

Validez, utilidad clínica y seguridad de la nueva plataforma genómica de secuenciación de próxima generación (NGS) FoundationOne® en el cáncer de pulmón no microcítico y otros tipos de tumores sólidos

Validity, clinical utility and safety of the next-generation sequencing (NGS) genomic platform FoundationOne® in non-small cell lung cancer and other solid tumors

Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN 2018
MINISTERIO DE SANIDAD, CONSUMO Y BIENESTAR SOCIAL



GOBIERNO DE ESPAÑA

MINISTERIO DE SANIDAD, CONSUMO Y BIENESTAR SOCIAL



ISC
Instituto de Salud Carlos III
Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias

Validez, utilidad clínica y seguridad de la nueva plataforma genómica de secuenciación de próxima generación (NGS) FoundationOne® en el cáncer de pulmón no microcítico y otros tipos de tumores sólidos

Validity, clinical utility and safety of the next-generation sequencing (NGS) genomic platform FoundationOne® in non-small cell lung cancer and other solid tumors

Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias

Validez, utilidad clínica y seguridad de la nueva plataforma genómica de secuenciación de próxima generación (NGS) FoundationOne® en el cáncer de pulmón no microcítico y otros tipos de tumores sólidos. Cristina Asensio del Barrio, Esther Elena García Carpintero, Montserrat Carmona Rodríguez. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III. 2019.

1 archivo pdf;— (Informes, Estudios e Investigación)

Palabras clave: FoundationOne; Validez diagnóstica; Utilidad clínica; Evaluación de Tecnologías Sanitarias.
Keywords: FoundationOne; Diagnostic validity; Clinic Utility; Health Technology Assessment.

Autoras:

Cristina Asensio del Barrio
Esther Elena García Carpintero
Montserrat Carmona Rodríguez

Convenio de colaboración/financiación:

Este documento ha sido realizado por la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del ISCIII en el marco de la financiación del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social para el desarrollo de las actividades del Plan anual de trabajo de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del SNS.

Para citar este informe:

ASENSIO DEL BARRIO C, GARCÍA CARPINTERO EE, CARMONA RODRÍGUEZ M. «Validez, utilidad clínica y seguridad de la nueva plataforma genómica de secuenciación de próxima generación (NGS) FoundationOne® en el cáncer de pulmón no microcítico y otros tipos de tumores sólidos». Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías y Prestaciones del SNS. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS) - Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Madrid. 2019. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias.

Revisión externa:

Este informe de evaluación ha sido sometido a un proceso de revisión externa. La Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III agradece a la Dra. Carmen Ayuso García y a la Dra. Rosa Riveiro Álvarez, del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (Madrid), su colaboración desinteresada y los comentarios aportados.

El contenido del presente informe es responsabilidad exclusiva de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III sin que la colaboración de los revisores externos presuponga por su parte la completa aceptación del mismo. Las revisoras externas del documento no suscriben necesariamente todas y cada una de las conclusiones y recomendaciones finales, que son responsabilidad exclusiva de las autoras.

Declaración de conflicto de interés:

Las autoras declaran que no ha existido ningún tipo de conflicto de interés en la elaboración de este documento.

Este documento puede ser reproducido total o parcialmente, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia.

Edita: Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (MSCBS)
Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del ISCIII.

MSCBS
NIPO PDF: 731190852
EPUB: 731190868

MCIU
NIPO PDF: 695190059
EPUB: 695190307

Maquetación: DiScript Preimpresión, S. L.

Validez, utilidad clínica y seguridad de la nueva plataforma genómica de secuenciación de próxima generación (NGS) FoundationOne® en el cáncer de pulmón no microcítico y otros tipos de tumores sólidos

Validity, clinical utility and safety of the next-generation sequencing (NGS) genomic platform FoundationOne® in non-small cell lung cancer and other solid tumors

Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias



MINISTERIO
DE SANIDAD, CONSUMO
Y BIENESTAR SOCIAL



ISC
Instituto de Salud
Carlos III
Agencia de Evaluación
de Tecnologías Sanitarias

Índice

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN	11
SUMMARY	13
ALGUNOS CONCEPTOS O DEFINICIONES	15
INTRODUCCIÓN	22
La tecnología: FoundationOne® y FoundationOne CDx®	25
Otras tecnologías diagnósticas y las NGS	32
El cáncer y su relación con las GAs	37
Sobre la medicina de precisión en oncología	39
OBJETIVO	45
METODOLOGÍA	46
Fuentes de información y estrategias de búsqueda	46
Selección de estudios	48
Criterios de inclusión de los estudios	48
Criterios de exclusión	49
Extracción de datos	50
Síntesis de los datos	51
RESULTADOS	52
Revisión de las GAs y terapias en los cinco tumores sólidos	52
Resultados de la búsqueda bibliográfica	74
Descripción de la evidencia disponible	74
Ensayos clínicos con F1/F1CDx	89
DISCUSIÓN	94
Calidad de la evidencia	109
Limitaciones de esta revisión	109
CONCLUSIONES	111
Conclusiones de la revisión de la literatura	111
Para investigaciones futuras	112
Valoraciones finales	113
BIBLIOGRAFÍA	114
ANEXOS	129
ANEXO I. Lista de genes estudiados por F1CDx	129
ANEXO II. Listado de otros tests CDx aprobados por la FDA para las GAs que detecta F1CDx	130

ANEXO III. Estrategia de búsqueda en PubMed y Cochrane Library	131
ANEXO IV. Diagrama de flujo de selección de estudios	132
ANEXO V. Estudios excluidos y motivo de exclusión	133
ANEXO VI. Tablas de extracción de datos de los artículos incluidos	134
ANEXO VII. Otras plataformas NGS distintas de F1	146
ANEXO VIII. Ensayo clínicos con F1/F1CDx	153

Lista de figuras

Figura 1. Validez analítica de F1.....	26
Figura 2. Estudios clínicos de concordancia entre F1CDx y otros tests...	28
Figura 3. Indicaciones de F1CDx como <i>companion diagnostic</i>	31
Figura 4. Tratamiento del NSCLC en estadio IV sin GAs intervenibles	60
Figura 5. Proceso de selección de estudios	132

Lista de tablas

Tabla 1. Concordancia entre F1CDx y F1 LDT.....	27
Tabla 2. Respuesta de los NSCLC al tratamiento recomendado por F1. Influencia de F1 en la decisión terapéutica. Tratamiento administrado...	77
Tabla 3. Artículos excluidos y motivo de exclusión	133
Tabla 4. Estudios de F1 en pacientes con tumores de pulmón	134
Tabla 5. Estudios de F1 en pacientes con cáncer de mama	139
Tabla 6. Estudios de F1 en pacientes con melanoma	145
Tabla 7. Plataformas NGS: principales características	152
Tabla 8. Ensayos clínicos con F1/F1CDx	153

Lista de abreviaturas

AI	Inhibidor de aromatasas
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homologue
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
BCRA1/2	<i>Breast cancer gene 1/2</i>
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CCR	Carcinoma colorrectal
CDKN2A/B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B</i>
CDx	<i>Companion Diagnostic</i>
CGP	Perfil genómico completo
CISH	Hibridación <i>in situ</i> cromogénica
CLIA	<i>Clinical Laboratory Improvement Amendments certified</i>
CMI	<i>Caris Molecular Intelligence</i>
CNA/CVN	Alteraciones / Variaciones en el número de copias
COSMIC	<i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>
CRGA	<i>Clinical relevant genomic alteration</i>
CT	Tomografía computerizada
CTCAE	<i>NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
ctDNA	DNA tumoral libre circulante
CTLA4	<i>Anti-cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4</i>
dMMR	Deficiencia en la reparación de apareamiento erróneos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Eventos adversos
ECA	Ensayo controlado y aleatorizado
ECOG PS	<i>Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ER	Receptor de estrógenos
ERBB2	<i>erb-B2 receptor tyrosine kinase 2</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
F1 LDT	<i>FoundationOne Laboratory Developed Test</i>
F1CDx	<i>FoundationOne Diagnostic Companion</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFPE	Fijado en formalina e incluido o embebido en parafina
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
G360	Guardant 360
GA	Alteraciones genómicas

H&E	Hematoxilina y eosina
HER2	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
HR	Receptores hormonales
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
HRR	Reparación de recombinación homóloga
IHC	Inmunohistoquímica
IMPACT	<i>Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets</i>
irAE	<i>Immune-related adverse events</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MAF	Frecuencia del alelo minoritario (<i>minor allele frequency</i>)
MAP	<i>Molecular Analyses for Personalized Medicine</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MET	<i>Mesenchymal epithelial transition</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSI	Inestabilidad de microsatélites
MSI-H	Niveles altos de MSI
MSI-L	Niveles bajos de MSI
MSK	<i>Memorial Sloan Kettering</i>
MSS	Estabilidad de microsatélites
mCCR	CCR metastásico
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NICE	<i>National Institute for Health and Clinical Excellence</i>
NGS	Secuenciación de nueva generación / Secuenciación masiva
NPA	Porcentaje de acuerdo negativo
NRAS	<i>Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
NSCLC	Cáncer de pulmón no microcítico/de células no pequeñas
NTRK1	<i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor 1</i>
PARP	Poli-ADP-ribosa-polimerasa
pb	Par de bases
PCDx	<i>Paradigm Cancer Diagnostic</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Proteína de muerte programada 1
PD-L1	Ligando de muerte programada 1
PFS	Supervivencia libre de progresión
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
PLD	<i>Pegylated liposomal doxorubicin</i>
PPA	Porcentaje de acuerdo positivo
PR	Receptor de progesterona
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>

QT	Quimioterapia
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma kinase</i>
RAS	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog gene</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
RET	<i>Rearranged during transfection</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS1	<i>ROS proto-oncogene 1</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
RTK	Receptor de tirosina quinasa
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple o de único nucleótido
SNS	Sistema Nacional de Salud
SNV	Variantes de nucleótido único
TAT	<i>Turnaround time</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TKI	Inhibidor de tirosina quinasa
TPS	<i>Tumor proportion score</i>
TMB	Carga mutacional tumoral
TNT	Tiempo hasta el siguiente tratamiento
TTF	Tiempo hasta el fallo del tratamiento
VAS	<i>Variant allele fraction</i>
VUS	Variante de significado desconocido

Resumen

Introducción

El avance en las tecnologías de diagnóstico genómico y de la bioinformática ha permitido detectar numerosas alteraciones genómicas (GAs) relacionadas con el inicio y progresión del cáncer y han contribuido a un cambio de paradigma en el tratamiento oncológico. La secuenciación de nueva generación (NGS) es la base de las plataformas genómicas FoundationOne (F1) y FoundationOne CDx (F1CDx) con las que puede realizar un perfil genómico completo (CGP) con el fin de identificar las GAs diana frente a las cuales ejercerán su efecto los fármacos dirigidos. También permiten cuantificar algunos biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento como la carga mutacional tumoral (TMB) o la expresión de la proteína de muerte programada 1 o su ligando (PD-1 y PD-L1, respectivamente).

Objetivo

El objetivo principal de este informe es valorar la validez diagnóstica, utilidad clínica y seguridad de F1 o F1CDx como plataformas NGS para el diagnóstico de alteraciones genómicas asociadas a tumores sólidos y su recomendación terapéutica.

Como objetivos secundarios de este informe, se han realizado revisiones breves narrativas sobre las tecnologías diagnósticas de secuenciación y alternativas a F1 o F1CDx para el análisis genómico de los procesos oncológicos, y sobre las principales alteraciones genómicas que caracterizan a los cinco tumores sólidos para los que F1CDx está aprobado por la FDA, que son el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), mama, colorrectal (CCR), ovario y melanoma, y sus correspondientes tratamientos.

Metodología

Se ha realizado una revisión sistemática de la literatura científica en PubMed, la Cochrane Library, Centre for Reviews and Dissemination y en los sitios web de centros relacionados con la Evaluación de Tecnologías Sanitarias y ensayos clínicos. La búsqueda se limitó a estudios originales publicados a partir de 2012, que incluyeran un número mínimo de 10 pacientes con NSCLC, cáncer de mama, CCR, ovario o melanoma, en quienes se hubiera realizado el estudio de perfil genómico con F1/F1CDx.

Las variables de resultados han sido las GAs detectadas, la TMB y expresión de PD-1 o PD-L1, los fármacos dirigidos o la inmunoterapia indica-

da en cada caso, número de pacientes tratados, la respuesta tumoral al tratamiento, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, tiempo hasta la obtención del resultados de F1/F1CDx.

Resultados

La búsqueda de la literatura localizó 2.320 referencias de las bases de datos electrónicas y búsqueda manual. Se excluyeron 20 duplicadas y otras 2.242 se descartaron tras la lectura de título y *abstract*. Las restantes 58 referencias fueron recuperadas a texto completo para su lectura en profundidad, lo que llevó a excluir 23 artículos, quedando finalmente seleccionados 33 artículos originales, 1 artículo de revisión de la evidencia sobre F1 y otro de validación de F1. De los 33 artículos incluidos, 10 estudiaban F1/F1CDx en pacientes con NSCLC; 17 artículos, en pacientes con cáncer de mama; 1 artículo, en CCR; 3 publicaciones en melanoma y 2 en ovario.

Tras la revisión de estos artículos se ha podido confirmar la capacidad de F1/F1CDx para detectar GAs en los cinco tipos de tumores estudiados. Además, de acuerdo a los datos informados por los autores, el 23% de pacientes con NSCLC recibió tratamiento tras disponer de los resultados de F1/F1CDx. Más del 68% de los pacientes presentaron respuesta objetiva (completa y parcial) y un 17,50%, enfermedad estable. F1/F1CDx parece haber influido en la decisión terapéutica en un 19% de los pacientes. Sólo dos artículos evaluaron posibles eventos adversos relacionados con el tratamiento recomendado por F1/F1CDx.

Hay que señalar la baja calidad metodológica de los artículos incluidos y una marcada infranotificación de resultados.

Conclusiones

F1/F1CDx tiene capacidad diagnóstica para identificar las GAs y las dianas terapéuticas en pacientes con cáncer, pero debido a la baja calidad de los estudios incluidos resulta necesario realizar nuevos estudios que permitan confirmar los resultados diagnósticos y de utilidad clínica de la prueba, además de valorar tanto la potencial toxicidad asociada a las terapias recomendadas por la prueba como la toxicidad evitada al descartar el uso de fármacos no efectivos.

Summary

Introduction

Advances in genomic diagnosis and bioinformatics technologies have allowed to identify numerous genomic alterations (GAs) related to the onset and progression of cancer and have contributed to a paradigm change in oncological treatment. New generation sequencing (NGS) is the basis of the genomic platforms FoundationOne (F1) and FoundationOne CDx (F1CDx) that can perform a complete genomic profile (CGP) in order to identify the target GAs against which there are targeted drugs. These genomic platform also make it possible to quantify some biomarkers predictive of response to treatment such as tumor mutational load (TMB) or expression of the protein of programmed death 1 or its ligand (PD-1 and PD-L1, respectively).

Objective

The main objective of this report is to assess the diagnostic validity, clinical utility and safety of F1 or F1CDx as NGS platforms for the diagnosis of genomic alterations associated with solid tumors and their therapeutic recommendation.

As secondary objectives of this report, brief narrative reviews have been carried out on diagnostic sequencing technologies and alternatives to F1 or F1CDx for the genomic analysis of oncological processes, and on the main genomic alterations characterizing the five solid tumours for which F1CDx is approved by the FDA, which are non-small-cell lung cancer (NSCLC), breast cancer, colorectal cancer (CCR), ovarian cancer and melanoma, and their corresponding treatments.

Methodology

A systematic review of the scientific literature has been conducted in PubMed, the Cochrane Library, Centre for Reviews and Dissemination and on the websites Health Technology Assessment Agencies and clinical trials. The search was limited to original studies published from 2012, including a minimum of 10 patients with NSCLC, breast cancer, CRC, ovary or melanoma, in whom the genomic profile study with F1/F1CDx had been performed.

The variables of results have been the detected GAs, the TMB and expression of PD-1 or PD-L1, the targeted drugs or immunotherapy indicated in each case, number of patients treated, tumor response to treatment, overall survival and disease-free survival, time until obtaining the results of F1/F1CDx.

Results

The literature search located 2,320 references from electronic databases and handsearched. Twenty duplicates were excluded and another 2,242 were discarded after reading the title and abstract. The remaining 58 references were retrieved to full text for in-depth reading, which led to the exclusion of 23 articles, leaving 33 original articles finally selected, 1 article reviewing the evidence on F1 and another F1 validation article. Of the 33 articles included, 10 studied F1/F1CDx in patients with NSCLC; 17 articles, in patients with breast cancer; 1 article, in CCR; 3 publications in melanoma and 2 in ovary.

A review of these articles has confirmed the ability of F1/F1CDx to detect GAs in the five types of tumors studied. In addition, according to the data reported by the authors, 23% of patients with NSCLC received treatment after the results of F1/F1CDx were available. More than 68% of the patients presented objective response (complete and partial) and 17.50%, stable disease. F1/F1CDx seems to have influenced the therapeutic decision in 19% of patients. Only two articles evaluated possible adverse events related to the treatment recommended by F1/F1CDx.

The low methodological quality of the included articles and a marked underreporting of results should be noted.

Conclusions

F1/F1CDx has the diagnostic capacity to identify GAs and therapeutic targets in patients with cancer, but due to the low quality of the included studies, it is necessary to carry out new studies to confirm the diagnostic results and the clinical usefulness of the test, as well as to evaluate both the potential toxicity associated with the therapies recommended by the test and the toxicity avoided by ruling out the use of ineffective drugs.

Algunos conceptos o definiciones

A continuación se presentan algunos conceptos o definiciones en orden alfabético.

Adaptador: se trata de una secuencia corta de DNA que se añade a los extremos de cada fragmento de DNA durante el proceso de preparación de las librerías. Estas secuencias son complementarias con la plataforma de secuenciación empleada.

Alelo: cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen localizado en una posición concreta (locus) de un cromosoma determinado, que se diferencian en su secuencia y que se pueden manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Alelo mutante: el que difiere del alelo estándar o salvaje, en la secuencia de referencia.

Alteraciones genómicas intervenibles: aquellas mutaciones que tienen asociada una terapia (que son dianas de fármacos dirigidos) o, en sentido más amplio, las que tienen asociada una medida preventiva.

Alteraciones genómicas biológicamente relevantes: variantes que pueden tener significación funcional o que se han observado en la literatura médica asociadas a una anomalía clínica, aunque no estén asociadas a una terapia específica.

Alteraciones genómicas clínicamente relevantes (CRGAs, *clinically relevant genomic alterations*): en el contexto del cáncer somático, se definen como aquellas GAs que son diana de fármacos antitumorales dirigidos, bien sean fármacos aprobados para un tumor concreto por las autoridades competentes y comercializados, o aprobados para otro tumor diferente, o para uso en ensayos clínicos.

Amplión: es una copia sintética de una secuencia de DNA o RNA que resulta de la amplificación de una secuencia de interés. Durante la amplificación, se produce un incremento exponencial del número de copias, a partir de un fragmento de DNA o RNA.

Amplificación: producción de múltiples copias de DNA o de una secuencia.

Amplitud de Cobertura: (o cobertura “horizontal”) cantidad o porcentaje de secuencia de un gen (o de un conjunto de genes o del exoma completo) que está representado en la región de captura (región a analizar).

Base calling: es el proceso de asignación de bases a cada señal detectada durante una reacción de secuenciación. Cada secuenciador tiene integrado un software específico con el que se realiza este proceso.

Carga mutacional tumoral (TMB): número total de mutaciones somáticas identificadas por megabase en una región concreta del genoma tumoral. Los tumores con alta TMB se asocian a mejor respuesta a la inmunoterapia.

Cobertura vertical: es la profundidad de lectura. Se mide en nº de lecturas para una región de secuencia dada. Es importante establecer un porcentaje mínimo de cobertura y, si no se alcanza, descartar la muestra y tomar una nueva para dar un diagnóstico fiable.

Cromosoma: cada paquete ordenado de DNA que se encuentra en el núcleo de la célula y se hace visible como estructura durante mitosis celular. En los humanos hay 23 pares de cromosomas (22 pares autosómicos y un par de cromosomas sexuales, X e Y) que se encuentran en el núcleo celular, así como un pequeño cromosoma que se encuentra en las mitocondrias de la célula. Cada conjunto de 23 cromosomas contiene aproximadamente 3,1 mil millones de bases de la secuencia de DNA.

Deleción: tipo de alteración genética que consiste en la pérdida de un fragmento de DNA dentro de un cromosoma o gen.

DNA: polímero que almacena y transmite información del código genético en los seres vivos. Consta de una doble hélice. Cada cadena tiene una parte central formada por azúcares (desoxirribosa) y grupos fosfato. Unido a cada azúcar hay una de las siguientes bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T). Las dos cadenas se mantienen unidas por enlaces entre las bases; la A se enlaza con la T, y la C con la G.

DNA mitocondrial: es un pequeño cromosoma circular que se encuentra dentro de la mitocondria. Sólo tiene unos 16.569 pares de bases y 37 genes. Codifica diferentes proteínas y RNAs que son específicas de la mitocondria. El DNA mitocondrial se hereda sólo de la madre mientras que el DNA nuclear se hereda de ambos progenitores.

Ensayos cesta (*basket trials*): incluyen pacientes con tumores de diferentes tipos histológicos, seleccionados por tener la misma mutación diana y que pueden ser tratados con el mismo fármaco. Estudian el efecto de uno o más fármacos sobre una misma mutación en diferentes tipos de tumores. Se asignan los pacientes a un tratamiento concreto dependiendo de las GAs identificadas, independientemente del tipo de tumor que tengan. Una ventaja de estos ensayos es que pueden estudiarse tumores raros que, de otra manera no se podrían incluir en ensayos controlados y aleatorizados.

Estos ensayos pueden incluir un fármaco y varios tipos de tumor; 1 fármaco y una GA en varios tipos de tumor; o 1 fármaco con varias GAs y varios tipos de tumor.

Un ejemplo de ensayo cesta es el NCI-MATCH que incluyó pacientes con linfomas, mielomas y varios tumores sólidos avanzados y refractarios al tratamiento para comparar la terapia dirigida frente al tratamiento convencional.

Ensayo clínico pivotal: aquel ensayo que ha conducido a la aprobación de un medicamento por la agencia reguladora y es la base de la ficha técnica.

Ensayos paraguas (*umbrella trials*): están diseñados para estudiar el impacto de diferentes fármacos sobre diferentes mutaciones en un mismo tipo de

cáncer, basándose en el perfil molecular. Por ejemplo, el ensayo BATTLE en pacientes con NSCLC; los tumores son biopsiados y se analizan diversos marcadores como EGFR, *ALK*, *ROS1*, etc; después, los pacientes son aleatorizados para recibir un tratamiento dirigido concreto o un tratamiento convencional.

Exones: regiones codificantes, es decir, aquellas porciones de un gen que contienen la información para codificar aminoácidos. Las que pueden expresarse y dar lugar a proteínas.

Gen: es la unidad física básica de la herencia. Los genes están dispuestos, uno tras otro, en estructuras llamadas cromosomas. Los seres humanos tienen aproximadamente 22.000 genes organizados en sus cromosomas.

Gen de fusión: está formado por la unión de partes de dos genes diferentes. Los genes de fusión se producen cuando parte del DNA de un cromosoma pasa a otro cromosoma o región del genoma. Estos genes, y las proteínas de fusión (quiméricas) que codifican, se han visto implicados en el origen de algunos tipos de cáncer como sarcoma de partes blandas, cáncer de próstata, mama, pulmón, vejiga, CCR y del SNC. Por ejemplo, el gen y la proteína de fusión BCR-ABL (citogenéticamente, cromosoma Ph) se relacionan con ciertos tipos de leucemia.

Genoma: es el conjunto completo de instrucciones genéticas de un organismo, es decir, todo su DNA, tanto el DNA cromosómico como el DNA mitocondrial.

Hibridación: proceso por el cual se combinan dos cadenas complementarias simples de ácidos nucleicos (DNA o RNA) y se permite que forme una única molécula de doble cadena por apareamiento de sus bases. Y el proceso inverso, una doble cadena de moléculas de DNA (o RNA o DNA/RNA) puede ser calentada para romper el apareamiento de las bases y separar las dos hebras.

Hibridación fluorescente in situ (FISH): técnica de laboratorio para detectar y localizar una secuencia específica de DNA en un cromosoma. La técnica se basa en exponer los cromosomas a una pequeña secuencia de DNA llamado sonda que tiene una molécula fluorescente unida a ella. La secuencia de la sonda se une a su secuencia homóloga correspondiente en el cromosoma. Es una técnica rápida, que no necesita cultivo celular. Permite detectar aneuploidías, microdeleciones, duplicaciones, inversiones o traslocaciones, pero no pequeñas deleciones o inserciones, o mutaciones puntuales, en general.

Indel: acrónimo que indica un tipo de alteración genética de tamaño generalmente pequeño (menores de 1 kb) y que consiste en una inserción o una deleción.

Índice: 6-8 pb del adaptador que se utilizan como código de barras identificativo de la muestra.

Inestabilidad de microsatélites (MSI): es una condición de hipermutabilidad genética que viene ocasionada por un fallo en el sistema de reparación del

DNA (MMR, *mismatch repair*). Una alta MSI se correlaciona con un incremento en la carga de neoantígenos, que se asocia a mayor probabilidad de respuesta a la inmunoterapia.

Inserción: tipo de alteración genética que consiste en la incorporación de un fragmento de DNA dentro de un cromosoma, procedente de otra región del genoma

Intrón: región no codificante de un gen que se encuentra entre 2 exones.

Lectura (*Read*): en la secuenciación de ADN, una lectura es una secuencia inferida de pares de bases (o probabilidades de pares de bases) correspondientes a todo o parte de un solo fragmento de ADN. Por extensión, la lectura es la secuencia corta que se obtiene, durante la secuenciación por NGS.

Librería: es el conjunto de fragmentos (millones de moléculas) de DNA que se obtiene de una muestra a secuenciar, de un determinado tamaño, que en sus extremos contiene los índices y los adaptadores.

Ligando 1 de muerte programada (PD-L1): se trata de una proteína inmunológica de punto de control que media la supresión inducida del tumor a través de la *downregulation* de células T. La expresión del PD-L1 puede considerarse un biomarcador predictivo de respuesta a la inmunoterapia.

Longitud de lectura: se mide en pares de bases (pb).

Microsatélites: son pequeñas secuencias de DNA de entre 2 a 5 pares de bases que se repiten en tándem un número variable de veces, generalmente entre 10 y 60 veces. Se encuentran distribuidos a lo largo del genoma, generalmente en las regiones no codificadoras. Durante la replicación del DNA, los microsatélites tienen tendencia a sufrir errores en el emparejamiento o apareamiento de bases que de manera habitual se van reparando mediante un sistema específico de MMR. Pero si el nuevo sistema de MMR se altera, se produce un estado de hipermutabilidad genética cuyo resultado es la inestabilidad de los microsatélites (MSI). Se ha descrito una relación entre niveles altos de MSI (MSI-H) y una buena respuesta a la inmunoterapia.

Mismatch: se refiere a la discrepancia de secuencias entre las lecturas y el genoma de referencia. Se detecta después de haber alineado la secuencia de la muestra que se está analizando frente al genoma de referencia.

Mismatch repair (MMR): es un sistema para reconocer y reparar la inserción, eliminación o incorporación erróneas de bases que pueden surgir durante la replicación y recombinación del DNA.

Mutación: se define como cualquier cambio permanente en la secuencia del genoma. Las mutaciones varían en tamaño; pueden presentarse en cualquier lugar, y afectar desde un solo par de bases hasta un gran segmento de un cromosoma que incluye múltiples genes. Pueden ser de distintos tipos, incluyendo también deleciones, inserciones, amplificaciones o translocaciones. Las mutaciones pueden ser el resultado de errores en la copia del DNA durante la división celular, la exposición a radiaciones ionizantes o a sustancias químicas

denominadas mutágenos, o infección por virus, de forma que puede aumentar el riesgo de padecer cáncer o defectos congénitos. Las mutaciones de la línea germinal están presentes en los gametos (óvulos o espermatozoides) y pueden transmitirse a la descendencia, mientras que las mutaciones somáticas se producen en algunas células del cuerpo y no se transmiten a los hijos.

NGS: Secuenciación masiva o de nueva generación, durante la cual millones de fragmentos de DNA a partir de una sola muestra se secuencian al simultáneamente.

Nucleótido: es la unidad básica de los ácidos nucleicos. El RNA y el DNA son polímeros formados por largas cadenas de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un grupo fosfato y un azúcar (que es la parte fija) y por una base nitrogenada (que diferencia cada tipo de nucleótido). El azúcar puede ser desoxirribosa en el DNA y ribosa en el RNA. Las bases nitrogenadas son adenina (A), guanina (G), timina (T) o citosina (C) en DNA; y adenina (A), guanina (G), uracilo (U) o citosina (C) en RNA. Por lo tanto, habrá cuatro tipos de nucleótidos.

OMIM (<http://www.omim.org>): es una base de datos de genes y enfermedades humanas. También contiene una muestra representativa de las variantes genéticas asociadas con las enfermedades.

Oncogén: gen anormal o activado que procede de la mutación de un alelo de un gen normal llamado protooncogén. Es decir, es un gen que ha mutado y contribuye al desarrollo de un cáncer. En su estado normal, no mutado, los oncogenes son llamados proto-oncogenes.

Polimorfismo o Variante de nucleótido único o de un solo nucleótido (SNP/ SNV, *single nucleotide polymorphism*): es una variación en la secuencia de DNA que afecta a una sola base o nucleótido que ocurre en una posición concreta del genoma y es el polimorfismo más común. Está presente en más del 1% de la población (frecuencia alélica >1%), si no se llega al 1% no se considera SNP y sí una mutación puntual. La mayoría de los SNP /SNVs no tienen mucho significado, porque están en una parte del genoma que no tiene una función crítica. Sin embargo, algunos de ellos confieren un riesgo (generalmente poligénico o aditivo) para una enfermedad, por ejemplo, diabetes o enfermedades cardíacas. Otros SNP/SNVs en el genoma humano se correlacionan con la respuesta a determinados fármacos y con otros fenotipos.

Profundidad de cobertura (*Depth of coverage o coverage*): número de veces que cada base del genoma está presente en los *reads* (lecturas) de secuenciación producidos. Es un factor muy importante para determinar la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma, especialmente importantes cuando se cuantifican las deleciones y duplicaciones.

A mayor profundidad de cobertura, mayor capacidad para detectar las GA y mayor confianza en la identificación de la variante. Pero una mayor

cobertura supone un mayor coste, por eso es necesario un equilibrio entre ambos elementos.

Proto-oncogenes: desempeñan un papel importante en el control de la división celular y la muerte celular durante nuestro crecimiento y desarrollo. Sin embargo, si un proto-oncogén muta, o si la célula hace copias adicionales de ese proto-oncogén, podrán activarse y producir una división celular descontrolada. De esta manera un proto-oncogén contribuye al desarrollo de una célula de cáncer partiendo de una célula normal. Una vez que un proto-oncogén es activado por una mutación, se le denomina oncogén.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de DNA, es decir, para crear un gran número de copias de un fragmento concreto de DNA. El método utiliza secuencias cortas de DNA llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. Se trata de un proceso enzimático en el que la temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del DNA a duplicar la secuencia del DNA que está siendo copiada. Con esta técnica se pueden producir un billón de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas. La amplificación del DNA nos permite estudiar la molécula del DNA en detalle en el laboratorio.

Utiliza ciclos repetidos, cada uno de los cuales consiste en tres fases: 1) desnaturalización o separación de las dos hebras de DNA; 2) hibridación del cebador, o unión a su secuencia complementaria, en el DNA molde; 3) elongación, la polimerasa, tomando el DNA molde, sintetiza la cadena complementaria.

Reordenamiento (*Rearrangement*): Alteración estructural de un cromosoma que implica normalmente la rotura y/o la reunión de un segmento de material cromosómico, que da lugar a una configuración anormal. Los 4 tipos de reordenamientos básicos son: deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones.

Secuenciación: Determinación del orden exacto de los pares de bases de una región específica de DNA.

***Time to next therapy (TNT)*:** se define como el tiempo transcurrido desde la fecha de inicio del primer tratamiento recibido hasta la fecha de inicio del segundo tratamiento. El TNT se utiliza como marcador subrogado de la PFS, porque generalmente está infranotificada la información sobre progresión de la enfermedad.

Translocación: es un tipo de reordenamiento en el que un cromosoma se rompe y una parte de él se vuelve a unir a otro cromosoma diferente. Pueden ser translocaciones equilibradas (no se produce ni aumento ni pérdida de material cromosómico) o desequilibradas (sí se produce aumento o pérdida de material cromosómico; el efecto será variable dependiendo de los segmentos cromosómicos implicados).

Utilidad clínica de una prueba diagnóstica: es la relevancia y utilidad de una intervención (en este caso una prueba diagnóstica) para la mejora de la atención clínica de un paciente. Se refiere al balance entre los beneficios y los riesgos asociados a la prueba e indica si su uso va a proporcionar una mejora en los resultados en salud del paciente y si va a implicar cambios en la práctica clínica.

Validez diagnóstica de una prueba: es la capacidad de una prueba para identificar de forma precisa y fiable a los pacientes. Se suele presentar en términos de sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica.

Variaciones de un solo nucleótido (SNV, *single nucleotide variant*) o sustituciones: son el tipo más frecuente de variaciones en el genoma. La mayoría de ellas son polimórficas en la población, pero no todas las SNVs son polimorfismos.

Variantes de significado incierto (VUS): aquellas variantes cuyo efecto funcional no está claro y/o que no están identificadas en la literatura.

Whole Genome Sequencing (WGS) - secuenciación del genoma completo: determinación de la secuencia del genoma completo de un organismo incluyendo, además del DNA cromosómico, el DNA mitocondrial.

Whole Exome Sequencing (WES) - secuenciación del exoma: determinación de la secuencia del exoma, es decir, sólo la parte codificante del DNA genómico.

Introducción

El avance en las tecnologías de diagnóstico genético unido al gran desarrollo de la bioinformática ha llevado a un mayor conocimiento sobre el origen y la progresión de la mayoría de los tumores malignos, entre otras enfermedades. Se acepta que es la acumulación de diversas alteraciones genómicas (GAs) lo que subyace en los procesos cancerígenos¹.

En el estudio de dichas GAs se han ido empleando diversas pruebas diagnósticas cuya evolución tecnológica ha resultado fundamental para profundizar en la biología molecular del cáncer. Hoy día se conocen muchas GAs que desencadenan la transformación de células sanas en células malignas, y otras GAs que estimulan la proliferación celular e inhiben su apoptosis. En las células cancerígenas se reconoce la presencia de multitud de GAs y de alteraciones epigenéticas aunque parece que de todas ellas sólo una o un número muy pequeño de GAs serían las alteraciones críticas que habrían desencadenado el inicio y crecimiento del tumor. La identificación de estas GAs, conocidas como alteraciones *drivers* o conductoras, ha contribuido a una nueva forma de clasificar y caracterizar a los tumores malignos. Pero, además, gracias a la identificación de esas GAs, se ha producido un cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer, pasando de terapias sistémicas basadas en el tipo de tumor, en sus características histopatológicas y localización, a un tratamiento dirigido frente a dichas GAs, que constituye la base de la denominada medicina de precisión o medicina personalizada. Con la medicina de precisión y el desarrollo de la denominada terapia dirigida y la inmunoterapia, entre otras terapias, se ha modificado sustancialmente el tratamiento de los pacientes oncológicos, buscando una mejoría en los parámetros de calidad de vida, en el control sintomático y funcional, además de retrasar el tiempo hasta el deterioro clínico del paciente. Se estima que un 30% de los pacientes tratados podrían obtener algún beneficio clínico en forma de incremento de la supervivencia o mejor calidad de vida².

La marcada evolución de las pruebas diagnósticas en el campo de la genómica ha permitido pasar del estudio de la expresión proteica o del análisis de un único gen a disponer de paneles amplios de genes que son analizados simultáneamente en un único test mediante la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS). El uso de las NGS ha sido clave en este cambio en la concepción y el tratamiento de los tumores malignos³. La NGS ha permitido la secuenciación masiva y en paralelo del genoma, contribuyendo a la implantación de la medicina personalizada en el ámbito de la práctica clínica, aunque en España todavía son pocos los hospitales que cuentan con esta tecnología.

Con las NGS se detectan las GAs presentes en cada tumor y se determinará si para cada una de ellas existe un tratamiento dirigido específico, ya

aprobado por las autoridades competentes de cada país o bien fármacos que estén siendo utilizados en el contexto de ensayos clínicos a los que se puedan incorporar los pacientes.

Por ello, en los últimos años se ha producido en paralelo el desarrollo de las pruebas para detectar las GAs asociadas al cáncer y el desarrollo de los fármacos frente a dichas GAs. En este contexto surgieron los “*companion diagnostics*” (CDx) que son dispositivos médicos, tanto de diagnóstico *in vitro* como herramientas de imagen, que ayudan a los profesionales en la toma de decisiones terapéuticas sobre el fármaco más adecuado para cada paciente en concreto, lo que convierte a estas CDx en herramientas esenciales para la seguridad y efectividad en el uso de los fármacos.

Entre estas plataformas de genes de NGS se incluyen FoundationOne® LDT (*laboratory developed test*) (F1) y FoundationOne CDx® (F1CDx). Foundation Medicine, Inc. (Cambridge, MA, EEUU) lanzó al mercado en 2012 el test F1, que en 2014 recibió el marcado CE para diagnóstico de GAs en tumores sólidos pero no llegó a ser aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*). En 2017, F1CDx fue aprobado por la FDA⁴ y tiene cobertura nacional para pacientes de Medicare y para todos los tumores sólidos. Desde primeros de noviembre de 2018, F1CDx ha reemplazado a F1. F1CDx también tiene marcado CE.

F1CDx se presenta como una plataforma integral de diagnóstico y para el tratamiento personalizado de tumores sólidos malignos. F1CDx permite estudiar el perfil genómico completo (CGP, *comprehensive genomic profile*) con el que se determinan las GAs concretas presentes en los tumores sólidos. Inicialmente, F1 se utilizaba en casos avanzados, recidivantes o refractarios al tratamiento convencional cuando se habían agotado las opciones terapéuticas, pero el número de terapias dirigidas aprobadas como primera línea terapéutica ha experimentado un progresivo aumento, por lo que cada vez se hace más necesario disponer de la información genómica del tumor desde el momento del diagnóstico inicial. F1CDx está destinado, por tanto, para ser solicitado por los clínicos como herramienta diagnóstica y de apoyo a la toma de decisiones terapéuticas, referidas a la selección de los fármacos más específicos para cada tumor en función del perfil genómico detectado, y de acuerdo a las recomendaciones de las guías de práctica clínica oncológicas.

Las NGS se han ido utilizando en la práctica clínica como un método eficiente, rápido y preciso para identificar GAs que puedan ser dianas terapéuticas o intervenibles, lo que está contribuyendo al desarrollo de nuevos fármacos⁵. Por tanto, la información de las NGS contribuye de forma clara a la toma de decisiones clínicas en cuanto a prevención, detección temprana, diagnóstico y tratamiento de pacientes oncológicos. Esto unido al mayor conocimiento de los defectos moleculares específicos de cada tumor, ha sido determinante para pasar de una oncología basada en la histología a la onco-

logía de precisión, aplicando un tratamiento personalizado con fármacos dirigidos contra los defectos moleculares concretos encontrados de cada tumor.

Además de estudiar las GAs del proceso tumoral, las NGS estarían indicadas para la monitorización de la respuesta tumoral y la evolución de la enfermedad. El perfil genómico tumoral tiene también un valor pronóstico y predictivo, este último por su capacidad de detección de biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia además de ofrecer información sobre posibles resistencias a determinados tratamientos de manera individualizada⁶.

No obstante, hasta la fecha, no está claro el papel en la práctica clínica de estas tecnologías NGS para el estudio del perfil genómico. La decisión sobre si estas nuevas pruebas deben incorporarse al sistema sanitario y a la práctica clínica debería basarse en evidencia científica que demuestren su validez analítica, validez diagnóstica y su utilidad clínica para los pacientes en quienes se utilicen, y esto se debe establecer para cada laboratorio⁷⁻⁹. Validez analítica en el sentido de estudiar su fiabilidad, sensibilidad y/o especificidad, es decir, la capacidad del test para hacer una medición exacta y fiable de los biomarcadores. También debe quedar claro si el uso de cada una de las NGS, en concreto, permite excluir o confirmar un diagnóstico. Así, se debe medir su validez clínica, o la capacidad del test para identificar de forma exacta y fiable o predecir un resultado clínico relevante. Y por último su utilidad clínica, para evaluar si las decisiones terapéuticas basadas en los resultados del test genómico han llevado a una mejoría en los resultados en salud. Para cada una de estas plataformas genómica habría que determinar su valor pronóstico (riesgo de recurrencia) como predictivo (potencial beneficio del tratamiento). También se hace necesario estudiar la seguridad de estas NGS así como la repercusión económica, y establecer protocolos de utilización de estas plataformas genómicas en la rutina asistencial.

La Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud y el procedimiento para su actualización, regula la cartera común de genética detallando los tipos de análisis genéticos que forman parte de la misma señalando que las pruebas que se faciliten han de estar respaldadas por la evidencia científica y ser de utilidad clínica.

Este informe surge a petición de la Comisión de prestaciones, aseguramiento y financiación en el proceso de identificación y priorización de necesidades de evaluación que se lleva a cabo para conformar el Plan de Trabajo Anual de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y prestaciones del SNS. En este contexto, se encargó a la AETS-ISCHII la elaboración de un informe sobre la efectividad diagnóstica y clínica y sobre la seguridad de F1/F1CDx para el estudio genómico de tumores malignos sólidos.

La tecnología: FoundationOne[®] y FoundationOne CDx[®]

F1CDx es un dispositivo de diagnóstico *in vitro* que analiza el perfil genómico mediante la técnica de NGS del DNA tumoral. Mediante captura híbrida estudia los exones de 309 genes relacionados con tumores, una región promotora, una no-codificante (ncRNA) y regiones intrónicas seleccionadas de 34 genes frecuentemente reordenados, 21 de los cuales también incluyen los exones codificantes¹⁰. Por tanto, este test detecta GAs incluidas en un total de 324 genes. Los genes estudiados por F1CDx se presentan en el anexo I. A diferencia de F1CDx, el test anterior F1 permitía estudiar las regiones codificantes de 315 genes relacionados con el cáncer y los intrones de 28 genes que frecuentemente presentan reordenamientos.

El método NGS permite la detección e identificación, de forma simultánea y en un único análisis, de las siguientes alteraciones genómicas: sustituciones de bases, inserciones y deleciones (indels), alteraciones en el número de copias (CNAs) del DNA y algunos reordenamientos genómicos (por ejemplo, fusiones de genes). F1CDx identifica GAs tanto somáticas (adquiridas) como de la línea germinal (hereditarias) pero no diferencia entre unas y otras.

A finales de 2013, Frampton y cols¹¹ publicaron un artículo sobre el proceso de validación de F1 como test para el estudio del perfil genómico de tumores. F1 interrogaba (captura basada en la hibridación) 4.557 exones de 287 genes relacionados con el cáncer y 47 intrones de 19 genes que con frecuencia sufren reordenamientos en tumores sólidos. Se estudiaron sustituciones de bases, indels, amplificaciones focales de genes, deleciones de genes homocigóticos y fusiones de genes, en 2.221 muestras tumorales fijadas en formalina y embebidas en bloque de parafina (FFIP/FFPE, *formalin-fixed/paraffin-embedded*) de pacientes, no en muestras especiales para investigación. Estas muestras se analizaron en un laboratorio con certificado CLIA (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*) y acreditación CAP (*College of American Pathologists*). Se extrajo una cantidad de 50-200 ng de DNA de muestras FFPE de biopsia o quirúrgicas. Se utilizó el secuenciador Illumina HiSeq2000. En general, el rendimiento global de F1 fue alto. Ver figura 1. La sensibilidad para detección de sustituciones de bases fue >99%, 98% para detección de indels y >95% para CNAs. El valor predictivo positivo para todas las GAs fue >99%.

Debido a la heterogeneidad tumoral, al escaso contenido tumoral en las muestras tisulares y a que estas muestras suelen ser de pequeño tamaño, es un requisito imprescindible que el test sea capaz de detectar de forma sensible y específica aquellas GAs poco frecuentes. F1 ha sido validado para detectar sustituciones de bases a una frecuencia del alelo mutante (MAF) de $\geq 10\%$ con una sensibilidad $\geq 99\%$ (IC 95%: 99,6-100%); para detectar pe-

queñas inserciones y deleciones a una MAF $\geq 20\%$ con una sensibilidad/exactitud diagnóstica $>97\%$; para detectar las alteraciones en el número de copias (deleciones homocigóticas vs genes altamente amplificados) con una sensibilidad/exactitud diagnóstica $>95\%$; y para reordenamientos, $>97\%$.

Figura 1. Validez analítica de F1.

Tomado de Foundation Medicine. Adaptado de Frampton y cols¹¹, 2013.

Sensibilidad	Substituciones de Bases	En la Frecuencia del Alelo Mutante $\geq 10\%$	$>99,9\%$ (IC de 99,6% - 100%)
		En la Frecuencia del Alelo Mutante de 5-10%	99,3% (IC de 98,3% - 99,8%)
	Inserciones/Eliminaciones (1-40 pb)	En la Frecuencia del Alelo Mutante $\geq 20\%$	97,9% (IC de 92,5% - 99,7%)
		En la Frecuencia del Alelo Mutante de 10-20%	97,3% (IC de 90,5% - 99,7%)
	Alteraciones del Número de Copias – Amplificaciones (ploidia <4 , Amplificación con Número de Copias ≥ 8)	En $\geq 30\%$ de los núcleos del tumor	$>99,0\%$ (IC de 93,6% - 100%)
		En 20% de los núcleos del tumor	92,6% (IC de 66,1% - 99,8%)
	Alteraciones del Número de Copias – Eliminaciones (ploidia <4 , Eliminaciones Homocigóticas)	En $\geq 30\%$ de los núcleos del tumor	97,2% (IC de 85,5% - 99,9%)
En 20% de los núcleos del tumor		88,9% (IC de 51,8%-99,7%)	
Reordenamientos (reordenamientos seleccionados en muestras con $\geq 20\%$ de los núcleos del tumor) ¹		$>90,0\%$ $>99,0\%$ para fusiones ALK (IC de 89,1% - 100%)	
Especificidad de todos los tipos de variantes		Valor Predictivo Positivo (VPP)	$>99,0\%$
Reproducibilidad		Concordancia media entre las réplicas	96,4% de precisión inter-lote 95,9% de precisión intra-lote
Biomarcadores de inmunoterapia		TMB ⁴ , MSI ⁵	
Tipo de Muestra		FFPE en bloque o laminilla (consulte instrucciones de Muestra para más detalles)	
Tiempo de Respuesta		2 Semanas ⁶	

Los autores encontraron una concordancia $>95\%$ entre los resultados obtenidos con F1 y los de otras pruebas diagnósticas como espectrometría de masas, FISH (hibridación *in situ* por fluorescencia) e IHC (análisis inmunohistoquímico) en un número elevado de muestras FFPE y analizaron la reproducibilidad de F1 observando la consistencia de resultados de las muestras procesadas de forma independiente. En global, F1 fue capaz de detectar el 95,1% de más de 2.200 casos clínicos consecutivos e identificó más alteraciones intervenibles (en 75% de pacientes) que las otras pruebas diagnósticas de rutina y en especial cuando la muestra de tejido disponible era escasa.

Los autores destacaron la detección de un número muy elevado de alteraciones diferentes, hasta 1.579 distintas. Y recalcaron el interés de este hallazgo poniendo el ejemplo del *ERBB2*: en la práctica clínica, su amplificación o sobreexpresión suele considerarse como diana terapéutica en cáncer de mama y cáncer gastroesofágico, pero en este trabajo se constató en otros 12 tipos más de tumores sólidos. Además, hasta un 40% de las alteraciones en el *ERBB2* fueron mutaciones puntuales o indels y no amplificaciones, por lo que con otros test diagnósticos utilizados en clínica no se hubieran podido detectar. Además de la identificación de las GAs en determinados genes, F1CDx analiza ciertas características genómicas como son la inestabilidad de microsatélites (MSI) y la carga mutacional tumoral (TMB)^{12,13}, ambos biomarcadores que pueden ayudar a estimar la respuesta a la inmunoterapia y, por tanto, informar las decisiones sobre su uso. La TMB viene

definida por F1CDx como el número total de todas las variantes sinónimas y no-sinónimas presentes a una frecuencia alélica $\geq 5\%$ y se expresa en unidades de mutaciones por megabase (mut/Mb) en el genoma tumoral examinado¹⁰.

TMB se puede determinar, también, mediante secuenciación del genoma completo y del exoma pero estos procedimientos son más complejos y difíciles de trasladar a la práctica clínica. En cambio, la determinación mediante secuenciación de paneles de genes, como es el caso de F1 y F1CDx, es más rápida y sencilla.

Con el fin de respaldar el uso de los datos retrospectivos generados por F1, Foundation Medicine desarrolló un estudio de concordancia entre F1CDx y F1 LDT¹⁴. En el estudio se analizaron 165 muestras y se determinó el grado de acuerdo positivo (PPA) y negativo (NPA) para los tipos de GAs, considerando F1 como método de referencia. Se incluyeron, en total, 2.325 variantes: 2.026 mutaciones, 266 CNAs y 33 reordenamientos. Los resultados del PPA y NPA fueron muy elevados, especialmente, este último. Para todas las variantes, el PPA entre F1CDx y F1 LDT fue del 98,6% y el NPA, del 99,99%. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Concordancia entre F1CDx y F1 LDT.		
	PPA	NPA
Todas las variantes	98,6%	99,99%
Variantes cortas	99,1%	99,99%
Sustituciones	99,4%	99,99%
Indels	97,0%	99,99%
Todas las CNAs	94,3%	99,90%
Amplificaciones	94,0%	99,90%
Delecciones	94,8%	99,80%
Reordenamientos	100,00%	99,98%

PPA: porcentaje de acuerdo positivo, NPA: porcentaje de acuerdo negativo, CNAs: alteraciones en el número de copias.

También se encontró una elevada concordancia entre F1CDx y F1 LDT en la determinación del MSI, con un PPA del 100% (IC 95%: 47,80-100%), NPA del 99,5% (IC 95%: 96,60-99,98%) y un porcentaje de acuerdo global del 99,4% (IC 95%: 96,70-99,98%). En cuanto a la concordancia en los resultados de TMB, en el análisis de regresión lineal utilizando la TMB de F1 LDT como predictora y TMB de F1CDx como resultado, el intercepto fue de -0,27782 (IC 95%: -0,662-0,106) y la pendiente de 0,94064 (IC 95%: 0,919-9,963).

F1CDx ha sido validado clínica y analíticamente para tumores sólidos, utilizando DNA de una gran cantidad de muestras FFPE de diferentes teji-

dos, con unas 2.100 muestras clínicas y 4.200 muestras analíticas. Es decir, que se han empleado casi 9 veces más muestras que en la validación de F1. Se analizó un amplio rango de GAs y en multitud de genes. También se confirmó que el rendimiento diagnóstico de F1CDx era similar independientemente del tipo de tejido estudiado; su precisión en cuanto a repetibilidad y reproducibilidad fueron altas, siendo ésta superior al 99% para detección de todas las GAs y del 100% para determinación de MSI. Para estudiar la validez y concordancia clínica, se comparó F1CDx con otros CDx aprobados por la FDA para estudiar las mismas GAs para las que está aprobado F1CDx, encontrando elevados grados de acuerdo PPA y NPA. De 157 genes estudiados mediante F1CDx y otros tests, el PPA alcanzó un porcentaje del 94,6% (IC 95%: 93,3%-95,8%) y un porcentaje de NPA del 99,9% (IC 95%: 99,9%-99,9%). Ver figura 2.

Figura 2. Estudios clínicos de concordancia entre F1CDx y otros tests.

Cobas® es una marca registrada de Roche Diagnostics Operations, Inc.
Therascreen® es una marca registrada de Qiagen. PharmDx® es una marca registrada de Dako Denmark A/S.

BIOMARKER	POSITIVE PERCENT AGREEMENT (PPA) ^a	NEGATIVE PERCENT AGREEMENT (NPA)	COMPARATOR METHOD ^b
<i>EGFR</i> Exon 19 Deletions and L858R	98.1% (106/108)	99.4% (153/154)	cobas® <i>EGFR</i> Mutation Test v2
<i>EGFR</i> T790M	98.9% (87/88)	86.1% (93/108)	cobas® <i>EGFR</i> Mutation Test v1 cobas® <i>EGFR</i> Mutation Test v2
<i>ALK</i> Rearrangements	92.9% (78/84)	100% (75/75)	Ventana <i>ALK</i> (D5F3) CDx Assay Vysis <i>ALK</i> Break-Apart FISH Probe Kit
<i>KRAS</i>	100% (173/173)	100% (154/154)	therascreen® <i>KRAS</i> RGQ PCR Kit
<i>ERBB2</i> (HER2) Amplifications	89.4% (101/113)	98.4% (180/183)	Dako HER2 FISH PharmDx® Kit
<i>BRAF</i> V600	99.4% (166/167)	89.6% (121/135) ^c	cobas® <i>BRAF</i> V600 Mutation Test
<i>BRAF</i> V600E	99.3% (149/150)	99.2% (121/122)	
<i>BRAF</i> V600 dinucleotide ^d	96.3% (26/27)	100% (24/24)	THxID® <i>BRAF</i> kit

El análisis del DNA en F1CDx implica varias etapas: recogida y preparación de las muestras de tejido tumoral, la extracción del DNA, la construcción de librerías, la captura híbrida, la secuenciación, el análisis de los datos secuenciados y, finalmente, la generación del informe. F1CDx utiliza muestras tisulares obtenidas mediante biopsia core, biopsia excisional o resección quirúrgica. El test se realiza en el DNA aislado de muestras de tejido FFPE, en laboratorios con certificado CLIA y acreditado por el CAP.

Se consideran muestras adecuadas si cumplen estos criterios:

- de tamaño de la muestra: se pueden almacenar bien como un bloque más un corte teñido con hematoxilina-eosina (H&E) para determinar el porcentaje tumoral y para confirmar el diagnóstico histológico, o bien como 10 cortes o láminas sin teñir de 4-5 µm de grosor, más 1 corte H&E. Es necesario disponer de ≥40-50 ng de DNA por muestra.
- área de superficie: si se envían los cortes, estos deben tener un mínimo de 25 mm² de superficie (cortes de 5 x 5 mm) o que alcancen un volumen tisular de al menos 1 mm³.

- contenido nuclear tumoral o porcentaje núcleos tumorales es el número de células tumorales dividido por el número total de todas las células con núcleo. Cuando se quieren determinar variaciones en el número de copias el porcentaje mínimo de núcleos tumorales debería ser de un 20% (los núcleos tumorales deberían ser al menos un 20% del total de núcleos presentes en la muestra) aunque lo óptimo sería un 30%. También podría considerarse adecuado si el porcentaje de células nucleadas es $\geq 80\%$ o si hay ≥ 30.000 células tumorales. Cuando la muestra está contaminada por células no tumorales o si el nivel de necrosis es muy elevado, se puede afectar la sensibilidad del test.

El proceso de secuenciación incluye los siguientes pasos. Se comienza realizando el procesamiento de las muestras para extracción del DNA. El DNA se extrae de muestras sin teñir. Se cuantifica, fragmenta y purifica este DNA. Es importante analizar la calidad de la muestra y valorar la fragmentación del tejido y la concentración de DNA para valorar si la muestra es adecuada. Después, se construyen las librerías; a continuación, se procede a la captura por hibridación de los exones relacionados con el cáncer y de los intrones implicados en los reordenamientos asociados al cáncer y después se realiza la secuenciación. F1CDx utiliza la plataforma Illumina® HiSeq 4000 para realizar la secuenciación a gran profundidad y uniforme (cobertura mediana $>500x$ con $>99\%$ de exones a una cobertura $>100x$)¹⁰. Esto permite una alta especificidad y sensibilidad del método NGS para detectar las alteraciones incluso a frecuencias bajas. Es importante que se pueda llevar a cabo con una cantidad de células tumorales baja. F1 LDT utilizaba el secuenciador Illumina HiSeq2000 o Illumina HiSeq2500 (San Diego, CA).

Una vez finalizada la secuenciación, se procede al análisis bioinformático utilizando un software propietario de Foundation Medicine Inc. Los datos secuenciados son mapeados con el genoma humano y, mediante algoritmos computacionales, se buscan las variantes presentes en las muestras. Para cada tipo de GA se utilizan unos algoritmos diferentes de análisis informático. Las lecturas se comparan con bases de datos de variantes detectadas en la población sana (los polimorfismos) y de variantes patológicas conocidas, por ejemplo, la base de datos COSMIC¹⁵⁻¹⁷ o ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) o la del proyecto The Cancer Genome Atlas (TCGA). Otra base de datos es FoundationCore™, de Foundation Medicine, con multitud de resultados de perfiles genómicos de más de 150 subtipos de tumores y datos clínicos y de respuesta al tratamiento.

Finalmente, los resultados de F1CDx se recogen y presentan en un informe donde se identifican los genes alterados, el número y tipo de GAs detectadas, las alteraciones clínicamente relevantes (CRGAs, *clinically relevant genomic alterations*) y las terapias disponibles recomendadas en fun-

ción del perfil genómico, tanto terapias aprobadas por las autoridades competentes y comercializadas para un tumor dado o para otro tumor, como las de uso en ensayos clínicos^{11,18}.

También se incluyen otras GAs adicionales identificadas en genes conocidos por ser inductoras de crecimiento tumoral, además de la información e interpretación de los biomarcadores MSI y TMB. En este mismo informe, también se incluyen los hallazgos genómicos con evidencia de significación clínica y los de potencial significación clínica. Se presenta, en su caso, información sobre posible resistencia del paciente a determinados fármacos en función del perfil genómico. Además, se incluye una interpretación útil para el manejo del paciente de acuerdo a las guías clínicas oncológicas.

Este informe tarda en llegar al clínico unos 14 días desde que la muestra es enviada al laboratorio.

Pero, además de estudiar el CGP, F1CDx está aprobado por la FDA como *companion diagnostic device* (sistema de diagnóstico complementario). F1CDx ha sido el primer “*broad*” *companion diagnostic* (CDx) aprobado por la FDA. Se trata de una única plataforma diagnóstica disponible para la práctica clínica, incluida entre los “*companion diagnostic tests*”¹⁹. Según define la FDA, CDx es una tecnología de diagnóstico que aporta información esencial sobre las opciones terapéuticas que pueden ofrecerse a un paciente concreto para el uso seguro y efectivo del tratamiento correspondiente. Los CDx se desarrollan a partir de aquellos biomarcadores que ayudan a predecir la probabilidad de respuesta y de toxicidad severa a un fármaco concreto²⁰. Se podrán sugerir determinados tratamientos en función del perfil genómico que discrimine entre respondedores y no respondedores. Cada test CDx está diseñado para detectar una alteración que sea diana para un fármaco determinado, lo que implica que exista una estrecha colaboración entre los fabricantes del dispositivo diagnóstico y los que desarrollan el fármaco. El test CDx se hace imprescindible cuando una diana genética o biológica concreta está presente sólo en algunos pacientes de una determinada enfermedad pero no en todos, de modo que su utilización permita discriminar aquellos pacientes que se beneficiarán de la administración del fármaco de aquellos otros pacientes en los que dicho fármaco no vaya a ser efectivo o pueda, incluso, ser perjudicial.

El primer CDx fue aprobado por la FDA en 1998 para estudio de pacientes con cáncer de mama con sobreexpresión de la proteína HER2 que responderían de forma satisfactoria al tratamiento con trastuzumab. El último listado actualizado de tests CDx aprobados por la FDA lleva fecha de 11 de marzo de 2019¹⁹.

F1CDx ha sido aprobado por la FDA con el fin de identificar a aquellos pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama, cáncer colorrectal (CCR), cáncer de ovario o melanoma que pudie-

ran beneficiarse del tratamiento con alguna de las 17 terapias dirigidas frente a alteraciones en los 8 genes: *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *ERBB2*, *KRAS*, *NRAS* y *BRCA1/2*, según ficha técnica (*on-label*). Ver figura 3.

Figura 3. Indicaciones de F1CDx como *companion diagnostic*.

Tomado de la web de Foundation Medicine¹⁴.

INDICATIONS	BIOMARKER	FDA-APPROVED THERAPY*
Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)	<i>EGFR</i> exon 19 deletions and <i>EGFR</i> exon 21 L858R alterations	Gilotrif® (afatinib), Iressa® (gefitinib), or Tarceva® (erlotinib)
	<i>EGFR</i> exon 20 T790M alterations	Tagrisso® (osimertinib)
	<i>ALK</i> rearrangements	Alecensa® (alectinib), Xalkori® (crizotinib), or Zykadia® (ceritinib)
	<i>BRAF</i> V600E	Tafinlar® (dabrafenib) in combination with Mekinist® (trametinib)
Melanoma	<i>BRAF</i> V600E	Tafinlar® (dabrafenib) or Zelboraf® (vemurafenib)
	<i>BRAF</i> V600E or V600K	Mekinist® (trametinib) or Cotellix® (cobimetinib), in combination with Zelboraf® (vemurafenib)
Breast Cancer	<i>ERBB2</i> (HER2) amplification	Herceptin® (trastuzumab), Kadcyla® (ado-trastuzumab-emtansine), or Perjeta® (pertuzumab)
Colorectal Cancer	<i>KRAS</i> wild-type (absence of mutations in codons 12 and 13)	Erbixx® (cetuximab)
	<i>KRAS</i> wild-type (absence of mutations in exons 2, 3 and 4) and <i>NRAS</i> wild-type (absence of mutations in exons 2, 3 and 4)	Vectibix® (panitumumab)
Ovarian Cancer	<i>BRCA1/2</i> alterations	Rubraca® (rucaparib)

La aprobación de FoundationOne CDx[®] también representa el primer sistema de diagnóstico complementario basado en NGS para Alecensa[®] (alectinib), una monoterapia aprobada por la FDA para el tratamiento del NSCLC *ALK*+, tanto como fármaco de primera línea, como tras progresión después de tratamiento con crizotinib o en pacientes intolerantes al mismo. La inclusión de reordenamientos *ALK* en un análisis integral más amplio puede ayudar a que se identifiquen más pacientes y a que sean seleccionados para el tratamiento en función de su estado *ALK* positivo.

Por tanto, como *companion test*, la información que aporte F1CDx resultará esencial en la efectividad y seguridad de los fármacos que se administren al paciente. Se trata de un test diagnóstico *in vitro* que se lleva a cabo específicamente para tomar una decisión terapéutica concreta. F1CDx ayudará al profesional sanitario en la selección del mejor tratamiento, determinando si los beneficios que pueda generar un fármaco concreto en un paciente concreto superan los potenciales riesgos de eventos adversos (EA) severos. De esta manera, F1CDx pretende identificar subpoblaciones de pacientes que tienen mayor probabilidad de beneficiarse de un tratamiento determinado (mayor probabilidad de ser seguro y efectivo) e identificar a aquellos con mayor probabilidad de sufrir complicaciones o EA asociados a un fármaco concreto. Por esto, resulta imprescindible que el test realice un diagnóstico correcto para evitar los resultados falsos positivos y negativos, que llevarían a tomar decisiones terapéuticas erróneas, bien administrando un tratamiento innecesario o descartándolo en pacientes en los que hubiera resultado efectivo. Además, su utilización permitiría reducir costes, al evitar administrar el tratamiento en los pacientes con baja probabilidad de respuesta al mismo y evitar los costes asociados a los EA que dicha terapia podría ocasionar.

Foundation Medicine ha comercializado otras plataformas de secuenciación, que no utilizan muestras tisulares. Se trata de FoundationOne® Liquid y de FoundationOne® Heme. Estas dos y otras plataformas NGS comercializadas se describen y resumen en la tabla 7 del anexo VII.

Otras tecnologías diagnósticas y las NGS

A lo largo del tiempo, en el estudio de las GAs se han ido utilizando diversas técnicas, algunas de las cuales siguen siendo de uso rutinario en la práctica clínica. El análisis inmunohistoquímico (IHC) permite buscar la expresión de determinadas proteínas, tanto la sobreexpresión como la pérdida. Por ejemplo, la sobreexpresión de la proteína HER2 en la superficie de algunas células tumorales. Con las diferentes formas de Hibridación *in situ*, fluorescente (FISH), cromogénica (CISH) y cromogénica con plata (SISH) se pueden detectar amplificaciones, inserciones/deleciones, CNAs²¹⁻²³. Por ejemplo, para estudiar amplificaciones del gen *HER2* en pacientes con cáncer de mama. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes como RT-PCR (*real-time PCR*), qPCR (*quantitative-PCR*) o MS-PCR (*Methylation-specific PCR*) son pruebas de gran sensibilidad que permiten detectar SNVs e indels pero no CNAs ni reordenamientos. La espectrometría de masa detecta mutaciones puntuales somáticas en la línea germinal, pero no CNAs ni reordenamientos; supone unos costes de inversión iniciales altos y requiere de personal con gran experiencia.

En 1977 Sanger describió la secuenciación del DNA por terminación de cadena²⁴, también denominada secuenciación capilar. Se basa en la reacción de replicación (polimerización) del DNA y en el uso de didesoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) que sirven como terminadores de la reacción. Cada didesoxinucleótido implica un color de fluoróforo diferente, lo que facilita su identificación. La secuenciación de Sanger es muy precisa, permite secuenciar con alta calidad fragmentos de DNA relativamente largos (de hasta 900 pares de bases, pb). Históricamente, ha sido considerada como el *gold standard* para la identificación de cambios de nucleótidos en la secuenciación de DNA. Permite detectar SNVs (*single nucleotide variants*) e indels, pero no CNAs, reordenamientos, grandes deleciones ni translocaciones. Este método fue mejorado técnicamente y se consiguió automatizar el proceso, aun así se trata de un procedimiento laborioso, lento y que requiere una gran cantidad de DNA tumoral. Además, resulta excesivamente costoso para estudiar el gran número de genes que hoy día se sabe que están relacionados con el origen y progresión del cáncer.

La pirosecuenciación es un método de secuenciación enzimático que mide la liberación de pirofosfato durante la incorporación de nucleótidos. Se trata de un método de síntesis porque la secuencia del molde se determina a

medida que se sintetiza su hebra complementaria. Permite detectar cambios epigenéticos en el DNA. Detecta SNVs e indels, pero no CNAs ni reordenamientos, ni grandes deleciones ni translocaciones. Es un método rápido. Es más sensible y menos costoso que la secuenciación de Sanger. Se puede aplicar en fragmentos de DNA de muestras FFPE.

En general, estas técnicas tradicionalmente utilizadas en clínica son muy sensibles para caracterizar las GAs tumorales pero son capaces de detectar sólo un número relativamente pequeño de mutaciones en los genes más frecuentes de modo que gran parte de las GAs quedarían sin ser detectadas en muchos tumores. Han resultado de utilidad cuando se quiere determinar la presencia o no de ciertas mutaciones, por ejemplo, si las mutaciones *BCRA1/2* se dan en una paciente concreta, generalmente en el contexto de un posible tumor hereditario de mama u ovario. A medida que se ha ido incrementado el número de fármacos con dianas moleculares confirmadas, la utilización de esos test genéticos se ha ido haciendo menos factible por la necesidad de una mayor cantidad de tejido para poder aplicar los tests haciendo imprescindible, en muchos casos, la repetición de biopsias, y porque implican un tiempo prolongado de estudio y altos costes.

La evolución tecnológica en los tests de secuenciación llevó a la aparición de la denominada NGS, secuenciación masiva paralela (*Massive Parallel Sequencing*, MPS), secuenciación de segunda generación o ultrasecuenciación de alta capacidad o de alto rendimiento (*High-throughput DNA sequencing*). En el año 2005, 454 Life Science comercializó la primera plataforma de NGS. La aparición de estas NGS supuso una revolución en el ámbito de la investigación genómica tanto básica como aplicada en la práctica asistencial hospitalaria al permitir estudiar la secuencia del DNA de cada individuo.

En los últimos años la tecnología de secuenciación ha experimentado avances importantes. A diferencia de la técnica de Sanger, las NGS extienden este proceso a millones de fragmentos de forma masiva y paralela, alcanzando una gran profundidad y una cobertura de varias megabases (Mb), ofreciendo un resultado más fiable a un coste más asequible y en un tiempo (*turnaround time*, TAT) corto y razonable para su aplicación en la práctica clínica. Por tanto, las NGS ofrecen la posibilidad de estudiar de forma simultánea multitud de genes en un único test y sobre una única muestra de tejido o de sangre periférica, evitando la necesidad de realizar múltiples tests para identificar los genes responsables o asociados al tumor concreto en estudio. De esta manera ofrece mucha más información y más rápida que cualquier otra prueba tradicional, que resultaban mucho más costosas, detectaban un número limitado de alteraciones genómicas y requerían una elevada cantidad de DNA tumoral que en muchas ocasiones resulta complicado de conseguir.

Para lograr esa secuenciación masiva y paralela se hace necesario reducir el tamaño de lectura por lo que los fragmentos de genoma cubierto son más pequeños, el número total de lecturas es mucho mayor aunque también resulta mayor la complejidad para el ensamblaje y análisis bioinformático final. La secuenciación realizada con NGS también permite el estudio de subpoblaciones de células tumorales, que resultaba imposible estudiar con la secuenciación de Sanger.

La secuenciación masiva permite detectar todos los tipos de variaciones genómicas en un único experimento: sustituciones de bases, variaciones de nucleótido único o de un solo nucleótido (*single nucleotide variants*, SNV), CNAs, *indels*, inversiones, traslocaciones, deleciones y duplicaciones²⁵.

Además de detectar las posibles variantes, habrá que determinar su implicación clínica en la enfermedad, es decir, analizar si se trata de CRGAs. Es fundamental hacer un diagnóstico correcto de las variantes genéticas, para lo cual las NGS comparan las diferencias en la secuencia de DNA de un individuo con un DNA de referencia. Para que esta comparación sea correcta es necesario que haya una buena calidad en el alineamiento y ensamblaje de las secuencias respecto a la de referencia. Cuando las secuencias se alinean de forma incorrecta se pueden ocasionar falsos positivos y si las secuencias no se alinean ocasionarán falsos negativos. Otros factores que influyen en la calidad y fiabilidad de los resultados de la NGS son el tipo de muestra utilizada, la pureza tumoral en la muestra, la técnica de secuenciación empleada y la cobertura. Es imprescindible que para uso clínico diagnóstico las NGS se realicen en laboratorios acreditados, que garanticen unos estrictos controles para reducir al máximo la posibilidad de errores. La alta sensibilidad de las NGS les permite detectar mutaciones presentes en alrededor de tan sólo un 5% del DNA aislado de una muestra tumoral^{6,26}.

El manejo y la interpretación del elevado número de datos obtenidos suponen un importante reto para las NGS. Por ello, el avance en esta tecnología ha sido posible por el desarrollo de potentes programas informáticos capaces de almacenar y manejar el enorme volumen de datos, así como de métodos bioinformáticos con los que generar la información correcta que permita realizar predicciones fiables de las GAs, sus consecuencias y sus potenciales tratamientos.

El estudio del perfil genómico de los procesos tumorales mediante NGS se basa en la utilización de ciertos genes preseleccionados (lo que se denominan paneles de genes) de los que se tiene conocimiento que están implicados en el inicio o desarrollo de determinados tumores. El CGP facilita la detección tanto de las GAs esperadas para un determinado tumor como la detección de otras GAs inesperadas o no sospechadas, que podrían ser determinantes para establecer el tratamiento más adecuado. Además, se podrán identificar tanto las mutaciones *drivers* o conductoras (aquellas altera-

ciones asociadas a la transformación y progresión neoplásica) como las mutaciones *passenger* o pasajeras (aquellas alteraciones no fundamentales, que pueden aparecer tanto en células tumorales como normales, pero que no determinan el desarrollo del cáncer), mucho más abundantes que las *drivers* en el tumor²⁷. La diferencia entre mutaciones *drivers* y pasajeras se basa, por tanto, en si se asocian a consecuencias funcionales.

Principales sistemas de secuenciación

Todas la NGS implican varias etapas: preparación de librerías, secuenciación y análisis de datos. Existen numerosas plataformas de secuenciación NGS aunque en todas ellas hay un elemento común que es la necesidad de realizar una amplificación previa del fragmento a secuenciar para poder obtener lecturas secuenciadas del mismo. Este proceso se puede realizar bien mediante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en emulsión (en las plataformas SOLID, 454 Life Science e Ion Torrent) o una PCR puente (en las plataformas Illumina).

Illumina ha desarrollado las plataformas NGS que incluyen el sistema de secuenciación por síntesis: la DNA polimerasa cataliza la incorporación aleatoria de nucleótidos marcados de forma fluorescente en una muestra de DNA durante ciclos secuenciales de síntesis de DNA de tal manera que en cada ciclo de ligación sólo uno de los cuatro nucleótidos se une de forma complementaria al DNA molde, emitiendo una señal luminosa que será captada por un sistema óptico altamente sensible.

Este método ha permitido reducir los costes en comparación a la secuenciación de Sanger y, aunque se requiere de una gran inversión inicial y de mantenimiento, ofrece resultados a precios razonables. Puede secuenciar desde pequeños paneles de genes a exomas, transcriptomas y genomas de humanos, en un solo experimento. Es la tecnología de secuenciación más utilizada hoy en día.

Illumina ofrece varios dispositivos clínicos como HiSeq 2500, HiSeq3000/4000/5000, NextSeq500 o MiSeq y más recientemente NovaSeq. NovaSeq y HiSeq pueden llegar a secuenciar un número muy elevado de bases en pocas horas o días. MiSeq tiene menor capacidad de secuenciación pero muy rápida (unos 500 millones de bases en 4 horas) y a un precio mucho más barato. Illumina ha permitido abaratar los costes y ofrecer lecturas más largas, sin embargo, se requiere de una gran inversión inicial y de mantenimiento, para poder adquirir y mantener uno de los equipos que ofrece.

La plataforma Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM), de Thermo Fisher Scientific (antes, Life Technologies). Salió al mercado en 2010. Utiliza una secuenciación basada en la tecnología de semiconductores: utiliza chips con sensores de voltaje en cada pocillo capaces de detectar los

iones hidrógeno (H^+) que son liberados cada vez que un nucleótido se une a la nueva cadena en formación durante la polimerización (síntesis) del DNA. Resulta bastante competitiva en cuanto a precio, rapidez y calidad para paneles pequeños de genes y el análisis de exomas, pero no está destinada para la secuenciación de genomas completos.

Las plataformas 454 y SOLID están prácticamente ya en desuso. 454 Life Sciences, comercializada por Roche, fue la primera plataforma en salir al mercado. Se basa en la pirosecuenciación: detecta señales luminosas generadas a partir de grupos de pirofosfato liberados tras la polimerización de un nuevo nucleótido complementario a una hebra de DNA molde. SOLiD (*Support Oligonucleotide Ligation Direction*), de Life Technologies, apareció en 2007; incluye una metodología de secuenciación basada en la ligación secuencial de oligonucleótidos marcados (secuenciación por ligación).

Las plataformas MiniON y PacBio son las principales tecnologías de lecturas largas disponibles en el mercado²⁹.

Biopsia líquida

Frente al análisis del DNA en el tejido tumoral, en los últimos años ha surgido la posibilidad de analizar el perfil genómico en DNA tumoral libre circulante (ctDNA) o en células tumorales circulantes. Es la denominada biopsia líquida. Este ctDNA son fragmentos de DNA que se liberan de forma continua desde las células tumorales apoptóticas y necróticas, generalmente de tumores en estadio avanzados mientras que en estadios iniciales, los niveles de ctDNA son bajos. Generalmente el ctDNA se toma del plasma pero es posible tomarlo de otros fluidos biológicos como saliva, orina o derrame pleural.

Entre las aplicaciones del estudio de secuenciación del ctDNA cabría destacar las siguientes: realizar el perfil genómico del tumor en el momento del diagnóstico; monitorizar la respuesta terapéutica de los pacientes, valorando los cambios moleculares más relevantes que pueden ocasionarse durante la progresión del tumor y que podrían relacionarse con el desarrollo de resistencias al tratamiento con la ventaja de ofrecer esta información antes de que la evolución clínica y/o radiológica indiquen progresión y falta de respuesta tumoral; también, detectar enfermedad residual mínima y enfermedad metastásica, que contribuiría a mejorar el diagnóstico y tener una mayor certeza sobre el pronóstico²⁸; determinar la TMB, como biomarcador predictivo de respuesta a la inmunoterapia. Además, la biopsia líquida será fundamental en aquel porcentaje de pacientes (estimado en un 20%) en los que la biopsia tisular no es adecuada para realizar el perfil molecular o cuando no es posible obtener estas muestras o su obtención es arriesgada (por ejemplo, cuando la muestra se debe tomar de tejido cerebral).

El cáncer y su relación con las GAs

El cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades del sistema circulatorio. En España, los tumores responsables del mayor número de fallecimientos son el cáncer de pulmón y el CCR, seguidos a mucha distancia de cáncer de páncreas, el cáncer de mama y de próstata³⁰. En hombres, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer, seguida de CCR, próstata y vejiga, mientras que en mujeres el cáncer de mama la primera causa de muerte por cáncer seguido de CCR, pulmón y páncreas³¹. En cuanto a su incidencia, a nivel mundial, el cáncer de pulmón es el tumor más frecuente seguido del cáncer de mama, CCR y próstata³². En España, las cifras ofrecidas por la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica)³⁰ muestran que el tumor de mayor frecuencia en hombres es el cáncer de próstata, seguido de cáncer de pulmón, CCR y vejiga, mientras que en mujeres los tumores más frecuentes son el cáncer de mama, CCR, útero y pulmón. Los tumores de mayor prevalencia en España son el cáncer de mama, de próstata y de pulmón.

Tradicionalmente, los tumores se clasificaban y trataban en función de su histología pero la llegada de las NGS ha permitido la caracterización molecular de los tumores. Hoy en día se reconoce la gran complejidad genética asociada a los procesos malignos. Diversas alteraciones en genes esenciales en el ciclo celular, en la reparación del DNA y en los mecanismos de proliferación celular estarían implicadas en el origen, diseminación y mantenimiento de los procesos tumorales malignos. Como las células normales tienen mecanismos de protección frente al efecto cancerígeno, parece que sólo cuando se produzca una acumulación de diversas alteraciones en varios genes se podría desarrollar el cáncer. En general, estas GAs pueden agruparse en dos grandes grupos, unas de activación de las vías de señalización celular o de las vías del ciclo celular, y otras de inactivación de los reguladores negativos.

Incluso tumores originados en un mismo órgano pueden tener perfiles genómicos distintos entre sí, y esta diversidad en las GAs es la que condiciona sus propiedades biológicas como su capacidad de proliferación, su agresividad local, su capacidad de invasión tisular, la tendencia a generar metástasis a distancia o su respuesta al tratamiento. Las GAs identificadas serían marcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos de respuesta del tumor a determinados fármacos, de ahí que el estudio del perfil genómico completo se ha convertido en un elemento fundamental en la aplicación de la medicina de precisión.

Entre los genes implicados en el cáncer es posible diferenciar tres grandes tipos. Por un lado, los protooncogenes, que llevan a la producción de proteínas implicadas en los procesos de proliferación y diferenciación celu-

lar. La mutación de esos protooncogenes resulta en variantes alteradas denominadas oncogenes, que llevan a la multiplicación descontrolada de las células. Un segundo grupo son los genes supresores de tumores cuya inactivación está relacionada con la proliferación celular y tienen un papel clave en la apoptosis y control del ciclo celular. El tercer grupo incluye los genes de estabilidad, los responsables de mantener la estabilidad genética. La inestabilidad genómica más estudiada y mejor caracterizada es la MSI. Estos genes de estabilidad se encargan de reparar aquellas alteraciones que ocurren en la replicación del DNA o las que se producen en los cromosomas durante la mitosis, de modo que su inactivación lleva a un aumento en el número de mutaciones. Dentro de este grupo se incluyen los genes reparadores de apareamientos erróneos o *mismatch repair* (MMR). La inactivación de estos genes conduce a una rápida acumulación de mutaciones, y por este motivo se les ha denominado también genes mutadores. Los tumores con deficiente MMR (dMMR) tienen entre 10 y 100 veces más mutaciones somáticas.

En general, se acepta la existencia de tres tipos principales de GAs³³ tumorales que ocurren sobre oncogenes y que se pueden detectar mediante NGS: mutaciones activadoras (ej: las que ocurren en *EGFR* y *BRAF*), las amplificaciones génicas (ej: en *MET* y *HER2*) y las fusiones génicas (ej: en *ALK* y *ROS1*). Las mutaciones activadoras son cambios en la secuencia de DNA de diferente naturaleza y que producen como resultado la activación constitutiva de las señales downstream de proliferación y supervivencia (MAPK, PI3K) que en las células normales están muy estrictamente controladas. Otras GAs son las CNAs, bien amplificaciones o deleciones. Estas alteraciones pueden tener un impacto significativo en la respuesta al tratamiento. Y el tercer tipo de GAs serían los reordenamientos genómicos o genes de fusión, que ocasionan rupturas del gen o la creación de nuevas moléculas oncogénicas (por ejemplo, en *ALK* y *ROS1*) y resultan en una expresión genética o una función genética errónea. Pueden tener, también, un impacto significativo en el tratamiento de algunos tumores.

El análisis de las mutaciones somáticas se ha convertido en una herramienta habitual en la práctica clínica de los tumores sólidos con el fin de identificar las mutaciones sensibles y las resistentes a determinados fármacos.

Aunque en las células tumorales pueden coexistir diferentes GAs, los tumores suelen presentar un *driver* oncogénico dominante o GA conductora, que es fundamental en la activación y mantenimiento del crecimiento tumoral maligno. Una vez que la célula se convierte en cancerígena, sufre una serie de cambios moleculares, metabólicos y estructurales que le permiten sobrevivir, desarrollarse y metastatizar. Entre estos cambios destacan la insensibilidad a los factores inhibidores del crecimiento y autosuficiencia de

factores de crecimiento, con una capacidad de replicación ilimitada y de escapar a los mecanismos de apoptosis, además de su capacidad para invadir tejidos cercanos o a distancia y el incremento en la angiogénesis. Por el contrario, las GAs denominadas *passengers* son alteraciones que sólo acompañan a las *drivers* pero no intervienen en el origen del tumor. El análisis de los genes *drivers* resulta fundamental para clasificar a los pacientes en subgrupos diferentes genéticamente, con una evolución, pronóstico y opciones terapéuticas distintas. Tumores histológicamente similares se diferencian en varios subtipos genómicos.

Muchas de las GA encontradas en el tejido tumoral también se presentan en el DNA de tejido sano y en el DNA de la línea germinal de un paciente, y esto debe ser tenido en cuenta para evitar falsos positivos. Por otro lado, sólo algunas GA son intervenibles, es decir, que son GA sobre las que se puede actuar porque han mostrado susceptibilidad a algún fármaco específico. A medida que se van conociendo nuevas GA intervenibles y desarrollando fármacos dirigidos frente a ellas, se hace necesario disponer de tecnologías capaces de detectarlas de forma rápida y económica y se intentan incorporar a la rutina de diagnóstico.

Sobre la medicina de precisión en oncología

La medicina de precisión o personalizada es un campo todavía en desarrollo que tiene como objetivo diseñar el tratamiento más ajustado a cada paciente en función del perfil biológico del tumor. Pero la medicina de precisión no incluye únicamente el uso de la información genética sino también la proteómica y ambiental, de manera que la integración de toda esa información permita seleccionar el tratamiento óptimo en cada caso. La medicina de precisión ha sido posible gracias al desarrollo de nuevas técnicas que han aportado un gran conocimiento sobre las GAs que subyacen en el cáncer y a la marcada evolución de la bioinformática.

En el caso de los tumores malignos, el uso clínico de estas pruebas permite estudiar y caracterizar de forma individual el tumor de cada paciente y seleccionar la mejor terapia y más específica de acuerdo a las mutaciones encontradas. Se ha ido pasando de aplicar un tratamiento quimioterápico similar a todos los pacientes con un tipo determinado de tumor, a clasificar a los pacientes en función del subtipo tumoral, de las características de los pacientes y de la presencia o no de biomarcadores tumorales y dianas moleculares específicas de cada tumor y cada paciente. Además, se ha comprobado que para una misma mutación genómica, las diferencias en la biología del tumor suponen comportamientos tumorales diferentes ante una misma medicación. A este cambio de conocimiento sobre el cáncer han contribuido fundamentalmente la utilización y el desarrollo de tests específicos que

identifiquen las GAs presentes en el tumor y esto, a su vez, se ha acompañado de una intensa investigación en nuevas terapias dirigidas frente a las dianas terapéuticas clínicamente relevantes.

Generalmente, los tumores se tratan al inicio con la terapia convencional, aunque algunos fármacos dirigidos están ya aprobados para ser utilizados como primera línea terapéutica. Los pacientes con cáncer en estadio avanzado o metastásico suelen haber recibido varias líneas de tratamiento a lo largo del tiempo, y progresivamente la probabilidad de estabilización de la enfermedad se va reduciendo a la vez que aumentan las resistencias al tratamiento recibido. En estos tumores recidivantes o con metástasis a distancia se suelen presentar varias GAs de forma simultánea, por lo que se debería valorar la posibilidad de realizar estudio del perfil genómico con el fin de identificar dianas terapéuticas para las que se disponga de un fármaco dirigido concreto, que sería altamente específico. Además, la presencia de ciertas GA aportarían información pronóstica.

El tratamiento combinado de varios fármacos, tanto de quimioterapia (QT) estándar como terapia dirigida, suele presentar mejores resultados en procesos tumorales avanzados que la monoterapia, además de contribuir a reducir el desarrollo de resistencias al tratamiento. Se espera que estos tratamientos sean más eficaces, puesto que se evita la administración de fármacos no efectivos, y más seguros que la QT convencional, porque van dirigidos contra las células tumorales principalmente, de modo que el daño ocasionado sobre las células sanas resulta inferior al que se produce con la QT convencional aunque en ocasiones también se asocian a EA de toxicidad nada despreciable como algunos EA relacionados con el sistema inmunitario (irAE).

Terapia dirigida

Las terapias dirigidas utilizadas en oncología son fármacos que interfieren en los denominados “dianas moleculares” que participan en el crecimiento, el avance y la diseminación tumoral. La mayoría de estos fármacos suelen ser citostáticos (bloquean la proliferación celular) a diferencia de muchos quimioterápicos citotóxicos (efecto destructor de las células). Las terapias dirigidas se aplicarían, por tanto, en subgrupos de pacientes con una alteración molecular específica que sería la diana de la terapia, pero siempre que exista el tratamiento pertinente o que haya sido aprobado por las autoridades competentes. Las dianas de la terapia dirigida pueden ser GAs o proteínas sobreexpresadas en la superficie de las células tumorales o en células relacionadas con el crecimiento tumoral como las células de los vasos sanguíneos.

La mayoría de las terapias dirigidas son de dos tipos: a) medicamentos micromoleculares o de moléculas pequeñas, capaces de entrar fácilmente en las células debido a su tamaño pequeño y por ello se usan para que actúen

sobre el objetivo o diana ubicados en el interior de las células, por ejemplo, los inhibidores de la angiogénesis, o b) anticuerpos monoclonales humanizados, que no pueden entrar al interior de las células sino que se unen a dianas específicas situadas en la superficie externa. Otros son anticuerpos conjugados porque van unidos a un quimioterápico, denominándose conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC), como el ado-trastuzumab-emtansina (TDM-1 o Kadcyła), que es absorbido por las células tumorales que expresan HER2 en su superficie y las destruye.

Se han desarrollado diferentes terapias dirigidas con distintos mecanismos de acción³³. Estas terapias incluyen inhibidores de transducción de señales, moduladores de la expresión de genes, inductores de apoptosis, inhibidores de apoptosis, inhibidores de la angiogénesis y moléculas que depositan sustancias radiactivas o compuestos químicos tóxicos que destruyen la célula.

La disfunción de proteína quinasas subyace en muchos tipos de cáncer de ahí que estas enzimas constituyan dianas moleculares para los inhibidores de proteína quinasas de vías de transducción implicadas en el tumor. Se han desarrollado algunos anticuerpos monoclonales contra proteína quinasas o contra su receptor, que interrumpen la transmisión de la señal a nivel de receptor. Estos fármacos reducen la proliferación celular tumoral, favorecen la apoptosis y disminuyen la angiogénesis. Se han aprobado varios inhibidores de proteína quinasas para uso clínico. Los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) son producidos por las células tumorales para estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos con los que aportar los nutrientes y el oxígeno necesario para su crecimiento. Estos VEGF se unen a sus receptores, que son otra familia de receptores de tirosina quinasa (RTKs). Entre ellos se incluye bevacizumab (Avastina®).

Entre los inhibidores de serina/treonina quinasas se incluyen los inhibidores mTOR como everolimus y temsirolimus. mTOR forma parte de una ruta de señalización PI3K/AKT/mTOR que regula la respuesta de células tumorales a nutrientes y factores de crecimiento, y controla el aporte de sangre y angiogénesis a través de efectos sobre VEGF en células endoteliales y tumorales. Esta ruta se encuentra activada en muchos tumores, especialmente en aquellos con una elevada actividad de PI3K, o en los que se encuentra mutada el supresor tumoral *PTEN*.

Una de las limitaciones de las terapias dirigidas es el desarrollo de resistencias frente a dichas terapias. Esta resistencia puede ocurrir porque la propia diana sufra una mutación de modo que la terapia dirigida no lo reconozca o bien porque el tumor desarrolle algún mecanismo diferente que le haga escapar del efecto de la terapia dirigida. Para evitar la resistencia, una posibilidad es combinar los fármacos. Otra limitación es que para algunas dianas no es posible, con la tecnología actual, desarrollar fármacos dirigidos contra ellos. Es el caso de la proteína Ras, proteína de señalización cuya

mutación se ha visto implicada en una cuarta parte de los tumores malignos y para la cual no se han podido formular hasta el momento, inhibidores de señalización de Ras.

Se han generado grandes expectativas de poder ofrecer a los pacientes esta terapia personalizada con fármacos que se ajusten a las GAs del tumor concreto que presenta. Es importante saber qué pacientes tienen mayor probabilidad de beneficiarse a estos tratamientos, que suelen ser de elevados costes y no están exentos de eventos adversos. En general se reconoce que esta terapia sólo beneficia a un número escaso de pacientes cuyos tumores han progresado a pesar de recibir los distintos tratamientos convencionales disponibles, pero aún no está claro cómo identificar a este pequeño número de pacientes que se va a ver beneficiado³⁴. En las indicaciones clínicas de los fármacos dirigidos se dice de forma expresa, que antes de iniciar el tratamiento del paciente, deben haberse detectado las alteraciones genómicas mediante “un método validado de determinación” de las mismas. Puesto que es un requisito para el uso de esta terapia dirigida es que el tumor presente las dianas concretas para poder ejercer su efecto, antes de utilizarla resulta necesario realizar el perfil genómico tumoral, siendo las NGS las técnicas más avanzadas para detectar y describir dichas GAs³⁴. Dada la heterogeneidad tumoral, es posible que resulte necesario utilizar más de un panel de genes.

Sin embargo, la decisión de qué fármaco elegir para un tumor concreto puede no ser fácil puesto que en muchos casos se presentan varias posibles dianas terapéuticas. Otro factor que influye tanto en la respuesta al fármaco como en el desarrollo de resistencias al mismo, es la marcada heterogeneidad existente en los tumores sólidos, incluso dentro del mismo tumor, entre unas zonas y otras. Además, se sabe que con la evolución del tumor se generan subclones con diferentes perfiles genéticos y epigenéticos, de modo que si el tumor recidiva, sería aconsejable rebiopsiar porque es posible encontrar GAs diferentes de las identificadas en el tumor inicial. Por tanto, hay que considerar a los tumores como entidades dinámicas y adaptativas que contribuyen a la aparición de resistencias terapéuticas que eventualmente son responsables de las recidivas tumorales³⁵.

Inmunoterapia

La inmunoterapia emplea fármacos que estimulan el sistema inmunitario del paciente para que destruya las células cancerígenas. Han supuesto un cambio sustancial en el manejo oncológico. Su principal ventaja es su capacidad para controlar el proceso tumoral durante periodos largos de tiempo, consiguiendo supervivencias prolongadas incluso en algunos tumores que se consideraban incurables. Para aumentar la efectividad antitumoral es posible combinar dos o más tratamientos de inmunoterapia.

Dentro de la inmunoterapia se incluyen algunos anticuerpos monoclonales, que actúan marcando a las células malignas de modo que facilitan que el sistema inmunitario las localice y destruya, y los inhibidores de puntos de control, que se unen a ciertas moléculas situadas en la superficie de los linfocitos y otras células del sistema inmune, denominadas puntos de control, que necesitan ser activados o desactivados para iniciar la respuesta inmunitaria. Con ello se restaura la capacidad innata del sistema inmunitario para eliminar células tumorales haciendo que se reduzca el crecimiento tumoral, lo que favorece que la respuesta tumoral se prolongue en el tiempo.

Entre los inhibidores de puntos de control se distinguen unos que se dirigen contra la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (*programmed cell death 1*, PD-1 y PD-L1) y otros contra el CTLA4 (*anti-cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4*) bloqueando las vías tumorales que inactivan a las células T citotóxicas. Los inhibidores del PD-1 son nivolumab (Opdivo®) y pembrolizumab (Keytruda®), y los inhibidores del PD-L1 como atezolizumab (Tecentriq®), avelumab (Bavencio®) y durvalumab (Imfinzi®). Entre los que se unen a la proteína CTLA-4 se incluye el ipilimumab (Yervoy®).

Estos fármacos no están exentos de riesgos y se estima que entre un 5-15% (datos de SEOM, 2018) de pacientes desarrolla toxicidades importantes que suelen deberse a la activación del sistema inmune contra el propio organismo en forma de neumonitis o colitis, por ejemplo. Otros EA más frecuentes de estos fármacos (irEA) son la tos, rash cutáneo, fatiga, pérdida de apetito, y otros más serios con repercusión renal, hepática o pulmonar. Los anti-CTLA-4 parecen tener efectos secundarios de mayor gravedad que los anti-PD-1 y anti-PD-L1.

Por esto y por su elevado coste, resulta de gran relevancia clínica valorar si el paciente va a responder o no a este tratamiento^{36,37}.

Entre los biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia se incluyen la TMB y MSI. La TMB mide el número de mutaciones somáticas por megabase de DNA identificadas en el DNA codificante tumoral. Se asume que a mayor número de mutaciones, mayor es la probabilidad de que estén presentes mutaciones carcinogénicas¹³. Mediante las NGS es posible determinar la TMB y cuanto mayor es la región secuenciada, más exacta es su cuantificación. En muchos tumores malignos se ha comprobado una alta TMB, especialmente en NSCLC, carcinoma urotelial o melanoma, asociada a exposiciones medioambientales que son factores de riesgo de mutaciones en el DNA y contribuyen a la tumorigénesis, como el consumo de tabaco o la exposición a la luz ultravioleta³⁸.

La TMB es un marcador clínico cuantitativo predictivo de buena respuesta tumoral a la inmunoterapia^{39,40}. A mayor TMB se ha observado un mayor beneficio clínico en el paciente tratado con estos fármacos, con mayores tasas de supervivencia global, de supervivencia libre de progresión (PFS)

y de respuesta tumoral^{41,42}. Una actividad anormal en varias vías de señalización celular, incluyendo la reparación del daño del DNA y su replicación, pueden incrementar la tasa global de mutaciones somáticas en el tumor. Los defectos en la reparación del daño del DNA llevan a una acumulación de mutaciones debidas a errores en la replicación y al daño ambiental.

El segundo biomarcador que pueden detectar las NGS es la presencia de MSI. La aparición de microsatélites de tamaño alternativo (anormalmente más largos o cortos) en el DNA tumoral de un individuo que no están presentes en el ADN de la línea germinal es lo que se denomina MSI. Las NGS pueden detectar con gran exactitud la MSI, a partir de muestras de tejido FFPE que deben acompañarse de una muestra de células normales del mismo paciente para documentar la presencia de la inestabilidad. Si no existe tal inestabilidad, se habla de microsatélite estable (MSS). Niveles altos de MSI (MSI-H) se correlacionan con incrementos en la carga antigénica que puede hacer más sensible al tumor a la inmunoterapia⁴³.

La presencia de esta MSI se asocia a errores en la reparación del DNA debidos a mutaciones en los genes MMR, lo que impide que los errores de replicación cometidos por la DNA polimerasa sean reparados. Esto lleva a una elevada tasa de mutación celular, a una acumulación acelerada de mutaciones de nucleótidos y a la alteración en la longitud de la hebra de DNA, que da origen a la MSI. Por eso, la MSI podría ser un marcador subrogado de trastornos en la reparación del DNA. Una alta TMB puede ser debida a dMMR que están asociados a la inestabilidad de microsatélites: Las mutaciones en los genes MMR pueden llevar a incrementos en la incidencia de mutaciones en los microsatélites. Por esto, MSI es un marcador subrogado de trastornos en la reparación del DNA, tales como una dMMR¹³.

Objetivo

El objetivo principal de este informe es valorar la validez diagnóstica y utilidad clínica de F1 o F1CDx como plataformas NGS para el diagnóstico de alteraciones genómicas asociadas a tumores sólidos y su recomendación terapéutica.

Se ha estudiado su validez diagnóstica para detectar las dianas terapéuticas y otras GAs, en comparación con las pruebas de referencia, con otros test de secuenciación convencional o de nueva generación, en pacientes con alguno de los cinco tumores sólidos (NSCLC, cáncer de mama, ovario, CCR y melanoma) para los que F1CDx está aprobado por la FDA como tecnología de diagnóstico complementario.

Asimismo se ha estudiado si su utilización supone un cambio en el diagnóstico y en el manejo terapéutico de los pacientes. Se han analizado la evolución clínica y estado de salud del paciente tras la administración del tratamiento personalizado indicado por F1 o F1CDx. También se han revisado otros aspectos relativos a la terapia como las posibles complicaciones o eventos adversos de la terapia dirigida utilizada, las consecuencias de utilizar unos fármacos y no otros, o el posible retraso en el inicio del tratamiento.

Como objetivos secundarios de este informe, se han realizado revisiones breves narrativas sobre las tecnologías diagnósticas de secuenciación y alternativas a F1 o F1CDx para el análisis genómico de los procesos oncológicos, y sobre las principales alteraciones genómicas que caracterizan a los cinco tumores sólidos ya mencionados y sus correspondientes tratamientos.

Metodología

Se ha realizado una revisión sistemática de la literatura científica sobre efectividad diagnóstica, utilidad clínica y seguridad de las plataformas F1 LDT y F1CDx en pacientes con tumores sólidos, en concreto, en los cinco tumores para los que está aprobado F1CDx como *companion diagnostic*: cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, carcinoma colorrectal, cáncer de ovario y melanoma. Para ello se realizó una búsqueda sistemática de las publicaciones recogidas en distintas fuentes de información aplicando estrategias de búsqueda específicas a cada una de esas fuentes con el fin de localizar toda la evidencia publicada que permita responder a la pregunta de investigación, estructurada siguiendo el concepto PICO (Pacientes, Intervención, Comparador, *Outcomes*-Resultados).

También se ha realizado una revisión breve sobre las alteraciones genómicas asociadas a cada uno de los tumores anteriormente mencionados, sobre las tecnologías NGS y alternativas a F1/F1CDx y sobre las distintas terapias dirigidas e inmunoterapia empladas en el tratamiento de estos tumores.

Fuentes de información y estrategias de búsqueda

La identificación de estudios se realizó mediante una búsqueda de la literatura científica realizada entre el 17/9/2018 y el 21/9/2018. Además, el 19/03/2019 y 5/06/2019 se repitieron las búsquedas para evitar dejar fuera publicaciones nuevas o indexadas con posterioridad a la búsqueda inicial. Se tomó como fecha de inclusión de estudios los publicados a partir de enero de 2012 y se escrutaron las siguientes bases de datos electrónicas:

- Medline (PubMed).
- *Cochrane Database of Systematic Reviews*, de Cochrane Library.
- *Cochrane Central Database of Controlled Trials-Central*, de Cochrane Library.
- DARE (*Database of Abstracts of Reviews of Effects*), *Health Technology Assessment (HTA) Database* y *NHS-EED (National Health System Economic Evaluation Database)*, del *Centre for Reviews and Dissemination (CRD)*.
- Biblioteca Virtual en Salud (BVS).
- Trip (*Turning Research Into Practice*) Database.
- Prospero.

Asimismo, se llevaron a cabo búsquedas en los siguientes registros de estudios clínicos:

- ClinicalTrials (<https://clinicaltrials.gov>), de Estados Unidos.
- International Clinical Trials Register Platform (ICTRP) de la Organización Mundial de la salud (<http://apps.who.int/trialsearch/>).
- EU Clinical Trials Register (www.clinicaltrialsregister.eu).

Por último, se realizó una búsqueda de literatura gris en las páginas web de las principales agencias de evaluación de tecnologías sanitarias (ETS) nacionales e internacionales y organismos regulatorios de productos sanitarios, como los siguientes:

- INAHTA (*International Network of Agencies for Health Technology Assessment*, <http://www.inahta.org/about-inahta/>).
- RedETS (Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del Sistema Nacional de Salud, <https://redets.mscbs.gob.es/>).
- CADTH (*Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health*, www.cadth.ca/).
- AHRQ (*Agency for Healthcare Research and Quality*, www.ahrq.gov/research/index.html).
- NICE (*National Institute for Health and Care Excellence*, www.nice.org.uk).
- FDA (*Food and Drug Administration*, www.fda.gov).

Para la identificación de estudios se diseñaron diferentes estrategias de búsqueda, adaptadas a cada fuente de información, combinando términos MESH (para Medline) y texto libre, junto a diferentes operadores booleanos y de truncamiento. Se seleccionaron publicaciones en inglés, francés y español. Las estrategias empleadas en las principales bases de datos se muestran en el anexo III.

Para la tecnología, se emplearon los siguientes términos de búsqueda en inglés y español, en función de la fuente de información: “*FoundationOne*”, “*Foundation Medicine*”, “*FoundationCDx*”, “*next-generation sequencing*”, “*high-throughput sequencing*”, “*comprehensive genomic profiling*”, “*hybrid-capture-based sequencing*”, “*CGP*”, “*NGS*”, “secuenciación de nueva generación”, “secuenciación de segunda generación”, “perfil genómico completo”. Para los tumores se utilizaron los siguientes términos: “colon”, “colorectal”, “lung”, “breast”, “ovarian”, “ovarian”, “melanoma”, “cancer”, “neoplasm”, “tumor”, “tumour”, “carcinoma”, “adenocarcinoma”, “squamous”, “non-small cell lung cancer”, “NSCLC”.

También se revisaron los listados de referencias bibliográficas de los estudios incluidos y de los artículos más relevantes con el fin de recuperar estudios que no hubieran sido localizados a través de las estrategias de búsquedas mencionadas.

Las referencias bibliográficas se gestionaron a través del gestor bibliográfico EndNote X9.

Selección de estudios

Durante este proceso de incorporación de las referencias localizadas en la búsqueda al gestor bibliográfico, se realizó un primer cribado de las referencias duplicadas de manera automática y después de forma manual. A continuación, dos revisoras (EGC, MCR), de forma independiente y aplicando los criterios de inclusión y exclusión, realizaron una selección inicial de artículos a partir de la lectura de los títulos y resúmenes. Los desacuerdos se resolvieron por consenso o por discusión con la tercera revisora (CAB). Aquellos artículos inicialmente seleccionados como relevantes fueron recuperados a texto completo para su lectura y así decidir si se ajustaban a los criterios de inclusión y exclusión. Esta etapa del proceso de selección fue realizada, de forma independiente, por las tres revisoras.

Ni durante el proceso de selección ni el posterior de extracción de datos se enmascararon los nombres de los autores, de las instituciones ni de las revistas de publicación. No se contactó con los autores o investigadores de publicaciones en marcha o no publicadas.

Criterios de inclusión de los estudios

Tipo y diseño de los estudios

Artículos originales de estudios de cualquier diseño que incluyeran un número mínimo de 10 pacientes. También se consideraron las editoriales, cartas al editor, revisiones narrativas, revisiones sistemáticas, meta-análisis e informes de evaluación de tecnologías sanitarias.

Población

Pacientes de ambos sexos, sin límite de edad, con diagnóstico de cáncer de pulmón, mama, CCR, ovario o melanoma en estadios avanzados o metastásicos.

Intervención

FoundationOne® o FoundationOne CDx™.

Comparadores

Se consideraron como comparadores otras pruebas diagnósticas de uso en la práctica clínica con las que se realice habitualmente el diagnóstico como

- plataformas de secuenciación genómica de nueva generación como Caris Molecular Intelligence® (CMI), Guardant 360® (G360), MSK-IMPACT, OncoDeep®, OncoPrint Dx®, Paradigm Cancer Diagnostic® (PCDx).
- otros paneles de genes como LungSeg, Oncopanel, SNaPshot, PanCan, Smart Genomics, TruSeq.
- otras pruebas diagnósticas como FISH, IHC, secuenciación Sanger.

Medidas de resultados

- Número y tipo de mutaciones detectadas.
- Intervalo de tiempo entre la obtención de las muestras y la realización del index test y el test de referencia. Tiempo requerido por cada prueba para ofrecer los resultados.
- Modificaciones del diagnóstico inicial.
- De efectividad diagnóstica: sensibilidad y especificidad, o los datos para poder calcular la tabla 2x2. Reproducibilidad.
- Detección de diana terapéutica y elección de tratamiento personalizado.
- Cambio en las decisiones terapéuticas o en el manejo de los pacientes después del resultado obtenido con FoundationOne® o FoundationOne CDx™.
- Mortalidad, supervivencia global, PFS, supervivencia libre de progresión tumoral.
- De seguridad: complicaciones asociadas a la técnica de obtención de la muestra. Toxicidad del tratamiento seleccionado. Toxicidad evitada por descartar un tratamiento no efectivo. Toxicidad o complicaciones debidas al posible retraso en el inicio del tratamiento en espera de los resultados de F1 o F1CDx.
- Otros resultados: disponibilidad de tratamiento dirigido.

Criterios de exclusión

- Estudios que no ofrecían datos relacionados con ninguna de las medidas de resultado consideradas en los criterios de inclusión.
- Estudios que sólo presentaban resultados de investigación experimental o en animales, o que se referían únicamente a aspectos técnicos.
- Estudios duplicados, con los mismos pacientes y/o datos, o estudios desfasados por publicaciones posteriores de la misma institución.
- Estudios no publicados aunque ya hubieran sido aceptados para su publicación.

Extracción de datos

La extracción de datos de los estudios finalmente seleccionados se realizó de forma independiente por las tres investigadoras, resolviendo los desacuerdos por consenso. Los datos y resultados de los estudios incluidos se extrajeron utilizando un formulario elaborado específicamente para este informe, a partir del cual se elaboraron las correspondientes tablas de evidencia. En este formulario se recogieron los datos y las variables más importantes relacionadas con los objetivos generales y específicos de este informe:

- Características generales del estudio, datos bibliométricos: autor principal, año de publicación, país donde se realizó el estudio, periodo de estudio, diseño del estudio, uni o multicéntrico, tiempo de seguimiento y criterios de inclusión y exclusión de cada estudio.
- Características de la población: número de pacientes, edad, sexo, tipo de tumor, estadio, histología y localización tumoral, tratamientos previos recibidos.
- Variables relacionadas con las NGS, F1o F1CDx y con otras plataformas o pruebas diagnósticas utilizadas y las de referencia: tipo de muestra, lugar de obtención (sitio primario del tumor, metástasis, DNA libre circulante o de células tumorales circulantes), forma de obtención de la muestra (punción aspiración con aguja fina, biopsia excisional, biopsia core, cirugía), tiempo desde la extracción de la muestra empleada por los diferentes tests diagnósticos, tiempo desde el análisis de la muestra hasta el resultado del test.
- Variables de resultado: número de pacientes con alteraciones interve-nibles, número y tipo (amplificaciones, deleciones, inserciones, fusiones, reordenamientos, truncamientos o sustituciones) de alteraciones genómicas detectadas, carga mutacional tumoral, tratamientos propuestos (número de fármacos y fármacos dirigidos) por F1 o F1CDx y por las otras plataformas o pruebas diagnósticas utilizadas, concordancia entre las GAs detectadas y los fármacos sugeridos por F1 o F1CDx y otras plataformas NGS o técnicas de diagnóstico convencionales, número de pacientes candidatos a la terapia dirigida propuesta por las NGS, número de pacientes que finalmente recibió la terapia dirigida, motivos por los que los potenciales candidatos no fueron tratados.
- Variables de resultado en salud para el paciente:
 - La supervivencia global se define como el tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad (generalmente, de la enfermedad metastásica) hasta la fecha del último seguimiento o del fallecimiento del paciente.
 - La PFS se define como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la progresión de la enfermedad (sea ésta detec-

tada mediante estudio radiológico o por sintomatología clínica) o muerte.

- Duración del tratamiento.
- Respuesta tumoral: completa, parcial, enfermedad estable, progresión y respuesta objetiva (suma de respuestas completa y parcial), y la duración de la respuesta. También se registra la forma de valoración de la respuesta tumoral (en la mayoría de los casos utilizando los criterios RECIST, *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*).
- Influencia en el manejo clínico del paciente: cambio (%) de pacientes en los que las NGS modificaron el diagnóstico. Influencia en la toma de decisiones terapéuticas: cambio (%) del tratamiento previsto por otro indicado por la NGS. Eficacia o efectividad de este tratamiento dirigido vs tratamiento ineficaz pautado por los resultados de la NGS vs tratamiento con efectos adversos.
- EA ocasionados por los fármacos dirigidos: número de EA, tipo, grado de severidad de acuerdo a la clasificación CTCAE (*NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events*).

Síntesis de los datos

La información recopilada fue resumida y analizada a través de una síntesis narrativa con tabulación de datos y resultados de los estudios incluidos.

Resultados

Revisión de las GAs y terapias en los cinco tumores sólidos

A continuación se presenta la revisión realizada sobre el estado actual de las principales GAs asociadas a cada uno de los cinco tumores sólidos considerados en este informe y las terapias correspondientes, lo que daría cumplimiento al objetivo secundario de este informe pero que presentamos en primer lugar de cara a facilitar la interpretación de la revisión sistemática sobre efectividad y seguridad de F1/F1CDx.

GAs en cáncer de pulmón y sus tratamientos

Un 85-90% de los tumores pulmonares son no microcíticos o NSCLC, y dentro de este grupo se pueden diferenciar 3 tipos histológicos: epidermoide o de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes⁴⁴. Se estima que el 60% de los pacientes con NSCLC son diagnosticados en fases avanzadas, bien como tumores localmente avanzados (estadío IIIB) o metastásicos (estadío IV) para los cuales no se dispone de tratamiento curativo, por lo que el pronóstico es muy negativo con tasas de supervivencia a los 5 años inferiores al 10%^{45,46}.

El abordaje del cáncer de pulmón empezó a cambiar cuando se descubrió, en 2003, la primera mutación tratable en el gen *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico), que respondía muy satisfactoriamente a los inhibidores del dominio tirosina-quinasa (TKIs) de EGFR. A partir de este descubrimiento la utilización de la información molecular y la medicina personalizada han conseguido un marcado impacto positivo en la evolución de estos pacientes, utilizando dos posibles estrategias terapéuticas: las terapias dirigidas contra tumores con mutaciones activadoras y la inmunoterapia.

En los últimos años, se ha producido el descubrimiento de un número elevado GAs que llevan al inicio y progresión de este tipo de tumor, y este conocimiento ha facilitado el rápido desarrollo y uso de otras opciones terapéuticas^{33,47}. Por esto, antes de iniciar el tratamiento del cáncer de pulmón, resulta interesante realizar el estudio molecular que hoy día contempla dos tipos de test diferentes: unos dirigidos a identificar posibles GAs dianas terapéuticas y otros que analizan posibles biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia. Tanto la FDA como la EMA (*European Medicines Agency*) han ido aprobando diferentes fármacos, tanto de terapia dirigida como de inmunoterapia, que han supuesto una mejora sustancial en la respuesta tu-

moral y en la supervivencia del paciente asociado a una menor toxicidad en comparación al tratamiento convencional.

El estudio del perfil genómico en pacientes con tumores avanzados ofrecería la ventaja de instaurar un tratamiento dirigido de forma rápida evitando el retraso en el inicio de tratamientos que requirieran otras pruebas diagnósticas, algunas de las cuales podrían ser invasivas, e incluso ayudaría a valorar la posibilidad del paciente de desarrollar resistencias a ciertos fármacos⁴⁸. El cáncer de pulmón es el tumor genéticamente más complejo, tal como ha confirmado el TCGA^{49,50}, y esta heterogeneidad, con células que responden de manera desigual, dificulta el tratamiento. También es preciso tener en cuenta que muy raras veces la terapia dirigida conduce a la curación de los pacientes sino que con el transcurso del tiempo prácticamente la totalidad de los tumores desarrolla resistencia a esta terapia, lo que termina ocasionando recurrencias y la progresión del tumor.

El principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón, tanto adenocarcinomas como carcinomas escamosos, es el consumo de tabaco aunque un 10-15% de adenocarcinomas pulmonares se da en pacientes no-fumadores⁵¹. La gran mayoría de los tumores de pulmón relacionados con oncogenes son adenocarcinomas, un 60% de los cuales presenta *drivers* oncogénicos. Según recoge TCGA *Research Network*, los NSCLC son tumores con una alta tasa de mutaciones somáticas, con una mediana de 8,7 mut/Mb en los adenocarcinomas y de 9,7 mut/Mb en los escamosos^{49,51}. En general, la presencia de alguna GA en los NSCLC suele ser excluyente de la presencia de otras. Existen determinadas características de la población o del tumor que se asocian a CRGAs porque son diana de terapias dirigidas.

Los genes más frecuentemente afectados

Los genes más frecuentemente afectados en el NSCLC son *KRAS* (25-30%), *EGFR* (10-35%), *ALK* (5-10%), *BRAF* (2-4%), *ROS1* (1-2%) y *RET* (1-2%)³³.

Las mutaciones en *EGFR* se han detectado con más frecuencia en un subgrupo de pacientes con adenocarcinoma bronquiolo-alveolar, mujeres jóvenes no fumadoras y de raza asiática⁵². En torno al 90% son deleciones en el exón 19 (19 Del) o mutación por sustitución L858R en el exón 21. El receptor EGFR es una glicoproteína transmembrana con actividad TK, codificada por un gen localizado en el cromosoma 7p12. Es uno de los 4 componentes de la familia de receptores TK HER (*human epidermal receptor*). La activación del EGFR está relacionada con la progresión tumoral maligna, con la inducción de la angiogénesis y con la inhibición de la apoptosis.

Entre los reordenamientos en *ALK* (*anaplastic lymphoma quinasa*, quinasa del linfoma anaplásico), un 95% de los casos se produce por la rotura de los genes *ALK* y *EML4* (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) y su posterior fusión en dirección opuesta: inversión cromosómica en

2p21 y 2p23. El resultado final es el oncogén de fusión *EML4-ALK* que inhibe la apoptosis y favorece la proliferación celular tumoral. La translocación *ALK* determina la expresión de la proteína de fusión resultante y la señalización aberrante de *ALK*. Los pacientes con tumores *ALK* positivos presentan con mayor frecuencia ciertas características: suelen ser pacientes más jóvenes, no fumadores o de bajo consumo tabáquico, mujeres y con predominio del tipo histológico de adenocarcinoma. Muchos progresan desarrollando metástasis cerebrales, lo que supone un deterioro en la calidad de vida y un pésimo pronóstico. De hecho, se estima que en el momento del diagnóstico, un 30% de pacientes ya presenta metástasis en el sistema nervioso central (SNC). Generalmente, la presencia del reordenamiento *ALK* es excluyente de la mutación en *EGFR*.

Las mutaciones *BRAF* (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) son mucho más frecuentes en los adenocarcinomas en pacientes jóvenes y fumadores. Aproximadamente la mitad corresponden a la mutación V600E y la otra mitad son mutaciones no-V600E, a diferencia del melanoma donde las mutaciones *BRAF* son mucho más frecuentes (afectarían a un 40-60% de casos) y de ellas, el 90% son V600E. En los NSCLC con esta mutación es raro encontrar mutaciones *EGFR* o *KRAS*, ni reordenamientos *ALK* y *ROS1*.

Los reordenamientos *RET* se dan sobre todo en los adenocarcinomas, en pacientes no fumadores o con una historia de mínima exposición al tabaco, y suelen no presentar otras GAs. La fusión más frecuente con *KIF5B* (en el 72% de los casos).

Los tratamientos dirigidos

Los primeros TKIs anti *EGFR* aprobados para NSCLC con mutaciones activadoras de *EGFR* fueron erlotinib (Tarceva®) y gefitinib (Iressa®). Ambos son inhibidores reversibles del dominio TK. El TKI de segunda generación afatinib (Gilotrif®) y el de tercera generación osimertinib (Tagrisso®) son inhibidores irreversibles. Afatinib es un potente TKI selectivo e irreversible de la familia ErbB: *EGFR* (ErbB1), *HER2* (ErbB2), *ErbB3* y *ErbB4*, aprobado por la FDA para nslc avanzado o metastásico con mutaciones activadoras del *EGFR* que no hayan recibido tratamiento previo y para NSCLC escamosos que dejen de responder al tratamiento con QT basada en platino. El dacomitinib (Vizimpro®) está aprobado por la EMA para NSCLC con mutación *EGFR*.

En general, los TKIs anti-*EGFR* actúan interrumpiendo la transducción de la señal de crecimiento, logrando así su efecto antitumoral y han demostrado incrementos en la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón avanzado o recurrente en comparación a la QT convencional. Están indicados como tratamiento de primera línea en NSCLC metastásico positivos a *EGFR* Del 19 o que presentan la mutación L858R.

Alrededor del 75% de pacientes con esta mutación responde a estos inhibidores, mientras que sólo un 10% de pacientes sin esta alteración en EGFR respondería a estos fármacos. En cualquier caso, con el tiempo los pacientes dejan de responder y la enfermedad tumoral progresa³³. Se desconoce el proceso que ocasiona esta resistencia a los inhibidores de *EGFR* aunque parece que estarían implicados varios factores, como las mutaciones secundarias del *EGFR* especialmente la mutación T790M (sustitución de un residuo de metionina por uno de treonina en la posición 790) del dominio quinasa en el exón 20 del *EGFR*⁵². Esta mutación es muy rara en pacientes que no han recibido tratamiento con TKIs anti *EGFR* y, sin embargo, es la causa más frecuente (en un 50%-60% de los casos) de resistencia a dicho tratamiento, de modo que su determinación es obligatoria en los pacientes con recidiva tumoral. Para ello es posible realizar un test de ctDNA, aunque la sensibilidad parece baja, por lo que ante resultados negativos se recomienda realizar el estudio sobre biopsia tisular que, además, permite estudiar otras posibles causas de resistencia como la amplificación *MET*, observada en un 5% de casos, o amplificaciones *HER2*, detectadas en casi un 10%⁴⁴. El osimertinib fue aprobado por la FDA a finales de 2015 para pacientes con NSCLC con la mutación T790M resistente a los fármacos anti-EGFR. Además, el osimertinib demostró una buena capacidad de penetración en SNC y un mejor perfil de toxicidad en comparación a los otros TKIs anti EGFR. Por esto y ante los buenos resultados de respuesta tumoral y alargamiento en la PFS frente a los otros TKIs anti EGFR, en 2018 el osimertinib fue aprobado como terapia de primera línea en NSCLC con mutaciones EGFR, aunque previamente es necesario constatar la presencia de dicha mutación mediante alguna prueba validada a partir del DNA tumoral, bien de tejido o de DNA circulante, entre las cuales estaría F1CDx.

Si el tumor progresa pero no se detecta la presencia de la mutación T790M o si el tumor progresa tras recibir osimertinib, el tratamiento estándar sería la QT basada en platino; también parece efectiva la combinación de atezolizumab+bevacizumab+QT.

Otra mutación *EGFR* es la inserción en el exón 20. Se da en un 4-9% de pacientes con NSCLC. Su presencia parece que confiere resistencia intrínseca al erlotinib y gefitinib, y el fármaco que ha demostrado mayor efectividad en los pacientes que presentan esta mutación es el pozotinib³³.

Los tumores pulmonares en los que se identifican reordenamientos *ALK* suelen ser muy sensibles al tratamiento con TKIs anti *ALK*⁵⁴ como crizotinib (Xalkori®), ceritinib (Zykadia®), alectinib (Alecensa®) o brigatinib (Alunbrig®), todos ya aprobados para uso en humanos por la EMA, tanto en pacientes no tratados previamente como en los que ya han recibido algún tratamiento previo. Sin embargo, antes de emplear estos fármacos debe confirmarse la presencia de esta GA por algún método validado. Parece que alec-

tinib y brigatinib tendrían mejores resultados clínicos y, por esto, se prefieren como primera línea, y si el paciente ya ha recibido QT, entonces es el crizotinib el fármaco de elección. Si progresan tras TKIs anti ALK, se podrá utilizar otro de los TKIs que no se hubieran utilizado con anterioridad o QT basada en platino o la combinación de atezolizumab, bevacizumab y QT.

El crizotinib es un TKIs frente a ALK y MET. Fue el primer fármaco aprobado cuya diana terapéutica era el ALK. Fue aprobado en 2012 por la FDA para el tratamiento del NSCLC avanzado positivo para ALK previamente tratado, por las altas tasas de respuesta tumoral e incrementos en la PFS mediana en comparación al tratamiento con pemetrexed y cisplatino o carboplatino⁵⁵, además de asociar una buena calidad de vida y menos efectos adversos⁵³. Posteriormente, en 2015 se aprobó su uso como terapia de primera línea en pacientes con NSCLC y ALK positivo.

Sin embargo, y a pesar de una buena respuesta inicial, es frecuente que en torno al año los tumores desarrollen resistencia al crizotinib. Esta resistencia se ha visto asociada a mutaciones ALK en un 20% de los casos y a amplificaciones ALK en un 8%. Para estos casos resistentes al crizotinib se pueden utilizar los TKIs anti ALK de segunda generación (ceritinib, alectinib y brigatinib), aunque también un 50% de pacientes termina desarrollando resistencias a los mismos, estando indicado para estos casos el uso del lorlatinib, un TKIs anti ALK potente y selectivo de tercera generación.

El ceritinib es un inhibidor oral altamente selectivo y potente de ALK, que fue aprobado para su uso en monoterapia en adultos con NSCLC avanzado ALK positivo, que no hubieran recibido tratamiento previo, por haber demostrado mayor efectividad que la QT convencional. También está indicado si ya han recibido crizotinib. Además, frente al estándar de tratamiento del NSCLC avanzado que hoy día es el crizotinib, el ceritinib resulta más efectivo porque permite prolongar el tiempo hasta la progresión, especialmente cuando existe diseminación cerebral por su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica^{56,57}.

El alectinib obtuvo su aprobación por la EMA en diciembre de 2017, para su uso en pacientes con NSCLC ALK positivo previamente tratados con crizotinib, pero también está aprobado como primera línea en adultos con NSCLC avanzado positivo para ALK. Se trata de un TKI, altamente selectivo de ALK y RET, que inhibe la actividad de la ALK bloqueando las vías de señalización consecutivas, incluidas STAT3 y PI3K/AKT y la inducción de la apoptosis. Tiene actividad frente a las formas mutadas de la enzima ALK, incluyendo las mutaciones que ocasionan resistencia al crizotinib. Parece tener una efectividad superior a crizotinib en pacientes con y sin diseminación al SNC previamente no tratados. No existen comparaciones directas entre alectinib y ceritinib, pero la comparación indirecta ajustada también sugiere que alectinib tiene una efectividad superior por lo que se

considera el tratamiento de elección en pacientes con NSCLC positivos para ALK que no hayan recibido tratamiento previo⁵⁸.

Los tumores positivos a reordenamientos ROS1 son altamente sensibles al tratamiento con inhibidores ROS1⁵⁹. El crizotinib ha sido aprobado por la FDA y la EMA para tratamiento de adenocarcinomas metastásicos con reordenamientos *ROS1* tanto de primera como de segunda línea que no hubieran sido tratados con este fármaco previamente. A pesar de una buena respuesta inicial al crizotinib, en muchos casos se ha descrito que en unos dos años la mayoría de pacientes desarrollará resistencia a este fármaco y ésta se asocia en un 50% a mutaciones *ROS1*, como G2032R y D2033N. Para estos casos resistentes se propone el cabozantinib (Cometriq[®]) que es un inhibidor multiquinasa (MKI) aunque su uso puede verse limitado por una baja tolerancia clínica al fármaco. Otra opción en pacientes resistentes es iniciar tratamiento con ceritinib.

Cuando se identifica la mutación BRAF V600E se recomienda la administración de un tratamiento combinado con los inhibidores BRAF/MEK dabrafenib (Tafinlar[®]) y trametinib (Mekinist[®])⁴⁴. Estos fármacos se dirigen contra dos TK diferentes de la vía RAS/RAF/MEK/ERK. Trametinib es un inhibidor reversible de la activación de *MEK1* y *MEK2*. Dabrafenib es un inhibidor de algunas formas mutadas de las quinastas *BRAF* y algunas mutaciones en el gen *BRAF*, incluyendo *BRAF V600E*.

Los MKIs RET como el cabozantinib, lenvatinib (Lenvima[®]) y vandetanib (Caprelsa[®]) han demostrado su utilidad en tumores pulmonares con reordenamientos *RET*.

Otras GAs poco frecuentes se dan en los genes *MET* en un 2-3% de los NSCLC y se tratarían con crizotinib o cabozantinib, aunque se están investigando otros fármacos como glesatinib o capamatinib; las mutaciones *ERBB2*, para las que se indicaría tratamiento con trastuzumab o afatinib; alteraciones en el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGFR), amplificaciones FGFR1 en cáncer escamoso; mutaciones somáticas en FGFR2 y FGFR3, tanto en adenocarcinoma como en carcinoma escamoso; genes de fusión FGFR3-TACC3 en ambos tipos, especialmente en no fumadores); los reordenamientos *NTRK* se dan en tan sólo un 0,1% de NSCLC y en ellos estarían indicados larotrectinib o entrectinib.

Por último, hay que señalar que las mutaciones KRAS se dan en un porcentaje elevado de NSCLC (25-30%), de las cuales la mayoría se presentan en el exón 2. Se trata del subtipo con peor pronóstico y hasta el momento actual, estas alteraciones en *KRAS* no tienen un tratamiento específico por lo que las estrategias terapéuticas en estos pacientes deben centrarse en las demás dianas terapéuticas.

Por todo ello, para todos los NSCLC no-escamosos en estadio avanzado está indicado realizar de forma sistemática un estudio del perfil genómico

antes de iniciar el tratamiento. Dicho análisis genómico debería incluir las mutaciones *EGFR*, los reordenamientos *ALK* y *ROSI* y las mutaciones *BRAF* puesto que su identificación permitiría aplicar una terapia dirigida específica, que ha demostrado un claro beneficio clínico y un cambio sustancial en el pronóstico de estos pacientes^{60,61}. En aquellos casos en los que se producen recidivas o progresión tumoral a pesar del tratamiento, el estudio genómico se realizará con la intención de identificar aquellas GAs relacionadas con la resistencia a los fármacos empleados con la intención de sustituirlos por otros más efectivos.

Por el contrario, para los tumores escamosos no estaría indicado realizar, de forma rutinaria, el estudio del perfil genómico, salvo en los pocos casos en que este tipo histológico se diera en no fumadores. El carcinoma escamoso también suele presentar una alta carga mutacional⁵⁰ y gran complejidad genómica, pero las GAs que presenta son diferentes a las del adenocarcinoma; la mayoría muestra mutaciones *TP53*, en la familia quinasa *FGFR* y en varias vías de señalización celular. Parece que sólo seis genes coincidirían entre ambos tipos histológicos: *TP53*, *CDKN2A*, *PIK3CA*, *RBI*, *ARID1A* y *NFI*, aunque los tres primeros se presentan con una frecuencia significativamente mayor en los escamosos⁵¹.

En algunos tumores de pulmón en estadios avanzados y especialmente en el adenocarcinoma, se han descrito incrementos de la expresión del VEGF. El gen del VEGF está localizado en el cromosoma 6p21.3 y resulta fundamental en el proceso de la angiogénesis. El VEGF actúa uniéndose a su receptor (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) localizado en las células endoteliales, con actividad TK. Para estos casos se indicaría el tratamiento con inhibidores de la angiogénesis como bevacizumab (Avastin[®]) o vandetanib (Caprelsa[®]). El bevacizumab se administra combinado con QT, y no está recomendado para tumores de células escamosas por el alto riesgo de sangrado.

En los pacientes con NSCLC metastásicos que no presentan mutaciones *drivers* estaría indicada la inmunoterapia. En estos casos resulta interesante disponer de un biomarcador predictivo de la respuesta tumoral a la inmunoterapia. La FDA aprobó en 2015 el uso de los inhibidores de puntos de control. Algunas características moleculares en los tumores se han asociado a una mejor respuesta clínica a los inhibidores del PD-1. La presencia de un TPS (*tumor proportion score*) $\geq 50\%$, es decir, una tinción de la membrana de las células tumorales altamente positiva para PD-L1 (elevada expresión de la proteína PD-L1), detectada por IHQ, se considera un buen biomarcador predictivo para inmunoterapia. De hecho, existe una relación entre la expresión de PD-L1 y la probabilidad de beneficio clínico con los agentes anti-PD-1 y anti-PD-L1, en primera y segunda línea terapéutica. Sin embargo, no siempre la expresión del PD-L1 por sí sola es

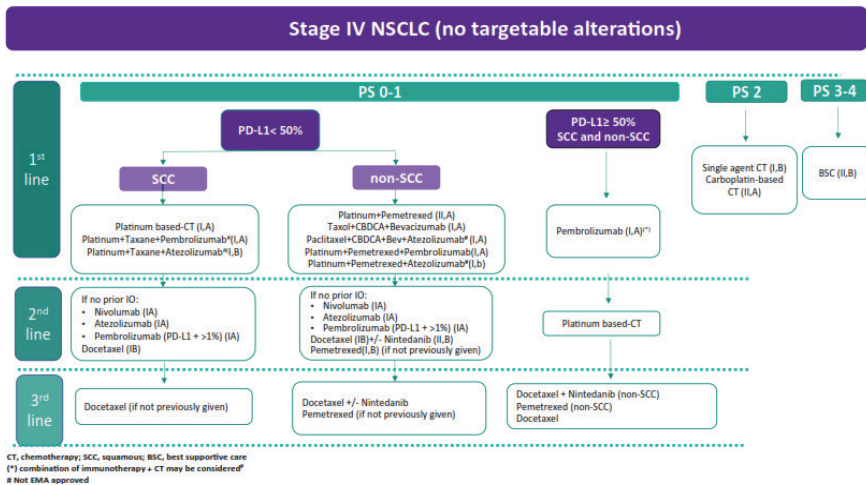
un buen predictor ya que menos de la mitad de los pacientes seleccionados experimentará beneficio clínico y, por el contrario, algunos pacientes con resultados negativos para PD-L1 son potenciales respondedores a esos fármacos anti PD-1/PD-L1. Para todos los pacientes con NSCLC avanzado está indicado determinar el nivel de expresión del PD-L1 en las células tumorales de cara a establecer un tratamiento con pembrolizumab⁶². En cambio, para administrar nivolumab o atezolizumab en segunda línea, no es un requisito realizar tests para PD-L1. La presencia de una TMB muy elevada es también un factor predictor independiente de buena respuesta a la inmunoterapia^{13,63}. Se han establecido algunos puntos de corte de TMB, como 16 mut/Mb o 10 mut/Mb^{64,65}.

El pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo inmunoglobulina G4 que se une al receptor PD-1 con lo que evita la unión y activación de los ligandos PD-L1 y PD-L2. Esto lleva a la activación de respuestas inmunitarias mediadas por las células T contra las células tumorales, lo que contribuye a reducir el crecimiento tumoral, es decir, que el pembrolizumab potencia las respuestas de los linfocitos T, incluyendo las respuestas antitumorales, mediante el bloqueo de PD-1. Fue el primer fármaco aprobado como terapia tumoral agnóstica, es decir, válido para cualquier tumor con esta GA, porque la presencia de dicha alteración predice la buena respuesta del tumor al fármaco, independientemente de su lugar de origen o del tipo histológico. Está indicado en pacientes de cualquier edad con tumores sólidos metastásicos no candidatos a cirugía que presenten MSI-H o dMMR. Los tumores que tienen MSI-H o dMMR presentan dificultad para reparar el daño del DNA por lo que muestran mutaciones con mucha frecuencia. Estos cambios hacen que sea más fácil para las células inmunitarias encontrar y atacar el tumor. El pembrolizumab está aprobado como tratamiento de primera línea para pacientes con NSCLC metastásico, tanto para los escamosos como no escamosos, en ausencia de mutaciones intervenibles y con positividad para PD-L1 en el estudio IHQ siempre que el porcentaje de expresión en las células tumorales sea $\geq 50\%$, en pacientes con una esperanza de vida de al menos 3 meses y un estado funcional ≤ 1 según la escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*)^{33,44}. Este tratamiento se asocia a mayor respuesta tumoral, mayor supervivencia global y PFS. No obstante, no todos los pacientes se benefician de este fármaco y, además, sólo un tercio de pacientes con NSCLC avanzado presenta niveles de PD-L1 $\geq 50\%$ ⁶⁶.

Para aquellos tumores que presentan mutaciones de *EGFR* o translocaciones *ALK*, el pembrolizumab podría estar indicado siempre que hayan recibido previamente tratamiento con un TKIs específico.

En los tumores con un TPS de PD-L1 $< 50\%$ el tratamiento depende de si son escamosos o no escamosos. Ver figura 4.

Figura 4. Tratamiento del NSCLC en estadio IV sin GAs intervenibles.
Tomada de la guía clínica publicada por la SEOM en 2019⁶⁶.



El nivolumab es un anticuerpo anti-PD-1 aprobado por la FDA como segunda línea de tratamiento para NSCLC no escamoso en diciembre de 2014 y para el escamoso en marzo de 2015. En octubre de 2016 la FDA aprobó el uso del inhibidor de PD-L1 atezolizumab para el tratamiento de NSCLC metastásico refractario a QT basada en platino.

En pacientes con NSCLC avanzado, tanto escamosos como no-escamosos, y alta TMB (>10 mut/Mb) una opción terapéutica de primera línea es nivolumab, combinado con ipilimumab independientemente de los niveles de PD-L1, porque se asocia a mayor PFS y menor toxicidad que la QT⁶⁴. Ambos son inhibidores de puntos de control con mecanismos de acción complementarios.

A pesar de que se ha ido descubriendo un mayor número de mutaciones intervenibles en los tumores pulmonares acompañado de un desarrollo de fármacos dirigidos e inmunoterapia frente a dichas GAs, en la literatura se reconoce que no existe tratamiento para casi la mitad de los NSCLC, incluyendo aquellos con mutaciones *KRAS*.

En el seguimiento de los NSCLC hay que valorar la respuesta tumoral al tratamiento, estudiar si aparecen nuevas GAs diferentes a las encontradas en el tumor primario y analizar si posibles progresiones tumorales son debidas a resistencia adquirida frente a los fármacos administrados. Para este seguimiento se puede analizar el perfil genómico de muestras de DNA libre circulante, que se considera más adecuado que el uso de células tumorales circulantes. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, para estudiar la presencia de la mutación T790M, aunque si el resultado fuera negativo estaría indicado realizar el estudio sobre tejido tumoral de biopsia por el riesgo de falsos negativos en los resultados del estudio en plasma.

GAs en cáncer de mama y sus tratamientos

Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama se considera una enfermedad heterogénea en la que pueden diferenciarse varios tipos de tumores según los receptores presentes en las células tumorales y esto tendrá repercusión terapéutica. Según la clasificación molecular establecida por el consenso internacional de expertos reunidos en St. Gallen en 2013⁶⁷, el cáncer de mama se clasificaba en los siguientes subtipos:

1) Tumores con receptores hormonales positivos (HR+): el subtipo luminal A es positivo a receptores de estrógenos (ER) y receptores de progesterona (PR), negativo a HER2 y presenta niveles bajos de Ki67; responde bien a terapia hormonal y es el de mejor pronóstico. El subtipo luminal B incluye el tipo HER2 negativo (ER+, HER2 negativo y al menos uno de los siguientes Ki67 alto o PR negativo) y otro tipo, HER2+ (ER+, HER2+ para cualquier Ki67 o PR); requieren tratamiento hormonal y QT; tiene peor pronóstico que el luminal A, pero mejor que los otros dos tipos.

Ki67 determina la actividad proliferativa del cáncer de mama. No existe acuerdo general sobre el punto de corte de Ki67 que discrimine entre valores altos y bajos, aunque se suele considerar que el punto de corte estaría entre 10-20%⁶⁸.

2) Tumores HER2 positivos: constituyen el 15-20% de los cánceres de mama. Sobreexpresan la proteína HER2/neu en la superficie de las células tumorales por amplificación del gen *HER2*. El proto-oncogén *HER2* (*ERBB2* o *erbB-2/neu*) está ubicado en el brazo largo del cromosoma 17 y codifica una glicoproteína transmembrana de 185 kDa que tiene estructura de EGFR, con un dominio extracelular y un dominio intracelular con actividad TK. Cuando los factores de crecimiento se unen a los receptores se activan genes específicos involucrados en regulación de la proliferación celular, la motilidad y la apoptosis⁶⁹. Por tanto, dicha sobreexpresión ocasiona un crecimiento descontrolado de las células tumorales. Se trata de un cáncer de crecimiento más rápido, más invasivo y con mayor probabilidad de recidiva y de diseminación. La detección de HER2 también tiene implicaciones pronósticas y predictivas. Su valor pronóstico adverso radica en que la presencia de la amplificación del gen se asocia a menor supervivencia y tiempos más cortos hasta la recurrencia. Además, su presencia predice una menor respuesta tumoral o resistencia al tratamiento convencional. Por otro lado, se relaciona con una angiogénesis acelerada y una reducción de la apoptosis celular. Estos tumores son ER y PR negativos. Se dan con más frecuencia en mujeres jóvenes y suelen ser muy agresivos, aunque el uso de la terapia con anti-HER2 ha cambiado sustancialmente el pronóstico de estas pacientes.

3) Subtipo basal o triple negativo: constituye el 10-20% del total. No presentan ni receptores hormonales ni amplificación del *HER2*, por lo que no son sensibles a terapia hormonal ni a anti-*HER2*. En ellos, el tratamiento utilizado es la QT neoadyuvante, pero un 70% de ellos no responde bien de modo que presentan recurrencias y baja supervivencia a largo plazo. El Ki67 determinado por IHC es un buen marcador de proliferación celular con valor pronóstico en estas pacientes. En general, presentan un crecimiento muy rápido y suelen ser agresivos, con mayor frecuencia presentan metástasis a nivel visceral y del sistema nervioso central⁷⁰. Estos tumores son más frecuentes en mujeres con mutaciones del gen *BCRA1/2* (*breast cancer 1/2*).

Genes y GAs más frecuentes en cáncer de mama

A partir de la aparición de la NGS la clasificación del cáncer de mama se ha modificado en función del *driver* molecular identificado. Estos *drivers* pueden ser receptores de factores de crecimiento (*ERBB2*, *EGFR*, *FGFR1*), vías señalización como *PI3K/AKT/mTOR*, reguladores del ciclo celular (*CCND1*, *CDK4*, *RBI*) y reparadores del DNA (*BRCA1/2*)⁷¹.

Las técnicas de NGS han permitido identificar los siguientes genes afectados con más frecuencia en el cáncer de mama: *PIK3CA* (31-41%), *TP53* (30-36%), *KTMC2* (7-11%), *GATA3* (10-11%), *MAP3KI* (7-10%) y *CDH1* (10-11%)⁶⁸. La presencia de múltiples GAs en el mismo tumor se ha asociado a inestabilidad genética y peor pronóstico. La inestabilidad cromosómica y la heterogeneidad tumoral se han asociado a peores resultados clínicos y menor respuesta tumoral al tratamiento en gran parte de tumores sólidos, incluyendo el cáncer de mama, y en hematológicos⁷².

La vía de señalización que con más frecuencia presenta GAs en el cáncer de mama es la *PI3K/AKT/mTOR*, vía implicada en la supervivencia celular y la proliferación. En torno a un 30% de pacientes con cáncer de mama tiene mutaciones en *PIK3CA*⁷³.

Entre un 10-17% de cánceres de mama presentan amplificación del *FGFR1*, que se asocia a cáncer de mama más invasivo, a un peor pronóstico, a menor supervivencia libre de enfermedad y a mayor resistencia a la hormonoterapia en aquellos ER positivos⁷⁴.

En torno al 5% de los cánceres de mama se asocian a la presencia de mutaciones germinales en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que se transmiten de forma hereditaria y predisponen a desarrollar cáncer de mama (riesgo cercano al 60% frente al 12-13% de la población general) junto a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Las pacientes con mutaciones en *BRCA1* desarrollan con más frecuencia tumores triples negativos.

El 5-10% de las mujeres con cáncer de mama menores de 35 años son portadoras de alguna mutación genética. Se asocia a un incremento en las mutaciones *BRCA1* y *BRCA2* (en un 15%), en las GAs en *ERBB2* y los tri-

ples negativos⁷⁵. Por ello en este grupo etario está indicado realizar estudio genético. Las portadoras de *BRCA* desarrollan tumores muy agresivos y precoces. Las mutaciones *ERBB2* se han descrito en numerosos tumores sólidos, incluyendo el cáncer de mama avanzado y/o metastásico. Según las bases de datos cBioPortal <https://www.cbioportal.org/> (TCGA)^{73,76} <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga> y COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*)⁷⁷, las mutaciones *ERBB2* en cáncer de mama se dan con una frecuencia de entre 1,7%-2,0%. Esta mutación no suele detectarse mediante IHC ni FISH pero sí mediante secuenciación del DNA.

Por tipos, las GAs más frecuentes en el subtipo luminal A se dan en *PIK3CA* (45%) seguidas de GAs en *MAP3KI*, *GATA3*, *TP53*, *CDHI* y *MAP2K4*. En el subtipo luminal B, las más frecuentes se dan en *TP53* (29%) y *PIK3CA* (29%); en el HER2 positivo, la amplificación *HER2* (80%), *TP53* (72%) y *PIK3CA* (39%); y en el triple negativo, mutaciones *TP53* (80-90%)⁷³.

Algunos tipos histológicos asocian algunas GAs concretas o en mayor frecuencia. En el carcinoma lobular es frecuente la mutación en el gen *CDHI* que codifica la proteína E-cadherin a diferencia del carcinoma ductal invasivo que no presenta alteraciones en este gen. En el cáncer de mama metaplásico los estudios con IHC y FISH han confirmado que la mayoría son triples negativos. Este tipo de tumor muestra peor pronóstico que los adenocarcinoma ductales o lobulares, con mayor quimiorresistencia y más agresividad. De ahí la importancia de realizar estudio CGP con el fin de encontrar posibles dianas terapéuticas. El carcinoma mucinoso de mama es una variante de buen pronóstico en general, de bajo grado tumoral, ER+ y HER2 negativo, pero en algunos casos puede presentar un curso clínico agresivo, con mala respuesta al tratamiento. Para estos casos, se plantearía la realización de un CGP con el fin de descubrir GAs candidatas a tratamientos dirigidos que ofrezcan un beneficio a la paciente. El cáncer de mama inflamatorio se suele asociar a HR negativos; entre un 40-60% tiene sobreexpresión HER2 por amplificación del *ERBB2* y en un 15-22% de pacientes se ha descrito amplificación del gen *MYC*, que se ha asociado a un desarrollo más temprano, mayor agresividad tumoral y peor pronóstico.

Tratamientos para el cáncer de mama

La terapia hormonal o terapia endocrina se considera el tratamiento de elección para los tumores positivos a HR por su efecto antitumoral y por presentar un buen perfil de seguridad. El tratamiento de primera línea terapéutica en mujeres postmenopáusicas se basaría en los inhibidores de aromataasa (AIs) no-esteroides como anastrozol, letrozol, que reducen la síntesis de estrógenos y resultan más efectivos que el tamoxifeno. También como pri-

mera línea puede utilizarse fulvestrant (Faslodex®), que es un antagonista competitivo del ER cuyo mecanismo de acción está asociado con la regulación a la baja de los niveles de la proteína del receptor de estrógenos. Pero si es posible se recomienda combinar AIs no esteroideos con inhibidores CDK4/6 (palbociclib, ribociclib o abemaciclib).

Sin embargo, en torno al 30-40% de pacientes no responde al tratamiento hormonal debido a resistencias intrínsecas o adquiridas, que suponen un importante reto en el manejo de las pacientes. Si tras los AIs no-esteroideos el tumor progresa, la segunda línea terapéutica hormonal a utilizar serían los AIs esteroideos como exemestane (Aromasin®) o el fulvestrant. Se han descrito algunas GAs implicadas o relacionadas con el desarrollo de la resistencia al tratamiento endocrino. Entre ellas estaría la activación de la vía PIK3/AKT/mTOR. Para estos casos, se podría administrar anastrozol/exemestane junto con everolimus pues su combinación ha demostrado incrementos de la PFS junto a respuestas tumorales parciales o incluso completas^{78,79}. El everolimus ha sido aprobado para el tratamiento de cáncer de mama avanzado recurrente o que haya progresado tras tratamiento con AIs no esteroideos en mujeres postmenopáusicas con HR positivos y HER2 negativo, en combinación con exemestane^{74,80}. Sin embargo, no existen, por el momento, biomarcadores que identifiquen aquellas mujeres que se van a beneficiar de tratamiento con inhibidores mTOR, ni con inhibidores CDK4/6. Estos últimos presentan un mayor rango de seguridad que los inhibidores mTOR por lo que se recomienda su uso como primera línea y si no siempre en la segunda y tercera líneas terapéuticas. Además, la presencia de mutaciones en *PIK3CA* en cáncer de mama HER2+ se ha relacionado con mayor resistencia a las terapias anti-HER2, por ello, en tumores con amplificación *ERBB2* y mutación *PIK3CA* se propone el tratamiento combinado de inhibidores HER2 e inhibidores de la vía PI3K. Y en ocasiones, cuando el tumor es HER2+ también se añadiría también fulvestrant. También se puede utilizar fulvestrant en combinación con inhibidores CDK4/6 aprobados en 2016 en mujeres que ya hayan recibido tratamiento hormonal previo para tumores HR+ y HER2 negativos⁸¹.

La presencia de mutaciones *ERBB2* asociadas a mutaciones *CDH1* (E-cadherina) también se han relacionado con resistencia al tratamiento hormonal en los tumores ER+. Para estos casos parece que asociar fulvestrant y neratinib (inhibidor irreversible de quinasa) ayudaría a alcanzar una buena respuesta tumoral. La amplificación *TOP2* suele coexistir con una amplificación *ERBB2* y esta combinación parece predecir buena respuesta a las antraciclinas.

Otra mutación asociada a resistencia a terapia hormonal (exceptuando al fulvestrant) es la mutación *ESR1*. Esta mutación ESR1 no se da en los tumores primarios de mama sino en los que ya han recibido tratamiento con

AIs, encontrándose con una presencia variable en el 12-55% de casos, y en los metastásicos ER+. Para estos casos, una dosis alta de fulvestrant y tamoxifeno tendrían un efecto beneficioso con un incremento de la PFS⁸². Los casos en que la mutación *ESR1* se ha detectado en tumores primarios antes de iniciar el tratamiento hormonal, se han asociado a recidivas tempranas. En cambio, los reordenamientos que ocasionan genes de fusión *ESR1* y amplificación de *ESR1* se han visto implicados en la resistencia a inhibidores de aromatasa.

Si el tumor HR+ termina haciéndose resistente a la terapia endocrina, la QT sería una opción. Entre los posibles fármacos a utilizar se incluirían antraciclinas, taxanos, capecitabina o gemcitabina.

Para los tumores triples negativos, el tratamiento estándar es la QT, con antraciclinas y taxanos u otros quimioterápicos como capecitabina o vinorelbina, dependiendo del fármaco previo utilizado. Otros fármacos van dirigidos contra el VEGFR implicado en la angiogénesis como bevacizumab o sunitinib (Sutent®). Otros fármacos en estudio para estos tumores triples negativos son los dirigidos al EGFR como el cetuximab (Erbix®), porque se ha observado que un porcentaje elevado de estos tumores sobreexpresan dicho receptor.

Otro grupo de fármacos utilizados en tumores triples negativos con mutaciones BRCA1/2 y en los HER2 negativos son los inhibidores de la poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP). Esta enzima PARP repara el daño del DNA celular, incluido el daño ocasionado por la QT. Los inhibidores PARP, como olaparib, niraparib y talazoparib, tienen como objetivo interferir con esta enzima para impedir que las células cancerígenas reparen el DNA y con ello aumenta la susceptibilidad del tumor maligno a la QT además de impedir que se haga resistente a la QT. Estos inhibidores se administran junto a la QT.

Para los tumores HER2 positivos, el tratamiento inicial son los anti-HER2 junto a QT. La amplificación *ERBB2* y la correspondiente sobreexpresión de la proteína HER2 se asocian una mayor sensibilidad a la terapia dirigida con anti-HER2, incluyendo los anticuerpos trastuzumab (Herceptin®) y pertuzumab (Perjeta®) e inhibidores de quinasa tanto reversibles (lapatinib, Tykerb®) como irreversibles (afatinib y neratinib, Nerlynx®) y a inhibidores duales *EGFR/HER2* lo que resulta interesante dada la ausencia de respuesta al tratamiento quimioterápico y hormonal convencional. Se recomienda un bloqueo doble con trastuzumab y pertuzumab y taxanos como tratamiento de elección de primera línea. Y generalmente se deja el T-DM1 (ado-trastuzumab emtansina, Kadcyla®) para utilizarlo como segunda línea.

También para tumores en los que se hayan identificado mutaciones *ERBB2* estarían indicados los anti-HER2. Los tumores con mutaciones HER2 fueron clasificados inicialmente como HER2 negativos, por la falta

del aumento en el número de copias (detectadas por FISH) o por la falta de sobreexpresión de la proteína HER2 (detectada por IHC). Entre los tumores *ERBB2* que se han hecho resistentes a la terapia anti-HER2, la mutación en la vía *PIK3CA* suele ser la GA más frecuente y para estos casos se indicaría el tratamiento con inhibidores mTOR, como el everolimus⁸³. Para pacientes con mal pronóstico y refractarios a tratamiento convencional, la detección de mutaciones HER2 permitiría tomar decisiones terapéuticas relevantes para el manejo del paciente.

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1 que se une de manera selectiva y eficiente al dominio extracelular del receptor HER2. Fue aprobado por la FDA en 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2+ avanzado por su eficacia en combinación con citotóxicos. Se comprobó una asociación entre el número de copias del *ERBB2* y la sensibilidad al tratamiento con trastuzumab y mayor supervivencia global⁸⁴. Posteriormente, recibió la aprobación para tratamiento en estadio precoz, también como terapia adyuvante y en 2013, como neoadyuvante en combinación a pertuzumab.

Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal específico frente a HER2 y otras proteínas de la familia EGFR. Fue aprobado por la FDA en 2012 para el tratamiento de cáncer de mama HER2+ metastásico en combinación a trastuzumab y docetaxel. En 2013, la FDA aprobó esta combinación de fármacos como terapia neoadyuvante, y en 2017 se aprobó el pertuzumab como adyuvante junto a trastuzumab y QT.

En 2013, la FDA aprobó el T-DM1 que combina trastuzumab con el citotóxico DM1, para tumores metastásicos de mama que hubieran progresado tras trastuzumab y taxanos, y tras haber demostrado un ligero incremento en la supervivencia frente a lapatinib con capecitabina.

El lapatinib aprobado en 2008, es un inhibidor reversible de quinasa en combinación con capecitabina (Xeloda®) para el tratamiento de cáncer de mama metastásico que hubiera progresado tras terapia con trastuzumab y taxanos. También se puede usar el lapatinib junto a letrozole. El neratinib fue aprobado por la FDA en 2017 como inhibidor irreversible de quinasa frente a HER2 y EGFR, para tratamiento de cáncer de mama HER2+ en estadios precoces tras tratamiento con trastuzumab post-operatorio.

Para los tumores de mama con amplificación *FGFR1*, el tratamiento dirigido indicado son los inhibidores de la familia *FGFR* como pazopanib, regorafenib o ponatinib. Y para los tumores con mutación en el gen *TP53*, que se asocian a peor pronóstico, hasta la fecha no existen terapias aprobadas dirigidas contra esta mutación.

La expresión de PD-L1 en las células tumorales suele presentarse en los tipos basal y HER2+. Aunque se ha asociado a mal pronóstico clínico, parece que responden bien a la inmunoterapia con agentes anti-PD-1 y an-

ti-PD-L1. En 2019, la FDA ha aprobado la combinación de atezolizumab con paclitaxel para el cáncer de mama triple negativo localmente avanzado y metastásico. Además, es el único fármaco aprobado para cáncer de mama positivo a PD-L1. Pembrolizumab está aprobado por la FDA para tratamiento de cáncer de mama metastásico o no candidato a cirugía que tengan MSI-H o dMMR.

GAs en cáncer colorrectal y sus tratamientos

En el momento del diagnóstico inicial de los pacientes con CCR, se estima que entre un 20-25% ya presenta metástasis⁸⁵. Cuando la enfermedad está diseminada, las opciones terapéuticas con el tratamiento convencional son escasas, de ahí el interés surgido a raíz del mayor conocimiento de las GAs relacionadas con el origen y progresión tumoral y la posibilidad de ofrecer terapia dirigida a estos pacientes con enfermedad avanzada y refractarios a otros fármacos.

TCGA Network⁸⁶ encontró que un 19% de los CCR presentaba mutaciones, deleciones o amplificaciones del gen *ERBB2*. Los tumores metastásicos de colon (mCCR) con amplificación *ERBB2* suelen originarse en colon rectosigmoideo. Esta GA y la sobreexpresión del HER2 en pacientes con CCR no se han asociado a peor supervivencia, a diferencia de lo que ocurre en pacientes con cáncer de mama, donde un 15-20% de casos son HER2+ y sí se asocian a un mal pronóstico y a una mayor probabilidad de recurrencia tumoral. En general, los mCCR con amplificación del *ERBB2* no se acompañan de mutaciones *RAS/BRAF* y se podrían beneficiar del tratamiento dirigido con anti-EGFR (cetuximab y panitumumab) en combinación con terapia citotóxica.

El tratamiento de primera línea indicado para pacientes con mCCR en colon izquierdo y sin mutaciones en el gen *RAS* incluye la combinación de QT citotóxica convencional con fármacos dirigidos frente al dominio extracelular de EGFR por sus buenos resultados en cuanto a supervivencia global y PFS. La QT utilizada para CCR incluye diversas combinaciones posibles de fármacos: FOLFIRI (5-fluorouracilo, leucovorín e irinotecan), FOLFIRINOX (5-fluorouracilo, leucovorín, irinotecan y oxaliplatino), FOLFOX (5-fluorouracilo, leucovorín y oxaliplatino). Para los mCCR en colon derecho y sin mutaciones en el gen *RAS* ni *BRAF* el tratamiento recomendado es QT combinada con bevacizumab³¹. Este fármaco antiangiogénico fue aprobado por la FDA en 2004 para ser utilizado junto con QT como primer tratamiento en CCR avanzado.

Por el contrario, si el tumor tiene mutaciones *RAS*, en *KRAS* o *NRAS* (que se dan en un 50% de los mCCR) el hecho de añadir los anti-EGFR no aportaría beneficios al paciente. En un 8-15% de los mCCR se han descrito

mutaciones *BRAF*, especialmente V600E. En dos tercios de estos pacientes, el tumor suele originarse en colon derecho y menos de un tercio presenta MSI. Estas mutaciones *BRAF* suelen asociarse a mal pronóstico, además de ser un biomarcador predictivo a falta de respuesta a los inhibidores EGFR⁸⁷. A diferencia de los melanomas con mutación *BRAF*, el CCR que presenta estas mutaciones no suele responder al vemurafenib⁸⁵. Esto parece relacionado con la presencia de una *upregulation* de la vía EGFR, que conllevaría resistencia al inhibidor *BRAF* por altos niveles de expresión del factor de crecimiento hepático (HGF) por parte de las células normales del colon que provocarían una activación del cMET. Sin embargo, en el ensayo clínico⁸⁸ con pacientes con mCCR metastásico con la mutación *BRAF*V600E se describió cierta respuesta tumoral al tratamiento combinado de dabrafenib con trametinib, encontrando que el 21% de paciente presentaron respuesta parcial o incluso mejor, incluyendo un 2% de respuesta completa, durante más de 36 meses; y en un 56% de pacientes se consiguió la estabilización tumoral.

También se ha observado que la presencia de mutaciones en otros genes implicados en la vía de señalización EGFR, como *PIK3CA* y *PTEN*, podrían asociarse a escasa respuesta a los anti-EGFR. En el CCR, las mutaciones *PIK3CA* se dan en un 10-20% del total y se asocian a determinadas características como la ubicación proximal del tumor, la MSI y la mutación *KRAS*, además de relacionarse con un mal pronóstico. Además, algunos datos sugieren que la activación *MET* estaría implicada en la resistencia al tratamiento anti-EGFR⁸⁹. Para estos casos, e independientemente de la localización del tumor, se indicaría QT con bevacizumab³¹. Las mutaciones *KRAS* en los exones 9 y 20 se asocian a resistencia a cetuximab.

Por otro lado, según TCGA⁸⁶, el 16% de los CCR son hipermutantes, es decir, que presentan una elevada tasa de mutaciones en el DNA que inducen a la producción de neoantígenos en la superficie de las células y estos neoantígenos serían dianas para la inmunoterapia. En el CCR se ha observado una fuerte asociación entre una MSI-L o MSS y una buena respuesta a la QT adyuvante, con un incremento significativo en la duración de la supervivencia global y en las tasas de PFS a los 5 años, mientras que aquellos tumores con MSI-H no serían susceptibles a la QT y tienen alto riesgo de recurrencia^{86,90}. Estos tumores MSI constituyen un 4-8% de todos los mCCR y un 30% de ellos asocian la mutación *BRAF* V600E. Para estos mCCR con MSI-H la opción sería la inmunoterapia. Por este motivo es importante comprobar el estatus de microsatélites o dMMR antes de comenzar el tratamiento con anti-PD-1 o anti-PD-L1^{91,92}. Entre estos inmunoterápicos se pueden utilizar pembrolizumab o nivolumab (anti-PD-1) o ipilimumab (anti-CTLA-4). En julio de 2018, la FDA aprobó la combinación de ipilimumab y nivolumab para el tratamiento de estos tumores si previamente habían sido tratados con QT. Ya en 2017 la FDA había aprobado el uso de

pembrolizumab para cualquier tumor dMMR o MSI-H, independientemente de su localización; este fue el primer caso de aprobación de un fármaco por la FDA basándose únicamente en la presencia de una característica genética.

El análisis sobre muestras tisulares tumorales FFPE se considera el *gold standard* diagnóstico, pero el análisis de ctDNA presenta una alta concordancia de resultados, de modo que se aceptaría su uso cuando no se dispone de muestras suficientes de tejido o si ello implica someter al paciente a pruebas invasivas o de riesgo.

GAs en cáncer de ovario y sus tratamientos

Sólo un 15-20% de los pacientes con cáncer de ovario son diagnosticados de forma temprana mientras que la mayoría presenta enfermedad en estadios FIGO III o IV en el momento inicial del diagnóstico y en estos casos la supervivencia a 5 años no alcanza el 30%^{32,93,94}. El cáncer de ovario es el tumor ginecológico que ocasiona mayor mortalidad y la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres.

El mayor conocimiento molecular ha supuesto una importante modificación en el manejo terapéutico y pronóstico⁹⁵. Casi en el 100% de los carcinomas serosos de alto grado se dan mutaciones en el gen *TP53* y en un 20% se dan mutaciones en los genes *BRCA1/2*. Aquellos con mutaciones en *BRCA1/2* suelen tener un mejor pronóstico⁹⁶. En los carcinomas serosos de bajo grado, no se dan alteraciones en *TP53* y la frecuencia de mutaciones en *BRCA1/2* es inferior al 10%. En cambio, presentan otras GAs no identificadas en los de alto grado como alteraciones en *KRAS* (en el 41% de los tumores), *HER2* (en 8%) y *BRAF* (en 6%). En los carcinomas endometrioides, de células claras y mucinosos tampoco se presentan mutaciones *TP53* pero sí se han identificado diversas mutaciones en *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *ARID1A* y *HER2*, en porcentajes variables⁹⁷. Algunas GAs en los tumores de ovario se han asociado a resistencia primaria a la QT basada en platino y a mayor probabilidad de recurrencia tumoral; entre ellas destacarían las mutaciones *BRCA1/2*, la inactivación de genes supresores de tumores como *RB1*, *NF1* o *PTEN*, y la amplificación *CCNE1*.

La mayoría (60-80%) de los carcinomas serosos de alto grado responde bien a la QT convencional basada en platino⁹⁵. En los estadios avanzados, la QT consiste en la combinación de carboplatino y paclitaxel o, si este último no puede administrarse, se podrían combinar el carboplatino con PLD (*pegylated liposomal doxorubicin*). En los serosos de bajo grado, la terapia antiangiogénica con bevacizumab junto con QT (carboplatino y paclitaxel) se ha mostrado efectiva como tratamiento de primera línea y para las recurrencias en el cáncer de ovario avanzado⁹⁷. No existen biomarcadores molecula-

res predictivos de buena respuesta al bevacizumab pero parece que otros tipos histológicos presentarían una menor respuesta a este fármaco.

Se estima que entre el 50-90 % de las pacientes con carcinomas avanzados sufre recurrencias de la enfermedad en los primeros 5 años después del diagnóstico⁹⁷. Para el tratamiento de estos casos recurrentes hay tener en cuenta la situación clínica de la paciente, el tipo histológico del tumor, el tratamiento previo administrado y el tiempo de duración de la respuesta al mismo, y la presencia o no de mutaciones *BRCA1/2*, que son diana para el tratamiento con inhibidores PARP como olaparib, niraparib o rucaparib⁹⁸. Estos fármacos actúan inhibiendo una enzima implicada en la reparación del daño del DNA por lo que el DNA de las células tumorales no se reparará favoreciendo una reducción en el crecimiento tumoral. Además de utilizarse para el tratamiento de las recurrencias, los inhibidores PARP también están aprobados como terapia de mantenimiento cuando el tumor de ovario ha alcanzado la remisión tras QT basada en platino⁹⁹. Por ello, se recomienda estudiar la presencia de estas mutaciones en *BRCA* en todas las pacientes con cáncer de ovario no-mucinoso⁹⁵. En las pacientes con recurrencia tumoral que no habían respondido a la QT de primera línea, se utilizarán otros agentes como paclitaxel, PLD, topotecan o gemcitabina, con o sin bevacizumab. En los carcinomas de células claras es frecuente encontrar deficiencia dMMR, lo que explicaría su buena respuesta a los inhibidores PD-1 como el nivolumab o pembrolizumab.

GAs en melanoma y sus tratamientos

El melanoma constituye un tumor maligno genéticamente muy heterogéneo, con multitud de subtipos caracterizados por la activación de una o más vías de señalización lo que favorece a la proliferación celular, el incremento en la angiogénesis y la diseminación metastásica. En torno a un 20-25% de pacientes presenta un melanoma en estadio avanzado (IIC o metastásico). Las opciones terapéuticas en estos pacientes son muy reducidas y el pronóstico pésimo, con una supervivencia de escasos meses. El tratamiento sistémico convencional incluía dacarbazina combinada con interleucina-2 o con fotemustina, pero las tasas de respuesta resultaban bajas y muy limitadas en el tiempo. La utilización de las NGS ha permitido estudiar el perfil genómico completo de los melanomas e identificar GAs *drivers* susceptibles de terapia dirigida así como otras GAs implicadas en las resistencias a determinados fármacos de modo que sus resultados contribuyen a establecer un tratamiento más adecuado.

Las vías de señalización celular más frecuentemente afectadas en el melanoma son la vía de la proteína-quinasa activada por mitógenos (MAPK; NRAS-BRAF-MEK-ERK) que se encuentra activada en la mayoría de los

melanomas, la vía PTEN-PI3K-AKT y p16INH4a-CCND1-CDK4-RB1. En un 20-40% de melanomas se ha encontrado una pérdida o reducción significativa de la expresión de PTEN, y tanto la delección como la mutación de *PTEN* conducen a la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR. En torno al 50% de los melanomas presenta delección de p16INK4 y en un 10%, una mutación.

Las GAs más frecuentes en el melanoma afectan a los siguientes genes: *BRAF* (50%), *TP53* (23%), *NRAS* (20%), *CDKN1A* (20%), *CDK4* (6%) y *CCND1* (6%)¹⁰⁰. Las mutaciones de *BRAF* y *NRAS* son más frecuentes en melanomas relacionados con una exposición intermitente al sol. En el melanoma uveal, la vía MAPK está sobreactivada en el 80% de los casos, mientras que son muy infrecuentes las mutaciones de *BRAF*, *NRAS* y *Kit*. En los melanomas acrales, los que se originan en mucosas y en piel expuesta de forma crónica al sol, la mutación más frecuente es la del gen *Kit* (15-40%), y en menos del 10% se presentan mutaciones de *BRAF* y *NRAS*. *Kit* es un receptor transmembrana con actividad TK. La unión con su ligando induce la dimerización y la autofosforilación del receptor, lo que provoca la activación de las vías de señalización de MAPK y PI3K-AKT que median la supervivencia y la proliferación celular.

TCGA estableció cuatro subtipos genómicos principales de melanomas cutáneos denominados *BRAF*, *RAS* (N/H/K), *NFI* y triples negativos¹⁰¹. Las mutaciones oncogénicas en *BRAF* provocan la activación de la vía RAF-MEK-ERK, que estimula el crecimiento descontrolado de las células. La desregulación de la señalización *BRAF* ha demostrado ser clave en el desarrollo de los melanomas. Las mutaciones *BRAF* se han encontrado en un 50% de los melanomas, siendo la mutación *BRAF* V600E la más frecuente (en casi un 90% de todas). Esta mutación consiste en la sustitución de valina por ácido glutámico en la posición 600 *BRAF* y sería responsable de la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis. Otras mutaciones son V600K (15-25%), V600R y V600D. Por esto, en todos los pacientes con melanoma está indicado realizar la determinación de *BRAF*, especialmente del procedente de metástasis¹⁰². En caso de no identificarse esta mutación, se buscarían otras GAs como mutaciones *NRAS* o c-*Kit*. Tal como ya recomendaba la *European Society for Medical Oncology* (ESMO) en su guía del 2015¹⁰², determinar la presencia de las mutaciones *BRAF*, *NRAS* o c-*Kit* es algo imprescindible para el correcto manejo de pacientes con melanoma.

Los melanomas que tienen mutaciones *RAS*, *NF1* y los triples negativos presentan una sobreexpresión de *AKT3*, que es una proteína-quinasa que afecta a las vías de señalización MEK y mTOR, por lo que los inhibidores de las vías de señalización MEK y PI3K/AKT/mTOR podrían ser efectivos para estos melanomas. Las proteínas *RAS* pueden activar las vías de señalización de MAPK y PI3K. En un 20% de los melanomas se dan mutaciones

de *NRAS*, mientras que las mutaciones *HRAS* y *KRAS* se dan en tan sólo un 1% y 2%, respectivamente. Generalmente, la presencia de alteraciones en *NRAS* es excluyente de alteraciones en *BRAF*. Las mutaciones adquiridas en *NRAS* se han descrito en un 15-30% de pacientes con melanoma refractario a inhibidores *BRAF* y parece que mediaría en la resistencia a estos fármacos^{103,104}.

Además, el melanoma es un tumor altamente inmunogénico, es decir, que desencadena con facilidad una respuesta inmune contra las células tumorales, pero estas células neoplásicas consiguen escapar al control inmunitario. El mayor conocimiento de las GAs asociadas al melanoma ha contribuido al desarrollo de algunas terapias dirigidas y, especialmente, de la inmunoterapia basada en inhibidores de puntos de control, lo que ha supuesto un cambio radical en la supervivencia de estos pacientes^{105,106}. Se ha descrito que en pacientes con melanoma, los agentes que actúan frente al receptor PD-1, como el nivolumab y pembrolizumab, y los fármacos frente a su ligando PD-L1, como el atezolizumab, inducen respuestas objetivas clínicas en un 25-45% y un mayor tasa de supervivencia a los 5 años que otras terapias³⁶. En el melanoma metastásico, su aplicación se ha asociado a incrementos en la tasa de respuesta global¹⁰⁷. Por ello, estudiar la posible sobreexpresión de PD-L1 resulta necesario en los pacientes con este tumor por ser un buen predictor de respuesta a los anti-PD1. El estudio del impacto de la carga mutacional y de mutaciones oncogénicas específicas puede ayudar a predecir la respuesta de los melanomas a los anti-PD-1/PD-L1^{105,106}. Es importante determinar si ante un paciente concreto se debe pautar esta inmunoterapia y desaconsejar su uso si la probabilidad de respuesta al tratamiento es baja³⁶. A pesar de la buena respuesta a los anti-PD-1, la mayoría de los pacientes terminan desarrollando resistencias a esta terapia, bien resistencias intrínsecas o extrínsecas¹⁰⁸.

Aquellos melanomas con alta TMB se podrían utilizar los anti-PD-1 en monoterapia mientras que para los pacientes con TMB intermedias y bajas lo recomendable sería la terapia combinada (nivolumab con ipilimumab) por ser más efectiva aunque se reconoce que la probabilidad de incrementar la toxicidad es también mayor porque el uso de ipilimumab puede ocasionar EA serios, de mayor gravedad que los descritos con los inhibidores PD-1 o PD-L1¹⁰⁹. En 2015 la FDA aprobó el uso de ipilimumab con nivolumab para el melanoma en estadio III irreseccable o en estadio IV.

El tratamiento estándar de primera línea del melanoma avanzado con mutaciones *BRAF* es la combinación de inhibidores *BRAF* (vemurafenib, encorafenib o dabrafenib) con inhibidores selectivos de la vía de señalización *MEK* (trametanib, cobimetinib o binimetinib), e inmunoterapia con anticuerpos anti-PD1 (pembrolizumab o nivolumab) y anti-CTLA4 (ipilimumab). El objetivo de combinar fármacos es intentar evitar que se desa-

rrollen resistencias terapéuticas. Vemurafenib (Zelboraf®) fue el primer inhibidor de la serina-treonina quinasa BRAF aprobado en Europa para el tratamiento del melanoma y fue aprobado en 2011 por la FDA como tratamiento de primera línea del melanoma avanzado positivos a la mutación *BRAF* V600E. En 2014, la FDA aprobó el uso combinado de dabrafenib (Tafilar®) y trametinib (Mekinist®); en 2015 aprobó la combinación de vemurafenib con cobimetinib (Cotellic®); y en 2018 aprobó el inhibidor *BRAF* encorafenib (Braftovi®) y el inhibidor *MEK* binimetinib (Mektovi®). Si la mutación en *BRAF* es V600K, entonces el fármaco indicado es trametinib, cuyo uso fue aprobado por la FDA en 2013. En caso de que el paciente presente metástasis cerebrales, también son los inhibidores *BRAF* los indicados, bien solos o combinados con inhibidores *MEK*.

Para el tratamiento de segunda línea de melanoma metastásico con mutaciones *BRAF*, si el paciente había sido tratado previamente con inmunoterapia, estarían indicados los inhibidores BRAF y MEK, mientras que si estos se habían utilizado como primera línea terapéutica, en la recidiva se emplearán los anti-PD-1 y se utilizaría ipilimumab si no hay respuesta a los anti-PD-1. Ipilimumab (Yervoy®) fue aprobado por la FDA en julio de 2011 para el tratamiento de melanoma avanzado (metastásico y/o irresecable) resistente a, al menos, un tratamiento previo. En septiembre de 2014, la FDA aprobó el uso de pembrolizumab como segunda línea terapéutica en melanomas metastásico o irresecable que hubieran progresado tras tratamiento con ipilimumab o si se trataba de portadores de la mutación *BRAF* V600E, después de haber recibido inhibidores *BRAF*.

Casi un año después, en julio de 2015, pembrolizumab recibió la aprobación de la EMA como tratamiento de primera línea y a finales de 2018 se aprobó en monoterapia para tratamiento adyuvante en adultos con melanoma en estadio III y afectación ganglionar, que hubieran sido sometidos a resección completa. Tanto nivolumab como pembrolizumab presentan un buen perfil de seguridad.

Para el melanoma metastásico sin mutaciones *BRAF* el tratamiento indicado como primera línea serían los anti-PD-1 en monoterapia, o ipilimumab, tanto de primera como segunda líneas asociado a nivolumab^{108,110}. En cambio, no están autorizados ni vemurafenib ni dabrafenib porque puede haber una estimulación paradójica de señalización MAPK que resulte en estimulación de la proliferación tumoral. La QT, con dacarbazina, fotemustina o paclitaxel, sólo se debería utilizar si las demás opciones han fracasado.

Para los melanomas con mutación *NRAS*, el tratamiento indicado desde 2017 es el inhibidor *MEK* binimetinib.

En algunos melanomas se ha encontrado el gen de fusión *NTRK*¹¹¹ y para ellos está indicado el uso de larotrectinib (Vitrakvi®), que es un tratamiento agnóstico, válido no sólo para melanoma sino para cualquier tumor

con esta GA, es decir, que la presencia de dicha alteración predice la buena respuesta del tumor al fármaco, independientemente de su lugar de origen o del tipo histológico.

Por otro lado, los melanomas son tumores asociados a una gran angiogénesis, que favorece el crecimiento tumoral y su diseminación metastásica. Por ello, entre los tratamientos empleados en el melanoma, se incluyen los antiangiogénicos como el bevacizumab, generalmente combinado con otros citostáticos como carboplatino, paclitaxel o con interferón alfa.

Además, muchos melanomas expresan c-Kit. C-Kit es una proteína que actúa como receptor del factor de crecimiento de los melanocitos epidérmicos. Las GAs del *c-Kit* incluyen mutaciones y amplificaciones, que serían sensibles a los inhibidores de c-Kit como imatinib, sinitinib, dasatinib y nilotinib.

Resultados de la búsqueda bibliográfica

La búsqueda de literatura permitió localizar 2.206 registros de PubMed, 107 de Cochrane Library y otros 7 artículos más recuperados a partir de los listados de bibliografía de algunos estudios. De este total inicial de 2.320 registros, 20 se excluyeron por ser duplicados. Tras la lectura del título y abstract de los demás registros, se descartaron 2.242 referencias. Las restantes 58 referencias fueron recuperadas a texto completo para su lectura en profundidad, lo que llevó a excluir 23 artículos, quedando finalmente seleccionados 33 artículos originales, 1 único artículo¹¹² de revisión de la evidencia sobre F1 y el artículo¹¹ de validación de F1. De los 33 artículos incluidos, 10 estudiaban F1 LDT o F1CDx en pacientes con NSCLC; 17 artículos, en pacientes con cáncer de mama; 1 artículo, en CCR; 3 publicaciones en melanoma y 2 en ovario.

El diagrama de flujo de la selección de estos artículos se muestra en la figura 5 del anexo IV. Los artículos excluidos y el motivo de su exclusión se presentan en la tabla 3 del anexo V.

La búsqueda realizada en las demás fuentes de información permitió localizar varios IETS: el único sobre FoundationOne® fue elaborado por HAYES, Inc¹¹³ que no se recuperó a texto completo para esta revisión porque no era de acceso libre y de 5 informes localizados en NICE ninguno estudiaba F1 ni F1CDx y uno era un informe breve sobre CMI.

Descripción de la evidencia disponible

Estudios de F1 en pacientes con cáncer de pulmón

En este informe se han incluido 10 artículos^{18,64,114-121} en los que se estudiaba el perfil genómico de pacientes con NSCLC mediante F1/F1CDx. Los prin-

cipales datos y resultados de estos estudios se recogen en la tabla 4 del anexo VI.

Estos artículos se habían publicado entre los años 2015 y 2018. Dos eran ensayos abiertos^{64,116} y los demás eran series de casos retrospectivas, tres de ellas con pacientes incluidos en el estudio de manera consecutiva¹¹⁷⁻¹¹⁹. Todos los pacientes estudiados presentaban NSCLC en estadios avanzados o metastásicos. En dos estudios^{18,119} no se especificaba el tipo de tumor, mientras que en los demás el único tipo histológico incluido era el adenocarcinoma o bien este era el tipo predominante (con porcentajes del 75-85%). El total de pacientes de los 10 artículos fue de 9.076, de los cuales se informó que 3.387 eran hombres y 3.837 mujeres. La edad mediana informada por los autores osciló entre 58-62,9 años. Dos estudios^{64,121} refirieron incluir pacientes con ECOG 0-1 y en un estudio¹¹⁶ el ECOG de los pacientes osciló entre 0-2. Sólo en el estudio de Hellman y cols⁶⁴ emplearon F1C-Dx mientras que en el resto de trabajos se había utilizado F1 LDT. Sólo dos trabajos utilizaron alguna otra tecnología NGS además de F1: en el de Vigneswaran y cols¹²⁰ también se recogieron resultados del análisis con CMI y Response Genetics Inc, y en el Rozemblum y cols¹¹⁸, se analizaron muestras sanguíneas con G360 cuando no se disponía de muestras de calidad para analizarlas con F1, pero en ninguno de los dos artículos se compararon las técnicas.

En seis estudios se mencionaron las GAs identificadas mediante F1/F1CDx, bien el número total de GAs identificadas que se especificó en tres estudios^{114,115,121}, bien el número medio de GAs por paciente que se informó en cuatro trabajos^{114,115,120,121}, o el número de GAs intervenibles que se mencionó en cuatro artículos^{114,115,118,121}. Entre las GAs informadas en estas publicaciones, las más frecuentes fueron mutaciones en *TP53* (porcentaje medio del 22%), *PIK3CA* (21,50%), mutación *KRAS* (19,63%), translocación *ALK* (16,06%), mutaciones *EGFR* (15,66%), mutaciones *BRAF* (9,10%), reordenamientos *RET* o *MET* (7,40% y 5,53%, respectivamente), mutación *ERBB2* (5,0%) y reordenamiento *ROS1* (1,15%). Tres artículos se centraron en estudiar la presencia de una alteración concreta: reordenamientos *ROS1* (un artículo¹¹⁶) y reordenamientos *ALK* (en dos trabajos^{18,117}). Hellman y cols⁶⁴ no analizaron las GAs sino que estudiaron la TMB y la PD-L1 como predictores de respuesta a la inmunoterapia. La TMB también fue analizada por Rozemburg y cols¹¹⁸.

Drilon y cols¹²¹ señalaron que la utilización de F1 permitió identificar GAs intervenibles que no habían sido detectadas mediante las pruebas convencionales en un 65% de los pacientes, con adenocarcinomas y no fumadores o de bajo consumo tabáquico. Seis pacientes en este estudio recibieron tratamiento y los 6 mejoraron inicialmente; después sólo uno sufrió progresión de la enfermedad. Ali y cols¹⁸ también refirieron que F1 había permitido

detectar reordenamientos *ALK* en 9 pacientes (el 19% del total de pacientes incluidos en el estudio) en los que el estudio con FISH había resultado negativo. A estos 9 pacientes se les trató con crizotinib, de los cuales 7 presentaron buena respuesta al tratamiento. Mediante FISH se detectaron 22 casos con reordenamientos *ALK* que también fueron identificados en el análisis de F1. Por eso, los autores aconsejaron realizar estudio con F1 a todos los pacientes por su superioridad para detectar las GAs *ALK*.

En el estudio de DiBardino y cols¹¹⁴ demostró que los resultados de F1 influyeron directamente en el manejo terapéutico de 7 de los 49 pacientes (14,2%). En 2 pacientes se indicó la retirada del fármaco que ya estaba pautado y en 5 pacientes se modificó el tratamiento, administrando uno nuevo. También en el estudio de Lim y cols¹¹⁵ F1 aportó información clave para 7 pacientes que habían tenido resultados negativos con las pruebas convencionales porque F1 permitió identificar reordenamientos *ROSI* y esto posibilitó su tratamiento con ceritinib; de estos casos, 6 presentaron respuesta objetiva. Pekar-Zlotin y cols¹¹⁷ compararon los resultados de FISH/IHC y F1 en 51 pacientes consecutivos, encontrando discordancia en 6 pacientes. Según informaron los autores, F1 permitió confirmar una incidencia de reordenamientos *ALK* del 13,7% y no del 7,8% como se hubiera considerado utilizando sólo FISH. Dos de los pacientes detectados por F1 pudieron recibir tratamiento con crizotinib: uno alcanzó respuesta completa y el otro, enfermedad estable. También Rozemblum y cols¹¹⁸ constataron la utilidad clínica tanto de F1 como de G360, que identificaron GAs en EGFR y *ALK* en 15 pacientes (14,9%) que habían presentado resultados negativos con los tests convencionales. De esos 15 casos, 12 recibieron el tratamiento recomendado por las NGS y de ellos, 8 alcanzaron una respuesta tumoral objetiva. Por otro lado, en 4 pacientes positivos a EGFR o *ALK*, las NGS permitieron identificar otras GAs. Los autores informaron de que la estrategia terapéutica se pudo modificar en 43 pacientes (42,6%).

En siete artículos^{18,114-118,121} se informó sobre el número de pacientes que podía recibir terapia dirigida, que sumaban un total de 152 pacientes informados, bien con algún fármaco ya aprobado por las autoridades pertinentes (67 pacientes) o bien con fármacos que sólo podían utilizarse en el entorno de un ensayo clínico (39 pacientes). En estos estudios se ofrecieron resultados sobre la respuesta tumoral a la terapia dirigida en 80 pacientes, de los cuales se informó una respuesta objetiva en 55 (68,75%), encontrando una respuesta informada completa en 8 (10%), respuesta parcial en 33 (41,40%), enfermedad estable en 14 (17,50%), progresión de la enfermedad en 5 (6,25%) pacientes y en 4 (5%) los pacientes aún estaban pendientes de revisión o eran pacientes perdidos en el seguimiento. Ver tabla 2.

Tabla 2. Respuesta de los NSCLC al tratamiento recomendado por F1. Influencia de F1 en la decisión terapéutica. Tratamiento administrado.

Autor	N	N tratados	RO	RC	RP	EE	PE	pendientes/ perdidos	Influencia en la decisión terapéutica	tto
Lim, 2017	15	15	11	1	10	2	1	1		ceritinib
Ali	47	9	7	1	6		1	1	19,00%	crizotinib
DiBardino	49	7	6						14,29%	no se menciona
Lim, 2016	51	7	6						13,73%	ceritinib
Rozenblum	101	34	22	5	17	9	3		42,60%	varios
Drilon	31	6	2			2		2	19,35%	varios
Pekar	51	2	1	1		1			6,00%	crizotinib
Total (N)	345	80	55	8	33	14	5	4		
Total (%)		23,19	68,75	10,00	41,25	17,50	6,25	5,00	19,16%	

RO: respuesta objetiva (incluye RC y RP), RC: respuesta completa, RP: respuesta parcial, EE: enfermedad estable, PE: progresión de la enfermedad, tto: tratamiento administrado.

En cinco artículos^{18,114,115,118,121} se informó sobre el impacto de los resultados de F1 en la decisión terapéutica (ver tabla 2), es decir, del porcentaje de pacientes en los que dichos resultados llevaron a una modificación del tratamiento previsto o del ya administrado al paciente. Estos porcentajes oscilaron entre 6% y 42,6%, con un porcentaje medio de 19,16%.

En ningún estudio se informó sobre la supervivencia global y cuatro artículos^{64,116-118} ofrecieron resultados de PFS: en el de Lim y cols¹¹⁶ se encontró una PFS entre 4,4 meses y más de 31,8 meses; en el artículo de Pekar-Zlotin y cols¹¹⁷, se mencionó que un paciente tratado con crizotinib presentó respuesta completa tras este tratamiento y alcanzó una PFS de 18 meses mientras que el segundo paciente llegó a los 6 meses; Rozenblum y cols¹¹⁸ informaron que 21 de 43 pacientes permanecían vivos después de un tiempo medio de seguimiento de 18 meses (rango, 1-58 meses).

En el ensayo abierto publicado por Hellman y cols⁶⁴ se incluyeron pacientes con NSCLC escamosos y no-escamosos en estadio IV o recurrentes, con una TMB ≥ 10 mut/Mb. Los autores consideraron varios grupos de tratamiento: un grupo de tratado combinado con nivolumab + ipilimumab, que incluyó 576 pacientes; otro de 391 pacientes tratados sólo con nivolumab y un grupo de QT con 570 pacientes. Los autores constataron que la TMB y la expresión del PD-L1 eran biomarcadores independientes efectivos para valorar la respuesta tumoral. Compararon la PFS del grupo tratado con nivolumab + ipilimumab (PFS de 30,9%) frente al tratado con QT (17%), independientemente de la TMB o del nivel de expresión de PD-L1. También la PFS resultó significativamente mayor cuando se ajustaba según expresión

del PD-L1 (para aquellos con PD-L1 $\geq 1\%$), y en el grupo de tumores con alta TMB (≥ 10 mut/Mb) la PSF fue significativamente superior, con una mediana de 7,2 meses (IC 95%: 5,5-13,2) vs 5,5 meses (IC 95%: 4,4-5,8). Los autores mencionaron una tasa de respuesta objetiva del 45,3% en el grupo tratado con la combinación de nivolumab e ipilimumab, frente al 26,9% de los pacientes tratados con QT. El 43% de los que recibieron tratamiento combinado, al año se mantenían libres de enfermedad en contraste con el 13% de los tratados con QT. Por esto, los autores reconocieron la necesidad de confirmar los resultados de la combinación de inmunoterapia + QT y determinar si algún punto de corte concreto de TMB podría predecir una buena respuesta a la monoterapia con nivolumab. El tratamiento combinado de nivolumab con ipilimumab frente a QT presentó un HR de progresión de la enfermedad o muerte de 0,48 (IC 95%: 0,27-0,85). Por el contrario, en pacientes con baja TMB (< 10 mut/Mb) y PD-L1 $< 1\%$, la PSF a un año fue del 18% tanto con nivolumab más dosis bajas de ipilimumab como con nivolumab más QT y del 16% con QT.

Este estudio recogió datos de seguridad del tratamiento dirigido recomendado por F1CDx. Los autores comprobaron que dosis de 3 mg/Kg de nivolumab cada 2 semanas y de 1 mg/Kg de ipilimumab cada 6 semanas eran seguras y efectivas. La tasa de EA en el grupo de nivolumab+ipilimumab fue ligeramente superior en los que tenían una TMB > 10 mut/Mb. Se informó de una tasa global de EA de grados 3 y 4 similar entre ambos grupos de tratamiento (31% vs 36%), pero en los casos con una TMB ≥ 10 mut/Mb, el 26% de los pacientes tratados con inmunoterapia presentó EA frente a tan solo un 9% de los tratados con QT. El porcentaje de pacientes que tuvo que suspender el tratamiento debido a los EA fue mayor en el grupo de nivolumab+ipilimumab que en los que recibieron QT (17,4% vs 8,9%). Los que abandonaron el tratamiento de nivolumab en monoterapia fueron un 11,5%. El EA más frecuente en los pacientes que recibieron inmunoterapia, tanto combinada como sólo nivolumab, fue la reacción cutánea (33,9% y 20,7%, respectivamente). Y entre los EA grados 3 y 4, los más frecuentes fueron los eventos hepáticos (8,0% y 3,3%, respectivamente). Del grupo de pacientes tratados con nivolumab+ipilimumab, 7 (2,1%) fallecieron (3 por neumonía, los demás por miocarditis, necrosis tubular aguda, colapso circulatorio y taponamiento cardiaco, respectivamente); de los tratados con QT, 6 (1,1%) fallecieron (2 por sepsis, el resto por infarto cerebral, enfermedad pulmonar intersticial, trombocitopenia y sepsis, respectivamente); y entre los tratados sólo con nivolumab, 2 (0,5%) fallecieron (uno por neumonitis y el otro por sepsis).

El estudio de Rozenblum y cols¹¹⁸ fue el único que hizo mención sobre el tiempo medio hasta obtener los resultados de F1, que fue de 13 días.

Estudios de F1 en pacientes con cáncer de mama

En esta revisión se incluyeron 17 artículos^{74,80,82,122-135}. Los principales datos y resultados de estos estudios se recogen en la tabla 5 del anexo VI.

Todos eran series de casos salvo un ECA (ensayo controlado y aleatorizado)⁷⁴ y fueron publicados entre 2013 y 2017. Entre las series de casos, cuatro de ellas eran consecutivas^{122,126,127,135}. La mayoría eran estudios retrospectivos, excepto tres^{130,131,133} prospectivos, uno de ellos, multicéntrico¹³⁰. El número total de pacientes incluidos fue de 1.067, con una mediana de 44 pacientes porque salvo el ECA⁷⁴ y uno de los trabajos de Ross y cols¹³⁵, que incluyeron 302 y 138 pacientes, respectivamente, en el resto de los artículos el número de pacientes osciló entre 20 y 75. Según datos informados por los autores, 1 de los pacientes era hombre, mientras que 689 eran mujeres. La edad mediana osciló entre 48 y 62 años, con un rango de edad de 14-93. Sólo en el estudio de Parsons y cols¹³⁰ se mencionó que las pacientes presentaban un ECOG entre 0 y 2. Todos los carcinomas de mama estaban en un estadio avanzado y se incluyeron diversos tipos: metaplásico⁸⁰, inflamatorio en los dos estudios^{122,124}, mucinoso¹²⁵, filodes¹³¹ y carcinoma lobular invasivo¹³⁴. En la mayoría de los artículos se describía el estado de receptores hormonales y/o la sobreexpresión HER2, presentando unos porcentajes variables: en un artículo⁸⁰ el 100% de las pacientes eran HER2 negativas, en otros dos^{128,130} el 100% eran triples negativos.

Todos habían utilizado la plataforma F1 para analizar las muestras tisulares, bien del tumor primario o de metástasis. Una gran parte de los estudios refería haber realizado FISH y estudio IHC y de ellos, 4 artículos^{122,124,125,130} daban resultados de concordancia con F1 del 70%, 94% y en dos casos, del 100% (este último valor se refería a la detección de amplificaciones *ERBB2*).

Sólo dos artículos comparaban los resultados de F1 sobre tejido tumoral frente al estudio NGS en ctDNA: Chae y cols¹²⁴ encontraron que F1 permitía detectar un número medio de GAs por paciente significativamente superior a G360 (4,56 (SD=2,98) vs 2,16 (SD=2,31), $P < 0,0001$; IC 95%: 1,28-3,52). El 32,5% de las alteraciones se detectaron sólo mediante ctDNA mientras que el 53,3% sólo en el estudio del tejido y no en ctDNA. En el estudio de Parsons y cols¹³⁰ se encontró una concordancia del 70% entre F1 y el análisis sobre ctDNA (no se menciona qué test se empleó). Nozad y cols¹²⁶ utilizaron ambas técnicas, F1 y F1 Heme, según fuera necesario para el diagnóstico de las GAs, pero no compararon resultados entre ambas.

Ninguno de los artículos seleccionados para este informe comparaba los resultados de F1 con los de otras plataformas de secuenciación con muestras tisulares. En el trabajo de Patel y cols¹³³, se estudió si diferentes

herramientas web identificaban opciones terapéuticas similares para un conjunto dado de GAs detectadas en biopsias tumorales y si estas opciones concordaban con las recomendadas por F1. Estas herramientas web fueron diseñadas para ajustar fármacos dirigidos a las dianas terapéuticas identificadas, y fueron las siguientes: *Drug-Gene Interaction Database* (DGIdb), *My Cancer Genome* (MCG), *Personalized Cancer Therapy* (PCT), *cBioPortal* (cBio). Los autores encontraron que sólo existía una concordancia parcial en las opciones terapéuticas recomendadas para las mismas GAs identificadas entre las herramientas web y F1. En el 33% de los casos existió acuerdo entre las 4 herramientas para recomendar un fármaco para al menos una mutación y en 72% de los casos existió concordancia entre 2 o más herramientas para recomendar la entrada de la paciente en un ensayo clínico

Tal como se recoge en la tabla 5 de extracción de datos y resultados de los estudios de cáncer de mama, el objetivo de la mayoría era estudiar mediante F1 la presencia de GAs intervenibles y contribuir a la toma de decisiones terapéuticas de estas pacientes con cáncer de mama avanzado. El número total de GAs detectadas por F1 e informadas por los autores de 8 artículos fue de 1.110. La mediana de GAs por paciente fue de 4,56, con unas medias informadas en 9 artículos que oscilaron entre 3,1 y 5,7. Del total de GAs, las GAs intervenibles fueron 398, con una mediana de 40 y la media de GAs intervenibles por paciente fue de 1,59. Wheler y cols¹²⁷ consideraron que la mayoría de las 131 GAs identificadas con F1 eran intervenibles aunque no concretaron el número. En los 17 artículos incluidos en este informe, F1 detectó GAs en más de 24 genes y/o vías de señalización celular. Las GAs identificadas con más frecuencia en el total de pacientes fueron las siguientes: mutaciones *TP53* (porcentaje medio de pacientes del 49%), mutaciones *PIK3CA* (32%), amplificaciones *MYC* (26%), amplificaciones *FGFR1* (17%), amplificaciones *CCND1* (18%), mutaciones *ERBB2* (23%) y deleciones *PTEN* (10%).

Balko y cols¹²⁸ estudiaron sólo el perfil molecular de las pacientes con cáncer de mama residual tras haber recibido QT y recomendaron la realización del estudio genómico para todas las pacientes que hubieran demostrado resistencia a la QT por la posibilidad de detectar algunas GAs para las que se pudiera administrar terapia dirigida. Meric-Bernstam y cols¹²⁹ compararon el perfil genómico de 33 muestras de tumores primarios y recurrentes emparejados, y encontraron que 97 de 112 (86,6%) mutaciones somáticas fueron concordantes; además, informaron que en 40 pacientes (93%) se presentaron GAs intervenibles en el tumor primario y la mayoría se detectaron también en las recurrencias/metástasis. Ross y cols¹²⁵ constataron que la amplificación *ERBB2* se daba con una frecuencia significativamente superior en los tumores recurrentes en comparación a los primarios ($p=0,03$). Vasan y

cols¹³¹ mencionaron que no se encontraron diferencias significativas entre la media de GAs por tumor en el primario y en los metastásicos hipertratados (2,9 vs 3,4; $p=0,31$) y que el número medio de GAs potencialmente intervenibles era similar en el tumor primario y en los metastásicos hipertratados (1,6 vs 2,0; $p=0,24$).

Entre las pacientes con cáncer de mama metastásico estudiadas por Yuan y cols¹²³, se detectaron alteraciones intervenibles en un porcentaje muy elevado (95%). La vía de señalización con mayor número de alteraciones en estas pacientes fue la PI3K/mTOR, de ahí que el tratamiento recomendado con más frecuencia fuera el everolimus. La presencia de amplificación FGFR1 se asoció a una sobreexpresión de RNA, RE+, expresión p53 y a un peor pronóstico. Los autores señalaron la falta de acceso a muchos de los fármacos que potencialmente pudieran utilizarse como terapia dirigida frente a las alteraciones intervenibles encontradas, al tiempo que recordaron la importancia de poder acceder a ensayos clínicos en los que las pacientes puedan recibir la terapia dirigida.

Sólo 5 trabajos^{82,128-131} mencionaron los tratamientos previos recibidos. Cinco artículos especificaron el número de pacientes que recibió terapia dirigida seleccionada a partir de los resultados de F1: en dos artículos^{74,82} el fármaco administrado fue everolimus; en el de Parsons y cols¹³⁰ se dio terapia dirigida o inmunoterapia a 4 pacientes: bicalutamida (a la paciente con AR+), carboplatino/inhibidor *PARP* (a la paciente con mutación *BAP1*), trametanib (a la paciente con amplificación *MAP2KI*) y trastuzumab (a la paciente con mutación *ERBB2*); en el estudio de Yuan y cols¹²³, los resultados aportados por F1 llevaron a administrar everolimus a 5 pacientes con mutaciones en *PIK3CA* o *TSC1* y pazopanib a 2 pacientes por presentar amplificación *FGFR*. Y Ross y cols¹³⁵ utilizaron varios anti-HER2 en 3 pacientes: la paciente con mutación *L755S ERBB2* respondió a neratinib; la que presentó la mutación *S310F* respondió a trastuzumab, pertuzumab y fulvestrant; y la paciente con la mutación *V777L* y *S310F* respondió a terapia anti-HER2 combinada con QT.

Cuatro estudios^{82,123,130,132} analizaron la respuesta tumoral al tratamiento. Exceptuando Yuan y cols¹²³, los demás utilizaron la clasificación RECIST para su valoración. De las 44 pacientes estudiadas por Yuan y cols¹²³, 7 presentaron un beneficio clínico tras la terapia indicada por F1, con duración de entre 8 a 34 semanas, e incluso 3 pacientes tratadas con everolimus presentaban una buena respuesta durante más de 32 semanas; 8 pacientes sufrieron finalmente progresión de la enfermedad. Niu y cols⁸² trataron a 28 pacientes pero la valoración de la respuesta tumoral sólo pudo hacerse en 13. De estas 13, de las 7 tratadas con everolimus y exemestane, 5 mostraron estabilidad de su enfermedad durante al menos 6 meses; 5 pacientes fueron tratadas con fulvestran y de ellas, 4 sufrieron progresión de la enfermedad mientras que

1 logró que la enfermedad se mantuviera estable durante 8 meses; la otra paciente fue tratada con tamoxifeno y presentó progresión de la enfermedad. También Parker y cols¹³² mencionaron respuesta parcial en 5 pacientes y enfermedad estable en 7 durante al menos 6 meses. Por último, Parsons y cols¹³⁰ describieron enfermedad estable durante 9 meses en una paciente tratada con trastuzumab, mientras que otras 3 pacientes que recibieron otros fármacos dirigidos respondieron inicialmente pero tras varias semanas sufrieron progresión de la enfermedad.

Yuan y cols¹²³ observaron que de las pacientes con cáncer de mama metastásico recogidas en su estudio, un 33% de las que presentaban alteraciones intervenibles no pudieron iniciar la terapia dirigida por rápido deterioro o lo comenzaron pero en menos de 2 semanas tuvieron que suspenderlo y también mencionaron la falta de acceso a este tipo de fármacos en algunos casos. Este último motivo fue esgrimido por Parker y cols¹³² como la principal causa de no recibir el tratamiento dirigido.

Pocos estudios utilizaron F1 para determinar la TMB y el estatus de microsatélites. Nozad y cols¹²⁶ encontraron que todos presentaban MMS y una baja TMB, todos por debajo del nivel de 10 mut/MB, con una mediana de 2,7 mut/Mb y unos valores muy similares y sin diferencias significativas entre la TMB del tumor primario y las metástasis.

El único estudio sobre F1 en cáncer de mama en el que se hace mención a la seguridad es el estudio de Yuan y cols¹²³, que mencionó la aparición de toxicidad asociada al tratamiento con pazopanib. La paciente afectada sufrió un incremento de enzimas hepáticas que llevó a suspender la administración del fármaco.

En un estudio se mencionó que el informe de F1 tardó entre 7-14 días en llegar al oncólogo. En otro artículo¹³⁰ también se hizo referencia al tiempo transcurrido desde el envío de las muestras tisulares hasta disponer del resultado de F1, que osciló entre 12-30 días y se pudo indicar el tratamiento en menos de 28 días al 60% de las pacientes.

Estudios de F1 en pacientes con CCR

Sólo el artículo de Gong y cols⁸⁷, que utilizaba F1 para estudiar el CGP de pacientes con CCR cumplía los criterios para ser incluido en este informe. Los autores estudiaron el perfil molecular de 138 pacientes con CCR mediante esta NGS con el objetivo de caracterizar las GAs que se sabía que eran dianas para la terapia dirigida y que estaban relacionadas con el pronóstico de la enfermedad o con una posible resistencia terapéutica. Además, describieron otras GAs poco frecuentes en mCCR. Se trata de un estudio unicéntrico, retrospectivo, que incluyó pacientes entre abril de 2013 y febrero de 2016. De los 138 pacientes, 82 (59,4%) eran hombres y 56 (40,6%) mujeres, con una edad

mediana de 56 años (rango, 27-88). Todos presentaban CCR avanzado o metastásico y habían recibido varias líneas terapéuticas previamente.

Las muestras para F1 se tomaron a partir de la resección quirúrgica, biopsia core o biopsia excisional. El estudio con F1 permitió detectar mutaciones RAS en el 51,4% de los tumores; la mayoría (n=68; 49,3%) fueron mutaciones *KRAS* en exón 2 (que predice falta de respuesta a anti-EGFR); 15,5% eran otras mutaciones que también se asociaron a resistencia a los anti-EGFR. En 3 (2,2%) pacientes se encontraron mutaciones *NRAS*. También se detectaron mutaciones *RAF* en 7,2%. La mayoría (n=9; 6,5%) fueron *BRAFV600E* activadoras, que se han asociado a peor pronóstico, a resistencia a la QT y a falta de respuesta a los anti-EGFR. En torno al 41% de pacientes no presentaba mutaciones RAS/*RAF*. Dos pacientes presentaron mutaciones *KRAS* y *BRAF* simultáneas, a pesar de que suelen ser mutuamente excluyentes y se asociaron a peor pronóstico.

Otras GAs identificadas por F1 fueron amplificaciones *MET* (n=3; 2,2%) que se asociaron a peor pronóstico, a fenotipos más agresivos y a resistencia a tratamiento con inhibidores MEK. También mutaciones *PIK3CA* (n=25; 18,1%), mutaciones *PTEN* (n=15; 10,9%) y mutaciones *AKT* (n=4; 2,9%), que se dieron en tumores más agresivos y que no respondían a anti-EGFR.

La mayor parte de los pacientes presentaba tumores con menos de 9 CRGAs (121 o 87,7%) y de ellos, la mayoría eran tumores de colon izquierdo y todos MSS. Catorce (10,1%) pacientes tenían entre 9-16 CRGAs y sólo 3 pacientes (2,2%) presentaban entre 17 y 25 CRGAs, detectándose en los tres una elevada TMB. En el 25% de los tumores hipermutantes se detectaron mutaciones *POLE* (polimerasa ϵ). En general, tanto los tumores con alta TMB como aquellos en los que se detectan mutaciones *POLE* responden bien a los anti-PD-1.

En este estudio se identificaron algunas mutaciones RAS poco frecuentes que tuvieron gran importancia clínica dada su resistencia a los fármacos anti-EGFR. También se detectó en 2 pacientes una amplificación *KRAS* y en otro, una amplificación *NRAS*, ambas muy raras en CCR. Estas GAs se dieron en pacientes con CCR con diseminación metastásica difusa que evolucionaron hacia la progresión tumoral incluso con varias líneas de tratamiento, y que resultaron ser resistentes también a los anti-EGFR. Los autores sólo concretaron el tratamiento administrado a un escaso número de pacientes. Una paciente con amplificación *KRAS* fue tratada con FOLFIRI+panitumumab y mostró enfermedad estable tras 6 meses. Otro paciente también con amplificación *KRAS* sufrió progresión rápida tras anti-EGFR y una paciente con amplificación *NRAS* también progresó tras dos meses de tratamiento con FOLFIRI+cetuximab. Cuatro de los 7 pacientes con amplificación *ERBB2 RAS wild-type* recibieron tratamiento anti-EGFR; de ellos, tres experimentaron estabilización de la enfermedad durante más de 4 meses y un paciente presentó respuesta parcial durante más de 5 meses.

A la vista de estos resultados, los autores recomendaron que a los pacientes con CCR se les debía realizar un análisis del CGP que estudiara el mayor número posible de genes, incluyendo más de los recomendados por la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)¹³⁶. Además, recomendaron estudiar la TMB en pacientes con CCR porque lo consideraron un mejor indicador que el estado de inestabilidad de los microsatélites para determinar un perfil hipermutante que predeciría una buena respuesta a la inmunoterapia con anti-PD-1.

Estudios de F1 en pacientes con cáncer de ovario

Se han seleccionado dos artículos^{137,138} en los que se utilizaba F1 para el estudio de tumores de ovario que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para el presente informe. Ambos eran retrospectivos y ambos se realizaron en un único centro hospitalario.

El estudio de Dougherty y cols¹³⁷ se analizaron 209 muestras de carcinomas serosos de alto grado recogidas de pacientes que habían respondido a la QT basada en platino pero que posteriormente sufrieron una recaída. El objetivo era estudiar la evidencia clínica y biológica de las mutaciones somáticas en *BRCA1/2* como predictoras de respuesta al olaparib para el tratamiento de mantenimiento. La mutación en estos genes se consideraba predictora de buena respuesta a los inhibidores PARP. Utilizaron F1 para realizar el análisis genómico, encontrando mutaciones *BRCA1/2* en 114 (55%), de las que 78 se presentaban en *BRCA1* y 36 en *BRCA2*. La concordancia de los resultados de F1 con los de la secuenciación de Sanger fue alta (grado de acuerdo del 97%). Los autores informaron sobre una respuesta favorable al olaparib en los que tenían mutaciones *BRCA1/2*, aunque no se aportaron datos sobre esta efectividad terapéutica.

El segundo estudio¹³⁸ incluido se realizó en 48 pacientes con cáncer de ovario en estadio avanzado, con una edad media en el momento del estudio del perfil genómico de 55,7 años; rango de 23 a 76 años. El 79% de los tumores eran carcinomas serosos, la mayoría de alto grado. En todas las pacientes el perfil genómico se analizó mediante F1, que permitió detectar un total de 141 GAs, con una media de 2,9 alteraciones por tumor (rango: 0-8). Las GAs más frecuentes fueron las siguientes: mutación *TP53* (en el 79% de los tumores), amplificación *MYC* (25%), truncamiento *BRCA1/2* (23%), mutación/amplificación *HRAS* (16,6%) y mutación *NFI* (14,5%). De todas las GAs, 67 eran intervenibles: 11 (22,9%) tumores presentaron mutaciones *BRCA1/2*, que eran potencialmente sensibles a inhibidores *PARP*; los 8 casos con GAs en *KRAS* predecían resistencia a los anti-EGFR y sensibilidad a los inhibidores *MEK*; las alteraciones en *NFI* potencialmente predecían respuesta a los inhibidores *mTOR*; la mutación *ATM* indicaba buena respuesta a inhibidores

PARP; en dos tumores se detectaron amplificaciones en *c-MET* predecían buena respuesta a los inhibidores *MET*, incluyendo el crizotinib. En cuanto a la relación entre las GAs y el tipo histológico, las mutaciones *TP53* se identificaron en el 79% de los tumores, aunque más frecuentemente en los carcinomas papilares serosos (83%) frente a los no-papilares serosos (50%). Los autores señalaron la ventaja de utilizar F1 como plataforma de NGS que facilitaba el estudio simultáneo de todo tipo de GAs en un único test.

En ninguno de los dos estudios se aportó información relativa a tratamiento, a posible respuesta tumoral ni otros resultados de efectividad clínica. Tampoco se evaluó el desarrollo de posibles EAs.

Estudios de F1 en pacientes con melanoma

Tres artículos^{100,105,139} de pacientes con melanomas estudiados con F1/F1CDx cumplieron los criterios de inclusión de este informe. Los principales datos y resultados de estos estudios se recogen en la tabla 6 del anexo VI. Se trata de estudios retrospectivos realizados sobre muestras muy pequeñas de pacientes, donde F1 se utilizó con diferentes objetivos y en los que se han estudiado variables de resultados diferentes entre sí.

En el estudio de Carlson y cols¹⁰⁰ se utilizó F1 como test para analizar el perfil genómico completo e identificar las GAs que pudieran influir en el tratamiento de 30 pacientes (17 hombres y 13 mujeres) con melanoma metastásico. Mediante F1 se pudo comprobar que todos los pacientes tenían al menos 1 GA. En total se detectaron 83 GAs, con una mediana de 2,5 GAs por muestra (rango, 1-7). Las GAs más frecuentes fueron sustituciones (54/83; 65%), amplificaciones (17/83; 20%), pérdidas del gen completo o de exones (11/83; 13%). Se encontró un número significativamente mayor de GAs en los melanomas pobremente diferenciados y en los anaplásicos. Y se detectó que la mutación *BRAF* era significativamente más frecuente en el melanoma de fenotipo nevoide (100% vs 32%, $p=0,02$). Además, las principales vías de señalización afectadas fueron MAPK (77%), PTEN-PI3K-AKT (50%) y p16INH4a-CCND1-CDK4-RB1 (43%). Por otro lado, mediante F1 se pudo comprobar que todos tenían, al menos, 1 CRGA. Del total de 83 GAs, se identificaron 64 CRGAs (77%; 64/83) y por tumor, se encontró una mediana de 2 CRGAs (media de 2,1; rango: 1-7). Un 29% (24/83) de las muestras presentaron GAs intervenibles. Los autores consideraron que la importancia del uso de F1 radicaba en su capacidad para identificar un elevado número de CRGAs, lo que permitiría modificar o influir en la toma de decisiones terapéuticas.

En el trabajo de Johnson y cols¹⁰⁵ el objetivo era analizar el valor de la TMB como factor predictivo de la respuesta de los melanomas metastásicos a la inmunoterapia. Utilizaron F1 para determinar la TMB y establecieron

unos valores de corte para clasificar a los pacientes en tres grupos según la probabilidad de respuesta al tratamiento: alta TMB (>23,1 mut/Mb), intermedia (3,3-23,1 mut/Mb) y baja (<3,3 mut/Mb). Los fármacos utilizados fueron nivolumab y pembrolizumab (como anti-PD-1) y atezolizumab (como anti-PD-L1). Los autores encontraron una TMB significativamente mayor en los respondedores a anti-PD-1/PD-L1 (mediana de 45,6 vs 3,9 mut/Mb; $p=0,003$). Además, la tasa de respuesta objetiva resultó mayor en los de alta TMB en comparación a los de intermedia y baja (85% vs 29% vs 14%; $p<0,001$), igual que la PFS y supervivencia global que también fueron superiores de forma significativa en el grupo de alta TMB. Por otro lado, se vio que la mediana de TMB era diferente según la mutación *driver* de cada caso, según los resultados obtenidos con F1: *BRAF*, *NRAS*, *NFI* y *triple wild-type* (12,0 vs 17,6 vs 62,7 vs 2,2 mut/Mb; $p<0,001$). También F1 permitió constatar que los melanomas con mutaciones *BRCA2* presentaban mayor TMB (mediana de 68,2 vs 15,9; $p=0,028$). Además, mediante F1 se observó que las GAs detectadas en *NFI* fueron más frecuentes en el grupo de respondedores (50% vs 21%; $p=0,015$) mientras que el *triple wild-type* fue más frecuente en los no-respondedores (13% vs 35%; $p=0,045$).

El tercer estudio incluido en este informe es el de Wheler y cols¹³⁹. En él los autores seleccionaron una muestra consecutiva de 10 pacientes con melanoma avanzado con mutación *BRAF* en los que el tratamiento convencional (mediana de 2 líneas terapéuticas previas) ya había fracasado. A todos los pacientes se les hizo F1, además de realizar estudio IHC para valorar la presencia de deleciones *PTEN* y PCR para detectar alteraciones *BRAF*, y en los casos en que fue posible, se estudiaron también *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* y *TP53*. Siete pacientes recibieron tratamiento con inhibidores *BRAF*, 1 paciente con inhibidores *MEK* y 2 pacientes fueron tratados con inhibidores *BRAF* y *MEK*. En ellos se hizo evaluación radiológica de la respuesta por CT y/o PET aplicando criterios RECIST v1.0 o v1.1 y encontraron una respuesta completa en 4 (40%) pacientes y respuesta parcial en 6 (60%). El tiempo hasta el fallo del tratamiento (TTF) de los pacientes con respuesta completa fue de 5,6; 23,6+; 27,4+ y 28,7+ meses. Y en los pacientes que respondieron parcialmente, el TTF fue de 3,0; 4,2; 5,7; 7,0; 7,9 y 11,2 meses. Todos los pacientes tenían la mutación *BRAFV600E* pero también se constató que la mayoría presentaba múltiples GAs. En opinión de los autores, estas otras GAs podrían estar implicadas en la resistencia al tratamiento con inhibidores *BRAF* y/o *MEK*.

Artículo de revisión de la evidencia

Se ha seleccionado un único artículo¹¹² de revisión de la evidencia publicada sobre tres plataformas comerciales de estudio de perfil genómico. En él se

recoge el trabajo de un panel de expertos multidisciplinares especialistas en cáncer que analizaron y compararon los resultados de CMI, F1 y OncoDEEP®, que eran las técnicas de NGS más utilizadas en España. Las tres plataformas llevaban el marcado CE y se realizaban en laboratorios con certificado CLIA y con acreditación por el CAP. También en este artículo se había realizado una amplia revisión de la literatura, aunque no sistemática, y de los sitios web de cada una de estas tecnologías. Los autores señalaron las ventajas que ofrecían estas plataformas comerciales en comparación a los test utilizados en laboratorios locales o con pequeños paneles de genes, ventajas derivadas del estudio centralizado de un alto número de pacientes y de la posibilidad de generar evidencia sobre la utilidad clínica de las mismas de forma más rápida, permitiendo una incorporación también más rápida a la clínica asistencial.

Para comparar las tres plataformas, los autores analizaron las tecnologías utilizadas en cada una de ellas, su proceso de validación analítica, la evidencia empleada para asociar sus resultados con determinados tratamientos para tumores sólidos o con resistencias a ciertos fármacos, y los estándares de calidad de cada una de ellas. En las tres, CMI, F1 y OncoDEEP®, se incluye la tecnología NGS para el estudio de 592, 315 y 150 genes, respectivamente. En resumen, los autores constataron que las tres plataformas eran capaces de identificar mutaciones puntuales, indels y CNA; que F1 también identificaba reordenamientos de genes y OncoDEEP®, translocaciones de genes; que CMI y F1 estudiaban, también, la TMB. CMI y OncoDEEP® incluyen IHC, pirosecuenciación y análisis de la inestabilidad de microsatélites, y sólo CMI secuenciación de RNA y CISH. Para este panel de expertos, CMI tiene un gran valor predictivo frente a un elevado número de quimioterápicos, hormonoterapia, terapia dirigida, inmunoterapia y fármacos en investigación en ensayos clínicos; F1 tenía valor predictivo frente a terapia dirigida, fármacos en investigación, inmunoterapia a partir de la TMB y QT basada en platinos por su asociación a mutaciones BRCA1/2; y OncoDEEP® era predictivo de respuesta a terapia dirigida, fármacos en investigación, inmunoterapia y de los quimioterápicos, sólo los agentes basados en platino, los análogos de nucleósidos y los taxanos. No se encontró que F1 y OncoDEEP® fueran predictivos de respuesta a hormonoterapia.

Los autores también revisaron la utilidad clínica de las tres plataformas, definiendo dicha utilidad clínica como cualquier uso de los resultados del test que aportara información para el manejo clínico del paciente y en la toma de decisiones. Encontraron que CMI había permitido un cambio en la decisión terapéutica en 120 de 137 (88%) casos y 348 de 473 (74%) pacientes fueron tratados de acuerdo al informe emitido por CMI. De los pacientes estudiados con F1, la decisión terapéutica se modificó en 36 de 132 (27%) y solo 285 de 1,174 (24%) pacientes recibieron el tratamiento recomendado

por F1. Para OncoDEEP® no se encontraron artículos publicados que ofrecieran estos datos.

También analizaron el beneficio clínico de estos tests, es decir, el impacto en resultados de salud del paciente a consecuencia de las decisiones tomadas en base al perfil genómico de cada test. Este beneficio se midió en forma de PFS, respuesta tumoral (si respuesta completa o parcial, o estabilización de más de 6 meses), tiempo hasta el siguiente tratamiento (TNT) y la supervivencia global. El porcentaje de pacientes en los que se observó beneficio clínico tras utilizar CMI o F1 fue de 40% y 27%, respectivamente. La mediana de supervivencia global de los registros observacionales (n=1180) estudiados con CMI fue de 422 días, mayor en los tratados de acuerdo al resultado genómico (HR=0,68; p=0,001) y la mediana de TNT en el estudio colaborativo en red que utilizó CMI fue de 33 días más en los pacientes tratados según indicación de CMI (248 días vs 215 días, HR=0,85; p=0,00018). Los autores no encontraron datos sobre supervivencia global ni TNT de los pacientes estudiados con F1.

En conclusión, los autores consideraron que estas plataformas tenían un valor clínico potencialmente alto y que utilizados correctamente podía aportar un marcado beneficio al paciente. Señalaron algunos contextos clínicos en los que resultaría de gran interés como el tratamiento de pacientes con enfermedades para las que haya terapias dirigidas aprobadas; para el screening de pacientes candidatos a participar en ensayos clínicos; y para aquellos pacientes en los que el test de biomarcadores estándar no identificara GAs intervenibles y no puedan ser incluidos en ensayos clínicos.

Los autores consideraron que CMI era la multiplataforma más completa y justificaron la utilización de esta prueba por el beneficio clínico que genera.

Por otro lado, señalaron que desde la perspectiva del paciente, la información que se debe dar a los pacientes antes de la prueba genómica debe ser “clara, transparente y honesta”, y se debían presentar de forma correcta las potenciales expectativas, en especial si cuando se realiza el test el paciente ya está en una fase muy avanzada del proceso tumoral donde es posible sufrir un rápido deterioro que imposibilite la administración de los fármacos que se pudieran recomendar. Además, otro elemento crucial a tener en cuenta son las limitaciones y barreras en el acceso al tratamiento y/o reembolso de fármacos no aprobados para una patología concreta.

Los autores reclamaron que estas plataformas de perfil genómico fueran introducidas en la práctica clínica y que en la autorización para el uso de estas plataformas y la aprobación de algunos de los fármacos sugeridos debían tenerse en cuenta determinadas situaciones clínicas de difícil tratamiento como los tumores raros, los carcinomas de origen desconocido, el cáncer de mama triple negativo o el carcinoma colorrectal avanzado y refractario a varias líneas terapéuticas.

Ensayos clínicos con F1/F1CDx

Se han identificado nueve ensayos clínicos que evalúan aspectos relacionados con F1 (tabla 8 del anexo VIII), de los cuales cuatro están activos. Siete de estos ensayos fueron realizados por Foundation Medicine Inc. (Cambridge, Massachusetts, EEUU).

El primer estudio realizado con F1 fue el estudio titulado *FoundationOne™ Test Registry Study*. Realizado entre 2013 y 2016 por Foundation Medicine Inc., el objetivo era caracterizar los patrones de utilización de la prueba F1 por parte de oncólogos de EEUU bajo condiciones de práctica clínica rutinaria.

El siguiente estudio es *IMAGE Study: Individualized Molecular Analyses Guide Efforts in Breast Cancer - Personalized Molecular Profiling in Cancer Treatment at Johns Hopkins* que fue realizado, entre 2013 y 2017, por el centro integral del cáncer *Sidney Kimmel* de *Johns Hopkins* en colaboración con Foundation Medicine Inc. Era un estudio controlado no aleatorizado de dos brazos con asignación paralela. Los pacientes diagnosticados con cáncer de mama metastásico eran asignados a dos grupos. En uno de los grupos se analizaba el perfil genético del tumor de las muestras de tejido de los pacientes con F1 y se sugería un tratamiento en función al perfil genético. En el otro grupo, también se analizaban las muestras sanguíneas de los pacientes con F1 pero no se sugería ningún tratamiento. El objetivo del estudio era estudiar la viabilidad para la identificación de pacientes que podrían beneficiarse del análisis del perfil molecular del tumor así como analizar los resultados de los pacientes que siguieron la sugerencia del “Molecular Profiling Tumor Board” en comparación con los que no lo hicieron.

El estudio observacional realizado entre 2014 y 2017 titulado *Concordance Between ctDNA Assay and FoundationOne* tuvo como objetivo evaluar si un nuevo ensayo de ctDNA desarrollado por Foundation Medicine Inc. era capaz de detectar alteraciones genómicas en la sangre periférica que fueran consistentes con las alteraciones genómicas detectadas en la muestra de biopsia tumoral primaria y/o metastásica de un paciente mediante F1. El estudio fue financiado por Foundation Medicine Inc., y colaboraron 29 universidades y centros de investigación de EEUU.

Otro estudio realizado entre 2015 y 2018, titulado *Outcomes of FoundationOne Directed Therapy in Cancer of Unknown Primary*, consistía en determinar si F1 proporcionaba información que permitiera a los médicos tomar decisiones terapéuticas con terapias dirigidas utilizadas en ensayos clínicos o terapias aprobadas por la FDA, incluyendo fármacos fuera de la indicación de la ficha técnica. El objetivo era evaluar si los resultados, en términos de supervivencia global, eran mejores en los pacientes que recibían la terapia dirigida en comparación con los resultados de los pacientes que

recibían la terapia estándar. Se trataba de un estudio observacional del tipo estudio de caso, realizado por Foundation Medicine Inc. en colaboración con 29 centros de EEUU, en el que participan 125 pacientes diagnosticados de tumor primario de origen desconocido avanzado no operable o metastásico.

El estudio titulado *Genomic Profiling in Previously Untreated Metastatic Non-small Cell Lung Cancer*, realizado entre 2015 y 2017, era un estudio observacional comparativo no aleatorio con siete cohortes. Las cohortes se diferenciaban entre sí en función de si el perfil genético del tumor se analizaba por F1 o por otra plataforma, si los resultados mostraban una alteración genética intervenible y si el paciente recibía la terapia dirigida indicada por la plataforma utilizada. El objetivo era comparar los datos de supervivencia y costes basándose en el uso diferente de la elaboración de perfiles genómicos. El estudio estaba realizado por la empresa Cota Inc. en colaboración con *Regional Cancer Care Associates LLC, Foundation Medicine Inc. y Horizon BlueCross BlueShield of New Jersey*. El estudio terminó sin completarse en 2017 por no alcanzar el número preestablecido en la cohorte de *Horizon BlueCross BlueShield*.

El estudio *Comprehensive Gene Sequencing in Guiding Treatment Recommendations Patients With Metastatic or Recurrent Solid Tumors*, que comenzó en 2013 y aún sigue activo, es un ensayo clínico piloto que implementa la secuenciación genómica integral para guiar las recomendaciones de tratamiento en pacientes con tumores sólidos metastásicos o recurrentes. Está realizado por *Ohio State University Comprehensive Cancer Center* en colaboración con Foundation Medicine Inc. Los objetivos primarios de este estudio son evaluar la factibilidad y la logística asociadas con un ensayo clínico utilizando F1 en un entorno terapéutico académico, así como determinar la proporción de pacientes que recibirán una terapia relacionada con el cáncer sobre la base de los resultados proporcionados por la prueba F1. En el estudio participan 150 pacientes diagnosticados con cáncer recurrente o en estadio IV de mama, colon o recto.

PROFILER 02 (Evaluation of the Added Value of a Large Molecular Profiling Panel Versus a Limited Molecular Profiling Panel in Advanced Solid Tumors), es un ensayo clínico multicéntrico aleatorizado con asignación paralela, que comenzó en 2017 y se encuentra en fase de reclutamiento, que se está llevando a cabo en el centro *Leon Berard* de Francia con la colaboración de *Roche Pharma*. El objetivo es comparar la relevancia clínica de F1 frente al panel CONTROL en pacientes con tumores sólidos avanzados. La medida principal de resultado es comparar la proporción de pacientes para los que se podría iniciar una terapia recomendada identificada genómicamente utilizando el panel NGS de F1 frente al panel CONTROL, desarrollado en el centro *Leon Berard "Unidad de Caracterización Tumoral"*; capaz de analizar 87 genes relacionados con el cáncer. Entre las medidas de resul-

tado secundarias destacan la progresión libre de enfermedad, la tasa de respuesta global, la duración de la respuesta, medidas de calidad de vida del paciente, número de pacientes con alteraciones dirigidas detectadas por ambas plataformas, entre otras.

El estudio *BLCIO (Beating Lung Cancer in Ohio Protocol in Improving Survival in Patients With Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer)*, que comenzó en 2017, es un ensayo controlado aleatorizado con asignación paralela y sin cegamiento, realizado por *Ohio State University Comprehensive Cancer Center* en EEUU. El objetivo principal del estudio es observar durante seis meses cuáles son las prácticas de atención habitual, supervivencia y calidad de vida de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón de células no microcíticas en estadio IV. Tras esos seis meses, los pacientes son asignados aleatoriamente a dos grupos distintos. Un grupo recibe el tratamiento habitual y en el otro grupo, los pacientes se someten a la toma de muestras de tejido para ser analizado con F1 y muestras de sangre para ser analizados con FoundationACT. En este último grupo, interviene un comité de genómica en el asesoramiento para la toma de decisiones.

TEMPO study: A Prospective Observational Trial Evaluating Outcomes of FoundationOne (Registered Trademark)-Directed Matched Targeted Therapy in Patients with Cancer of Unknown Primary fue un estudio realizado entre 2015-2017 por el *Instituto del Cancer Peter MacCallum - East Melbourne* y financiado por Foundation Medicine Inc. Se trataba un estudio observacional prospectivo de un solo brazo que terminó antes de tiempo por dificultades en el reclutamiento de pacientes. El objetivo principal era evaluar la utilidad clínica de F1 para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de primario desconocido. Se mandaron muestras de todos los pacientes a Foundation Medicine Inc. para ser analizadas con F1. Los resultados se enviaron al médico, junto con otras pruebas diagnósticas realizadas, para establecer el plan de tratamiento. Los pacientes se sometían a un seguimiento cada tres meses para obtener información sobre su estado y tratamiento.

A parte de los estudios mencionados anteriormente, se han identificado cuatro ensayos clínicos en los que se utiliza F1 para elaborar el perfil genómico de los pacientes enrolados en los distintos ensayos clínicos que evalúan principalmente la respuesta a distintos fármacos antitumorales.

El primero de estos ensayos es *CheckMate 451: An Investigational Immunotherapy Study of Nivolumab, or Nivolumab in Combination With Ipilimumab, or Placebo in Patients With Extensive-Stage Disease Small Cell Lung Cancer (ED-SCLC) After Completion of Platinum-based Chemotherapy*. Este estudio comenzó en 2015 y está realizado por Bristol-Myers Squibb. Se trata de un ensayo clínico en fase 3, aleatorizado con asignación paralela y cegamiento de participantes, investigador, evaluador de resultados y

proveedor de cuidados. El estudio cuenta con tres brazos: en uno de ellos los pacientes reciben nivolumab, en otro brazo, reciben una terapia combinada de nivolumab y ipilimumab y en el tercer brazo reciben un placebo. La medida principal es la supervivencia global, y las medidas secundarias la PFS, análisis descriptivos de supervivencia global y PFS para evaluar la monoterapia con nivolumab frente a la terapia combinada de nivolumab con ipilimumab. Otra medida de resultados es la TMB que es medida con la plataforma F1CDx.

El ensayo *International Breast Cancer Biomarker, Standard of Care and Real World Outcomes Study BREAKOUT*, comenzó en 2017 y está siendo realizado por AstraZeneca en distintos países. Es un estudio de una cohorte de pacientes con cáncer de mama metastásico con receptor HER2 negativo que, han iniciado una QT citotóxica sistémica de primera línea. El estudio estimará la prevalencia BRCA y otros genes de reparación de recombinación homóloga (HRR). El estudio también describirá los tratamientos administrados y estimará los resultados clínicos asociados de la supervivencia global y la PFS entre las portadoras de mutaciones en el contexto de un entorno de tratamiento con un inhibidor de la ribosa polimerasa de bajo contenido en polipropileno ADP. La mutación del gen BRCA analizará, utilizando una muestra de sangre obtenida preferiblemente durante la práctica clínica de rutina, con la prueba *Germline BRCA Test*. Cuando se disponga de suficiente cantidad de muestras tumorales almacenadas del paciente se realizará el perfil genómico del tumor utilizando la plataforma F1CDx. Posteriormente, se realizará el seguimiento durante 30 meses de los pacientes que hayan dado positivo para los genes *gBRCA* y *sBRCA* y otros genes *HRR* para evaluar los patrones de tratamiento y los resultados clínicos asociados.

El estudio titulado *Evaluation of the Safety and Tolerability of Niraparib With Everolimus in Ovarian and Breast*, realizado por el *Hospital Avera McKennan* Hospital en EEUU, comenzó en 2017 y tienen un diseño de ensayo clínico no aleatorizado. Este estudio tiene como objetivo determinar la dosis máxima tolerada de la combinación de niraparib y everolimus, mediante un diseño tradicional de escalado de dosis, comenzando con el nivel de dosis más bajo y aumentando hasta el nivel de dosis máximo permitido según se especifica en el protocolo. El estudio cuenta con cuatro brazos que se diferencian en las dosis de everolimus y niraparib y en el número de días de administración durante ciclos de 28 días. Una de las medidas secundarias de resultados es evaluar si los pacientes con ciertas alteraciones moleculares responden mejor a la combinación de medicamentos, según indicación de la plataforma F1.

Otro estudio realizado también por el *Hospital Avera McKennan Hospital* se titula *Evaluation of the Safety and Tolerability of TAK-228 with TAK-*

117 and Paclitaxel in Advanced Solid Tumors. Es un ensayo clínico no aleatorizado, que comenzó 2017, cuyo objetivo es determinar la factibilidad y tolerabilidad de la combinación de TAK-228 y TAK-117. El estudio está formado por cinco cohortes en las que se varían las dosis de los medicamentos Paclitaxel, TAK-228 y TAK-117. La plataforma F1 es utilizada para evaluar si los pacientes con alteraciones genómicas responden más favorablemente en el grupo de combinación de fármacos.

El último estudio identificado, *KATIA-Unraveling KAdcykla (Trastuzumab Emtansine; T-DMI) Resistance In HER2-positive Advanced Breast Cancer (ABC): a Prospective GEICAM Study*, comenzó en 2019, y es realizado por el Grupo Español en Investigación de Cáncer de Mama en varios hospitales españoles con la colaboración de Roche Pharma. El objetivo de este estudio es evaluar los mecanismos de resistencia primaria y adquirida a Kadcyla®. F1 se utiliza para analizar el perfil genético de las muestras obtenidas antes y después del tratamiento.

Discusión

En este informe se presenta una revisión sistemática de la literatura científica sobre F1/F1CDx como tecnología NGS para el estudio de cáncer de pulmón, mama, CCR, ovario y melanoma.

Desde noviembre de 2018, F1CDx es la tecnología comercializada y ha sustituido a la anterior F1. En los estudios revisados se ha podido ver la evolución en el tiempo de este test, con un incremento en el número de genes estudiados. Inicialmente analizaba 3.320 exones de 182 genes relacionados con el cáncer y 37 intrones de 14 genes que frecuentemente presentaban reordenamientos. Después se amplió el análisis a 4.557 exones de 287 genes relacionados con el cáncer y 47 intrones de 19 genes frecuentemente ordenados. Con el tiempo, incluyó 315 genes e intrones seleccionados de 28 genes con frecuencia reordenados y la plataforma actual, F1CDx, analiza, hasta el momento, 324 genes. Tan sólo en un artículo⁶⁴ de los incluidos en esta revisión se había utilizado F1CDx.

El objetivo de este informe ha sido estudiar si existe suficiente evidencia sobre la efectividad diagnóstica y clínica de F1/F1CDx. La validez analítica de F1 ya se había demostrado tal como se detalló en el artículo de Frampton y cols¹¹, publicado en 2013. Esta validez analítica se considera un paso previo fundamental antes de que cualquier NGS sea incorporada a la práctica clínica. La revisión de los estudios seleccionados para este informe ha permitido confirmar la validez diagnóstica y utilidad clínica de F1/F1CDx como plataforma genómica en pacientes con alguno de los cinco tumores malignos sólidos seleccionados. F1/F1CDx ha identificado las GAs más frecuentes que caracterizan a cada tumor, siendo concordantes con las GAs esperadas y descritas por TCGA, entre otros.

Para el estudio genómico de cáncer de pulmón, los estudios incluidos^{18,64,114-121} han mostrado la utilidad de F1 para detectar e identificar las principales GAs y para facilitar, en muchos casos, la selección de un tratamiento específico en función de las GAs encontradas. En algunos estudios se destacó el papel de F1 para detectar otras GAs poco comunes¹¹⁹, algunas de las cuales resultaron ser susceptibles de terapia dirigida.

En algunos estudios previos en NSCLC se sugería que la presencia de determinadas GAs excluía otras. Por ejemplo, en los NSCLC con mutaciones *KRAS* se aceptaba que la probabilidad de tener alteraciones en *EGFR* y *ALK* era baja. De hecho, algunos algoritmos proponen comenzar el estudio analizando la presencia de mutaciones *KRAS* y sólo en los casos negativos se indicaría realizar el análisis de las alteraciones en *EGFR* y *ALK*¹⁴⁰. Sin embargo, otros autores¹²⁰ han comprobado que la coexistencia de multitud de GAs en el mismo tumor no es tan baja como se consideraba. También

estos mismos autores recomiendan realizar un estudio de perfil genómico completo y no hacer estudio secuencial en función de los resultados para evitar el retraso en el inicio del tratamiento si finalmente el análisis NGS confirma la presencia de dianas terapéuticas, especialmente teniendo en cuenta que se trata de pacientes con enfermedad avanzada. Por otro lado, un resultado negativo de NGS resulta de interés para derivar a los pacientes a otros tratamientos o incluso a tratamiento paliativo.

Respecto a la validez diagnóstica de F1 en cáncer de mama, los artículos seleccionados^{74,80,82,122-135} confirman su efectividad para identificar las GAs. En el documento de consenso¹⁴¹ surgido de la MAP conference, se decía que el panel de genes óptimo para cáncer de mama debía incluir el estudio de mutaciones *AKT1*, *PIK3CA*, *PTEN* y *ESR1* y amplificaciones *FGFR1*, además de analizar la presencia de los HR, HER2 y *BRCA1/2*. Ya en la guía clínica de ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) del 2018 se aconsejaba estudiar la presencia de GAs en *ERBB2* tanto en el momento del diagnóstico inicial como en las recurrencias¹⁴². En la guía de la ESO-ESMO sobre cáncer de mama avanzado¹⁴³ se reconoce que la presencia de estas cinco GAs somáticas en *PIK3CA*, *AKT1*, *ERBB2*, mutaciones *ESR1* y fusiones *NTRK* se han asociado a respuesta objetiva. Sin embargo, se dice que la utilización de paneles de múltiples genes para análisis mediante NGS no ha demostrado su beneficio clínico y todavía es incierto el impacto en los resultados de salud del paciente, por lo que explícitamente aconsejan que no se deben utilizar de forma rutinaria en la práctica clínica. Por el contrario, sí se recomienda que la paciente participe en ensayos clínicos donde se administren fármacos aún en estudio. Tampoco se recomienda en esta guía el uso de técnicas que estudien el ctDNA.

En el único artículo⁸⁷ incluido sobre F1 en CCR, se observó que F1 fue capaz de detectar las GAs más habituales descritas en este tumor, pero también otras mutaciones poco frecuentes que tuvieron importancia por su influencia en la toma de decisiones terapéuticas. En los dos únicos estudios^{137,138} que utilizaron F1 para realizar el estudio genómico de pacientes con cáncer de ovario se comprobó la utilidad de F1 para identificar mutaciones *BRCA1/2* como predictoras de buena respuesta a inhibidores PARP. La capacidad diagnóstica para detectar las GAs, en concreto para identificar las CRGAs, y facilitar la elección de inmunoterapia fue señalada por los autores^{100,105,139} que evaluaron el papel de esta técnica en el estudio de pacientes con melanoma.

Esta capacidad de F1/F1CDx para identificar genes y/o sus alteraciones tiene implicaciones a nivel pronóstico y terapéutico. La utilidad pronóstica se refiere a que estadios de la misma enfermedad podrían tener pronósticos distintos en base al perfil genómico. La información generada podrá tener gran utilidad clínica al posibilitar un tratamiento personalizado de acuerdo

al perfil genómico de cada tumor¹⁴⁴. En unos casos es posible que se trate de una terapia dirigida aprobada para unas GAs concretas; en otros casos, se podrá dirigir al paciente hacia algún ensayo clínico, incluyendo los nuevos tipos de ensayos clínicos, ensayos en paraguas o en cesta, que potencialmente tienen menos restricciones por tipo de tumor o perfil molecular.

Entre los artículos seleccionados, la utilidad clínica de F1/F1CDx se ha podido estudiar con más detalle en pacientes con cáncer de pulmón porque se aportaban suficientes datos sobre la terapia administrada, sobre la respuesta tumoral y sobre algunos resultados en salud del paciente, como PFS. Por el contrario, para los demás tumores estos datos sólo aparecían recogidos en algún estudio y de forma desigual.

A partir de los datos informados por los autores se ha calculado que en torno al 23% de pacientes con cáncer de pulmón recibió el fármaco recomendado por F1/F1CDx. Los fármacos dirigidos más utilizados fueron TKIs anti-EGFR como erlotinib, o anti-ALK y *MET* como ceritinib, crizotinib o alectinib, o MKIs como cabozantinib. Algunos autores¹⁸ recomendaron que dada la buena respuesta de los pacientes con fusiones *ALK* al crizotinib, se empleara este mismo fármaco también para los casos de translocaciones *ALK* no-*EML4*, como primera línea o tras QT. Varios estudios confirmaron un marcado beneficio clínico en los pacientes pues se llegó a observar una respuesta objetiva (respuesta parcial y completa) en casi el 70% y estabilización de la enfermedad en más del 17%.

En la mayoría de los estudios revisados, se aplicaron los criterios RECIST pero su utilización como método estándar de evaluación de la respuesta a la terapia dirigida e inmunoterapia es un tema en debate, puesto que RECIST puede infraestimar el efecto terapéutico de la inmunoterapia y no permite evaluar la denominada pseudoprogresión. Por este motivo, a la largo del tiempo se han ido desarrollando modificaciones al RECIST (irRECIST, iRECIST, imRECIST) aunque no se ha concretado una definitiva y RECIST todavía estaría en uso en la práctica clínica rutinaria⁴⁴.

También se ha observado que F1/F1CDx influye directamente en el manejo clínico del paciente, modificando la toma de decisiones de los profesionales sanitarios al recomendar o sugerir los fármacos potencialmente más efectivos para cada caso, en función del perfil genómico identificado. Diversos estudios¹⁴⁵ han señalado que los resultados de F1 pueden influir en hasta un 21% de los casos, un porcentaje muy similar al encontrado en esta revisión para los pacientes con NSCLC (19,16%).

Gong y cols⁸⁷ confirmaron que F1 permitió identificar algunas mutaciones en CCR que predicen con gran seguridad la falta de respuesta a los anti-EGFR y además de descartar mutaciones RAS en varios pacientes que tenían amplificaciones *ERBB2*. De estos últimos, algunos pacientes pudieron ser tratados con anti-EGFR y controlar la enfermedad durante más de 4

meses. Estos autores destacaron la importancia de realizar un análisis del CGP con el mayor número posible de genes, como también se recomienda en la guía de la SEOM³¹, de 2019, y en la GPC elaborada por las sociedades científicas *American Society for Clinical Pathology*, *College of American Pathologists*, *Association of Molecular Pathology* y la *American Society of Clinical Oncology*, publicada en 2017¹⁴⁶. Se debe realizar un estudio de perfil genético completo del CCR con el objetivo de descartar la presencia de mutaciones *BRAF* y el “*extended*” o “*expanded*” *RAS* para detectar mutaciones en exones 3 y 4 de *KRAS* y exones 2, 3 y 4 de *NRAS* antes de tomar decisiones terapéuticas. Ese análisis mutacional “*expanded RAS*” tiene un alto valor predictivo negativo (con alta probabilidad el paciente no va a responder al tratamiento anti-EGFR). Por esto, la terapia dirigida anti-EGFR sólo estaría indicada una vez descartada la presencia de dichas mutaciones y esta prueba se ha convertido en un requisito imprescindible antes de utilizar los fármacos cetuximab o panitumumab⁸⁵.

No se han encontrado suficientes datos para establecer la utilidad de F1 para evitar el uso de terapias innecesarias. Tan sólo algunos autores¹¹⁴ aportaron datos referentes a esta posibilidad pero el número de pacientes analizados ha sido muy escaso.

Además de identificar GAs, F1/F1CDx incluye el análisis y cuantificación de los biomarcadores predictivos de respuesta a la inmunoterapia, TMB y MSI. Diversos estudios^{110,147,148} han confirmado la correlación entre niveles altos de TMB y una buena respuesta tumoral a los anti-P1 y anti-PD-L1, en especial en tumores como el NSCLC^{64,118} y melanoma^{100,105,139}, que se caracterizan por su elevada carga mutacional. Tanto la respuesta tumoral como otros resultados de supervivencia global y PFS han resultado significativamente superiores en comparación con los de pacientes con TMB baja/intermedia¹³⁹. Hellman y cols⁶⁴ estudiaron los biomarcadores TMB y la expresión de PD-L1 como predictores de respuesta a la inmunoterapia con nivolumab + ipilimumab, confirmando una buena respuesta al tratamiento (respuesta objetiva en un 45% de los pacientes) y que tanto esta respuesta tumoral como la PFS eran significativamente superiores en los casos en que la TMB era >10 mut/Mb y PD-L1>1%. También la supervivencia fue mayor en los tratados con inmunoterapia frente al grupo de QT (24% frente al 3%). En cambio, Rozemberg y cols¹¹⁸ no encontraron relación entre la TMB y la respuesta a la inmunoterapia con nivolumab o pembrolizumab.

Existe acuerdo entre los artículos revisados sobre la utilidad de realizar F1 a los pacientes con tumores recidivantes o recurrentes por su utilidad para diagnosticar si existen nuevas GAs que justifiquen la recurrencia tumoral o la resistencia a ciertos fármacos, pues se ha demostrado que el tumor evoluciona con el tiempo y las GAs potencialmente intervenibles pueden ser diferentes del tumor primario, lo que llevaría a cambiar la medica-

ción^{82,149,150}. Por ejemplo, las amplificaciones *ERBB2* parece que serían más frecuentes en los tumores de mama recidivantes¹²⁵. No obstante, otros autores¹²⁹ constataron una alta concordancia en las GAs en el tumor primario de mama y en las recurrencias o metástasis, por lo que sólo recomendaban repetir el estudio de F1 en nuevas biopsias de recurrencias/metástasis cuando la sospecha de cambio molecular en el tumor secundario era evidente. Sin embargo, la opinión más extendida es que los resultados del CGP de una muestra pueden no ser representativos del tumor meses o años después^{151,152} y se cuestiona la utilidad de los resultados de un test NGS realizado sobre muestra del tumor primario cuando el objetivo es aconsejar el tratamiento de futuras recurrencias¹⁵³. Por tanto, sería recomendable realizar una nueva biopsia antes de iniciar un nuevo tratamiento, aunque esto no siempre es posible, bien por inaccesibilidad de las recurrencias o por insuficiente cantidad de tejido, además del inconveniente de tener que someter al paciente, de nuevo, a un intervención invasiva y el retraso potencial en el inicio del tratamiento, además del incremento de los costes económicos. Además, es posible que el perfil genómico sufra cambios relacionados con el tratamiento administrado¹²³. Por eso, cuando el tumor progresa y se sospecha que ha desarrollado resistencias al tratamiento, también se recomendaría realizar un nuevo estudio de muestras de biopsias recientes siempre que sea factible.

No está claro si debe realizarse el estudio de CGP en los tumores iniciales aunque algunos autores sí lo recomiendan. Se cree que posiblemente se obtendrían mejores resultados si se iniciara antes el tratamiento personalizado, cuando todavía los tumores se han sometidos a pocas líneas de tratamiento y no se han hecho resistentes. De hecho, muchos fármacos dirigidos están ya indicados como primera línea terapéutica. Además, en los artículos revisados uno de los motivos mencionados con más frecuencia por el que los pacientes no han llegado a recibir el tratamiento recomendado o sugerido por F1 es el marcado deterioro clínico que muchos presentan cuando se realiza el test o cuando llegan sus resultados^{123,145,150,154}. Según algunos estudios, hasta un 25% de los pacientes no lograría un beneficio terapéutico, bien por estar ya muy avanzada la enfermedad o bien por el deterioro del paciente que lleve a desaconsejar el tratamiento sistémico^{155,156}. Por esto, diversos autores^{150,154,157} cuestionan el momento de realizar los tests genómicos y proponen que se debería realizar de manera precoz en el curso de la enfermedad con el fin de facilitar la identificación y uso de terapias dirigidas, dando oportunidad a los pacientes a recibir un tratamiento dirigido que pudiera ser efectivo pero antes de que la enfermedad progrese y el deterioro clínico del paciente desaconseje su utilización.

Por otro lado, en los pacientes en los que la enfermedad ha progresado y se ha decidido realizar un estudio del perfil genómico para buscar un tratamiento dirigido a las CA intervenibles, resulta importante disponer lo an-

tes posible de esta información. Por eso, un elemento importante a considerar en las plataformas de NGS para su aplicación clínica es el tiempo que tarda cada test en generar el informe, el denominado *turnaround time*, puesto que generalmente durante este tiempo el paciente no está recibiendo ningún tratamiento a la espera del que sugiera la NGS. Se puede disponer del informe de F1/F1CDx en unos 14 días y otras plataformas de NGS pueden generarlo incluso antes. En el estudio comparativo entre F1 y PCDx realizado por Weiss y cols¹⁵⁸, PCDx fue significativamente mejor que F1 en este aspecto, con una diferencia mediana de 9 días. Con la evolución tecnológica en el ámbito del análisis bioinformático, se espera acortar el tiempo de obtención de resultados con las NGS. Especialmente aquellas plataformas NGS con paneles de más de 100 genes, requieren al menos 7 días hasta obtener resultados, a diferencia de las técnicas de secuenciación tradicionales de estudio de hotspot de un solo gen⁸³. Cuanto más corto sea este tiempo, mayor influencia clínica podría tener.

La realización de F1CDx en un paciente tendría sentido cuando existe un tratamiento dirigido aprobado para su uso en la patología concreta de ese paciente. En estos casos, es importante confirmar que el paciente tiene la diana molecular sobre la que actuará el fármaco. Otra situación en la que se podría indicar el análisis con F1CDx es si el tratamiento estándar del tumor ha fracasado y es necesario buscar otros fármacos, incluyendo la terapia dirigida. También en pacientes con alto riesgo de progresión de la enfermedad, la información genómica nos ayudaría a plantear tratamientos incluso en situaciones en las que el tratamiento convencional estaría descartado. En opinión de Johnson y cols¹⁵⁹ el paciente candidato a F1 sería aquel con cáncer metastásico o irreseccable candidato a tratamiento sistémico con al menos una de las siguientes condiciones: no hay disponible otros tests genéticos para el tumor en estudio en concreto; al paciente ya se le han realizado otros tests genéticos pero no se han detectado alteraciones intervenibles; no existe tratamiento estándar o las opciones son mínimas o se quiere testar con el fin de decidir su inclusión en ensayos clínicos.

Por otro lado, no todos los pacientes candidatos a un fármaco recibieron finalmente dicha medicación y esto fue debido a diferentes motivos: en algunos casos fue por la falta de disponibilidad o de acceso al fármaco^{128,138,160} o por la imposibilidad de participar en algún ensayo clínico donde se utilizara dicho fármaco; otras veces, como ya se ha mencionado, fue por el estado de salud del paciente, pues a veces el proceso tumoral está en un estadio ya muy avanzado y el paciente tiene un deterioro significativo que desaconseja su uso¹²³; en otros casos es el propio paciente quien rechazó el tratamiento o incluso es posible que hubiera fallecido antes de disponer de los resultados de F1. También los problemas relacionados con la financiación o reembolso de esta técnica se mencionan como impedimento para someterse al trata-

miento porque pueden no estar incluidos en las coberturas sanitarias públicas o privadas, siendo el coste una de las barreras principales para su uso clínico.

En muchos de los artículos revisados se hace mención a que la elección del tratamiento es decisión del clínico encargado del paciente. Algunos autores proponen que para este tipo de decisiones, sería conveniente la creación de un comité de expertos, que a la vista de la información genética y de las opciones terapéuticas disponibles, tomara, por consenso, esa decisión. En algunos centros hospitalarios de reconocido prestigio se han puesto en marcha comités de tumores, con profesionales multidisciplinares, para estudiar e interpretar las GAs encontradas en cada tumor y cada paciente, para revisar las GAs intervenibles y para revisar la evidencia científica publicada sobre las GAs identificadas y los posibles fármacos recomendados en función de las mismas. Entre estos Comités puede mencionarse a GAITWAY (*Genetic Alterations in Tumors With Actionable Yields*), de *John Hopkins Kimmel Cancer Center*¹³⁰. También en *San Diego Moores Cancer Center* se constituyó el *Molecular Tumor Board* en la Universidad de California, con el fin de optimizar el manejo terapéutico de pacientes con cáncer de mama avanzado hipertratado¹³².

Las terapias dirigidas tienen como diana aquellas GAs específicas del tumor, y es esta especificidad la que permite actuar sobre las células tumorales sin dañar a las células sanas no tumorales, generando menos EAs que la QT convencional. No obstante, tanto la terapia dirigida como la inmunoterapia no están exentas de EAs, por lo que la decisión de utilizarlas deberá estar sólidamente respaldada para evitar que se utilicen en pacientes que no vayan a responder, exponiéndoles a un riesgo innecesario a los EA secundarios. De hecho, para iniciar el tratamiento con cualquier fármaco dirigido es necesario que se haya confirmado la presencia de la GA diana para dicho fármaco. Entre los EAs relacionados con el uso de terapia dirigida, los más frecuentes son diarreas y problemas hepáticos, como hepatitis o incremento de las enzimas hepáticas. Otros son problemas cutáneos (rash, sequedad de piel, despigmentación del pelo); incrementos en la tensión arterial; trastornos de coagulación y de forma muy excepcional, perforación gastrointestinal. Algunos de estos EAs se dan en los pacientes que mejor están respondiendo al tratamiento^{161,162}. En general, se acepta que la inmunoterapia se tolera mejor que la QT pero también se han descrito algunos irEAs asociados que si no son reconocidos y diagnosticados a tiempo, pueden ocasionar un incremento en la morbilidad y, con menos frecuencia, el fallecimiento del paciente. El irEA más frecuente suele ser la fatiga. Otros irAE descritos son neumonitis, hipotiroidismo, nefritis, rash cutáneo, colitis, pero son relativamente poco frecuentes (en un 4-8%, de todos los grados de severidad)¹⁶³.

Sólo en dos artículos seleccionados para esta revisión se han aportado datos sobre la seguridad de F1/F1CDx. En el artículo de Hellman y cols⁶⁴ se comprobó que la frecuencia de EAs había sido superior en los pacientes con NSCLC tratados con inmunoterapia, en comparación a los que recibieron QT. La complicación más habitual fue la toxicidad a nivel cutáneo, y entre los EAs de grados 3 y 4, el incremento de enzimas hepáticas. Además, estos autores informaron sobre varios fallecimientos en los tres grupos de tratamiento estudiados. Yuan y cols¹²³ mencionaron la aparición de toxicidad (incremento de enzimas hepáticas) asociada al pazopanib con una paciente con cáncer de mama, que la obligó a suspender el tratamiento.

En algunos estudios incluidos en esta revisión se ha analizado la concordancia entre F1 y otras técnicas convencionales como FISH o el análisis IHC pero, en general, se limitaba a pocos pacientes y en los casos discrepantes, resultaba difícil precisar si se trataba de falsos positivos de una prueba o falsos negativos de la otra, tal como reconocieron algunos autores¹¹⁴. Esta ausencia de patrón de referencia ya había sido mencionada en un estudio comparativo entre varias plataformas genómicas en cáncer de mama¹⁶⁴. Varios estudios^{18,117,137} confirmaron que la efectividad diagnóstica de F1 era superior, detectando algunas GAs en pacientes con resultados falsos negativos con FISH o IHC, lo que podía suponer una clara influencia en el tratamiento. En la práctica clínica, muchos centros utilizan IHC como test de screening por ser rápido y de bajo coste, en comparación a FISH que implica un mayor consumo de tiempo y de costes. A la vista de los resultados de esta revisión, en aquellos casos negativos, estaría indicado realizar NGS para confirmar o no el diagnóstico y poder tratar a los pacientes que potencialmente se beneficiarían de la terapia dirigida, especialmente cuando la probabilidad de identificar GAs intervenibles es alta, por ejemplo, en pacientes jóvenes no fumadores con adeconcarinoma de pulmón^{118,165}.

Desde diferentes sociedades y entidades científicas se reconoce que el avance en el conocimiento de las GAs ha facilitado el desarrollo y uso de terapias dirigidas e inmunoterapia y contribuido a un mejor pronóstico de vida de estos pacientes con NSCLC^{33,47}. También se reconoce en la guía de la SEOM sobre el tratamiento del NSCLC⁶⁶ publicada recientemente. Existe un acuerdo bastante generalizado sobre la importancia de realizar estudio del perfil genómico a todos los pacientes con NSCLC independientemente del tipo histológico¹²⁰. El análisis debe incluir la detección de las GAs y la determinación de los biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia. La guía elaborada en 2018 por el *College of American Pathologists*, la *International Association for the Study of Lung Cancer* y la *Association for Molecular Pathology*⁴⁷ establece las recomendaciones de análisis molecular en cáncer de pulmón avanzado para facilitar la toma de decisiones terapéuticas. Se definen 3 categorías de genes: una formada por *EGFR*, *ALK* y *ROSI*, que

debían estudiarse en todos los pacientes con adenocarcinoma de pulmón; un segundo nivel de genes que incluye *BRAF*, *MET*, *RET*, *ERBB2* y *KRAS*, que se analizarían si se dispone de suficiente material; y el resto de genes, que se consideran todavía en investigación. También en esta guía se recomienda estudiar a los pacientes con mutaciones *EGFR* sensibles a TKIs anti-*EGFR* que progresen tras dicho tratamiento por la posibilidad de que hayan desarrollado la mutación *EGFR* T790M y se aconseja emplear tests que hayan demostrado su capacidad diagnóstica con tan sólo un 5% de células viables. Si se presenta esta mutación T790M, el tratamiento recomendado es osimertinib; y si las GAs identificadas son la sustitución L858R en el exón 21 o deleciones en el exón 19, los tratamientos aprobados que se indicarían son erlotinib, afatinib y gefitinib. También en esta guía se recomienda el estudio de los genes *ROS1* y *ALK* en todos los pacientes con adenocarcinomas, independientemente de las características clínicas. La IHC se acepta como test de screening para estudiar las GAs en *ROS1*, aunque todo resultado positivo debe confirmarse con pruebas moleculares. Además, se reconoce que GAs en genes como *BRAF*, *MET*, *KRAS*, *ERBB2* y *RET* verán incrementada su importancia clínica a medida que las tecnologías NGS avancen. No se recomienda realizar el análisis molecular de forma individual de estos genes de manera rutinaria en todos los pacientes, pero sí incluirlos como parte de paneles mayores de genes cuando el análisis de *EGFR*, *ALK* y *ROS1* haya sido negativo. Los autores consideran que los paneles de múltiples genes son preferibles frente a múltiples tests de un único gen para poder identificar otras opciones terapéuticas más allá de *EGFR*, *ALK* y *ROS1*. Respecto a los tumores que no fueran adenocarcinomas, esta guía recomienda que el estudio molecular sólo se debe realizar si existen características clínicas que hagan sospechar con una alta probabilidad la presencia de *drivers* oncogénicos. Además, en esta guía se incluyen recomendaciones sobre el estudio del ctDNA para pacientes con adenocarcinoma de pulmón, que no estaría indicado para el tumor primario sino sólo para las recurrencias o cuando del tumor progresa o se desarrollan resistencias a los TKIs *EGFR*. En aquellos casos en los que el test de ctDNA presente un resultado negativo, se recomienda realizar el análisis molecular sobre muestras tisulares para confirmar el resultado.

También desde 2014, la NCCN recomienda que en los pacientes con cáncer de pulmón metastásico se debe realizar un estudio de “perfil molecular amplio” que incluya las siguientes GAs: mutaciones *EGFR*, fusiones *ALK*, mutaciones *BRAF*, mutaciones *ERBB2*, amplificaciones *MET*, reordenamientos *RET* y reordenamientos *ROS1*⁶¹. Igualmente, en la MAP (*Molecular Analyses for Personalized Medicine*) conference¹⁴¹ se recomendó estudiar de forma rutinaria en la práctica clínica mutaciones *EGFR* y reordenamientos *ALK* y *ROS1* en todos los pacientes con NSCLC, y para

valorar si incluir a los pacientes en ensayos clínicos debían analizarse las siguientes GAs: mutaciones en *EGFR*, *BRAF*, *HER2*, *KRAS*, *PIK3CA*, *NTKR*, *ALK*, *MET*, *AKY1*, *BRCA1/2*, *HRAS* y *NRAS*; reordenamientos de *ALK*, *ROS1* y *NTRK*; amplificaciones en *RET*, *MET* y *EGFR*; y mutaciones o amplificaciones en *FGFR1/2/3* y *NOTCH1/2*.

Sin embargo, a pesar de que existe cierto consenso entre las sociedades científicas europeas y americanas en cuanto a las recomendaciones de estudio molecular de los tumores de pulmón, su seguimiento es muy desigual entre los diferentes países y centros hospitalarios^{45,118}. Entre los motivos de esta falta de adherencia a las recomendaciones de estudio genómico están algunas de índole financiera (reembolso por los sistemas de salud), la insuficiente cantidad de tejido para el análisis o problemas en la obtención de las muestras biológicas, las limitaciones en la coordinación de los distintos profesionales sanitarios o la dificultad en la interpretación de resultados¹⁶⁶.

La revisión de la literatura ha puesto de manifiesto que existen muy pocos estudios comparativos entre F1 y otras plataformas genómicas, y ninguno que compare F1CDx con otras. Capdevilla y cols¹¹² compararon CMI, F1 y OncoDEEP®, analizando diferentes aspectos como las tecnologías empleadas, la validez analítica y el impacto clínico, y concluyeron que CMI era la plataforma más completa porque estudiaba un mayor número de genes, tenía una mayor capacidad predictiva de respuesta a numerosos fármacos y mayor impacto clínico que F1 (de OncoDEEP® no localizaron datos sobre utilidad ni beneficio clínico). No obstante, la revisión no fue sistemática tal como reconocieron los autores. Weiss y cols³⁰ realizaron una evaluación comparativa entre F1 y PCDx a partir de muestras de 21 tumores sólidos y comprobaron la existencia de discrepancias significativas en la detección de las alteraciones intervenibles entre las dos plataformas y de un TAT más rápido para PCDx.

Se han empleado otras plataformas de NGS pero sólo para complementar el diagnóstico de las GAs, no se trataba de estudios comparativos entre dichas GAs. Así, en dos de los estudios revisados^{118,124} utilizaron G360 para analizar el ctDNA cuando no se disponía de suficiente tejido muestral, en uno¹²⁶ utilizaron también F1 Heme y en otro artículo¹²⁰ se utilizaron CMI y Response Genetics Inc, además de F1.

Existen algunas alternativas a F1CDx aprobadas por la FDA como CDx para la detección de algunas GAs sobre muestras tumorales FFPE de los cinco tumores para los que está aprobado F1CDx¹⁹. Ver listado en el anexo II. Para NSCLC sólo una de las técnicas aprobadas es una NGS, OncoMine CDx Target Test, que se utilizaría para identificar la delección en el exón 19 y la mutación L585R del gen *EGFR*. El resto de tests para NSCLC están basados en PCR. Para pacientes con cáncer de ovario, el estudio de *BRCA1/2* se puede hacer con la NGS Foundation Focus CDx_{BRCA}. En pacientes con

CCR, las mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* se pueden estudiar con la NGS Praxis Extended Ras Panel. Los otros dos tests aprobados como CDx se basan en PCR y sólo estudian el gen *KRAS*. Para melanoma y mama, la FDA no ha aprobado ninguna técnica NGS como CDx. Por tanto, quedaría un número importante de GAs en estos tumores para los que no existe una alternativa diagnóstica CDx aprobada por la FDA. La gran ventaja de F1CDx es la posibilidad de estudiar otros muchos genes de forma simultánea en el mismo test, mientras que las demás pruebas sólo permitirían identificar GAs en uno o un número muy escaso de genes.

En el momento actual, existen diversos tests moleculares comercializados, con diferentes niveles de evidencia, cuya elección supone un reto para los oncólogos¹⁵⁸. En la práctica clínica oncológica resulta fundamental la capacidad del test para informar de la manera más exacta posible sobre aquellas alteraciones moleculares que sean intervenibles y clínicamente significativas, y que el informe aportado indique de la manera más clara y concisa posible los fármacos disponibles para las GAs detectadas. Oncólogos del *National Cancer Institute* reconocieron tener un escaso conocimiento en el ámbito genético además de falta de tiempo durante la asistencia a los pacientes, y consideraron fundamental que los informes de las diferentes plataformas de NGS fueran concisos y claros para ayudar en la elección de los fármacos dirigidos más adecuados en cada caso¹⁶⁷.

F1CDx, igual que otras plataformas NGS, presenta ciertas limitaciones técnicas. Por un lado, unas limitaciones relacionadas con la muestra tumoral. Es necesario disponer de una cantidad suficiente de DNA para poder realizar el test. Algunas muestras proceden de biopsias core de pequeño tamaño, de aspiraciones con aguja fina o de bloques celulares de tejido maligno pleural, pericárdico o peritoneal, que suelen contener una proporción relativamente baja de células tumorales (alta contaminación por células no tumorales y de contenido necrótico) que afectarían a la sensibilidad de la prueba¹⁵³, a diferencia de las muestras tomadas en el ámbito de la investigación donde es más frecuente disponer de un alto contenido tumoral. Por eso se requieren protocolos en los que sea posible el manejo de pequeñas cantidades de tejido. Se estima que los paneles de 400 genes requieren unos 60 ng de DNA y los paneles de 50 genes, unos 10 ng de DNA. Dado que en una célula hay aproximadamente 1 pg de DNA, el total de células necesario para realizar un estudio NGS de calidad oscilará entre 10 y 60.000 células¹²⁰.

La proporción de células tumorales en un cáncer es una característica propia del tumor mientras que las diferencias de pureza en la muestra no lo son, sino que se deben a otras cuestiones metodológicas, como la destreza del cirujano al tomar la muestra, y pueden afectar a los resultados de los análisis genéticos, interfiriendo con las terapias diseñadas basados en ellos¹⁶⁸. Se acepta que una pureza tumoral del 60% sería suficiente para detectar el

perfil genómico de un tumor respecto a las células normales de la muestra. Para estudiar CNAs es necesario que la muestra contenga al menos un 20% de núcleos tumorales. Si no se alcanza este porcentaje, el riesgo de no detectar amplificaciones en el número de copias o pérdidas homocigóticas se incrementa considerablemente⁸³.

Por otro lado, se manejan muestras de tejido FFPE y, además, en el proceso de secuenciación el DNA puede sufrir daños, que podrán evitarse o limitarse aplicando protocolos rigurosos de extracción del DNA y la construcción de librerías de secuenciación. También la heterogeneidad intratumoral¹⁵³, que se mide por la presencia de multitud de GAs subclonales, puede repercutir en la calidad de la biopsia y en la exactitud diagnóstica del posterior análisis genético, lo que representa un reto para establecer un tratamiento personalizado adecuado.

Tampoco está claro que el análisis de una sola muestra de biopsia sea siempre representativo de lo que ocurre a nivel global en el tumor¹⁵³, y especialmente si la enfermedad tumoral está diseminada. De modo que aún falta por resolver cuál es el origen (tumor primario, de las recurrencias, de las metástasis o si utilizar el DNA circulante) más adecuado de donde tomar las muestras. Mientras que la biopsia tisular presenta las limitaciones por toma de muestra en una única localización, el análisis del ctDNA de sangre periférica permitiría valorar la heterogeneidad tumoral al incluir DNA de células metastásicas de diferentes lugares. La desventaja de este test en ctDNA es que este DNA sólo aparece en sangre una vez que las células tumorales han sufrido hipoxia y necrosis y han liberado el DNA al torrente sanguíneo.

Algunos autores como Jones y cols¹⁶⁹ consideran que es necesario realizar la secuenciación de tejido sano además de analizar el tejido tumoral porque se cree que hasta un 15-20% de las GAs detectadas en un tumor puedan ser, realmente, alteraciones en la línea germinal. De esta manera se podrá discriminar entre alteraciones somáticas y de la línea germinal, e identificar las GAs dianas frente a las que tomar las oportunas decisiones terapéuticas¹³³.

En el mismo tumor se pueden dar varias GAs que sean dianas terapéuticas por lo que surge la necesidad de priorizar aquellas frente a las que se establecerá el tratamiento. Todavía faltan por establecer algoritmos que estratifiquen o representen la mejor secuencia terapéutica a seguir. Es posible que para el mismo tumor se den varias recomendaciones de distintos fármacos y que la opción de combinar varios fármacos sea la más adecuada, aunque para pocas combinaciones de fármacos se dispone de resultados de seguridad procedentes de ensayos clínicos. En otros casos, aunque se den varias GAs en el mismo tumor, administrar una sola terapia dirigida para una sola GA podría resultar efectivo¹³¹. Además, el impacto de una GA y su respuesta al tratamiento puede ser diferente según el tipo de tumor. Por

ejemplo, la mutación *BRAF*V600E predice buena respuesta al vemurafenib en melanomas pero no en CCR.

A pesar de estos riesgos relativos a la muestra y a los procesos técnicos, varios estudios^{114,170} han comprobado que F1CDx, como otras NGS, se puede aplicar de forma satisfactoria en la mayoría de las muestras tumorales, independientemente del método empleado para la obtención de las mismas (excisión quirúrgica, biopsia con aguja gruesa, PAAF, etc) y del tiempo transcurrido desde la obtención de las muestras.

Algunas de las limitaciones se podrían resolver con las técnicas de biopsia líquida que permiten estudiar las células tumorales circulantes y el ctDNA. Se espera que en un futuro próximo, el análisis del ctDNA se pueda utilizar como biomarcador no invasivo para detectar en tiempo real la presencia de tumores residuales, monitorizar la respuesta tumoral al tratamiento¹⁷¹, con la ventaja de no ser invasiva y permitir la repetición del análisis a lo largo del tiempo, si fuera necesario^{44,172}. La evolución en esta tecnología está permitiendo niveles de sensibilidad y especificidad elevados, incluso con cantidades muy bajas de ctDNA en las muestras sanguíneas lo que contribuirá a detectar y tratar de forma precoz a los pacientes con cáncer. Algunos autores¹³⁰ han confirmado, que la biopsia líquida permite detectar más mutaciones en cáncer de mama que el análisis NGS tisular, y para otros^{171,173} permitiría diferenciar si persiste enfermedad residual microscópica, que requeriría un tratamiento añadido sistémico, de aquellos otros casos sin enfermedad diseminada que podrían tratarse sólo con terapia local. Sin embargo, en los estudios de Chae y cols^{124,174} se encontró una baja concordancia entre ambas pruebas, siendo F1 la técnica que permitía detectar un número de GAs significativamente superior. Los autores consideraron que el análisis de ctDNA resultaba más útil para confirmar la presencia de alteraciones genéticas que para descartarlas, dada su alta especificidad. Chae y cols^{124,174} estudiaron subclones y VUS con el fin de realizar un estudio comparativo lo más completo posible de la concordancia de la NGS en tejido tumoral y en ctDNA, con el objetivo de estudiar si ambas técnicas coincidían no sólo en los genes afectados sino también si eran capaces de identificar las mismas secuencias. Estos autores concluyeron que había una alta concordancia entre los dos tests cuando se estudiaba si las GAs estaban presentes o ausentes, pero si el objetivo era analizar un subgrupo concreto de genes con alteraciones en el DNA, la concordancia entre los tests era relativamente baja. Se detectaron más mutaciones en el tejido tumoral obtenido de biopsia que en el análisis del ctDNA, aunque se reconoció que existía una cantidad considerable de mutaciones que se sólo podían detectar mediante una de las plataformas y que una gran proporción de GAs no eran detectadas por ambas NGS. Así, en el estudio referente a pacientes con cáncer de mama¹²⁴, un 25,6% de las alteraciones tisulares se encontraron también en el ctDNA y un 30,3% de las alteraciones

detectadas en ctDNA se encontraron en las muestras tisulares. En torno al 50% de las mutaciones detectadas por una técnica no eran detectadas por la otra, lo que se explicaría por la heterogeneidad tumoral y ante este hecho los autores consideraron la posibilidad de que ambas tecnologías tuvieran un papel complementario. Es posible que la concordancia de resultados entre los tests genómicos NGS realizados en tejido tomado de biopsia y sobre el ctDNA dependa de algunos factores como el tiempo transcurrido entre la toma de ambas muestras, el tipo de cáncer y el sitio donde se realizó la biopsia. Parece que en los tumores de páncreas, ovario, CRC, mama, vejiga, gastroesofágicos, melanoma y CHC, la probabilidad de detectar ctDNA es mayor que en los tumores cerebrales, renales, de próstata y tiroides.

El único IETS sobre las tecnologías NGS fue realizado por NICE para estudiar la efectividad clínica de CMI como guía para el tratamiento del cáncer¹⁷⁵ y se confirmó que CMI influía en la toma de decisiones terapéuticas en varios tumores sólidos y que los tratamientos indicados suponían un incremento en la PFS, superior a la de aquellos pacientes en los que la decisión terapéutica la habían tomado sólo los clínicos sin información de CMI. La opinión de cuatro especialistas recogida en este informe en relación a aspectos como la población en la que estaría indicado el uso de CMI, su impacto clínico y el impacto sobre el sistema sanitario en términos de costes, puso de manifiesto opiniones diversas, incluso contrarias en algunos aspectos. Sí hubo acuerdo entre los expertos en la necesidad de realizar más estudios en centros de Reino Unido pues todos de los revisados se habían realizado fuera, en que se hicieran estudios comparativos entre CMI y otras alternativas y estudios de análisis coste-efectividad.

Tal como manifiestan Joosten y cols⁶, la implantación de las diferentes plataformas basadas en NGS dependerá de factores, económicos, organizativos, éticos y sociales. Ante este tipo de pruebas diagnósticas será necesario preguntarse si los hospitales disponen de los medios técnicos y humanos requeridos para su implantación, si existe el conocimiento suficiente para utilizar la información aportada por estos paneles en la práctica clínica y si es posible administrar el tratamiento dirigido que estos tests recomiendan.

Aunque el coste de F1 no era objeto de estudio de esta revisión, en algunas publicaciones se hace referencia a ellos. Así, en el estudio comparativo de Weiss y cols¹⁵⁸ se recoge que el coste de un test con PCDx es de USD \$4.880 por muestra y con F1, USD \$5.800. Rozenblum y cols¹¹⁸ mencionaron que, en su entorno y a fecha de 2015, el coste de un test NGS sobre tejido tumoral era de USD \$5.274 y el de NGS sobre biopsia líquida de USD \$4.838. El elevado coste de la mayoría de las terapias dirigidas podría ser una limitación para su uso, pero algunos estudios han constatado que la identificación de determinadas dianas terapéuticas y la administración de una terapia dirigida suponen una potencial reducción en los costes totales.

Por ejemplo, Henk y cols¹⁷⁶ observaron que en pacientes con NSCLC avanzado, el tratamiento con erlotinib dirigido a mutaciones *EGFR* se asociaba a unos costes inferiores que el tratamiento con QT y agentes biológicos, tanto como primera y segunda línea terapéuticas, por resultar más efectivo y por ocasionar una menor tasa de EA.

Uno de los problemas asociados al estudio genético con F1CDx son los relacionados con aspectos éticos. Por un lado, no existe acuerdo respecto a la información que debe recogerse y ofrecerse al paciente en cada informe generado. Tampoco está claro cómo manejar ni interpretar hallazgos inesperados: si informar o no sobre ellos al paciente, porque algunas alteraciones patogénicas en individuos concretos pueden llegar a no desarrollar la enfermedad, por esto las mutaciones patógenas inesperadas no se debe interpretar de manera aislada, pero también porque algunas GA son sólo VUS por el momento pero en un futuro podrían tener una significación patológica. Por otro lado, no todas las variantes encontradas suponen las mismas consecuencias clínicas ni de la misma relevancia, unas veces en el individuo, otras en su descendencia pero no en el propio individuo y otras sólo suponen mayor riesgo, pero no implican que la enfermedad se desarrolle con total seguridad. También se asocian problemas relacionados con la confidencialidad de la información, el almacenamiento de los datos, posible acceso a los mismos para investigación, etc.

El progreso en las plataformas NGS, integrando otros niveles de información como la proteómica o la epigenética, supondrá un mayor conocimiento molecular de la enfermedad tumoral y permitirá el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos, que se espera conduzcan a unos mejores resultados en salud para los pacientes. Pero, además, permitirá que GAs que hoy no son intervenibles lo sean en un futuro, haciendo que la terapia dirigida sea más efectiva y se consigan alcanzar mejores resultados en salud para el paciente, en especial, la supervivencia y calidad de vida. Por esto, algunos autores¹⁵⁹ proponen que aquellos pacientes con VUS sean tratados en el contexto de ensayos clínicos, porque probablemente en el futuro sean identificadas como marcadores pronósticos o predictivos de respuesta tumoral aunque en el momento del diagnóstico no se disponga de suficiente evidencia. Otros autores⁹, por el contrario, consideran que tanto las VUS como las alteraciones genómicas de baja frecuencia, de las que sólo se dispone de información procedente de estudios de un único caso o presentaciones en *abstracts* de congresos o de datos experimentales, no deberían utilizarse para la toma de decisiones terapéuticas pues se espera que la mayoría no sean patogénicas y si se consideran podrían exponer al paciente a terapias no efectivas, costosas e incluso que provoquen eventos adversos. Esto fue una de las críticas realizadas al estudio de validación del F1 de Frampton y cols¹¹, donde se propusieron ciertas terapias dirigidas para algunas VUS identificadas.

El avance tecnológico permitirá mejoras en el sentido de realizar secuenciaciones a mayor profundidad, o poder medir la expresión de ciertas proteínas y no sólo las alteraciones genómicas (como ya ocurre con PCDx porque incluye el análisis IHC además del test NGS). La investigación avanza hacia otras formas alternativas más rápidas, sencillas y de menor coste, como es la secuenciación de tercera generación, con la que se elimina la etapa de amplificación del DNA y se realiza la secuenciación a partir de una única molécula de DNA con la tecnología SMRT (*single molecule real time sequencing*), basada en la lectura de la hebra molde de DNA (hebras de mayor longitud).

Calidad de la evidencia

El diseño de los estudios incluidos, que en su mayoría eran series de casos retrospectivas, el número pequeño de pacientes incluidos, la heterogeneidad de los datos recogidos y los analizados, además de una infranotificación marcada de resultados lleva a dar una valoración global de baja calidad a los artículos incluidos en esta revisión.

Limitaciones de esta revisión

Se debe señalar, en primer lugar, la dificultad encontrada en el proceso de búsqueda bibliográfica para la localizar literatura publicada en relación a F1/F1CDx, dificultad posiblemente relacionada con la indexación de los artículos, incluso en varios artículos no se refieren a esta plataforma genómica por su nombre. Esta misma limitación había sido señalada también por Capdevilla y cols¹¹², que reconocieron que las plataformas genómicas estaban en continua evolución pero sus resultados no se solían publicar ni indexar de manera formal.

Las características mencionadas anteriormente de los artículos, que han llevado a valorar como baja la calidad de la evidencia, suponen una limitación para la generalización de los resultados y para establecer conclusiones sólidas. El hecho de que la casi totalidad de estudios sean series de casos retrospectivas, generalmente de pocos pacientes y con una gran heterogeneidad entre estudios, tanto en lo que respecta a los pacientes como al tumor, hace que, a pesar de encontrar que F1/F1CDx es una prueba con efectividad diagnóstica y de utilidad clínica, sean necesarios más estudios para confirmar estos resultados. Los pacientes estudiados tenían distintos niveles de afectación clínica consecuencia de su proceso tumoral, habían recibidos distintos tratamientos y un número diferente de líneas terapéuticas. En cuanto al tumor, también se ha detectado una gran heterogeneidad, tanto en el tipo histológico como en el estadio tumoral, además de encontrar muy diferentes

GAs y genes afectados. Las terapias propuestas fueron también diferentes y tampoco ha sido comparable el seguimiento entre estudios. Además, los estudios incluidos tenían diferentes objetivos: algunos estudios se centraban únicamente en la descripción de las GAs encontradas y los genes afectados en los tumores, analizando características como el tipo de alteración, la frecuencia o el porcentaje de alteraciones intervenibles. Otros artículos se realizaban en pacientes con alguna GA concreta y analizaban la concordancia de resultados entre F1 y otras pruebas convencionales como PCR, IHC o FISH. Algunos estudiaban la respuesta tumoral a determinados tratamientos dirigidos o a inmunoterapia y resultados como supervivencia o PFS, con variables de resultado de efectividad y seguridad que no han sido comunes a todos los artículos. Esta heterogeneidad entre estudios y especialmente la infranotificación de datos y resultados relativos a las principales variables relevantes de efectividad clínica, como la PFS, la supervivencia global, la respuesta tumoral, llevaron a descartar la posibilidad de realizar un análisis cuantitativo (meta-análisis) de los resultados. Otras variables escasamente informadas han sido el tiempo transcurrido desde la realización del estudio de perfil genómico hasta el inicio del tratamiento o las pruebas de imagen u otras utilizadas para valorar la respuesta tumoral.

Por otro lado, se esperaba poder recoger datos sobre la seguridad de F1/F1CDx en el sentido de estudiar si el uso clínico de esta plataforma y la administración de los tratamientos recomendados a partir de sus resultados suponía algún riesgo para los pacientes. Sin embargo, muy pocos estudios^{64,123} han mostrado información relativa a los EAs, ni sobre el tipo de EA, ni el número de pacientes afectados ni el grado de severidad de los mismos.

Conclusiones

Conclusiones de la revisión de la literatura

- El análisis de las GAs tumorales es una herramienta diagnóstica fundamental en la práctica clínica, con implicaciones pronósticas y predictivas de la respuesta al tratamiento oncológico.
- F1CDx ha sustituido a F1 como tecnología de NGS que permite identificar las GAs en muestras tisulares.
- Se ha demostrado la validez analítica de F1/F1CDx.
- En la literatura revisada se reconoce la efectividad diagnóstica y utilidad clínica de F1/F1CDx aunque la calidad de la evidencia encontrada es limitada.
- Se reconocen las ventajas que presenta F1CDx como plataforma de análisis NGS. Especialmente cabe señalar su capacidad para identificar con gran exactitud las GAs más relevantes en un elevado número de genes sobre muestras tisulares de tumores sólidos, en un único test y de forma rápida. Su utilización permite evitar la realización de otras pruebas que analizan la presencia una sola GA en un único gen.
- F1/F1CDx ha demostrado influir en el tratamiento de los pacientes estudiados, permitiendo que sean tratados con un fármaco dirigido o inmunoterapia potencialmente efectivos, aunque todavía se desconoce el porcentaje de pacientes que se beneficiará del análisis de F1CDx.
- El tratamiento recomendado por F1CDx vendrá especificado en el informe final junto con el resto de la información aunque la decisión de seguir o no esta recomendación se tomará de forma conjunta entre médico y paciente.
- Será necesario revisar la accesibilidad de los pacientes a estos fármacos, tanto a los aprobados por las autoridades pertinentes como a través de ensayos clínicos, con el fin de garantizar la equidad en el tratamiento.
- En comparación con las técnicas convencionales no-NGS, F1/F1CDx muestra alta concordancia con las GAs que pueden detectar dichas técnicas pero F1/F1CDx ha demostrado tener una capacidad diagnóstica superior identificando otras GAs que sin su utilización no se hubieran detectado.
- No se dispone de suficiente información que compare F1/F1CDx con otras técnicas de NGS por lo que no es posible determinar si esta técnica presenta o no un valor añadido frente a alguna de las demás.

- Existe muy poca información sobre la seguridad de F1/F1CDx, especialmente sobre los posibles EAs relacionados con el tratamiento recomendado por el test o por retrasar su inicio. Tampoco se dispone de suficiente información sobre la potencial toxicidad evitada por el hecho de sustituir un fármaco no efectivo por otro indicado por F1/F1CDx.
- La utilización de F1/F1CDx en la práctica asistencial no supondría cambios organizativos. Si se requiere seguimiento riguroso de las pautas indicadas en las especificaciones técnicas para que la recogida y manejo de las muestras sea correcta y se eviten daños en el DNA antes del envío de las mismas a los laboratorios de referencia.
- Como con otros tests genéticos, la utilización de F1CDx debería realizarse en centros con suficiente experiencia clínica y/o de investigación sobre el proceso tumoral en que será aplicada y se definirán unos criterios de inclusión y exclusión de pacientes en los que realizar el test.

Para investigaciones futuras

- Es importante insistir en la necesidad de realizar estudios con un número alto de pacientes y un diseño adecuado que permita estudiar la capacidad diagnóstica de F1CDx, su valor pronóstico y predictivo, su capacidad para influenciar y modificar la decisión terapéutica, y para evaluar la respuesta tumoral y evolución del paciente, con un tiempo mínimo de seguimiento donde sea posible comprobar el beneficio clínico y si se ocasionan eventos adversos asociados a la terapia recomendada por esta tecnología.
- Una recogida exhaustiva de cada uno de estos datos permitirá realizar un análisis completo de resultados con suficiente robustez y basado en una evidencia de adecuada calidad con el fin de poder generalizar los resultados encontrados y generar información que pueda contribuir a la toma de decisiones sobre la incorporación e implementación de F1CDx a la práctica asistencial.
- Son necesarios más estudios sobre F1CDx puesto que ha sustituido a F1 y el número de publicaciones hasta el momento es aún muy escaso.
- Antes de decidir su incorporación a la práctica asistencial, sería de gran valor clínico cuantificar la información diagnóstica añadida por F1CDx en comparación a otras pruebas ya existentes en la práctica habitual, y determinar la importancia que puedan tener los posibles falsos positivos y negativos en la toma de decisiones.
- Sería interesante realizar futuros estudios que comparen la efectividad y utilidad clínica de F1CDx frente a otras plataformas de NGS

de modo que se pueda determinar si tienen un valor diagnóstico y pronóstico similar y la repercusión de cada una de ellas en resultados en salud de los pacientes, y así poder establecer las mejores indicaciones clínicas para cada una de estas NGS.

- Sería conveniente establecer en qué situaciones clínicas la biopsia líquida presenta ventajas frente a F1CDx.
- El futuro de la investigación incluirá el desarrollo de nuevas tecnologías genómicas, ventajosas desde el punto de vista técnico, como son las NGS de tercera generación, al mismo tiempo que evolucionen los sistemas bioinformáticos y todo ello irá acompañado de un desarrollo de nuevos fármacos.
- Algunos aspectos de interés que debieran analizarse son los referentes a cuestiones éticas, sobre el almacenamiento y manejo de toda la información generada o garantías para preservar la confidencialidad, de modo que toda la previsible evolución bioinformática y farmacológica tendrá que ajustarse al marco jurídico de la investigación y de la protección de datos.
- Facilitar la adecuada inclusión de pacientes en ensayos clínicos aumentará el conocimiento sobre las GAs y los nuevos fármacos en investigación.
- También son necesarios estudios de coste-efectividad y coste-utilidad de F1CDx para intentar garantizar un correcto balance beneficios/costes.

Valoraciones finales

- A pesar del gran interés suscitado por la medicina de precisión y por la utilización de tests como F1CDx con los que determinar el perfil genético de los tumores, se reconoce la importancia de hacer un uso adecuado de los mismos, sobre todo por no trasladar al paciente falsas expectativas respecto a la posibilidad de tratar su tumor. El profesional debería plantearse si los resultados de estos tests van a influir en el manejo terapéutico de cada paciente en concreto.

Bibliografía

1. Garraway LA. Genomics-driven oncology: framework for an emerging paradigm. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(15):1806-1814.
2. Janssens JP, Schuster K, Voss A. Preventive, predictive, and personalized medicine for effective and affordable cancer care. *EPMA J*. 2018;9(2):113-123.
3. Gong J, Pan K, Fakih M, Pal S, Salgia R. Value-based genomics. *Oncotarget*. 2018;9(21):15792-15815.
4. FDA. FDA announces approval, CMS proposes coverage of first breakthrough-designated test to detect extensive number of cancer biomarkers. Accesible en: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announces-approval-cms-proposes-coverage-first-breakthrough-designated-test-detect-extensive>. 2017.
5. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol*. 2011;22(12):2616-2624.
6. Joosten S, Retèl V, Coupé V, van den Heuvel M, van Harten W. Scenario drafting for early technology assessment of next generation sequencing in clinical oncology. *BMC Cancer*. 2016;16.
7. Matthijs G, Souche E, Alders M, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24(1):2-5.
8. Soto JL, Blanco I, Díez O, et al. Documento de consenso sobre la implementación de la secuenciación masiva de nueva generación en el diagnóstico genético de la predisposición hereditaria al cáncer. *Medicina Clínica*. 2018;151(2):80.e81-80.e10.
9. Weiss MM, Van der Zwaag B, Jongbloed JD, et al. Best practice guidelines for the use of next-generation sequencing applications in genome diagnostics: a national collaborative study of Dutch genome diagnostic laboratories. *Human mutation*. 2013;34(10):1313-1321.
10. FDA. FoundationOne CDx: Summary of Safety and Effectiveness Data (SSED). Accesible en: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019B.pdf. 2018.
11. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2013;31(11):1023-1031.
12. FDA. Evaluation of Automatic Class III Designation for MSK-IMPACT (Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets): decision summary. Accesible en: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/DEN170058.pdf. 2018.
13. Büttner R, Longshore JW, Lopez-Rios F, et al. Implementing TMB measurement in clinical practice: considerations on assay requirements. *ESMO Open*. 2019;4(1):e000442.

14. FoundationMedicine. FoundationOne CDx™. Technical Information. *Disponibile en:* https://assets.ctfassets.net/vhribv12lmne/6Rt6csmCPua-guuqmg12iY8/629ba4e5c7d9a3bd1f1f666085e1e4b1/FoundationOne_CDx_Label_Technical_Info.pdf. 2019.
15. Harsha B, Creatore C, Kok CY, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*. 2018;47(D1):D941-D947.
16. Sondka Z, Bamford S, Cole CG, Ward SA, Dunham I, Forbes SA. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(11):696-705.
17. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941-D947.
18. Ali SM, Hensing T, Schrock AB, et al. Comprehensive Genomic Profiling Identifies a Subset of Crizotinib-Responsive ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer Not Detected by Fluorescence In Situ Hybridization. *The oncologist*. 2016;21(6):762-770.
19. FDA. List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools). *Accesible en:* <https://www.fda.gov/medical-devices/vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-vitro-and-imaging-tools>. 2019.
20. Duffy MJ, Crown J. Companion Biomarkers: Paving the Pathway to Personalized Treatment for Cancer. 2013;59(10):1447-1456.
21. Fernandez A, Reigosa A. [Molecular classification of breast cancer patients obtained through the technique of chromogenic in situ hybridization (CISH)]. *Invest Clin*. 2013;54(4):406-416.
22. Jacquemier J, Spyrtos F, Esterni B, et al. SISH/CISH or qPCR as alternative techniques to FISH for determination of HER2 amplification status on breast tumors core needle biopsies: a multicenter experience based on 840 cases. *BMC Cancer*. 2013;13:351.
23. Sharifi N, Salmaninejad A, Ferdosi S, et al. HER2 gene amplification in patients with prostate cancer: Evaluating a CISH-based method. *Oncol Lett*. 2016;12(6):4651-4658.
24. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-5467.
25. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre y postnatal. *Diagn Prenat*. 2012;23(2):56-66.
26. Gómez JJ, de Castro J, Concha Á, Felipe E, Isla D, López-Ríos F. Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma de pulmón no microcítico avanzado. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. *Revista Española de Patología*. 2012;45(1):14-28.

27. Zhong X, Yang H, Zhao S, Shyr Y, Li B. Network-based stratification analysis of 13 major cancer types using mutations in panels of cancer genes. *BMC genomics*. 2015;16 Suppl 7:S7.
28. Gagan J, Van Allen EM. Next-generation sequencing to guide cancer therapy. *Genome Med*. 2015;7(1):80.
29. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, et al. Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019;133:171-182.
30. SEOM. Las Cifras del Cáncer en España. *Sociedad Española de Oncología*. 2018.
31. Gomez-Espana MA, Gallego J, Gonzalez-Flores E, et al. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer (2018). *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2019;21(1):46-54.
32. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.
33. Yoda S, Dagogo-Jack I, Hata AN. Targeting oncogenic drivers in lung cancer: Recent progress, current challenges and future opportunities. *Pharmacology & therapeutics*. 2019;193:20-30.
34. Fernandes GS, Marques DF, Girardi DM, et al. Next-generation Sequencing-based genomic profiling: Fostering innovation in cancer care? *Clinics*. 2017;72(10):588-594.
35. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017;168(4):613-628.
36. Khagi Y, Goodman AM, Daniels GA, et al. Hypermutated Circulating Tumor DNA: Correlation with Response to Checkpoint Inhibitor-Based Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2017;23(19):5729-5736.
37. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2016;387(10031):1909-1920.
38. Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*. 2016;354(6312):618-622.
39. Greillier L, Tomasini P, Barlesi F. The clinical utility of tumor mutational burden in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2018;7(6):639-646.
40. Hendriks LE, Rouleau E, Besse B. Clinical utility of tumor mutational burden in patients with non-small cell lung cancer treated with immunotherapy. *Transl Lung Cancer Res*. 2018;7(6):647-660.

41. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, et al. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(11):2598-2608.
42. Campesato LF, Barroso-Sousa R, Jimenez L, et al. Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice. *Oncotarget.* 2015;6(33):34221-34227.
43. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Medicine.* 2018;7(3):746-756.
44. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29(Supplement_4):iv192-iv237.
45. Gutierrez ME, Choi K, Lanman RB, et al. Genomic Profiling of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in Community Settings: Gaps and Opportunities. *Clin Lung Cancer.* 2017;18(6):651-659.
46. Duggan MA, Anderson WF, Altekruse S, Penberthy L, Sherman ME. The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program and Pathology: Toward Strengthening the Critical Relationship. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(12):e94-e102.
47. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2018;142(3):321-346.
48. Chung JH, Ali SM, Davis J, et al. A Poorly Differentiated Malignant Neoplasm Lacking Lung Markers Harbors an EML4-ALK Rearrangement and Responds to Crizotinib. *Case reports in oncology.* 2014;7(3):628-632.
49. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511(7511):543-550.
50. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012;489(7417):519-525.
51. Campbell JD, Alexandrov A, Kim J, et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nature Genetics.* 2016;48:607.
52. Taus A, Vollmer I, Arriola E. Activating and resistance mutations of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and non-small cell lung cancer: a clinical reality. *Arch Bronconeumol.* 2011;47(2):103-105.
53. Parente I, Abal J, Fírvida JL. Terapias dirigidas en el cáncer de pulmón: ¿una nueva esperanza? *Arch Bronconeumol.* 2012;48(10):367-371.

54. Hida T, Satouchi M, Nakagawa K, et al. Ceritinib in patients with advanced, crizotinib-treated, anaplastic lymphoma kinase-rearranged NSCLC: Japanese subset. *Jpn J Clin Oncol.* 2017;47(7):618-624.
55. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(23):2167-2177.
56. Deeks ED. Ceritinib: a Review in ALK-Positive Advanced NSCLC. *Target Oncol.* 2016;11(5):693-700.
57. Zhu Z, Chai Y. Crizotinib resistance overcome by ceritinib in an ALK-positive non-small cell lung cancer patient with brain metastases: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(45):e8652.
58. (AEMPS) Aedmysps. Informe de Posicionamiento Terapéutico de alectinib (Alecensa®) en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico. *IPT, 21/2018 v1.* 2018.
59. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(21):1963-1971.
60. Ou SH, Chalmers ZR, Azada MC, et al. Identification of a novel TMEM106B-ROS1 fusion variant in lung adenocarcinoma by comprehensive genomic profiling. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2015;88(3):352-354.
61. Network NNCC. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Non-Small Cell Lung Cancer. *NCCNorg.* 2019.
62. Sgambato A, Casaluze F, Sacco PC, et al. Anti PD-1 and PDL-1 Immunotherapy in the Treatment of Advanced Non- Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Review on Toxicity Profile and its Management. *Curr Drug Saf.* 2016;11(1):62-68.
63. Hellmann MD, Rizvi NA, Goldman JW, et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open-label, phase 1, multicohort study. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):31-41.
64. Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med.* 2018;378(22):2093-2104.
65. Khagi Y, Goodman AM, Daniels GA, et al. Hypermutated circulating tumor DNA: Correlation with response to checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Clinical Cancer Research.* 2017;23(19):5729-5736.
66. Majem M, Juan O, Insa A, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico.* 2019;21(1):3-17.
67. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen Internatio-

- nal Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013;24(9):2206-2223.
68. Colomer R, Aranda-Lopez I, Albanell J, et al. Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2018;20(7):815-826.
 69. Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Advances in anatomic pathology*. 2014;21(2):100-107.
 70. Afghahi A, Telli ML, Kurian AW. Genetics of triple-negative breast cancer: Implications for patient care. *Current problems in cancer*. 2016;40(2-4):130-140.
 71. Arnedos M, Vicier C, Loi S, et al. Precision medicine for metastatic breast cancer--limitations and solutions. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(12):693-704.
 72. Burrell RA, Juul N, Johnston SR, Reis-Filho JS, Szallasi Z, Swanton C. Targeting chromosomal instability and tumour heterogeneity in HER2-positive breast cancer. *J Cell Biochem*. 2010;111(4):782-790.
 73. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
 74. Hortobagyi GN, Chen D, Piccart M, et al. Correlative Analysis of Genetic Alterations and Everolimus Benefit in Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Results From BOLERO-2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(5):419-426.
 75. Azim HA, Jr., Partridge AH. Biology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res*. 2014;16(4):427.
 76. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*. 2013;6(269):p11.
 77. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*. 2018;47(D1):D941-D947.
 78. Beaver JA, Park BH. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Future oncology (London, England)*. 2012;8(6):651-657.
 79. Wheler JJ, Atkins JT, Janku F, et al. Multiple gene aberrations and breast cancer: lessons from super-responders. *BMC cancer*. 2015;15:442.
 80. Ross JS, Badve S, Wang K, et al. Genomic profiling of advanced-stage, metaplastic breast carcinoma by next-generation sequencing reveals

- frequent, targetable genomic abnormalities and potential new treatment options. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(5):642-649.
81. Wheler JJ, Moulder SL, Naing A, et al. Anastrozole and everolimus in advanced gynecologic and breast malignancies: activity and molecular alterations in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncotarget.* 2014;5(10):3029-3038.
 82. Niu J, Andres G, Kramer K, et al. Incidence and clinical significance of ESR1 mutations in heavily pretreated metastatic breast cancer patients. *OncoTargets and therapy.* 2015;8:3323-3328.
 83. Ross JS, Gay LM. Comprehensive genomic sequencing and the molecular profiles of clinically advanced breast cancer. *Pathology.* 2017;49(2):120-132.
 84. Gomez-Martin C, Plaza JC, Pazo-Cid R, et al. Level of HER2 gene amplification predicts response and overall survival in HER2-positive advanced gastric cancer treated with trastuzumab. *Journal of Clinical Oncology.* 2013;31(35):4445-4452.
 85. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology.* 2016;27(8):1386-1422.
 86. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-337.
 87. Gong J, Cho M, Sy M, Salgia R, Fakhri M. Molecular profiling of metastatic colorectal tumors using next-generation sequencing: a single-institution experience. *Oncotarget.* 2017;8(26):42198-42213.
 88. Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2015;33(34):4023-4031.
 89. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov.* 2013;3(6):658-673.
 90. Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM.* 2018;26(2):e15-e21.
 91. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509-2520.
 92. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017;357(6349):409-413.
 93. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.

94. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(4):284-296.
95. Colombo N, Sessa C, du Bois A, et al. ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent diseasedagger. *Ann Oncol.* 2019;30(5):672-705.
96. The Cancer Genome Atlas Research N, Bell D, Berchuck A, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011;474:609.
97. Santaballa A, Barretina P, Casado A, et al. SEOM Clinical Guideline in ovarian cancer (2016). *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico.* 2016;18(12):1206-1212.
98. Swisher EM, Lin KK, Oza AM, et al. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):75-87.
99. Balasubramaniam S, Beaver JA, Horton S, et al. FDA Approval Summary: Rucaparib for the Treatment of Patients with Deleterious BRCA Mutation-Associated Advanced Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(23):7165-7170.
100. Carlson JA, Caldeira Xavier JC, Jr., Tarasen A, et al. Next-Generation Sequencing Reveals Pathway Activations and New Routes to Targeted Therapies in Cutaneous Metastatic Melanoma. *The American Journal of dermatopathology.* 2017;39(1):1-13.
101. Akbani R, Akdemir Kadir C, Aksoy BA, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell.* 2015;161(7):1681-1696.
102. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26 Suppl 5:v126-132.
103. Lo RS, Shi H. Detecting mechanisms of acquired BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Methods Mol Biol.* 2014;1102:163-174.
104. Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology.* 2013;31(14):1767-1774.
105. Johnson DB, Frampton GM, Rieth MJ, et al. Targeted Next Generation Sequencing Identifies Markers of Response to PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(11):959-967.
106. Johnson DB, Lovly CM, Sullivan RJ, Carvajal RD, Sosman JA. Melanoma driver mutations and immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2016;5(5):e1051299.
107. Eggermont AM, Maio M, Robert C. Immune checkpoint inhibitors in melanoma provide the cornerstones for curative therapies. *Semin Oncol.* 2015;42(3):429-435.

108. Wang DY, Eroglu Z, Ozgun A, et al. Clinical Features of Acquired Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Advanced Melanoma. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(5):357-362.
109. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23-34.
110. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell.* 2017;168(3):542.
111. Lezcano C, Shoushtari AN, Ariyan C, Hollmann TJ, Busam KJ. Primary and Metastatic Melanoma With NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(8):1052-1058.
112. Capdevila J, Rojo F, González-Martín A, et al. Molecular Profiling for Clinical Decision Making in Advanced Cancer: A Clinical Appraisal. *Journal of Cancer Research and Treatment.* 2017;5(3):77-85.
113. HAYES I. FoundationOne (Foundation Medicine Inc). *Lansdale: HAYES, Inc Genetic Testing Publication.* 2016.
114. DiBardino DM, Saqi A, Elvin JA, et al. Yield and Clinical Utility of Next-Generation Sequencing in Selected Patients With Lung Adenocarcinoma. *Clinical lung cancer.* 2016;17(6):517-522.e513.
115. Lim SM, Kim EY, Kim HR, et al. Genomic profiling of lung adenocarcinoma patients reveals therapeutic targets and confers clinical benefit when standard molecular testing is negative. *Oncotarget.* 2016;7(17):24172-24178.
116. Lim SM, Kim HR, Lee JS, et al. Open-Label, Multicenter, Phase II Study of Ceritinib in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring ROS1 Rearrangement. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2017;35(23):2613-2618.
117. Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L, et al. Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and next-generation sequencing for detection of EML4-ALK rearrangement in lung cancer. *The oncologist.* 2015;20(3):316-322.
118. Rozenblum AB, Ilouze M, Dudnik E, et al. Clinical Impact of Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing on Changes in Treatment Decisions in Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer.* 2017;12(2):258-268.
119. Suh JH, Johnson A, Albacker L, et al. Comprehensive Genomic Profiling Facilitates Implementation of the National Comprehensive Cancer Network Guidelines for Lung Cancer Biomarker Testing and Identifies Patients Who May Benefit From Enrollment in Mechanism-Driven Clinical Trials. *The oncologist.* 2016;21(6):684-691.

120. Vigneswaran J, Tan YH, Murgu SD, et al. Comprehensive genetic testing identifies targetable genomic alterations in most patients with non-small cell lung cancer, specifically adenocarcinoma, single institute investigation. *Oncotarget*. 2016;7(14):18876-18886.
121. Drilon A, Wang L, Arcila ME, et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. *Clin Cancer Res*. 2015;21(16):3631-3639.
122. Ross JS, Ali SM, Wang K, et al. Comprehensive genomic profiling of inflammatory breast cancer cases reveals a high frequency of clinically relevant genomic alterations. *Breast cancer research and treatment*. 2015;154(1):155-162.
123. Yuan Y, Yost SE, Yuan YC, et al. Genomic mutation-driven metastatic breast cancer therapy: a single center experience. *Oncotarget*. 2017;8(16):26414-26423.
124. Chae YK, Davis AA, Jain S, et al. Concordance of Genomic Alterations by Next-Generation Sequencing in Tumor Tissue versus Circulating Tumor DNA in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(7):1412-1420.
125. Ross JS, Gay LM, Nozad S, et al. Clinically advanced and metastatic pure mucinous carcinoma of the breast: a comprehensive genomic profiling study. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;155(2):405-413.
126. Nozad S, Sheehan CE, Gay LM, et al. Comprehensive genomic profiling of malignant phyllodes tumors of the breast. *Breast cancer research and treatment*. 2017;162(3):597-602.
127. Wheler JJ, Parker BA, Lee JJ, et al. Unique molecular signatures as a hallmark of patients with metastatic breast cancer: implications for current treatment paradigms. *Oncotarget*. 2014;5(9):2349-2354.
128. Balko JM, Giltane JM, Wang K, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer discovery*. 2014;4(2):232-245.
129. Meric-Bernstam F, Frampton GM, Ferrer-Lozano J, et al. Concordance of genomic alterations between primary and recurrent breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(5):1382-1389.
130. Parsons HA, Beaver JA, Cimino-Mathews A, et al. Individualized Molecular Analyses Guide Efforts (IMAGE): A Prospective Study of Molecular Profiling of Tissue and Blood in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(2):379-386.
131. Vasan N, Yelensky R, Wang K, et al. A targeted next-generation sequencing assay detects a high frequency of therapeutically targetable altera-

- tions in primary and metastatic breast cancers: implications for clinical practice. *The oncologist*. 2014;19(5):453-458.
132. Parker BA, Schwaederle M, Scur MD, et al. Breast Cancer Experience of the Molecular Tumor Board at the University of California, San Diego Moores Cancer Center. *Journal of oncology practice*. 2015;11(6):442-449.
 133. Patel JM, Knopf J, Reiner E, et al. Mutation based treatment recommendations from next generation sequencing data: a comparison of web tools. *Oncotarget*. 2016;7(16):22064-22076.
 134. Ross JS, Wang K, Sheehan CE, et al. Relapsed classic E-cadherin (CD-H1)-mutated invasive lobular breast cancer shows a high frequency of HER2 (ERBB2) gene mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(10):2668-2676.
 135. Ross JS, Gay LM, Wang K, et al. Nonamplification ERBB2 genomic alterations in 5605 cases of recurrent and metastatic breast cancer: An emerging opportunity for anti-HER2 targeted therapies. *Cancer*. 2016;122(17):2654-2662.
 136. Network NNCC. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Colon cancer. *NCCNorg*. 2019.
 137. Dougherty BA, Lai Z, Hodgson DR, et al. Biological and clinical evidence for somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 as predictive markers for olaparib response in high-grade serous ovarian cancers in the maintenance setting. *Oncotarget*. 2017;8(27):43653-43661.
 138. Ross JS, Ali SM, Wang K, et al. Comprehensive genomic profiling of epithelial ovarian cancer by next generation sequencing-based diagnostic assay reveals new routes to targeted therapies. *Gynecol Oncol*. 2013;130(3):554-559.
 139. Wheler J, Yelensky R, Falchook G, et al. Next generation sequencing of exceptional responders with BRAF-mutant melanoma: implications for sensitivity and resistance. *BMC cancer*. 2015;15:61.
 140. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2013;8(7):823-859.
 141. Swanton C, Soria JC, Bardelli A, et al. Consensus on precision medicine for metastatic cancers: a report from the MAP conference. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1443-1448.
 142. Oncology ASoc. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *ASCO, May 30, 2018*.
 143. Cardoso F, Senkus E, Costa A, et al. 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)†. *Annals of Oncology*. 2018;29(8):1634-1657.

144. Schwaederle M, Zhao M, Lee JJ, et al. Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials. *2015;33(32):3817-3825.*
145. Sohal DP, Rini BI, Khorana AA, et al. Prospective Clinical Study of Precision Oncology in Solid Tumors. *Journal of the National Cancer Institute.* 2016;108(3).
146. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(13):1453-1486.
147. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, et al. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2017;16(11):2598-2608.
148. Davis EJ, Perez MC, Ayoubi N, et al. Clinical Correlates of Response to Anti-PD-1-based Therapy in Patients With Metastatic Melanoma. *J Immunother.* 2019.
149. Ross JS, Wang K, Khaira D, et al. Comprehensive genomic profiling of 295 cases of clinically advanced urothelial carcinoma of the urinary bladder reveals a high frequency of clinically relevant genomic alterations. *Cancer.* 2016;122(5):702-711.
150. Hirshfield KM, Tolkmunov D, Zhong H, et al. Clinical Actionability of Comprehensive Genomic Profiling for Management of Rare or Refractory Cancers. *Oncologist.* 2016;21(11):1315-1325.
151. Brannon AR, Vakiani E, Sylvester BE, et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol.* 2014;15(8):454.
152. Lee SY, Haq F, Kim D, et al. Comparative genomic analysis of primary and synchronous metastatic colorectal cancers. *PLoS ONE.* 2014;9(3):e90459.
153. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-892.
154. Dhir M, Choudry HA, Holtzman MP, et al. Impact of genomic profiling on the treatment and outcomes of patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Cancer medicine.* 2017;6(1):195-206.
155. Von Hoff DD, Stephenson JJ, Jr., Rosen P, et al. Pilot study using molecular profiling of patients' tumors to find potential targets and select treatments for their refractory cancers. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(33):4877-4883.
156. Weiss GJ, Liang WS, Demeure MJ, et al. A pilot study using next-generation sequencing in advanced cancers: feasibility and challenges. *PLoS ONE.* 2013;8(10):e76438.

157. Wheler JJ, Janku F, Naing A, et al. Cancer Therapy Directed by Comprehensive Genomic Profiling: A Single Center Study. *Cancer Res.* 2016;76(13):3690-3701.
158. Weiss GJ, Hoff BR, Whitehead RP, et al. Evaluation and comparison of two commercially available targeted next-generation sequencing platforms to assist oncology decision making. *Oncotargets and therapy.* 2015;8:959-967.
159. Johnson DB, Dahlman KH, Knol J, et al. Enabling a genetically informed approach to cancer medicine: a retrospective evaluation of the impact of comprehensive tumor profiling using a targeted next-generation sequencing panel. *Oncologist.* 2014;19(6):616-622.
160. Park HS, Lim SM, Kim S, et al. Pilot Study of a Next-Generation Sequencing-Based Targeted Anticancer Therapy in Refractory Solid Tumors at a Korean Institution. *PloS one.* 2016;11(4):e0154133.
161. Cai J, Ma H, Huang F, et al. Correlation of bevacizumab-induced hypertension and outcomes of metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab: a systematic review and meta-analysis. *World journal of surgical oncology.* 2013;11:306.
162. Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Lonati V, Barni S. Relationship between skin rash and outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with anti-EGFR tyrosine kinase inhibitors: a literature-based meta-analysis of 24 trials. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2012;78(1):8-15.
163. Grigg C, Rizvi NA. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction? *Journal for Immunotherapy of Cancer.* 2016;4(1):48.
164. Martínez-Férez IM, Viguera-Guerra I, Rosario-Lozano MP, Benot-López S. Plataformas genómicas de carácter pronóstico-predictivo en el cáncer de mama: actualización de la evidencia. Revisión Sistemática. Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del SNS; 2018. .
165. Sacher AG, Dahlberg SE, Heng J, Mach S, Janne PA, Oxnard GR. Association Between Younger Age and Targetable Genomic Alterations and Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA oncology.* 2016;2(3):313-320.
166. Meric-Bernstam F, Brusco L, Shaw K, et al. Feasibility of Large-Scale Genomic Testing to Facilitate Enrollment Onto Genomically Matched Clinical Trials. *Journal of Clinical Oncology.* 2015;33(25):2753-2762.
167. Gray SW, Hicks-Courant K, Cronin A, Rollins BJ, Weeks JC. Physicians' attitudes about multiplex tumor genomic testing. *Journal of Clinical Oncology.* 2014;32(13):1317-1323.

168. Aran D, Sirota M, Butte AJ. Systematic pan-cancer analysis of tumour purity. *Nature communications*. 2015;6:8971-8971.
169. Jones S, Anagnostou V, Lytle K, et al. Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. *Sci Transl Med*. 2015;7(283):283ra253.
170. Kanagal-Shamanna R, Portier BP, Singh RR, et al. Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics. *Mod Pathol*. 2014;27(2):314-327.
171. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(6):579-586.
172. Ziogas DE, Spiliotis J, Lykoudis EG, Zografos GC, Roukos DH. Intratumor and circulating clonal heterogeneity shape the basis of precision breast cancer therapy. *Future oncology (London, England)*. 2017;13(2):113-116.
173. Stearns V, Park BH. Gene Mutation Profiling of Breast Cancers for Clinical Decision Making: Drivers and Passengers in the Cart Before the Horse. *JAMA Oncol*. 2015;1(5):569-570.
174. Chae YK, Davis AA, Carneiro BA, et al. Concordance between genomic alterations assessed by next-generation sequencing in tumor tissue or circulating cell-free DNA. *Oncotarget*. 2016;7(40):65364-65373.
175. NICE. Caris Molecular Intelligence for guiding cancer treatment. Medtech innovation briefing, MIB 120. *NICE advice*. 2017:Acceso el 6/06/2018. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/advice/mib120>.
176. Henk HJ, Ray S. Treatment patterns and healthcare costs among patients with advanced non-small-cell lung cancer. 2013;2(3):189-197.
177. Gautschi O, Milia J, Filleron T, et al. Targeting RET in Patients With RET-Rearranged Lung Cancers: Results From the Global, Multicenter RET Registry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(13):1403-1410.
178. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nature medicine*. 2013;19(11):1469-1472.
179. Capelletti M, Dodge ME, Ercan D, et al. Identification of recurrent FGFR3-TACC3 fusion oncogenes from lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(24):6551-6558.
180. Hutchinson KE, Lipson D, Stephens PJ, et al. BRAF fusions define a distinct molecular subset of melanomas with potential sensitivity to MEK inhibition. *Clin Cancer Res*. 2013;19(24):6696-6702.
181. Gunderson CC, Rowland MR, Wright DL, et al. Initiation of a formalized precision medicine program in gynecologic oncology. *Gynecologic oncology*. 2016;141(1):24-28.

182. Lim MC, Randall LM. Role and clinical application of next-generation sequencing (NGS) for ovarian cancer. *J Gynecol Oncol.* 2017;28(4):e51.
183. Grenader T, Tauber R, Shavit L. Next-generation sequencing in patients with advanced cancer: are we ready for widespread clinical use? A single institute's experience. *Anti-cancer drugs.* 2016;27(9):899-907.
184. Kuderer NM, Burton KA, Blau S, et al. Comparison of 2 commercially available next-generation sequencing platforms in oncology. *JAMA Oncology.* 2017;3(7):996-998.
185. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD.* 2015;17(3):251-264.
186. Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO precision oncology.* 2017;2017.
187. Li Y, Bare LA, Bender RA, et al. Cost Effectiveness of Sequencing 34 Cancer-Associated Genes as an Aid for Treatment Selection in Patients with Metastatic Melanoma. *Molecular diagnosis & therapy.* 2015;19(3):169-177.
188. Beaubier N, Tell R, Huether R, et al. Clinical validation of the Tempus xO assay. *Oncotarget.* 2018;9(40):25826-25832.

Anexos

ANEXO I. Lista de genes estudiados por F1CDx

Genes con regiones exónicas codificantes incluidas en FoundationOne CDx™ para la detección de sustituciones, indels y alteraciones en el número de copias.

ABL1	ACVR1B	AKT1	AKT2	AKT3	ALK	ALOX12B	AMER1 (FAM123B)	APC
AR	ARAF	ARFRP1	ARID1A	ASXL1	ATM	ATR	ATRX	AURKA
AURKB	AXIN1	AXL	BAP1	BARD1	BCL2	BCL2L1	BCL2L2	BCL6
BCOR	BCORL1	BRAF	BRCA1	BRCA2	BRD4	BRIP1	BTG1	BTG2
BTK	CT1orf30 (EMSY)	CALR	CARD11	CASP8	CBFB	CBL	CCND1	CCND2
CCND3	CCNE1	CD22	CD274 (PD-L1)	CD70	CD79A	CD79B	CDC73	CDH1
CDK12	CDK4	CDK6	CDK8	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2A	CDKN2B	CDKN2C
CEBPA	CHEK1	CHEK2	CIC	CREBBP	CRKL	CSF1R	CSF3R	CTCF
CTNNA1	CTNNB1	CUL3	CUL4A	CXCR4	CYP17A1	DAXX	DDR1	DDR2
DIS3	DNMT3A	DOT1L	EED	EGFR	EP300	EPHA3	EPHB1	EPHB4
ERBB2	ERBB3	ERBB4	ERCC4	ERG	ERRF1	ESR1	EZH2	FAM46C
FANCA	FANCC	FANCG	FANCL	FAS	FBXW7	FGF10	FGF12	FGF14
FGF19	FGF23	FGF3	FGF4	FGF6	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4
FH	FLCN	FLT1	FLT3	FOXL2	FUBP1	GABRA6	GATA3	GATA4
GATA6	GID4 (C17orf39)	GNAI1	GNAI3	GNAQ	GNAS	GRM3	GSK3B	H3F3A
HDAC1	HGF	HNF1A	HRAS	HSD3B1	ID3	IDH1	IDH2	IGF1R
IKBKE	IKZF1	INPP4B	IRF2	IRF4	IRS2	JAK1	JAK2	JAK3
JUN	KDMSA	KDM5C	KDM6A	KDR	KEAP1	KEL	KIT	KLHL6
KMT2A (MLL)	KMT2D (MLL2)	KRAS	LTK	LYN	MAF	MAP2K1 (MEK1)	MAP2K2 (MEK2)	MAP2K4
MAP3K1	MAP3K13	MAPK1	MCL1	MDM2	MDM4	MED12	MEF2B	MEN1
MERTK	MET	MITF	MKNK1	MLH1	MPL	MRE11A	MSH2	MSH3
MSH6	MST1R	MTAP	MTOR	MUTYH	MYC	MYCL (MYCL1)	MYCN	MYD88
NBN	NF1	NF2	NFE2L2	NFKB1A	NKX2-1	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3
NPM1	NRAS	NTSC2	NTRK1	NTRK2	NTRK3	P2RY8	PALB2	PARK2
PARP1	PARP2	PARP3	PAX5	PBRM1	PDCD1 (PD-1)	PDCD1LG2 (PD-L2)		PDGFRA
PDGFRB	PDK1	PIK3C2B	PIK3C2G	PIK3CA	PIK3CB	PIK3R1	PIM1	PMS2
POLD1	POLE	PPARG	PPP2R1A	PPP2R2A	PRDM1	PRKARIA	PRKCJ	PTCH1
PTEN	PTPN11	PTPRO	QKI	RAC1	RAD21	RAD51	RAD51B	RAD51C
RADS1D	RAD51L	RAD54L	RAF1	RARA	RBI	RBM10	REL	RET
RICTOR	RNF43	ROSI	RPTOR	SDHA	SDHB	SDHC	SDHD	SETD2
SF3B1	SGK1	SMAD2	SMAD4	SMARCA4	SMARCB1	SMO	SNCAIP	SOCS1
SOX2	SOX9	SPEN	SPOP	SRC	STAG2	STAT3	STK11	SUFU
SYK	TBX3	TEK	TET2	TGFB2	TIPARP	TNFAIP3	TNFRSF14	TP53
TSC1	TSC2	TYRO3	U2AF1	VEGFA	VHL	WHSC1 (HMSET)	WHSC1L1	WT1
XPO1	XRCC2	ZNF217	ZNF703					

Genes con regiones intrónicas para la detección de reordenamientos, un gen con una región promotora y un gen RNA no-codificante.

ALK	BCL2	BCR	BRAF	BRCA1	BRCA2	CD74	EGFR	ETV4
ETV5	ETV6	EWSR1	EZR	FGFR1	FGFR2	FGFR3	KIT	KMT2A (MLL)
MSH2	MYB	MYC	NOTCH2	NTRK1	NTRK2	NUTM1	PDGFRA	RAF1
RARA	RET	ROSI	RSPO2	SDC4	SLC34A2	TERC*	TERT (promoter only)**	
TMPRSS2								

*TERC is non-coding RNA gene. **TERT is gene with promoter region.

Listado de genes que estudia F1CDx. Tomada de FoundationOne CDx™ Technical Information¹⁰.

ANEXO II. Listado de otros tests CDx aprobados por la FDA para las GAs que detecta F1CDx

	Device	Company	Technology	Therapy	Indication
HER2-Amplification	PathVysion HER-2 DNA Probe Kit	Abbott Molecular, Inc.	FISH	Herceptin (trastuzumab)	Breast cancer
	Pathway Anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody	Ventana Medical Systems, Inc.	IHC	Herceptin (trastuzumab)	Breast cancer
	Insite HER-2/neu Kit	Biogenex Laboratories, Inc.	IHC	Herceptin (trastuzumab)	Breast cancer
	Spot-Light HER2 CISH Kit	Life Technologies, Inc.	CISH	Herceptin (trastuzumab)	Breast cancer
	Bond Oracle Her2 IHC System	Leica Biosystems	IHC	Herceptin (trastuzumab)	Breast cancer
	HER2 CISH pharmDx Kit	Dako Denmark A/S	CISH	Herceptin (trastuzumab)	Breast cancer
	INFORM HER2 DUAL ISH DNA Probe Cocktail	Ventana Medical Systems, Inc.	Dual ISH	Herceptin (trastuzumab)	Breast cancer
	HercepTest	Dako Denmark A/S	IHC	Herceptin (trastuzumab)	Breast cancer
				Perjeta (pertuzumab)	Gastric or Gastroesophageal junction adenocarcinoma
				Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine)	Breast cancer
BRAF-V600	THxID BRAF Kit	bioMerieux	PCR	Mekinist (trametinib)	Melanoma
	cobas BRAF V600 Mutation Test	Roche Molecular Systems, Inc.	PCR	Zelboraf (vemurafenib)	Melanoma
BRAF-600E	THxID BRAF Kit	bioMerieux	PCR	Tafinlar (dabrafenib)	Melanoma
	Oncomine Dx Target Test	Life Technologies, Inc.	NGS	Tafinlar (dabrafenib) Mekinist (trametinib)	Non-small cell lung cancer
KRAS	Praxis Extended Ras Panel	Illumina	NGS	Vectibix (panitumumab)	Colorectal cancer
	cobas KRAS Mutation Test	Roche Molecular Systems, Inc.	PCR	Erbix (cetuximab) Vectibix (panitumumab)	Colorectal cancer
	therascreen KRAS RGQ PCR Kit	QIAGEN	PCR	Erbix (cetuximab) Vectibix (panitumumab)	Colorectal cancer
	Praxis Extended Ras Panel	Illumina	NGS	Vectibix (panitumumab)	Colorectal cancer
ALK - fusion	Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit	Abbott Molecular, Inc.	FISH	Xalkori (crizotinib)	Non-small cell lung cancer
	ALK (D5F3) CDx Assay	Ventana Medical Systems, Inc.	IHC	Xalkori (crizotinib)	Non-small cell lung cancer
EGFR - Exon 19 deletions & L858R	cobas EGFR Mutation Test v2	Roche Molecular Systems, Inc.	PCR	Tarceva (erlotinib)	Non-small cell lung cancer
	therascreen EGFR RGQ PCR Kit	QIAGEN	PCR	Gilotrif (afatinib) Iressa (gefitinib)	Non-small cell lung cancer
	Oncomine Dx Target Test	Life Technologies, Inc.	NGS	Iressa (gefitinib)	Non-small cell lung cancer
EGFR T790M	cobas EGFR Mutation Test v2	Roche Molecular Systems, Inc.	PCR	Tagrisso (osimertinib)	Non-small cell lung cancer
BRCAl/2	FoundationFocus CDx _{BRC1/2}	Foundation Medicine, Inc.	NGS	Rubraca (rucaparib)	Advanced Ovarian

FISH: hibridación fluorescente in situ, IHC: inmunohistoquímica, CISH: hibridación in situ cromogénica, ISH: hibridación sin situ, PCR: reacción en cadena de la polimerasa, NGS: secuenciación de nueva generación.

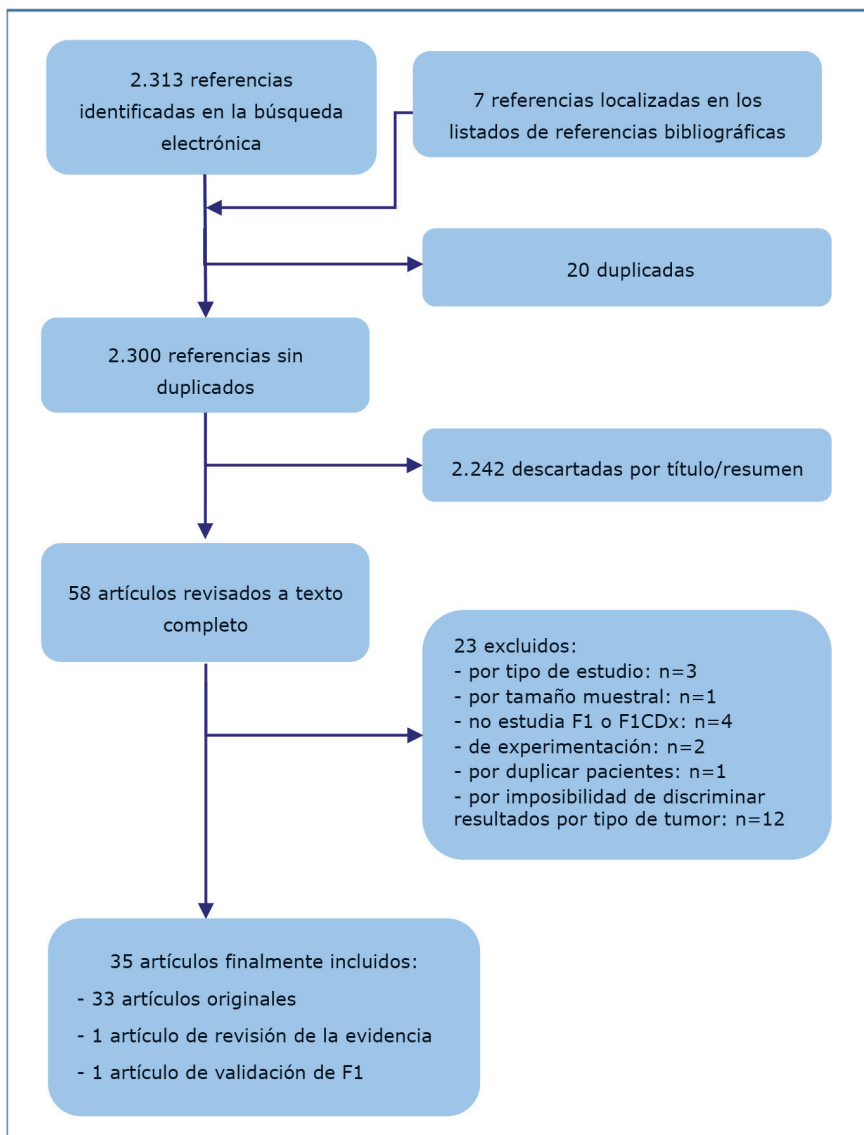
ANEXO III. Estrategia de búsqueda en PubMed y Cochrane Library

PUBMED		
Nº	Pregunta	Resultados
#1	Search ("FoundationOne" OR "Foundation Medicine" OR "FoundationOne CDx" OR "next-generation sequencing" OR "high-throughput sequencing" OR "comprehensive genomic profiling" OR "hybrid-capture-based sequencing")	41008
#2	Search (lung[Title/Abstract] OR breast[Title/Abstract] OR colon[Title/Abstract] OR colorectal[Title/Abstract] OR ovarian[Title/Abstract] OR ovaric[Title/Abstract] OR melanoma[Title/Abstract])	1431294
#3	Search (cancer*[Title/Abstract] OR tumour*[Title/Abstract] OR tumor*[Title/Abstract] OR neoplasm*[Title/Abstract] OR carcinoma*[Title/Abstract] OR "non-small cell lung cancer"[Title/Abstract] OR "NSCLC"[Title/Abstract] OR adenocarcinoma[Title/Abstract] OR squamous[Title/Abstract])	3013215
#4	#1 AND #2 AND #3	3542
#5	#4 Filters: Publication date from 2012/01/01 to 2019/06/05; Humans	2206

Cochrane Library		
Nº	Pregunta	Resultados
#1	(lung AND (canc* OR tumo* OR neoplasm*)):ti,ab,kw	24817
#2	(breast AND (canc* OR tumo* OR neoplasm*)):ti,ab,kw	34635
#3	(colon AND (canc* OR tumo* OR neoplasm*)):ti,ab,kw	5963
#4	(colorectal AND (canc* OR tumo* OR neoplasm*)):ti,ab,kw	14749
#5	(melanoma AND (canc* OR tumo* OR neoplasm*)):ti,ab,kw	4158
#6	((ovarian OR ovaric) AND (canc* OR tumo* OR neoplasm*)):ti,ab,kw	7118
#7	#1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5 OR #6	81461
#8	(Foundation one):ti,ab,kw	1711
#9	(FoundationOne):ti,ab,kw	31
#10	(Next Generation sequencing):ti,ab,kw	0
#11	(Comprehensive genomic test profiling platform):ti,ab,kw	2
#12	#4 OR #5 OR #6 #7	1714
#13	(#7 AND #12) with Publication Year from 2010 to 2019, with Cochrane Library publication date from Jan 2010 to Mar 2019, in Trials	107

ANEXO IV. Diagrama de flujo de selección de estudios

Figura 5. Proceso de selección de estudios.



ANEXO V. Estudios excluidos y motivo de exclusión

Tabla 3. Artículos excluidos y motivo de exclusión.		
Primer autor, año	Tumor	Motivos de exclusión
Gautschi y cols ¹⁷⁷ , 2017. Vaishnavi y cols ¹⁷⁸ , 2013.	NSCLC	No utilizan F1 sino otra NGS.
Sacher y cols ¹⁶⁵ , 2016.	NSCLC	No queda claro que se trate de F1 pero en todo caso no mencionan ningún resultado.
Capelletti y cols ¹⁷⁹ , 2014.	NSCLC	No es un estudio clínico sino de investigación en laboratorio.
Lindeman y cols ⁴⁷ , 2018.	NSCLC	No es un estudio clínico sino una guía clínica.
Wheler y cols ⁷⁹ , 2015.	Mama	Incluyeron los mismos tres pacientes que en estudio del 2014.
Wheler y cols ⁸¹ , 2014.	Mama	Sólo utilizaron F1 en 3 pacientes.
Hutchinson y cols ¹⁸⁰ , 2013.	Melanoma	No es un estudio clínico sino de investigación en laboratorio.
Gunderson y cols ¹⁸¹ , 2016.	Ovario	Incluye diversos tumores ginecológicos, no sólo ovario y no da resultados por separado de ovario.
Balasubramaniam y cols ⁹⁹ , 2017.	Ovario	No estudia efectividad de F1, incluye <i>FoundationFocus CDx BRCA test</i> .
Lim y cols ¹⁸² , 2017.	Ovario	No es un estudio clínico sino una revisión narrativa.
Fernandes y cols ³⁴ , Goodman y cols ¹⁴⁷ , Grenader y cols ¹⁸³ , Hirshfield y cols ¹⁵⁰ , Hohanson y cols ¹⁵⁹ , Kuderer y cols ¹⁸⁴ , Park y cols ¹⁶⁰ , Sohal y cols ¹⁴⁵ , Weiss y cols ¹⁵⁸ , Chae y cols ¹⁷⁴ , Wheler y cols ¹⁵⁷ , Zhong y cols ²⁷	Varios tumores	Se aportan resultados para el total de tumores, no resulta posible discriminar los resultados por separado para cada tipo de tumor.

NSCLC: cáncer de pulmón no microcítico, NGS: secuenciación de nueva generación, F1: FoundationOne.

ANEXO VI. Tablas de extracción de datos de los artículos incluidos

Tabla 4. Estudios de F1 en pacientes con tumores de pulmón.

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características de la población	Index test/ comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Hellmann y cols ¹⁴ , 2018, EEUU.	Estudiar la supervivencia libre de progresión (PFS) de nivolumab + ipilimumab frente a QT en pacientes con una TMB ≥ 10 mut/Mb, independientemente del nivel de expresión del PD-L1.	Ensayo open-label en fase 3 (Checkmate 227). Se aleatorizaron pacientes con PD-L1 $\geq 1\%$ y $< 1\%$ a los tres grupos de tratamiento.	N=1.739 N=1.189 con $\geq 1\%$ de expresión del PD-L1. N=550 con $< 1\%$ de expresión del PD-L1. Adultos con ECOG=0-1 que no hubieran recibido tratamiento sistémico previo por NSCLC avanzado o metastásico. Se excluyeron pacientes con mutaciones EGFR o ALK translocaciones. Se pudo estudiar la TMB en 1.044 pacientes (57,7%). De estos, 444 (44,2%) tenían alta carga mutacional (TMB ≥ 10 mut/Mb). De ellos, 139 recibieron nivolumab+ipilimumab y 160 recibieron QT.	F1 CDx para determinar la TMB. No hay comparador.	NSCLC escamosos o no escamosos, en estadio IV o recurrente.	No	Nivolumab (3 mg/Kg cada 2 semanas) + ipilimumab (1mg/Kg cada 6 semanas) como primera línea. vs QT según tipo histológico. vs nivolumab cada 2 semanas (si $\geq 1\%$ de expresión del PD-L1) o nivolumab cada 3 semanas + QT según tipo histológico (si $< 1\%$ de expresión del PD-L1).	<p>- Seguimiento mínimo de 11,2 meses.</p> <p>- Tiempo mediano de duración de tratamiento con nivolumab+ipilimumab fue de 4,2 meses (rango de 0,03-24,0) y con QT, de 2,6 meses (rango, 0,03-22,1).</p> <p>- Tasa de PFS al año en el total de pacientes, independientemente de la TMB y del nivel de expresión del PD-L1, fue de 30,9% en el grupo de nivolumab + ipilimumab vs 17,0% en el grupo de QT, HR de progresión o muerte=0,83 (IC 95%: 0,72-0,96). PFS mediana de 4,9 meses (IC 95%: 4,1-5,6) vs 5,5 meses (IC 95%: 4,6-5,6).</p> <p>- Tasa de PFS al año en pacientes con TMB ≥ 10 mut/Mb (alta carga tumoral mutacional) fue de significativamente superior en el grupo de nivolumab + ipilimumab: 42,6% vs 13,2% en el grupo de QT. PFS mediana de 7,2 meses (IC 95%: 5,5-13,2) vs 5,5 meses (IC 95%: 4,4-5,6). HR de progresión o muerte=0,58 (IC 97,5%: 0,41-0,81; P<0,001).</p> <p>Y de este grupo, ajustando en función de si PD-L1 era $\geq 1\%$ o $< 1\%$, el HR=0,57; IC 97,5%: 0,40-0,80; P<0,001.</p> <p>Y si además, PD-L1 $\geq 1\%$, la PFS era mayor que en los PD-L1<1%, y mayor entre los pacientes con tumor escamoso que no escamoso.</p> <p>- En pacientes con TMB<10 mut/Mb, la PFS mediana de 3,2 meses (IC 95%: 2,7-4,3) vs 5,5 meses (IC 95%: 4,3-5,6), sin diferencias entre ambos grupos (HR=1,07; IC 95%: 0,84-1,35).</p> <p>- Tasa de respuesta objetiva: 45,3% en grupo nivolumab+ipilimumab frente a 26,9% en grupo QT.</p> <p>Progresión de la enfermedad en los pacientes con TMB ≥ 10 mut/Mb en el 37,8% y 47,2%, respectivamente.</p> <p>- Duración de la respuesta: 43% libres de progresión al año en el grupo de nivolumab+ipilimumab frente al 13% del grupo de QT. El porcentaje de pacientes con respuesta después del año fue del 68% en grupo nivolumab+ipilimumab frente a 25% en grupo QT.</p> <p>- No se encontraron diferencias en la PFS entre los pacientes tratados con nivolumab (N=71) vs QT (N=79) con TMB ≥ 13 mut/Mb y PD-L1 $\geq 1\%$.</p> <p>- Seguridad, de acuerdo al NCI CTCAE v.4.0: porcentaje global de EA similar en grupos nivolumab+ipilimumab y QT. El porcentaje de EA grados 3 o 4 fue de 31,2% en grupo nivolumab+ipilimumab y 36,1% en grupo QT.</p> <p>Entre los pacientes con TMB ≥ 10 mut/Mb, los del primer grupo sufrieron un 25,9% de EA y los de QT un 8,8%.</p> <p>- Entre los pacientes con TMB ≥ 10 mut/Mb, el 24,4% de los tratados con nivolumab+ipilimumab y el 3,1% de los tratados con QT seguía en tratamiento al cierre del estudio.</p> <p>- No existe relación entre la TMB y el nivel de expresión de PD-L1.</p> <p>- De los asignados al grupo de QT, un 30% recibió posteriormente inmunoterapia.</p>

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características de la población	Index test/ comparador	Tumor, estado	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Lim y cols ¹⁶ , 2017, Corea.	Estudiar la actividad antitumoral y el perfil de seguridad del certinib en pacientes con NSCLC y reordenamientos ROS1.	Ensayo abierto de fase II, multicéntrico.	Mayores de 20 años, ECOG:0-2. Hacen F1 en muestras de 15 pacientes. Todos eran FISH positivos a reordenamientos ROS1.	- FISH: los 15 positivos a reordenamientos ROS1. - IHC: 9 positivos y 2 negativos. - F1.	NSCLC localmente avanzado o metastásico. Todos son adenocarcinomas.	No se menciona.	Certinib.	- De los 15 pacientes a quienes hicieron F1, 11 dieron un resultado positivo; los reordenamientos encontrados fueron: CD74-ROS1 (n=2), SL3342-ROS1 (n=2) y EZR-ROS1 (n=7). - 4 tuvieron un resultado negativo con F1. De estos 4, uno había sido también negativo con IHC y clínicamente progresó tras tratamiento con certinib por lo que se considera que fue un falso positivo de FISH. - Dos negativos con F1 presentaron respuesta parcial al certinib, lo que sugiere que son falsos negativos de F1 (los autores lo relacionaron con disponer de una cantidad limitada de tejido muestral). - Respuesta tumoral al certinib valorados por RECIST v.1.1: RC en 1 paciente, RP en 10, progresión en 1 paciente, estabilización tumoral en 2 y no disponible esta información en 1 paciente. - PFS en los pacientes con RP osciló entre 4.4 meses a más de 31,8 meses.
Vigneswaran y cols ¹⁵ , 2016, EEUU.	Revisar los resultados del perfil genómico exhaustivo realizado a pacientes con NSCLC. Evaluar el porcentaje de pacientes con GAs potencialmente dianas terapéuticas. Evaluar el porcentaje de pacientes con alteraciones concurrentes previamente consideradas excluyentes. Caracterizar el grupo de pacientes con mutaciones KRAS.	Petrospectivo de una serie de casos, de un centro universitario, recogidos en 5 años (dic-2009 a ago-2014).	N=160 pacientes analizados con F1. Edad media de 62,1 años. Hombres: n=79 (49%) Mujeres: n=81 (51%). No fumadores: 22%.	- F1 (en 160 pacientes). - Caris Molecular Intelligence. - Response Genetics Inc. - No comparador.	NSCLC avanzado. De los 160 estudiados con F1: Adenocarcinomas: n=120 (75%). Carcinoma de células escamosas (SCC): n=15 (9%). NSCLC-no especificado de otra manera (NOS): n=7 (4%). Carcinoma de células grandes: n=4 (3%).	No se menciona.	No se administra.	- El 99,4% de los pacientes analizados con las NGS presentaron al menos una GA, con una media de 10,8 alteraciones/tumor. - El estudio se centró en los pacientes con adenocarcinoma (n=120). La mayoría de las GAs implicaban a los genes de receptores de quinasas/ factores de crecimiento (RTK/GFs). - Se identificaron GAs en la vía MAPK/RAS en un 56,7% (68/120) y en la vía PI3K/mTOR en un 30% (36/120), GAs en genes asociados al ciclo celular en 25% (30/120), mutaciones KRAS en 32,5% de las que un 10% se dieron en no fumadores. - 46% de alteraciones en ECFR y 61% de las alteraciones en ALK se dieron en no fumadores. - Las GAs identificadas mediante las NGS se dieron en los genes: EGFR (23,3%), KRAS (32,5%), ALK (7,5%), ROS1 (0,8%), RAF1 (1,7%), RET (10,8%), ERBB2 (4,2%), PIK3CA (10,0%), MET (5,0%), BRAF (12,5%) y en el gen potencialmente intervenible CBL (6,7%). - En 36,25% de las muestras (59/160) se encontraron múltiples GAs. Se trata de un porcentaje de casos superior al esperado.
Ali y cols ¹⁸ , 2016, California, EEUU.	Estudiar el papel de F1 para realizar un CGP que permita identificar reordenamientos ALK en pacientes con NSCLC y comparar su capacidad diagnóstica frente a FISH.	Serie de casos.	N=1.070 pacientes. Y una segunda serie de 45 pacientes de otro centro. 47 pacientes con reordenamiento ALK.	- FISH. - F1. Profundidad de cobertura media >650x para al menos 3.769 exones de 236 genes relacionados con cáncer y 47 intrones de 19 genes que presentan reordenamientos en casos de cáncer.	NSCLC avanzado.	No se menciona.	Crizotinib en 9 pacientes en los que FISH había sido negativo. En total, de los 47 pacientes, se tratan con crizotinib 28, no se poen tratamiento en 4 y en los 15 restantes, se desconoce este dato.	- Con F1, 47 (4,4%) pacientes presentaron reordenamientos ALK: 41 fusiones EML4-ALK. - Con FISH, de los 47 pacientes, se tienen datos de 31: 11 (35%) eran FISH negativos a reordenamientos ALK. - 9 pacientes de los 11 con FISH negativo recibieron crizotinib porque con F1 había dado resultado positivo a fusión ALK. 7 respondieron (RP: n=6, RC: n=1). Duración de la respuesta: 5-28 meses (mediana >17 meses). Dos no respondieron. - 2 pacientes no fueron tratados con crizotinib: uno no ha progresado, el otro se perdió su seguimiento. - 22 casos con reordenamientos ALK detectados por FISH también fueron detectados por F1. Todos fueron fusiones EML4-ALK. - De los 23 casos negativos con FISH, 22 también lo fueron con F1 y 1 caso fue un reordenamiento SOCS5-ALK. - Los autores recomendaron realizar estudio de F1 en todos los NSCLC avanzados para detección de reordenamientos ALK dado que FISH no resulta suficiente para identificar todos los casos implicando que estos pacientes que no son identificados por FISH reciban el tratamiento adecuado. A la vista de la respuesta a la terapia dirigida con crizotinib, insistieron en administrar este fármaco, no sólo a los pacientes con fusiones EML4-ALK sino también a aquellos con translocaciones no-EML4-ALK, como primera línea o tras QT.

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características de la población	Index test/ comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
DíBardino y cols ¹⁴ , 2016, EEUU.	Identificar dianas terapéuticas en las muestras tumorales.	Retrospectivo de una serie de casos. Unicéntrico. Muestras recogidas entre 2012-2014.	N=49 pacientes. Mujeres: n=30 (61%). Hombres: n=19 (39%). Edad mediana: 62,9 (rango: 42-93). Fumadores: n=35 (71,4%).	- FISH, PCR. - F1: en al menos 50 ng de DNA; se analizaron por captura de hibridación 3.320 exones de 236 genes relacionados con el cáncer y 47 intrones de 19 genes que con frecuencia presentan reordenamientos.	NSCLC. Adenocarcinoma: n=45 (92%) Escamosos: n=2 (4%) Sarcomatoides: n=1 (2%) Otros: n=1 (2%) Metástasis en 30 pacientes (61,2%).	No se menciona.	No se menciona.	<ul style="list-style-type: none"> - El test se pudo realizar bien en 41 casos; en 5 la muestra fue insuficiente y en 3 el test falló. - En total, 40 tumores pudieron ser analizados. Se detectaron 179 GAs, con una media de 4,37 por tumor y 63 eran CRGAs. De los 40 tumores, 30 tenían alguna CRGA y en estos 30 casos, todos tenían al menos 1 fármaco disponible aprobado por la FDA. De los otros 10 tumores, había 13 fármacos en fase I o III de ensayo clínico. - Las GAs más frecuentes fueron mutación en TP53, pérdida CDKN2A, amplificación MCL1 y amplificación RICTOR, en este orden. - Las CRGAs más frecuentes fueron mutaciones en EGFR, PIK3CA, KRAS y ERBB2. - En 25 muestras se detectaron alteraciones en ALK con FISH en 20 tumores y en los 25 mutaciones EGFR en exones 18-21 con PCR, mutación V600E en BRAF con PCR en 16 tumores y mutaciones KRAS con PCR en 22 tumores. - Comparando estos resultados con F1 sólo hubo 1 discrepancia: se detectó fusión EML4-ALK en un caso que no se detectó por FISH. - 7 de 49 pacientes (14,3%) los resultados de F1 contribuyeron a modificar el tratamiento: en 2 pacientes se suspendió el tratamiento que tenían y en 5 se instauró una nueva terapia.
Lim y cols ¹⁵ , 2016, Corea.	Realizan CGP a muestras de cáncer de pulmón previamente negativas a EGFR, KRAS y ALK, con el fin de identificar a los pacientes candidatos a terapia dirigida.	Estudio unicéntrico de una serie de casos. Entre 2013 y 2015.	N=51 pacientes. Mujeres: n=33. Hombres: n=18. Edad mediana: 58 años (rango, 29-77). No fumadores: n=39 (76%)	- Todos eran triples negativos con secuenciación convencional y/o FISH a EGFR/KRAS/ALK. - F1: secuenciación a cobertura mediana de 564x, en muestras con ≥20% núcleos tumorales y ≥50 ng de DNA. Secuenciador: Illumina HiSeq2500.	NSCLC. Adenocarcinomas: 100%. Estadio IV: n=25 (49%).	No se menciona.	- 7 pacientes con reordenamiento ROS 1 fueron tratados con certinib.	<ul style="list-style-type: none"> - Total de 190 GAs conocidas y 601 desconocidas. - Media de 3,7 GAs por paciente (rango, 0-10). - Sustituciones de bases no-sinónimas (50%, 80 de 190), indels (15%, 23 de 190), mutaciones (3%, 5 de 190), amplificaciones (20%, 39/190), genes de fusión (7%, 14/190) - Entre las primeras, las GAs más frecuentes fueron: TP53 (30%, n=24/80), KRAS (10%, n=8/80) y EGFR (10%, n=24/80). - En 8 pacientes negativos según las pruebas convencionales, F1 permitió detectar mutaciones EGFR y en otros 8, KRAS. - 17 pacientes (33%) presentaron GAs en la vía PI3K-AKT-mTOR. - En 16 pacientes (31%) se identificaron GA para los que hay terapia dirigida aprobada. Siete pacientes con reordenamiento ROS 1 recibieron certinib y 6 presentaron respuesta objetiva. - En 14 pacientes (27%) se encontraron otras GAs con fármacos utilizados en ensayos clínicos. - Valoración de la respuesta tumoral al tratamiento mediante RECIST v1.1.

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características de la población	Index test/ comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Rozenblum y cols ¹⁸ , 2016, Israel.	Estudiar el impacto de los resultados de las NGS en las decisiones terapéuticas y resultados clínicos de pacientes con adenocarcinoma de pulmón.	Estudio retrospectivo de una serie de pacientes consecutivos incluidos entre nov-2011 y oct-2015. Unicéntrico.	N=101 Mujeres: n=54 (53,5%) Hombres: n=47 (46,5%) Edad mediana 63 (rango, 20-84). No fumadores: n=45 (44,6%)	- RT-PCR para mutaciones EGFR, n=86 (85,2%). - IHC y/o FISH para reordenamientos ALK, n=72 (71,3%). - F1 en 82 (81,2%). - Guardant360 (ctDNA) si no había suficiente muestra de tejido tumoral, n= 19 (18,8%).	NSCLC avanzado (94%). Adenocarcinoma: n=86 (85,1%).	No se menciona.	12 pacientes con mutación EGFR fueron tratados con EGFR TKIs; otros 13 con crizotinib (7 por alteraciones ALK, 4 en MET y dos en ROS1). 5 pacientes con reordenamientos RET fueron tratados con cabozantinib y 1 con alectinib. 1 paciente con mutación V600E fue tratado con vemurafenib.	<ul style="list-style-type: none"> - 81 de 101 pacientes (80,2%) eran negativos a mutaciones EGFR y 71 de 101 (70,3%) negativos a reordenamientos ALK. - NGS antes de iniciar tratamiento en 52 pacientes (51,5%). - NGS después de fracaso del tratamiento en 49 pacientes (48,5%). - Tiempo mediano hasta obtener resultados de NGS fue de 13 días (rango, 8-460). - Tiempo mediano hasta empezar el tratamiento de 8 días desde que se reciben los resultados. - Al menos una GA interviniente con fármaco aprobado por la FDA en 73 pacientes (89,0%) de los 82 análisis con F1 y en 11 (67,9%) de los 19 análisis con Guardant360. En 23 pacientes (22,8%) se detectaron 2 GAs intervinientes y en 6 (5,9%) ≥3 GAs intervinientes. - NGS identificó GAs dianas en 50% de los pacientes: EGFR (18%), RET (9%), ALK (8%), MET (6%) y ERBB2 (5%). - En 15 pacientes (14,9%) con tests convencionales negativos a alteraciones EGFR/ALK, las NGS sí detectaron alteraciones. 12 fueron tratados y 8 (67%) alcanzó RC o RP. - En 4 pacientes con tests positivos a EGFR/ALK, las NGS detectaron alteraciones en otros genes diferentes. - La estrategia terapéutica fue modificada en 43 pacientes (42,6%). F1 modificó el tratamiento en 37 de 82 pacientes (45,1%) y G360 en 6 de 19 (31,6%). - La respuesta tumoral se mide con RECIST v.1.1. La tasa de respuesta global en estos pacientes fue del 65%; en 5 pacientes (14,7%) se alcanzó RC, en 17 (50%) PP, en 9 (26,5%) estabilización y en 3 (8,8%) progresión. - Se administró inmunoterapia a 33 pacientes (nivolumab a 20 y pembrolizumab a 13), la mayoría de ellos no presentaban drivers intervinientes (13 presentaban mutación KRAS), alcanzando una tasa de control de la enfermedad en 32%. Se encontró relación no significativa entre TMB y respuesta a la inmunoterapia frente a los pacientes con enfermedad estable o progresión.
Suh y cols ¹⁹ , 2016, China.	Estudiar la viabilidad y utilidad de perfil genómico completo en la práctica clínica.	Serie de casos consecutivos entre sept-2012 y mayo-2015.	N=6.832 pacientes. Edad mediana de 64 años (rango, 13-88). Mujeres: 53%	- F1: Secuenciación a una profundidad media de cobertura de 576x en Illumina HiSeq2000 o HiSeq2500. - No otros comparadores.	NSCLC avanzado. Tipo histológico: Adenocarcinoma: n=5.380 (79%). Otros carcinomas no microcíticos (NSCLC-NOS): n=1.345 (20%) Carcinoma adenoescamoso (ADSQ): 72 (1%) Carcinoma de células grandes (LCC): 35 (0,5%).	No se menciona.	No se especifica ni valora respuesta al tratamiento.	<ul style="list-style-type: none"> - Se observó una diferencia estadísticamente significativa (p<0,0001) entre los casos de adenocarcinomas (75%) y ADSQ (68%) con al menos una GA frente a los pacientes con NSCLC-NOS (57%) y LCC (37%). - En 5,4% de casos presentaron GAs que afectaban a más de un gen. - En 4.876 muestras (71%) se identificaron GA en los genes EGFR (1.324; 20%), ALK (280; 4,1%), BRAF (388; 5,7%), ERBB2 (408; 6,0%), MET (383; 5,6%), ROS1 (100; 1,5%), RET (166; 2,4%) o KRAS (2.178; 32%). En el 29% restante no se detectó ninguna GA. - De acuerdo a las guías CAP/IASLC/AMP y NCCN, el 15% de los casos fueron positivos para mutaciones puntuales e indels con conocida sensibilidad en EGFR, 3,9% para reordenamientos en ALK, 2,1% positivas para la mutación V600E en BRAF, 3,5% positivas para mutaciones e indels en ERBB2, 3,1% positivos para amplificaciones en MET, 2,8% positivas para mutaciones en MET, 1,3% para reordenamientos en ROS1 y 1,9% para reordenamientos en RET. - CGP identificó otras GAs potencialmente intervinientes que incluyeron 5,9% de casos con amplificaciones en EGFR, 3% con mutaciones en BRAF no V600E, 0,2% con reordenamiento en BRAF, 3% con amplificación en ERBB2, 3,2% con mutaciones resistentes EGFR T790M y 0,1% en mutaciones resistentes ALK. - En 1.339 casos de adenocarcinomas no se encontraron GAs en esos 5 genes sino que se detectaron otras GA que implicaban a oncogenes conocidos: NF1 (13%), PIK3CA (5,4%), NRAS (2,3%), MAP2K1 (1,2%) y HRAS (0,7%). Un total de 273 genes con GA (0,1% casos) muchas de las cuales se asocian a potenciales beneficios con una terapia dirigida o que permiten su inclusión en ensayos clínicos: STK11 (21%), MHC (9,6%), RICTOR (6,4%), CDK4 (4,3%), CCND1 (4,0%), BRCA2 (2,5%), BRCA1 (1,7%), NTRK1 (0,7%) y NTRK3 (0,2%).

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características de la población	Index test/ comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Drilon y cols ¹²¹ , 2015, EEUU.	Definir el potencial beneficio incremental de F1 al detectar GAs no diagnosticadas previamente en 11 genes (mutaciones EGFR, ERBB2, KRAS, NRAS, BRAF, MAP2K1, PIK3CA y AKT1, fusiones en ALK, ROS1, y RET) y susceptibles de terapia dirigida en pacientes no fumadores o fumadores ocasionales.	Serie de casos. Pacientes estudiados en un solo centro, entre 2006 y 2013.	N=31. Mujeres: n=18 (58%) Hombres: n=13 (42%) Edad mediana: 60 (rango, 29-78). No fumadores: n=22 (71%). ≤15 paquetes de cigarrillos al año: n=9 (29%). ECOG: 0-1. Otros tests moleculares negativos. Suficiente muestra para realizar NGS.	- F1 - Espectrometría de masas (Sequenom) para estudiar 91 mutaciones puntuales. - FISH para estudiar reordenamientos en ALK, ROS1 y RET.	Adenocarcinoma de pulmón. Estadio IIIb/IV o precoz pero sospecha radiológica de recurrencia no candidata a tratamiento local.	No se especifica.	Erlotinib al paciente con EGFR G719A. Crizotinib a los pacientes con las GAs SOCS5-ALK, HIP1-ALK y CD74-ROS1. Cabozantinib a los pacientes con KIF5B-RET (n=2) y CCDC6-RET.	- En 29 (94%) pacientes se encontró, al menos, 1 GA. En total, 96 GAs con una mediana de 3 GAs (rango, 0-7) por muestra. - Las GAs más frecuentes fueron TP53 (14%, n=13 de 96), EGFR (7%, n=7), MDM2 (5%, n=5), KRAS (4%, n=4), CDK4 (4%, n=4) y SETD2 (4%, n=4). - En 8 pacientes (26 %) se encontró GA con tratamiento dirigido aprobado. En estos 8 pacientes las alteraciones detectadas fueron: EGFR G719A, BRAF V600E, SOCS5-ALK, HIP1-ALK, CD74-ROS1, KIF5B-RET (n=2) y CCDC6-RET. De ellos, 6 recibieron tratamiento: 2 tuvieron RP; otros 2, EE (reducción tumoral <30%); otros 2 pendientes de evolución. Los otros 2 fallecieron antes de iniciar el tratamiento. - En 12 pacientes (39%) se encontraron GAs con tratamiento "off-label" o en investigación en ensayo clínico. - Por tanto, con F1 fue posible determinar la presencia de GAs intervinientes no detectadas con las pruebas convencionales en un 65% de los tumores de pacientes no fumadores o fumadores ocasionales.
Pekar-Zlotin y cols ¹¹⁷ , 2015, Israel.	Estudiar la capacidad diagnóstica de FISH e IHC, y NGS en los casos discordantes para detectar reordenamientos EML4-ALK. Consideran F1 como el gold standard.	Retrospectivo, transversal. Entre 2011 y 2013.	57 pacientes consecutivos. Sólo muestra suficiente en 51.	- FISH. - IHC. - F1. Secuenciador Illumina HSeq2000, lecturas pareadas con 49 pb, a una profundidad media de cobertura de 843x. Cortes de muestras FFPE de 10 µm.	NSCLC. Todos eran adenocarcinomas.	No se menciona.	De los 6 casos discordantes, sólo 2 pacientes recibieron crizotinib.	- De 51 pacientes, FISH-IHC fueron discordantes en 6, que se estudiaron con F1: -- 5 IHC positivo y FISH negativo: en 4 de ellos, F1 fue positivo para ALK. --1 paciente con FISH positivo e IHC negativo, fue negativo con F1. - Por tanto, incidencia de reordenamiento EML4-ALK del 13,7% y no del 7,8% como se hubiera considerado sin utilizar F1. - De los casos discordantes, dos pacientes tratados con crizotinib. Uno presentó RC, con PFS de 18 meses. El otro, enfermedad estable, con PFS de 6 meses.

CGP: perfil genómico completo, CRGA: Clinical relevant genomic alteration, ctDNA: DNA tumoral libre circulante, EA: eventos adversos, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group, F1: FoundationOne, FDA: Food and Drug Administration, FISH: hibridación *in situ* fluorescente, GA: alteración genómica, IHC: inmunohistoquímica, QT: quimioterapia, NSCLC: cáncer de pulmón no microcítico, NGS: secuenciación de nueva generación, RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, PD-L1: ligando de muerte programada 1, PFS: supervivencia libre de progresión, RC: respuesta completa, RP: respuesta parcial, TMB: carga mutacional tumoral.

Tabla 5. Estudios de F1 en pacientes con cáncer de mama.

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características población	Index test/ comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Chae y cols ²⁴ , 2017, EEUU.	Estudiar la concordancia de alteraciones genéticas detectadas por NGS en tejido tumoral y ctDNA.	Retrospectivo.	N= 45 pacientes. Mujeres: n=44 (97,8%) Hombres: n=1 (2,2%) Edad mediana: 55 años. Cáncer ductal: n=34 (75,6%). Cáncer inflamatorio de mama: n=34 (75,6%).	- F1: muestra de tejido tumoral. - G360: ctDNA. F1 se considera el <i>gold standard</i> en este estudio. Intervalo mediano entre la toma de las muestras de biopsia y sangre de 146 días.	Cáncer de mama. Estadio IV: n=31 (68,9%).	No se menciona.	No se indica.	<ul style="list-style-type: none"> - Estudiaron concordancia entre 45 y 67 genes comunes a ambas plataformas para cada paciente individual. - Concordancia de negativos: 91,0% incluyendo todos los genes estudiados, aunque cuando se estudian los genes con alteraciones en DNA detectadas con ambos tests, la concordancia de positivos total y parcial cae a 10,8%-15,1% y 13,8%-19,3%, respectivamente. - Concordancia excluyendo los genes no estudiados por G360: 94,2%. - 32,5% de alteraciones fueron sólo detectadas mediante ctDNA y 53,3% sólo en el estudio del tejido y no en ctDNA. - Número medio de alteraciones por paciente fue significativamente superior en el NGS tisular vs ctDNA: 4,56 (SD= 2,98) vs 2,16 (SD=2,31), P<0,0001; IC 95%: 1,28-3,52). - Se detectaron más mutaciones en el tejido: 38 de 45 pacientes (84,4%). - En concreto, para los genes <i>TP53</i>, <i>PIK3CA</i>, <i>ERBB2</i>, <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>, excluyendo las VUS, los valores globales de sensibilidad, especificidad valores predictivos positivo y negativo y exactitud diagnóstica fueron 35,7%, 95,0%, 71,4%, 80,9%, 79,6%, respectivamente, e índice J de Youden de 0,3. Incluyendo las VUS, los valores de estos mismos parámetros fueron similares. - En 2 pacientes se estudió la utilidad clínica del análisis ctDNA: en una paciente, se comprobó el cambio genético en respuesta al tratamiento; en la otra se comprobó una respuesta molecular compatible con la respuesta parcial observada mediante técnicas de imagen.
Nozad y cols ¹⁰ , 2017, EEUU.	Estudiar el perfil genómico de tumor filodes maligno para identificar GAs que orienten sobre posibles terapias dirigidas para este tipo de tumores.	Serie consecutiva de casos.	N=24 Mujeres: 100% Edad mediana: 54 años (rango, 14-70).	F1 o F1 Heme. Las muestras procedían de mama en 15 pacientes y de metástasis en 9 pacientes.	Tumor filodes maligno de mama.	No se menciona.	No se menciona.	<ul style="list-style-type: none"> - Se identificaron 136 GAs en 43 genes. - El número medio de GAs por muestra fue de 5,7 (rango 0-9) con al menos 1 GA identificada en 95,8% casos (23/24). - La carga tumoral mutacional (TMB) mediana fue de 2,7 mut./Mb. (rango de 0,8-7,5). Ningún caso presentó una TMB >10 mut./Mb. No diferencias entre TMB del tumor primario y metástasis. - 20/24 pacientes fueron evaluados para estatus microsatélites. Todos ellos mostraron patrón microsatélite estable. - Las alteraciones más frecuentes se encontraron en <i>TP53</i> (58,3%), <i>TERT-promoter</i> (57,9%), <i>NF1</i> (45,8%), <i>MED12</i> (45,8%), <i>CDKN2A/B</i> (33,3%) y <i>MLL2</i> (33,3%). - Se detectaron CNA en 62,5% (15/24); la más frecuente fue una delección homocigótica en <i>CDKN2A/B</i>. - Alteraciones en las vías de señalización del receptor de tirosina quinasa y <i>RAS/RAF</i> en 79,1% (19/24).

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características población	Index test/comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Parsons y cols ¹⁰ , 2017, EEUU.	Estudiar la viabilidad de obtener el perfil molecular tumoral en menos de 28 días con el fin de recomendar un tratamiento. También se investigó el uso de ctDNA para estudiar el perfil molecular tumoral bajo la hipótesis de que las muestras sanguíneas son una fuente de fácil acceso al DNA tumoral.	Estudio prospectivo en varias clínicas de la misma institución, entre sept-2013 y abril-2015.	N= 26 mujeres. Edad mediana de 55 (rango, 25-78). ECOG: 0-2.	- F1. De nueva biopsia de las metástasis sólidas. - IHC para receptores E, P y aromatasa, y HER2. - ctDNA de muestras de sangre.	Cáncer de mama triple negativo metastásico.	Todas habían recibido, al menos, 1 línea de QT previa. Número mediano de líneas de QT previas fue 1 (rango, 0-4). Número mediano de líneas de hormonoterapia previas fue 1,5 (rango, 1-2). Antraciclinas y taxanos en 16 pacientes; antraciclinas en 2; taxanos en 2 y otros en 2.	Bicalutamida (paciente con AR+). Carboplatino/inhibidor PARP (paciente con mutación BAP1). Trametanib (paciente con amplificación MAP2K1). Trastuzumab (paciente con mutación ERBB2).	- Se estudia la concordancia entre las GAs (sólo las mutaciones en los 27 genes estudiados en sangre) detectadas mediante NGS en muestras sólidas y de sangre. En 18 pacientes se pudo hacer análisis de tejido y ctDNA y 23 de 33 mutaciones (70%) fueron concordantes. En 5 pacientes se encontró discordancia de resultados. En 2 pacientes, ninguno de los tests detectó mutaciones. - 20 (77%) pacientes se pudo realizar correctamente el estudio NGS en muestras tisulares. De estos 20 pacientes, todos presentaban 1 GA al menos. Y en 24 se obtuvo suficiente muestra para ctDNA. - Tiempo desde obtención de muestra hasta envío a FM: 4 días (2-7) - Tiempo hasta tener informe de FM: 15,5 días (12-30). - Tiempo hasta que el comité emite su recomendación: 5 días (3-10). - Recomendación terapéutica en menos de 28 días en 12 pacientes (60%). - Mutaciones potencialmente intervenibles: 15. - Las GAs más frecuentes se dieron en los siguientes genes: TP53 (n=19; 35%), MYC (n=6; 11%), CCNE1 (n=5; 9%), MCL1 (n=5; 9%), NOTCH1 (n=4; 7%), FGFRT1 (n=3; 6%), MYST3 (n=3; 6%), PIK3CA (n=3; 6%), PTEN (n=3; 6%) y RB1 (n=3; 6%). - Terapia dirigida recomendada por el comité de tumores: 13. - 4 pacientes recibieron tratamiento. - La paciente con AR+ tratada con bicalutamida experimentó progresión de la enfermedad a las 2 semanas y se retiró el fármaco. - La paciente tratada con carboplatino/inhibidor PARP presentó enfermedad estable tras dos ciclos y progresión tras 4 ciclos. - La paciente tratada con trametanib progresó tras varias semanas de tratamiento. - La paciente tratada con trastuzumab progresó después de 10 meses de tratamiento. Luego recibió capecitabina y mantuvo enfermedad estable durante 9 meses.
Yuan y cols ²³ , 2017, EEUU.	Se presentan los resultados y el impacto clínico del uso de NGS en pacientes con cáncer de mama metastásico, estudiadas entre enero de 2014 y mayo de 2016.	Serie de casos. Estudio retrospectivo.	N=44 Mujeres: 100%. Edad mediana en el momento de realizar la NGS: 54,5 (rango: 34-78 años).	- F1: muestras tumorales de biopsias tomadas en diferentes órganos (14 mama, 9 nódulo linfático, 6 piel, 4 hígado, 2 pulmón, 2 hueso, 2 cerebro, 1 pared torácica, 1 tejido blanco, 1 glándula adrenal y 1 otro), con la plataforma Illumina HiSeq2000. -No otro comparador.	Cáncer de mama con metástasis. Triple negativo (n=24), ER+ (n=16) y HER2+ (n=4).	Varios tratamientos: mediana de 3 (rango, 0-13). Más de 3 líneas de tratamiento en 23 pacientes.	- Everolimus a 5 pacientes por mutaciones en PIK3CA o TSC1. - Pazopanib a 2 pacientes por amplificación FGFR.	- Mutaciones intervenibles en 42 pacientes (95%). - Las GAs más frecuentes fueron mutaciones TP53 (68%), mutación o amplificación PIK3CA (41%), amplificación MYC (27%), pérdida PTEN (23%), otras en <20% de pacientes. - Recibieron tratamiento dirigido: 23 de las 42 (52%). - Respuesta evaluable en 16 de las 23 (70%) (duración >6 semanas). Se valoró respuesta según cambios en CT, gammagrafía ósea o valoración clínica, pero no según RECIST. - En 7 pacientes se describió beneficio clínico, de 8 a 34 semanas: 3 pacientes tratadas con everolimus presentaron respuesta de más de 32 semanas; en 8 se observó progresión. - 1 paciente suspendió el tratamiento con pazopanib por elevación de enzimas hepáticas. - No evaluables: 7 pacientes (30%) por tiempo muy corto de tratamiento (<2 semanas). - No recibieron tratamiento dirigido 19 (45%); 7 recibieron tratamiento paliativo, 5 QT convencional, 4 agotaron todas las opciones y 3 declinaron la terapia dirigida. - En total, 14 pacientes de las 42 (33%) pasaron a tratamiento paliativo en los 2 siguientes meses del resultado del test.

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características población	Index test/comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Hortobagyi y cols ¹⁴ , 2016, EEUU.	Explorar con NGS el perfil genético de tumores de pacientes incluídas en el ensayo clínico BOLERO-2 para identificar correlaciones potenciales entre alteraciones genéticas y la eficacia del tratamiento con everolimus.	Ensayo clínico controlado y aleatorizado. Grupos everolimus + exemestane vs placebo + exemestane.	N=724. Subgrupo análisis NGS: n=302 (42%). 244 con muestras de tumor primario (81%), 57 metástasis y 1 muestra de origen desconocido. 209 pacientes en el grupo de everolimus y 93 en grupo placebo.	F1	Cáncer de mama avanzado, HR+ y HER2 negativo.	No se menciona.	Everolimus.	<ul style="list-style-type: none"> - Los genes afectados con más frecuencia fueron: <i>PIK3CA</i> (47,6%), <i>CND1</i> (31,3%), <i>TP53</i> (23,3%) Y <i>FGFR1</i> (18,1%). - Se encontraron similares perfiles genómicos en las muestras del tumor primario y metastásicas. - Las pacientes con mutaciones <i>mTOR</i> parecen presentar mejores resultados al tratamiento con everolimus. - La presencia de mutaciones en exón 9 de <i>PIK3CA</i> se asoció a mayor beneficio clínico del everolimus que las mutaciones en el exón 20. Casi se produjo el doble de efecto antiproliferativo en las pacientes con mutación en exón 9. - El beneficio del everolimus fue similar entre pacientes con y sin amplificaciones <i>FGFR1</i> (mediana de PFS de 4 meses en ambos casos). - En 7 pacientes con mutación <i>FGFR2</i> se encontró una mediana de PFS, tras everolimus, de 2,7 meses significativamente menor que la mediana de 7 meses de PFS de los que no presentaban dicha mutación. - La amplificación <i>CND1</i> o GAs en los genes de control del ciclo celular no se asociaron a ningún beneficio en PFS tras tratamiento con everolimus.
Patel y cols ¹⁵ , 2016, EEUU.	Estudiar si diferentes herramientas web identifican opciones terapéuticas similares para un conjunto dado de GAs detectadas en biopsias tumorales y si estas opciones concuerdan con las recomendadas por F1 con el que se realizó el estudio de perfil genómico.	Prospectivo, unicéntrico de pacientes incluídas en un ensayo clínico reutilizadas en jun-2013 y jun-2015.	N=75 pacientes.	- F1. - 4 herramientas web diseñadas para ajustar fármacos dirigidos a las dianas terapéuticas identificadas: Drug-Gene Interaction Database (DGIdb), My Cancer Genome (MCG), Personalized Cancer Therapy (PCT), cBioPortal (cBio). Muestras de metástasis.	Cáncer de mama metastásico.	No se menciona.	Varios.	<ul style="list-style-type: none"> - Número mediano de genes mutados por muestra: 5 (rango, 2-18). - Los genes más frecuentemente afectados fueron: <i>TP53</i> (49%) y <i>PIK3CA</i> (40%). - 43 genes (42%) tenían al menos un fármaco aprobado por la FDA recomendado por al menos una herramienta. - La herramienta web que identificó más fármacos fue DGIdb (para 36 genes) seguida de F1 (para 31 genes), cBioPortal (para 25 genes), MCG (para 10 genes) y PCT (para 9 genes). - Los fármacos más recomendados fueron temsirolimus (para GAs en 15 genes), everolimus (para GAs en 14 genes) y regorafenib (para GAs en 10 genes). - Sólo para alteraciones en los genes <i>Kit</i> y <i>FLT3</i> las 5 herramientas web recomendaron el mismo fármaco. - Para los genes <i>BRAF</i>, <i>GFFR1</i> y <i>FGFR2</i> las 5 herramientas recomendaron fármacos pero estas recomendaciones fueron parcialmente discordantes. - Para 7 genes, 4 herramientas web recomendaron el mismo fármaco; para otros 11 genes, sólo coincidieron 3 herramientas web en al menos una recomendación terapéutica; y para 12 genes, sólo coincidieron 2 herramientas en recomendar el mismo fármaco. - En el 33% de los casos existe acuerdo entre 4 o más de las herramientas para recomendar un fármaco para al menos una mutación y en 72% de los casos existió concordancia entre 2 o más herramientas para recomendar entrar en un ensayo clínico. - Por tanto, sólo existe concordancia parcial en las opciones terapéuticas recomendadas para las mismas GAs identificadas entre las herramientas web y F1.
Ross y cols ¹⁶ , 2016, EEUU.	Estudiar si el CGP realizado con una NGS puede sugerir un tratamiento dirigido.	Serie de casos.	N=22. Mujeres: 100%. Edad mediana de 57 años (rango, 32-79).	- F1 sobre muestras con 20% contenido nuclear tumoral, 50 ng DNA extraído de muestras FFPE de 40 micras. Profundidad media de secuenciación de 564x. Muestras de tumor primario (n=11) y de tumor recurrente o metástasis (n=11). - IHC y/o FISH para estudio de ER, PR y HER2.	Carcinoma de mama mucinoso recurrente metastásico, estadio IV (100%). ER+: n=21 (96%) PR+: n=19 (86%) HER2+: n=3 (14%).	No se mencionan.	No se menciona si se administró alguna terapia dirigida a las pacientes con CRGA ni se hace mención a la respuesta.	<ul style="list-style-type: none"> - 132 GAs (6 GA por tumor), de las cuales 53 eran clínicamente relevantes (CRGA), con una media de 2,3 CRGA por tumor. - Las GAs más frecuentes fueron: amplificación <i>FGFR1</i> (36%), mutación <i>TP53</i> (32%), amplificación <i>CND1</i> y <i>FGF3/4/19</i> (27%), mutación <i>PIK3CA</i> (23%) y <i>MYST3</i> (23%), amplificación y/o mutación <i>ERBB2</i> (23%). - La amplificación <i>ERBB2</i> se detectó en 5 pacientes mediante F1 y sólo 3 mediante IHC/FISH. Esta GA se presentó con una frecuencia significativamente superior en los tumores recurrentes en comparación a los primarios (p=0,03).

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características población	Index test/comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Ross y cols ¹⁰ , 2016, EEUU.	Determinar la prevalencia de mutaciones <i>ERBB2</i> como diana terapéutica en cáncer de mama metastásico e identificar GAs asociadas al cáncer de mama metastásico clínicamente avanzado.	Serie de casos consecutivos.	N= 5.605 De las 138 mujeres con mutaciones en <i>ERBB2</i> , la mediana de edad fue de 59,6 años (29-93).	- F1.	Cáncer de mama metastásico clínicamente avanzado.	No se mencionan.	Varios anti-HER2.	- 697 casos (12,5%) presentaban alteraciones en <i>ERBB2</i> : 596 (10,6%) amplificaciones y 138 (2,4%) mutaciones. En 38 pacientes (0,7%) se daban las dos. - Los genes más frecuentemente alterados junto con las mutaciones <i>ERBB2</i> fueron: <i>TP53</i> (49%), <i>PIK3CA</i> (42%), <i>CDH1</i> (37%), <i>MYC</i> (17%) y <i>CCND1</i> (16%). - Una paciente con mutación L755S <i>ERBB2</i> respondió a neratinib. - Paciente con mutación S310F respondió a trastuzumab, pertuzumab y fulvestrant. - Paciente con mutación V777L y S310F respondió a terapia anti-HER2 combinada con QT.
Niu y cols, 2015 ⁹ , EEUU.	Estudiar la incidencia y la implicación clínica de la mutación en <i>ESR1</i> en pacientes con tumores de mama tratados avanzados.	Estudio retrospectivo de pacientes incluidos entre nov-2012 y nov-2014 en 5 centros hospitalarios.	Cohorte de 341 pacientes. Sólo se detectó la mutación en <i>ESR1</i> en 28. De estos 28, la edad mediana fue de 55,5 años (rango, 34-75).	- F1: muestras de recurrencia (n=3) y de metástasis (n=25). - IHC en todas las muestras para estudiar ER, PR y HER2. - FISH para HER2.	Cáncer de mama avanzado.	De media, habían recibido al menos 2 líneas de QT con citotóxicos y 3 líneas de tratamiento hormonal adyuvante. Todos habían recibido al menos una línea con un inhibidor de aromatasas (AI).	- Fulvestrant en 5 de 13. - Tamoxifeno a 1 paciente. - Exemestane y everolimus a 5 pacientes.	- F1 detectó una mutación en <i>ESR1</i> en 28 pacientes. Se detectó en 27 pacientes de 217 ER+ (27/217=12,45%), en 24 pacientes de 177 PR+ (24/177=13,56%). En total, la mutación en <i>ESR1</i> se daba en 12,1% de HR+. Se detectó esta mutación en 2 de 30 pacientes ER+ y HER2+ (6,7%) y sólo en 1 paciente triple negativo (1/119=0,8%). - La mutación en <i>ESR1</i> más frecuente fue Y537 (17/28=60,7%) seguida de la mutación D538 (9/28=32,1%). - 19 pacientes (67,9%) presentaban 3 o más GAs; 7 (25%) presentaban 1 o 2 GAs, y 2 (7%) sólo la mutación en <i>ESR1</i> . - Las GAs más frecuentes implicaban a los genes <i>PIK3CA</i> (35,7%), <i>GATA3</i> (21,43%), <i>CCND1</i> (17,86%), <i>FGF</i> (17,86%) y <i>FGFR1</i> (17,86%). - Valoración del tratamiento: se excluyen 15 pacientes por recibir QT. - De los 13 restantes, 3 recibieron fulvestran inmediatamente antes de F1 y 2 después de F1. De ellos, 1 paciente logró EE durante 8 meses y 4 PE. Por tanto, beneficio clínico en 25% (1/5). - 1 paciente recibió tamoxifeno. No respondió al tratamiento. - 3/3 pacientes tratados antes de F1 y 2/4 después de F1 tratados con exemestane y everolimus lograron EE al menos durante 6 meses.
Parker y cols ¹² , 2015, EEUU.	Presentar la experiencia de un comité para el estudio molecular de tumores centrado en pacientes individuales con cáncer de mama avanzado.	Serie de casos estudiados por un equipo multidisciplinar.	N=43 Edad media de 59 años DE: 11 (IC 95%: 55,71-62,29).	- F1. Se indicó para establecer tratamiento tras progresión. Muestra de tumor mamario: n=13 (30%) y de las metástasis: 30 (70%). - No comparador.	Cáncer de mama avanzado. HR+, HER2 negativos: n=23 (54%). Triples negativos: n=10 (23%). Triples positivos: n=7 (16%). HR negativos y HER2+: n=3 (7%).	Mediana de 3 (rango, 1-13) tratamientos previos.	A 17 pacientes se les administró terapia dirigida de acuerdo a las consideraciones del Comité.	- 40/43 (93%) presentaban al menos 1 GA intervenible. Media de 4,79 GA por paciente, rango de 1-14. - Tiempo medio desde la solicitud a resultados del test de 27 días (mediana de 11 para la adquisición y de 14 para el procesamiento diagnóstico). - Sólo 2 pacientes presentaron el mismo perfil molecular. - 73 genes presentaron alteraciones. Se detectaron 119 GAs diferentes. - Las GAs más frecuentes fueron mutaciones <i>TP53</i> (n=20; 46%), amplificaciones <i>MYC</i> (n=11; 25%), mutaciones o amplificaciones <i>ERBB2</i> (n=10; 23%), mutación <i>GATA3</i> (n=10; 23%), amplificación <i>CCND1</i> (n=8; 18%), mutaciones o amplificaciones <i>PIK3CA</i> (n=8; 18%), amplificación <i>FGFR1</i> (n=6; 13%), amplificación <i>FGF4</i> (n=6; 13%), amplificación <i>ZNF217</i> (n=6; 13%), amplificación <i>FGF3</i> (n=6; 13%), amplificación <i>FGF19</i> (n=6; 13%). - 17 de 43 pacientes (40%) fueron tratados de acuerdo a la opinión del comité basándose en el resultado de F1. - 7 pacientes (16% de 43) alcanzaron enfermedad estable durante al menos 6 meses (n=2) o remisión parcial (n=5) con PFS de 4, 7, 7, 8 y 9 meses, respectivamente. - La principal causa de no recibir el tratamiento dirigido fue la falta de acceso al mismo.

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características población	Index test/ comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Ross y cols ¹⁹² , 2015, EEUU.	Identificar potenciales terapias dirigidas para pacientes con cáncer inflamatorio recurrente.	Estudio retrospectivo de una serie de casos, consecutivos.	N=53 pacientes. 100% mujeres. Edad mediana 53,7 (rango, 33-82) años.	- F1: muestras FFPE de tejido tumoral primario o metastásico. -IHC y/o FISH.	Cáncer de mama inflamatorio, estadio avanzado (III o IV). HER2+: 13/52 (25%). Triple negativo: n=19/44 (39%).	No se menciona.	No se menciona.	- Un total de 266 GAs, media de 5 GAs por paciente. En 51 tumores (86%) tenían al menos una GA clínicamente relevante. - Los genes con más alteraciones fueron: <i>TP53</i> (62%), <i>MYC</i> (32%), <i>PIK3CA</i> (28%), <i>ERBB2</i> (26 %), <i>FGFR1</i> (17 %), <i>BRCA2</i> (15 %) y <i>PTEN</i> (15 %). - Las vías genómicas más afectadas por las GAs fueron: vía del ciclo celular y apoptosis (87%), vía <i>PI3K</i> (56%) y vía <i>RTK/RAS</i> (49%). - En 1 paciente: concordancia 100% entre la amplificación de <i>ERBB2</i> detectada por NGS y <i>HER2</i> determinado por IHC y/o FISH.
Ross y cols ¹⁹¹ , 2015, EEUU.	Estudiar potenciales terapias para pacientes con carcinoma metaplásico de mama.	Serie de casos.	N=20 Edad mediana=62 años (rango, 42-86)	- F1 - IHC y FISH para determinar los receptores estrógenos y progesterona, y <i>HER2</i> .	Carcinoma metaplásico de mama, avanzado. 87% eran triple negativos; 13% eran ER+ o PR+. De 16 (80%) se disponían de resultados sobre el estatus <i>HER2</i> : el 100% era <i>HER2</i> negativas.	QT, pero no se concreta nada más.	Posibles tratamientos dirigidos pero no se especifica cuáles administran ni la respuesta a los mismos.	- F1 identificó 93 GAs. Al menos 1 GA, media de 4,65 (SD=2,08) por tumor. - Las GAs más frecuentes se encontraron en <i>TP53</i> (n=15; 75%), <i>MYC</i> (n=6; 30%), <i>MLL2</i> (n=6; 30%) y <i>KDM6A</i> (n=2; 10%). - 19 (95%) presentaban 36 GA potencialmente dianas de terapia dirigida (media de 1,8; SD=1,08, por tumor). - Las pacientes <i>HER2</i> negativas con IHC eran negativas a la amplificación <i>ERBB2</i> .
Merc-Bernstam y cols ¹⁹³ , 2014, EEUU.	Comparar mediante NGS el perfil genómico en los tumores primarios y en los recurrentes de pacientes con cáncer de mama.	Estudio retrospectivo de una cohorte de pacientes de las que se disponía de muestras tanto del tumor primario como de la recurrencia.	N=43 pacientes. 74 tumores: 36 primarios y 38 recurrencias/metástasis. Edad mediana de 48 años (rango, 30-83).	- F1. - IHC para determinar los niveles de expresión de ER, PR y <i>HER2</i> . - FISH para determinar el número de copias de <i>HER2</i> si en IHC daba un score 2+ o si valores discordantes en el mismo paciente entre tumor primario y recurrente/metastásico.	Cáncer de mama. I: n=3 II: n=22 III: 17 IV: n=1 HR+: n=50 HER2+: n=16 Triple negativos: n=8.	QT adyuvante: n=36 Tamoxifeno: n=34 Letrozole: n=2 Ninguna paciente recibió terapia dirigida anti- <i>HER2</i> .	No se menciona.	- Mediana de tiempo libre de enfermedad fue de 39 meses desde el diagnóstico y 36,5 meses desde la cirugía. - Se identificaron alteraciones en 55 genes. En cada muestra se detectó al menos una alteración. Media de 3,95 GAs por muestra (rango, 1-12). - Se identificaron mutaciones en numerosos genes como <i>PIK3CA</i> , <i>TP53</i> , <i>ARID1A</i> , <i>PTEN</i> , <i>AKT1</i> , <i>NF1</i> , <i>FBXW7</i> y <i>FGFR3</i> , y amplificaciones (>6 copias) en <i>MCL1</i> , <i>CCND1</i> , <i>FGFR1</i> , <i>MYC</i> , <i>IGF1R</i> , <i>MDM2</i> , <i>MDM4</i> , <i>AKT3</i> , <i>CDK4</i> y <i>AKT2</i> . - Alteraciones en <i>TP53</i> se detectaron en el 87,5% de los triples negativos, en 68,8% de los <i>HER2+</i> y 18,2% de los <i>HR+</i> . Esta diferencia según subtipo fue significativa (p=0,0028). - Amplificaciones en <i>HER2</i> en 12 (30%) muestras. - En 33 tumores primarios y recurrentes emparejados, 97 de 112 (86,6%) mutaciones somáticas fueron concordantes. - 40 pacientes (93%) presentaron alteraciones intervenibles. Y la mayoría se conservaron entre el tumor primario y la recurrencia/metástasis.
Vasan y cols ¹⁹¹ , 2014, EEUU.	Estudiar la frecuencia de GAs potencialmente intervenibles en cáncer de mama que puedan ser dianas de fármacos aprobados o en investigación en ensayos clínicos.	Serie de casos.	N=51 Edad media de 52 años (rango, 28-86).	- F1. Muestras de DNA recogidas de forma prospectiva. - No comparador.	Cáncer de mama. Estadios: I: n= 1 II: n=17 III: n= 15 IV: n=18 ER+: 58% HER2+: 20% Triple negativos: 31%	En los metastásicos, al menos 2 líneas de tratamiento previo. Recibieron una media de 7 fármacos diferentes (rango, 5-17).	No lo especifican.	- Se detectaron 158 GAs en 55 genes de 48/51 (94%) de tumores. Media de 3,1 GAs por tumor (rango, 0-9). - En 39 (76%) tumores se identificaron numerosas GAs mientras que sólo 9 (18%) tumores presentaron una sola GA y 3 (6%) no presentaron ninguna GA. No se encontraron diferencias significativas entre la media de GAs por tumor primario (2,9) y en los tumores metastásicos hipertratados (3,4), p=0,31. - Las GAs fueron 45 (15%) sustituciones de bases, 24 (28%) indels, 63 (40%) amplificaciones focales, 18 (11%) deleciones homocigóticas y 8 (5%) reordenamientos. - El 84% de las muestras presentaba al menos 1 GA intervenible. - Número medio de GAs potencialmente intervenibles fue similar en el tumor primario (1,6; rango, 0-4) y en los metastásicos hipertratados (2,0; rango, 0-4), p=0,24. - Las GAs intervenibles más frecuentes se dieron en los genes: <i>PIK3CA</i> (n=9, 18%), <i>HER2</i> (n=9, 18%), <i>NF1</i> (n=7, 14%), <i>MCL1</i> (n=6, 12%) y <i>PTEN</i> (n=5, 10%). Otros 25 genes con alteraciones intervenibles se identificaron a una frecuencia menor (<10%). - Tiempo hasta recibir el informe de F1 fue de 7-14 días.

Autor, año, país	Objetivo	Tipo estudio	Muestra, características población	Index test/comparador	Tumor, estadio	Tto. previo	Tto. dirigido F1	Resultados
Wheler y cols ¹⁹⁷ , 2014, EEUU.	Estudiar el perfil genómico de pacientes con cáncer de mama metastásico para buscar el tratamiento óptimo que se ajuste al perfil molecular de cada paciente.	Serie de casos consecutivos.	N=57 Mujeres: 100%.	- F1. Secuenciador Illumina HiSeq 2000. - No comparador.	Cáncer de mama metastásico. HR+ y HER2-: n=26 HR+ y HER2+: n=7 HR- y HER2+: n=4 Triple negativos: n=20.	No se menciona.	Mencionan fármacos dirigidos pero no que los administran a las pacientes ni estudian la respuesta a los mismos.	- Ninguna paciente presentaba el mismo patrón molecular. - Se identificaron 131 GAs somáticas. - Número medio de GAs por paciente fue de 4. - La mayoría de las GAs eran intervinientes. - Los genes más frecuentemente alterados fueron: TP53 (n=30, 13.9%), PIK3CA (n=25; 11.6%), CCNDA (n=12; 5.6%), MYC (n=12; 5.6%), HER2/ERBB2 (n=11; 5.1%), MCL1 (n=7; 3.2%), PTEN (n=7; 3.2%), FGFR1 (n=6; 2.8%), GATA3 (n=5; 2.3%), NF1 (n=5; 2.3%), PIK3R1 (n=5; 2.3%), BRCA2 (n=4; 1.9%), EGFR (n=4; 1.9%) y IRS2 (n=4; 1.9%). - Las GAs más frecuentes fueron mutaciones (46%) y amplificaciones (45%). Entre las 80 mutaciones diferentes identificadas, 49 no se habían descrito en TCGA ni COSMIC en pacientes con cáncer de mama. Todas las amplificaciones habían sido encontradas anteriormente en pacientes con este tumor.
Balko y cols ²⁰⁸ , 2013, EEUU.	Estudiar perfil molecular de pacientes con cáncer de mama residual triple negativo tras tratamiento con quimioterapia neoadyuvante.	Serie de casos.	N=111 aunque F1 se realiza en sólo en 74. Edad mediana de 48 años (rango, 24-78). Premenopáusicas: n=55 (50%) Ganglios positivos: n=70 (63%)	- IHC determinó que eran triples negativos. - FISH para estudiar HER2 en casos dudosos o discrepantes. - F1.	Cáncer de mama. IIa: n=3 (3%) IIb: n=5 (5%) IIIa: n=13 (12%) IIIb: n=77 (69%) IIIc: n=10 (9%) Triples negativos: 100%.	QT Taxanos: n=55 (50%)	No se menciona.	- 81/85 muestras fueron analizadas con F1. - 74 muestras mostraron datos evaluables. - Se identificaron alteraciones en el gen TP53 en el 89% de las muestras. Los otros genes con alteraciones más frecuentes fueron MCL1 (54%) y MYC (35%). - En esta cohorte de pacientes ya tratadas se detectó un porcentaje mayor de alteraciones PTEN, amplificaciones JAK2, CDK6, CCND1, CCND2, CCND3 y de IGF1R del descrito en TCGA para cáncer de mama. - CNAs en familia AKT y CCND asociadas a resistencia a QT. También truncamientos y mutaciones TSC1. Estas alteraciones son sensibles a everolimus. - Amplificaciones JAK2 y amplificaciones MYC predecían pobre supervivencia global mientras que alteraciones PTEN se relacionaron con pronóstico favorable. - Los inhibidores MEK podrían tener un papel terapéutico en pacientes con amplificaciones MYC. - Los autores aconsejan realizar estudio molecular en todas las pacientes resistentes a QT.
Ross y cols ¹⁹⁴ , 2013, EEUU.	Estudiar si F1 permite detectar dianas terapéuticas nuevas en pacientes con carcinoma lobular invasivo con mutación en CDH1 recidivante o metastásico o resistente a tratamiento.	Serie de casos.	N=22 Edad media de 56 años (rango, 44-74).	- F1. Muestras del tumor primario: n=9 y de metástasis: n=13. - IHC para ER, PR y HER2. - FISH para HER2.	Carcinoma lobular invasivo con mutación en CDH1. Grado 1: n=1 (5%) Grado 2: n=16 (73%) Grado 3: n=5 (23%) Estadio III: n=6 (27%) Estadio IV: n=16 (73%). ER+: 88%, PR+: 61% HER2: 5%	No se mencionan.	No se mencionan.	- Se detectaron 75 GAs en los 22 tumores. Media de GAs por tumor: 3.4. - 35 GAs intervinientes. Media de GAs intervinientes por paciente de 1,59 (rango, 0-3). - 19 de 22 (86%) presentaban al menos 1 GA interviniente asociada a terapia dirigida que había demostrado beneficio clínico. - Todas las pacientes presentaban alteraciones en CDH1 y todas estas GA eran diferentes, no se repetía el patrón de secuencia de la GA en ninguna paciente. - Las mutaciones más frecuentes se encontraron en PIK3CA (n=8, 36%), TP53 (n=6, 27%), RB1 (n=2; 9%), KRAS (n=2; 9%), AKT1 (n=2; 9%) y ERBB4 (n=1; 5%). - La mutación en PIK3CA se daba con más frecuencia en el tumor primario que en el metastásico mientras que la mutación TP53 se dio más en las metástasis. - Entre las CNAs se detectaron en CCND1 (n=6; 27%), FGFR1 (n=3; 14%), MYC (n=2; 9%) y ESR1 (n=1; 5%). - En 6 pacientes (27%) se encontraron alteraciones en ERBB2 (en 4, mutaciones; en 1, amplificación; en 1, genes de fusión). Es una proporción superior a la habitualmente descrita en cáncer de mama. Podría ayudar a seleccionar la terapia dirigida.

AI: inhibidor de aromatasas, CGP: perfil genómico completo, CNA: alteraciones en el número de copias, CRGA: Clinical relevant genomic alteration, CT: tomografía computerizada, ctDNA: DNA tumoral libre circulante, EE: enfermedad estable, ER: receptores de estrógenos, F1: *FoundationOne*, FFPE: Fijado en formalina e incluido en parafina FISH: hibridación *in situ* fluorescente, G360: Guardant 360, GA: alteración genómica, HR: receptores hormonales, IHC: inmunohistoquímica, QT: quimioterapia, NGS: secuenciación de nueva generación, RP: respuesta parcial, VUS: variantes de significado desconocido.

Tabla 6. Estudios de F1 en pacientes con melanoma.

Autor, año, país	Objetivo	Tipo de estudio	Muestra, características población	Index test/ comparador	Tumor, estadio	Tto. Previo	Tto. Dirigido F1	Resultados
Carlson y cols ¹⁰⁰ , 2017, EEUU.	Se utiliza F1 para realizar CGP e identificar las GAs que puedan influir en el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico.	Serie de casos.	N=30. Edad mediana de 56 años (media de 60 y rango, 41-83). Hombres: n=17 (57%) Mujeres: n=13 (43%)	F1. Illumina HiSeq 2000 a una profundidad media de cobertura de 776x.	Melanoma en estadio IV. Varios tipos histológicos.	No se menciona.	No se menciona.	<ul style="list-style-type: none"> - Todos tenían al menos 1 GA. Se detectaron 83 GAs, mediana de 2,5 GAs por muestra (rango, 1-7). - Las GAs más frecuentes fueron sustituciones (54/83; 65%), ampliaciones (17/83; 20%), pérdidas del gen completo o de exones (11/83; 13%). - Número significativamente superior de GAs en los melanomas pobremente diferenciados y en los anaplásicos. - Mutación BRAF significativamente más frecuente en el fenotipo nevoide (100% vs 32%, p=0,02) - Las principales vías de señalización afectadas fueron MAPK (77%), PTEN-P13K-AKT (50%) y p16INH4a-CCND1-CDK4-RB1 (43%). - Todos tenían, al menos, 1 GA clínicamente relevante (CRGAs). Se identificaron 64 CRGAs (77%; 64/83). Mediana de 2 CRGAs por tumor (media de 2,1; rango: 1-7). - 29% (24/83) muestras presentaron GAs intervenibles. - Gracias a F1 se identifican más CRGAs lo que supondría una influencia en la selección del tratamiento.
Johnson y cols ¹⁰⁵ , 2016, EEUU.	Estudiar el valor predictivo de la TMB detectada por F1 de respuesta a la inmunoterapia.	Estudio retrospectivo sobre muestras almacenadas. Entre enero-2011 y marzo-2015.	N=65.	F1 sobre muestras de biopsia o resección.	Melanoma metastásico.	Mediana de líneas de tratamiento previas de 1.	Anti-PD-1 (nivolumab y pembrolizumab) o Anti-PD-L1 (atezolizumab).	<ul style="list-style-type: none"> - La mediana de TMB fue diferente entre grupos según la mutación driver: BRAF/NRAS/NF1 y triple wild-type (12,0 vs 17,6 vs 62,7 vs 2,2 mut/Mb; p<0,001). - GAs en NF1 fueron más frecuentes entre respondedores (50% vs 21%; p=0,015) mientras que el triple wild-type fue más frecuente en los no-respondedores (13% vs 35%; 0=0,045). - Los melanomas con mutaciones BRCA2 presentaron mayor TMB (mediana de 68,2 vs 15,9; p=0,028). - TMB significativamente mayor en los respondedores a anti-PD-1/PD-L1 (mediana de 45,6 vs 3,9 mut/Mb; p=0,003). - Se calculan los cutoffs para clasificar a los pacientes en tres grupos según la probabilidad de respuesta al tratamiento: alta TMB (>23,1 mut/Mb), intermedia (3,3-23,1 mut/Mb) y baja (<3,3 mut/Mb). - Tasa de respuesta objetiva mayor en los de alta TMB en comparación a los de intermedia y baja (85% vs 29% vs 14%; p<0,001). - PFS y supervivencia global superiores de forma significativa en el grupo de alta TMB.
Wheler y cols ¹⁰⁹ , 2015, EEUU.	Estudio piloto para investigar pacientes con melanoma avanzado que responden a inhibidores BRAF y/o MEK.	Análisis retrospectivo de una serie consecutiva de pacientes y que tras inhibidores BRAF y/o MEK alcanzan RP o RC. Se inicia el estudio en julio de 2010.	N=10. Edad mediana de 52 años (rango, 23-60). Hombres: n=7 (70%). Mujeres: n=3 (30%). EOOG=0: n=5 EOOG=1: n=5.	<ul style="list-style-type: none"> - PCR para detectar alteraciones BRAF. Cuando fue posible, se estudiaron también KRAS, NRAS, PIK3CA y TP53. - IHC para estudiar deleciones PTEN. - F1, profundidad media de cobertura de 734x con >99% de bases cubiertas a >100x. 	Melanoma avanzado con mutación BRAF en los que ha fracasado el tratamiento estándar, y posterior respuesta parcial o completa a inhibidores BRAF y/o MEK.	Mediana de 2 tratamientos previos (rango, 0-5).	Inhibidores BRAF a 7 pacientes. Inhibidores MEK a 1 paciente. Inhibidores BRAF y MEK a 2 pacientes.	<ul style="list-style-type: none"> - Todos los pacientes tenían la mutación BRAF V600E pero también se constató que la mayoría de pacientes presentaba múltiples GAs. Estas GAs podían ser responsables de la resistencia al tratamiento con inhibidores BRAF/MEK. - 7 (70%) tenían alteraciones somáticas de significado conocido además de la mutación BRAF. - 7 (70%) tenían alteraciones somáticas de significado incierto. - Evaluación radiológica de la respuesta por CT y/o PET aplicando criterios RECIST v1.0 o v1.1: RC en 4 (40%), RP en 6 (60%). - Tiempo hasta el fallo del tratamiento (TTF): de los pacientes con RC, TTF=5,6; 23,6+; 27,4 y 28,7+ meses. - De los pacientes con RP: TTF= 3,0; 4,2; 5,7; 7,0; 7,9 y 11,2 meses.

CGP: perfil genómico completo, CRGA: Clinical relevant genomic alteration, CT: tomografía computerizada, F1: *FoundationOne*, GA: alteración genómica, IHC: inmunohistoquímica, NGS: secuenciación de nueva generación, PET: tomografía por emisión de positrones, PFS: supervivencia libre de progresión RC: respuesta completa, RECIST: *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*, RP: respuesta parcial, PD-1: proteína de muerte programada 1, PD-L1: ligando de muerte programada 1, TTF: tiempo hasta el fallo del tratamiento.

ANEXO VII. Otras plataformas NGS distintas de F1

Hoy día, se dispone de múltiples plataformas NGS comercializadas. Estas plataformas intentan identificar las GAs somáticas presentes en muestras tumorales tisulares FFPE, en el DNA tumoral circulante y algunas plataformas permiten, también, analizar tejidos sanos como saliva o sangre para disponer de DNA de referencia con el que comprar los resultados procedentes del DNA tumoral. La mayoría de las plataformas NGS requieren de una muestra de al menos 5 mm² y un mínimo de un 5% de células tumorales; son capaces de identificar mutaciones e indels pero también fusiones/translocaciones y CNAs, además de aportar información sobre la MSI y TMB, importantes predictores de respuesta a la inmunoterapia.

En la tabla 7 de este anexo se presentan las principales características de estas NGS.

FoundationOne® Liquid

Es un test de biopsia líquida de nueva generación para el estudio del ctDNA de tumores sólidos. Analiza unos 70 genes, y se ha descrito una sensibilidad del 99% y un valor predictivo positivo del 99%. Identifica las GAs clínicamente relevantes, además de MSI. Puede ayudar en la toma de decisiones al profesional sanitario al identificar las potenciales terapias dirigidas y/o ensayos clínicos y por aportar información relevante para el diagnóstico, estratificación del riesgo y pronóstico. El test se considera como complemento al estudio de las muestras tisulares o cuando estas muestras no son válidas. El resultado se obtiene en algo menos de 2 semanas.

FoundationOne® Heme

Se trata de un test de perfil genómico completo para el estudio de tumores hematológicos y sarcomas. Las muestras pueden estar FFPE, ser de sangre periférica o de aspirado de médula ósea. Se utiliza para la secuenciación de DNA, de 405 genes alterados en cáncer y 31 genes implicados frecuentemente en reordenamientos además de la secuenciación de RNA de 265 genes que permite estudiar un amplio rango de fusiones, muchas en el origen de los sarcomas y tumores hematológicos. Permite estudiar todo tipo de GAs: sustituciones de bases, inserciones, deleciones, fusiones, CNAs, duplicaciones y reordenamientos. Las alteraciones genómicas diana pueden incluir variaciones en el número de copias (amplificaciones, deleciones, duplicaciones) o mutaciones (deleciones, reordenamientos, truncamientos o fusiones) en los genes reparadores de DNA, discordancia en los genes reparadores,

alteraciones en la vía *PIK3/mTOR*, en los *ERBB2*, *BRAF*, etc. Aporta información sobre las CRGAs, las potenciales terapias dirigidas, ensayos clínicos disponibles y sobre la posibilidad de respuesta a inmunoterapia.

Guardant360® (G360, Guardant Health, Redwood City, CA, EEUU)

Se trata de una biopsia líquida que utiliza ctDNA tomado de una muestra de sangre con el fin de identificar mutaciones, indels y reordenamientos en más de 70 genes diferentes. Fue aprobado por la FDA en enero de 2018. En unos 7 días proporciona un informe que sugiere el tratamiento más indicado para las GAs o, en su defecto, la existencia de algún ensayo clínico en el que pueda ser para ofrecer al paciente. Está indicado en pacientes con tumor sólido avanzado o metastásico cuando la enfermedad progresa después de recibir el tratamiento convencional. Otras indicaciones serían no disponer de suficiente cantidad de tejido, que resulte imposible volver realizar biopsia o si ésta se descarta por su carácter invasivo, o que se hayan administrado varias líneas de tratamiento después de obtener la biopsia.

Caris Molecular Intelligence® (CMI, Caris Life Sciences, Phoenix, AZ, EEUU)

Esta plataforma se basa en una multiplataforma que trata de utilizar toda la información clínica relevante para buscar opciones terapéuticas para tumores sólidos. Se trata de una herramienta para la ayuda a la toma de decisiones para identificar el mejor tratamiento para cada paciente. CMI obtuvo el marcado CE como dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* en 2015.

CMI estudia el perfil tumoral, analizando proteínas, RNA y DNA tumorales, mediante el uso de las siguientes técnicas: 1) IHC para determinar el nivel de expresión de ciertas proteínas; 2) hibridación *in situ* para detectar delecciones, amplificaciones, translocaciones y fusiones de determinados genes; 3) NGS para identificar mutaciones del DNA, variaciones en el número de copias, genes de fusión y reordenamientos, amplificaciones e indels. Estudia 592 genes. También con NGS es posible determinar la TMB y la MSI⁴³; 4) Secuenciación de Sanger que examina las cadenas de DNA para identificar mutaciones mediante el análisis de secuencias largas y contiguas; 5) Pirosecuenciación para detectar y cuantificar mutaciones, metilaciones, etc. a través de la secuenciación por síntesis; 6) Análisis de Fragmentos, que detecta cambios en el DNA o RNA para indicar la presencia o ausencia de marcadores genéticos.

CMI define una TMB alta si en el tumor se presentan 17 mut/Mb. En este sentido CMI ayudaría a la toma de decisiones sobre la idoneidad de

establecer o no el tratamiento con inhibidores de punto de control. La concordancia entre CMI y PCR para el total de tumores indica una sensibilidad de la NGS del 95,8%, una especificidad del 99,4%, valor predictivo positivo del 94,5% y valor predictivo negativo del 99,2%⁴³.

Utiliza una muestra de tejido FFPE. Se requiere una superficie de 25 mm². El porcentaje mínimo de núcleos tumorales debe ser >20%. El secuenciador utilizado es de Illumina.

Los resultados de CMI se resumen en un informe que tarda unos 14 días en completarse desde que se recibe la muestra. En este informe se incluyen las GAs identificadas y otros biomarcadores tumorales, además de una relación de fármacos que podrían ser efectivos contra el tumor, tanto quimioterápicos, como tratamiento hormonal, inmunoterapia y terapia dirigida. Por otro lado, se incluye un listado de ensayos clínicos en los que se investiga la efectividad de determinados fármacos frente a GAs concretas. También en el informe se presenta la evidencia que respalda el uso de cada terapia, agrupados según si hay un beneficio potencial, falta de beneficio o beneficio incierto.

MSK-IMPACT

MSK-IMPACT (*Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets*) es un test de diagnóstico *in vitro* que utiliza la tecnología NSG sobre muestras tisulares FFPE de tumores malignos sólidos para detectar GAs en un panel de 468 genes. El test identifica mutaciones somáticas, tanto mutaciones puntuales, SNVs como pequeños indels, además de determinar la MSI. MSK-IMPACT fue desarrollado por el *Memorial Sloan Kettering* (MSK) Cancer Center¹⁸⁵. Fue aprobado por la FDA en noviembre de 2017¹².

Requiere entre 5-20 cortes de muestras de tejido sin teñir, de 10 micras de grosor, con más de un 20% de células tumorales aunque para determinar la MSI se precisa >25% de células tumorales. La cantidad de DNA necesaria oscila entre 100-250 ng. Se utiliza el secuenciador Illumina HiSeqTM 2500.

MSK-IMPACT utiliza la herramienta OncoKB (<http://oncokb.org/>)¹⁸⁶ para facilitar la interpretación clínica de las mutaciones detectadas. OncoKB es una base de datos de conocimiento en oncología de precisión, con información biológica, clínica y terapéutica, constituida a partir de múltiples fuentes de información basada en la evidencia, como guías y recomendaciones de profesionales y grupos de expertos, información terapéutica y datos procedentes de la literatura médica. Las mutaciones detectadas son clasificadas en dos grupos, uno con evidencia de significación clínica y otro de potencial significación clínica, tanto pronóstica como predictiva.

Todos los datos recogidos de los tests MSK-IMPACT están disponibles para la comunidad científica en la base de datos cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>), también desarrollada por MSK.

OncoDEEP® (OncoDNA, Gosselis, Bélgica)

Se trata de una multiplataforma que permite el análisis de DNA y proteínas a partir de muestras FFPE de tumores sólidos. En total secuencia 313 genes ligados a terapias dirigidas aprobadas. Las GAs que puede identificar son mutaciones puntuales, indels y CNAs. Las translocaciones, genes de fusión y reordenamientos se analizan mediante secuenciación RNA. También realiza análisis IHC, FISH y otras pruebas para detectar algunas proteínas relevantes implicadas en el proceso oncológico, que se seleccionarán en función del tipo de tumor y de los tratamientos previos recibidos por el paciente. Además permite evaluar la MSI y TMB.

Se considera que la muestra para NGS es de suficiente calidad si el tejido tumoral es al menos un 10% del total de la muestra, el tamaño del tejido tumoral debe ser >5 mm² y la invasión de linfocitos debe ser <20% en la zona donde estén localizadas las células tumorales. Se requiere un bloque FFPE o 20 cortes de 5 µm. Utiliza el secuenciador Ion TorrentTM.

OncoDEEP[®] genera un informe en unos 10 días hábiles que el incluye la asociación de la alteración genómica con algunos fármacos quimioterápicos (taxanos, análogos de nucleósidos y basados en platino), con inmunoterapia, terapia dirigida y fármacos en investigación en ensayos clínicos, pero no con tratamiento hormonal, aunque no está claro el nivel de evidencia que sustenta estas asociaciones.

OncoSELECTTM (OncoDNA, Gosselis, Bélgica)

Permite detectar las mutaciones en ctDNA. Dispone de tres paneles específicos para pacientes con NSCLC, cáncer de colon y cáncer de mama HR+ o HER2+. Facilita la identificación de resistencias al tratamiento, antes de que éstas puedan ser diagnosticadas mediante las pruebas de imagen. Y también puede servir para monitorizar la respuesta tumoral y en caso de ser necesario, modificar el tratamiento.

BioSequence-OncoDNA selecciona los estudios genómicos más apropiados para cada indicación. Genera un informe detallado integrado en la plataforma interactiva Oncoshare, donde se expresa a la asociación directa entre las alteraciones detectadas, las opciones de tratamiento y los ensayos clínicos. Según la propia empresa, hasta mayo de 2016, había conseguido cambiar la estrategia terapéutica en un 67% de los pacientes informados. En este sentido, sería una herramienta de gran valor para la toma de decisiones clínicas para el paciente.

OncoSTRAT&GO (OncoDNA, Gosselis, Bélgica)

Combina sendos análisis, de muestras tisulares FFPE de tumores sólidos malignos y la biopsia líquida de muestras sanguíneas para análisis de ctD-

NA. Se debe enviar un bloque tumoral y se considerará que la muestra es válida si incluye se dan tres condiciones: que incluya más de un 10% de células tumorales, que éstas estén localizadas en un área de más de 5 mm² y que el porcentaje de linfocitos en la región donde se sitúan las células tumorales sea inferior al 20%.

El secuenciador utilizado para la NGS es Ion Torrent™ para analizar DNA y RNA de un elevado número de genes en el tejido y en el ctDNA, genes seleccionados por su relevancia clínica en el cáncer. Además de NGS, también se realiza análisis IHC, FISH o análisis de translocaciones, que se realizarán dependiendo del tipo de tumor del paciente y de los tratamientos recibidos.

Este test genera multitud de datos para cuyo análisis se desarrolló el software OncoKDO que integra todos esos resultados, además de incluir la evidencia publicada y con todo ello genera un informe donde se incluyen recomendaciones de tratamiento, tanto con fármacos aprobados para el tipo de tumor como otros que han demostrado su utilidad en otros tumores o que sólo pueden usarse en ensayos clínicos. Este informe tarda unos 10 días e incluye las GAs, MSI y TMB.

Ha sido el test utilizado en el ensayo clínico NCI-MATCH (*National Cancer Institute-Molecular Analysis of Therapy Choice*).

Oncomine™ Dx Target Test (Thermo Fisher Scientific)

Se trata de una tecnología NGS que permite estudiar hasta 46 GAs en genes relacionados con el cáncer, incluyendo mutaciones en *EGFR* (incluyendo *L858R*, *T790M* y *deleciones en exón 19*), *BRAF*, *KRAS*, *ERBB2* y *MET*, y fusiones en *ALK*, *ROS1*, *RET* y *NTRK1/2/3*, y en función de las alteraciones identificadas, recomendará el tratamiento con dabrafenib, trametinib, crizotinib o gefitinib. Utiliza un secuenciador Ion Torrent™. El informe de Oncomine se emite en unos 4 días evitando el retraso en las decisiones terapéuticas. Fue aprobado por la FDA como un dispositivo de diagnóstico complementario (*companion diagnostic device*) *in vitro* en junio de 2017 para pacientes con NSCLC.

Paradigm Cancer Diagnostic (PCDx) (Paradigm Diagnostics, Phoenix, AZ, EEUU)

Utiliza muestras tumorales FPPE de tumores sólidos recurrentes, recidivantes o metastásicos, sobre los cuales realiza NGS que permite identificar mutaciones y CNAs de DNA, análisis de RNA para estudiar fusiones y análisis

IHC para ver la expresión de ciertas proteínas. También determina la MSI y TMB. Utiliza Illumina NextSeq que puede ofrecer resultados en 25 horas. Las muestras deben contener un mínimo de un 15% de células tumorales y superficie >3 mm². Se considera uno de los tests más sensibles del mercado, con sensibilidad y especificidad ≥99%.

OncoVantage (Quest Diagnostics)

Utiliza la tecnología NGS para identificar GAs de tumores sólidos, aunque sólo detecta mutaciones puntuales e indels, no reordenamientos ni CNAs. Su estudio incluye los 34 genes intervenibles, más frecuentemente alterados en procesos tumorales sólidos con fines diagnósticos, pronósticos y terapéuticos¹⁸⁷. Utiliza un secuenciador Ion Torrent™.

Tempus xT/xE/xF (TEMPUS, Chicago, IL, EEUU)

Tempus xT incluye tecnología NGS que utiliza un secuenciador Illumina para secuenciar DNA y RNA. Permite identificar mutaciones, fusiones, CNAs de 595 genes de relevancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica en cancer. También determina la TMB y MSI. Tarda entre 14 y 21 días en emitir un informe pero también otro en los siguientes 18 meses desde el resultado inicial con el fin de aportar información sobre la evolución del tumor en el tiempo¹⁸⁸.

Tempus xE secuencía el exoma completo. Analiza muestras tisulares tumorales FPPE y muestras normales de saliva o sangre para confirmar las variantes somáticas. Identifica SNPs, indels y CNAs. Presenta una sensibilidad del 98,8% y especificidad del 99,9% para SNPs e indels a 10% VAF (*variant allele fraction*) y una sensibilidad del 87% y especificidad del 99% para las CNAs.

Tempus xF es una forma de biopsia líquida, basada en tecnología NGS, que incluye un panel de 105 genes para detectar las GAs intervenibles de tumores sólidos en sangre circulante. Permite estudiar SNVs, indels, CNAs y reordenamientos cromosómicos (translocaciones). Este test tiene un límite de detección de 0,5% de VAF con una sensibilidad del 99% para SNVs, indels y CNAs; y un límite de detección del 1% VAF con una sensibilidad del 99% para las translocaciones.

Tabla 7. Plataformas NGS: principales características.

Nombre	Fabricante	Aprobación FDA, Mercado CE, Fecha.	Tipo de ácido nucleico	Tipo de muestra	Número de genes	Mide TMB y MSI	Cantidad mínima necesaria de ácido nucleico	Cantidad de muestra	Secuenciador	Tiempo hasta el informe
FoundationOne	Foundation Medicine, Inc.	CE, 2014	DNA	FFPE	287	Sí	40-50 ng	≥40 μm de tejido tumoral	Illumina	14 días
FoundationOne CDx	Foundation Medicine, Inc.	FDA, nov-2017	DNA	FFPE	315	Sí	40-50 ng	≥40 μm de tejido tumoral	Illumina	14 días
FoundationOne Heme	Foundation Medicine, Inc.		ctDNA, RNA	FFPE, sangre periférica y aspirado de médula ósea	405	Sí				14 días
FoundationOne Liquid	Foundation Medicine, Inc.		ctDNA	sangre periférica	70	MSI				14 días
Guardant 360	Guardant Health, Redwood City, CA, EEUU.	FDA, ene-2018	ctDNA	sangre periférica	73	¿?	5 ng			7 días
MSK Impact	Memorial Sloan Kettering (MSK) Cancer Center.	FDA, nov-2017	DNA	FFPE	468	MSI	100-250 ng		Illumina	30 días
Caris Molecular Intelligence (CMI)	Caris Life Sciences.	CE, 2015	DNA y RNA	FFPE	592	Sí		25 mm ² tejido tumoral	Illumina	10-14 días
Paradigm Cancer Diagnostic (PCDx)	Paradigm Diagnostics, Phoenix, AZ, EEUU.	No se han encontrado datos	DNA y RNA	FFPE	131-234	Sí	1,5 ng		Illumina	4-5 días
OncoDeep	OncoDNA, Gosselies, Bélgica.		DNA y RNA	FFPE	313	Sí		>5 mm ² de tejido tumoral	Ion Torrent	10 días
OncoPrint™ Dx	Thermo Fisher Scientific.	FDA, jun-2017	DNA y RNA	FFPE	161	Sí	10 ng		Ion Torrent	4 días
OncoVantage	Quest/ IBM Genomics.	No se han encontrado datos	DNA	FFPE	34	¿?	Sin datos		Ion Torrent	14 días
Tempus xT/xE/xF	Tempus Labs, Inc. Chicago, IL, EEUU.	No se han encontrado datos	DNA y RNA	FFPE, saliva, sangre	595/Exoma Completo/105	Sí	Sin datos		Illumina	14-21 días

FFPE: muestra de tejido tumoral fijada en formalina y embebida en parafina; ctDNA: DNA tumoral circulante.

ANEXO VIII. Ensayo clínicos con F1/F1CDx

Tabla 8. Ensayos clínicos con F1/F1CDx.

Título	Identificador/País/Año de inicio	Tipo de estudio	Tipo de cáncer	Objetivo	Participantes	Tiempo de seguimiento	Estado
FoundationOne™ Test Registry Study	NCT01851213/EEUU/2013	Observacional, prospectivo, multicéntrico	-	Caracterizar los patrones de utilización de la prueba F1 por parte de oncólogos bajo condiciones de práctica clínica rutinaria en EEUU.	510	12 meses	Completado
IMAGE Study: Individualized Molecular Analyses Guide Efforts in Breast Cancer - Personalized Molecular Profiling in Cancer Treatment at Johns Hopkins	NCT01939847/EEUU/2013	Ensayo clínico no aleatorizado	Cáncer de mama metastásico	Estudiar la viabilidad para la identificación de pacientes que podrían beneficiarse del análisis del perfil molecular del tumor así como analizar los resultados de los pacientes que siguieron el tratamiento dirigido sugerido en comparación con los que no lo hicieron.	32	12 meses	Completado
Comprehensive Gene Sequencing in Guiding Treatment Recommendations Patients With Metastatic or Recurrent Solid Tumors	NCT01987726/EEUU/2013	Ensayo clínico piloto, observacional prospectivo	Cáncer de mama y CCR recurrentes o en estado IV	Estudiar la secuenciación genómica completa para guiar las recomendaciones de tratamiento en pacientes con tumores sólidos metastásicos o recurrentes.	150	18 meses	Activo
Concordance Between ctDNA Assay and FoundationOne	NCT02620527/EEUU/2014	Observacional	Tumores sólidos	Evaluar la capacidad de un nuevo test de Foundation Medicine Inc. para la detección de alteraciones genómicas en la sangre periférica concordantes con las alteraciones genómicas detectadas por la prueba F1.	1400	-	Completado
Outcomes of FoundationOne Directed Therapy in Cancer of Unknown Primary	NCT02628379/EEUU/2015	Observacional prospectivo	Tumor primario de origen desconocido	Determinar si F1 proporciona información que permita a los médicos tomar decisiones terapéutica para utilizar terapias dirigidas.	125	20 meses	Completado
Genomic Profiling in Previously Untreated Metastatic Non-small Cell Lung Cancer	NCT02671045/EEUU/2015	Estudio de cohortes	NSCLC	Comparar los datos sobre supervivencia y costes basándose en el uso de diferentes perfiles genómicos.	649	20 meses	Finalizado, reclutamiento no completado
TEMPO study: A Prospective Observational Trial Evaluating Outcomes of FoundationOne (Registered Trademark)-Directed Matched Targeted Therapy in Patients with Cancer of Unknown Primary	ACTRN12616000331437/ Australia y EEUU/2016	Estudio observacional	Tumor primario de origen desconocido	Evaluar la utilidad del F1 en pacientes diagnosticados de tumor de origen desconocido.	500	-	Finalizado, reclutamiento no completado
PROFILER02: Evaluation of the Added Value of a Large Molecular Profiling Panel Versus a Limited Molecular Profiling Panel in Advanced Solid Tumors.	NCT03163732/Francia/2017	Ensayo clínico multicéntrico aleatorizado	Tumor sólido avanzado	Comparar la relevancia clínica de F1 frente al panel CONTROL.	300*	28 meses	Reclutando
BLCIO: Beating Lung Cancer in Ohio Protocol in Improving Survival in Patients With Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer	NCT03199651/EEUU/2017	Ensayo clínico aleatorizado	NSCLC	Evaluar las inmunoterapias y terapias dirigidas para NSCLC frente a los tratamientos convencionales en términos de supervivencia, toxicidad y calidad de vida.	2994	36 meses	Reclutando
An Investigational Immuno-therapy Study of Nivolumab, or Nivolumab in Combination With Ipilimumab, or Placebo in Patients With Extensive-Stage Disease Small Cell Lung Cancer (ED-SCLC) After Completion of Platinum-based Chemotherapy	NCT02538666/varios países/2015	Ensayo clínico aleatorizado	Cáncer de pulmón de células pequeñas	Evaluar si el tratamiento con nivolumab o con nivolumab+ipilimumab seguido de nivolumab prolonga la supervivencia global de los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas.	1327	37 meses?	Activo
BREAKOUT - International Breast Cancer Biomarker, Standard of Care and Real World Outcomes Study BREAKOUT.	NCT03078036/varios países/2017	Estudio de cohorte	Cáncer de mama metastásico	Estudiar la prevalencia del gen <i>BRCA</i> en una población no seleccionada, describir los tratamientos administrados y estimar los resultados clínicos asociados de la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión entre las portadoras de mutaciones en el contexto de un entorno de tratamiento con un inhibidor de la <i>PARP</i> .	1864	30 meses	Activo, no reclutando
Evaluation of the Safety and Tolerability of Niraparib With Everolimus in Ovarian and Breast	NCT03154281/EEUU/2017	Ensayo clínico no aleatorizado	Cáncer de ovario y de mama	Determinar la dosis máxima tolerada de la combinación de niraparib y everolimus para el tratamiento de cáncer de ovario y cáncer de mama.	24	24 meses	Reclutando
Evaluation of the Safety and Tolerability of TAK-228 With TAK-117 and Paclitaxel in Advanced Solid Tumors	NCT03154294/EEUU/2017	Ensayo clínico no aleatorizado	Tumor sólido avanzado	Determinar la tolerabilidad de la administración combinada de los medicamentos combinación de TAK-228 y TAK-117 junto con paclitaxel en pacientes con tumor sólido avanzado.	30	24 meses	Reclutando
Unraveling KAdcyLa (Trastuzumab Emtansine, T-DM1) Resistance In HER2-positive Advanced Breast Cancer (ABC): a Prospective GEICAM Study* (KATIA)	NCT03829306/España/2018	Estudio de casos prospectivo	Mama	Evaluar los mecanismos de resistencia primaria y adquirida al Kadcyla en una cohorte de 50 pacientes de HER2+ progresivos/recurrentes que se prevé tratar con Kadcyla dentro de la indicación aprobada en España.	50	12 meses	Reclutando

*estimado. F1: FoundationOne®, NSCLC: cáncer de pulmón no microcítico, CCR: cáncer colorrectal.



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE SANIDAD, CONSUMO
Y BIENESTAR SOCIAL



Plan Estratégico de Asesoramiento de Evaluación
de Tecnologías Sanitarias de España



Agencia de Evaluación
de Tecnologías Sanitarias
Instituto de Salud
Carlos III