B_Platform.

Fruto de este trabajo, la Bplatform, cuenta ahora con una sección de **"Evidencia de oncogenicidad"** con

filtros específicos que incluyen las bases de datos descriptas previamente, pudiendo de esta manera **filtrar por incidencia en diferentes bases de datos**, ya sea en alguna de ellas o todas al mismo tiempo. Permite también **filtrar según clasificación por Tiers** y por **órganos en donde se ha descrito algún hot spot mutacional**, es decir, regiones del ADN donde las mutaciones ocurren con una frecuencia significativamente mayor que en otras áreas del genoma en determinados tumores. El filtro **VAF (Variant allele frequency)**, por otro lado, permite establecer el punto de corte a partir del cual se seleccionarán variantes basadas en su frecuencia alélica. Esto es especialmente útil para diferenciar entre mutaciones somáticas y variantes de la línea germinal, ya que las mutaciones somáticas suelen tener frecuencias más bajas al estar presentes únicamente en una subpoblación de células tumorales. Por último, hay una opción para **excluir aquellas variantes que estén presentes en el PON**, definido previamente, lo que facilita reducir el número de variantes y descartar aquellas que posiblemente sean de origen germinal (Figura 2).

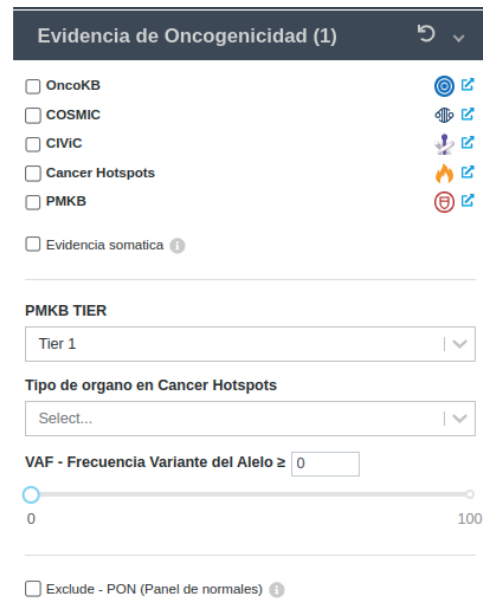


Figura 2. Filtros incidencia en bases de datos con evidencia de oncogenicidad.

Asimismo, la visualización de las variantes estará adaptada a esta patología. Como se observa en la Figura 3, en la columna "Evidencia" correspondiente a la variante, si la variante está reportada en alguna base de datos oncológica, aparecerán los iconos de las mismas con sus respectivos links para poder acceder a ellas fácilmente.

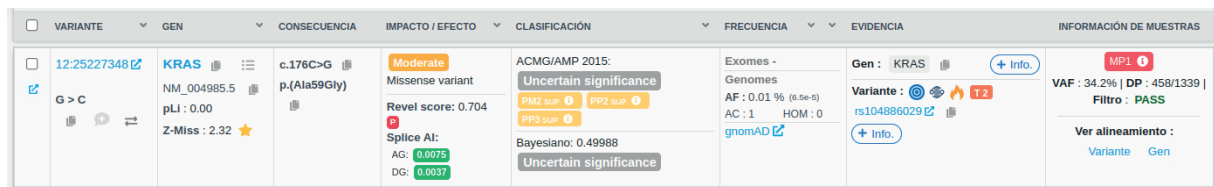


Figura 3. Visualización de las variantes.

Por último, si se aprieta **"click"** sobre la variante, se podrá acceder a información detallada de la misma, como el resultado de predictores bioinformáticos, nomenclatura, frecuencias, etc. También se podrá encontrar un gran resumen de la información disponible en las distintas bases de datos con evidencia de oncología (Figura 4).

Esta sección permite también, acceder a links sumamente útiles a la hora de priorizar y clasificar variantes, como son OncoTree y PMKB.

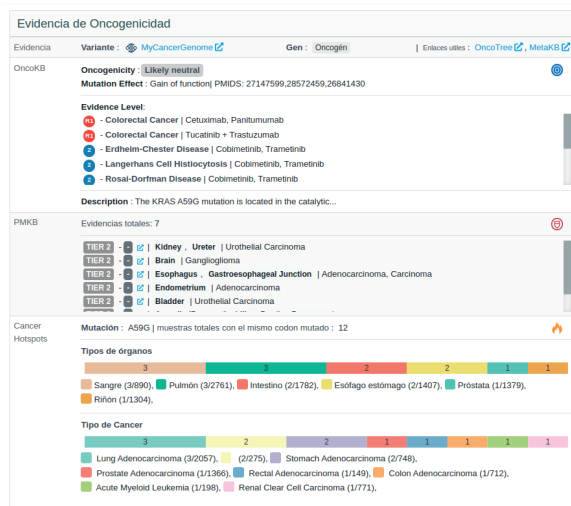


Figura 4. Detalle de la información de distintas bases de datos con evidencia de oncología para una determinada variante.

Conclusiones

Finalmente, y a modo de concluir este newsletter, solo resta decir que seguimos trabajando en la B_Platform e incorporando cada vez más avances con tal de optimizar la selección, priorización, y categorización de las variantes tumorales que serán relevantes para el paciente.

Alineados a todos los avances vigentes vamos en camino hacia una verdadera medicina personalizada. Este enfoque no solo facilita a los profesionales de la salud el análisis de variantes somáticas, sino que también contribuye a obtener resultados precisos y óptimos para la toma de decisiones, mejorando así la calidad de vida de los pacientes con cáncer.