

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERÍA
AGRONÒMICA Y DEL MEDI NATURAL



*HTG EdgeSeq: un nuevo abordaje en la
determinación del perfil molecular de
tumores con cáncer de ovario*

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: ADRIÁN LÓPEZ CHAMORRO

TUTOR: DR. JOSE ANTONIO LÓPEZ-GUERRERO

TUTOR ACADÉMICO: PROFESOR RAFAEL SIRERA PÉREZ

CURSO ACADÉMICO: 2016-2017

VALENCIA, JULIO 2017



Título: HTG EdgeSeq, un nuevo abordaje en la determinación del perfil molecular de tumores de cáncer de ovario.

Title: HTG EdgeSeq, a new approach in molecular profiling of ovarian cancer tumors.

Resumen: Con el objetivo de ampliar nuestro conocimiento en la comprensión de una enfermedad tan compleja y heterogénea como es el cáncer de ovario, se propone el uso de una nueva tecnología genómica, el HTG EdgeSeq, en la determinación del perfil molecular de muestras de tumores ováricos incluidas en parafina (FFPE). El empleo de HTG EdgeSeq se basa en el análisis completo de 2545 genes (Oncology Biomarker Panel) empleando una librería de sondas específicas y posterior acoplamiento a NGS que van a permitir la obtención de perfiles cuantitativos de expresión a partir de volúmenes de muestra realmente pequeños. La información digitalizada obtenida de diferentes pacientes servirá para facilitar la identificación de biomarcadores específicos asociados a este tipo de cáncer, mejorando así el diagnóstico y la clasificación de los diferentes subtipos de cáncer de ovario para la orientación pronóstica y predictiva de tratamiento con agentes que dañan el ADN.

Abstract: In order to expand our knowledge in the understanding of a complex and heterogeneous disease such as ovarian cancer, we propose the use of a new genomic technology, the HTG EdgeSeq, in the determination of the molecular profile of paraffin embedded ovarian tumor samples (FFPE). The use of HTG EdgeSeq is based on the complete analysis of 2545 genes (Oncology Biomarker Panel) using a library of specific probes and subsequent coupling to NGS that will allow the obtaining of quantitative expression profiles from really small sample volumes. Digitized information obtained from different patients will facilitate the identification of specific biomarkers associated with this type of cancer, thus improving the diagnosis and classification of different subtypes of ovarian cancer for the prognostic and predictive orientation of treatment with agents that damage the DNA.

Palabras clave: perfil molecular, cáncer de ovario, diagnóstico, NGS

Keywords: molecular profiling, ovarian cancer, diagnosis, NGS

Alumno: Adrián López Chamorro

Tutor: Dr. José-Antonio López Guerrero

Co-tutor: Profesor Rafael Sirera Pérez

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias al Doctor José Antonio López – Guerrero, jefe del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Valenciano de Oncología, por recibirme en su grupo y por su supervisión durante la realización del trabajo.

También me gustaría agradecer a David Millán Esteban y Marta Ramírez Calvo por su apoyo personal y profesional durante el tiempo que he permanecido en el laboratorio así como por su ayuda técnica.

Por último, me gustaría dar las gracias al profesor Rafael Sirera Pérez por su ayuda en el proceso de presentación del trabajo y por haber aceptado ser mi tutor académico durante la realización del trabajo de fin de grado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer de ovario y medicina personalizada	1
1.2 Caracterización del cáncer de ovario: una enfermedad compleja y heterogénea..	3
1.3 Nueva clasificación del cáncer de ovario.....	4
1.3.1 Carcinomas tipo I.....	5
1.3.2 Carcinomas tipo II.....	6
1.4. <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> y concepto de <i>BRCAness</i> en cáncer de ovario.....	8

2. OBJETIVO..... 12

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 HTG EdgeSeq: nueva herramienta para el <i>profiling</i> tumoral.....	14
3.2 Procesado de las muestras.....	15
3.3 Preparación de las librerías.....	16
3.4 Secuenciación y ensamblaje de datos.....	17
3.5 Análisis estadístico y algoritmo de agrupamiento.....	17

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Historial clínico de los pacientes analizados y estado de los genes <i>BRCA</i>	19
4.2 Análisis de pacientes con mutaciones <i>BRCA</i> patogénicas frente a VED + casos no informativos.....	20
4.3 Análisis de pacientes <i>BRCAness</i> frente a <i>No-BRCAness</i>	22
4.4 Validación firma <i>BRCAness</i> de Konstantinopoulos et al.,.....	24

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... 26

6. CONCLUSIONES..... 29

7. REFERENCIAS..... 30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación tradicional del cáncer de ovario según el tipo celular en el que se desarrolla.....	3
Figura 2. Subtipos caracterizados dentro del cáncer de ovario epitelial.....	3
Figura 3. Nueva clasificación del cáncer de ovario basada en evidencias clinicopatológicas y moleculares.....	4
Figura 4. Supervivencia libre de progresión (PFS) en pacientes <i>BRCA</i> mutados que han sido tratados con olaparib junto a quimioterapia (línea azul) frente a pacientes <i>BRCA</i> mutados que han sido tratados únicamente con quimioterapia (línea roja).....	9
Figura 5. Grupo de expresión de los 60 genes que componen el perfil <i>BRCAness</i> de Konstatinopoulos et al.....	11
Figura 6. Representación gráfica de la asociación del perfil <i>BRCAness</i> con un mayor DFS (A) y un mayor OS (B) en pacientes con cáncer de ovario.....	11
Figura 7. Vías de señalización que guardan relación con el cáncer y que han sido analizadas durante el ensayo de HTG EdgeSeq.....	14
Figura 8. Representación gráfica del flujo de trabajo seguido durante la realización del ensayo HTG EdgeSeq.....	15
Figura 9. Esquema gráfico del proceso de protección por nucleasas (qNPA).....	16
Figura 10. <i>Heat map</i> que refleja los datos de expresión de pacientes con mutaciones patogénicas en <i>BRCA1/2</i> frente a pacientes con VED y casos no informativos.....	21
Figura 11. Análisis de componentes principales multidimensional realizado entre el grupo de pacientes con mutaciones patogénicas en <i>BRCA1/2</i> frente a pacientes con VED y casos no informativos.....	21
Figura 12. <i>Heat map</i> que muestra los datos de expresión de los pacientes considerados <i>BRCAness</i> frente a pacientes considerados <i>No-BRCAness</i>	22
Figura 13. Análisis de componentes principales multidimensional realizado entre pacientes considerados <i>BRCAness</i> frente a pacientes considerados <i>No-BRCAness</i> (A). Análisis de componentes principales entre pacientes considerados <i>BRCAness</i> frente a pacientes considerados <i>No-BRCAness</i> (B).....	23
Figura 14: <i>Heat map</i> resultado de aplicar el patrón de expresión <i>BRCAness</i> definido por Konstatinopoulos et al.....	25

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de los principales genes alterados en los diferentes subtipos histológicos que se agrupan en los carcinomas tipo I.....	5
Tabla 2. Frecuencia de los principales genes alterados en los carcinomas de ovario tipo II.....	7
Tabla 3. Lista de los 36 pacientes analizados en el ensayo con HTG EdgeSeq junto a una serie de datos del historial clínico.....	19
Tabla 4. Lista de los genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes con mutaciones patogénicas en <i>BRCA1/2</i> frente a pacientes con VED y casos no informativos.....	22
Tabla 5. Lista de genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes <i>BRCAness</i> frente a el grupo de pacientes <i>No-BRCAness</i>	24

LISTA DE ABREVIATURAS

OS	Supervivencia promedio
HGS-OvCa	Cáncer de ovario seroso de alto grado
EOC	Cáncer de ovario epitelial
HRR / HR	Reparación por recombinación homóloga
DFS	Supervivencia libre de enfermedad
NGS	Secuenciación de próxima generación
CNV	Variante en el número de copias
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
iPARP	Inhibidor de poli ADP ribosa polimerasa
DSBs	Roturas de doble cadena
NHEJ	Reparación por recombinación no homóloga
TCGA	“The Cancer Genome Atlas”
PFS	Supervivencia libre de progresión
FFPE	Muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina
qNPA	Ensayo de protección por nucleasas
ILP	Intervalo libre de platino
VED	Variante de efecto desconocido
VF	Frecuencia de variante
NP	No patogénica
PCA	Análisis de componentes principales
MPCA	Análisis de componentes principales multidimensional
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
mRNA	RNA mensajero

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer de ovario y medicina personalizada

Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es una enfermedad resultante de la formación y crecimiento descontrolado de las células malignas que forman el tumor en los tejidos del ovario, los órganos reproductores femeninos encargados de secretar los óvulos y las hormonas sexuales femeninas.

En España la incidencia del cáncer de ovario se considera alta con aproximadamente 3.300 casos registrados anualmente y un ratio de 10 casos por cada 100.000 habitantes al año. En cuanto a la edad, se trata de un tumor propio de las edades medias de la vida. La gran mayoría de los casos se diagnostican entre los 45 y los 75 años, habiendo un número significativo de casos desde los 30 años. (AECC, 2017)

Actualmente, el cáncer de ovario es el sexto más frecuente entre las mujeres, registrándose en torno a 205.000 nuevos casos en todo el mundo y resultando en la principal causa de muerte ginecológica en países desarrollados. En este sentido, las tasas de incidencia más elevadas se registran en Europa (UK, Austria, Alemania), donde las tasas siguen aumentando lentamente, y en EEUU, con una estimación de 22.280 nuevos casos y 14.240 muertes estimadas en 2016 (CANCER.ORG, 2016)

Su gran ratio de muertes se debe a que la mayoría de los pacientes, en torno al 75 % de los casos, son diagnosticados en un estado avanzado de la enfermedad debido a que actualmente no existe un test establecido para el cáncer de ovario, lo que supone un obstáculo para su detección temprana. La inexistencia de marcadores predictivos y relevantes a nivel pronóstico que hayan sido completamente validados en cáncer de ovario suponen una limitación en el diagnóstico, entendimiento y avance del tratamiento de esta enfermedad. (Cannistra, 2004)

Hasta ahora, algunos factores clinicopatológicos clásicos como la perspectiva del estado patológico, la extensión de enfermedad residual, subtipo histológico, la edad y el rendimiento del paciente han presentado significancia pronóstica; sin embargo, la pronosticación permanece imprecisa. (Agarwal, 2005)

En este contexto, la identificación de la biología subyacente así como la patogénesis del cáncer de ovario es crucial para lograr nuevas estrategias personalizadas de diagnóstico, predicción, pronóstico y terapia. Además, la determinación de las características moleculares de la oncogénesis del cáncer de ovario (*molecular profiling*) tiene el potencial de incrementar las probabilidades de detección temprana utilizando múltiples abordajes (Rojas et al., 2016)

En cuanto al tratamiento actual, desde la introducción de los compuestos basados en platino en la época de 1980s, la combinación de los regímenes de quimioterapia ha aumentado la supervivencia de pacientes con cáncer de ovario, pero no han afectado a los ratios de cura los cuales se han mantenido bajos. En este sentido, la práctica habitual consiste en la eliminación quirúrgica de los tumores seguido de un tratamiento quimioterapéutico de platino-taxano (Muggia, 2009). Sin embargo, a pesar del agresivo tratamiento inicial con ratios de respuesta inicial de entre el 65 % y el 80 % al tratamiento en primera línea, muchos tumores presentan recurrencia y la supervivencia promedio (OS) a los 5 años es del 44% (Siegel Naishadham and Jernal, 2012), apuntando la necesidad de identificar subgrupos de pacientes que puedan beneficiarse de las nuevas terapias moleculares dirigidas.

Medicina personalizada

En este contexto, se piensa que el cáncer de ovario resulta de una acumulación de cambios genéticos (Aunoble et al., 2000). Cuando estos cambios sean mejor comprendidos, será posible identificar nuevos subgrupos de cáncer de ovario. Esto podría identificar pacientes que podrían verse beneficiados en el futuro de terapias nuevas experimentales, incluso cuando existen altos ratios de resistencia a las quimioterapias en primera línea de tratamiento. Además, el conocimiento de estos cambios, puede aportar información sobre la agresividad tumoral y la resistencia a fármacos, dejando paso a nuevas y potenciales dianas moleculares para terapia (Hogg and Friedlander, 2004).

En este sentido, con el inicio de este siglo estamos experimentando una transición a un nuevo modelo de medicina personalizada para el tratamiento del cáncer, basada en las firmas moleculares de cánceres individuales. En el campo de la medicina personalizada, la caracterización fenotípica-molecular del tumor y del microambiente dirige la decisión terapéutica. De esta forma, los estudios basados en terapias dirigidas están guiados por biomarcadores, son más centrados, y sólo trata a aquellos pacientes que tienen la anormalidad molecular la cual es la diana del fármaco. Estos hallazgos traen consigo importantes implicaciones para el *screening*, detección y tratamiento del cáncer de ovario en el futuro (Dutta and Dutta, 2013).

No obstante, hasta la fecha, existen pocas terapias que se hayan probado o se usen en cáncer de ovario. La rapidez en la elucidación está frenada por la baja incidencia y la heterogeneidad molecular subyacente entre los subtipos de cáncer de ovario (Cannistra., 2004), (Aunoble et al., 2000).

En definitiva, el panorama actual obliga a la búsqueda de nuevas estrategias de diagnóstico que permitan predecir el curso clínico y facilitar la orientación pronóstica a los pacientes con el fin de aumentar los ratios de supervivencia y garantizar el tratamiento más efectivo en base a la oncogénesis particular de cada uno de los tumores.

1.2 Caracterización del cáncer de ovario: una enfermedad compleja y heterogénea.

El cáncer de ovario es una enfermedad con una gran heterogeneidad con respecto a su histopatología, biología molecular y curso clínico y está caracterizada por múltiples subtipos histológicos.

Tradicionalmente se ha hecho referencia a este cáncer como cáncer de ovario epitelial (EOC) puesto que más del 90 % de los casos se producen en las células epiteliales del ovario (Rojas et al., 2016).

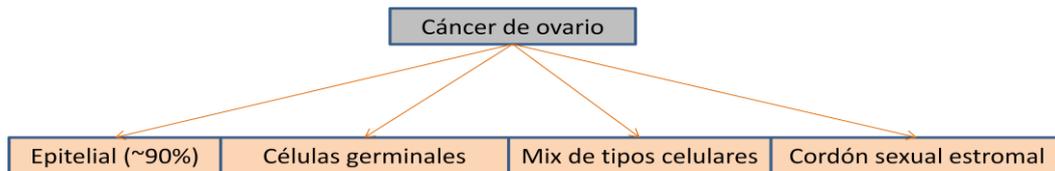


Figura 1. Clasificación tradicional del cáncer de ovario según el tipo celular en el que se desarrolla. El 90 % de los casos se diagnostican como cáncer de ovario epitelial al originarse en las células epiteliales del ovario. (Rojas et al., 2016)

Así mismo, dentro del cáncer de ovario epitelial existen varios subtipos caracterizados (Rojas et al., 2016):

- Cáncer de ovario seroso: con distinción en alto grado y bajo grado
- Cáncer de ovario de células claras
- Cáncer de ovario endometriode
- Cáncer de ovario mucinoso
- Tumores malignos de Brenner
- Subtipos histológicos combinados

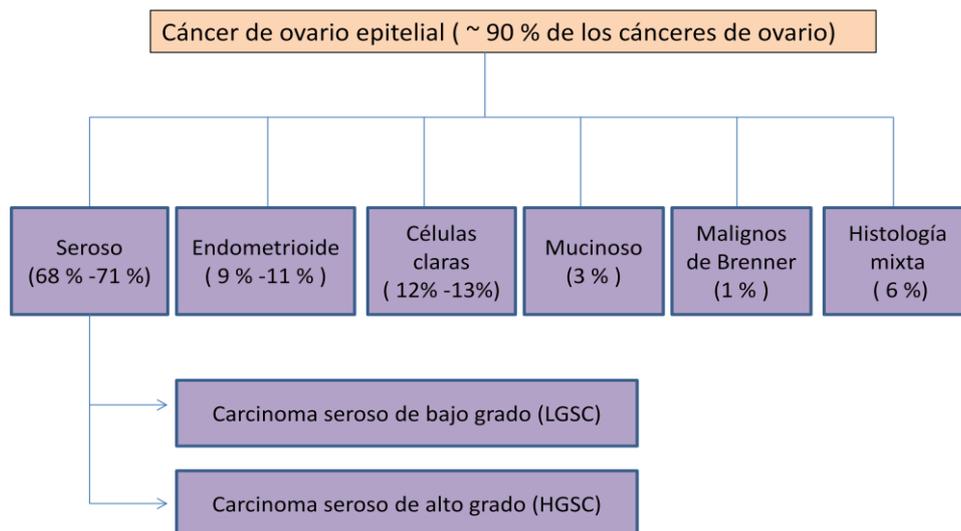


Figura 2. Subtipos caracterizados dentro del cáncer de ovario epitelial. El cáncer de ovario epitelial puede subdividirse en 6 subtipos histológicos diferentes: seroso, endometriode, de células claras, mucinoso, tumores malignos de Brenner y subtipo histológico mixto (Rojas et al., 2016).

En este sentido, dos tercios de los casos son clasificados como el subtipo histológico seroso. Los otros subtipos histológicos son relativamente menos frecuentes en comparación con el cáncer de ovario seroso de alto grado (HGS-OvCa) aunque la incidencia del cáncer de ovario de células claras resulta muy elevada en la zona de Japón en comparación con otros estudios realizados en Estados Unidos o Canadá. (Seidman et al., 2004)

No obstante, aunque esta clasificación ha resultado de utilidad clínica, está basada en criterios histopatológicos y no aporta información acerca de la oncogénesis y la biología subyacente a la enfermedad. Tumores con idéntica patología pueden tener diferentes orígenes y responder de forma diferente al tratamiento (Cross and Burmester, 2004)

De este modo, recientes avances en la determinación del perfil molecular del cáncer de ovario correlacionado con descubrimientos en el ámbito clínico-patológico han revelado que el cáncer de ovario puede ser definido en dos grupos distintos llamados carcinomas tipo I y tipo II (Network, 2012), (Kurman and Shih, 2016).

1.3 Nueva clasificación del cáncer de ovario

Esta nueva clasificación no solo facilita una mejor caracterización de la enfermedad y una mejor predicción de la prognosis de los pacientes, sino que también ofrece una visión interior de los mecanismos subyacentes al desarrollo de cáncer de ovario epitelial. De esta forma, los diferentes subtipos histológicos mencionados anteriormente han sido agrupados en tipo I y tipo II en base a las vías de señalización y las alteraciones genéticas que comparten y son comunes entre ellos, es decir, en base al origen de la patología (Rojas et al., 2016).

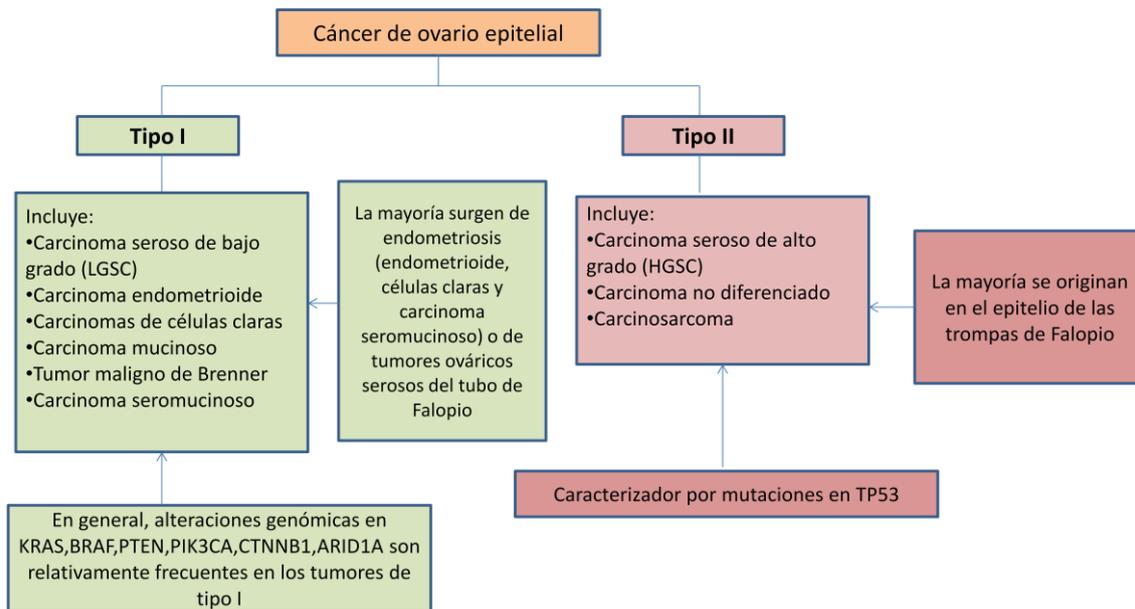


Figura 3. Nueva clasificación del cáncer de ovario basada en evidencias clinicopatológicas y moleculares de que los carcinomas tipo I y tipo II se desarrollan a partir de diferentes vías de señalización. En la figura se incluyen las alteraciones genómicas más comunes tanto para los tumores tipo I como para los tumores tipo II (Rojas et al., 2016).

1.3.1 Carcinomas de ovario tipo I

Dentro de los carcinomas de ovario tipo I encontramos la mayoría de los subtipos histológicos: cáncer de ovario epitelial seroso de bajo grado, carcinoma endometriode, carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso, tumores malignos de Brenner y carcinoma seromucinoso. En general, este grupo de carcinomas de ovario tipo I presenta una serie de alteraciones genómicas relativamente frecuentes en una serie de genes que incluye: *KRAS* (30 %), *BRAF* (30 %), *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB*, *ARID1A* y *ERBB2* (Kurman and Shih , 2016).

En general, los cánceres de ovario tipo I incluyen cánceres de bajo grado que presentan un curso relativamente indolente y normalmente presente a un bajo grado. Las lesiones de tipo I están caracterizadas generalmente por tener un curso clínico más llevadero y un perfil genómico relativamente estable (Fukumoto and Nakayama, 2006).

Además, este tipo de tumores presenta un crecimiento lento y confinado al ovario y son menos sensibles a tratamientos de quimioterapia estándares. Mutaciones somáticas en *BRAF* y *KRAS* son muy frecuentes en este tipo de tumores, especialmente en el subtipo seroso de bajo grado, lo cual presenta importantes implicaciones terapéuticas (Oluwole Fadare, 2017). Adicionalmente a las mutaciones activadoras en *KRAS* o *BRAF*, particularmente en el carcinoma seroso de bajo grado, endometriode y mucinoso, se han encontrado también alteraciones en los genes que codifican para la B-catenina (*CTNNB1*) y *CDKN2A*. Mutaciones en *TP53* se observan con rareza en estos tumores con la excepción del carcinoma mucinoso en el que las mutaciones en *TP53* ocurren frecuentemente (Vereczkey et al., 2010).

Tabla 1. Frecuencia de los principales genes alterados en los diferentes subtipos histológicos que se agrupan en los carcinomas tipo I.

Gene mutation	EOC Overall	High Grade Serous (Type II)	Low Grade Serous (Type I)	Clear Cell (Type I)	Endometrioid (Type I)	Mucinous (Type I)
BRAF	11 % (Kurman and Shih 2011)	< 1 % (TCGA 2011)	24-33 % (Nakayama et al 2006; Singer et al 2003)	1 % (Kuo et al 2009)	24 % (Singer et al 2003)	50-75 % (Gemignani et al 2003)
KRAS	11 % (Kurman and Shih 2011)	< 1 % (TGCA (2011)	33 % (Nakayama et al 2006; Singer et al 2003)	< 1-7% (Kuo et al 2009; Singer et al 2003)	< 1 % (Singer et al 2003)	50-75 % (Gemignani et al 2003)
PIK3CA	6,7 % (Campbell, Rusell and Phillips 2005;Levine et al. 2005; Wang et al.2005)	< 1 % (TGCA 2011)	5 % (Nakayama et al.2006)	20-33 % (Campbell et al.2004;Kuo et al.2009)	20%(Campbell et al.2014)	Rare
PTEN	20% (Kurman and Shih 2011)	< 1 % (TCGA 2011)	20% (Landen,Birrer and Seed 2008)	<1-5 % (Kuo et al.2009; Willner et al.2007)	20-31 % (Kurman and Shih 2011; Willner et al 2007)	Rare

Destacablemente, los genes caracterizados por estar alterados con elevada frecuencia en los carcinomas tipo I, aparecen con una frecuencia inferior al 1% en el caso de los tumores serosos de alto grado (tipo II).

A pesar de que los cánceres de ovario tipo I han sido menos caracterizados por NGS en comparación con los de tipo II, los hallazgos han revelado la existencia de una elevada heterogeneidad genética entre cada subtipo histológico de cáncer de ovario de tipo I (Dutta and Dutta, 2013).

1.3.2 Carcinomas de ovario tipo II

Dentro de los carcinomas de ovario tipo II encontramos el cáncer de ovario seroso de alto grado, el de peritoneo y el de trompas de Falopio. Además, dentro del grupo II se incluyen otros como el endometrioides de alto grado y otros cánceres peormente diferenciados como carcinomas. Estos tumores son clínicamente agresivos y normalmente presentan metástasis extensa en el tiempo en el que se presenta. Los tumores EOC de alto grado presentan elevados niveles de inestabilidad genómica con una serie de mutaciones típicas: *TP53* el cual aparece alterado en el 90 % de los casos (Kurman and Shih, 2016) (Landen, Birrer and Sood, 2008) ,y las vías de señalización *PI3KCA* y *RAS* que están alteradas en el 45 % de los casos; no obstante, mutaciones somáticas son raras y amplificaciones génicas están lejos de ser comunes (Bell et al., 2011).

Los cánceres de ovario de alto grado se han relacionado con anomalías asociadas a las ciclinas. Las ciclinas, contribuyen a la coordinación temporal de cada evento mitótico. Anomalías en estas moléculas resultan en inestabilidad cromosómica y esto puede contribuir a la tumorigénesis (Mandai M et al., 2010)

Por otro lado, en contraste con los carcinomas de ovario tipo I, los genes relacionados con la proliferación como *KRAS* y *BRAF* no aparecen mutados en cánceres de alto grado de tipo II. Además, a diferencia de los estudios realizados en cáncer de ovario tipo I, estudios de NGS de cáncer de ovario tipo II han mostrado un alto grado de inestabilidad genómica/cromosómica y están caracterizados fundamentalmente por las mutaciones en *TP53*, como puede verse en la tabla 2 (Wei et al., 2013).

Tabla 2. Frecuencia de los principales genes alterados en los carcinomas de ovario tipo II. Los tumores ováricos tipo II se caracterizan principalmente por mutaciones en TP53. Además, se observa una elevada frecuencia de mutaciones en BRCA 1 y BRCA 2 así como en las variantes en el número de copias (CNV) de algunos genes como MYC, CCNE1, PI3KCA y NOTCH3 entre otros. (Rojas et al., 2016)

Gene	Frequency of mutations	Frequency of CNV
TP53	96 %	0,9 %
BRCA1	12 %	0,6 %
BRCA2	11 %	2 %
MYC	0 %	31 %
MECOM	0,6 %	22 %
CCNE1	0 %	20 %
PRKCI	0,6 %	19 %
PIK3CA	0,6 %	17 %
NOTCH3	0,9 %	11 %
KRAS	0,6 %	11 %
RAB25	0 %	7 %
AKT2	0 %	6 %
AURKA	0 %	3 %
PIK3R1	0,3 %	2 %
AKT1	0 %	3 %
ERBB2	0,9 %	2 %
KIT	2 %	1 %
FGF1	0 %	1 %
EGFR	2 %	0,4 %
BRAF	0,6 %	5 %
PTEN	0,6 %	6 %
RB1	2 %	7 %
NF1	4 %	6 %
ETV4	0 %	0,5 %
FOXM1	0 %	5 %
CD9	0,3 %	8 %
RAB11F1P4	0 %	6 %
FGFRL1	0 %	3 %

Resulta de gran importancia resaltar que estos estudios han demostrado que el carcinoma seroso de bajo grado no es una lesión precursora del carcinoma seroso de alto grado tal y como se creía; más bien, se cree que los dos subtipos son enfermedades diferentes caracterizadas por diferentes patrones de variación genómica, con distintas implicaciones pronósticas. Gracias a este nuevo paradigma, el carcinoma seroso de bajo grado se clasifica como carcinoma tipo I y el carcinoma seroso de alto grado se clasifica como tipo II y se asocia a un curso clínico más agresivo (Kurman, 2013), (Kurman and Shih, 2011)

Finalmente, recientes estudios de secuenciación de DNA han revelado la presencia de mutaciones somáticas y en la línea germinal en genes implicados en la recombinación homóloga (HRR) en cáncer de ovario serosos. En este sentido, se incluyen las mutaciones somáticas en **BRCA1**, **BRCA2**, **CHEK2**, **ATM** y en la línea germinal mutaciones en **BRCA1**, **BRCA2**, **RAD51D**, **CHEK2** y **BRIP1**. En un estudio, la pérdida de función en al menos un gen implicado en la recombinación homóloga ocurrió en el 30% de los casos de cáncer de ovario seroso registrados. (Pennington et al., 2013). Además, en el caso de cáncer seroso de alto grado se han reportado altos índices de alteraciones somáticas y de la línea germinal en **BRCA1 y/o BRCA2** y otros genes de recombinación homóloga así como en el porcentaje de variaciones en el número de copias (CNV).

En los últimos 20 años, ha habido un progreso considerable en nuestra comprensión de las funciones biológicas de *BRCA1* y *BRCA2*, genes susceptibles del cáncer. Esto ha dejado paso al desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas que atacan tumores con pérdida de función bien en *BRCA1* o bien en *BRCA2* (Lord and Ashworth, 2016). En este sentido, cabe destacar que las terapias con platino así como con inhibidores de PARP han resultado particularmente efectivas en pacientes con cáncer de ovario que tienen mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2* al dirigir la acumulación de roturas dobles en el DNA, lo que induce una muerte celular resultado de la combinación de mutaciones en dos o más genes. Por ello, los inhibidores de PARP así como otros agentes que dañan el DNA constituyen una gran promesa en la mejora del tratamiento de pacientes con cáncer de ovario (Rojas et al., 2016).

A continuación, se explica detalladamente el papel que juegan los genes *BRCA1* y *BRCA2* en la carcinogénesis ovárica, sus implicaciones terapéuticas y la importancia de la determinación del estado molecular de ambos genes en pacientes con cáncer de ovario serosos, el subtipo en el que aparece la frecuencia más elevada de mutaciones. Adicionalmente, se introduce el novedoso concepto de “*BRCAness*” para describir un subconjunto de carcinomas ováricos que comparten características moleculares con los tumores *BRCA* mutados.

1.4 *BRCA1*, *BRCA2* y concepto de *BRCAness*

Tanto la proteína *BRCA1* como *BRCA2* están implicadas en el proceso de recombinación homóloga (HRR), el cual interviene en la reparación de las dobles lesiones en el DNA (D'Andrea and Grompe, 2003). Los pacientes con cáncer de ovario y mutaciones en *BRCA1/2* en línea germinal exhiben una habilidad imprecisa para reparar las dobles roturas (DSBs) en las cadenas de DNA por la vía de la recombinación homóloga (Tan et al., 2008). El HRR es considerado una forma de reparación del DNA conservativa, reestablece la secuencia original del DNA. En ausencia de HRR, por ejemplo cuando *BRCA1* y *BRCA2* son defectivos, formas no conservativas de reparación como la recombinación no homóloga (NHEJ) entran en juego para reparar las DSBs (Prakash et al., 2015). La NHEJ repara las dobles roturas por un proceso relativamente simple en el cual los extremos de las dos cadenas rotas se unen sin utilizar una secuencia de DNA homóloga que guíe la reparación. Esto puede resultar en la introducción de mutaciones en el DNA, de ahí que el aumento del uso de NHEJ en ausencia de *BRCA1* o *BRCA2* cause una firma mutacional característica que consiste en una elevada frecuencia de deleciones en el DNA flanqueadas por pequeñas repeticiones en tándem en los puntos de roturas de la deleción (Lord and Ashworth, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, una característica definida en los tumores *BRCA1/2* mutados es su sensibilidad a ciertos fármacos que detiene la progresión normal de las orquillas de replicación causando que colapsen, frecuentemente resultando en DSBs (Chernikova, Game and Brown, 2012). Por ejemplo, las sales de platino (cisplatino o carboplatino) causan entrecruzamientos covalentes dentro de la doble hebra de DNA que detienen la progresión de la orquilla de replicación (Stefanou et al., 2015).

Por otro lado, los inhibidores de PARP, como olaparib, también detienen la orquilla de replicación pero por otra vía diferente, en este caso previniendo el desarrollo normal de la proteína reparadora del DNA llamada PARP, la cual presenta un papel crucial en el NHEJ (Hopkins et al., 2015). En ausencia de función en *BRCA* e inhibiendo otra vía de reparación alternativa las células pueden fallar en la reparación del DNA dañado causado por estos agentes originando una gran inestabilidad genómica inconsistente con la viabilidad celular por lo que progresan hacia alguna forma de muerte celular programada (McCabe et al., 2006). Estudios preclínicos que han establecido la sensibilidad de los tumores *BRCA* mutados a los inhibidores de PARP, han dejado paso a ensayos clínicos en pacientes con cáncer ovario *BRCA* mutado familiar (figura 4) (Oza et al., 2015).

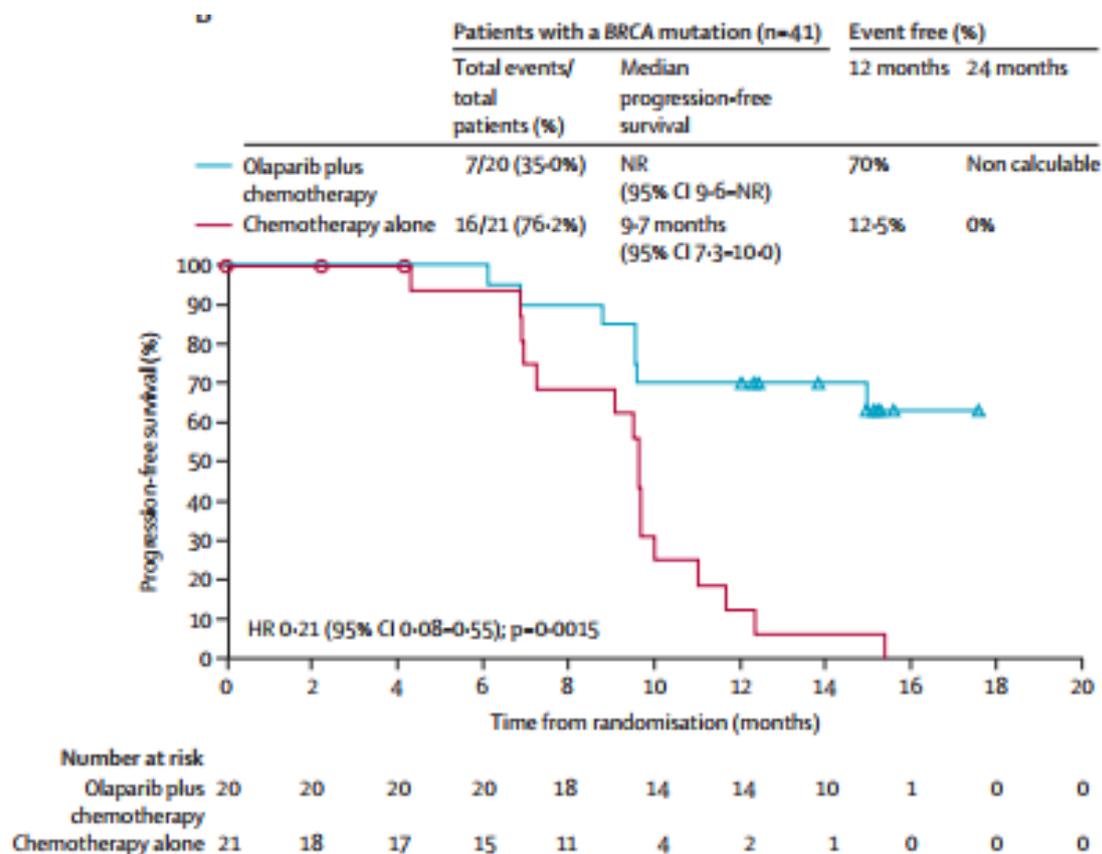


Figura 4. Supervivencia libre de progresión (PFS) en pacientes *BRCA* mutados que han sido tratados con olaparib junto a quimioterapia (línea azul) frente a pacientes *BRCA* mutados que han sido tratados únicamente con quimioterapia (línea roja) (Oza et al., 2015).

Sin embargo, debido a que solo del 10 al 15 % de las mujeres que desarrollan cáncer de ovario presentan mutaciones en línea germinal de *BRCA1* y *BRCA2*, la promesa de los inhibidores de PARP en el tratamiento del EOC está frenada ya que esto podría implicar que el 90 % de los pacientes con esta enfermedad letal no podría beneficiarse de esta nueva clase de fármacos (Risch et al., 2006)

No obstante, se ha propuesto que defectos en el HRR pueden aparecer también en tumores esporádicos que no presentan alteraciones en los genes *BRCA*, un concepto denominado *BRCAness* (Turner, Tutt and Ashworth, 2004) . Este fenotipo *BRCAness* representa un subgrupo de cánceres de ovario esporádicos que presentan anomalías en la vía de la recombinación homóloga en ausencia de mutaciones germinales en los genes *BRCA1* y/o *BRCA2*. Esta deficiencia en el mecanismo de reparación HRR se atribuye a diferentes mecanismos que incluyen: la hipermetilación epigenética del promotor de *BRCA1/2* (Esteller, 2000), mutaciones somáticas en *BRCA1/2* (Hennessy, Timms y Carey, 2009) o pérdidas de función debido a mutaciones en otros genes de la vía de la reparación homóloga como *EMSY*, *PALB2*, *PTEN*, *ATM*, *ATR*, *CHEK1*, *CHEK2*, *RAD51*, *CDK12*, *ERCC1* y la familia de genes *FANC* principalmente (Lord and Ashworth, 2016).

En 2011, el TCGA reportó el análisis de 489 muestras de HGS-OvCa, el subtipo con la frecuencia más elevada de mutaciones en los genes HRR, y encontró que mutaciones en *TP53* estaban presentes en el 96 % de los tumores, y alteraciones en al menos uno de los genes moduladores del HRR estaban presentes en aproximadamente el 50% de las muestras tumorales. (TCGA, 2011).

Estas alteraciones en HRR incluían mutaciones somáticas en *BRCA1* y *BRCA2* (3%) Así mismo, la amplificación de *EMSY*, un evento que afecta al HRR por inactivación de *BRCA2*, fue un evento recurrente en HGS-OvCa (encontrado en más del 13% de los tumores) y la delección focal o mutación en *PTEN* se correlaciona con defectos en el HRR; lo que se observa en el 7 % de los casos. La hipermetilación de *RAD51C*, el producto del cual está directamente implicado en el HRR, fue notificado en el 3% de los tumores, mutaciones en *ATM* o *ATR* en el 2% y mutaciones en *FANC* en el 5%. Finalmente, se notificaron mutaciones recurrentes en *CDK12* que detienen la transcripción de genes clave en el HRR, sugiriendo que alteraciones en *CDK12* también pueden causar un defecto *BRCAness* (TCGA, 2011).

De esta forma, los tumores *BRCAness* constituyen una copia fenotípica de aquellos con mutaciones en *BRCA1* y/o *BRCA2*; es por ello que el alto grado de inestabilidad genómica observado en los tumores *BRCA1/2* mutados en línea germinal también se observa en una elevada fracción de cánceres esporádicos y además existen características histológicas de los tumores *BRCA1* mutados que también aparecen en los tumores esporádicos (Turner, Tutt and Ashworth, 2004).

En este sentido, del mismo modo que los pacientes con cáncer de ovario mutado en los genes *BRCA* presentan una respuesta significativa a la quimioterapia basada en platino así como a otros agentes que dañan el DNA, el fenotipo *BRCAness* ha logrado asociarse a una mejora en la respuesta y la supervivencia tras el tratamiento con platino así como a inhibidores de PARP, dejando entrever la importancia de la identificación de pacientes con cáncer de ovario *BRCAness* que puedan beneficiarse de las nuevas terapias dirigidas con agentes que dañan el DNA. (Muggia and Safra, 2014)

Una serie de estudios han intentado identificar la firma molecular *BRCAness* utilizando marcadores transcripcionales, normalmente firmas metagénicas compuestas por varios genes, la expresión de las cuales está asociada con defectos germinales en los genes *BRCA* y han intentado comprobar si estas firmas también están presentes en los tumores esporádicos.

En este sentido, Konstantinopoulos et al utilizaron un array de expresión tumoral para desarrollar un perfil *BRCAness* capaz de identificar pacientes con deficiencias en los mecanismos de recombinación homóloga (HR) y lograron correlacionarlo con el curso clínico en base a factores pronósticos y predictivos como la respuesta a platino y la respuesta a iPARPs (Konstantinopoulos et al., 2010).

De esta forma, el perfil *BRCAness* se basó en 60 genes donde un análisis lineal discriminante fue capaz de distinguir entre tumores *BRCAness* y *No-BRCAness* con un 94 % de exactitud (figura 5). Además, este perfil resultó ser independiente de otros factores pronósticos como la edad, el grado y el estado del tumor así como la histología.

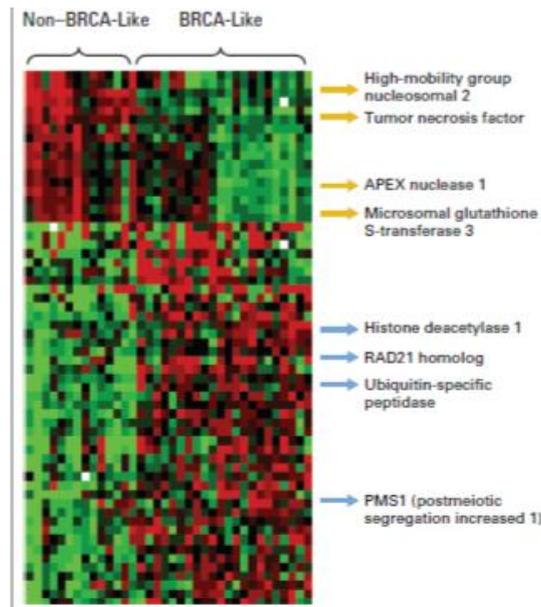


Figura 5. Grupo de expresión de los 60 genes que componen el perfil *BRCAness* visualizado en un *heat map*. Las columnas corresponden a las distintas muestras empleadas y las filas los niveles de expresión génica normalizados. El rojo indica sobreexpresión de genes y el verde indica baja expresión génica con respecto al control.

Este perfil *BRCAness* fue capaz de indicar un curso clínico favorable en 70 pacientes con cáncer de ovario esporádico. El 28% de los pacientes cuyos cánceres exhibían *BRCAness* tuvieron un DFS mayor y un OS mayor. Además, una vez definido el perfil *BRCAness*, se utilizó para distinguir con gran exactitud entre sensibilidad a platino y resistencia en 8 de 10 tumores de ovario. En los dos casos restantes, el perfil *BRCAness* rastreó dinámicamente el desarrollo de resistencia a platino durante el curso de la terapia, es decir, el perfil cambió de *BRCAness* a *No-BRCAness* después del desarrollo de resistencia platino. La emergencia de la resistencia a platino fue asociada a mutaciones adicionales en *BRCA* que revirtieron la función normal del HR en las células cancerosas. Esta observación apoya fuertemente la sensibilidad a platino como predictor del *BRCAness* (Konstantinopoulos et al., 2010)

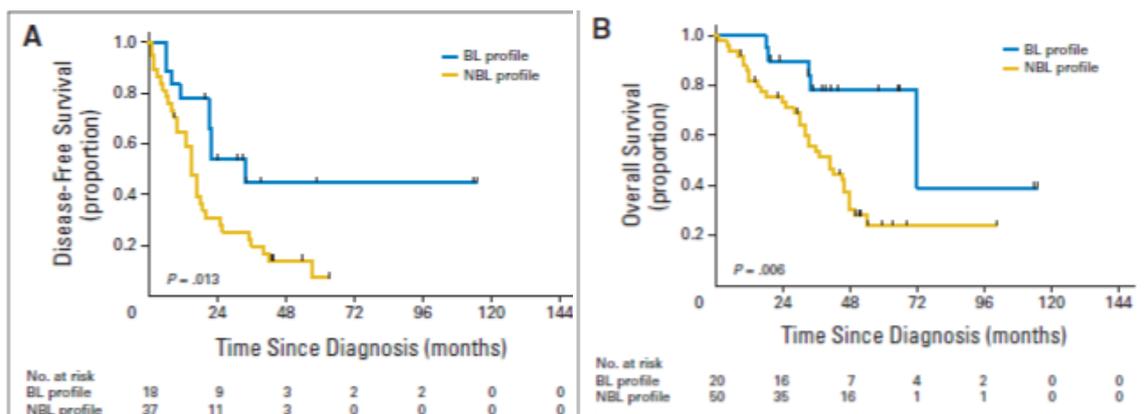


Figura 6. Representación gráfica de la asociación del perfil *BRCAness* con un mayor DFS (A) y un mayor OS (B) en pacientes con cáncer de ovario. (A) El DFS medio para los pacientes *BRCAness* y *No-BRCAness* fue de 34 meses y 15 meses, respectivamente. (B) EL OS medio para los pacientes *BRCAness* y *No-BRCAness* fue de 72 meses y 41 meses, respectivamente. BL: *BRCAness* (Konstantinopoulos et al., 2010).

Finalmente, los autores del estudio lograron correlacionar un fenotipo *BRCAness* con la respuesta a inhibidores de PARP en una línea celular de cáncer de páncreas (Konstantinopoulos et al., 2010). El curso clínico observado apoya la potencial habilidad de la firma de 60 genes *BRCAness* para identificar una población de pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento con inhibidores de PARP.

En otro estudio en el que se evaluó el fármaco niraparib (inhibidor de PARP), en un subgrupo de pacientes con mutaciones germinales en *BRCA1* y/o *BRCA2* y en un subgrupo de tumores esporádicos sin mutaciones en *BRCA1* y/o *BRCA2*, se consiguió relacionar una deficiencia en el HRR (*BRCAness*) con un PFS y un OS mayor tras el tratamiento con dicho agente. De esta forma, el subgrupo de pacientes con mutaciones germinales en *BRCA1/2* experimentó un aumento sustancial del PFS tras la terapia con niraparib (21.0 vs. 5.5 meses); no obstante, resultó aún más notable el descubrimiento de que el subgrupo de pacientes esporádicos sin mutaciones germinales en *BRCA1/2* también experimentó un beneficio significativo en el PFS en comparación con los pacientes que recibieron placebo (9,3 vs 3,9 meses). En este último grupo, el beneficio experimentado en el PFS fue mayor en aquellos pacientes con mutaciones somáticas en *BRCA* u otros defectos en el mecanismo de recombinación homóloga, apuntando la necesidad de utilizar los genes *BRCA* así como otros biomarcadores indicativos de un HRR deficiente en la selección de pacientes para el tratamiento con inhibidores de PARP (Mirza et al., 2016).

En definitiva, adicionalmente a las mutaciones en *BRCA1/2*, el perfil *BRCAness* se ha correlacionado con una mejora en la respuesta a platino y a los iPARP e identifica un subgrupo de pacientes esporádicos con mejor curso clínico dejando ver la importancia pronóstica y terapéutica que tendría la determinación de la característica *BRCAness* en mujeres con cáncer de ovario epitelial a vista de ampliar el número de pacientes que podrán beneficiarse de las terapias con inhibidores de PARP, sin importar el estado de las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*. Así, la identificación de *BRCAness* mediante la determinación del perfil molecular de muestras de tumores ováricos tiene el potencial de dirigir la decisión terapéutica en este tipo de pacientes.

2.OBJETIVO

- El objetivo principal del presente trabajo es identificar y caracterizar la firma molecular *BRCAness* en pacientes con cáncer de ovario utilizando marcadores transcripcionales, la expresión de los cuales está asociada con defectos germinales en los genes *BRCA* así como defectos en otros genes del HRR, a través de la determinación del perfil molecular de muestras de tumores ováricos incluidas en parafina. Para ello se utilizará un panel de secuenciación (Oncology Biomarker Panel) capaz de analizar más de 2500 genes relacionados con el cáncer en base a un ensayo de expresión génica acoplado a NGS. La información obtenida permitirá la caracterización molecular de los tumores de forma individual así como realizar una subclasificación de los mismos permitiendo ofrecer una mejor orientación pronóstica y predictiva de tratamiento a los pacientes analizados, especialmente en aquellos con el fenotipo *BRCAness*.

- En segundo lugar, se tratará de comprobar la validez de la firma *BRCAness* descrita en la bibliografía previamente por Konstatinopoulos et al. en el grupo de pacientes analizados con HTG Edge Seq

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 HTG EDGE SEQ: nueva herramienta para el *profiling* tumoral

Dentro de este panorama se enmarca la tecnología **HTG Edge Seq**, una herramienta con capacidad de superar las dificultades metodológicas de los estudios de expresión y con el potencial de descubrir perfiles tumorales mediante el análisis de muestras de tejido muy reducidas, la consolidación de la plataforma y la optimización de la eficacia de las pruebas para su translación a clínica (HTGMOLECULAR.COM, 2017).

Los tejidos tumorales presentan perfiles anormales cuando son comparados con sus tejidos normales asociados y el *profiling* tumoral es capaz de elucidar de forma rápida las características de un cáncer particular.

Con este propósito se hace uso del Oncology Biomarker Panel de HTG Edge Seq, un sistema que permite el análisis de 2560 biomarcadores asociados con el cáncer para poder identificar dianas terapéuticas y marcadores de respuesta a fármacos en base a un estudio de expresión génica acoplado a NGS. Este sistema puede ser aplicado a múltiples tipos tumorales y permitirá el descubrimiento potencial de perfiles únicos de expresión. En este caso en particular, el sistema se utilizó para llevar a cabo determinaciones del perfil molecular de muestras de tejido tumoral procedentes de pacientes con cáncer de ovario, permitiendo obtener perfiles cuantitativos de expresión y con ello realizar una clasificación molecular de las muestras. Los resultados obtenidos aportarán mejores criterios para la orientación pronóstica y de tratamiento en este tipo de pacientes con agentes que dañan el DNA.

Entre los genes analizados, encontramos importantes componentes de las vías de señalización principalmente conocidas por estar alteradas en muestras de cáncer, incluyendo receptores, ligandos y kinasas. En este sentido, el análisis incluye componentes de las vías *FGFR*, *HER*, *MET*, *IGFR*, *WNT*, *PI3K-AKT*, *EGFR*, *NFkB*, *AMPK* y *JAK-STAT*. Además, se investigó el papel de ciertos componentes implicados en la apoptosis, respuesta inmune, toxicidad, ciclo celular, angiogénesis y reparación del DNA, entre otros (figura 7).

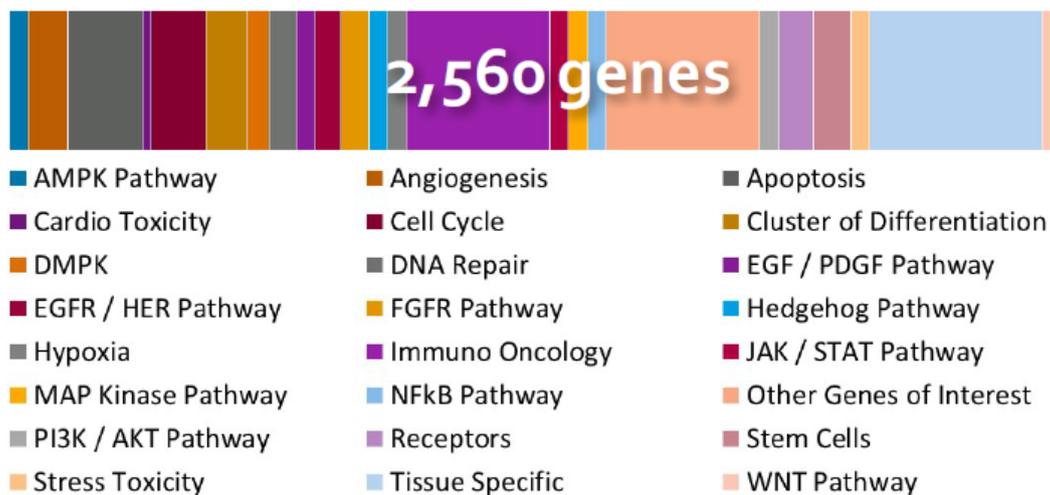


Figura 7. Vías de señalización que guardan relación con el cáncer y que han sido analizadas durante el ensayo de HTG EdgeSeq.

Este tipo de análisis permitirá la detección de alteraciones / desregulaciones en genes implicados en importantes funciones celulares que pueden arrojar información clínica significativa. Además, el análisis por HTG permitirá visualizar dichas alteraciones dentro de una red de vías de señalización y con ello identificar la vía que más está contribuyendo al desarrollo del tumor.

Mediante el uso de HTG Edge Seq, será posible obtener información sobre diferencias a nivel de expresión génica que se relacionen con la supervivencia y curso clínico. Esta información resultará de gran utilidad a la hora de determinar la terapia dirigida más efectiva para un determinado paciente en base a las alteraciones genéticas de su cáncer particular, pues resulta cada vez más aparente que cada tipo de cáncer de ovario puede ser “atacado” de forma dirigida de diferentes formas, lo que explica el amplio espectro de respuestas observado en los diferentes ensayos clínicos. Las terapias personalizadas resultado del análisis de alteraciones específicas de tumores particulares y la evaluación de los tejidos cercanos prometen aumentar los ratios de respuesta y resultar en última instancia en potenciales curas (Dutta and Dutta, 2013).

METODOLOGÍA HTG EDGE SEQ

La química y la metodología de HTG Edge Seq están optimizadas para la automatización del flujo de trabajo en NGS. El protocolo llevado a cabo para el análisis de las muestras fue el

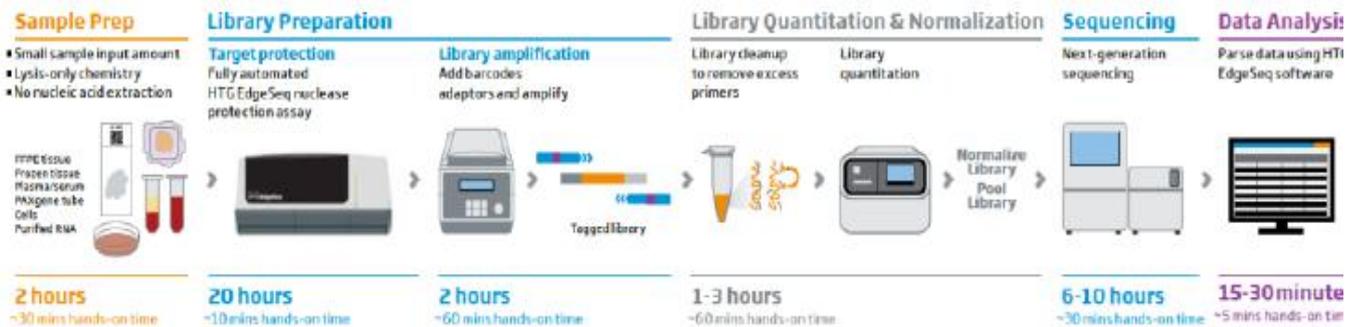


Figura 8. Representación gráfica del flujo de trabajo seguido durante la realización del ensayo HTG EdgeSeq

3.2 Procesado de las muestras

El ensayo basado en HTG es compatible con múltiples tipos de muestras: muestras incluidas en parafina (FFPE), plasma, suero, células y RNA purificado. En nuestro caso, partimos de muestras de tejido ovárico incluidas en parafina (FFPE) procedentes de pacientes con cáncer de ovario, donde el área con mayor presencia de células tumorales ha sido marcada previamente por un patólogo para facilitar el procesado de la muestra.

En este sentido, el sistema HTG Edge Seq constituye un gran cuello de botella para el análisis de expresión haciendo uso de un método de extracción basado en buffers de lisis que permite partir de cantidades de muestra muy limitadas. Solo 5 micrómetros de sección de tejido FFPE son suficientes para el análisis de expresión génica.

Para la preparación de la muestra, se obtuvo el área de interés con ayuda de un bisturí y se midió el área con ayuda de una regla (cm²). Para la extracción de mRNA, en base al área tumoral obtenida se calculó la cantidad de buffer de lisis a emplear en cada caso así como la cantidad de proteinasa K y se dejó incubar con agitación para el lisado de la muestra.

El lisado de la muestra requiere una mínima manipulación de la muestra y requiere aproximadamente de 30 minutos.

3.3 Preparación de las librerías

Una vez obtenidos los lisados de las muestras, conteniendo los mRNA representativos del tumor, se dispensaron en placas de 96 pocillos y se transfirieron al procesador HTG Edge Seq donde tiene lugar de forma automatizada el proceso de protección por nucleasas (qNPA) en la preparación de la librería para la secuenciación y el posterior análisis de expresión.

La tecnología de qNPA se ajusta a un flujo de trabajo de laboratorio del mismo modo que otros métodos de análisis de expresión génica, permitiendo un alto grado de *multiplexing* en especímenes incluidos en parafina (FFPE). En primer lugar y para capturar los transcritos, se añadió un buffer de lisis junto con las sondas complementarias a los RNA diana correspondientes a los 2560 genes a analizar. De esta forma, para atrapar los transcritos expresados, las sondas de protección específicas para los transcritos diana, y que presentan cebadores universales (wings), se unieron a los mRNA contra los que iban dirigidos así como a la sonda Wingman tal y como puede verse en la figura 9 (punto 1).

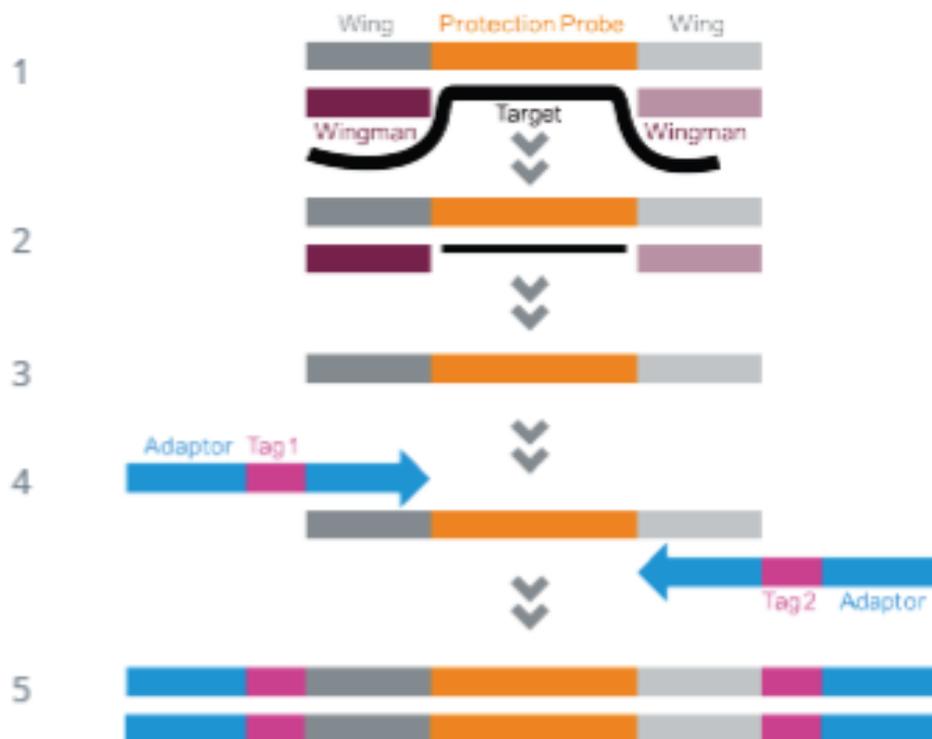


Figura 9: Esquema gráfico del proceso de protección por nucleasas (qNPA)

De esta forma, la sonda, el transcrito y las dos sondas Wingman forman un heterodúplex al unirse. A continuación, se añade la nucleasa S1 cuya función es degradar las sondas que no han hibridado así como el mRNA no hibridado, resultando en un ratio estequiométrico de DNA 1:1 entre las sondas y el RNA diana (punto 2).

En este punto, la reacción se detiene con una solución de parada y calor, la cual destruye a la nucleasa S1 y el RNA hibridado, quedando únicamente las sondas de protección, correspondientes a cada mRNA diana expresado, listas para la unión de adaptadores. Estas sondas, que son representativas del RNA nativo, están diseñadas para protegerse a esta degradación (punto 3).

Mediante una simple reacción de PCR se añaden los adaptadores de secuenciación y los *barcodes* (identificadores) a las sondas presentes y se procede a purificar y cuantificar los productos de PCR los cuales ya estarán listos para la secuenciación. No son necesarios pasos adicionales como ligación, adenilación o transcripción reversa en este proceso.

En este sentido, la realización de una qPCR es crucial para determinar la concentración, la cual es necesaria conocer para secuenciar. Además, previamente a la secuenciación, se realizó una normalización de la librería generada.

3.3 Secuenciación y ensamblaje de datos

El ensayo HTG Edge Seq es compatible con numerosos instrumentos de NGS, incluyendo Illumina MiSeq e Ion Torrent. En nuestro caso, se realizó una secuenciación por Illumina MiSeq del pool de sondas presentes en la librería y que representan a los transcritos expresados por el tejido tumoral ovárico.

El propio laboratorio cuenta con un equipo Illumina MiSeq, por lo que no fue necesario enviar las muestras a otras entidades para llevar a cabo la secuenciación.

Una vez finalizada la secuenciación, los archivos FASTQ se cargaron en el software analizador de datos de HTG EdgeSeq que se incluye con el sistema, el HTG Parser Software. De esta forma, para el análisis de los datos, a partir de los archivos FASTQ y a la hoja de registro de muestras generada por el sistema HTG donde aparecen listadas las secuencias correspondientes a cada gen analizado, el sistema es capaz de generar perfiles cuantitativos de expresión en relativamente poco tiempo y sin necesidad de complejos análisis bioinformáticos.

Los archivos FASTQ son alineados con las secuencias de las sondas gracias a que el software de análisis de HTG EdgeSeq incorpora Bowtie2, una herramienta de alineación de secuencias. De esta forma, se realiza un conteo digital de los transcritos expresados y el resultado final es una tabla donde, para cada paciente, aparece listado el número de transcritos expresados para cada uno de los genes analizados. El HTG parser software es una forma rápida y sencilla de identificar las secuencias de sondas individuales que están dentro de los archivos FASTQ.

3.4 Análisis estadístico y algoritmo de agrupamiento

Una vez obtenidos los valores de expresión de cada uno de los genes analizados, se realizó un análisis estadístico para determinar aquellos genes que se expresan diferencialmente de forma significativa entre los sets de pacientes analizados.

De este modo, se aplicó el test estadístico Deseq2, un test diseñado para su uso en aproximaciones de RNA-seq y con el que es posible determinar diferencias significativas en la expresión génica en base a un modelo que utiliza una distribución negativa binomial. El Deseq2 constituye un método para el análisis diferencial de los transcritos expresados que utiliza una precisa estimación de la dispersión y los *fold changes* para aumentar la estabilidad y la interpretabilidad de la gran cantidad de datos procedentes de esta clase de estudios. En este caso, el test se aplicó para investigar las diferencias en la expresión de los pacientes en base a la patogénesis de la mutación en *BRCA* y en base al fenotipo *BRCAness*, es decir:

- Pacientes *BRCA* mutados patogénicos frente a pacientes VED + casos no informativos
- Pacientes *BRCAness* frente a *No-BRCAness*

Los genes diferencialmente expresados entre pacientes *BRCA* patogénicos frente a no patogénicos y pacientes *BRCAness* frente a *No-BRCAness*, con su correspondiente *p-value* y *p-value* corregido, se muestran en la parte de Resultados (Tabla 4 y Tabla 5).

Adicionalmente, se aplicó un algoritmo de agrupamiento jerárquico estándar a los datos de expresión de los 36 pacientes analizados con el objetivo de buscar patrones de expresión génica compartidos que permitan subclasificar a los pacientes y puedan correlacionarse con factores pronósticos como la sensibilidad a platino así como a inhibidores de PARP. La visualización de los agrupamientos puede observarse en la parte de Resultados a modo de *heat map*. (Figura 10 y Figura 12). También se aplicó el algoritmo de agrupamiento para tratar de validar la firma molecular *BRCAness* descrita por Konstantinopoulos et al. Para ello, se aplicó el algoritmo teniendo en cuenta la expresión de los 26 de los 61 genes del modelo de Konstantinopoulos et al. que están incluidos en el Oncology Biomarker Panel. El *heat map* correspondiente a este agrupamiento se muestra en la parte de Resultados (Figura 14).

Por último, se realizó un análisis de componentes principales multidimensional (MPCA) para ambos sets de pacientes. En el caso del set de *BRCA* patogénicos frente a no patogénicos (VED + no informativos), el MPCA permitirá ver una separación espacial de los pacientes en el espacio en base a los patrones de expresión y permitirá visualizar gráficamente si el paciente presenta mutación en *BRCA* y si la presenta, si es patogénica o no.

Por otro lado, también se realizó un análisis de componentes principales multidimensional (MPCA) en el caso del set de pacientes *BRCAness* frente a *No-BRCAness*. En este caso, el MPCA permitirá ver una separación espacial de los casos en base a los patrones de expresión y además permitirá visualizar gráficamente si el paciente presenta mutación o no en *BRCA* y si presenta el fenotipo *BRCAness* o *No-BRCAness*. También se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) en este set de pacientes. En este caso, el PCA permitirá ver la separación espacial de los pacientes en base a los patrones de expresión compartidos y diferenciales únicamente.

Las visualizaciones de los MPCA y los PCA se muestran en la parte de Resultados (Figura 11 y Figura 13).

4. RESULTADOS

4.1 Historial clínico de los pacientes analizados y estado de los genes *BRCA1/2*

A continuación en la Tabla 3, se muestra un listado de los 36 pacientes analizados en el ensayo con HTG Edge Seq.

Tabla 3. Lista de los 36 pacientes analizados junto a una serie de datos del historial clínico que incluyen: el estado de las mutaciones en *BRCA1* y/o *BRCA2*, el fenotipo *BRCAness* o *No-BRCAness*, el desarrollo de recaída (*) o no y el intervalo libre de platino (ILP).

Muestra	Mutación BRCA	BRCAness	ILP 1 ^a Recaída
CO27	BRCA2 c.7435+1G>A 14% NP	BRCAness	189
OBP8	No informativo. Low Coverage ex17 de BRCA2 960 lecturas	BRCAness	168
CO14-rep	BRCA1 c.68_69delAG p.Glu23Valfs*17	BRCAness	95
CO10-rep	BRCA2 c.3264dupT p.Gln1089Serfs*10	BRCAness	72
CO34	Grandes reordenamientos BRCA1 exones8-13	BRCAness	64
CO17*	No informativo	No BRCAness	52
CO22	BRCA1 c.81-14C>T 11.27% VED	BRCAness	51
CO28	No informativo	BRCAness	44
CO21	BRCA2 c.2808_2811delACAA p.Ala938Profs*21	No BRCAness	42
CO32	No informativo. Low coverage revisado con igv	BRCAness	41
CO16-rep	BRCA2 c.6024dupG p.Gln2009Alafs*9	BRCAness	36
CO23*	No informativo. Patogénica BRCA2 con VF 1%	BRCAness	36
C11-rep*	BRCA1 c.213-12A>G	BRCAness	34
CO13-rep*	BRCA1 c.4287C>A p.Tyr1429*	BRCAness	33
CO26*	BRCA1:c.3770_3771delAG p.Glu1257Glyfs	BRCAness	33
CO29*	No informativo	No BRCAness	20
CO15-rep*	BRCA1 c.68_69delAG p.Glu23Valfs*17	BRCAness	20
CO25*	BRCA2 c.7976 + 1G>A 40% pero Low Coverage	BRCAness	18
CO35*	BRCA1 c.5434C>G p.Pro1812Ala VED	BRCAness	18
CO18*	BRCA2 c.2246_2261delGTGATACTGACTTTCA p.Ser749Asnfs*18	BRCAness	17
CO19	No informativo. Low coverage revisado con igv	No BRCAness	16
CO9-rep*	BRCA1:c.5095C>T (p.Arg1699Trp)	BRCAness	15
CO30*	No informativo	No BRCAness	14
OBP3*	No informativo. Patogénica BRCA1 con VF 2% y BRCA2 con un 1%	No BRCAness	14
OBP2*	No informativo	BRCAness	13
CO24	No informativo. Mutación patogénica BRCA1 pero con VF del 1.13%	No BRCAness	12
OBP1*	No informativo	No BRCAness	12
OBP4*	No informativo	No BRCAness	11
OBP5*	BRCA2 c.7060C>T p.Gln2354* 24% pero Low Coverage P	No BRCAness	11
CO33*	BRCA1 c.3481_3491del11 p.Glu1161Phefs* y en BRCA2 c.3264dupT p.Gln1089Serfs*10 2P	BRCAness	11
OBP6*	No informativo. Patogénica BRCA1 con VF 1%	No BRCAness	9
CO36*	No informativo	No BRCAness	8
CO12-rep*	BRCA1 c.4307_4308delCT p.Ser1436Phefs*4 P	BRCAness	8
CO20*	BRCA2 c.5576_5579delTTAA p.Ile1859Lysfs*3 P	BRCAness	8
CO31	BRCA1 c.1961delA p.Lys654Serfs*47 P	BRCAness	7
OBP7*	No informativo	No BRCAness	2

Como es posible observar, se analizaron dos grupos de pacientes con cáncer de ovario distintos; por un lado un subgrupo de pacientes con mutaciones reportadas en *BRCA* (n = 20) , dentro de los cuales encontramos pacientes con mutación patogénica y otros no patogénicos, y por otro lado un subgrupo de pacientes con un fenotipo para *BRCA* desconocido o negativo (n=16).

El intervalo libre de platino (ILP) se define como el tiempo transcurrido desde el último día de administración de platino hasta la recaída. Entre los términos utilizados, se incluyen: No informativo (estado de genes *BRCA* desconocido o negativo), VED (variante efecto desconocido), *BRCAness* (deficiencias en el HRR que confieren susceptibilidad a platino), VF (frecuencia de la variante) y NP (no patogénica).

Todos los tumores analizados pertenecen al subtipo histológico seroso de cáncer de ovario.

La característica *BRCAness* se determinó en base a la respuesta a platino de los pacientes, es decir, aquellos con una respuesta significativa a la terapia con platino antes de los 6 meses se consideraron tumores *BRCAness* mientras que aquellos sin respuesta significativa antes de los 6 meses tras la administración de la terapia con platino fueron considerados tumores con fenotipo *No-BRCAness*.

4.2 Análisis de pacientes con mutaciones *BRCA* patogénicas frente a VED + casos no informativos

Con los valores de expresión para cada uno de los genes analizados de los 36 pacientes, se procedió a enfrentar los datos de expresión correspondientes a los pacientes con mutaciones en *BRCA* patogénicas contra los datos de expresión de los pacientes con mutaciones VED en *BRCA* junto a los casos no informativos.

Para facilitar la posterior interpretación de resultados, sólo se tuvieron en cuenta los 35 genes que mayor expresión diferencial presentaban entre los pacientes analizados. La visualización de la información obtenida tras aplicar un algoritmo de agrupamiento jerárquico se muestra a continuación a través de un *heat map* (ver figura 10).

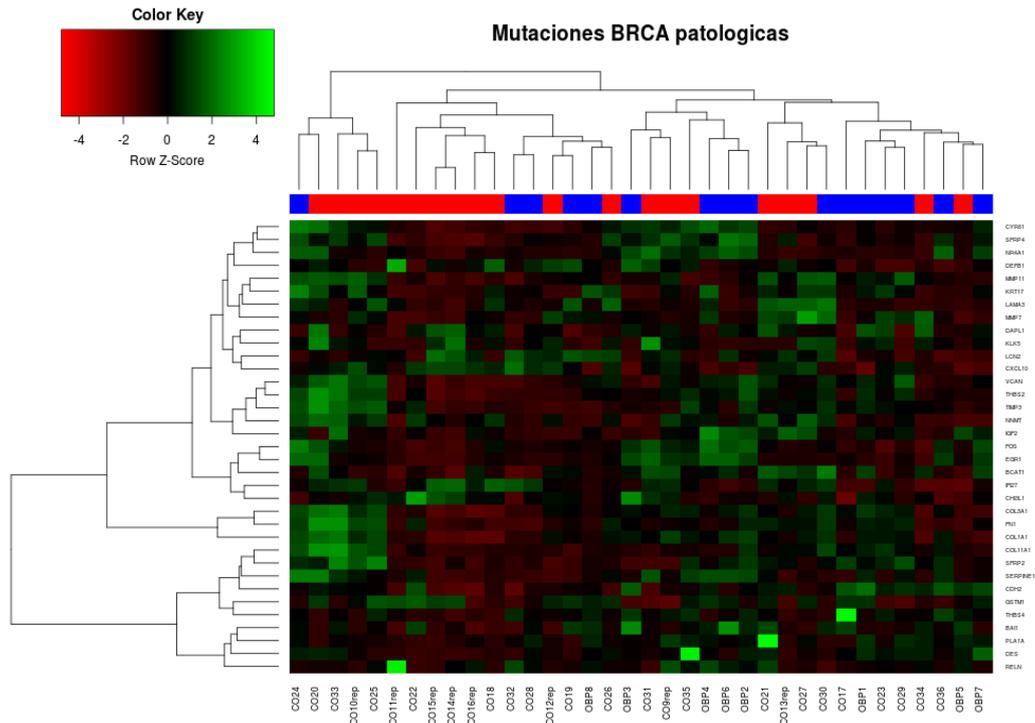


Figura 10: Heat map que refleja los datos de expresión de pacientes con mutaciones patogénicas en *BRCA1/2* frente a pacientes con VED y casos no informativos (no patogénicos). Las mutaciones en *BRCA* aparecen en rojo. Las columnas corresponden a cada una de las muestras analizadas y las filas corresponden al nivel de expresión normalizado de cada gen analizado. El rojo indica sobreexpresión mientras que el verde indica menor expresión génica. El algoritmo ha logrado agrupar un 55% de pacientes *BRCA* patogénicos (11/20) y un 50 % de los casos VED + no informativos (8/16) en base a los patrones de expresión génica obtenidos.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de componentes principales multidimensional (MPCA) entre pacientes con mutaciones *BRCA* patogénicas frente a casos VED + no informativos. El resultado del MPCA se muestra a continuación en la figura 11.

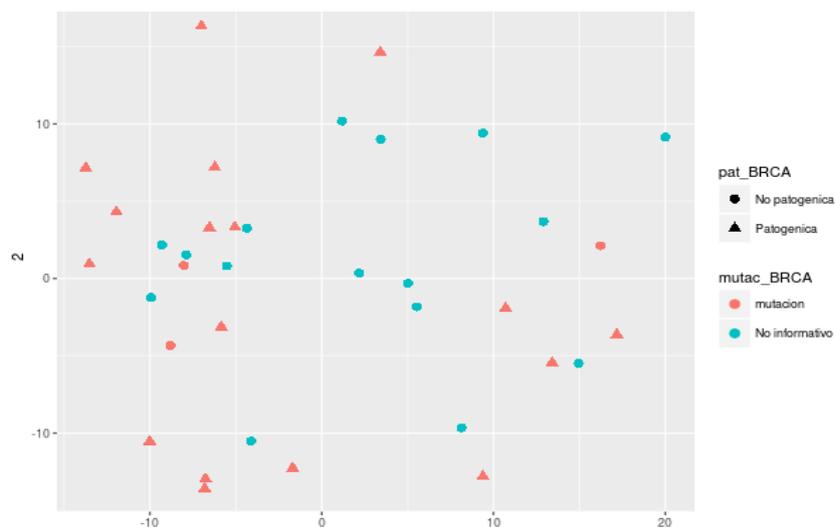


Figura 11. Análisis de componentes principales multidimensional (MPCA) realizado entre el grupo de pacientes con mutaciones patogénicas en *BRCA1/2* frente a pacientes con VED y casos no informativos (no patogénicos).

En este sentido, aquellos genes que destacan por expresarse diferencialmente de forma significativa entre ambos grupos se recogen a continuación en la Tabla 4:

Tabla 4: Lista de los genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes con mutaciones patogénicas en *BRCA1/2* frente a pacientes con VED y casos no informativos.

Patogénica vs No patogénica						
	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
TSC22D1	314,4639	-0,8974	0,2137	-4,1995	2,67E-05	0,0684
CXCL3	340,2413	-0,9161	0,2341	-3,9129	9,12E-05	0,0778
DUSP5	684,5030	-0,9229	0,2403	-3,8401	0,000123	0,0787
LIF	454,2215	-0,9496	0,2385	-3,9817	6,84E-05	0,0778

El valor de *p-value* corregido (columna “padj”) debe ser inferior a 0,1 para que el gen se considere diferencialmente expresado. Así mismo, un valor de *log2Fold Change* negativo indica una mayor expresión de dicho gen en el grupo no patogénico.

4.3 Análisis de pacientes *BRCAness* frente a *No-BRCAness*

Análogamente al proceso seguido previamente, en este caso se enfrentaron los datos de expresión de los pacientes *BRCAness* contra los de pacientes *No-BRCAness*. El *heat map* correspondiente a dichos datos se muestra a continuación en la figura 12.

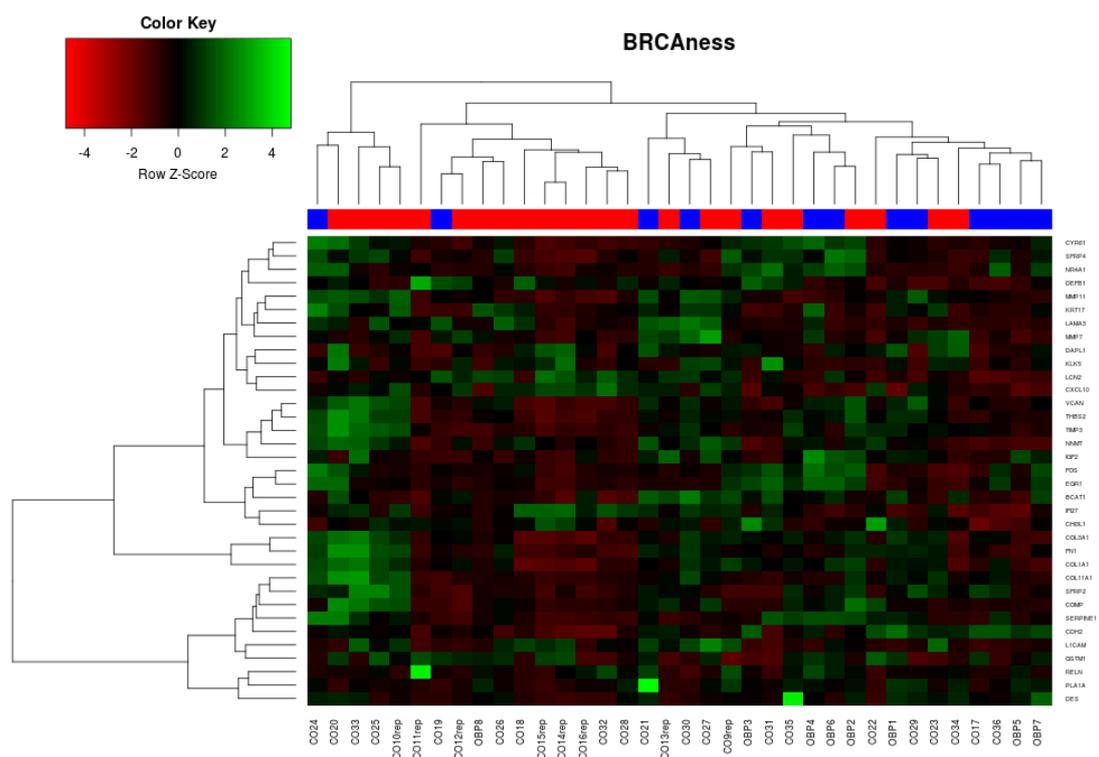


Figura 12. *Heat map* que muestra los datos de expresión de los pacientes considerados *BRCAness* frente a pacientes considerados *No-BRCAness*. El rojo indica pacientes considerados *BRCAness*. Las columnas corresponden a cada una de las muestras analizadas y las filas corresponden al nivel de expresión normalizado de cada gen analizado. El rojo en los valores de expresión indica sobreexpresión mientras que el verde indica menor expresión génica. El algoritmo ha sido capaz de agrupar un 60% de los casos considerados *BRCAness* (14/23) y un 61% de los casos *No-BRCAness* (8/13).

Por otro lado, el análisis de componentes principales multidimensional (MPCA) también se llevó a cabo entre el grupo de pacientes *BRCAness* y el grupo *No-BRCAness*. El resultado obtenido se muestra a continuación en la figura 13.

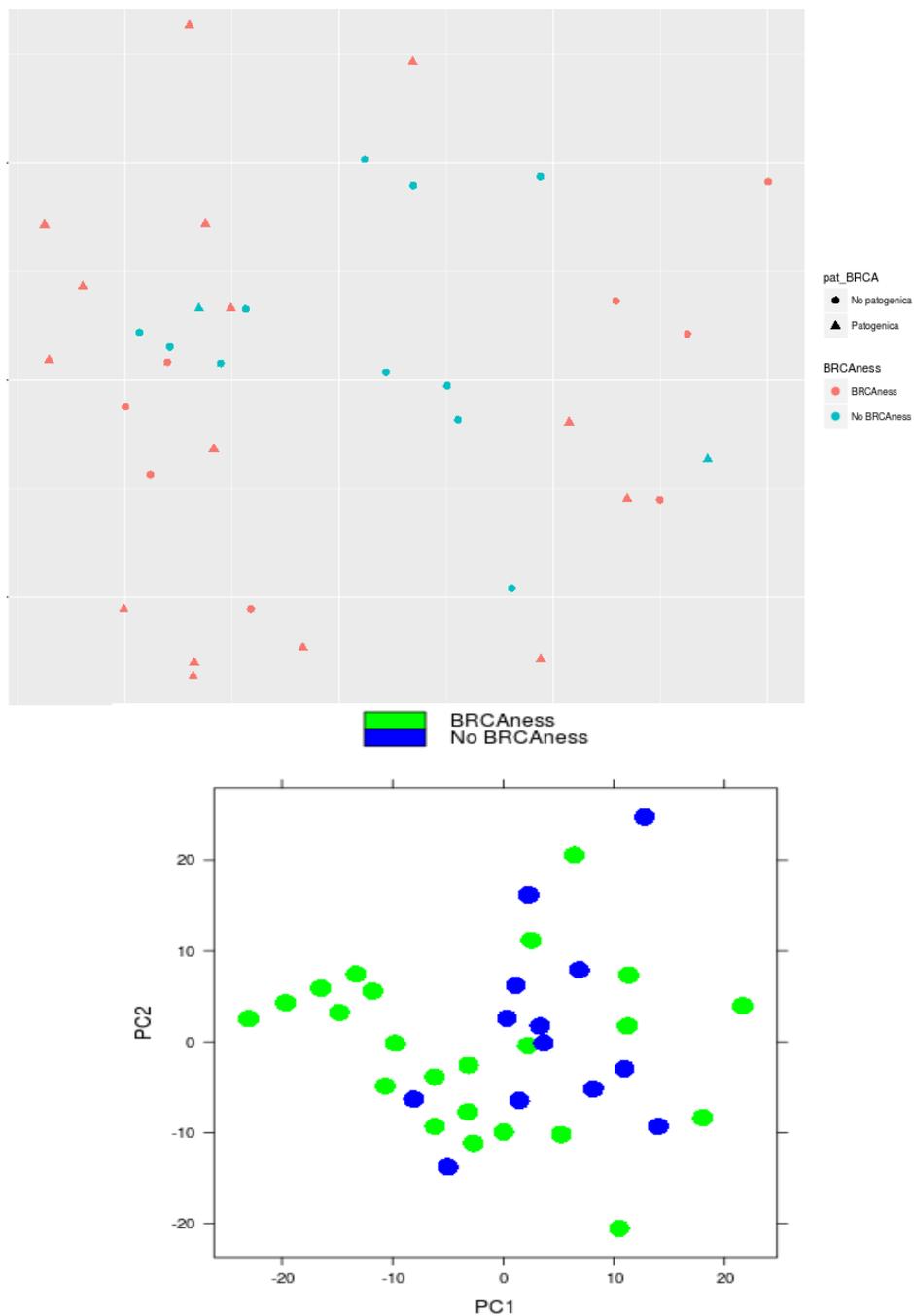


Figura 13. Análisis de componentes principales multidimensional realizado entre pacientes considerados *BRCAness* frente a pacientes considerados *No-BRCAness* (A). Análisis de componentes principales entre pacientes considerados *BRCAness* frente a pacientes considerados *No-BRCAness* (B).

Así mismo, los genes que se caracterizan por estar diferencialmente expresados de forma significativa entre estos dos grupos se recogen en la Tabla 5 que se muestra a continuación:

Tabla 5. Lista de genes diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes *BRCAness* frente al grupo de pacientes *No-BRCAness*.

No BRCAness vs BRCAness						
	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
BAI1	180,4220	1,3175	0,2809	4,6901316	2,73E-06	0,0019
DUSP5	684,5030	1,2596	0,2551	4,9376761	7,906E-07	0,0008
TSC22D1	314,4639	1,1564	0,2172	5,3229081	1,021E-07	0,0002
CDH2	796,7775	1,0982	0,2788	3,9386796	8,193E-05	0,0180
SIX1	466,3146	0,9937	0,2768	3,5898609	0,0003309	0,0459
DACH1	1002,8792	0,9597	0,2742	3,5007644	0,0004639	0,0494
TRIB1	810,9759	0,9405	0,2204	4,2668212	1,983E-05	0,0102
HNF1B	198,2118	0,9389	0,2704	3,4723717	0,0005159	0,0494
ZIC2	150,6756	0,9387	0,2708	3,466831	0,0005266	0,0494
SPRY2	930,4939	0,8526	0,2418	3,526149	0,0004216	0,0483
COL18A1	2791,5230	0,7857	0,2402	3,2716205	0,0010693	0,0817
FLNC	657,1501	0,7830	0,2473	3,1666108	0,0015423	0,0964
ITGA7	553,9182	0,7704	0,2305	3,3429337	0,000829	0,0713
SLCO2A1	202,2613	0,7492	0,2146	3,4905371	0,0004821	0,0494
CIC	1408,1132	0,6646	0,2065	3,2184039	0,0012891	0,0886
CREB5	193,4510	0,6207	0,1876	3,3088388	0,0009368	0,0773
KLF12	311,6937	0,5989	0,1850	3,236948	0,0012082	0,0886
JMJD1C	1223,1399	0,5714	0,1434	3,9844283	6,764E-05	0,0177
MNAT1	986,5863	0,5569	0,1769	3,1485607	0,0016408	0,0992
PIK3C3	640,4317	0,4843	0,1516	3,1946595	0,0014	0,0926
JAK2	512,8681	-0,4999	0,1592	-3,141097	0,0016832	0,0992
PPARGC3	571,7105	-0,6749	0,2095	-3,221421	0,0012756	0,0886
DHX58	370,1385	-0,7436	0,2105	-3,53241	0,0004118	0,0483
LTF	213,4886	-0,8008	0,2441	-3,280656	0,0010357	0,0817
MYCL	220,8291	-0,8352	0,2483	-3,362858	0,0007714	0,0692
LTB	214,0544	-0,8742	0,2437	-3,587828	0,0003334	0,0459
OASL	301,5820	-0,8848	0,2310	-3,830239	0,000128	0,0220
COMP	559,4044	-0,9033	0,2834	-3,187158	0,0014368	0,0926
DDX58	1103,5298	-0,9385	0,2274	-4,127939	3,66E-05	0,0143
OAS1	574,2157	-0,9619	0,2417	-3,980321	6,882E-05	0,0177
IFI27	4709,7883	-0,9816	0,2772	-3,541152	0,0003984	0,0483
ISG15	3321,3690	-0,9917	0,2649	-3,743167	0,0001817	0,0288
VTCN1	2144,3468	-1,0450	0,2716	-3,84791	0,0001191	0,0220
MX1	2249,6774	-1,0793	0,2634	-4,09796	4,168E-05	0,0143
CXCL10	1257,8469	-1,1145	0,2840	-3,924156	8,703E-05	0,0180

Igual que en el caso anterior, el valor de *p-value* corregido debe ser inferior a 0,1 para que el gen se considere diferencialmente expresado. Así mismo, un valor de *log2Fold Change* negativo indica una mayor expresión de dicho gen en el grupo *BRCAness*.

4.4 Validación firma *BRCAness* de Konstantinopoulos et al

Finalmente, se trató de validar la firma *BRCAness* de 61 genes definida por Konstantinopoulos et al. en el set de pacientes estudiados con HTG EdgeSeq. De estos 61 genes descritos, sólo 26 estaban presentes en el kit del Oncology Biomarker Pannel, por lo que dicha validación no fue del todo completa. Los resultados del análisis se recogen en el *heat map* que se muestra a continuación en la figura 14.

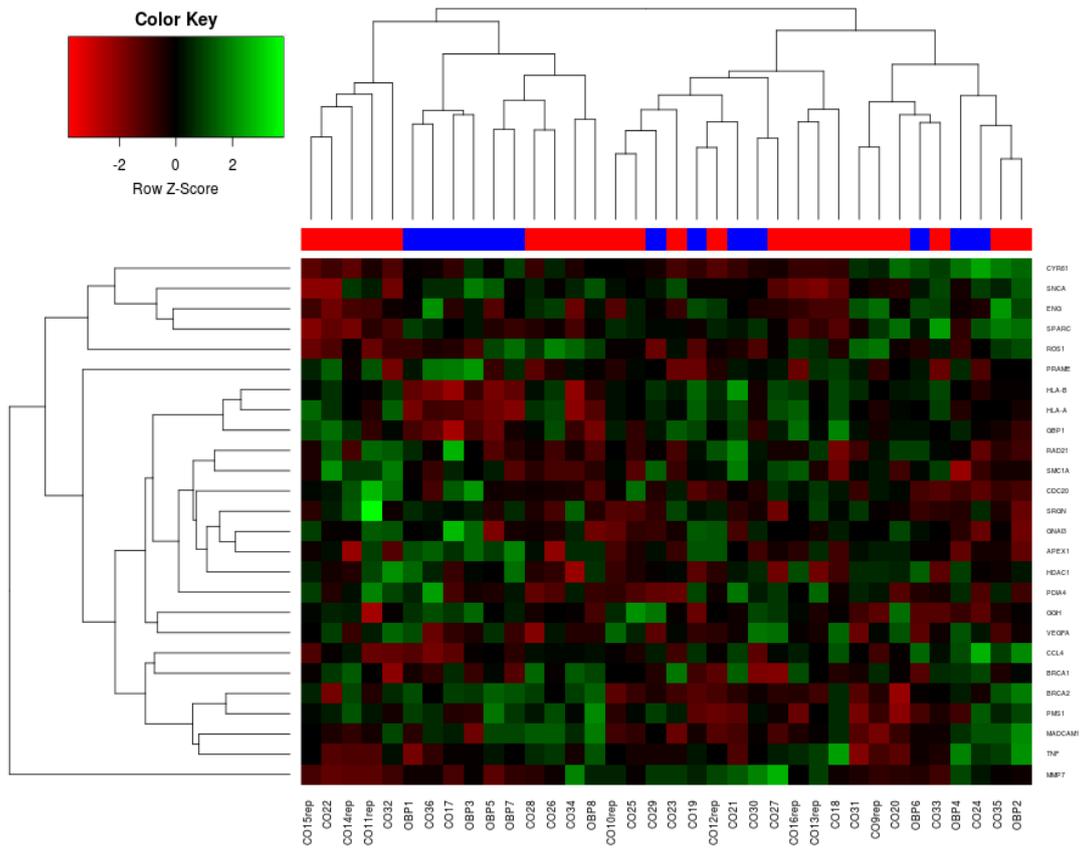


Figura 14. Heat map resultado de aplicar el patrón de expresión *BRCAness* definido por Konstantinopoulos et al. (en este caso sólo 26 genes han sido incluidos) al grupo de pacientes analizados con HTG EdgeSeq. El rojo indica pacientes considerados *BRCAness*. Las columnas corresponden a cada una de las muestras analizadas y las filas corresponden al nivel de expresión normalizado de cada gen analizado. El rojo indica sobreexpresión mientras que el verde indica una menor expresión génica (Konstantinopoulos et al., 2010).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Gracias a la labor de investigación llevada a cabo por grandes instituciones como “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) y colaboradoras, actualmente nuestro conocimiento a nivel molecular sobre el cáncer de ovario ha permitido mejorar en gran medida la comprensión de la biología subyacente a esta enfermedad tan compleja y heterogénea. La información genómica publicada por este tipo de instituciones y entidades ha permitido a la comunidad científica avanzar en el entendimiento de esta patología dejando paso a nuevos y más efectivos métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer.

A pesar de ello, el cáncer de ovario continúa siendo la principal causa de muerte ginecológica en países desarrollados tal y como reflejan los altos ratios de mortalidad registrados, apuntando a la falta de tratamientos efectivos en este tipo de pacientes y dejando ver la necesidad de desarrollar nuevas terapias terapéuticas que aumenten los ratios de supervivencia.

En este sentido, la promesa de los inhibidores de PARP para el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario caracterizado por mutaciones germinales en *BRCA1/2* ha aumentado considerablemente en los últimos años, tal y como reflejan numerosos ensayos clínicos. Estos iPARPs han sido evaluados en este tipo de pacientes con resultados muy prometedores como agentes de tratamiento único (Fong et al., 2009). Adicionalmente a estos pacientes con mutaciones en *BRCA1/2* germinales, se ha sugerido que la inhibición de PARP puede resultar una estrategia terapéutica de gran utilidad en el tratamiento de pacientes con cáncer esporádico que presentan un fenotipo *BRCAness*, caracterizado por defectos en el mecanismo de recombinación homóloga (Konstantinopoulos et al., 2010).

Por tanto, y a pesar de que se necesitan claramente nuevos estudios adicionales, la identificación de un perfil de expresión génica que se correlacione con el *BRCAness* puede hacer posible la administración de iPARPs a un número mucho mayor de pacientes con cáncer de ovario epitelial, independientemente del estado de las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, resultando en un aumento potencial de los ratios de supervivencia.

Dada la importancia de lo expuesto anteriormente a nivel clínico, en este trabajo se ha abordado el concepto de *BRCAness* mediante la identificación de un perfil de expresión génica tumoral que ha logrado asociarse con la respuesta a platino así como a inhibidores de PARP. Esta aproximación se ha basado en el uso de la nueva tecnología genómica HTG Edge Seq, una herramienta con el potencial de determinar el perfil molecular de tumores mediante el análisis de muestras de tejido muy reducidas y con la capacidad ser trasladado al ámbito clínico de forma efectiva y sin dificultades

De esta forma, la determinación del perfil molecular de muestras de tumores con cáncer de ovario se ha aplicado a un set de 36 casos con el objetivo de determinar diferencias significativas en la expresión génica de pacientes con mutaciones en *BRCA* patogénicas frente a pacientes no patogénicos (VED y casos no informativos) así como a pacientes *BRCAness* frente a *No-BRCAness*.

En el *heat map* resultado de enfrentar los datos de expresión de los pacientes *BRCA* patogénicos contra los datos de expresión de los pacientes VED y no informativos (**figura 10**), se observa una mayor concentración de casos *BRCA* patogénicos en la zona izquierda de la figura así como una mayor concentración de casos VED + no informativo en la zona derecha de la figura. Pese a que el agrupamiento no es exacto totalmente, el algoritmo ha logrado agrupar un 55% de pacientes *BRCA* patogénicos (11/20) y un 50 % de los casos VED + no informativos (8/16) en base a los patrones de expresión génica obtenidos. De esta forma, se observa como los pacientes con mutaciones patogénicas en los genes *BRCA* presentan un patrón de expresión génica diferente en comparación con los casos no patogénicos, lo cual se correlaciona con una mayor susceptibilidad al tratamiento con agentes como iPARPs.

Además, en el análisis de componentes principales multidimensional (**figura 11**), a pesar de no haber una separación espacial completa, es posible observar una tendencia a la agrupación de los casos *BRCA* patogénicos en la zona izquierda del gráfico (Δ). Entre los genes responsables de dicha separación encontramos a *TSC22D1*, *CXCL3*, *DUSP5* y *LIF*.

Por otro lado, en el *heat map* correspondiente a los pacientes *BRCAness* frente a *No-BRCAness* (**figura 12**), es posible observar una mayor concentración de casos *BRCAness* en la zona izquierda de la figura mientras que en la zona derecha se concentran los casos *No-BRCAness*. Igual que en el caso anterior, el agrupamiento no resulta ser exacto totalmente ya que están influyendo otra serie de factores.

No obstante, a pesar de ello, el algoritmo ha sido capaz de agrupar un 60% de los casos considerados *BRCAness* (14/23) y un 61% de los casos *No-BRCAness* (8/13). Así mismo, en la **figura 13** correspondiente al MPCA y PCA realizado entre el grupo de pacientes *BRCAness* y *No-BRCAness*, es posible observar una separación espacial razonablemente significativa entre ambos grupos analizados, pese a que no llega a ser del todo completa.

Los genes diferencialmente expresados entre ambos grupos incluyen *BAIL*, *DUSP5*, *TSC22D1* y *CDH2* entre otros. Estos genes se caracterizan por estar infraexpresados en el grupo *BRCAness*. En la bibliografía, estos genes destacan por interactuar con *TP53*, el cual estaba alterado en el 96 % de los casos de cáncer de ovario seroso de alto grado. De esta forma, tanto la expresión de *BAIL* como de *DUSP5* se ve inducida por este gen supresor de tumores (Sunamura et al., 2000) (Ueda, Arakawa and Nakamura, 2003), *TSC22D1* constituye un regulador positivo de *TP53* (Yoon et al., 2012) y *CDH2* presenta un importante papel en la supresión tumoral cuando hay una expresión mutante de *TP53* (Alaee, Danesh and Pasdar, 2016). Dentro de los genes regulados por *TP53* también se incluye *LIF*, un gen caracterizado por estar diferencialmente expresado en el caso anterior entre el grupo *BRCA* patogénico frente a *BRCA* no patogénico (Yu et al., 2014). En este sentido, se sabe que *TP53* presenta importantes funciones en el mecanismo de reparación homóloga del DNA (HRR) así como en la reparación por recombinación no homóloga (NHEJ) por lo que alteraciones en *TP53* podrían provocar un fenotipo HRR deficiente que se refleja en una menor expresión de los genes mencionados anteriormente (Menon and Povirk, 2014).

Estos pacientes clasificados como *BRCAness* son los que **con mayor probabilidad serán sensibles y podrían verse beneficiados de las nuevas terapias dirigidas con inhibidores de PARP** así como otros agentes que dañan el DNA, pues están caracterizados por presentar algún tipo de defecto o alteración en el mecanismo de reparación homóloga del DNA.

Por otro lado, en contraste con los genes menos expresados, aquellos genes que destacan por estar sobreexpresados en los pacientes *BRCAness* incluyen: *CXCL10*, *MX1* y *VTCN1* entre otros. Estos genes destacan por presentar un importante papel en la respuesta inmune mediada por células inmunológicas como los linfocitos T y linfocitos *helper*. En este sentido, en la bibliografía se ha demostrado que aquellas células con una alta tasa de lesiones debido a un fenotipo hipermutador, como por ejemplo el que provoca un HRR deficiente, albergan más neoantígenos específicos del tumor y estimulan el reclutamiento de un elevado número de linfocitos infiltrantes de tumores (Strickland et al., 2016). Dado que los cánceres de ovario seroso de alto grado mutados en *BRCA1/2* así como en otros genes del HRR exhiben una carga mutacional alta caracterizada por un número elevado de inserciones/deleciones mayores de hasta 50 pb, se ha hipotetizado que también pueden albergar más neoantígenos específicos del tumor y por lo tanto, exhiben una mayor expresión de determinados genes inmunológicos, lo que concuerda con los resultados observados. Luego, una mayor expresión de genes inmunitarios en pacientes con cáncer de ovario podría ser indicativo de un mecanismo de recombinación homóloga alterado o deficiente (**indicativo de *BRCAness***)

Dado el auge que está experimentando la lucha contra el cáncer por la vía inmunogénica, la evaluación de estos marcadores podría tener importantes implicaciones en el descubrimiento de dianas moleculares útiles en la inmunoterapia contra el cáncer de ovario, dejando paso a nuevas y potenciales terapias experimentales.

Por último, cabe destacar que, a similitud con otros estudios previos como el de Konstantinopoulos et al., en el que identificaron una firma característica del fenotipo *BRCAness* en base a datos de expresión génica con utilidad para identificar a los pacientes con HRR defectivo sensibles a iPARPs (Konstantinopoulos et al., 2010), el ensayo con HTG y la aplicación del algoritmo de agrupamiento ha logrado el mismo objetivo pero con resultados diferentes.

De hecho, como se puede observar en la **figura 14**, la firma de Konstantinopoulos et al., no ha resultado de utilidad para clasificar en un grupo *BRCAness* y otro grupo *No-BRCAness* a los 36 pacientes analizados con HTG EdgeSeq. Probablemente sea debido a que únicamente se tuvieron en cuenta 26 de los 61 genes que componen la firma *BRCAness* de Konstantinopoulos et al. Además, hay que destacar que la metodología empleada por Konstantinopoulos et al se basó en el uso de un array de expresión mientras que el abordaje con HTG EdgeSeq se asemeja más a una aproximación de RNA-seq. Por ello, las diferencias técnicas también constituyen un factor adicional que explica la poca validez de la firma *BRCAness* definida por Konstantinopoulos et al. en el set de pacientes estudiados en el presente trabajo.

La conclusión principal de este trabajo es que el ensayo **HTG EdgeSeq constituye un sistema con gran potencial para la determinación del perfil molecular de muestras de tumores ováricos** incluidas en parafina (FFPE). La información obtenida ha permitido la subclasificación de pequeños grupos discretos de pacientes en base a patrones transcriptómicos que han logrado correlacionarse en mayor o menor medida con el perfil *BRCAness*, es decir, con un fenotipo caracterizado por deficiencias en el HRR. A su vez, este perfil *BRCAness*, ya sea por mutaciones germinales en *BRCA1/2* o por alteraciones en otros genes del HRR, se ha asociado con un mejor curso clínico así como a una mayor susceptibilidad a agentes que dañan el DNA como inhibidores de PARP, señalando la **gran utilidad de esta clase de estudios en la orientación pronóstica y predictiva de tratamiento de mujeres con cáncer de ovario epitelial**.

En última instancia, la determinación del perfil molecular de muestras de cáncer de ovario permitirá agrupar a los pacientes según patrones de expresión compartidos, por lo que será posible descubrir nuevos patrones discriminatorios que separen a los pacientes en base a la biología subyacente a su enfermedad y posibilitando el descubrimiento de nuevos biomarcadores asociados con el cáncer de ovario.

6. CONCLUSIONES

- HTG Edge Seq ha demostrado poseer un gran potencial en el ámbito clínico a la hora de determinar perfiles cuantitativos de expresión génica a partir del análisis de muestras de tejido muy reducidas (5 micrómetros). Los resultados demuestran que este sistema puede ser extrapolable a otros tipos de cáncer facilitando el entendimiento de la patogénesis subyacente a cada uno de ellos.
- El uso de esta tecnología ha demostrado la existencia de diferencias en la expresión génica entre pacientes que poseen mutaciones patogénicas en los genes *BRCA1/2* en comparación con pacientes sin mutación patogénica
- Además, se han logrado identificar tendencias en la expresión génica representativas de un fenotipo deficiente en el mecanismo de recombinación homóloga en pacientes con cáncer de ovario epitelial (*BRCAness*). Este fenotipo *BRCAness*, el cual se ha caracterizado por una menor expresión de genes relacionados con *TP53* así como una sobreexpresión de genes relacionados con la respuesta inmune como *CXCL10*, se ha logrado asociar a una mejor respuesta a platino así como a inhibidores de PARP.
- La información obtenida por esta clase de estudios, permitirá aumentar el número de pacientes que puedan beneficiarse de las nuevas terapias personalizadas con iPARPs resultando en un aumento de los ratios de supervivencia en mujeres con cáncer de ovario epitelial, especialmente aquellas con el subtipo histológico seroso. Además, permitirá una mejor predicción del curso clínico así como respuesta a quimioterapia en pacientes no tratados o que presenten recurrencia.

7. REFERENCIAS

AECC.(2017). *Cáncer de ovario*. [online] Available at: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdeovario/Paginas/cancerdeovario.aspx> [Accessed 22 Apr. 2017

AGARWAL, R. (2005). Prognostic factors in ovarian cancer: how close are we to a complete picture?. *Annals of Oncology*, 16(1), pp.4-6.

ALAEI, M., DANESH, G. AND PASDAR, M. (2016). Plakoglobin Reduces the in vitro Growth, Migration and Invasion of Ovarian Cancer Cells Expressing N-Cadherin and Mutant p53. *PLOS ONE*, 11(5), p.e0154323.

AUNOBLE, B., SANCHES, R., DIDIER, E. AND BIGNON, Y. (2000). Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *International Journal of Oncology*.

BELL, D. et al. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), pp.609-615.

CANCER.ORG. (2017). *Cáncer de ovario*. [online] Available at: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario.html> [Accessed 13 May 2017

CANNISTRA, S. (2004). Cancer of the Ovary. *New England Journal of Medicine*, 351(24), pp.2519-2529.

CHERNIKOVA, S., GAME, J. AND BROWN, J. (2012). Inhibiting homologous recombination for cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 13(2), pp.61-68.

CROSS, D. AND BURMESTER, J. (2004). The Promise of Molecular Profiling for Cancer Identification and Treatment. *Clinical Medicine & Research*, 2(3), pp.147-150

D'ANDREA, A. AND GROMPE, M. (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nature Reviews Cancer*, 3(1), pp.23-34.

DUTTA, D. AND DUTTA, I. (2013). Origin of Ovarian Cancer: Molecular Profiling. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 63(3), pp.152-157.

ESTELLER, M. (2000). Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(7), pp.564-569.3

FONG, P., BOSS, D., YAP, T., TUTT, A., WU, P., MERGUI-ROELVINK, M., MORTIMER, P., SWAISLAND, H., LAU, A., O'CONNOR, M., ASHWORTH, A., CARMICHAEL, J., KAYE, S., SCHELLENS, J. AND DE BONO, J. (2009). Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers. *New England Journal of Medicine*, 361(2), pp.123-134.

FUKUMOTO, M. AND NAKAYAMA, K. (2006). Ovarian epithelial tumors of low malignant potential: Are they precursors of ovarian carcinoma?. *Pathology International*, 56(5), pp.233-239.

HENNESSY B, TIMMS K, CAREY MS, (2009): Somatic BRCA status in ovarian tumors. *J Clin Oncol* 27:284s, 2009

- HOGG, R. AND FRIEDLANDER, M. (2004). Biology of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Screening Women at High Genetic Risk. *Journal of Clinical Oncology*, 22(7), pp.1315-1327.
- HOPKINS, T., SHI, Y., RODRIGUEZ, L., SOLOMON, L., DONAWHO, C., DIGIAMMARINO, E., PANCHAL, S., WILSBACHER, J., GAO, W., OLSON, A., STOLARIK, D., OSTERLING, D., JOHNSON, E. AND MAAG, D. (2015). Mechanistic Dissection of PARP1 Trapping and the Impact on In Vivo Tolerability and Efficacy of PARP Inhibitors. *Molecular Cancer Research*, 13(11), pp.1465-1477.
- HTGMOLECULAR.COM. (2017). *HTG Edge System - EdgeSeq*. [online] Available at: <https://www.htgmolecular.com/products/htg-edg-system-edgeseq> [Accessed 24 Jul. 2017].
- KONSTANTINOPOULOS, P., SPENTZOS, D., KARLAN, B., TANIGUCHI, T., FOUNTZILAS, E., FRANCOEUR, N., LEVINE, D. AND CANNISTRA, S. (2010). Gene Expression Profile of BRCAness That Correlates With Responsiveness to Chemotherapy and With Outcome in Patients With Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(22), pp.3555-3561.
- KURMAN, R. (2013). Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Annals of Oncology*, 24(suppl 10), pp.x16-x21.
- KURMAN, R. AND SHIH, I. (2016). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis. *The American Journal of Pathology*, 186(4), pp.733-747.
- LANDEN, C., BIRRER, M. AND SOOD, A. (2008). Early Events in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(6), pp.995-1005
- LORD, C. AND ASHWORTH, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381), pp.287-294.
- LORD, C. AND ASHWORTH, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, 16(2), pp.110-120.
- MANDAI M, YAMAGUCHI K, MASTUMURA N, et al. 2010 IGCS meeting Prague, abstract page 24
- MCCABE, N., TURNER, N., LORD, C., KLUZEK, K., BIAŁKOWSKA, A., SWIFT, S., GIAVARA, S., O'CONNOR, M., TUTT, A., ZDZIENICKA, M., SMITH, G. AND ASHWORTH, A. (2006). Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Research*, 66(16), pp.8109-8115.
- MENON, V. AND POVIRK, L. (2014). Involvement of p53 in the Repair of DNA Double Strand Breaks: Multifaceted Roles of p53 in Homologous Recombination Repair (HRR) and Non-Homologous End Joining (NHEJ). *Subcellular Biochemistry*, pp.321-336.
- MIRZA, MR., MONK, BJ. HERRSTEDT, J.(2016) Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *N Engl J Med* 375:2154-2164, 2016
- MUGGIA, F. (2009). Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: Implications for the treatment of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 112(1), pp.275-281.

- MUGGIA F, SAFRA T.(2014). 'BRCAness' and its implications for platinum action in gynecologic cancer. *Anticancer Res* 2014;34(2):551–6
- NETWORK, T. (2012). Erratum: Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 490(7419), pp.292-292.
- OLUWOLE FADARE, D. (2017). Molecular Profiling of Epithelial Ovarian Cancer - My Cancer Genome. [online] Mycancergenome.org. Available at: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/ovarian-cancer/> [Accessed 22 May. 2017].
- OZA, A., CIBULA, D., BENZAQUEN, A., POOLE, C., MATHIJSSEN, R., SONKE, G., COLOMBO, N., ŠPAČEK, J., VUYLSTEKE, P., HIRTE, H., MAHNER, S., PLANTE, M., SCHMALFELDT, B., MACKAY, H., ROWBOTTOM, J., LOWE, E., DOUGHERTY, B., BARRETT, J. AND FRIEDLANDER, M. (2015). Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 16(1), pp.87-97.
- PENNINGTON, K., WALSH, T., HARRELL, M., LEE, M., PENNIL, C., CASADEI, S., AGNEW, K., GARCIA, R., RENDI, M., KING, M. AND SWISHER, E. (2013). Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and improved overall survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Gynecologic Oncology*, 131(1), pp.257-258.
- PRAKASH, R., ZHANG, Y., FENG, W. AND JASIN, M. (2015). Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4), p.a016600.
- UEDA, K., ARAKAWA, H. AND NAKAMURA, Y. (2003). Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene*, 22(36), pp.5586-5591.
- RISCH, H., MCLAUGHLIN, J., COLE, D., ROSEN, B., BRADLEY, L., FAN, I., TANG, J., LI, S., ZHANG, S., SHAW, P. AND NAROD, S. (2006). Population BRCA1 and BRCA2 Mutation Frequencies and Cancer Penetrances: A Kin-Cohort Study in Ontario, Canada. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 98(23), pp.1694-1706.
- ROJAS, V., HIRSHFIELD, K., GANESAN, S. AND RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, L. (2016). Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), p.2113.
- SEIDMAN, J., HORKAYNE-SZAKALY, I., HAIBA, M., BOICE, C., KURMAN, R. AND RONNETT, B. (2004). The Histologic Type and Stage Distribution of Ovarian Carcinomas of Surface Epithelial Origin. *International Journal of Gynecological Pathology*, 23(1), pp.41-44.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D. AND JEMAL, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(1), pp.10-29.
- STEFANOU, D., BAMIAS, A., EPISKOPOU, H., KYRTOPOULOS, S., LIKKA, M., KALAMPOKAS, T., PHOTIOU, S., GAVALAS, N., SFIKAKIS, P., DIMOPOULOS, M. AND SOULIOTIS, V. (2015). Aberrant DNA Damage Response Pathways May Predict the Outcome of Platinum Chemotherapy in Ovarian Cancer. *PLOS ONE*, 10(2), p.e0117654.

STRICKLAND, K., HOWITT, B., SHUKLA, S., RODIG, S., RITTERHOUSE, L., LIU, J., GARBER, J., CHOWDHURY, D., WU, C., D'ANDREA, A., MATULONIS, U. AND KONSTANTINOPOULOS, P. (2016). Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(12), pp.13587-13598.

SUNAMURA, M., DUDA, D., LOZONSCHI, L., YOKOYAMA, T., YATSUOKA, T., MOTOI, F., SHIMAMURA, H., TAKEDA, K. AND MATSUNO, S. (2000). Anti-angiogenesis effect of p53-target gene, BAI1 on pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 118(4), p.A1043.

TAN, D., ROTHERMUNDT DR, C., THOMAS, K., BANCROFT, E., EELES, R., SHANLEY, S., ARDERN-JONES, A., NORMAN, A., KAYE PROF, S. AND GORE PROF, M. (2008). The “BRCAness” syndrome in ovarian cancer: A case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA 1/2 mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 26(15_suppl), pp.5594-5594.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474, 609–615 (2011).

TURNER N, TUTT A, ASHWORTH A (2004): Hallmarks of ‘BRCAness’ in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 4:814-819, 2004

VERECZKEY, I., SERESTER, O., DOBOS, J., GALLAI, M., SZAKÁCS, O., SZENTIRMAY, Z. AND TÓTH, E. (2010). Molecular Characterization of 103 Ovarian Serous and Mucinous Tumors. *Pathology & Oncology Research*, 17(3), pp.551-559.

WEI, W., DIZON, D., VATHIPADIEKAL, V. AND BIRRER, M. (2013). Ovarian cancer: genomic analysis. *Annals of Oncology*, 24 (suppl 10), pp.x7-x15.

YOON, C., RHO, S., KIM, S., KHO, S., PARK, J., JANG, I., WOO, S., KIM, S., LEE, J. AND LEE, S. (2012). Crucial Role of TSC-22 in Preventing the Proteasomal Degradation of p53 in Cervical Cancer. *PLoS ONE*, 7(8), p.e42006.

YU, H., YUE, X., ZHAO, Y., LI, X., WU, L., ZHANG, C., LIU, Z., LIN, K., XU-MONETTE, Z., YOUNG, K., LIU, J., SHEN, Z., FENG, Z. AND HU, W. (2014). LIF negatively regulates tumour-suppressor p53 through Stat3/ID1/MDM2 in colorectal cancers. *Nature Communications*, 5, p.5218.