



Universidad de Oviedo



**Universidad de Oviedo**

**Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias**

**Máster en Biomedicina y Oncología Molecular**

**Recidivas de Adenocarcinomas Nasosinusales:  
Análisis genético molecular e histológico**

**Autor:** María Camila Cubides Córdoba

**Tutores:** José Luis Llorente Pendas, Mario Hermsen

**Fecha:** 31 de Mayo de 2023

**Trabajo de Fin de Máster**

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 <i>Etiopatogenia</i> .....	3
1.2 <i>Histopatología</i> .....	4
1.3 <i>Clínica</i> .....	5
1.4 <i>Diagnóstico</i> .....	6
1.5 <i>Tratamiento</i> .....	8
1.6 <i>Seguimiento</i> .....	9
1.7 <i>Pronóstico</i> .....	10
1.8 <i>Tumorigénesis en ACNS</i> .....	10
1.8.1 <i>Mutaciones genéticas en cánceres primarios de senos paranasales.</i> ...	11
1.9 <i>El problema: tratamiento de las recidivas</i> .....	12
1.9.1 <i>El avance: NGS y paneles de genes</i> .....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL Y MÉTODO.....	15
3.1 <i>Diseño y sujetos de estudio</i> .....	15
3.2 <i>Variables</i> .....	15
3.3 <i>Recogida y análisis de datos</i> .....	15
3.3.1 <i>Inmunohistoquímica y descripción histopatológica</i> .....	16
3.3.2 <i>Procedimientos de extracción y secuenciación de ADN</i> .....	17
3.3.3 <i>Análisis bioinformático</i> .....	18
3.4 <i>Limitaciones del estudio</i> .....	19
4. RESULTADOS .....	20
5. DISCUSIÓN.....	29
6. CONCLUSIÓN.....	32
7. PROYECTO A FUTURO.....	33
8. BIBLIOGRAFÍA.....	34
ANEXOS.....	39
ANEXO 1: <i>Clasificación ACNS</i> .....	39
ANEXO 2: <i>Lista de los 131 genes que componen el panel</i> .....	40

## RESUMEN

**Introducción:** Los Adenocarcinomas nasosinusales (ACNS) tipo intestinal (ITAC) son tumores muy poco frecuentes con un mal pronóstico y una alta tasa de recurrencia local que determina su supervivencia (65%). Se relacionan con la exposición del polvo de madera. La principal causa de muerte en el cáncer nasosinusal es la recidiva local. El abordaje estándar de los tumores primarios es la cirugía más radioterapia, pero para las recidivas aún no existe un protocolo de tratamiento bien definido. La tumorigénesis de los ITAC sigue siendo desconocida, lo que condiciona a la falta de avances en el uso de terapias personalizadas de estos tumores. Se han observado ITAC que muestran más de un aspecto histológico en el mismo tumor (mixto), variaciones en los subtipos histológicos entre el tumor primario y su recidiva, o incluso la existencia sincrónica de dos tipos diferentes de tumores de senos paranasales en el mismo paciente, esto apoya la hipótesis de que podrían ser el resultado de la expansión de las células madre cancerosas ubicadas en la hendidura olfativa capaces de experimentar diferenciación en varios tipos de células.

El objetivo fundamental de nuestro trabajo es analizar genéticamente muestras de tumores primarios y muestras de sus recidivas, utilizando un panel de secuenciación de próxima generación (NGS) de genes accionables y relacionados con el cáncer; para ver si existe una relación genética entre ellos, independientemente de su apariencia histológica.

**Material y método:** El estudio se llevó a cabo a partir de muestras de tejido fresco congelado de tumores nasosinusales primarios (9 ITAC y uno mixta ITAC-SNEC) y muestras de recidivas locales desarrolladas durante el seguimiento de estos pacientes. Además, en un caso fue posible recolectar una muestra de metástasis de ganglios linfáticos. En 8 casos se obtuvo muestras de sangre periférica para estudio paralelo de ADN germinal. Se realizó estudio de inmunohistoquímica (IHQ) y confirmación histopatológica. Posteriormente se extrajo ADN tumoral utilizando el kit de extracción de tejido Qiagen y el ADN de la línea germinal de la sangre periférica se obtuvo utilizando el kit de preparación de plantillas de Roche High Pure. Se generaron datos NGS de muestras

coincidentes de tumor primario, recidiva y línea germinal para 8 pacientes y en 2 casos solo de obtuvieron perfiles NGS de muestras coincidentes de tumor primario y recidiva tumoral debido a la falta de ADN de línea germinal. La NGS se realizó mediante la plataforma Illumina, con un panel que cubría todos los exones de 131 genes relacionados con el cáncer. Para el análisis bioinformático se aplicó el software Genoma One.

**Resultados:** En total, 17 genes aparecieron alterados en al menos una muestra de tumor. Los genes alterados con mayor frecuencia fueron TP53, APC y BRCA2. Otros como, ATM, KMY2B, KRAS, TSC2, EPHA2, ERBB3, EZH2, LRP1B, MAP2K1, PIK3R2, PRDM9, PTCH1, RAC1 y SMO también presentaron alteraciones en menor proporción. Solo en 1 caso encontramos una mutación (LRP1B P4175T) presente en el tumor primario que no aparecía en el segundo tumor o recidiva. Además, hemos identificado 4 mutaciones que aparecen de novo en la recidiva (TSC2 V299L, PIK3R2 A194P, PRDM9 K670Nfs\*179 y ATM H1352Y). Los cambios TSC2, PIK3R2 y PRDM9 son alteraciones detectadas por primera vez en ITAC en nuestra serie, no descritas en la literatura ni en bases de datos de cáncer.

**Discusión:** Encontramos cambios significativos en cuanto la histología entre el tumor primario y las recidivas. Encontramos que, de 35 mutaciones cribadas, 31 están presentes en los tumores primarios y de estas solo 1 (LRP1B P4175T) no aparece en su correspondiente recurrencia, lo que sugiere que se trata de una mutación pasajera innecesaria para la supervivencia y propagación del tumor. Por el contrario, todos los pares tumor primario/recidiva tienen al menos dos mutaciones en común, lo que indicaría un origen clonal común y descartaría la presencia de segundos tumores primarios en nuestra serie. El grado de similitud mostrado a nivel genético en los pares tumor primario/recidiva podría ser aprovechado para la aplicación de terapias dirigidas en estos pacientes.

**Conclusión:** Aunque los tumores primarios y las recidivas de los tumores nasosinusales suelen tener una histología muy diferente, la presencia de las mismas alteraciones genéticas indica que estamos hablando de la misma entidad tumoral, y descartaría la presencia de segundos tumores primarios incluso en casos con un lapso de tiempo significativo entre ellos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las fosas nasales y los senos paranasales son una de las zonas del cuerpo humano con mayor variedad histológica, con un gran número de subtipos tumorales diferentes. El adenocarcinoma nasosinusal de tipo intestinal (ITAC) y el carcinoma nasosinusal de células escamosas (SNSCC) son los dos más frecuentes, representando juntos el 80% de todos los tumores nasosinuales (1). Los ITAC tienen una incidencia relativamente baja, 0,003 por 100.000 habitantes/año, y un mal pronóstico, con una alta tasa de recidiva local que determina una supervivencia global del 65% a los 5 años.(2)

Su baja frecuencia supone un obstáculo para su estudio y dificulta que los centros acumulen experiencia a no ser que sean centro de referencia o que se diseñen estudio mult institucionales con el riesgo de sesgo que ellos conlleva. Es 4 veces más frecuente en hombres que en mujeres y la edad de presentación ronda los 50-60 años(3). Existen variaciones geográficas en la incidencia de estos tumores, siendo el ITAC más frecuente en Europa y en el norte de España, mientras que el SNSCC en el resto del mundo.

Con el objetivo de comprender la biología de estos tumores, explicar los pasos genéticos de la carcinogénesis y las vías moleculares de progresión, se han llevado a cabo numerosas investigaciones (principalmente sobre muestras tumorales). Siendo el más reciente de nuestro grupo con la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) (4).

### **1.1 Etiopatogenia**

En la etiopatogenia de los ITAC ha intervenido la exposición profesional a diferentes factores laborales como el polvo de madera y cuero. En la actualidad, se considera que las personas que tienen esta exposición tienen un riesgo mayor de presentar este tipo de tumores (500 a 900 veces más) que las personas que no presentan la exposición. También influye el tiempo de exposición, que suele ser superior a 20 años(1,2), sin embargo, en nuestra

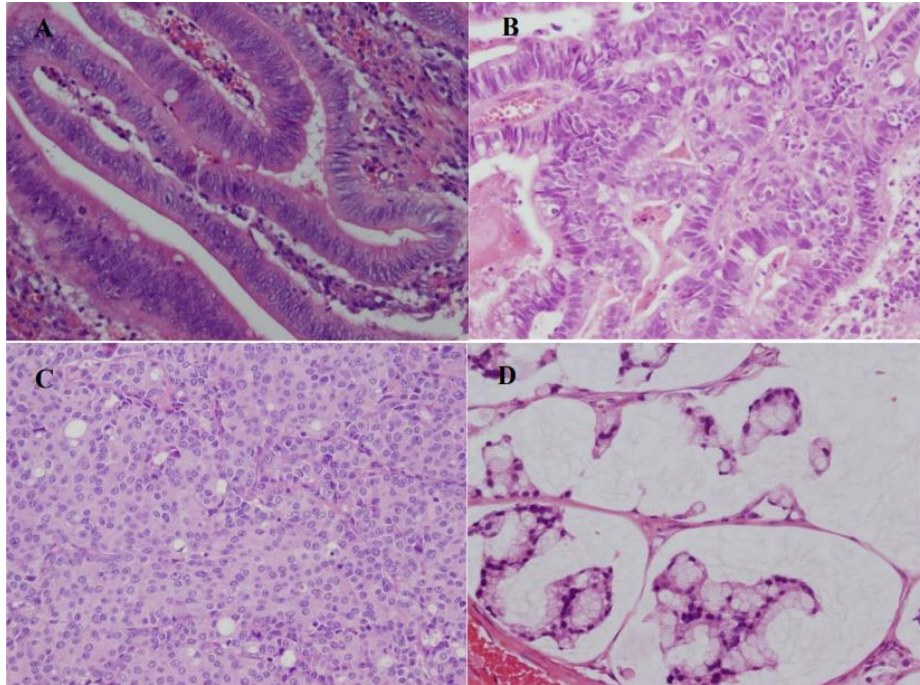
serie se ha visto que influye más la edad de inicio de la exposición, es decir, si se presenta exposición a más temprana edad mayor es el riesgo. Se piensa que esta exposición causa una inflamación crónica y desencadena la transdiferenciación de la mucosa respiratoria en metaplasia cuboide/intestinal. Las mutaciones encontradas en estos tumores son el resultado de especies radicales de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) producidas por procesos inflamatorios(5).

Otros factores etiológicos descritos son el formaldehído (carcinógeno tipo I pero con limitada evidencia) y compuestos de cromo y níquel. No se ha demostrado asociación con el tabaco y el alcohol.

## **1.2 Histopatología**

La clasificación más utilizada para los ACNS es la de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que los divide en dos categorías: Tipo intestinal (ITAC) y Tipo no intestinal (no-ITAC). Este trabajo se basa en el estudio de las recidivas de los ITAC. Los ITAC son los más frecuentes e histológicamente son casi idénticos al adenocarcinoma de colon. La clasificación histopatológica reconoce cinco subtipos (Figura 1): papilar (18%), colónico (40%), sólido (20%), mucinoso (22%) y mixto (22%) y se origina predominantemente en el seno etmoidal y área olfatoria (1–3,5,6). En todos los tipos histológicos existe diferenciación o reprogramación del epitelio nasosinusal hacia epitelio intestinal, incorporando células reabsortivas, calciformes, neuroendocrinas y de Paneth, con un aumento de la producción de mucina intra y extracelular dando lugar a lagos de mucina similares a los adenocarcinomas mucinosas del tracto intestinal. Esta metaplasia suele ser detectada por métodos inmunohistoquímicos que utilizan técnicas de diferenciación epitelial: la tinción para citoqueratinas como CDK20, CDK7, CDX2 (expresada en el 90% de los ITAC) y villina, es útil para diferencias ITAC de otros adenocarcinomas (2). También se ha observado la expresión de TP53, que está ausente en el epitelio respiratorio normal, principalmente en la metaplasia escamosa, y parece estar relacionada con la exposición al

polvo de madera (1). No se ha demostrado lesiones precursoras definidas de estos tumores, pero se han encontrado datos de metaplasia escamosa en la vecindad del tumor (7).



*Figura 1. Subtipos Histológicos ITAC (Hematoxilina - eosina 200x): A. Subtipo papilar (arquitectura papilar); B. Subtipo colónico (arquitectura tubuloglandular); C. Subtipo sólido (arquitectura sólida o trabecular); D. Subtipo mucinoso (lagos de moco separados por finos septos fibrosos y células en anillo de sello)(8).*

### **1.3 Clínica**

La clínica de inicio suele ser inespecífica, presentando la mayoría de los pacientes obstrucción nasal, epistaxis y rinorrea uni o bilateral; síntomas que a veces no se pueden diferenciar a la mayoría de las patologías benignas y otros tipos de tumores malignos de los senos paranasales, lo que retrasa el diagnóstico de este tipo de tumor y suele oscilar entre 3 a 8 meses (2). Por lo tanto, el diagnóstico a menudo se realiza en etapas avanzadas cuando el

tumor ya puede invadir la base del cráneo (60% son T3 y T4), la órbita o los tejidos blandos de la cara y la cavidad oral.

Tanto el ITAC como el SNSCC presentan típicamente una alta frecuencia de recurrencias locales (50-80%), que constituyen la principal causa de muerte.

La clasificación más utilizada para su estadificación es la de la UICC-2009 (Anexo 1). Los ganglios linfáticos y las metástasis a distancia ocurren entre un 10-20% (1,2).

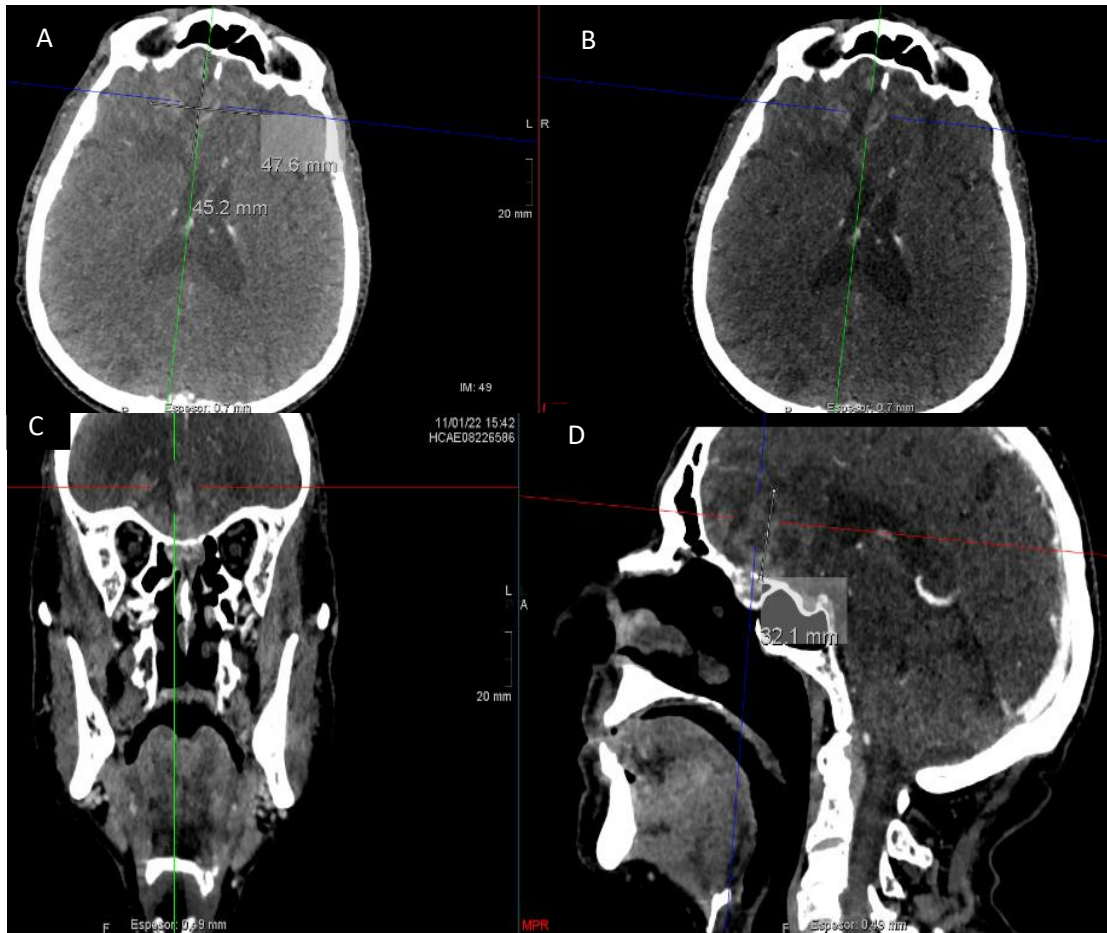
#### **1.4 Diagnóstico**

Primero, se debe realizar una exploración clínica con fibroscopio flexible o con un endoscopio rígido en la consulta ante una clínica sospechosa, lo que nos puede ayudar a visualizar las lesiones nasales e incluso podemos tomar una biopsia para su estudio y enviarla a estudio histopatológico.

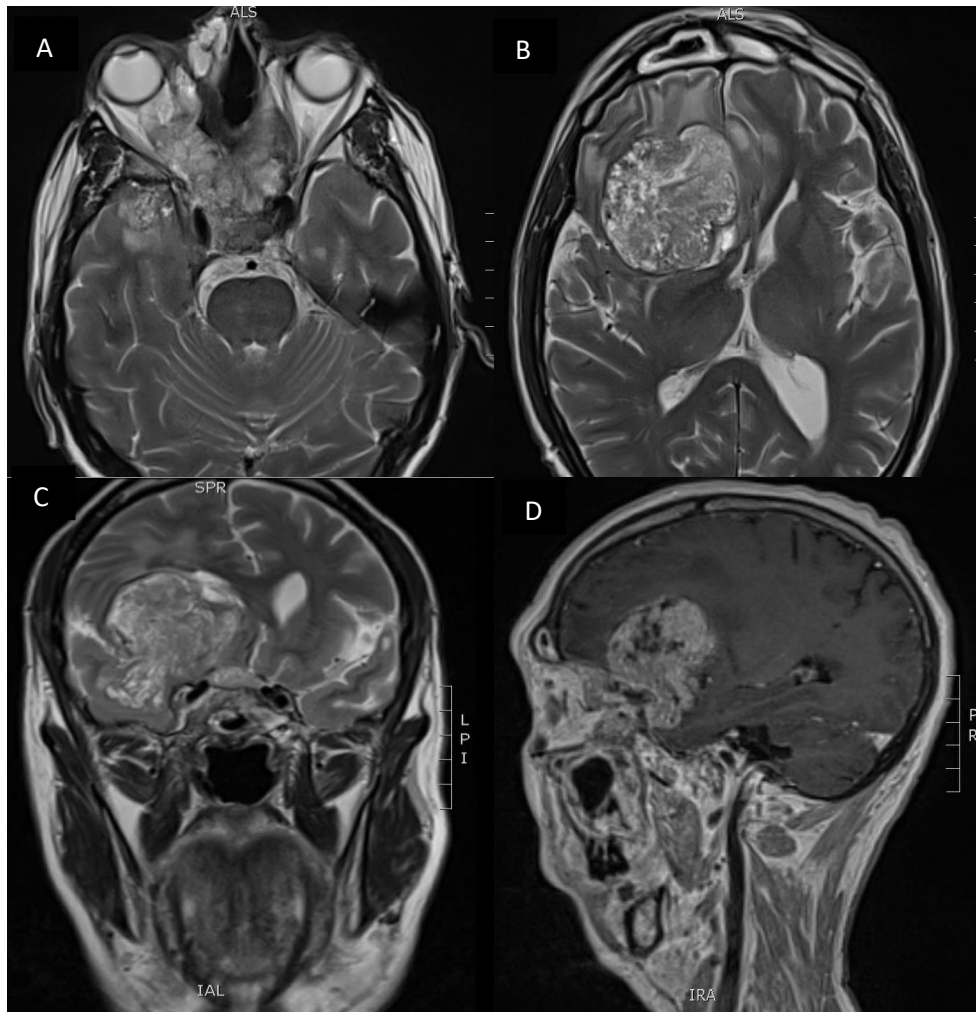
El TC y la RMN aportan información precisa sobre la localización y extensión tumoral, imprescindibles para valorar la mejor opción terapéutica. El TC axial y coronal nos permite visualizar la afectación ósea de la órbita, cavidad nasal y base de cráneo (Figura 2). La RMN coronal, axial y sagital es superior al TC para valorar tejidos blandos, diferenciando entre tumor, el edema peritumoral y la retención de secreciones por lo que suele requerirse junto con la TC para tener una precisa delimitación del tumor (Figura 3).

El PET/TC se utiliza para obtener información en pacientes con sospecha de metástasis en el momento del diagnóstico.





*Figura 2. Imágenes axiales (A y B), coronal (C) y sagital (D) de TC. Formación nodular hipercaptante de aproximadamente 12 mm, sugestiva de recidiva tumoral. Adelgazamiento de la lámina cribosa y se asocia a una extensa lesión necrótica frontobasal bilateral y frontal derecha con edema vasogénico perilesional.*



*Figura 3. Imágenes RMN T2 (axial: A y B, coronal: C) T1 (sagital: D). Extensa recidiva local sobre ala mayor del esfenoides derecho, orbita, fosa craneal anterior afectando lóbulo frontal medio y seno cavernoso derecho*

### **1.5 Tratamiento**

El tratamiento en tumores primarios de ITACs y SNSCC está claramente establecido (aunque no es óptimo). Se basa fundamentalmente en cirugía con abordajes que permiten obtener márgenes de seguridad adecuados, seguido de radioterapia complementaria (con o sin quimioterapia concomitante). Tienen en general, una pobre respuesta, a las quimioterapias (9). Sin embargo, hasta el momento no existe un protocolo definido de tratamiento para la enfermedad recurrente y metástasis.

En la década de 1960 el primer paso del abordaje quirúrgico fue la introducción de la resección craneofacial anterior abierta, que es una técnica combinada transfacial-transcraneal que permite obtener márgenes a nivel intracraneal en tumores que involucran la base anterior del cráneo. Sin embargo, la aparición de la cirugía endoscópica en las últimas dos décadas y nuevas técnicas de la hemostasia han cambiado el abordaje del tratamiento quirúrgico de estos tumores permitiendo un menor daño del tejido sano, una recuperación más rápida, menos complicaciones y un mejor resultado estético (10).

Las nuevas técnicas de radiación utilizadas (IMRT, VMAT, tomoterapia, terapia con haz de protones e IGRT) son capaces de delimitar con precisión la zona a tratar y graduar la dosis en diferentes áreas según la localización y la extensión del tumor, sean tumores primarios o recidivas. Con ellos se consigue aplicar la máxima dosis en la zona de implantación tumoral y áreas colindantes donde puede haber invasión microscópica. Al mismo tiempo se minimiza la dosis de radiación en el tejido sano y en los órganos vitales (ojo, nervio óptico, glándulas lacrimales, lóbulo frontal, medula espinal, etc.) (7).

### **1.6 Seguimiento**

El seguimiento se realiza mediante la evaluación clínica e imágenes que deben realizarse durante un mínimo de 5 años, aunque por nuestra experiencia se recomienda de por vida. La exploración endoscópica (buscar lesiones superficiales sugestivas de recidiva) y la RMN (buscar recidivas submucosas o complicaciones tardías como mucocelos asintomáticos) deben realizarse cada cuatro meses en el primer año postoperatorio, cada seis meses durante los siguientes cuatro años y luego anual dependiendo de la histología (9,11). Lo que se busca es detectar precozmente las recidivas, complicaciones y secuelas derivadas al tratamiento.

El papel del PET-TC en el seguimiento de los pacientes con neoplasias malignas nasosinusales aún no está protocolizado.

## **1.7 Pronóstico**

El pronóstico de los adenocarcinomas nasosinuales en general es malo y no ha cambiado sustancialmente en los últimos 30 años. La tasa de supervivencia permanece en torno al 30-50% a los 5 años, pero varía según la histología siendo mayor en subtipo papilar y colónico, el estadio y la localización. La principal causa de muerte en el cáncer nasosinusal es la recidiva local (30-60%). Si bien el rescate quirúrgico es posible para aquellos casos con invasión limitada a áreas vecinas, en general no existen protocolos de tratamiento claramente definidos. Además, aún no está claro si algunas recurrencias podrían ser segundos tumores primarios. Es por esto que existe una clara necesidad de nuevas opciones de tratamiento para la enfermedad recurrente y mejorar el pronóstico.

## **1.8 Tumorigénesis en ACNS**

Aunque cada vez estamos más cerca de conocer estos tumores, la tumorigénesis de los ITAC sigue siendo desconocida, lo que condiciona la falta de avances en el uso de las terapias personalizadas en estos tumores. La evidencia clínica y radiológica sugiere que los ITAC se originan en el epitelio que recubre la hendidura olfativa. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que podrían ser el resultado de la expansión de las células madre cancerosas ubicadas en estas regiones capaces de experimentar la diferenciación en varios tipos de células. Apoyando esta hipótesis, existen ITAC que muestran más de un aspecto histológico en un mismo tumor (mixto), variaciones de subtipos histológicos entre el tumor primario y su recidiva, o incluso la existencia sincrónica/metacrónica de dos tipos diferentes de tumores de senos paranasales en el mismo paciente. Aunque las clasificaciones basadas en histopatología en ITAC se han relacionado con el pronóstico [2], se ha demostrado que son de poca utilidad a la hora de personalizar tratamientos y no se ha aclarado por qué existen estas variaciones de subtipos de ITAC dentro de el mismo paciente.

Se ha descrito expresión aberrante de proteínas involucradas en la inflamación crónica (NFkB, COX2, iNOS, TNFa) con la tumorigénesis, conectando así la inflamación con el desarrollo del cáncer. La expresión de Ciclooxygenasa-2 (COX2) se asoció con la exposición al polvo de madera y con el estado de no fumador. Mediante análisis IHQ se demostró positividad para COX2 en el 52% de los casos. Las COX2 se expresa más en los adenocarcinomas nasosinuales que en los carcinomas de células escamosas (8,12)

### **1.8.1 *Mutaciones genéticas en cánceres primarios de senos paranasales.***

Nuestro grupo se han encargado de una revisión de la literatura existente sobre las características genéticas de varios tipos de tumores nasosinuales y análisis de la ruta EGFR (13,14). El papiloma invertido y el SNSCC asociados portan frecuentes mutaciones (30-91%) en el exón 20 de EGFR(15). Estos estudios también indican que los casos con mutación de EGFR tienen un mejor pronóstico que los tumores de tipo salvaje. La infección por VPH se ha descrito en el 38% de los tumores benignos y en el 31% de los malignos(15,16). Posiblemente, la mutación de EGFR y la infección por VPH representan dos vías mutuamente excluyentes de progresión del papiloma invertido al SNSCC (15). Los ITAC tienen un 40-50% de mutaciones TP53 que pueden estar asociadas con la exposición ocupacional al polvo de madera (5). La expresión nuclear de  $\beta$ -catenina que indica la activación de la vía Wnt se ha informado en el 31-53 % de los casos (17), y KRAS y HRAS estaban mutados en aproximadamente el 15 %, mientras que las mutaciones BRAF estaban ausentes (17). Finalmente, como resultado preliminar de secuenciación masiva de exoma, identificamos mutaciones RET y ROS, oncogenes conocidos con cáncer de tiroides y de pulmón respectivamente, para cuyas proteínas ya existen terapias específicas como el Crizotinib, por lo tanto, sería de gran aportación analizar exomas completos para estudios futuros.

Los estudios genéticos de todo el genoma han demostrado que tanto SNSCC como ACNS generalmente tienen genomas aneuploides complejos que portan una gran variedad y un gran número de aberraciones cromosómicas (cómo ocurre con tumores sólidos). Una excepción es el ITAC papilar, que parece ser predominantemente diploide y con pocas aberraciones genéticas (1).

La metilación de las islas CpG es un mecanismo frecuente de inactivación de genes supresores de tumores que se han relacionado con agentes genotóxicos del polvo. En consecuencia, los ITACs relacionados con la exposición al trabajo presentan una alta frecuencia de p14ARF y p16INK4a con metilación aberrante, lo que sugiere que la desregulación de genes supresores de tumores es un acontecimiento importante en el desarrollo de ITAC.

### ***1.9 El problema: tratamiento de las recidivas***

El tratamiento en tumores primarios de ITACs y SNSCC está actualmente bien establecido (aunque no óptimo) e incluye como tratamiento estándar la cirugía seguida de radioterapia complementaria (con o sin quimioterapia concomitante). La quimioterapia convencional sola (Cisplatino, 5-Fu, Taxanos...) es poco o nada eficaz y se utiliza casi exclusivamente como radio sensibilizador y con fines paliativos (18). Sin embargo, para las recidivas y la metástasis, no existe un protocolo claramente definido y las opciones de cirugía y radioterapia son limitadas debido al tratamiento primario previo. La mayoría de las recurrencias se desarrollan dentro de 1 a 2 años de seguimiento; aproximadamente el 25% de los pacientes desarrollan recurrencia después de más de 2 años y hasta 10 años después del tratamiento (19). Todavía está por aclarar si estos pueden ser o no segundos tumores primarios. En cualquier caso, es importante contar con otras opciones de tratamiento para la enfermedad recurrente, como inmunoterapia o terapia dirigida específica con anticuerpos monoclonales o inhibidores de moléculas pequeñas.

### **1.9.1 El avance: NGS y paneles de genes**

La primera secuenciación del genoma humano requirió de una duración de 12 años y costó casi 3 mil millones\$. Actualmente las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) permiten la secuenciación de un genoma humano completo en un solo día por más de 1000\$. La utilidad clínica de una prueba basada en NGS se deriva por su capacidad para identificar con confianza las diferencias entre el genoma de un paciente y el genoma de referencia. Estas diferencias, son llamadas “variantes” y son de 2 clases: cambios en la secuencia de ADN (“SNP” polimorfismos de un solo nucleótido e inserciones/deleciones “Indels”) y grandes deleciones/duplicaciones “del/dups”, también conocidas como “variaciones del número de copias” o “CNV” (9).

En los últimos años, se ha hecho posible analizar mutaciones en un gran panel de genes (o, de hecho, en todos los genes) simultáneamente mediante secuenciación de nueva generación (NGS). La técnica que más se utiliza de NGS es la secuenciación por síntesis empleando por los dispositivos *Illumina* que se basa en la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR para generar clústers y la detección de bases a través de etiquetas fluorescentes. Esto nos permite el conocimiento de variantes somáticas de cada tumor individual y, en concreto de aquellas relevantes o responsables de su comportamiento agresivo, conocidas como mutaciones conductoras (del inglés “drivers”) lo que es fundamental para lograr la individualización de los tratamientos oncológicos.

Estos paneles de genes requieren menos tejido y se pueden obtener a partir de bloques de tejido de parafina, producen datos genéticos menos complejos, más fáciles de traducir a la implementación clínica y, además, se han vuelto económicamente viables. Los NGS que utilizan paneles de genes ya se utilizan para el tratamiento clínico de tumores frecuentes como el melanoma, los tumores de mama, ovario, colon, pulmón y cerebro. Las mutaciones genéticas encontradas en estos tumores han indicado vías de señalización a las que se pueden dirigir varios medicamentos contra el cáncer y se están realizando estudios clínicos y preclínicos. Los son los inhibidores de

proteínas porcupina (PORCN) para bloquear la señalización de Wnt y el crecimiento tumoral en el cáncer colorrectal metastásico (14); inhibidores de MEK (trametinib, cobimetinib...) e inhibidores de la vía Pi3K-AKT (apelisib, fulvestrant, everolimus...) en melanoma, cáncer de pulmón y mama (20,21); inhibidores de IDH1,2 (enasidenib, ivosidenib...) en gliomas (22); Fármacos dirigidos a la reparación defectuosa del ADN (rucaparib, niraparib, olaparib...) en cáncer de mama y de ovario (23).

## **2. OBJETIVOS**

Objetivo principal:

- Analizar genéticamente muestras de tumores primarios, sus recidivas y tejido germinal, utilizando un panel NGS de genes accionables y relacionados con el cáncer, para verificar si existe una relación genética entre ellos independientemente de su histología.

Objetivos secundarios:

- Comparación de las alteraciones genéticas entre tumores primarios y recidivas para la identificación de posibles segundos tumores primarios.
- Analizar las alteraciones genéticas en el ADN de la línea germinal en busca de posibles mutaciones hereditarias que predispongan a tumores y permitir perfiles de genes encontrados en NGS.
- Correlación de todos los hallazgos genéticos con los datos histopatológicos, clínicos y de seguimiento.



### **3. MATERIAL Y MÉTODO**

#### ***3.1 Diseño y sujetos de estudio***

Estudio retrospectivo donde se obtuvieron un total de 10 muestras de ACNS primarios (9 ITAC y una mixta ITAC-SNEC) de pacientes tratados quirúrgicamente en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, España) entre 1999 y 2017. Las muestras de las recurrencias de los pacientes se obtuvieron de algunas de las recidivas locales desarrolladas durante el seguimiento de los pacientes. Además, en un caso fue posible recolectar una muestra de metástasis de los ganglios linfáticos. Las muestras se obtuvieron de áreas representativas de la pieza quirúrgica en todos los casos, evitando áreas de necrosis o áreas dudosas. En 8 casos, también se pudieron obtener muestras de sangre periférica para estudio paralelo de ADN germinal, sujeto a disponibilidad del paciente. Todos los pacientes habían firmado un consentimiento informado para la recolección, análisis y almacenamiento de su material biológico, y el estudio fue aprobado por el comité ético.

#### ***Variables***

- Datos clínico-patológicos de los ACNS: edad, sexo, etiología (madera, tabaco, alcohol), tipo histológico, estadio, tipo de tratamiento y seguimiento (recidiva, metástasis, estado del paciente)
- Datos genéticos a estudiar: secuencias (mutaciones y polimorfismos) de un panel de 131 genes (NGS).

#### ***3.2 Recogida y análisis de datos***

Los criterios de inclusión fueron:

- Diagnóstico de ITAC.

- Cirugía como tratamiento de primera línea.
- Disponibilidad de material de muestra de recidiva.
- Muestras de óptima calidad.

Los criterios de exclusión fueron:

- Tumor primario inoperable o tumores irresecables en el momento del diagnóstico.
- Otros tratamientos previos sobre el tumor primario.
- Persistencia del tumor después de la cirugía del tumor primario (presencia de tumor por endoscopia o control radiológico menor de 6 meses después de la cirugía).
- Material de mala calidad.

Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron tratados quirúrgicamente con intención curativa.

En general, se propuso radioterapia concomitante a todos los pacientes con:

- Clasificación T3-T4.
- Subtipo histológico sólido o mucinoso.
- Márgenes quirúrgicos sospechosos de afectación o no evaluables macroscópicamente.

Todos los pacientes fueron seguidos hasta el presente o hasta su muerte. El diagnóstico histológico fue confirmado por un patólogo experto (B.V) según la clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud 2017.

### ***3.2.1 Inmunohistoquímica y descripción histopatológica***

Las tinciones IHC fueron realizadas por el Departamento de la Anatomía Patológica del Hospital Central de Asturias en una estación de trabajo de tinción automática (Dako Autostainer Plus; DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) como parte de los diagnósticos de rutina. El estudio y descripción histopatológica de los casos fue realizado por los patólogos B.V y M.G.

### **3.2.2 Procedimientos de extracción y secuenciación de ADN**

Las muestras fueron obtenidas de áreas representativas de la pieza quirúrgica en todos los casos, evitando áreas de necrosis o dudosas. El ADN genómico de las muestras tumorales se extrajo utilizando el micro kit de extracción de tejido Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Para obtener el ADN germinal se procesaron 4 ml de cada muestra de sangre con el kit de preparación de plantillas de PCR de alta pureza (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Todas las muestras de ADN aisladas se cuantificaron por fluorimetría, usando el kit Qubit dsDNA HS y por espectrofotometría (NanoDrop) como control de calidad del ADN al utilizar el índice Q/N (concentración Qubit/concentración NanoDrop >0.29).

Se generaron datos NGS de muestras coincidentes de tumor primario, recurrencia y línea germinal para 8 pacientes (1 de ellos también incluía datos de metástasis en los ganglios linfáticos). En dos casos, solo se obtuvieron perfiles NGS de recurrencia tumoral coincidentes debido a la falta de ADN de la línea germinal.

La secuenciación de próxima generación (NGS) con el kit de enriquecimiento de objetivos SureSelect QXT para secuenciación multiplexada de Illumina (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) se realizó con un panel descrito anteriormente que cubría todos los exones de 131 genes relacionados con el cáncer, 119 genes seleccionados en nuestra anterior serie (Sánchez-Fernández et al., 2021) más KMT2B, KMT2C, KMT2D, OTX1, PRDM2, PRDM9, PRDM14, SETD1A, SETD1B, SETD2 y TP53 (Anexo 2).

Seleccionamos los genes del panel en base a los siguientes criterios:

1. Su mutación podría ser diana directa de un fármaco aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, Food and Drug Administration; [www.fda.gov](http://www.fda.gov)) o por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, European Medicines Agency; [www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/)) en el tratamiento del cáncer.

2. Su mutación podría ser diana directa o indirecta de un fármaco que está bajo investigación en ensayos clínicos (preliminares o avanzados) en el tratamiento del cáncer.
3. Su mutación podría ser diana directa o indirecta de un fármaco bajo investigación en estudios preclínicos en el tratamiento del cáncer.
4. Su mutación podría predecir la sensibilidad o resistencia a fármacos específicos aprobados, bajo investigación o en estudios preclínicos en el tratamiento del cáncer.

De esta forma, excluimos aquellos genes del cáncer cuyas alteraciones somáticas solo tienen valor clínico diagnóstico y / o pronóstico, es decir, sin valor predictivo terapéutico y conformamos un panel de 131 genes.

Las sondas se diseñaron para cubrir toda la secuencia de codificación, todos los exones de los 131 genes, para la detección de variaciones de nucleótido único (SNV, Single Nucleotide Variant), inserciones o deleciones (indels) y CNA, así como intrones específicos de ciertos genes para detectar los reordenamientos seleccionados.

Las bibliotecas en los pools de 16 plex se secuenciaron en un sistema MiSeq (Illumina Inc.) en el servicio de secuenciación de IMOMA (Oviedo, España). La cobertura de la secuenciación fue como mínimo de 150X.

### **3.2.3 Análisis bioinformático**

Para el análisis bioinformático se aplicó el Software Genome One, certificado con UNE-EN ISO 13485:2016 y marcado IVD/CE (DREAMgenics). Después del formato de llamado de variantes (VCF), se filtraron las variantes de secuencia con una frecuencia de alelo menor  $>1\%$  en la población normal y solo se consideraron los cambios no sinónimos con un impacto en la secuencia de la proteína. Debido a que la secuenciación de la línea germinal emparejada dio resultados inequívocos sobre el estado somático de las variantes, este criterio se relajó al  $5\%$  en tales casos. Solo se consideraron relevantes aquellas variantes con una frecuencia alélica  $>10\%$  del total de

lecturas en al menos una de las muestras tumorales. Oncoprint para alteraciones relevantes seleccionadas se realizó en Rstudio 2022.02.0 (Bioconductor versión 3.14, BiocManager 1.30.16, R 4.1.3) y el paquete base ComplexHeatmap.

### 3.3 Limitaciones del estudio

Este tipo de tumor es raro, y, por tanto, no es fácil recolectar un número estadísticamente relevante de muestra de tumores completas con datos clínicos y de seguimiento. Además, consiste en una multitud de subtipos histológicamente diferentes, cada uno con su propio comportamiento clínico y probablemente también alteraciones genéticas únicas.

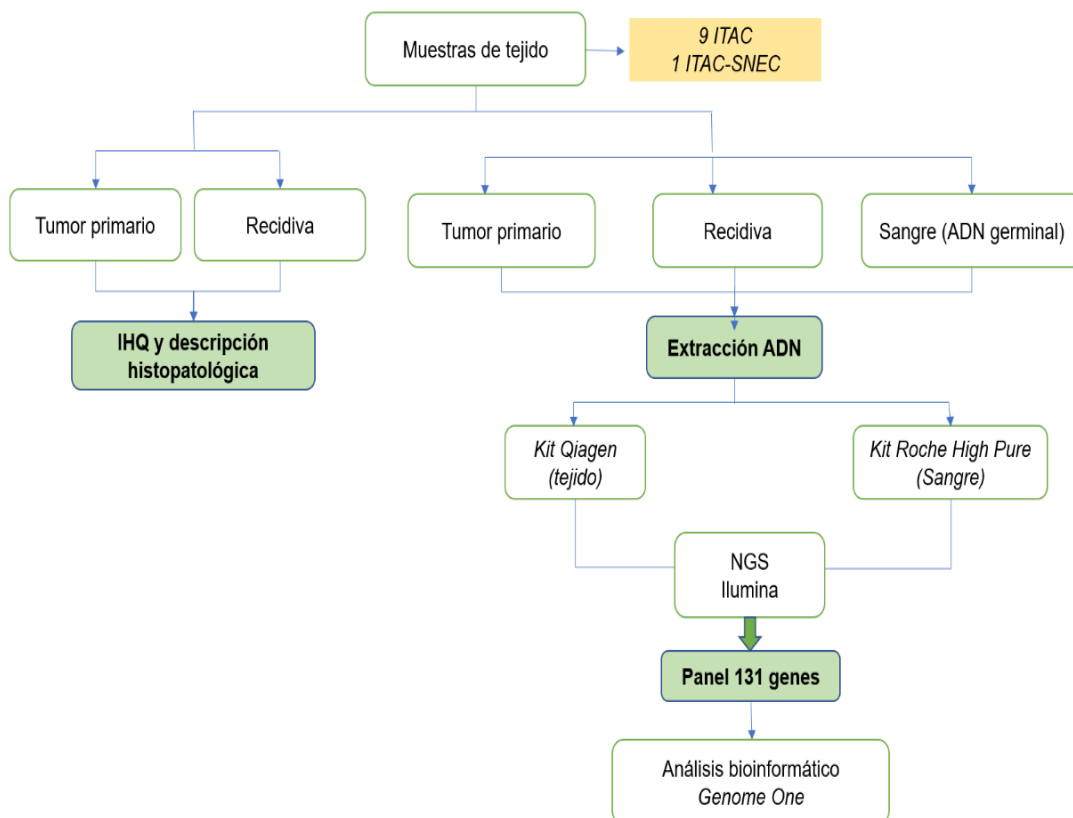


Figura 4. Diagrama de flujo de material y método.

#### 4. RESULTADOS

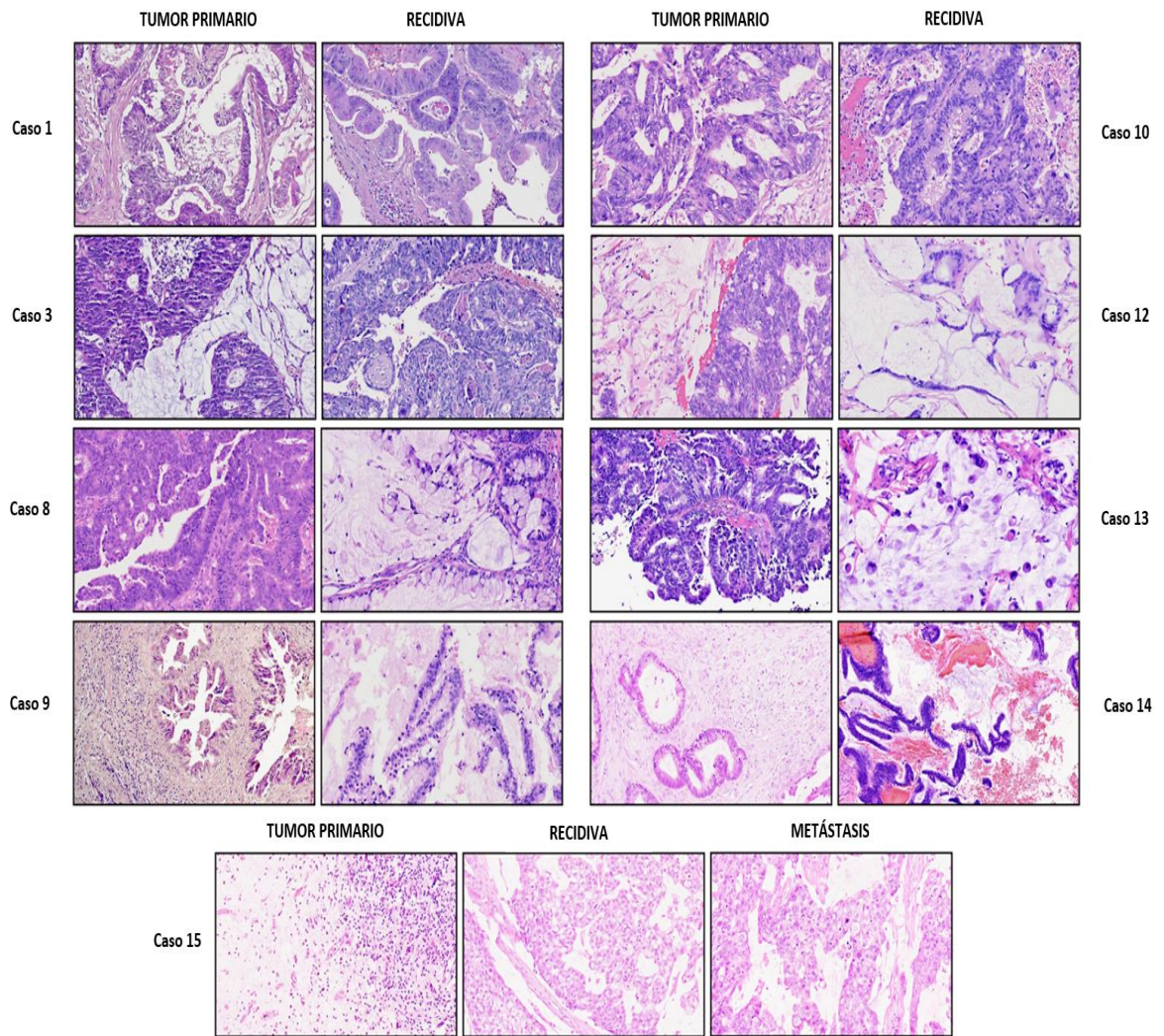
Todos los datos clínicos y de seguimiento se enumeran en la tabla 1. Todos los pacientes eran varones. La edad media fue de 69 años (rango 49-86). Todos eran trabajadores expuestos al polvo de madera con un tiempo medio de exposición de 32 años (rango de 5 a 50 años). Ningún paciente tenía antecedentes de exposición a otros carcinógenos conocidos en ACNS. Cinco pacientes (50%) tenían una clasificación tumoral de T1-T2 y otros 5 (50%) T3-T4. Ningún paciente tenía ganglios linfáticos o metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, por lo que la clasificación T coincide con el estadio del tumor. Todos los pacientes fueron tratados mediante cirugía sin tumor residual. Cuatro (40%) pacientes recibieron radioterapia (RT) (60 Gy en volumen objetivo) entre la muestra del tumor primario y la muestra de la recidiva. Ningún caso fue tratado con quimioterapia (CTx). En cuanto al subtipo histológico del tumor primario, las muestras estaban compuestas por 9 ITAC y un tumor mixto ITAC-SNEC. En cuanto a los ITAC, 2 (22%) fueron subtipo colónico, 1 (11%) mucinoso y 6 (67%) mixtos (tabla 1). No se observaron diferencias en cuanto a cambio de subtipo histológico y haber recibido RT previa. El tiempo entre el muestreo del tumor primario y el muestreo del tumor secundario fue variable, con una media de 41,5 meses (rango 9 a 120 meses). El promedio de tiempo libre de enfermedad (DFT) fue de 25 meses (rango 9 a 120). Se diagnosticó un promedio de 3 recidivas por pacientes (rango 1 a 8) durante el seguimiento (media 66 meses; rango de 17 a 147). Dos pacientes (20%) también desarrollaron metástasis en los ganglios linfáticos, de los cuales solo uno se recogió muestra de ganglio linfático metastásico. Actualmente, 3 pacientes (30%) están vivos. Un paciente tiene tumor y se encuentra en cuidados paliativos después de no responder a la RT y al 5-FU tópico semanalmente durante 6 semanas. Cinco (71%) pacientes habían fallecido por recidiva tumoral, uno (14%) durante el postoperatorio y uno (14%) por causa no relacionada con la enfermedad. La tasa de supervivencia global fue del 49% a los 3 años y del 42% a los 5 años, mientras que la tasa de supervivencia libre de enfermedad fue del 10% tanto a los 3 años como a los 5 años.

**Tabla 1. Características clinicopatológicas**

Características	Nº de pacientes (%)
Subtipo Histológico	
ITAC-SNEC	1 (10)
ITAC	9 (90)
Papilar	0 (0)
Colonico	2 (22)
Sólido	0 (0)
Mucinoso	1 (11)
Mixto	6 (67)
T	
1	3 (30)
2	2 (20)
3	4 (40)
4a	0 (0)
4b	1 (10)
Radioterapia complementaria	
Si	4 (40)
No	6 (60)
Quimioterapia complementaria	
Si	0 (0)
No	10 (100)

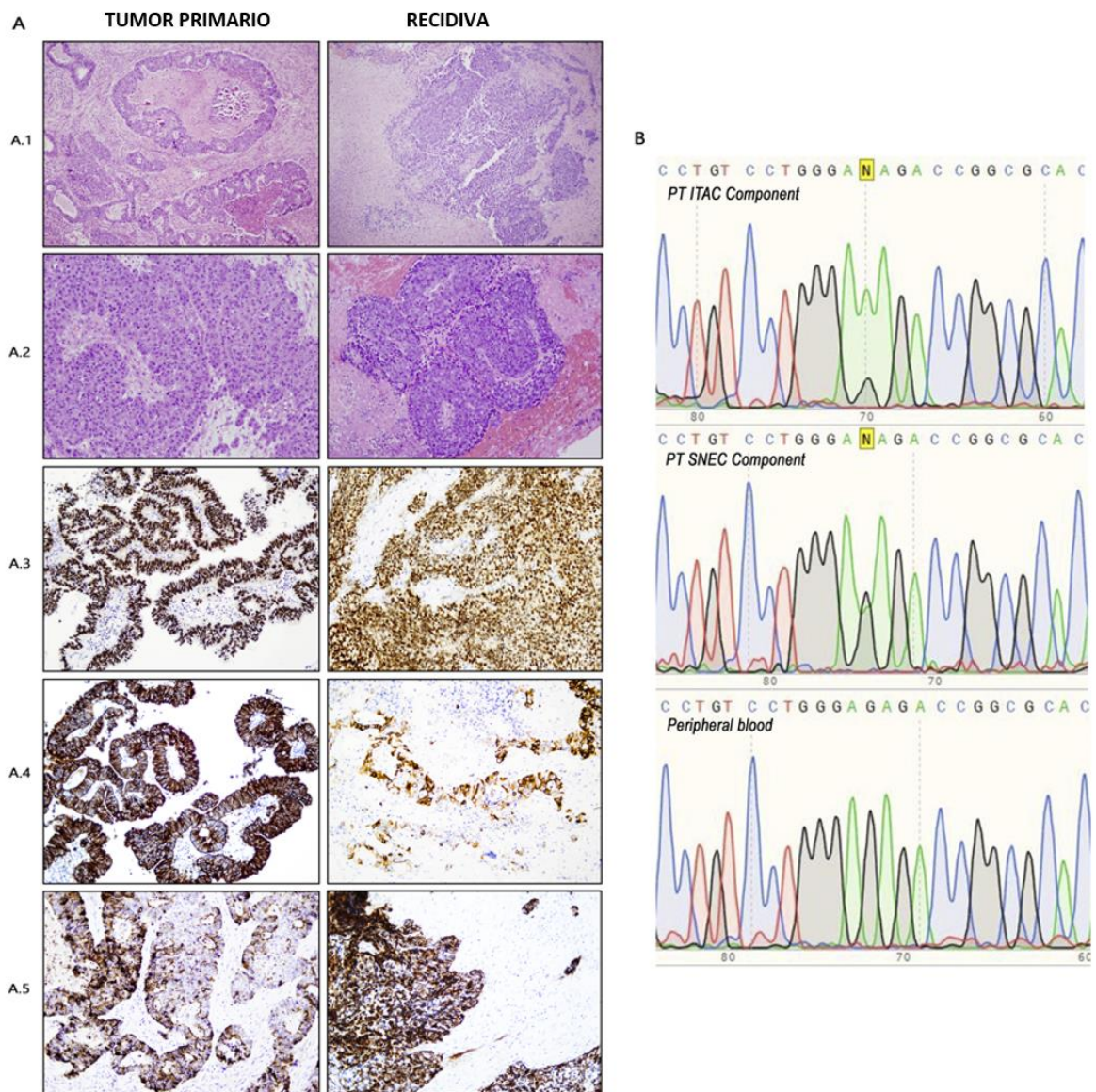
### ***Histopatología***

En cuanto a la histología de los tumores primarios, de los 10 casos: uno es un ITAC-SNEC mixto y 9 son ITAC (6 mixtos, 1 mucinoso, 2 colónicos). En esta sección describimos las características histológicas de cada caso individual a lo largo de las muestras. Las imágenes representativas de los casos ITAC se muestran en la Figura 5, mientras que el caso mixto ITAC-SNEC se ilustra con más detalle en la Figura 6.



*Figura 5. Imágenes Histopatológicas de los 9 casos ITAC.*





*Figura 6. A: Imagen Histopatológica del caso mixto (ITAC-SNEC) A3: CDX2 bastante extensa. A4: IHQ de CK20 negativa. A5: Positividad intensa y difusa en ambos componentes tumorales para los marcadores neuroendocrinos sinaptofisina y cromogranina. B: Cromatograma de secuenciación*

**Caso 1.** El **tumor primario** tiene glándulas dilatadas con mucha mucina, también tiene áreas colónicas bien diferenciadas y áreas papilares adicionales. Es un ITAC mixto colónico-mucinosos-papilar. La **recidiva** tiene una apariencia más colónica, con solo pequeñas áreas mucinosas y papilares.

**Caso 3.** El **tumor primario** es un ITAC mixto papilar-colónico. El componente colónico es más marcado, y la mucina está presente (fuera del tumor), aunque no se considera que presente componente mucinoso. La **recidiva** tiene la misma apariencia.

**Caso 8.** El **tumor primario** es una ITAC mixto papilar-mucinoso. Predominantemente papilar (tan desarrollado que puede parecer colónico), con áreas papilares aisladas y áreas mucinosas significativas, con lagos de mucina. Por el contrario, la **recidiva** es claramente un ITAC mucinoso, con células caliciformes y células de Paneth que no se observaron en el tumor original. Es un tumor bastante diferente, habiendo perdido completamente el componente papilar.

**Caso 9.** El **tumor primario** comprende un ITAC colónico, disperso como parches tumorales formando glándulas entre la mucosa normal. Sin embargo, la **recidiva** es completamente diferente, es un ITAC mucinoso con estructuras glandulares dilatadas con mucha mucina y células caliciformes.

**Caso 10.** El **tumor primario** es de subtipo colónico, con células aberrante. Forma glándulas y tiene algo de mucina. La **recurrencia** tiene la misma apariencia que el tumor primario. Presencia de muchos fibroblastos, tejido cicatricial y células grandes multinucleadas (posible remodelado óseo en el estroma donde asienta el tumor, en forma de pequeños nidos).

**Caso 11.** Comprende una entidad rara clasificada como tumor mixto ITAC/SNEC. El **tumor primario** tiene un aspecto más bien sólido, poco diferenciado. Consiste en células grandes con uno o más núcleos y se observa mucha necrosis y apoptosis. Tiene áreas glandulares mejor diferenciadas con dilataciones secundarias. Las áreas glandulares tienen positividad zonal del CK20, lo que apoya el diagnóstico del ITAC. CDX2 es intenso y difuso, claramente positivo tanto en el componente sólido como en

el glandular. Por lo tanto, el tumor primario se diagnosticó inicialmente como ITAC. Sin embargo, cuando se examinó la **recidiva**, se encontró que el tumor era muy necrótico, casi completamente sólido, con solo unas pocas áreas glandulares aisladas. Células pleomórficas, con núcleos muy grandes y mucha apoptosis. La IHQ de CK20 fue prácticamente negativa (Fig. 6A.4), aunque la expresión de CDX2 fue bastante extensa (Fig.6A.3). Se amplió el estudio IHQ, CK8 teñido en punto paranuclear, cromogranina y sinaptofisina también fueron bastante positivos. Dado que tanto los marcadores neuroendocrinos como los intestinales eran positivos, se amplió el estudio a otros dos marcadores: IMSM-1 (neuroendocrino) y SATB2 (intestinal), ambos positivos, corroborando el diagnóstico de tumor mixto ITAC/SNEC. Ante el diagnóstico de recidiva, se revisó el primario, observándose positividad intensa y difusa en ambos componentes tumorales para los marcadores neuroendocrinos sinaptofisina, cromogranina (Fig. 6A.5) y CF53. CK8, como en la recidiva, se tiñe en el punto paranuclear y no en toda la membrana (típico de los tumores neuroendocrinos). Por tanto, el **tumor primario** se reclasificó como tumor mixto ITAC/SNEC.

**Caso 12.** El **tumor primario** es un ITAC mixto colónico-mucinoso con una distribución bastante uniforme de sus dos componentes. Por el contrario, la **recurrencia** ha perdido por completo el componente colónico, siendo claramente mucinosa.

**Caso 13.** El **tumor primario** es un ITAC mixto colónico-papilar, en el que predomina el componente colónico. La **recidiva** es muy diferente del PT. Es un tumor mucinoso con células en anillo de sello y patrón alveolar. No hay rastro del componente colónico ni papilar.

**Caso 14.** El **tumor primario** es el subtipo mucinoso, con pocas células tumorales completamente embebidas en mucina y patrón alveolar. Un revestimiento epitelial atípico rodea las glándulas dilatadas llenas de mucina. La **recidiva** es similar en apariencia, sin embargo, comienzan a aparecer pliegues que sugieren un patrón papilar, aunque insuficiente para considerarlo mixto.

**Caso 15.** El **tumor primario** es mixto, con componente mucinoso y sólido (poco diferenciado). No forma glándulas en la parte sólida. De hecho, solo la parte mucinosa es indicativa de ITAC. La **recidiva** tiene un aspecto mucho más mucinoso, con células en anillo de sello. Los núcleos son más grandes y pleomórficos. Hay zonas de mayor densidad celular, pero sin llegar a ser sólidas. La **metástasis** es muy similar a la recidiva. La atipia y la densidad celular van aumentando, mientras que el porcentaje de mucina disminuye. Se ve mucha apoptosis. En resumen, es menos diferenciada y más sólida que la recidiva.

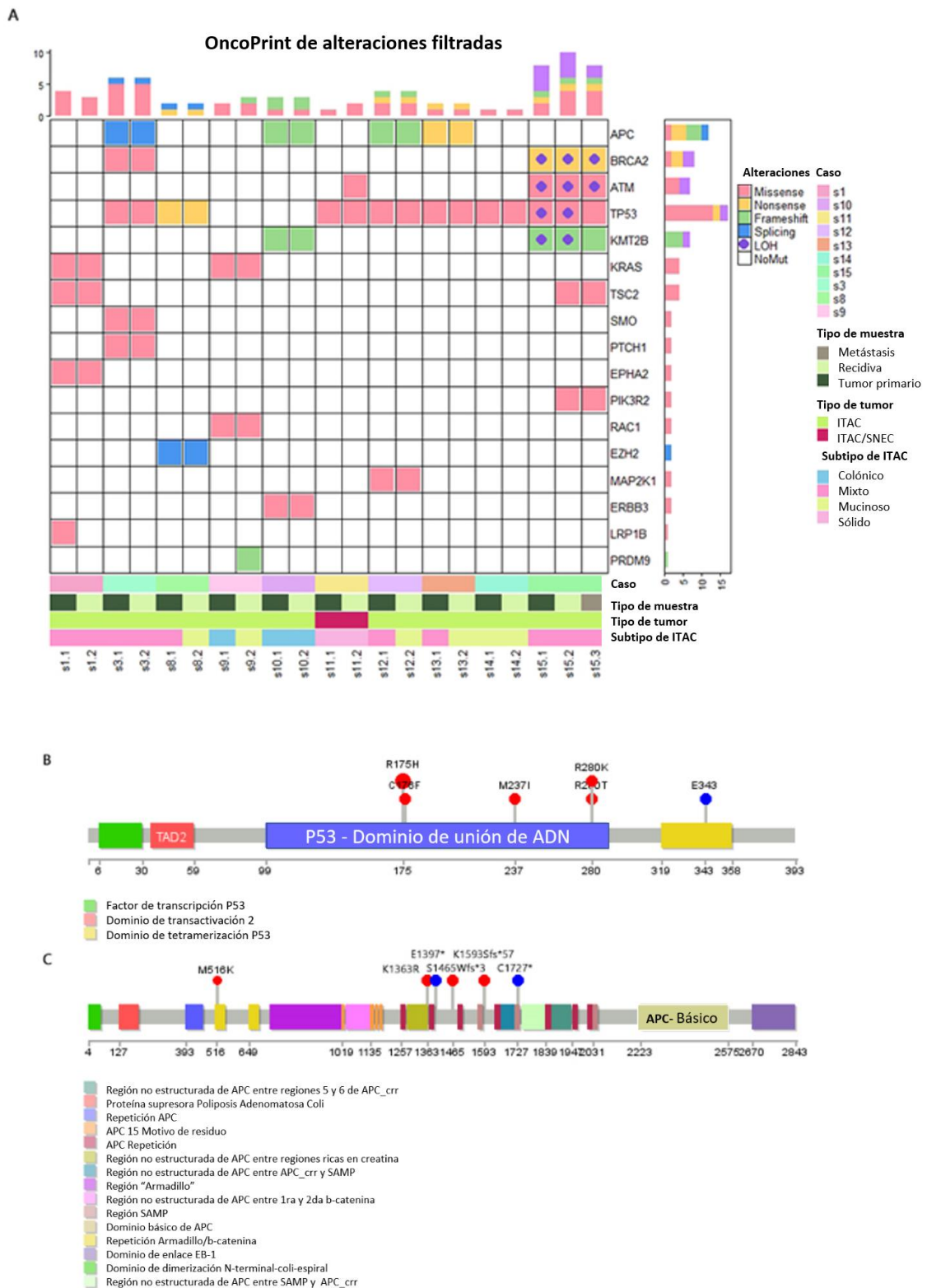
### ***Resultados de secuenciación***

Todas las alteraciones tomadas en consideración después del filtrado bioinformático se enumeran en la Figura 7A. En total, 17 genes aparecieron alterados en al menos una muestra de tumor. Los genes alterados con mayor frecuencia fueron TP53 (7 mutaciones en 7 pacientes), APC (7 alteraciones en 4 casos), así como BRCA2 (3 mutaciones en 2 casos). Las mutaciones en TP53 y APC se anotan gráficamente a lo largo de la estructura del gen en la figura 7 (7B y 7C respectivamente), mientras que la figura 7A es una oncoparcela que captura todas las alteraciones. Los genes ATM, KMT2B, KRAS y TSC2 presentaron 2 mutaciones en 2 casos cada uno. Por último, los genes EPHA2, ERBB3, EZH2, LRP1B, MAP2K1, PIK3R2, PRDM9, PTCH1, RAC1 y SMO mostraron una variación que afectó a un caso.

En general, las mutaciones encontradas son muy heterogéneas, pero notamos 2 variaciones recurrentes. Por un lado, dos pacientes presentaban cambios en los conocidos hotspots de KRAS G12y G13 (G12D y G13D respectivamente). Además, de los siete casos con alteraciones de TP53, dos casos portaban la mutación R175H, que ha sido ampliamente descrita en varios tipos de cáncer.

Solo en un caso (Caso 1) encontramos una mutación (LRP1B P4175T) presente en el tumor primario que no aparecía en la recidiva. Esta es una

mutación no descrita previamente en la literatura de significado incierto (clasificación ACMG), que probablemente sea una mutación transitoria. Además, hemos detectado 4 mutaciones que aparecen de novo en la recidiva. Dos de ellos (TSC2 V299L y PIK3R2 A194P), están presentes en el caso 15, en el que también tenemos una muestra de metástasis ganglionar, y ambos persisten en la metástasis. De las otras dos mutaciones (PRDM9 K670Nfs\*179 y ATM H1352Y), cada una aparece en un caso diferente. Los cambios TSC2, PIK3R2 y PRDM9 son alteraciones detectadas por primera vez en nuestra serie, no descritas en la literatura ni en bases de datos de cáncer (COSMIC, ICGC, ClinVar...), mientras que ATM H1352Y se describe una vez en ClinVar como una línea germinal de significado incierto, variante de un síndrome hereditario de predisposición al cáncer (VCV000824542.2-ClinVar-NCBI (nih.gov)).



*Figura 7. Oncoparcela de las mutaciones encontradas A: 17 genes aparecieron alterados en al menos una muestra de tumor B: Mutación TP53 C: Mutación APC.*

## 5. DISCUSIÓN

El cáncer recidivante y/o metastásico suele ser incurable con las terapias actuales. Entre los ACNS, la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años está entre el 62% y el 74%, la supervivencia general entre el 64% y el 69% y la supervivencia específica de la enfermedad entre el 64% y el 82% según diferentes series (24), siendo las recidivas locales la principal causa de muerte (2). En esta pequeña muestra de 10 casos, la supervivencia es incluso significativamente menor (DFS 10% /OS 42% a los 5 años).

La frecuencia de recidivas locales es muy prevalente incluso cuando la resección quirúrgica es exitosa, siendo más frecuentes en los dos primeros años de seguimiento (4,24,25). A su vez, el desarrollo de recurrencias está relacionado con el estadio avanzado (TNM = T3, T4 y metástasis)(2,4,10,19,26–31), así como el subtipo histológico sólido y mucinoso en el caso de los ITAC (4).

Debido a la dificultad de distinguir entre un tumor residual, un tumor recidivante o un segundo tumor primario, se ha tratado de precisar estas definiciones. La recurrencia se refiere a la reaparición del tumor después de un período más o menos largo de ausencia de enfermedad. Hemos considerado recurrencia a un tumor que regresa al menos 6 meses después del tratamiento del tumor primario sin evidencia de tumor en exámenes radiológicos (TC y/o RM) y el examen endoscópico. El concepto de enfermedad residual mínima (ERM) se refiere a la persistencia de un pequeño número de células malignas (detectables con técnicas convencionales) después del tratamiento. La ERM es especialmente relevante en tumores de senos nasales en los que es problemático reconocer histopatológicamente los márgenes quirúrgicos debido a su proximidad a estructuras neurovasculares críticas. Por ello, consideramos tumores residuales aquellos que aparecen en los primeros 6 meses tras la cirugía. En cuanto al estándar para considerar una neoplasia maligna como segundo tumor primario, la mayoría de los estudios se basan en los criterios de Warren et al. (1932): 1. Ambos tumores son malignos; 2. Los tumores son histológicamente distintos; y 3. Se excluye que uno sea una metástasis del

otro. Hong et al. (1990) introdujeron el criterio de la distancia desde el tumor primario para distinguir las recidivas de los segundos tumores primarios. Así, una recidiva local se encuentra a menos de 2 cm del sitio de origen del tumor primario. Sin embargo, todo parece mucho más complicado y debería tenderse a abandonar estos conceptos puramente clínicos. Además, del mal pronóstico, en cánceres raros como los adenocarcinomas nasosinusales, la introducción de terapias dirigidas es un desafío por la falta de disponibilidad de ensayos clínicos. Identificar las alteraciones genéticas presentes en los adenocarcinomas del seno nasal recurrentes y/o metastásicos puede facilitar la aplicación de la oncología de precisión al manejo de estos pacientes.

En este contexto, probamos, a partir de 10 pacientes con adenocarcinoma nasosinusal, los tumores primarios y sus posibles recidivas/segundos tumores primarios a través de un panel NGS de genes procesable para explorar si las muestras de tumores del mismo paciente están relacionadas clonalmente o no, si su histología cambia o permanece igual, y si tienen dianas terapéuticas alternativas a los tratamientos convencionales.

En cuanto a la comparación histológica entre tumores primarios y recidivas, es curioso que casi todos los casos muestran cambios significativos entre las dos muestras, ya sea por pérdida o ganancia de predominio de algún subtipo histológico, o por un cambio drástico en la histología. Solo 2/10 (20%) de los tumores tienen histología equivalente en ambas muestras: caso 3, ITAC papilar colónico mixto con 3 años de diferencias entre las muestras y caso 10, ITAC colónico con 1 año de diferencia entre tumor primario y recidiva.

En cuanto al resto de casos, los 2 pacientes cuyas muestras presentan mayor lapso de tiempo entre sí (casos 9 y 13, 9 y 10 años respectivamente), presentan el cambio más drástico entre la histología del tumor primario y la recidiva (Figura 4). El primero va de un subtipo ITAC colónico en tumor primario a mucinoso en recidiva y el segundo va de un tumor primario mixto colónico-papilar a una recidiva mucinosa. En el caso 9, el paciente desarrolló 9 recidivas y 1 metástasis cerebral durante 11 años de seguimiento, y la muestra de recidivas que analizamos corresponde a la séptima recidiva. La histología ha ido cambiando constantemente entre mucinosa, papilar y colónica. Sin embargo, el caso 13 es completamente diferente, la recidiva



analizada es la primera que desarrolla el paciente tras 10 años libre de enfermedad, constituyendo uno de los casos en los que cobra más fuerza la duda sobre la posibilidad de que la recidiva sea en realidad un segundo primario.

En cuanto a los resultados del análisis del panel de secuenciación (Figura 7), las diferencias entre los tumores primarios y las recurrencias son mucho menores. De las 35 mutaciones cribadas, 31 están presentes en tumores primarios y de estas solo 1 (LRP1B P4175T) no aparece en su correspondiente recidiva, lo que indica que se trata de una mutación pasajera innecesaria para la supervivencia y propagación del tumor. Por el contrario, todos los pares tumor primario/recidiva tienen al menos dos mutaciones en común, lo que indicaría un origen clonal común y descartaría la presencia de segundos tumores primarios en nuestra serie. Las 4 mutaciones que aparecen de novo en REC aparecen en tres casos diferentes (Casos 9,11, y 15) y este hecho no parece estar relacionado con una mayor divergencia histológica entre muestras. Las 2 mutaciones que debutan en la recidiva del caso 15 también se detectaron en la metástasis ganglionar, lo que puede indicar que el subclon portador de estas alteraciones tiene una mayor potencia de diseminación.

Estos resultados revelan que los cambios histológicos observados no se deben a alteraciones genéticas, sino que es más probable que estén involucrados mecanismos epigenéticos y postranscripcionales. También observamos este mismo patrón genético en el caso 11, mixto ITAC-SNEC. En el tumor primario con dos tipos de tumores que ocurren simultáneamente, la única mutación que encontramos fue TP53 R280L. Pudimos extraer ADN de un bloque FFPE de cada componente tumoral por separado (tumor primario ITAC y tumor primario SNEC) y confirmamos que ambos tenían la mutación presente (Figura 6.B), lo que indica el mismo origen clonal para dos tipos diferentes de tumor nasosinusal.

La heterogeneidad de las alteraciones encontradas, como en los estudios previos (32), dificulta encontrar dianas terapéuticas generalizadas para estos tumores y pone de manifiesto la necesidad de aplicar estrategias de medicina de precisión individualizadas. Sin embargo, el alto grado de similitud

mostrado a nivel genético en los pares tumor primario/recidiva podría ser aprovechado para la aplicación de terapias dirigidas en estos pacientes.

Los ITAC son tumores muy recurrentes y la aplicación de un panel de secuenciación o secuenciación del exoma completo para detectar mutaciones procesables en muestras de tumores primarios nos brindaría opciones terapéuticas reales para tratar las recidivas en estos mismos pacientes. La presencia de la mutación o mutaciones puede confirmarse mediante una simple secuenciación de Sanger en una biopsia de la recidiva y podría ser una gran revolución en el tratamiento de los pacientes con tumores raros sin acceso a ensayos clínicos convencionales.

## **6. CONCLUSIÓN**

Aunque los tumores primarios de los ITAC suelen tener una histología muy diferente en las recidivas, la presencia de las mismas alteraciones genéticas indica que estamos hablando de la misma entidad tumoral. Ello descartaría la presencia de segundos primarios incluso en casos con un lapso de tiempo significativo entre ellos. Sin embargo, este dato curioso puede ayudarnos a aplicar nuevos sistemas diagnósticos y de tratamientos a pacientes que no tienen acceso a ensayos clínicos y cuyo tratamiento suele consistir en cirugía y radioterapia.

## 7. PROYECTO A FUTURO

En base a los resultados obtenidos:

- Confirmaremos y Estudiaremos en profundidad dichos hallazgos en muestras mayores.
- Realizar un estudio NGS basado en secuenciación de exoma completo (WES) para encontrar nuevas o diferentes alteraciones genéticas procesables en tumores recidivantes de senos paranasales, en comparación con las ya encontradas en este estudio en las que utilizamos un panel de 131 genes. Al comparar las recidivas con los tumores primarios correspondientes, podremos evaluar posibles diferencias genéticas, ya sea causadas por la evolución clonal o por la posibilidad de que la recurrencia sea en realidad un segundo tumor primario, al realizar WES se espera que se maximicen estos resultados.
- Además, seguiremos investigando el posible papel de las mutaciones que predisponen a tumores hereditarios en el ADN de la línea germinal de la misma cohorte de pacientes. Los resultados contribuirán a nuevas opciones de tratamiento para mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer nasosinusal recidivante.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Llorente JL, López F, Suárez C, Hermsen MA. Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat Rev Clin Oncol*. agosto de 2014;11(8):460-72.
2. Turner JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck*. junio de 2012;34(6):877-85.
3. Luis Llorente J, Núñez F, Pablo Rodrigo J, Fernández León R, Álvarez C, Hermsen M, et al. Adenocarcinomas nasosinusales: nuestra experiencia. *Acta Otorrinolaringológica Esp*. 1 de mayo de 2008;59(5):235-8.
4. Llorente JL, Pérez-Escuredo J, Alvarez-Marcos C, Suárez C, Hermsen M. Genetic and clinical aspects of wood dust related intestinal-type sinonasal adenocarcinoma: a review. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. enero de 2009;266(1):1-7.
5. Pérez-Escuredo J, Martínez JG, Vivanco B, Marcos C, Suárez C, Llorente JL, et al. Wood dust-related mutational profile of TP53 in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 1 de noviembre de 2012;43(11):1894-901.
6. Barnes L. Schneiderian papillomas and nonsalivary glandular neoplasms of the head and neck. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. marzo de 2002;15(3):279-97.
7. Duprez F, Madani I, Morbée L, Bonte K, Deron P, Domján V, et al. IMRT for sinonasal tumors minimizes severe late ocular toxicity and preserves disease control and survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 de mayo de 2012;83(1):252-9.
8. Vivanco Allende B, Perez-Escuredo J, Fuentes Martínez N, Fresno Forcelledo MF, Llorente Pendás JL, Hermsen M. Adenocarcinomas

- nasosinuales tipo intestinal. Perfil inmunohistoquímico de 66 casos. *Acta Otorrinolaringológica Esp.* 1 de marzo de 2013;64(2):115-23.
9. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep.* 2015;3(4):158-65.
  10. Nicolai P, Schreiber A, Bolzoni Villaret A, Lombardi D, Morassi L, Raffetti E, et al. Intestinal type adenocarcinoma of the ethmoid: Outcomes of a treatment regimen based on endoscopic surgery with or without radiotherapy. *Head Neck.* abril de 2016;38 Suppl 1:E996-1003.
  11. Holmila R, Cyr D, Luce D, Heikkilä P, Dictor M, Steiniche T, et al. COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *Int J Cancer.* 1 de mayo de 2008;122(9):2154-9.
  12. Hermsen MA, Riobello C, García-Marín R, Cabal VN, Suárez-Fernández L, López F, et al. Translational genomics of sinonasal cancers. *Semin Cancer Biol.* 1 de abril de 2020;61:101-9.
  13. Udager AM, McHugh JB, Goudsmit CM, Weigelin HC, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ, et al. Human papillomavirus (HPV) and somatic EGFR mutations are essential, mutually exclusive oncogenic mechanisms for inverted sinonasal papillomas and associated sinonasal squamous cell carcinomas. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 de febrero de 2018;29(2):466-71.
  14. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev.* enero de 2018;62:50-60.
  15. Syrjänen K, Syrjänen S. Detection of human papillomavirus in sinonasal papillomas: systematic review and meta-analysis. *The Laryngoscope.* enero de 2013;123(1):181-92.

16. Díaz-Molina JP, Llorente JL, Vivanco B, Martínez-Cambolor P, Fresno MF, Pérez-Escuredo J, et al. Wnt-pathway activation in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Rhinology*. diciembre de 2011;49(5):593-9.
17. López F, García Inclán C, Pérez-Escuredo J, Alvarez Marcos C, Scola B, Suárez C, et al. KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer. *Oral Oncol*. agosto de 2012;48(8):692-7.
18. Licitra L, Resteghini C, Bossi P. The Evolving Role of Systemic Therapy in the Primary Treatment of Sinonasal Cancer. *Adv Otorhinolaryngol*. 2020;84:78-86.
19. Youlden DR, Cramb SM, Peters S, Porceddu SV, Møller H, Fritschi L, et al. International comparisons of the incidence and mortality of sinonasal cancer. *Cancer Epidemiol*. 1 de diciembre de 2013;37(6):770-9.
20. Zimmermann G, Papke B, Ismail S, Vartak N, Chandra A, Hoffmann M, et al. Small molecule inhibition of the KRAS-PDE $\delta$  interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature*. 30 de mayo de 2013;497(7451):638-42.
21. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*. 19 de febrero de 2019;18(1):26.
22. Stein EM, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Swords RT, Roboz GJ, et al. Enasidenib (AG-221), a Potent Oral Inhibitor of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 2 (IDH2) Enzyme, Induces Hematologic Responses in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS). *Blood*. 2 de diciembre de 2016;128(22):343.
23. Kamel D, Gray C, Walia JS, Kumar V. PARP Inhibitor Drugs in the Treatment of Breast, Ovarian, Prostate and Pancreatic Cancers: An Update of Clinical Trials. *Curr Drug Targets*. 2018;19(1):21-37.

24. Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, Liétin B, Marandas P, et al. Adenocarcinoma of Ethmoid: A GETTEC Retrospective Multicenter Study of 418 Cases. *The Laryngoscope*. 2008;118(3):437-43.
25. Hoeben A, van de Winkel L, Hoebbers F, Kross K, Driessen C, Slootweg P, et al. Intestinal-type sinonasal adenocarcinomas: The road to molecular diagnosis and personalized treatment. *Head Neck*. octubre de 2016;38(10):1564-70.
26. Ansa B, Goodman M, Ward K, Kono SA, Owonikoko TK, Higgins K, et al. Paranasal sinus squamous cell carcinoma incidence and survival based on Surveillance, Epidemiology, and End Results data, 1973 to 2009. *Cancer*. 15 de julio de 2013;119(14):2602-10.
27. Camp S, Van Gerven L, Poorten VV, Nuyts S, Hermans R, Hauben E, et al. Long-term follow-up of 123 patients with adenocarcinoma of the sinonasal tract treated with endoscopic resection and postoperative radiation therapy. *Head Neck*. febrero de 2016;38(2):294-300.
28. Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, Liétin B, Marandas P, et al. Role of radiotherapy in the treatment of nasoethmoidal adenocarcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. febrero de 2010;136(2):143-6.
29. Chen MM, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. Predictors of Survival in Sinonasal Adenocarcinoma. *J Neurol Surg Part B Skull Base*. junio de 2015;76(3):208-13.
30. Suarez C, Llorente JL, Fernandez De Leon R, Maseda E, Lopez A. Prognostic factors in sinonasal tumors involving the anterior skull base. *Head Neck*. febrero de 2004;26(2):136-44.
31. Fiaux-Camous D, Chevret S, Oker N, Turri-Zanoni M, Lombardi D, Choussy O, et al. Prognostic value of the seventh AJCC/UICC TNM classification of intestinal-type ethmoid adenocarcinoma: Systematic review and risk prediction model. *Head Neck*. abril de 2017;39(4):668-78.

32. Sánchez-Fernández P, Riobello C, Costales M, Vivanco B, Cabal VN, García-Marín R, et al. Next-generation sequencing for identification of actionable gene mutations in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Sci Rep.* 26 de enero de 2021;11(1):2247.
33. L B, JW E, P R, D S. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours [Internet]. [citado 4 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Pathology-And-Genetics-Of-Head-And-Neck-Tumours-2005>



## ANEXOS

### ANEXO 1: Clasificación ACNS

CLASIFICACIÓN TNM PARA CARCINOMAS DE LA CAVIDAD NASAL Y SENO ETMOIDAL	
<b>TX</b>	No se puede asegurar
<b>T0</b>	No hay evidencia
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor que afecta a una sola sublocalización con o sin invasión ósea
<b>T2</b>	Tumor que afecta a 2 sublocalizaciones en una sola región o que invade una región adyacente etmoidal, con o sin invasión ósea
<b>T3</b>	Tumor que invade el suelo o la pared medial de la órbita, seno maxilar, lámina cribosa o paladar
<b>T4a</b>	Tumor que invade cualquiera de las siguientes regiones: contenido orbitario anterior, piel de la nariz o mejilla, extensión leve a la fosa craneal anterior, apófisis pterigoides, seno frontal o seno esfenoidal.
<b>T4b</b>	Tumor que invade cualquiera de las siguientes regiones: Ápex orbitario, cerebro, duramadre, fosa craneal media, nervios craneales, nasofaringe o clivus.

AFECTACIÓN DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS	
<b>NX</b>	No se puede asegurar su existencia
<b>N0</b>	Ausencia de ganglios metastásicos
<b>N1</b>	Metástasis en un único ganglio linfático ipsilateral ≤ 3cm
<b>N2a</b>	Metástasis en único ganglio linfático ipsilateral de > 3 cm pero < 6 cm
<b>N2b</b>	Múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno > de 6 cm
<b>N2c</b>	Ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales ninguno > 6 cm
<b>N3</b>	Ganglio linfático de > 6 cm

METÁSTASIS A DISTANCIA	
<b>MX</b>	No se puede asegurar su existencia
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis
<b>M1</b>	Presencia de metástasis

ESTADIOS			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
Estadio IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Estadio IVb	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IVc	Cualquier T	Cualquier N	M1

## **ANEXO 2: Lista de los 131 genes que componen el panel**

ALK	CDKN1A	FBW7	INPP4B	NF1	RET	KMT2B
APC	CDKN1B	FBXW7	JAK1	NF2	RET-PTC1	KMT2C
AR	CDKN2A	FGFR1	JAK2	NFKB2	ROS1	KMT2D
ARAF	CDKN2B	FGFR2	JAK3	NOTCH1	SH2B3	OTX1
ATM	CDKN2C	FGFR3	KIT	NOTCH2	SMO	OTX2
ATR	COL1A1-PDGFRB	FLT3	KRAS	NOTCH3	SOCS1	PRDM2
AURKA	CRLF2	FOXA1	LRP1B	NPM1	STAG2	PRDM9
BAP1	CSF1R	FOXL2	MAP2K1	NRAS	STK11	PRDM14
BCL2L1	CSF3R	FOXP1	MAP2K2	NTRK1	TMPRSS2-ERG	SETD1A
BCR-ABL1	CTNNB1	GNA11	MAP2K4	PALB2	TMPRSS2-ETV1	SETD1B
BCR-JAK2	DDR2	GNAQ	MCL1	PDGFRA	TSC1	SETD2
BRAF	DNMT3A	HGF	MDM2	PIK3CA	TSC2	TP53
BRCA1	EGFR	HRAS	MET	PIK3R1	AKT	
BRCA2	EPHA2	IDH1	MGMT	PIK3R2	AKT1	
BRD4	ERBB2	IDH2	MITF	PML-RARA	AKT3	
CBL	ERBB3	IGF1	MLL	PTCH1	ETV4	
CCND1	ERBB4	IGF1R	MPL	PTEN	EWSR1	
CCNE1	ERCC1	IGF2	mTOR	RAC1	NFKB1	
CDK4	ERS1	IL10	MYCN	RAF1	AKT2	
CDK6	EZH2	IL7R	MYD88	RB1		