



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Programa de doctorado: Biomedicina y Oncología molecular

**“Mutaciones en Adenocarcinomas
Nasosinusales: el papel de la secuenciación
de nueva generación”**

TESIS DOCTORAL

Paula Sánchez Fernández



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Programa de doctorado: Biomedicina y Oncología molecular

**“Mutaciones en Adenocarcinomas
Nasosinusales: el papel de la secuenciación
de nueva generación”**

TESIS DOCTORAL

Autor

Paula Sánchez Fernández

Directores

Dr. D. José Luis Llorente Pendás

Dr. D. Mario Hermsen

RESUMEN DEL CONTENIDO DE LA TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: “Mutaciones en Adenocarcinomas Nasosinusales: el papel de la secuenciación de nueva generación”	
Inglés: “Mutations in Sinonasal Adenocarcinomas: the role of Next-Generation Sequencing”	

2.- Autor	
Nombre: Paula Sánchez Fernández	DNI/Pasaporte
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología molecular	
Órgano responsable: Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA)	

RESUMEN (en Español)

<p>Los ITAC tienen una baja incidencia, de 0,003 por cada 100.000 habitantes/año y un mal pronóstico, con una alta tasa de recidivas locales que condiciona una supervivencia global del 65% a los 5 años. Su tratamiento se basa fundamentalmente en la cirugía y la radioterapia con una mala respuesta, en general, a las quimioterapias actuales.</p> <p>La necesidad de mejorar el control local, aumentar la supervivencia y preservar la función del órgano nos ha llevado a buscar nuevas opciones terapéuticas. Hasta ahora, las clasificaciones basadas en la histopatología se han mostrado poco útiles a la hora de plantear tratamientos personalizados y los estudios genéticos en ITAC son escasos por la dificultad para organizar ensayos clínicos y conseguir series amplias.</p> <p>Hipótesis. Considerando que el cáncer es una enfermedad genética, todos los tumores podrían tener alteraciones genético-moleculares que sirvieran como dianas de terapias biológicas, es decir, que les hicieran sensibles a inhibidores específicos (anticuerpos monoclonales y moléculas pequeñas).</p> <p>Objetivo. El objetivo global de este trabajo fue el diseño y análisis de un panel de 119 genes “accionables” para ampliar las alternativas terapéuticas disponibles en ITAC.</p> <p>Material y método. Se obtuvieron prospectivamente 48 muestras de ITAC y 24 muestras de sangre para el estudio germinal de pacientes intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Universitario Central de Asturias entre 1998 y 2014. Se diseñó un panel de 119 genes cuyas mutaciones pudieran predecir la sensibilidad o resistencia a terapias o bien ser dianas de fármacos específicos. El ADN de las muestras fue secuenciado con el sistema MiSeq (Illumina Inc.). Los resultados fueron filtrados bioinformáticamente y comparados con la línea germinal en 27 casos. El análisis estadístico se efectuó</p>
--

mediante el programa R con un nivel de significación empleado en todo el análisis de 0,05.

Resultados. En los 48 ITAC, se obtuvieron un total de 216 mutaciones en 69 de los 119 genes. El estudio de la línea germinal en 27 de los ITAC permitió confirmar como mutaciones somáticas el 40% (52/131). Los genes mutados fueron agrupados de acuerdo con las vías de señalización más frecuentemente afectadas; 7 casos (26%) con mutaciones en la vía RAS-RAF-MEK-ERK (2 *NF1*, 3 *KRAS*, 1 *BRAF* y 1 *NF1-MAP2K1*), 7 casos (26%) con mutaciones en la vía de reparación del ADN por Recombinación Homóloga (3 *ATM*, 3 *BRCA1* y 1 *ATM-BRCA2*), 6 casos (22%) con mutaciones en la vía PI3K-AKT-mTOR (1 *PIK3CA*(x2)-*PIK3R2*, 4 *PIK3CA*, 1 *MTOR*) y 6 casos (22%) con mutaciones en la vía Wnt/ β -catenina (4 *APC* y 2 *CTNNB1*). También encontramos mutaciones somáticas potencialmente patogénicas en los genes que codifican para varios receptores tirosina quinasa como *KIT* (4%; 1/27), *ROS1* (4%; 1/27), *DDR2* (4%; 1/27), *ERBB2*, *ERBB3* y *ERBB4* (15%; 4/27) sin encontrar mutaciones en EGFR.

Aquellos ITAC con mutaciones en la ruta Wnt mostraron un menor número de recidivas a lo largo del seguimiento (p valor=0.03) aunque sin repercusión en la supervivencia. Las mutaciones en la vía RAS-RAF-MEK-ERK, a pesar de estar presentes en los subtipos papilar y colónico, se relacionaron de forma significativa con un peor pronóstico (SG: HR=1.150; 95%IC=1.028-1.287; p valor=0.015) y las mutaciones en la vía de la Recombinación Homóloga definieron un subgrupo de ITAC con mejor pronóstico (SG: HR=0.207; 95%IC=0.049-0.871; p valor=0.032).

Quince variantes de las confirmadas como somáticas y potencialmente patogénicas estaban asociadas, según OncoKB, con terapias contra el cáncer en el 41% (11/27) de los ITAC.

Conclusiones. Los resultados del estudio de este panel muestran un potencial beneficio de terapias alternativas en el 41% de los pacientes con ITAC. Debe considerarse especialmente el estudio de genes que codifican para proteínas de las vías de señalización RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT-mTOR, Wnt/ β -catenina y Recombinación Homóloga realizando co-análisis con la línea germinal para una buena interpretación de los resultados.

RESUMEN (en Inglés)

ITACs have a low incidence of 0,003 per 100.000 population/year and a poor prognosis, with a high rate of local recurrences that conditions an overall survival of 65% at 5 years. Its treatment is mainly based on surgery and radiotherapy with, usually, a poor response to current chemotherapies.

The need to improve local control, increase survival and preserve organ function has led us to seek new therapeutic options. Until now, histopathology-based classifications have been of little use in proposing personalized treatments and genetic studies in ITAC are scarce due to the difficulty to organize clinical trials and obtaining big series.

Hypothesis. Considering that cancer is a genetic disease, all tumors could have genetic-molecular alterations that serve as targets for biological therapies, meaning that they make them sensitive to specific inhibitors (monoclonal antibodies and small molecules).

Objective. The overall objective of this work was the design and analysis of a panel of 119 actionable genes to expand the therapeutic alternatives available at ITAC.

Material and method. 48 ITAC samples and 24 blood samples for the germline study were prospectively obtained from patients operated on at the Central University Hospital of Asturias between 1998 and 2014. A panel of 119 genes was designed whose mutations could predict sensitivity or resistance to therapies or to be specific drug targets. The DNA of the samples was sequenced with the MiSeq system (Illumina Inc.). The results were bioinformatically filtered and compared with the 27 cases germline. Statistical analysis was carried out using the R program with a significance level of 0.05.

Results. In 48 ITACs, a total of 216 mutations were obtained in 69 of the 119 genes. The germline study in 27 of ITACs confirmed 40% (52/131) somatic mutations. The mutated genes were grouped according to the most frequently affected signaling pathways; 7 cases (26%) with mutations in the RAS-RAF-MEK-ERK pathway (2 *NF1*, 3 *KRAS*, 1 *BRAF* and 1 *NF1-MAP2K1*), 7 cases (26%) with mutations in the DNA repair pathway due to Homologous Recombination (3 *ATM*, 3 *BRCA1* and 1 *ATM-BRCA2*), 6 cases (22%) with mutations in the PI3K-AKT-mTOR pathway (*IPIK3CA[x2]-PIK3R2*, 4 *PIK3CA*, 1 *MTOR*) and 6 cases (22 %) with mutations in the Wnt / β -catenin pathway (4 *APC* and 2 *CTNNB1*). We also found potentially pathogenic somatic mutations in the genes that code for various receptor tyrosine kinase such as KIT (4%; 1/27), ROS1 (4%; 1/27), DDR2 (4%; 1/27), ERBB2, ERBB3 and ERBB4 (15%; 4/27) without finding EGFR mutations.

Those ITACs with Wnt pathway mutations showed a lower number of recurrences throughout the follow-up (p -value = 0.03), although with no impact on survival. Mutations in the RAS-RAF-MEK-ERK pathway, despite being present in the papillary and colonic subtypes, were significantly associated with a worse prognosis (OS: HR = 1,150; 95% CI = 1,028-1,287; p -value = 0.015) and mutations in the Homologous Recombination pathway defined a subgroup of ITAC with better prognosis (OS: HR = 0.207; 95% CI = 0.049-0.871; p -value = 0.032).

According to OncoKB fifteen variants of those confirmed as somatic and potentially pathogenic were associated with cancer therapies in 41% (11/27) of ITACs.

Conclusions. The results of the study of this panel show a potential benefit of alternative therapies in 41% of patients with ITACs. The study of genes that code for proteins of the RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT-mTOR, Wnt / β -catenin and Homologous Recombination signaling pathways should be especially considered, performing co-analysis with the germline for a good interpretation of results.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

Agradecimientos

Cuando apenas tenía 17 años, leí en el periódico una entrevista dirigida al premio Nobel de Medicina de 2007, Mario Capecchi, un conocido genetista molecular italiano nacido en 1937 y premiado por sus trabajos pioneros en el campo de la manipulación genética de animales en modelos de cáncer. De familia de artistas, muy alejados del mundo de la ciencia y que sufrió profundamente las consecuencias de la llegada del fascismo a Italia. Su padre falleció y su madre fue arrestada por la Gestapo y enviada a un campo de concentración en Dachau por haber publicado folletos antifascistas, cuando él apenas tenía 5 años. Se quedó en la calle y estuvo vagando por la carretera entre Bolzano y Verona entre pandillas juveniles italianas para comer. “En los caseríos, en las ciudades que atravesábamos en el camino hacia el sur, intentaban cogernos y nosotros nos escondíamos en toneles vacíos, en los establos, cambiando de lugar continuamente”. Su madre, tras haber sobrevivido a Dachau, y cuando los americanos liberaron el campo de concentración, regresó a Italia para buscarle, encontrándolo en un hospital luchando frente al tifus. Decidieron emigrar a Nueva York, junto con otros refugiados, donde su tío, por entonces profesor de la facultad de Física, le llevó a Princeton. “En esa época, todavía estaba allí Einstein, y recuerdo haberlo visto. Pero por aquel entonces qué sabía yo de Einstein”.

Comenzó a leer a los 13 años, pero ya sabía “la ciencia de la calle”. Él dice que lo que aprendió en la calle con aquellos ladronzuelos le sirvió después como investigador; una cierta intuición del porvenir. En la calle aprendió a confiar en sí mismo, su mente era su entretenimiento. “Cuando vivía solo tuve que usar mucho mi cerebro, para encontrar donde dormir, qué comer y cómo cuidarme. Eso sustituyó en parte mi ausencia en la escuela. Creo que es importante que la gente encuentre qué le apasiona, qué es lo que le gusta, qué le hace pensar. Debe perseguir eso, y así alcanzar su objetivo”. “En vez de pasar tanto tiempo pensando en algo, es mucho mejor ir y hacerlo. No hay que darle tanta vuelta, hay que empezar por algo”.

Por entonces yo ya sabía que mi pasión era la medicina, siempre de la mano de la investigación. Ya tenía la idea, ya tenía el camino hacia donde quería ir. Aquellas palabras de aquel gran científico siguen presentes en mí día a día. Quién iba a decirme que después de tantos años sería yo quien escribiera humildemente sobre genética en el cáncer haciendo lo que me apasiona. Y como él decía: “ahora existe una sensación de que la gratificación tiene que ser inmediata. La gratificación es algo que lleva mucho tiempo, esfuerzo, dedicación y paciencia. Y por eso es gratificante cuando llega”.

Con esta historia, cobran aún más sentido mis agradecimientos a todos los que me han acompañado y guiado en mi formación científica y en el intenso trabajo que ha supuesto realizar esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, a mis directores de tesis:

Al Dr. Mario Hermsen por haberme guiado desde cero en el camino de la oncología molecular, con gran paciencia y sabiduría.

Al Dr. José Luis Llorente Pendás, ejemplo de excelencia y humildad conjunta, por haber confiado en mí para este proyecto, por haber respetado y tenido en cuenta mis opiniones aún sin pulir y por haberme guiado de forma incansable en toda mi formación. Hoy y siempre, gracias de todo corazón.

A mi tutor, el Dr. César Álvarez Marcos por su inteligencia e ingenio sin límites, por ser el mejor docente que conozco, y mejor persona. A mis compañeros y amigos del Instituto de Medicina Oncológica y Molecular de Asturias (IMOMA) y de la Fundación para la Investigación y la Innovación Biosanitaria del Principado de Asturias (FIMBA), en especial a D^a Cristina Riobello Suárez por enseñarme el trabajo fuera de mi entorno clínico, por haber sabido entenderme aun hablando un lenguaje científico distinto, por apoyarme y ayudarme siempre y porque sin ella, este trabajo no hubiera sido posible. A la Dra. Blanca Vivanco Allende quien me proporcionó las excelentes fotografías anatomopatológicas de este trabajo. A la Unidad de Consultoría Estadística de la Universidad de Oviedo, y de forma muy especial a D^a Tania Iglesias Cabo quien ha dado rigor estadístico a los resultados de esta tesis y me ha acompañado telemáticamente en los meses más difíciles.

A mi familia, a quien debo la vida y el haber podido formarme en lo que me apasiona. A mi padre; D^o Julio Sánchez Lorenzo por dotarme de “la raza” que necesito para esta profesión, por enseñarme lo que es el trabajo duro y por apoyarme siempre. A mi madre; D^a Carmen Fernández Rubio por ser mi confidente, por abrazarme cuando más lo he necesitado y por estar siempre. A mis hermanas, Carmen y Cristina por compartir conmigo las caídas y los éxitos, aunque eso suponga escucharme hablar de genes durante horas. Por darme a mis dos sobrinas, Carmen y Claudia cuyas sonrisas fueron aliento para seguir. A mi abuelo Segundo y a mi persona favorita, mi abuela Ana, quien me miraba como nadie; por dentro y creyendo en mí, y a quienes dedico esta tesis allá donde estén. A mi compañero de vida, Salvador, por entender que esto era importante para mí, por la renuncia de estos años y por ser la viga de sostén cuando he flaqueado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 HISTOPATOLOGÍA	8
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	9
1.3 FACTORES DE RIESGO	10
1.4 CLÍNICA	11
1.5 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN	12
1.6 TRATAMIENTO	13
1.6.1 Cirugía	14
1.6.2 Radioterapia	15
1.6.3 Quimioterapia	15
1.6.4 Bioterapia e Inmunoterapia	17
1.7 SEGUIMIENTO	18
1.8 PRONÓSTICO	19
1.9 TUMORIGÉNESIS	20
1.9.1 Inflamación crónica e ITAC	20
1.9.2 Células madre e ITAC	21
1.9.2 Estudios genómicos de los ITAC en muestras tumorales	21
1.9.3 Estudios genéticos de los ITAC en muestras tumorales	22
2. HIPÓTESIS	25
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL Y MÉTODO	33
4.1 PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES	35
4.2 DISEÑO DEL PANEL	36

4.3	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN EN LAS MUESTRAS TUMORALES Y GERMINALES	38
4.4	CONSTRUCCIÓN Y CAPTURA DE BIBLIOTECAS	38
4.5	SECUENCIACIÓN	39
4.6	PROCESAMIENTO BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS DE SECUENCIACIÓN	39
4.6.1	Control de calidad y alineamiento	39
4.6.2	Identificación de variantes somáticas	40
4.6.3	Anotación y priorización de variantes relevantes	41
4.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
5.	RESULTADOS	45
5.1	DESCRIPCIÓN MUESTRAL	47
5.2	RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO	49
5.2.1	Análisis de supervivencia en los 48 ITAC	51
5.2.2	Análisis de supervivencia en el subgrupo de 27 ITAC: muestra tumoral/germinal	53
5.3	RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN	55
5.3.1	Agrupación de las variantes en rutas de señalización en el subgrupo de 27 ITAC	68
5.3.2	Estudio de la relación entre las variables clínicas y la presencia o número de mutaciones en el subgrupo de 27 ITAC	69
5.3.3	Estudio de la relación entre las variables clínicas y las diferentes rutas de señalización mutadas en el subgrupo de 27 ITAC	71
5.3.4	Estudio de la relación entre la recidiva tumoral y las diferentes rutas mutadas en el subgrupo de 27 ITAC	75
5.3.5	Estudio de la relación entre las diferentes vías de señalización y la supervivencia en el subgrupo de 27 ITAC: Test log-rank y Curvas Kaplan Meier	76

5.3.6	Estudio de la relación entre las diferentes variables y la supervivencia en el subgrupo de 27 ITAC: Modelo de regresión de Cox-----	80
6.	DISCUSIÓN-----	83
6.1	LA ONCOLOGÍA DE PRECISIÓN-----	86
6.1.1	Identificación y anotación de variantes generadas por NGS-----	88
6.2	COMPARACIÓN DE LA MUESTRA Y DATOS CLÍNICOS CON OTRAS SERIES DESCRITAS-----	93
6.3	RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN-----	95
6.3.1	Receptores tirosina quinasa en relación con las rutas MAPK y PI3K----	96
6.3.2	La vía MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK)-----	100
6.3.2.1	Comparación de nuestros resultados en la vía RAS-RAF-MEK-ERK con otras series-----	102
6.3.2.2	RAS-RAF-MEK-ERK como factor pronóstico-----	104
6.3.2.3	RAS-RAF-MEK-ERK como diana terapéutica-----	105
6.3.3	La vía PI3K-AKT-mTOR-----	106
6.3.3.1	Comparación de nuestros resultados en la vía PI3K-AKT-mTOR con otras series-----	110
6.3.3.2	PI3K-AKT-mTOR como factor pronóstico-----	112
6.3.3.3	PI3K-AKT-mTOR como diana terapéutica-----	112
6.3.4	La vía Wnt/ β -catenina-----	115
6.3.4.1	Comparación de nuestros resultados en la vía Wnt/ β -catenina con otras series-----	118
6.3.4.2	Wnt/ β -catenina como factor pronóstico-----	119
6.3.4.3	Wnt/ β -catenina como diana terapéutica-----	120
6.3.5	La vía de reparación del ADN (Recombinación Homóloga)-----	121
6.3.5.1	Comparación de nuestros resultados en la vía de Recombinación Homóloga con otras series-----	125

6.3.5.2	Recombinación Homóloga como factor pronóstico-----	126
6.3.5.3	Recombinación Homóloga como diana terapéutica-----	127
6.4	INTERPRETACIÓN DE VARIANTES-----	129
7.	LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS-----	135
8.	CONCLUSIONES-----	139
9.	ANEXOS-----	143
10.	BIBLIOGRAFÍA-----	147

ABREVIATURAS

- ACNS: Adenocarcinoma Nasosinusal.
- AJCC: American Joint Committee on Cancer.
- ATMi: ATM inhibitor (Inhibidor de ATM).
- ATRi: ATR Inhibitor (Inhibidor de ATR).
- BER: Base Excision Repair (Reparación por escisión de base).
- CCDS: Consensus Coding Sequence (Secuencia de codificación consenso)
- CCR: Cáncer Colorrectal.
- CECC: Carcinoma Escamoso Cabeza y Cuello.
- CENS: Carcinoma Epidermoide Nasosinusal.
- CGH: Comparative Genomic Hybridization (Hibridación genómica comparativa).
- CNA: Copy-Number Alteration (Alteración en el número de copias).
- CN-LOH: Copy-Number neutral Loss Of Heterozygosity (Pérdida de heterocigosidad).
- COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer).
- COX2: Ciclooxygenasa 2.
- CPNM: Carcinoma Pulmonar No Microcítico.
- CSCs: Cancer Stem Cells (Células madre del cáncer).
- dbSNP: database of Single Nucleotide Polymorphisms (Base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido)
- DSB: Double Strand Breaks (Roturas de doble cadena).
- EMA: European Medicines Agency (Agencia Europea del medicamento).
- EJR: End-Joining Repair (Reparación por unión de extremos).
- ESP: Exome Sequencing Project (Proyecto de secuenciación del exoma).
- ExAC: Exome Aggregation Consortium (Consortio de agregación de exomas)
- FDA: Food and Drugs Administration (Administración de medicamentos y alimentos).
- FISH: Fluorescent In Situ Hybridization (Hibridación fluorescente in situ).
- HGVS: Human Genome Variation Society (Sociedad de variación del genoma humano).
- HR: Homologous Recombination (Recombinación homóloga).
- HUGO: Human Genome Organization (Organización genoma humano).
- HVP: Human Variome Project (Proyecto humano variome).

- ICGC: International Cancer Genome Consortium (Consortio internacional del genoma del cáncer).
- IGRT: Image-Guided Radiation Therapy (Radioterapia guiada por imagen).
- IHQ: Inmunohistoquímica.
- IMRT: Intensity-Modulated Radiation Therapy (Radioterapia de intensidad modulada).
- Indels: inserciones y deleciones.
- iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido nítrico sintasa inducible).
- ITAC: Intestinal-Type Adenocarcinoma (Adenocarcinoma tipo intestinal).
- ITK: Inhibidor tirosina quinasa.
- LF: Linfoma Folicular.
- LLC: Leucemia Linfática Crónica.
- LLP: Linfoma Linfocítico Pequeño.
- LMC: Leucemia Mieloide Crónica.
- LNH: Linfoma No Hodgkin.
- VAF: Variant Allele Frequency (Frecuencia alélica de variante).
- MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases (Proteínas quinasa activadas por mitógenos).
- MLPA: Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (Amplificación de sondas tras ligación múltiple).
- MMR: Mismatch Repair (Reparación de errores de apareamiento).
- NER: Nucleotide Excision Repair (Reparación por escisión de nucleótido).
- NF-κB: Nuclear Factor κB (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa).
- NGS: Next- Generation Sequencing (Secuenciación de próxima generación).
- NITAC: Non-Intestinal-Type Adenocarcinoma (Adenocarcinoma tipo no intestinal).
- OncoKB: Precision Oncology Knowledge Base (Base de conocimientos de oncología de precisión).
- PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar.
- PARPi: PARP1 inhibitors (Inhibidores de PARP1).
- PCP: Polaridad Celular Planar.
- PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).
- PDL1: Programmed Death- Ligand 1 (Ligando 1 de muerte celular programada).
- PET: Positron Emission Tomography (Tomografía por emisión de positrones).
- Pfam: Protein families database (Base de datos de familias de proteínas).

- PI3K: Phosphatidyl- Inositol 3-Kinase (Fosfatidil-Inositol 3-quinasa).
- QRT: Quimioradioterapia.
- QRTc: Quimioradioterapia concomitante.
- QT: Quimioterapia.
- QTI: Quimioterapia de inducción.
- RefSeq: Reference Sequence database (Base de datos de secuencia de referencia).
- RMN: Resonancia Magnética Nuclear.
- RNS: Reactive Nitrogen Species (Especies reactivas de nitrógeno).
- ROS: Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno).
- RT: Radioterapia.
- RTK: Receptor Tyrosine Kinase (Receptor tirosina quinasa).
- SEE: Supervivencia Específica para Enfermedad.
- SG: Supervivencia Global.
- SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad.
- SNV: Single Nucleotide Variant (Variación de nucleótido único).
- TC: Tomografía Computarizada.
- TLE: Tiempo Libre de Enfermedad.
- TNF α : Tumor necrosis Factor α (Factor de necrosis tumoral α).
- TNM: Tumor-Nodes-Metástasis (Tamaño-ganglios-metástasis).
- TNS: Tumores Nasosinusales.
- UICC: Union for International Cancer Control (Unión para el control internacional del cáncer).
- VMAT: Volumetric-Modulated Arc Therapy (Terapia de arco volumétrico modulado).
- WHO: World Health Organization (Organización mundial de la salud).

1. INTRODUCCIÓN

Los tumores nasosinusales (TNS) difieren en etiología, epidemiología, características y perfil genético del resto de tumores de cabeza y cuello (laringe, faringe y cavidad oral). Por lo tanto, deben considerarse tumores malignos únicos dentro de las neoplasias de cabeza y cuello.

En la cavidad nasosinusal se pueden desarrollar una amplia variedad de tumores, con una de las mayores heterogeneidades del cuerpo humano y con diferentes comportamientos y características biológicas¹. De todas ellas, las neoplasias epiteliales son la forma predominante de malignidad representando el 50-90% de todos los TNS^{2,3}. Dentro de estas, el carcinoma epidermoide es el más frecuente (50-80%), seguido del adenocarcinoma (10-20%)⁴⁻⁷. Otros TNS son el neuroblastoma olfatorio, también conocido como estesioneuroblastoma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma indiferenciado y carcinoma neuroendocrino^{6,8}. Menos frecuentes son el melanoma primario de la mucosa nasal, diferentes tipos de sarcoma, tumores hematolinfoides, tumores de células germinales y metástasis de tumores primarios de otras partes del cuerpo⁹.

El carcinoma epidermoide nasosinusal (CENS) ocurre predominantemente en el seno maxilar y la cavidad nasal. El adenocarcinoma nasosinusal (ACNS) de tipo intestinal (ITAC) y el estesioneuroblastoma surgen casi exclusivamente del epitelio respiratorio o células glandulares que recubren la hendidura olfatoria del seno etmoidal^{2,10}. Los demás tipos de tumores nasosinusales pueden desarrollarse en cualquier lugar dentro de la cavidad nasosinusal, aunque los tumores con la localización en el seno frontal y esfenoidal son raros³.

El presente trabajo se basa en el estudio de los ITAC. Su patogenia es desconocida, pero se relaciona con la exposición ocupacional al polvo de madera y cuero por lo que es considerado de gran importancia en salud laboral. El tratamiento estándar actual es la cirugía y la radioterapia, pero la supervivencia global a los 5 años, aunque ha aumentado en los últimos años, se mantiene aún baja (64-69%)^{4,11-13} y la quimioterapia convencional (Cisplatino, 5-Fluorouracilo, Taxanos, etc.) aún no ha aportado resultados concluyentes. De ahí surge la necesidad de desarrollar y estudiar el uso de nuevos fármacos o moléculas alternativas en el tratamiento neoadyuvante, concomitante o adyuvante de estos tumores.

1.1 HISTOPATOLOGÍA

La clasificación más empleada para los ACNS es la de la “World Health Organization (WHO)”, 4.a edición,¹, que los divide en dos categorías: tipo intestinal (ITAC, Intestinal-Type-AdenoCarcinoma) y tipo no intestinal (NITAC, Non-Intestinal-Type-AdenoCarcinoma). Los ITAC son con mucho los adenocarcinomas más frecuentes e histológicamente son casi idénticos al adenocarcinoma intestinal, de ahí su nombre^{14,15}.

En cuanto a los subtipos histológicos, la clasificación más frecuentemente empleada, por su simplicidad, es la propuesta por Barnes¹⁶ que los divide en cinco categorías (Figura 1): papilar (18%), colónico (40%), sólido (20%), mucinoso (22%) y mixto (22%). Otra clasificación es la sugerida por Kleinsasser y Schroeder¹⁷ que los divide en cuatro categorías: papilar-tubular de células cilíndricas tipos I-III (I: bien diferenciado, II: moderadamente diferenciado y III: pobremente diferenciado), alveolar con células “caliciformes”, con células en anillo de sello y transicional.

Un rasgo característico que pueden tener todos los subtipos histológicos es la diferenciación o reprogramación del epitelio nasosinusal hacia un epitelio intestinal, que incorpora células reabsortivas, caliciformes, neuroendocrinas y de Paneth. El diagnóstico diferencial incluye una localización secundaria de adenocarcinoma colorrectal y NITAC de bajo grado¹⁸.

La tinción inmunohistoquímica indica que los ITAC son positivos para CK20, CDX-2, Villina y MUC2, como el adenocarcinoma colónico, pero son positivos de manera variable y típica para CDK7, Cromogranina A y Sinaptofisina¹⁸⁻²¹. Recientemente, el factor epigenético SATB-2 fue identificado como un marcador adicional para ITAC²².

No existe una lesión precursora definida, pero se ha planteado la hipótesis de que el desarrollo de los ITAC parte de la metaplasia intestinal del epitelio respiratorio y/o glandular. Se han observado áreas de metaplasia escamosa en la vecindad del tumor asociando, en ocasiones, cambios displásicos, de forma similar a lo que ocurre en el esófago de Barret o en la displasia gástrica^{23,24}.

También se ha observado la expresión de TP53, que está ausente en el epitelio respiratorio normal, en la metaplasia escamosa, y parece estar relacionada con la exposición al polvo de madera y cuero^{23,24}. Además, la metaplasia escamosa puede albergar la misma mutación del gen TP53 que está presente en el ITAC adyacente²⁴.

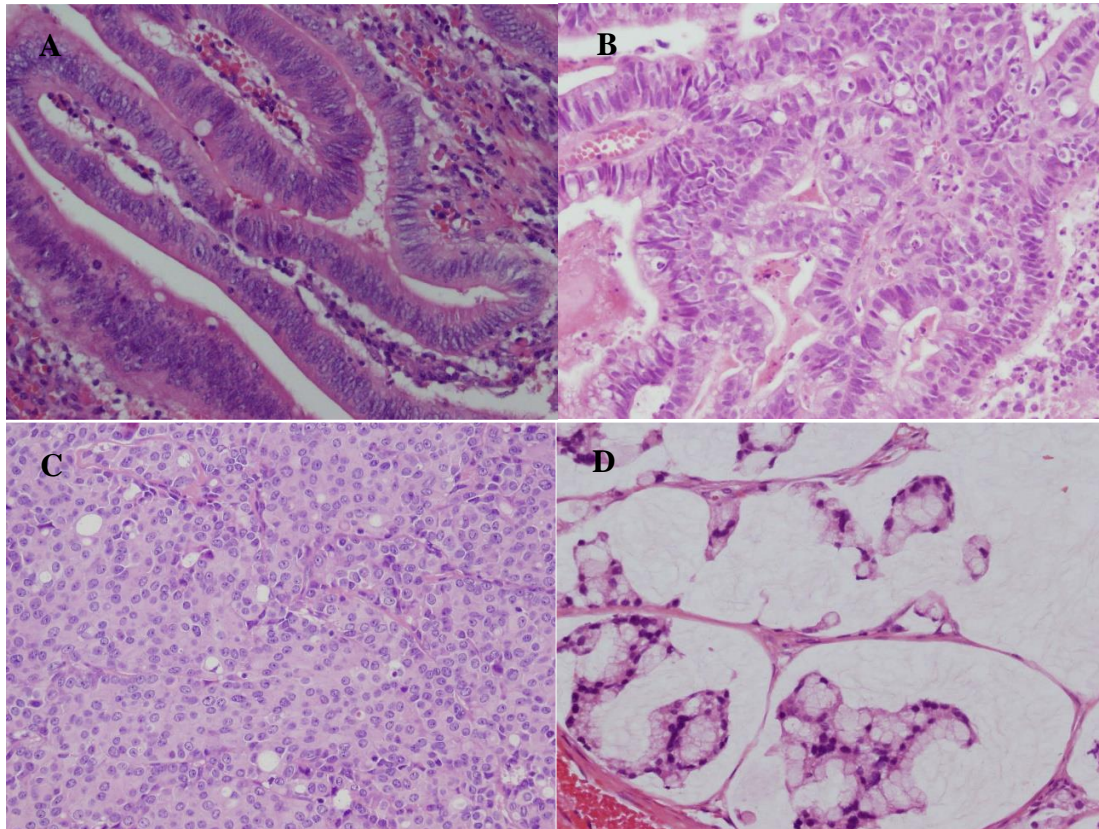


Figura 1. Subtipos histológicos ITAC (hematoxilina-eosina 200×).

(A) Subtipo papilar con arquitectura papilar, mínima atipia citológica y escasas mitosis; (B) Subtipo colónico con arquitectura túbulo-glandular más pleomorfismo y figuras mitóticas; (C) Subtipo sólido poco diferenciado con crecimiento sólido, trabecular y formaciones tubulares aisladas, marcado pleomorfismo y figuras mitóticas frecuentes; (D) Subtipo mucinoso con lagos de moco separados por finos septos fibrosos y células en anillo de sello.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La aparición de los ITAC se sitúa entre los 50-60 años y son seis veces más frecuentes en hombres que en mujeres, reflejando muy probablemente el riesgo ocupacional^{3,5,25}.

La incidencia de los TNS epiteliales es de 0,45 casos por cada 100.000 habitantes/año y la de los ITAC de 0,003 por cada 100.000 habitantes/año²⁶, aunque existen variaciones geográficas mundiales, siendo mucho más frecuentes en Europa o en el norte de España^{4,5,27,28}. Esta variación geográfica podría reflejar la existencia de factores de susceptibilidad genética actualmente no identificados, o exposición a diferentes tipos de madera u otros compuestos como el polvo de cuero.

1.3 FACTORES DE RIESGO

El mecanismo etiopatogénico de los ITAC es aún desconocido, pero en Europa, se ha relacionado con la exposición ocupacional a varios carcinógenos en aproximadamente el 90% de los casos^{27,29-31}.

En los ITAC, los principales carcinógenos son el polvo de madera (roble y haya, principalmente) y cuero, lo que le confiere gran importancia en salud laboral. Otros factores etiológicos como el formaldehído y compuestos de cromo y níquel han sido identificados como factores de riesgo en el desarrollo de TNS, pero sin haberse confirmado un papel en el desarrollo de los ITAC estando principalmente asociados a CENS y NITAC^{27,29,32-34}.

Por otro lado, a diferencia de otros cánceres de cabeza y cuello, no se ha demostrado asociación entre los ITAC y el tabaco o el alcohol³⁵. Las infecciones por virus Herpes simple, Epstein-Barr, Varicela-zóster, Papiloma humano, Citomegalovirus o Adenovirus tampoco tienen relación con los ITAC³⁶.

Aunque existen variaciones geográficas de riesgo y resultados heterogéneos, en un metaanálisis reciente, la exposición al polvo de cuero se ha asociado de forma global con un mayor riesgo relativo que la exposición al polvo de madera³².

A pesar de esto, se estima que en la Unión Europea hay más de 3,4 millones de trabajadores expuestos al polvo madera y otros tantos expuestos al polvo de cuero, por lo que la susceptibilidad genética también podría explicar la tasa relativamente baja de ITAC a pesar de los sujetos expuestos a estos carcinógenos³⁰.

El carcinógeno más estudiado ha sido el polvo de madera. El desarrollo tumoral parece estar relacionado con el inicio temprano de la exposición², con la duración (>15 años) y el nivel de exposición (>5mg/m³)³², con un intervalo medio entre el final de la exposición y el inicio del ITAC de 33 años⁴. Aunque el tiempo medio de exposición al polvo de la madera es en general prolongado, pueden aparecer desde pocos años hasta décadas²⁹.

Varios estudios evaluaron la genotoxicidad del polvo de madera in vivo a través del estudio de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en trabajadores de la madera a través por un proceso inflamatorio crónico³⁷⁻³⁹.

También se descubrió que los extractos del polvo de madera inducen daño en el ADN^{40,41}. La producción de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) es una de las lesiones de ADN más comunes en respuesta al estrés oxidativo y se considera como un marcador celular de daño oxidativo del ADN^{42,43}. OGG1 es la enzima implicada en la reparación por escisión de base de esta 8-oxodG y se ha asociado recientemente con el desarrollo y / o la progresión tumoral⁴⁴⁻⁴⁶. *Staffolani S et al.*⁴⁷ estudiaron un modelo celular in vitro de células bronquiales observando que las células formadas después de la exposición tenían una menor expresión de OGG1 y una acumulación de bases oxidadas de ADN. Estos eventos se relacionaron con la activación de la vía EGFR-PI3K-AKT, que participó en la activación de mTOR y en la regulación descendente OGG1.

1.4 CLÍNICA

La sintomatología inicial suele ser anodina o incluir síntomas inespecíficos como obstrucción nasal, epistaxis, anosmia y rinorrea unilateral o bilateral que son comunes a la mayoría de las enfermedades inflamatorias crónicas y a otros tipos de tumores nasosinusales (benignos y malignos). La elevada prevalencia de patologías similares benignas crónicas y la baja incidencia de las neoplasias explican el retraso diagnóstico que suele situarse entre 6 y 8 meses^{2,48}. Debido a ello, con frecuencia, el diagnóstico se realiza en estadios avanzados cuando pueden aparecer síntomas por invasión orbitaria o craneal (alteraciones oculares como edema palpebral, epifora, diplopía, proptosis o exoftalmos y neurológicas como crisis comiciales o alteraciones de la conducta).

La incidencia de metástasis en los ganglios linfáticos cervicales en el diagnóstico inicial y seguimiento oscila entre un 2,4-8% y 1,8-2,4%, respectivamente, siendo distintivo de un comportamiento tumoral agresivo^{11,49,50}. Las metástasis a distancia en el momento del diagnóstico son excepcionales, pudiendo desarrollarse durante el seguimiento entre un 5-12% de los casos, pero rara vez en ausencia de recidiva locorregional^{2,13,51}.

1.5 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN

La exploración nasal con endoscopio flexible o rígido, ante una clínica sospechosa, nos puede permitir visualizar la lesión nasal e incluso tomar una biopsia para su estudio. La tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) aportan información precisa sobre la localización y extensión tumoral, imprescindibles para valorar la mejor opción terapéutica.

El TC axial y coronal juega un papel importante en el estudio de estos tumores y tiene como ventaja sobre la RMN la visualización de la afectación ósea de la órbita, cavidad nasal y base del cráneo (Figura 2). La RNM coronal, axial y sagital es superior al TC para valorar la afectación de tejidos blandos, diferenciando entre el tumor, el edema peri tumoral y la retención de secreciones, por lo que suele requerirse junto con el TC para delimitar el tumor (Figura 2). En la RMN, el contenido de mucina, la densidad celular y la presencia de áreas hemorrágicas-necróticas afectan significativamente a la señal mostrada por los ITAC; los tumores ricos en mucina son hiperintensos en T2, mientras que los ITAC sin producción de mucina muestran isointensidad o hipointensidad en T2⁵². Sin embargo, se debe tener en cuenta que las características radiológicas de los ITAC son a menudo similares a las exhibidas por otros tumores malignos nasosinuales.

El 18F-fluorodesoxiglucosa-PET-TAC no suele usarse de rutina para el diagnóstico o seguimiento de estos pacientes, aunque se puede considerar en pacientes con un estadio tumoral avanzado o sospecha de metástasis⁵³.

La estadificación clínica de los TNS de origen epitelial se basa en su localización y extensión, de acuerdo con la 8ª edición de la clasificación Tumor-Nodes-Metastases (TNM) de la UICC (Union for International Cancer Control) y la AJCC (American Joint Committee on Cancer) (Anexo 1)⁵⁴.

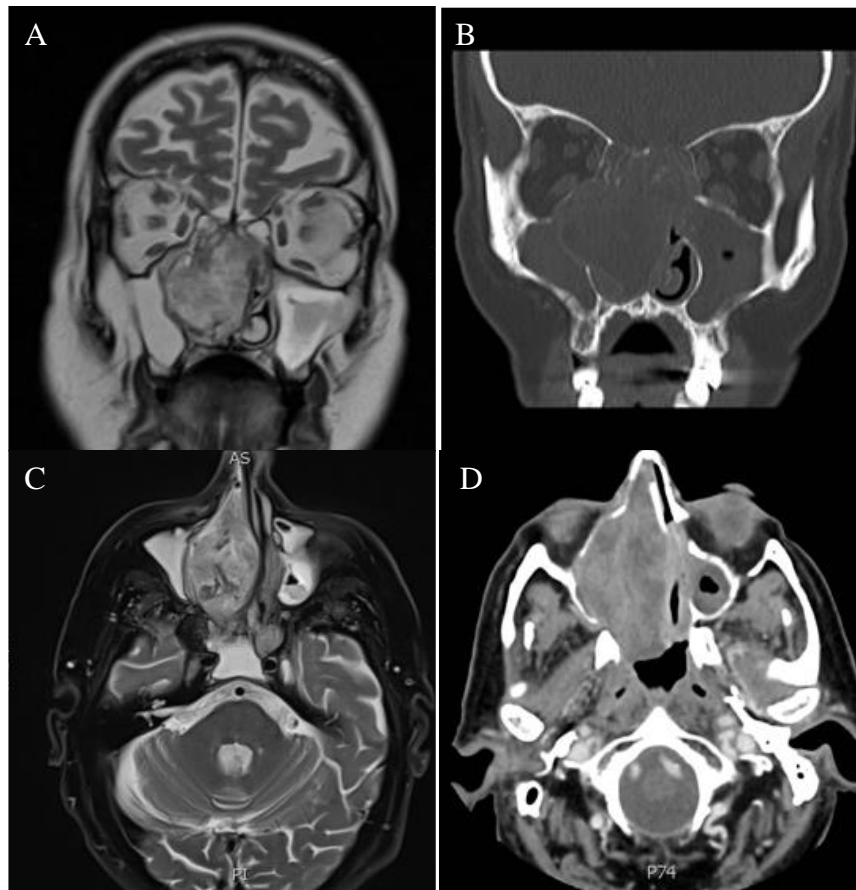


Figura 2. Cortes coronales (A: RMN T2 y B: TC) y cortes axiales (C: RMN T2 y D: TC) de un paciente con ITAC T3N0M0.

ITAC implantado en área olfatoria derecha, en estadio avanzado. El tumor ocupa la totalidad de la fosa nasal derecha y parte de la izquierda, con erosión del septum y de la lámina cribosa, pero sin afectación orbitaria o intracraneal. Además, obstrucción secundaria del complejo osteomeatal bilateral. La RMN nos permite valorar la ocupación hiperintensa de los senos maxilares compatible con secreciones.

1.6 TRATAMIENTO

La estrategia terapéutica óptima debe centrarse en el control local de la enfermedad y en reducir la tasa de metástasis a distancia, con una morbilidad aceptable. La resección quirúrgica completa seguida o no de radioterapia (RT) postoperatoria es la base del tratamiento de la mayoría de los TNS, y en concreto de los ITAC, tanto inicialmente como en las recidivas^{55,56}.

No obstante, es importante plantear un tratamiento integral (cirugía, RT, quimioterapia [QT], terapias biológicas) e individualizado en función de la histología y el estadio tumoral, la edad y las comorbilidades del paciente, y el tratamiento previo^{55,57}.

1.6.1 Cirugía

La cirugía radical de base de cráneo es el pilar principal en el tratamiento en estos tumores. Dada la escasa incidencia de metástasis que mencionamos previamente, el tratamiento cervical profiláctico no ha demostrado beneficio⁵⁶.

A pesar de esto, en ocasiones, la resección subtotal junto con la RT adyuvante es la mejor opción cuando el tumor infiltra estructuras neurovasculares críticas (fosa craneal anterior, quiasma óptico, seno cavernoso, etc.). La cirugía también puede ser usada como tratamiento paliativo para disminuir los síntomas locales (obstrucción nasal, sangrado, proptosis, etc.) con un impacto en la supervivencia probablemente mayor que otras modalidades de tratamiento paliativo⁵⁸.

Sabiendo esto, debe seleccionarse la técnica quirúrgica de base de cráneo (abierta, endoscópica o combinada) que permita la mayor radicalidad en la exéresis y márgenes oncológicos libres con la menor morbilidad posible. En comparación con los abordajes tradicionales, la cirugía endoscópica permite abordar lesiones profundas centofaciales, con una exposición directa de la línea media, una menor manipulación del parénquima cerebral y de estructuras neurovasculares y una desvascularización tumoral precoz. Los resultados oncológicos son similares a los obtenidos con los métodos abiertos^{11,12,55,59-61} y la resección tumoral fragmentada no parece comprometer los resultados oncológicos, siempre que los márgenes de resección sean negativos⁶².

Desde la perspectiva del paciente, las ventajas de la cirugía endoscópica son la disminución del tiempo quirúrgico y de hospitalización, la menor tasa de complicaciones y la ausencia de incisiones faciales⁵⁵.

Los abordajes externos o combinados (resección craneofacial y craneoendoscópica, respectivamente) están indicados en casos seleccionados que no se controlan adecuadamente vía transnasal, es decir, cuando existe infiltración intracraneal importante, extensión dural supraorbitaria, invasión facial e invasión masiva del sistema lagrimal y / o contenido orbitario⁶³.

Cuando existe un defecto quirúrgico dural es necesaria la reconstrucción para separar el área cerebral aséptica de la cavidad nasal séptica y también para prevenir la fuga de líquido cefalorraquídeo, existiendo en la actualidad numerosas técnicas. Los colgajos locales mucoperiosticos rara vez están disponibles ya que suele ser necesaria la resección de sus componentes por infiltración tumoral directa o por la necesidad de

sacrificar su pedículo vascular. Sin embargo, en resecciones unilaterales se puede utilizar la mucosa septal contralateral pediculada en las arterias etmoidales⁶⁴⁻⁶⁶ o en la rama septal de la arteria esfenopalatina (colgajo naso-septal)^{64,67}. Cuando esto no es posible, la reconstrucción de la duramadre puede realizarse con colocación de injertos de tejido (fascia lata, matriz de colágeno o grasa abdominal) en dos o tres capas (intradural, epidural y extracraneal). En casos de resección craneoendoscópica / craneofacial con defectos extensos, debe considerarse la utilización de colgajos de pericráneo, de fascia temporoparietal, o incluso el uso de colgajos libres microvascularizados⁶⁸⁻⁷².

1.6.2 Radioterapia

La literatura actualmente disponible sugiere que los ITAC papilar y colónico en estadios precoces (T1–T2) pueden ser tratados con cirugía radical exclusivamente^{73,74}. En todos los demás casos (T3–T4, subtipo sólido, mucinoso y / o márgenes involucrados), la RT complementaria debe ser considerada. Sin embargo, debido a la alta tasa de recidiva local (39-51%)^{4,13} y la dificultad frecuente para obtener márgenes oncológicos óptimos, la mayoría de los autores recomiendan el uso de RT adyuvante, la cual no debería administrarse más allá de 6 semanas tras la cirugía^{11,12}.

La radioterapia de intensidad modulada (IMRT, Intensity-Modulated Radiation Therapy), la radioterapia guiada por la imagen (IGRT, Image-Guided Radiation Therapy), la tomoterapia, la arcoterapia modulada volumétricamente (VMAT, Volumetric-Modulated Arc Therapy) y la terapia con partículas son las técnicas de elección en el tratamiento de los TNS ya que 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. Con ello se consigue aplicar la máxima dosis en la zona de implantación tumoral y áreas colindantes, minimizando la toxicidad en estructuras adyacentes críticas (globo ocular, nervio óptico, glándula lagrimal, lóbulo frontal, médula espinal, etc.)⁵⁷.

1.6.3 Quimioterapia

La indicación clásica para el uso de QT en TNS es el tratamiento paliativo de pacientes con tumores localmente avanzados o metastásicos cuando la cirugía y la RT está contraindicada o ya no controla la enfermedad con eficacia. Sin embargo, la necesidad de mejorar el control local, aumentar la supervivencia y preservar la función

del órgano, junto con el desarrollo de nuevas técnicas de radioterapia, ha llevado a explorar la adición de QT al tratamiento estándar.

La secuencia apropiada de las diferentes modalidades de tratamiento es importante a la hora de valorar los resultados ya que la QT neoadyuvante está destinada al control de las metástasis a distancia y posiblemente a mejorar el control local, y la QT adyuvante a aumentar el control locorregional. Además, debe tenerse en cuenta la toxicidad del tratamiento y si pudiera suponer un retraso quirúrgico que condicione el pronóstico.

Se ha descrito que los ITAC con *TP53* tipo salvaje presentan una mejor respuesta a la QT, mayor probabilidad de respuesta completa y mejor pronóstico pudiendo justificar su uso en ITAC avanzado con gen *TP53* salvaje⁷⁵⁻⁷⁷.

Debido a la baja incidencia de estos tumores, se han realizado pocos ensayos clínicos específicos en TNS, por lo que la QT o los protocolos de quimio-radioterapia generalmente se basan en enfoques previos de otros tumores de cabeza y cuello más comunes, como la preservación de órgano en el cáncer de laringe. Además, la mayoría de las series publicadas mezclan diferentes tipos histológicos y son pocos los estudios realizados en ITAC exclusivamente; principalmente series pequeñas retrospectivas y escasos estudios en fase II. Por lo tanto, no hay grandes estudios controlados que evalúen las diferentes opciones de tratamiento y la secuencia de este.

Con respecto a la QT de inducción (QTI), existe una cantidad limitada pero creciente de estudios basados en platino (en combinación con 5-Fluorouracilo [5-FU], Taxano, Ifosfamida o Vincristina) previo a la terapia local definitiva en TNS⁷⁸. A pesar de la falta de ensayos aleatorios, los datos de múltiples estudios de TNS, sugieren que la QTI puede jugar un papel importante en la mejora de la supervivencia⁷⁹⁻⁸⁶ con un posible papel en la preservación de órganos o estructuras^{83,87}. Un ensayo clínico de fase II en varios TNS basado en QTI con esquema PFL (Cisplatino, 5-FU y Leucovorín) mostró un 16% de respuesta completa y una mejor supervivencia en los respondedores (supervivencia global a los 3 años: 100% vs 65%, *p*valor=0,09; supervivencia libre de enfermedad a los 3 años: 100% vs 43%, *p*valor=0,03)⁸⁸.

El uso de QRTc ha sido aún menos estudiado en TNS y fundamentalmente se ha estudiado en CENS con una experiencia limitada basada en estudios retrospectivos^{77,89}. La evidencia sugiere que la QRTc aumenta la supervivencia y permite el control

locorregional en TNS⁹⁰ pero no se han realizado estudios comparativos en ITAC que demuestren un beneficio de supervivencia estadísticamente significativo para la quimiorradioterapia concomitante versus los protocolos de quimioterapia neoadyuvante.

Un estudio reciente realizado en el Anderson Cancer Center en 95 pacientes con SNUC, demostró que los pacientes que logran una respuesta favorable a la QTI, la QRT definitiva mejora la supervivencia en comparación con los que se someten a cirugía definitiva. En pacientes que no logran una respuesta favorable a la QTI, la cirugía, cuando sea factible, parece proporcionar un mejor control de la enfermedad y una mejor supervivencia⁹¹. No existen estudios similares en ITAC.

Se han explorado otras modalidades de QT en ITAC como la QT intraarterial, que no está recomendada⁷⁷, y la QT tópica. La tendencia a la recurrencia local sin metástasis a distancia ha llevado a algunos autores a recomendar la resección quirúrgica seguida de QT adyuvante tópica (5-FU) transnasal semanal con resultados similares de supervivencia a 5 años comparado con cirugía y RT adyuvante^{62,92-96}.

En conclusión, se necesitan más estudios para definir mejor el papel y la secuencia apropiada de la QT en TNS y, en concreto, en ITAC. El uso de marcadores moleculares predictivos de respuesta al tratamiento adyuvante en pacientes con tumores nasosinuales representaría un importante avance terapéutico, como se sugiere con *TP53*.

1.6.4 Bioterapia e Inmunoterapia

Las características genéticas y moleculares se utilizan cada vez más como dianas para el tratamiento con inhibidores de pequeña molécula o de anticuerpos monoclonales en muchos tipos de tumores. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios genéticos sobre ITAC se han centrado en un número limitado de genes y proteínas conocidos por estar involucrados en otros adenocarcinomas, particularmente colorrectales y pulmonares u otros tumores de cabeza y cuello. A pesar de las similitudes histológicas con el CCR, no hay evidencia de la eficacia de agentes sistémicos, utilizados en CCR, en el ITAC avanzado^{75,77,96}.

Además, contrario al CCR, donde los estudios de biopsia líquida han mostrado resultados muy prometedores, no hay evidencia de su papel potencial en ITAC⁹⁷⁻¹⁰⁰.

En virtud de su perfil mutacional, que se caracteriza por una baja incidencia de mutaciones en *EGFR*, *HER2*, *KRAS* y *BRAF* y una alta tasa de ganancia del número de copias *EGFR*, se ha propuesto que los ITAC pudieran ser tumores adecuados para drogas anti-EGFR¹⁰¹⁻¹⁰³.

No obstante, solo consta una publicación en la literatura sobre un paciente con ITAC tratado con Cetuximab y los autores informaron una respuesta deficiente a la bioterapia, que explicaron podría atribuirse a una mutación en *KRAS* revelada por el análisis de células tumorales circulantes, pero previamente no detectada en el muestreo primario del tumor¹⁰⁴.

También se ha propuesto que el subgrupo de pacientes con mutación en *HRAS* (16%) puede beneficiarse de la administración de inhibidores de la vía MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)⁴⁸.

La alta tasa de mutación de *MET* (64%) hace que los inhibidores de MET sean otra alternativa interesante para varios autores^{48,105}.

Finalmente, la expresión de PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) en el ITAC y las células inmunes se ha observado en el 17% y 33% de los casos respectivamente, sin mostrar valor pronóstico¹⁰⁶. Estos datos sugieren que la inmunoterapia podría ser razonable en el tratamiento multimodal de ITACs seleccionados.

A pesar de todo esto, la mayoría de los potenciales fármacos bioterapéuticos e inmunoterapéuticos en los ITAC siguen siendo teóricos, y actualmente no hay datos clínicos disponibles. El desarrollo de enfoques novedosos con quimioterapia sistémica, y terapia molecular dirigida (guiada por el perfil genómico de tumores) exclusiva o en combinación con otras modalidades terapéuticas (neoadyuvante, concomitante o adyuvante), podría contribuir a mejorar el control de la enfermedad.

1.7 SEGUIMIENTO

En consecuencia con la tasa de recurrencia local, la vigilancia postoperatoria debe centrarse en la cavidad nasosinusal. El seguimiento incluye una combinación de evaluaciones clínicas y de imagen cuyo objetivo es detectar de forma temprana las recurrencias, complicaciones y secuelas derivadas del tratamiento. En la evaluación endoscópica, se pueden identificar y biopsiar pequeñas lesiones superficiales de la

mucosa, sugestivas de recurrencia. La endoscopia también puede facilitar el diagnóstico de secuelas post-tratamiento, tales como sinequias, estenosis o cierre del ostium sinusal que puede derivar en una sinusitis sintomática. La RMN es crucial para detectar recidivas submucosas, como las surgidas en el hueso, pero también puede ser útil en la diferenciación del tejido inflamatorio, especialmente en los pacientes radiados, de la recidiva local. Además, se pueden identificar algunas complicaciones tardías, como mucocelos asintomáticos. El papel del PET-TC en el seguimiento de los pacientes con neoplasias malignas nasosinuales sigue siendo poco claro. La detección precoz de metástasis a distancia no está generalmente asociada con alteraciones significativas en el curso clínico pero la mayor disponibilidad para su realización lo convierte en un estudio aconsejable en el preoperatorio, en la planificación terapéutica y en el seguimiento.

El seguimiento ideal consiste en una evaluación endoscópica cada 2–3 meses, con RMN cada 3–4 meses durante el primer año, una evaluación endoscópica con RMN dos veces al año desde el segundo al quinto año, y evaluación endoscópica anual con RMN a partir de entonces⁷.

Aunque no está basado en evidencia sólida, generalmente se recomienda un seguimiento de por vida para los pacientes con ITAC, ya que se ha observado la aparición de recurrencias hasta 19 años tras el tratamiento¹².

1.8 PRONÓSTICO

El pronóstico de los tumores malignos nasosinuales es malo pero los pacientes con ITAC son los únicos que han mejorado su supervivencia a lo largo de los años³. La Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) a los 5 años se sitúa entre el 62 y el 74%, la Supervivencia Global (SG) entre el 64 y 69% y la Supervivencia Específica para Enfermedad (SEE) entre el 64% y el 82% en diferentes series^{4,11-13}.

La principal causa de su alta mortalidad son las recidivas locales^{3,11-13,25,28,107} a pesar de su adecuada extirpación quirúrgica, y ocurren más frecuentemente en los primeros dos años de seguimiento^{4,108,109}.

No obstante, los resultados oncológicos están influenciados por varios factores que incluyen características del paciente y características biológicas del tumor. La edad

superior a 75 años, el sexo masculino y la raza negra se han identificado como factores pronósticos adversos¹¹⁰.

Los factores tumorales que influyen en el desarrollo de recidivas y en la supervivencia son la clasificación T^{2,3,6,25}, el subtipo histológico^{1,111}, la extensión intracraneal y orbitaria y la aparición de metástasis^{11,12,73,110,112,113}. Se ha demostrado que los subtipos bien diferenciados (papilar y colónico) tienen un mejor pronóstico^{1,111} y que la supervivencia a 5 años disminuye del 80% al 30% al pasar de un tumor T1 a un T4^{2,3,6}.

En cuanto a los factores dependientes de los estudios moleculares, el estado del gen *TP53* y la expresión de la proteína β -catenina son considerados marcadores de mal pronóstico^{76,114}.

1.9 TUMORIGÉNESIS

La tumorigénesis de los ITAC sigue siendo desconocida. Varios autores han trabajado en estos tumores con diferentes enfoques clínicos y de investigación (principalmente sobre muestras tumorales), pero no se dispone aún de un conocimiento suficiente para explicar los pasos genéticos de la carcinogénesis y las vías moleculares de progresión.

1.9.1 Inflamación crónica e ITAC

Los polvos orgánicos asociados con el desarrollo de tumores no se consideran directamente mutágenos, pero estos materiales se asocian con inflamación crónica, que es un mecanismo reconocido de tumorigénesis en varios tipos de cáncer.

Se ha descrito expresión aberrante de proteínas involucradas en la inflamación crónica como NF κ B, COX-2, iNOS y TNF- α en pacientes con ITAC expuestos al polvo de madera. Tras la estimulación con polvo de madera, los macrófagos alveolares liberan especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), tales como la COX-2¹¹⁵⁻¹¹⁷. Mediante análisis inmunohistoquímico se demostró positividad para COX2 en el 52% de los casos de ITAC siendo mayor que en CENS¹¹⁵.

La mayor expresión de NF κ B y COX2 se describió en el subtipo sólido de ITAC y la positividad más baja en el subtipo mucinoso¹¹⁸.

Las transiciones G \rightarrow A están típicamente relacionadas con la exposición a carcinógenos. Estas mutaciones en *TP53* fueron demostradas de forma casi exclusiva en

trabajadores expuestos al polvo de madera no fumadores. Además, la transición G→A en *KRAS* fue la mutación más frecuente encontrada en pacientes con ITAC que tenían una historia de exposición a la madera y al polvo de cuero^{37,101,119-124}.

A pesar de lo mencionado, se necesitan más estudios para confirmar esta relación, y también para explicar por qué ninguna de las patologías inflamatorias conocidas de la cavidad nasosinusal, tales como rinitis y pólipos, parecen estar asociadas con un mayor riesgo de cáncer. Tales estudios pueden abrir perspectivas de prevención y tratamiento.

1.9.2 Células madre e ITAC

El esteseoneuroblastoma es el único tipo de tumor nasosinusal que ha demostrado derivarse del epitelio olfatorio. La evidencia clínica y radiológica sugiere que los ITAC también se originan del epitelio olfatorio que recubre la hendidura. Por lo tanto, estos tipos de tumores podrían ser resultado de la expansión de células madre (CSCs, Cancer Stem Cells) localizadas en estas regiones particulares capaces de experimentar diferenciación en varios tipos de células. Apoyando esta sugerencia, se han descrito ITAC que muestran más de una apariencia histológica en el mismo tumor o variaciones histológicas entre el tumor primario y su recidiva.

Por lo tanto, el estudio de las CSCs y del microambiente tumoral puede tener implicaciones clínicas en el cáncer nasosinusal, en particular porque estas células han sido relacionadas con las recidivas y la resistencia a la quimioterapia, que son características típicas de los ITAC. Sin embargo, no hay estudios actualmente en ITAC que hayan demostrado esta teoría.

1.9.3 Estudios genómicos de los ITAC en muestras tumorales

Se ha mapeado el perfil de cambios genómicos en series de tumores primarios con técnicas como FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), CGH (Comparative Genomic Hybridization) y array de CGH (CGH-array) y MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)¹²⁵⁻¹²⁹.

En general, estos estudios han demostrado que los ITAC tienen genomas aneuploides complejos que portan una gran variedad y un gran número de aberraciones cromosómicas, como ocurre con los tumores sólidos¹²⁵⁻¹²⁷. Una excepción podría ser el

ITAC subtipo papilar, que parece ser predominantemente diploide y con pocas aberraciones genéticas^{118,126,127}.

Las ganancias más frecuentes ocurren en los brazos cromosómicos 5p, 7q, 8q, 12p y 20q y las pérdidas en 4q, 5q, 8p, 17p y 18q. Las ganancias en 5p, 12p y las pérdidas en 4q son típicas de ITAC y no han sido descritas en otros adenocarcinomas¹²⁵⁻¹²⁸.

Por otro lado, las variaciones en el número de copias (CNA, Copy-Number Alterations) más frecuentes en el adenocarcinoma de pulmón y colon, como la ganancia de 16p y pérdidas de 9p y 15q, son poco frecuentes en ITAC^{118,130,131}. Es difícil especular sobre genes específicos sobre la base de CNA que abarcan varios pares de megabase.

Recientemente *López-Hernández A et al*¹¹⁸ presentaron cinco subgrupos de ITAC con resultados clínicos distintos basados en distintos perfiles de CNA. Describieron además 7 CNAs específicos significativamente asociados con una peor supervivencia global: ganancias en 1q22-23, 3q28-29, 6p22 y 13q31-33, y pérdidas en 4p15-16, 4q32-35 y 10q24.

1.9.4 Estudios genéticos de los ITAC en muestras tumorales

Los estudios genéticos realizados hasta la fecha en ITAC, a menudo, se han guiado por los hallazgos de tumores más frecuentes y mejor estudiados en ORL, como el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CECC), o por una histología similar, como el adenocarcinoma colorrectal, cuyas similitudes pueden sugerir alteraciones genéticas y moleculares similares. Trabajando según esta hipótesis, varios autores compararon las aberraciones genéticas de ITAC con el CCR, pero sus hallazgos no parecen respaldar esta hipótesis^{120-122,132}.

Los estudios genéticos en ITAC se han centrado principalmente en el estudio del estado de los receptores tirosina quinasa (RTKs, Receptor Tyrosine Kinases) como EGFR, la ruta de señalización RAS-RAF- ERK, la vía de Wnt/ β -catenina y el gen *TP53*.

En cuanto a los RTKs, los estudios inmunohistoquímicos (IHQ) han mostrado una sobreexpresión del 20-33% de EGFR^{101,133}. Sin embargo, las mutaciones en *EGFR* son poco o nada frecuentes (0-5.5%)^{101,102,123,133}. También se ha estudiado la expresión de otros RTKs en ITAC como ERBB2 (0-8%)^{103,115,134}, MET (64%)¹⁰⁵ y ALK (0%)¹³⁵.

Debido a la no desdeñable sobreexpresión proteica de EGFR se propuso el uso de fármacos anti-EGFR. Entre los factores más importantes que determinan la resistencia a estos tratamientos están las alteraciones de la vía de señalización RAS-RAF-ERK. Por este motivo, se ha estudiado el perfil de mutaciones en *KRAS*, *HRAS* y *BRAF* en ITAC. Las mutaciones en *KRAS* varían en frecuencia entre un 6% y un 15% generalmente^{101,102,118,133,136}, aunque existen trabajos con frecuencias superiores (43 y 50%)^{123,137}. Las mutaciones en *HRAS* se han descrito en el 16% de los ITAC¹²⁰. Las mutaciones en *BRAF* son casi inexistentes (0-6%)^{101,102,123,124,133}.

La ruta de señalización Wnt es de las más ampliamente estudiadas ITAC por su frecuente alteración en el CCR. La vía canónica (Wnt/ β -catenina) es importante en la determinación del destino celular y tiene una función fisiológica en el desarrollo embrionario de la cresta neural, el corazón y el tracto gastrointestinal. En la mayoría de los tejidos adultos, esta vía está inactiva, excepto en algunas células madre. El actor central de esta vía es la β -catenina, una proteína codificada por el gen *CTNNB1*. La activación de esta vía, detectada como expresión nuclear de β -catenina, se observa en aproximadamente el 30-40% de los ITAC^{114,137}, aunque hay resultados con nula expresión nuclear^{138,139}. A pesar de todo esto no se han encontrado mutaciones en *CTNNB1*, pero sí en otros genes que codifican componentes de la vía como *APC* (28-37%)^{137,140}.

La forma no canónica es importante en el control del movimiento celular mediante la interacción con las proteínas del citoesqueleto y la polaridad de los tejidos que regulan la vía de señalización del calcio. Promueve la asociación entre la β -catenina y la E-cadherina en la membrana celular por la proteína WNT-5a aumentando la adhesividad celular. La pérdida membranosa de E-cadherina y de β -catenina se ha descrito en el 6-20% y 25% de los ITAC, respectivamente^{114,138}. El patrón de expresión de β -catenina y E-cadherina se asemeja más al descrito en el CCR relacionado con la enfermedad inflamatoria intestinal que al descrito en el CCR esporádico, lo que apoya que la inflamación crónica juega también un papel en ITAC¹¹⁴.

La acumulación de TP53 es una característica común en ITAC, con una inmunopositividad que oscila entre 50-70% de los casos^{37,117,122,132,138}. El gen *TP53* es el más frecuentemente mutado en cáncer. En ITAC, la mutación del gen *TP53* se ha asociado con la exposición al polvo de madera y se ha descrito una frecuencia de mutación muy variable; del 18 % al 86%^{37,75,117,122,132}.

Recientemente también se han estudiado alteraciones epigenéticas en ITAC encontrado metilación recurrente en los genes *CDH3*, *ESR1*, *APC*, *TIMP3*, *CASP8*, *HIC1* y *RASSF1*¹⁴¹.

Basado en todo esto, los estudios genéticos en ITAC han mostrado una menor mutación en *TP53*, menor activación de la vía Wnt / β -catenina y mutaciones poco o nada frecuentes en la vía RAS- RAF-ERK en comparación con el CCR.

A diferencia del CCR y el cáncer de pulmón, donde se han descrito varios genes con mutaciones de alta frecuencia con implicaciones terapéuticas (*APC*, *TP53*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF* en CCR y *TP53*, *CDKN2A*, *STK11*, *EGFR*, *KRAS*, *NRAS* en cáncer de pulmón)^{142,143}, hasta la fecha son pocos los estudios que han sido capaces de correlacionar los hallazgos genéticos con datos clínico-patológicos o pronósticos en ITAC.

En cuanto al subtipo histológico, la sobreexpresión proteica de *EGFR* está descrita especialmente en los ITAC subtipo colónico^{101,118,144,145} y la mutación de *KRAS* se ha asociado a los subtipos histológicos de bajo riesgo (colónico y papilar)^{118,124,136} al igual que la sobreexpresión nuclear de β -catenina^{114,138,139}. Por otro lado, se ha descrito una mayor pérdida de expresión de E-cadherina^{114,138} y una menor mutación y acumulación de *TP53* en el subtipo mucinoso^{118,118,138} como ocurre en el CCR¹⁴⁶⁻¹⁴⁹.

En términos pronósticos, la mutación en *KRAS* se ha asociado con una mejor SG de forma significativa¹²³, a diferencia de lo descrito con la presencia de mutaciones en *HRAS* que se ha relacionado con una peor SG y SLE¹²⁰. El aumento de expresión nuclear de β -catenina ha sido descrita como un factor de mal pronóstico independiente del estadio tumoral y del subtipo histológico en ITAC¹¹⁴.

En cuanto al gen *TP53*, dada la estrecha relación entre las alteraciones del gen con la exposición ocupacional y dado que su mutación parece aumentar con la duración y cantidad de exposición al polvo de madera, puede representar un marcador potencial de las primeras fases de la carcinogénesis^{150,151}. Además, el ITAC con una proteína *TP53* no funcional se ha relacionado con un peor pronóstico y, como comentamos previamente, con una peor respuesta a la QT^{75,76}.

2. HIPÓTESIS

Los pacientes con cáncer nasosinusal, y más concretamente los ITAC, tienen una baja prevalencia y supervivencia. Su tratamiento está basado fundamentalmente en la cirugía y la radioterapia con una mala respuesta, en general, a las quimioterapias actuales. Por lo tanto, es importante desarrollar nuevas alternativas terapéuticas.

Considerando que el cáncer es una enfermedad genética, partimos de la hipótesis de que todos los tumores tienen alteraciones genético-moleculares que podrían servir como dianas de terapias biológicas, es decir, ser sensibles a inhibidores específicos (anticuerpos monoclonales y moléculas pequeñas).

Los estudios genéticos en ITAC son escasos porque el cáncer nasosinusal es raro, con una incidencia menor a 1/100.000 habitantes/año como hemos visto anteriormente. Eso también dificulta la organización de ensayos clínicos y colección de series amplias. Hasta ahora, las clasificaciones basadas en la histopatología se han mostrado poco útiles a la hora de segregar tratamientos personalizados.

Actualmente se están desarrollando y llevando a cabo ensayos clínicos en los tumores más prevalentes del organismo (pulmón, colon, mama, etc) basados en marcadores moleculares predictivos de respuesta farmacológica en otras neoplasias (basket trials). Apoyados en este concepto, este trabajo busca clasificar los tumores nasosinuales por sus características genético-moleculares, independientemente de su histopatología, para estudiar posibles terapias dirigidas. Para ello, la premisa a la hora de diseñar el panel de este trabajo fue incluir y estudiar aquellos genes relacionados con la sensibilidad o resistencia a inhibidores específicos. Esto es debido al carácter eminentemente traslacional de esta investigación que busca una aplicación práctica para el tratamiento de estos tumores.

3. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo fue el diseño y análisis de un panel reducido de genes “accionables” para ampliar las alternativas terapéuticas disponibles en ITAC. Debería ser económicamente viable, rápido, con suficiente profundidad para ser aplicable a la clínica y que pudiera realizarse con una pequeña biopsia de tejido tumoral del paciente.

Planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Describir los aspectos clínicos de la serie.
- 2) Analizar los resultados de la NGS de un panel de 119 genes.
- 3) Evaluar si las mutaciones obtenidas son somáticas y potencialmente patogénicas mediante análisis bioinformático y el estudio de la línea germinal.
- 4) Analizar las rutas de señalización afectadas por las mutaciones.
- 5) Relacionar los resultados genéticos con las características clínicas.
- 6) Valorar la aplicabilidad de la secuenciación masiva en terapias personalizadas para los pacientes con ITAC.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES

Se obtuvieron prospectivamente 48 muestras de ITAC de pacientes tratados quirúrgicamente en el departamento de otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, España) entre 1998 y 2014. En 27 casos, también se pudieron obtener muestras de sangre periférica para el estudio en paralelo de ADN germinal, condicionado esto por la disponibilidad del paciente. Las muestras tumorales fueron congeladas y almacenadas en el biobanco de nuestro hospital.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias y se obtuvo el consentimiento informado para la recolección, el almacenamiento y el análisis de las muestras de todos los pacientes.

Los criterios de inclusión fueron: (1) diagnóstico de ACNS variante ITAC nasosinusal, (2) cirugía curativa como primer tratamiento y (3) muestra tumoral recogida y disponible de óptima calidad. Los criterios de exclusión fueron: (1) enfermedad inoperable o tumores irreseccables al diagnóstico, (2) presencia simultánea de otros tumores primarios nasosinuales al diagnóstico, (3) otros tratamientos previos y (4) muestra de mala calidad.

Todos los pacientes incluidos fueron tratados quirúrgicamente con intención curativa. Como regla general, se indicó la radioterapia a todos los pacientes con; (1) clasificación T3–T4, (2) subtipo histológico sólido o mucinoso y (3) márgenes quirúrgicos sospechosos de afectos o no valorables macroscópicamente.

Los datos clínico-patológicos fueron recogidos de la historia clínica hospitalaria e incluyeron el sexo, la edad, la exposición a carcinógenos conocidos en ITAC, el consumo de tabaco, el tamaño y la extensión del tumor, el tratamiento (cirugía, RT y/o QT postoperatoria) y seguimiento clínico (recurrencia y supervivencia). Todos los pacientes, salvo dos pacientes que realizaron seguimiento en su comunidad de origen, fueron seguidos un mínimo de 60 meses o hasta su fallecimiento.

El diagnóstico de ITAC y del subtipo histológico fue confirmado por un patólogo independiente, experto en estos tumores, según la clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud de 2017¹. Tras esto, el subtipo histológico fue reclasificado en 13 casos (27%). Hay que señalar que la indicación de tratamiento complementario se tomó en base al subtipo histológico inicial. Esto pudo condicionar la no indicación de RT en 3 pacientes, aunque no de forma exclusiva.

4.2 DISEÑO DEL PANEL

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) o por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, European Medicines Agency; 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 y (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 119 genes (Figura 3).

Las sondas se diseñaron para cubrir toda la secuencia de codificación, todos los exones de los 119 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.

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

Figura 3. Lista de los 119 genes que componen el panel.

4.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN EN LAS MUESTRAS TUMORALES Y GERMINALES

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).

4.4 CONSTRUCCIÓN Y CAPTURA DE BIBLIOTECAS

La preparación de las bibliotecas es el siguiente paso del proceso, en él se preparan los ácidos nucleicos extraídos para la reacción de secuenciación. Implica la fragmentación del ADN, la ligadura del adaptador y el enriquecimiento del objetivo de interés. Después de la preparación de la biblioteca, se aplican controles de calidad para determinar si se debe continuar con el resto de los procedimientos. Los controles de calidad incluyen cuantificación, análisis de tamaño de fragmentos y PCR cuantitativa utilizando secuencias adaptadoras para el cebador.

La secuenciación se realizó mediante el kit de enriquecimiento de objetivos SureSelectQXT de Illumina Secuencia multiplexada (Agilent Technologies, Santa Clara CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante (versión D0 del protocolo, Noviembre, 2015).

Veinticinco ng de ADN bicatenario, cuantificado usando El kit Qubit HS dsDNA, se fragmentó y se agregaron adaptadores en un solo paso enzimático. La biblioteca de ADN se purificó y amplificó. A continuación, 750 ng de cada biblioteca se hibridaron usando la captura de bibliotecas de SureSelect QXT (Agilent Technologies, Santa Clara CA, EEUU).

Las bibliotecas resultantes fueron recuperadas utilizando bolas magnéticas Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies, Madrid, España) y se llevó a

cabo una amplificación por PCR, posterior a la captura e indexación de las muestras.

Después de cada paso, la purificación se realizó con cuentas AMPure XP (Beckman Coulter, Brea CA, EEUU) para eliminar fragmentos cortos, como dímeros de adaptadores. La calidad de las bibliotecas se evaluó en un Microanalizador de ADN de alta sensibilidad (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU). Basado en la concentración y el tamaño promedio del fragmento de ADN, las bibliotecas se normalizaron a una concentración igual, 5 nM, y fueron agrupadas por igual volumen en grupos de 16 plex.

4.5 SECUENCIACIÓN

Las bibliotecas indexadas se secuenciaron usando el sistema MiSeq (Illumina Inc.) en el servicio de secuenciación del Instituto de Medicina Oncológica y Molecular de Asturias (IMOMA, Oviedo, España) siguiendo las instrucciones del equipo. La profundidad de secuenciación fue de al menos 423X lecturas para las muestras tumorales y de al menos 278X lecturas para las muestras germinales.

4.6 PROCESAMIENTO BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS DE SECUENCIACIÓN

En la Figura 4 se resume gráficamente el diagrama de flujo para la identificación, priorización y anotación de variantes una vez realizada la secuenciación.

El paso inicial después de la secuenciación consiste en convertir las intensidades de las bases a secuencias de nucleótidos a nivel digital, llamadas FASTQ.

Todos los datos de secuenciación de las 48 muestras tumorales se procesaron utilizando el software bioinformático HD Genome One (DREAMgenics, Oviedo, España), certificado con el marcaje CE-IVD.

4.6.1 Control de calidad y alineamiento

Los archivos FASTQ sin procesar se evaluaron primero mediante el control de calidad de FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). La

eliminación de bases de baja calidad, adaptadores y otras secuencias técnicas se realizó con Trimmomatic¹⁵².

Para conocer dónde se encuentran las secuencias de lectura, cada biblioteca se alineó con el genoma de referencia humano (GRCh37/ hg19) generando archivos BAM ordenados con SAMtools¹⁵³ y se anotaron utilizando las bases de datos CCDS, RefSeq y Ensembl.

Tras esto, los duplicados ópticos y los duplicados de PCR fueron eliminados usando Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) porque la amplificación clonal no deseada de lecturas con artefactos de secuencia puede conducir a identificación de variantes falsas positivas.

4.6.2 Identificación de variantes somáticas

El desafío clave de la identificación de variantes es distinguir las variantes reales de las falsas (desaminación de citosina, errores de amplificación y errores de secuencia). Para ello, se filtran en base a una serie de parámetros bioinformáticos.

Identificación SNV e indels

Se empleó una variación del algoritmo Sidr¹⁵⁴ para la identificación de SNV e indels, cuyo rendimiento se ha descrito previamente por *Cabanillas R et al.*¹⁵⁵.

Las variantes se identificaron utilizando los siguientes parámetros de filtrado: profundidad de lectura total ≥ 15 , calidad de base ≥ 20 , calidad de mapeo ≥ 30 y VAF (Variant Allele Frequency) > 0.1 , es decir, estuvieran presentes en más del 10% de las lecturas tumorales, basado en la lógica de que se espera que aparezcan mutaciones conductoras (drivers) de forma más temprana en la carcinogénesis y con una frecuencia alélica de la variante más alta que las mutaciones pasajeras (passengers)¹⁵⁶.

En aquellos 27 casos en los que se estudió el ADN tumoral y germinal de forma paralela, se estableció de forma inequívoca el estado somático y germinal de las mutaciones suponiendo esto un paso más allá en el filtrado final¹⁵⁵.

Identificación de CNA y CN-LOH

La detección de CNA y CN-LOH (Copy-Number neutral Loss Of Heterozygosity) se realizó empleando exome2cnv, evaluando la profundidad de lectura y

los cálculos de desequilibrio alélico. El algoritmo emplea un fondo de muestras agrupadas procesadas usando el mismo protocolo de captura y tecnología de secuenciación^{154,155}.

4.6.3 Anotación y priorización de variantes relevantes

Tras la identificación de variantes, éstas son comparadas con múltiples bases de datos poblacionales, funcionales y relacionadas con enfermedades, que nos permiten conocer la frecuencia alélica de dicha variante en la población, establecer relaciones genotipo-fenotipo o predecir la función de la variante y así realizar la priorización de las mismas.

Previamente se eliminaron todas las variantes silenciosas o sinónimas. Seguidamente, eliminamos las variantes con una frecuencia alélica poblacional >0.01 en todas las bases de datos de poblacionales evaluadas (dbSNP, ExAC, ESP y 1000 Genomas) como se muestra en la Figura 4.

Posteriormente, se consultaron las siguientes bases de datos para la anotación de variantes (Figura.4): relacionadas con la enfermedad (COSMIC e ICGC), de correlación genotipo-fenotipo (Clinvar), funcionales (Ensembl, CCDS, RefSeq, Pfam), así como el score (GERP ++)^{157,158} para calcular la conservación del nucleótido afectado^{157,158}.

Para estimar el impacto proteico de las mutaciones puntuales, se tuvieron en cuenta los siguientes algoritmos predictivos: SIFT¹⁵⁹, PolyPhen2¹⁶⁰, PROVEAN¹⁶⁰, Mutation Assessor¹⁶¹, Mutation Taster¹⁶², LRT¹⁶³, MetaLR, MetaSVM¹⁶⁴, FATHMM, FATHMM- MKL¹⁶⁵ y M- CAP¹⁶⁶. Su puntaje predictivo se integró y normalizó en un solo valor escalado (valor DG), que varía de 0 (tolerado) a 5 (perjudicial).

Tras esta consulta, finalmente, basándonos en la metodología de *Dienstmann et al.*¹⁶⁷, seleccionamos las variantes con frecuencia alélica poblacional <0.01 y que cumplieran alguna de las siguientes condiciones: (1) Estuvieran presentes como mutaciones somáticas en las bases de datos relacionadas con la enfermedad COSMIC y/o ICGC, (2) tuvieran un impacto probable en la secuencia de las proteínas codificadas por los genes que afectan (según los algoritmos mencionados) y fueran mutaciones sin sentido (missense, nonsense, frameshift, inserciones y deleciones inframe y splicing).

Las variantes se anotaron según las directrices de la “Human Genome Variation Society”, versión 20.5¹⁶⁸ autorizada por la “Human Genome Variation Society (HGVS)”, “Human Variome Project (HVP)” y la “Human Genome Organization (HUGO)”.

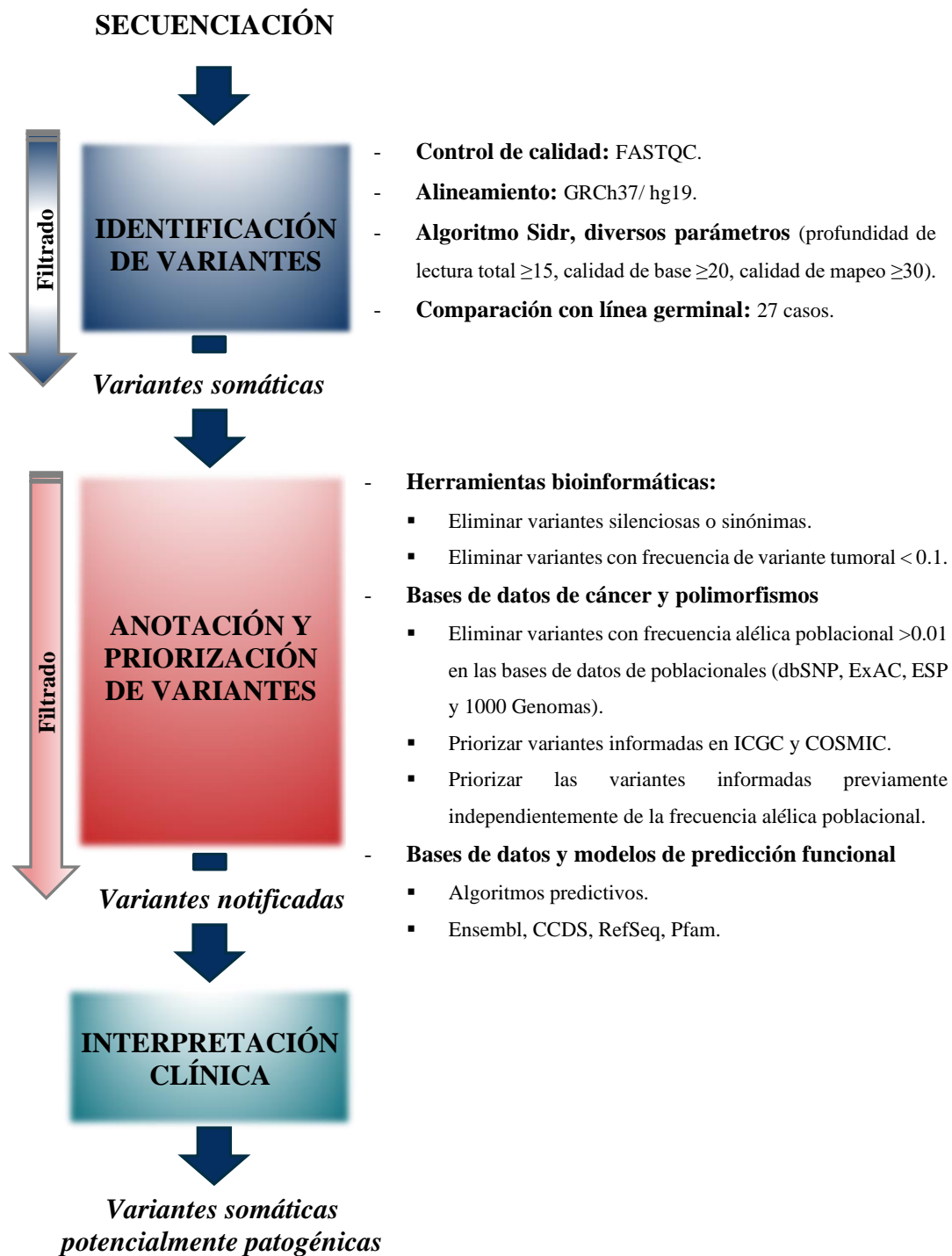


Figura 4. Diagrama de flujo del análisis de variantes tras la secuenciación de próxima generación en las 48 muestras tumorales.

Leyenda: dbSNP= database of Single Nucleotide Polymorphisms; ExAC= Exome Aggregation Consortium; ESP=Exome Sequencing Project; ICGC= International Cancer Genome Consortium; COSMIC= Catalogue Of Somatic Mutations in Cancer; CCDS=Consensus Coding Sequence; RefSeq=Reference Sequence; Pfam= Protein families.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se efectuó mediante el programa R (R Development Core Team) versión 3.6.0¹⁶⁹, y se emplearon las librerías pROC¹⁷⁰, OptimalCutpoints¹⁷¹ y survival¹⁷². El nivel de significación empleado en todo el análisis fue 0,05.

Se realizó un análisis descriptivo proporcionando distribuciones de frecuencias relativas y absolutas para variables cualitativas, y medidas de posición y dispersión para las cuantitativas.

Las relaciones entre variables cualitativas se valoraron con el test Chi Cuadrado de Pearson o el test de Fisher, según se verificase o no la hipótesis sobre frecuencias esperadas. Cuando se compararon variables cuantitativas entre dos grupos se emplearon el test t de Student o el test de Wilcoxon para muestras independientes según se verificase o no la hipótesis de normalidad.

Las relaciones lineales entre variables cuantitativas se estudiaron con el coeficiente y test de correlación de Pearson o Spearman, en función del ajuste a la normalidad.

Se establecieron, para las diferentes rutas de señalización, puntos de corte para el diagnóstico en función de la edad y el tiempo de exposición, según el índice de Youden. Se calcularon, según este punto de corte, la sensibilidad (Se), especificidad (Sp) y área bajo la curva ROC (AUC), junto con la significación e intervalo de confianza asociado.

Se estimaron tasas de supervivencia a través del estimador Kaplan-Meier. Las diferencias en supervivencia entre las diferentes vías se evaluaron con el test log-rank.

Por último, se construyeron modelos de regresión de Cox univariantes y multivariantes para estimar los Hazard Ratio y sus intervalos de confianza al 95 %.

5. RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN MUESTRAL

El resumen de los datos clínico-patológicos se muestra en la Tabla 1. Todos los 48 pacientes eran varones con una edad media y mediana de 68 y 70 años, respectivamente (rango de 49 a 88 años). A excepción de un paciente, todos eran trabajadores expuestos al polvo de madera (98%) con un tiempo medio de exposición de 30 años (rango de 1 a 50 años). Ningún paciente tenía antecedente de exposición a otros carcinógenos conocidos en ITAC. Treinta pacientes (63%) tenían antecedente de hábito tabáquico.

En cuanto al subtipo histológico, 31 (65%) eran considerados de bajo riesgo (papilar y colónico) y 17 (35%) de alto riesgo (sólido y mucinoso). Concretamente, 27 (56%) eran subtipo colónico, 4 (8%) papilar, 6 (13%) sólido y 11 (23%) mucinoso.

Dieciocho pacientes (37,5%) tenían una clasificación tumoral T1-T2 y 30 (62,5%) T3-T4. Ningún paciente tuvo metástasis ganglionares o a distancia al diagnóstico por lo que la clasificación T coincide con el estadio tumoral.

Todos los pacientes fueron tratados mediante cirugía; 20 (42%) mediante abordaje externo y 28 (58%) mediante abordaje endoscópico. De los que sobrevivieron al postoperatorio quirúrgico (96%), 26 (54%) recibieron tratamiento complementario con RT complementaria. Se propuso tratamiento radioterápico a 38 pacientes (79%) pero 12 no recibieron finalmente RT adyuvante por decisión propia del individuo o por decisión conjunta del Comité Oncológico Multidisciplinar de nuestro hospital en base a su estado general, comorbilidades y apoyo familiar, entre otros. Solo un caso recibió tratamiento complementario con QT por persistencia postquirúrgica, elevado riesgo de toxicidad ocular y escaso beneficio esperable de la RT.

El subgrupo de 27 de los 48 pacientes de los que contamos con muestra tumoral y germinal, eran varones con una edad media y mediana de 71 y 72 años respectivamente (rango de 53 a 88). El tiempo medio de exposición al polvo de madera fue de 34 años (rango de 1 a 50). Del mismo modo, el resto de las características clínico-patológicas de este subgrupo, en comparación con los 21 en los que solo contamos con ADN tumoral, se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínico-patológicas.

	48 ITAC	27 ITAC + Germinal	21 ITAC
Característica	Nº pacientes (%)	Nº pacientes (%)	Nº pacientes (%)
Sexo			
Mujer	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Hombre	48 (100)	27 (100)	21 (100)
Exposición polvo madera			
Si	47 (98)	27 (100)	20 (95)
No	1 (2)	0 (0)	1 (5)
Consumo de tabaco			
Si	30 (63)	16 (59)	14 (67)
No	18 (37)	11 (41)	7 (33)
Subtipo histológico			
Papilar	4 (8)	2 (7)	2 (10)
Colónico	27 (56)	15 (56)	12 (57)
Sólido	6 (13)	2 (7)	4 (19)
Mucinoso	11 (23)	8 (30)	3 (14)
T			
1	8 (17)	5 (18)	3 (14)
2	10 (21)	7 (26)	3 (14)
3	17 (35)	10 (37)	7 (34)
4a	5 (10)	1 (4)	4 (19)
4b	8 (17)	4 (15)	4 (19)
Abordaje quirúrgico			
Externo	20 (42)	8 (30)	12 (57)
Endoscópico	28 (58)	19 (70)	9 (43)
Radioterapia adyuvante			
Si	26 (54)	13 (48)	13 (62)
No	22 (46)	14 (52)	8 (38)
Quimioterapia adyuvante			
Si	1 (2)	1 (4)	0 (0)
No	47 (98)	26 (96)	21 (100)

5.2 RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO

Se disponen de 47 pacientes para el estudio de seguimiento. Durante el periodo de seguimiento (media de 51 meses; rango de 0 a 187), 28 pacientes (58%) desarrollaron recidiva. Siete pacientes desarrollaron metástasis ganglionares y/o a distancia a lo largo del seguimiento. El tipo de recidiva, de estos 28, se recoge en la Tabla 2. La media del número de recidivas por cada paciente estudiado fue de 1 (rango de 0 a 4). El tiempo libre de enfermedad (TLE) promedio de toda la muestra fue de 36 meses (rango de 0 a 153). Ningún paciente tuvo un TLE menor de 3 meses (persistencia postquirúrgica) a excepción de un paciente en el que no se logró resección quirúrgica completa. Los TLE más bajos se explican en base a que dos pacientes fallecieron hospitalizados durante el postoperatorio (1 mes) y otro paciente desarrolló metástasis a distancia a menos de un mes de la cirugía.

Al momento de escribir, se conocía el estado completo de 43 pacientes. Nueve pacientes estaban vivos, uno de ellos con tumor pendiente de cirugía y el resto libres de enfermedad, 21 pacientes habían fallecido a causa de la recurrencia tumoral, 2 durante el postoperatorio y 11 por otras causas no relacionadas con la enfermedad. Dos pacientes supimos que habían fallecido, pero sin poder conocer la causa exacta.

En el subgrupo de los 27 ITAC comparados con su línea germinal, el periodo de seguimiento fue algo mayor (media de 59 meses; rango de 0 a 187 meses) así como el TLE promedio (41 meses; rango de 1-107 meses). La tasa de recidiva en este subgrupo fue del 52% (14/27). El resto de los resultados del seguimiento de este subgrupo, en comparación con los 21 en los que solo contamos con ADN tumoral, se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del seguimiento.

	48 ITAC	27 ITAC+ Germinal	21 ITAC
Característica	Nº pacientes (%)	Nº pacientes (%)	Nº pacientes (%)
Recidiva			
Si	28 (58)	14 (52)	14 (67)
No	19 (40)	12 (44)	7 (33)
Desconocido	1 (2)	1 (4)	0 (0)
Tipo de recidiva			
Local	21 (75)	11 (79)	10 (72)
Local+Distancia	2 (7)	1 (7)	1 (7)
Local+Regional+Distancia	1 (4)	1 (7)	0 (0)
Regional+Distancia	1 (4)	0 (0)	1 (7)
Distancia	3 (10)	1 (7)	2 (14)
Estado del paciente			
Vivo	9 (19)	8 (30)	1 (5)
Muerto por tumor	21 (44)	9 (33)	12 (57)
Muerto por otras causas	13 (27)	8 (30)	5 (24)
Muerto desconocido	2 (4)	0 (0)	2 (9)
Desconocido	3 (6)	2 (7)	1 (5)

5.2.1 Análisis de supervivencia en los 48 ITAC

Supervivencia libre de enfermedad (SLE)

Recidivaron 28 casos y contamos con el tiempo de seguimiento de 27. La mediana del tiempo libre de enfermedad fue de 34 meses tras la cirugía. La tasa de supervivencia libre de enfermedad fue del 46% a los 3 años y del 43 % a los 5 años (Figura 5).

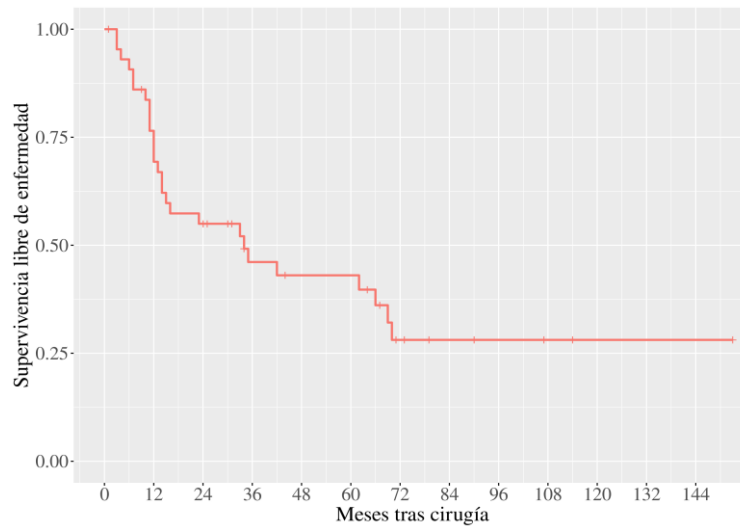


Figura 5. Curva Kaplan-Meier de la Supervivencia Libre de Enfermedad.

Supervivencia global (SG)

Fallecieron 36 pacientes. La mediana del tiempo de supervivencia fue de 36 meses tras la cirugía. La tasa de supervivencia global fue del 49% a los 3 años y del 42 % a los 5 años (Figura 6).

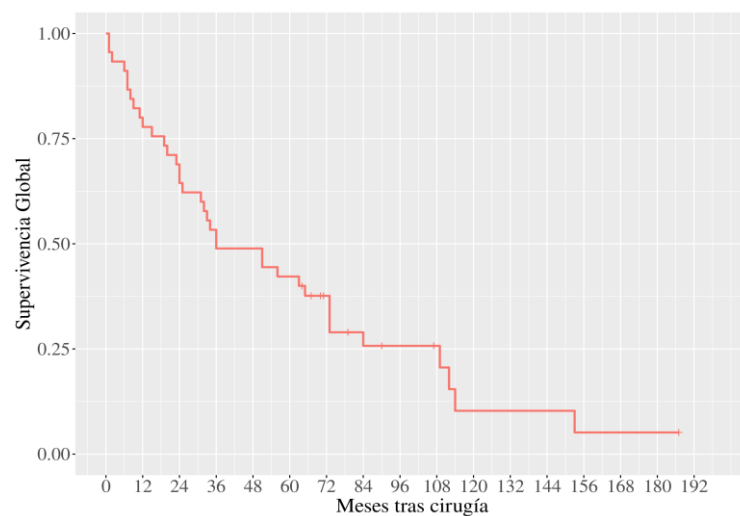


Figura 6. Curva Kaplan-Meier de la Supervivencia Global.

Supervivencia específica para enfermedad (SEE)

Se produjeron 21 exitos por tumor y contamos con el tiempo de seguimiento de 19. La mediana del tiempo de supervivencia, en este caso, fue de 66 meses tras la cirugía. La tasa de supervivencia específica para enfermedad fue del 56% a los 3 años y del 52% a los 5 años (Figura 7).

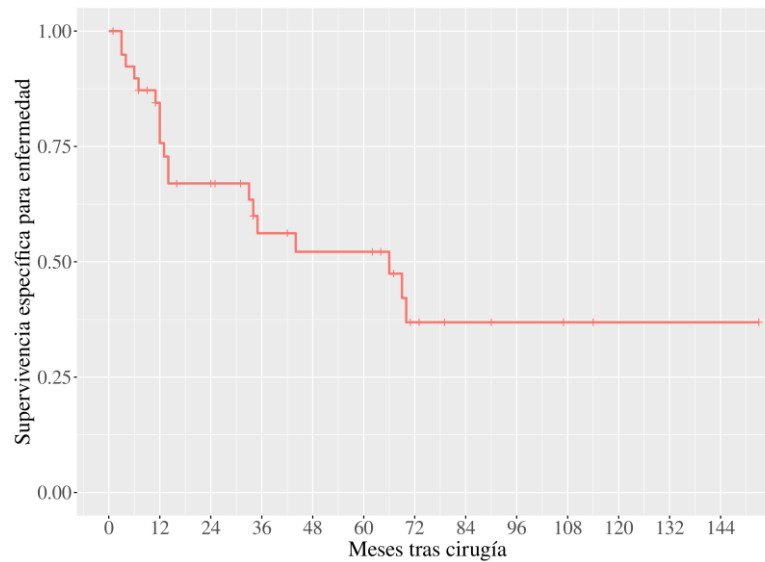


Figura 7. Curva Kaplan-Meier de la Supervivencia Específica para Enfermedad.

5.2.2 Análisis de supervivencia en el subgrupo de 27 ITAC: muestra tumoral/germinal

Supervivencia libre de enfermedad (SLE)

Recidivaron 14 casos. La mediana del tiempo libre de enfermedad fue de 66 meses. La tasa de supervivencia libre de enfermedad fue del 62% a los 3 años y del 57% a los 5 años de (Figura 8).

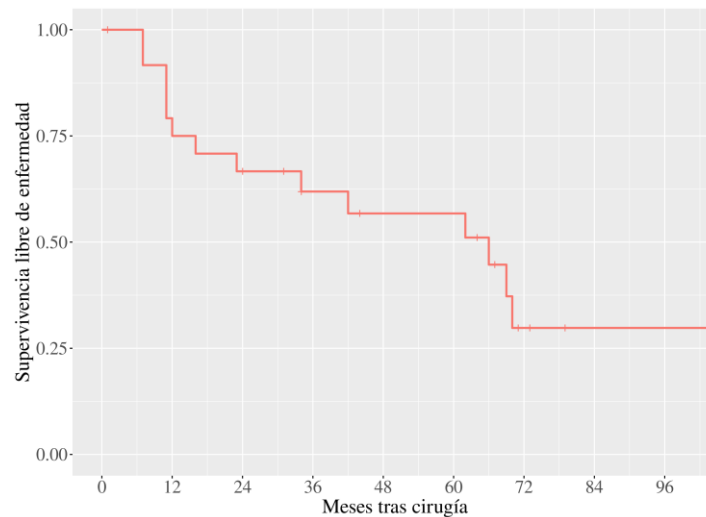


Figura 8. Curva Kaplan-Meier de la Supervivencia Libre de Enfermedad.

Supervivencia global (SG)

Fallecieron 17 pacientes, siendo la mediana del tiempo de supervivencia de 73 meses tras la cirugía. La tasa de supervivencia global fue del 60% a los 3 años y del 56% a los 5 años (Figura 9).

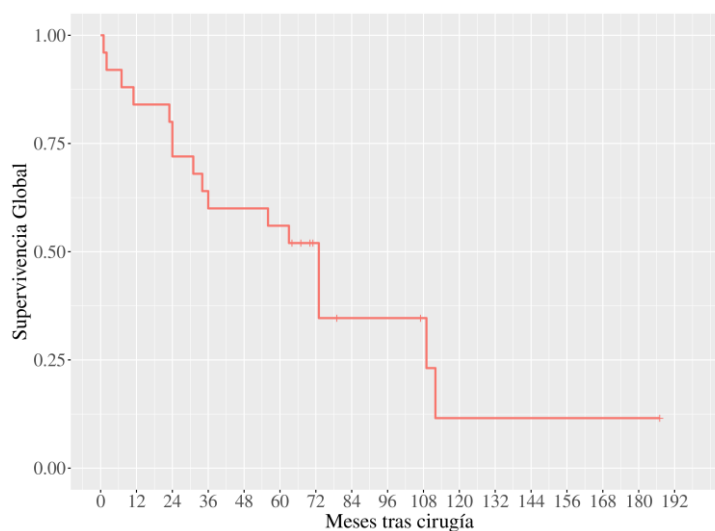


Figura 9. Curva Kaplan-Meier de la Supervivencia Global.

Supervivencia específica para enfermedad (SEE)

Fallecieron 9 pacientes a causa del tumor. La mediana del tiempo de supervivencia fue de 70 meses. La tasa de supervivencia específica para enfermedad fue del 80% a los 3 años y del 73% a los 5 años (Figura 10).

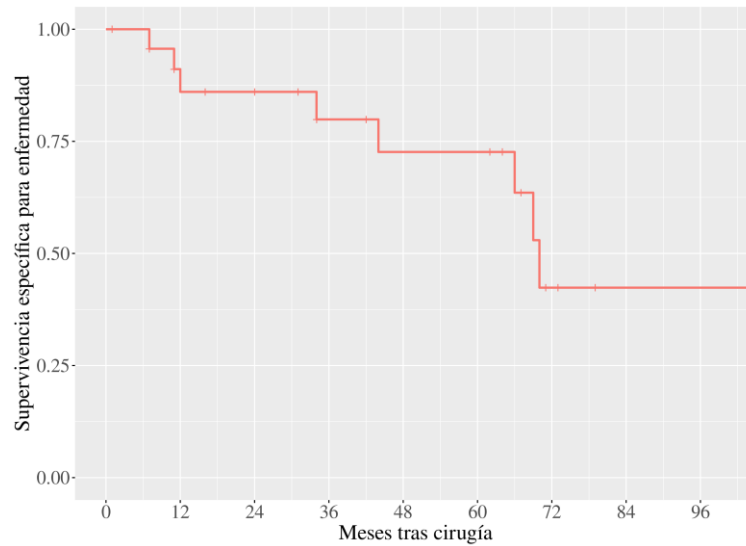


Figura 10. Curva Kaplan-Meier de la Supervivencia Específica para Enfermedad.

Como se observa en las figuras anteriores, este subgrupo de 27 ITAC tiene una tasa de supervivencia libre de enfermedad, global y específica superior a la de todos los 48.

Las 27 muestras de ADN germinal también se secuenciaron con éxito. Después del proceso de filtrado general de las 27 muestras tumorales (apartado 4.6) se detectaron 131 mutaciones en 61 genes (Figura 12). Al comparar las 27 muestras con su línea germinal, siete (26%) no albergaron mutaciones somáticas en ninguno de los 119 genes analizados, aunque un caso tuvo amplificación de *CTNNB1* (Figura 13). Cincuenta y dos, de las 131 detectadas previamente (40%), eran variantes somáticas (recuadros verdes en la Figura 13). Dicho de otro modo, 79 eran mutaciones germinales, por lo que fueron excluidas.

Además, rescatamos 7 mutaciones somáticas por ser variantes claramente patogénicas excluidas primeramente en base al estricto filtrado (recuadros azules en la Figura 13). Esto supuso ampliar el umbral de frecuencia de variante poblacional a 0,05. Por lo tanto, 58 variantes adicionales hubieran sido consideradas y 7 variantes se hubieran descartado atendiendo a los parámetros de filtrado si no contáramos con la línea germinal como filtro. Así, finalmente, el filtrado con la línea germinal resultó en 58 variantes somáticas relevantes en 33 genes diferentes.

Once genes se mutaron en dos o más de las 27 muestras comparadas. La media y mediana del número de mutaciones por muestra fue de 2 (rango de 0 a 10). Las mutaciones más frecuentes incluyeron los genes *PIK3CA*, *APC* y *ATM*.

Analizar los datos de secuenciación del tumor y la línea germinal ha permitido analizar CNAs. Encontramos tres casos con amplificaciones genéticas de alto nivel, de 8 copias o más, en *CTNNB1*, *NRAS*, *ATM* y *MET* (recuadros morados en la Figura 13).

En la Tabla 3 y la Tabla 4 se muestran, respectivamente, las variantes concretas que encontramos en las 27 muestras comparadas con la línea germinal y en las 21 muestras no comparadas. En la Tabla 3, se han señalado en negrita las variantes que finalmente demostramos como somáticas tras comparar el ADN tumoral con el germinal.

ID	2	3	6	7	8	10	11	13	15	19	21	24	27	28	29	30	31	32	33	34	36	38	40	42	44	45	47	Nº muestras (%)	
LRP1B									x2			x2																8 (30)	
APC					x2																								6 (22)
ATM																													6 (22)
NOTCH1	x2																												5 (19)
PIK3CA								x2																					5 (19)
BRCA1																													4 (15)
NOTCH2																													4 (15)
NF1																													4 (15)
ROS1																													4 (15)
TSC2																													3 (11)
KRAS																													3 (11)
ERBB3																													3 (11)
BRCA2																													3 (11)
ESR1																													3 (11)
CSF1R																													3 (11)
KMT2A									x2																				2 (7)
FOXP1																													2 (7)
NTRK1																													2 (7)
PDGFRA																													2 (7)
MET																													2 (7)
ERBB4																													2 (7)
CTNNB1																													2 (7)
KIT																													2 (7)
CBL																													2 (7)
SH2B3																													2 (7)
ERBB2																													1 (4)
FLT3																													1 (4)
BRD4																													1 (4)
PTCH1																													1 (4)
JAK3																													1 (4)
MTOR																													1 (4)
NOTCH3																													1 (4)
RB1																													1 (4)
AR																													1 (4)
MGMT																													1 (4)
SMO																													1 (4)
ATR																													1 (4)
TSC1																													1 (4)
CDKN2A																													1 (4)
IGF1R																													1 (4)
DDR2																													1 (4)
BRAF																													1 (4)
MAP2K1																													1 (4)
MYD88																													1 (4)
DNMT3A																													1 (4)
IGF2																													1 (4)
EWSR1																													1 (4)
MDM2																													1 (4)
ALK																													1 (4)
FGFR2																													1 (4)
FOXL2																													1 (4)
MAP2K4																													1 (4)
HGF																													1 (4)
CDK1B																													1 (4)
SOCS1																													1 (4)
FOX1A																													1 (4)
MITF																													1 (4)
IDH1																													1 (4)
BCL2																													1 (4)
NFKB2																													1 (4)
FGFR3																													1 (4)
Nº mutaciones	4	2	5	2	6	2	4	11	3	5	4	9	7	5	4	8	5	3	8	4	9	2	6	2	4	5	2		

Figura 12. Mutaciones genéticas en las 27 muestras tras el proceso de filtrado general.

■ Una mutación puntual; x2 Dos mutaciones puntuales distintas en el mismo gen.

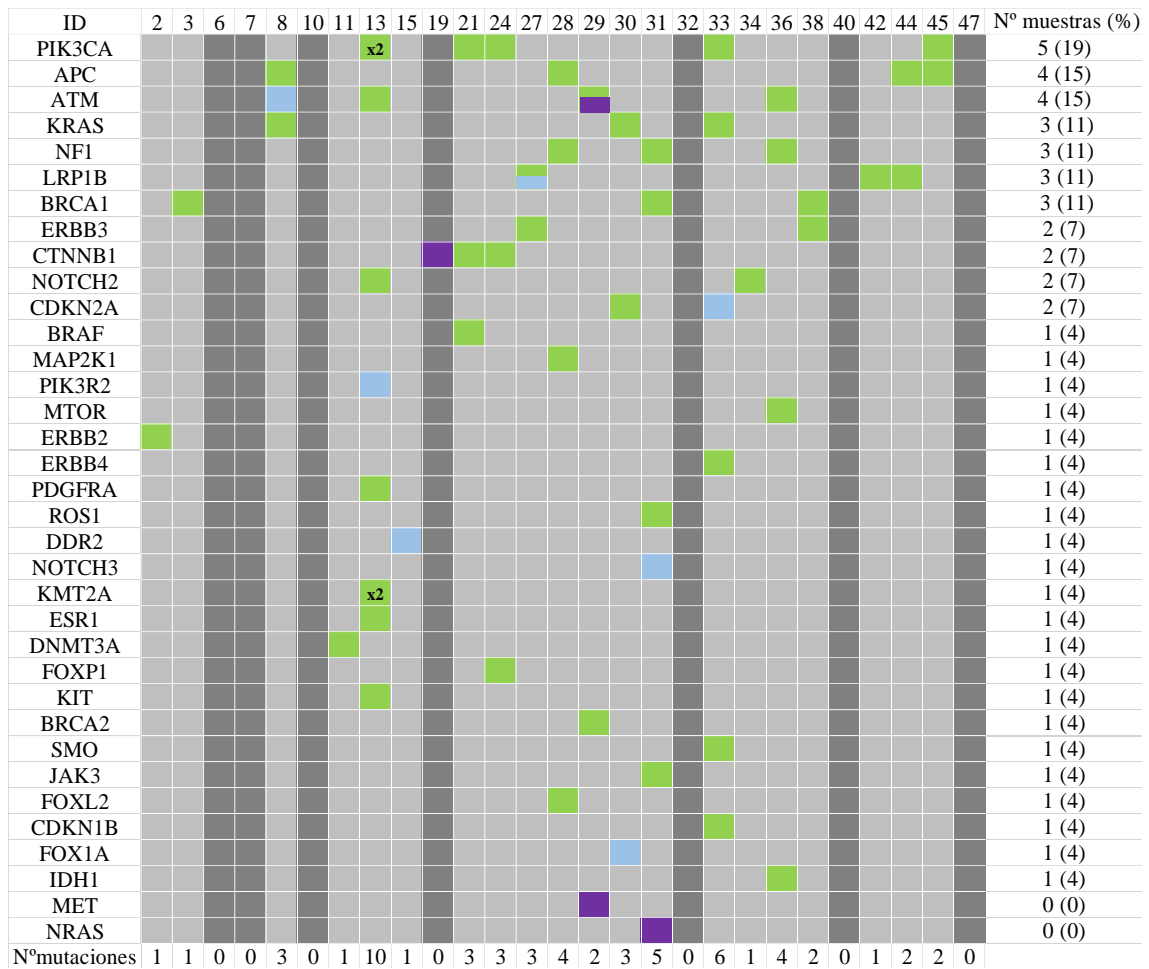


Figura 13. Mutaciones genéticas somáticas en las 27 muestras tras su comparación con línea germinal.

■ Variantes somáticas; x2 Dos variantes distintas en el mismo gen; ■ Variantes somáticas rescatadas; ■ Variaciones en el número de copias; ■ Muestras que no albergaron mutaciones.

Tabla 3. Variantes encontradas en el subgrupo de 27 ITAC tras el filtrado bioinformático y germinal.

ID	Gen	Variante ADN	Variante proteína	Efecto proteico	VAF	Zigocidad
2	NOTCH1	c.5015G>A	p.R1672H	NO_SYN	0,411	HETZ
	NOTCH1	c.2542G>A	p.E848K	NO_SYN	0,440	HETZ
	ERBB2	c.929C>T	p.S310F	NO_SYN	0,101	HETZ
	NOTCH3	c.6097C>T	p.P2033S	NO_SYN	0,503	HETZ
3	BRCA1	c.4663G>A	p.V1534M	NO_SYN	0,765	HOMZ_ALT ["LOH"]
	MYD88	c.16_34delGCTG AGGCTCCAGGA CCGC	p.A6Pfs*39	FRAMESHIFT	0,436	HETZ
6	NOTCH1	c.4691A>G	p.H1564R	NO_SYN	0,547	HETZ
	ROS1	c.1144T>C	p.Y382H	NO_SYN	0,508	HETZ
	MET	c.467C>T	p.S156L	NO_SYN	0,488	HETZ
	BRD4	c.1445C>T	p.P482L	NO_SYN	0,483	HETZ
	DDR2	c.745C>T	p.H249Y	NO_SYN	0,403	HETZ
7	NOTCH1	c.2783C>T	p.T928M	NO_SYN	0,430	HETZ
	KTM2A	c.1504G>A	p.E502K	NO_SYN	0,484	HETZ
8	APC	c.5826_5829delC	p.D1942Efs*27	FRAMESHIFT	0,389	HETZ
	APC	c.3949G>C	p.E1317Q	NO_SYN	0,747	HETZ
	NOTCH2	c.4238T>A	p.L1413H	NO_SYN	0,468	HETZ
	NF1	c.7468G>C	p.V2490L	NO_SYN	0,727	HETZ
	KRAS	c.38G>A	p.G13D	NO_SYN	0,536	HETZ
	ESR1	c.316A>G	p.S106G	NO_SYN	0,492	HETZ
10	ATM	c.3161C>G	p.P1054R	NO_SYN	0,820	HOMZ_ALT ["LOH"]
	TSC2	c.1574A>G	p.N525S	NO_SYN	0,462	HETZ
	CSF1R	c.1517A>C	p.H506P	NO_SYN	0,485	HETZ
11	PDGFRA	c.2365G>C	p.G789R	NO_SYN	0,498	HETZ
	ERBB4	c.882A>G	p.P294P	SPLICING	0,495	HETZ
	IGFR1	c.16G>A	p.G6R	NO_SYN	0,466	HETZ
	DNMT3A	c.1895A>G	p.H632R	NO_SYN	0,200	HETZ

■ Variantes somáticas rescatadas. **Negrita** = variantes somáticas confirmadas con la línea germinal.

Tabla 3. Continuación.

ID	Gen	Variante ADN	Variante proteína	Efecto proteico	VAF	Zigocidad
13	ATM	c.497-2^a>T	-	SPLICING	0,282	HETZ
	PIK3CA	c.331^a>G	p.K111E	NO_SYN	0,252	HETZ
	PIK3CA	c.1361^a>G	p.D454G	NO_SYN	0,269	HETZ
	BRCA1	c.3331_3334delC AAG	p.Q1111Nfs*5	FRAMESHIFT	0,665	HETZ
	ESR1	c.1057G>T	p.E353*	STOP_GAINED	0,197	HETZ
	KMT2A	c.472dupA	p.R158Kfs*12	FRAMESHIFT	0,257	HETZ
	KMT2A	c.7246G>T	p.E2419*	STOP_GAINED	0,265	HETZ
	NOTCH2	c.4733G>A	p.R1578H	NO_SYN	0,274	HETZ
	PDGFRA	c.1364^a>G	p.K455R	SPLICING, NO_SYN	0,282	HETZ
	KIT	c.1039C>A	p.Q347K	NO_SYN	0,236	HETZ
	AR	c.2357T>C	p.V786A	NO_SYN	0,491	HETZ
	PIK3R2	c.1010+3^a>T	-	SPLICING	0,242	HETZ
15	LRP1B	c.7420G>A	p.G2474S	NO_SYN	0,392	HETZ
	LRP1B	c.2005 ^a >G	p.I669V	NO_SYN	0,641	HETZ
	MGMT	c.55C>T	p.L19F	NO_SYN	0,636	HETZ
	DDR2	c.1323G>A	p.M441I	NO_SYN	0,767	HOMZ_ALT ["LOH"]
19	ESR1	c.352T>C	p.S118P	NO_SYN	0,618	HETZ
	CBL	c.1227+4C>T	-	SPLICING	0,663	HETZ
	IGF2	c.59C>T	p.S20L	NO_SYN	0,335	HETZ
	EWR1	c.1276C>T	p.P426S	NO_SYN	0,504	HETZ
	EWR1	c.1408G>A	p.G470S	NO_SYN	0,436	HETZ
21	PIK3CA	c.1637A>G	p.Q546R	NO_SYN	0,295	HETZ
	CSF1R	c.1517A>C	p.H506P	NO_SYN	0,476	HETZ
	CTNNB1	c.1004A>T	p.K335I	NO_SYN	0,600	HETZ
	BRAF	c.1780G>A	p.D594N	NO_SYN	0,315	HETZ


 Variantes somáticas rescatadas. **Negrita** = variantes somáticas confirmadas con la línea germinal.

Tabla 3. Continuación.

ID	Gen	Variante ADN	Variante Proteína	Efecto proteico	VAF	Zigocidad
24	LRP1B	c.6428-49A>C	-	INTRONIC	0,529	HETZ
	LRP1B	c.3128C>G	p.T1043S	NO_SYN	0,491	HETZ
	PIK3CA	c.2816A>G	p.D939G	NO_SYN	0,255	HETZ
	NOTCH2	c.7075C>G	p.P2359A	NO_SYN	0,517	HETZ
	BRCA2	c.6100C>T	p.R2034C	NO_SYN	0,496	HETZ
	FOXP1	c.1144C>A	p.P382T	SPLICING, NO_SYN	0,309	HETZ
	CTNNB1	c.133_135delTCT	p.S45del	INFRAME DELETION	0,505	HETZ
	MDM2	c.1492delT	p.*498del	FRAMESHIFT	0,403	HETZ
	ALK	c.661G>C	p.G221R	NO_SYN	0,518	HETZ
27	LRP1B	c.2152C>A	p.H718N	NO_SYN	0,297	HETZ
	ATM	c.5558A>T	p.D1853V	NO_SYN	0,245	HETZ
	TSC2	c.1318G>A	p.G440S	NO_SYN	0,288	HETZ
	ERBB3	c.217G>A	p.D73N	NO_SYN	0,328	HETZ
	MET	c.2975C>T	p.D1853V	NO_SYN	0,245	HETZ
	FGFR2	c.2305-216C>T	-	INTRONIC	0,464	HETZ
	FGFR2	c.170C>T	p.S57L	NO_SYN	0,487	HETZ
	LRP1B	c.10844G>C	p.G6315A	NO_SYN	0,786	HOMZ_ALT ["LOH"]
28	APC	c.4585C>T	p.Q1529*	STOP_GAINED	0,405	HETZ
	NF1	c.7946C>G	p.S2649*	STOP_GAINED	0,423	HETZ
	MAP2K1	c.622G>C	p.D208H	NO_SYN	0,291	HETZ
	FOXL2	c.695C>T	p.A232V	NO_SYN	0,309	HETZ
	MAP2K4	c.43G>A	p.G15S	NO_SYN	0,275	HETZ
29	LRP1B	c.2005A>G	p.I669V	NO_SYN	0,448	HETZ
	ATM	c.1744T>C	p.F582L	NO_SYN	0,956	HOMZ_ALT ["LOH"]
	TSC2	c.5359G>A	p.G1787S	NO_SYN	0,169	HETZ
	BRCA2	c.9976A>T	p.K3326*	STOP_GAINED	0,900	HOMZ_ALT ["LOH"]

■ Variantes somáticas rescatadas. **Negrita** = variantes somáticas confirmadas con la línea germinal.

Tabla 3. Continuación.

ID	Gen	Variante ADN	Variante proteína	Efecto proteico	VAF	Zigocidad
30	LRP1B	c.7420G>A	p.G2474S	NO_SYN	0,422	HETZ
	APC	c.4336G>A	p.A1446T	NO_SYN	0,353	HETZ
	ROS1	c.1958C>T	p.S653F	NO_SYN	0,365	HETZ
	KRAS	c.35G>A	p.G12D	NO_SYN	0,439	HETZ
	FOXP1	c.1762G>A	p.A588T	NO_SYN	0,494	HETZ
	TSC1	c.3103G>A	p.G1035S	NO_SYN	0,502	HETZ
	CDKN2A	c.172C>T	p.R58*	STOP_GAINED	0,815	HOMZ_ALT
	HGF	c.1211C>A	p.S404Y	NO_SYN	0,577	HETZ
	FOX1A	c.442C>G	p.L148V	NO_SYN	0,855	HOMZ_ALT ["LOH"]
31	BRCA1	c.4039A>G	p.R1347G	NO_SYN	0,866	HOMZ_ALT ["LOH"]
	NF1	c.6709C>T	p.R2237*	STOP_GAINED	0,717	HETZ
	ROS1	c.6116G>A	p.R2039H	NO_SYN	0,223	HETZ
	JAK3	c.2164G>A	p.V722I	NO_SYN	0,864	HOMZ_ALT ["LOH"]
	RB1	c.2652A>C	p.E884D	NO_SYN	0,493	HETZ
		NOTCH3	c.3399C>A	p.H1133Q	NO_SYN	0,861
	ATM	c.6067G>A	p.G2023R	NO_SYN	0,485	HETZ
32	CSF1R	c.2760G>C	p.E920D	NO_SYN	0,503	HETZ
	CSF1R	c.2080G>A	p.E694K	NO_SYN	0,505	HETZ
33	APC	c.1959G>A	p.R653R	SPLICING, SYN	0,489	HETZ
	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	NO_SYN	0,306	HETZ
	KRAS	c.35G>A	p.G12D	NO_SYN	0,278	HETZ
	ERBB4	c.2008A>G	p.T670A	NO_SYN	0,286	HETZ
	SMO	c.2285G>A	p.R762H	NO_SYN	0,298	HETZ
	SMO	c.808G>A	p.V270I	NO_SYN	0,498	HETZ
	CDKN1B	c.376G>T	p.E126*	STOP_GAINED	0,293	HETZ
	SOCS1	c.134_139dupTC	p.A47Vfs*168	FRAMESHIFT	0,388	HETZ
	CDKN2A	c.187G>C	p.Gly63Arg	NO_SYN	0,782	HOMZ_ALT ["LOH"]

■ Variantes somáticas rescatadas. **Negrita** = variantes somáticas confirmadas con la línea germinal.

Tabla 3. Continuación.

ID	Gen	Variante ADN	Variante proteína	Efecto proteico	VAF	Zigocidad
34	NOTCH2	c.4888C>T	p.R1630C	NO_SYN	0,121	HETZ
	KIT	c.1211C>T	p.A404V	NO_SYN	0,561	HETZ
	FLT3	c.*80A>G	-	3'UTR	0,511	HETZ
	FOX1A	c.890C>T	p.P297L	NO_SYN	0,523	HETZ
36	ATM	c.2051A>C	p.Q684P	NO_SYN	0,436	HETZ
	NF1	c.7267dupA	p.T2423Nfs*4	FRAMESHIFT	0,365	HETZ
	ERBB3	c.286A>G	p.T96A	NO_SYN	0,514	HETZ
	BRCA2	c.2998A>C	p.I1000L	NO_SYN	0,182	HETZ
	PTCH1	c.4081G>A	p.V1361M	NO_SYN	0,514	HETZ
	MTOR	c.6607G>A	p.G2203S	NO_SYN	0,231	HETZ
	ATR	c.3245G>A	p.R1082H	NO_SYN	0,466	HETZ
	MITF	c.790G>A	p.A264T	NO_SYN	0,492	HETZ
38	IDH1	c.394C>T	p.R132C	NO_SYN	0,294	HETZ
	BRCA1	c.4807_4823del	p.P1603Rfs*13	FRAMESHIFT	0,569	HETZ
	ERBB3	c.3529C>A	p.L1177I	NO_SYN	0,926	HOMZ_ALT
40	NOTCH1	c.2542G>A	p.E848K	NO_SYN	0,492	HETZ
	ROS1	c.6061C>T	p.P2021S	NO_SYN	0,493	HETZ
	NTRK1	c.16C>T	p.R6W	NO_SYN	0,493	HETZ
	NTRK1	c.53G>A	p.G18E	NO_SYN	0,509	HETZ
	BCL2	c.-373G>A	-	5'UTR	0,482	HETZ
	NFKB2	c.2249C>T	p.A750V	NO_SYN	0,482	HETZ
42	LRP1B	c.1604T>C	p.V535A	NO_SYN	0,213	HETZ
	ATM	c.1229T>C	p.V410A	NO_SYN	0,483	HETZ
44	LRP1B	c.4496C>A	p.T1499K	NO_SYN	0,176	HETZ
	APC	c.4282G>T	p.G1428*	STOP_GAINED	0,375	HETZ
	CBL	c.2414_2416dup	p.L805_D806insV	INFRAME DUPLICATION	0,372	HETZ
	FGFR3	c.1354G>T	p.A452S	NO_SYN	0,385	HETZ


 Variantes somáticas rescatadas. **Negrita** = variantes somáticas confirmadas con la línea germinal.

Tabla 3. Continuación.

ID	Gen	Variante ADN	Variante proteína	Efecto proteico	VAF	Zigocidad
45	APC	c.4618G>T	p.E1540*	STOP_GAINED	0,422	HETZ
	NOTCH1	c.5227G>A	p.A1743T	NO_SYN	0,347	HETZ
	PIK3CA	c.2176G>A	p.E726K	NO_SYN	0,267	HETZ
	NTRK1	c.575G>A	p.G192D	SPLICING,NO_SYN	0,473	HETZ
	SH2B3	c.464C>T	p.P155L	NO_SYN	0,485	HETZ
47	LRP1B	c.7452T>A	p.N2484K	NO_SYN	0,496	HETZ
	SH2B3	c.639C>A	p.S213R	NO_SYN	0,547	HETZ

■ Variantes somáticas rescatadas. **Negrita** = variantes somáticas confirmadas con la línea germinal.

Leyenda: VAF= Variant Allele Frequency; NO_SYN= No sinónima; SYN= Sinónima; INTRONIC= Secuencia de nucleótido que no codifica para proteína pero regulan su expresión; SPLICING= Corte y empalme; FRAMESHIFT=Cambio de marco de lectura; STOP_GAINED= Ganancia de un codón de terminación prematuro; INFRAME DELECTION= Fragmento de ADN con una delección conservando marco de lectura; INFRAME DUPLICATION= Fragmento de ADN duplicado conservando marco de lectura; 3'UTR= Región no traducida 3 prima ; 5'UTR= Región no traducida 5 prima; HETZ= Mutación en heterocigosis; HOMZ_ALT= Mutación en homocigosis; HOMZ_ALT ["LOH"]= Mutación en heterocigosis en línea germinal y en homocigosis en tumor [Loss Of Heterozygosity].

Tabla 4. Variantes encontradas en las 21 muestras tumorales restantes tras el filtrado bioinformático.

ID	Gen	Variante ADN	Variante proteína	Efecto proteico	VAF	Zigocidad
1	LRP1B	c.2005A>G	p.I669V	NO_SYN	0,511	HETZ
	ATM	c.146C>G	p.S49C	NO_SYN	0,487	HETZ
	EPHA2	c.2319delC	p.T774Pfs*37	FRAMESHIFT	0,274	HETZ
	FLT3	c.1606C>T	p.P536S	NO_SYN	0,475	HETZ
4	NOTCH1	c.4028C>T	p.A1343V	NO_SYN	0,509	HETZ
	KRAS	c.35G>A	p.G12D	NO_SYN	0,589	HETZ
5	NRAS	c.553C>T	p.P185S	NO_SYN	0,457	HETZ
	RB1	c.1574C>G	p.A525G	NO_SYN	0,693	HETZ
9	APC	c.2413C>T	p.R805*	STOP_GAINED	0,640	HETZ
	KRAS	c.176C>G	p.A59G	NO_SYN	0,163	HETZ
12	FOXP1	c.1135G>A	p.A379T	NO_SYN	0,490	HETZ
14	NOTCH1	c.1543G>C	p.E515Q	NO_SYN	0,480	HETZ
	NOTCH2	c.7223T>A	p.L2408H	NO_SYN	0,244	HETZ
	LRP1B	c.12161A>C	p.E4054A	NO_SYN	0,361	HETZ
	EPHA2	c.830C>T	p.S277L	NO_SYN	0,664	HETZ
	PDGFRA	c.39_44delTCTTCT	p.L14_L15del	INFRAME DELETION	0,111	HETZ
16	ATM	c.998C>T	p.S333F	NO_SYN	0,463	HETZ
	NF1	c.278G>A	p.C93Y	NO_SYN	0,121	HETZ
	NF1	c.2686delG	p.D896Ifs*6	FRAMESHIFT	0,126	HETZ
	KMT2A	c.6563G>A	p.R2188Q	NO_SYN	0,407	HETZ
	PTCH1	c.1306G>A	p.D436N	NO_SYN	0,479	HETZ
17	BRCA1	c.2521C>T	p.R841W	NO_SYN	0,486	HETZ
	ROS1	c.2411C>A	p.T804N	NO_SYN	0,420	HETZ
	BRD4	c.755C>G	p.P252R	NO_SYN	0,620	HETZ
	AR	c.1424C>T	p.A475V	NO_SYN	0,996	HOMZ_ALT

Tabla 4. Continuación.

ID	Gen	Variante ADN	Variante proteína	Efecto proteico	VAF	Zigocidad
18	BRCA1	c.3331_3334delCAAG	p.Q1111Nfs*5	FRAMESHIFT	0,386	HETZ
	CSF1R	c.895G>A	p.A299T	NO_SYN	0,493	HETZ
	TSC2	c.5383C>T	p.R1795C	NO_SYN	0,449	HETZ
	MET	c.504G>T	p.E168D	NO_SYN	0,472	HETZ
	EPHA2	c.2875G>A	p.A959T	NO_SYN	0,443	HETZ
	AKT1	c.138C>A	p.D46E	NO_SYN	0,470	HETZ
20	APC	c.4088A>G	p.K1363R	NO_SYN	0,744	HETZ
	BCRA2	c.4419C>A	p.N1473K	NO_SYN	0,129	HETZ
	BCRA2	c.4421A>T	p.K1474I	NO_SYN	0,130	HETZ
	SMO	c.808G>A	p.V270I	NO_SYN	0,483	HETZ
	PTCH1	c.3487G>A	p.G1163S	NO_SYN	0,468	HETZ
22	ATM	c.2932T>C	p.S978P	NO_SYN	0,501	HETZ
	JAK3	c.2152G>C	p.V718L	NO_SYN	0,474	HETZ
23	APC	c.1779G>A	p.W593*	STOP_GAINED	0,398	HETZ
	BRCA1	c.4039A>G	p.R1347G	NO_SYN	0,268	HETZ
	BRCA1	c.3284A>C	p.K1095T	NO_SYN	0,282	HETZ
	ERBB2	c.1960A>G	p.I654V	NO_SYN	0,711	HETZ
	FLT3	c.1774G>A	p.V592I	NO_SYN	0,158	HETZ
	JAK3	c.2164G>A	p.V722I	NO_SYN	0,461	HETZ
25	MAP2K2	c.813C>G	p.D271E	NO_SYN	0,381	HETZ
	LRP1B	c.13114A>T	p.N4372Y	NO_SYN	0,482	HETZ
	LRP1B	c.11227G>A	p.G3743S	NO_SYN	0,510	HETZ
	APC	c.933G>A	p.K311K	SPLICING, SYN	0,543	HETZ
26	TSC2	c.5378G>A	p.R1793Q	NO_SYN	0,514	HETZ
	KRAS	c.35G>A	p.G12D	NO_SYN	0,284	HETZ
	LRP1B	c.12523C>A	p.P4175T	NO_SYN	0,236	HETZ
	EPHA2	c.2162G>A	p.R721Q	NO_SYN	0,473	HETZ
35	ERBB3	c.2150C>T	p.S717L	NO_SYN	0,459	HETZ
	TSC2	c.5116C>T	p.R1706C	NO_SYN	0,532	HETZ
	APC	c.1746dupA	p.S583Ifs*19	SPLICING, FRAMESHIFT	0,584	HETZ
	ATR	c.2290A>G	p.K764E	NO_SYN	0,648	HETZ
	PALB2	c.2816T>G	p.L939W	NO_SYN	0,600	HETZ

Tabla 4. Continuación.

ID	Gen	Variante ADN	Variante proteína	Efecto proteico	VAF	Zigocidad
37	ATM	c.1810C>T	p.P604S	NO_SYN	0,482	HETZ
	ATM	c.4388T>G	p.F1463C	NO_SYN	0,482	HETZ
	ERBB3	c.1106A>G	p.N369S	NO_SYN	0,673	HETZ
	TSC2	c.1574A>G	p.N525S	NO_SYN	0,628	HETZ
	ESR1	c.-30C>T	-	5'UTR	0,873	HOMZ_ALT
	MGMT	c.322G>A	p.E108K	NO_SYN	0,629	HETZ
	NTRK1	c.16C>T	p.R6W	NO_SYN	0,667	HETZ
	LRP1B	c.12003G>T	p.W4001C	NO_SYN	0,297	HETZ
39	BRD4	c.3536A>G	p.K1179R	NO_SYN	0,297	HETZ
	NOTCH2	c.7075C>G	p.P2359A	NO_SYN	0,499	HETZ
	KMT2A	c.1948A>G	p.N650D	NO_SYN	0,446	HETZ
	KMT2A	c.10648G>A	p.G3550R	NO_SYN	0,485	HETZ
	NRTK1	c.2339G>A	p.R780Q	NO_SYN	0,507	HETZ
	FOXP1	c.643C>G	p.P215A	NO_SYN	0,506	HETZ
	ERBB2	c.2033G>A	p.R678Q	NO_SYN	0,980	HOMZ_ALT
	ERBB2	c.1157C>A	p.A386D	NO_SYN	0,980	HOMZ_ALT
41	NOTCH3	c.6532C>T	p.P2178S	NO_SYN	0,493	HETZ
	BRCA1	c.1367T>C	p.I456T	NO_SYN	0,491	HETZ
43	TSC2	c.5383C>T	p.R1795C	NO_SYN	0,516	HETZ
	IL7R	c.760G>A	p.A254T	NO_SYN	0,484	HETZ
	TSC2	c.1577G>A	p.S526N	NO_SYN	0,496	HETZ
	CSF3R	c.2422G>A	p.E808K	NO_SYN	0,495	HETZ
46	MTOR	c.985G>A	p.A329T	NO_SYN	0,469	HETZ
	NOTCH1	c.4348G>A	p.E1450K	NO_SYN	0,586	HETZ
	BRCA2	c.430G>T	p.V144F	NO_SYN	0,245	HETZ
	BRCA2	c.5299A>T	p.K1767*	STOP_GAINED	0,419	HETZ
48	EPHA2	c.334G>A	p.A112T	NO_SYN	0,520	HETZ
	MLP	c.1102G>T	p.V368L	NO_SYN	0,605	HETZ

Leyenda: VAF= Variant Allele Frequency; NO_SYN= No sinónima; SYN= Sinónima; SPLICING= Corte y empalme; FRAMESHIFT= Cambio de marco de lectura; STOP_GAINED= Ganancia de un codón de terminación prematuro; INFRAME DELETION= Fragmento de ADN con una deleción conservando marco de lectura; 5'UTR= Región no traducida 5 prima; HETZ= Mutación en heterocigosis; HOMZ_ALT= Mutación en homocigosis.

5.3.1 Agrupación de las variantes en rutas de señalización en el subgrupo de 27 ITAC

Agrupando los genes mutados de acuerdo con las vías de señalización más frecuentemente afectadas, identificamos 7 casos (26%) con mutaciones en la vía MAPK (2 *NF1*, 3 *KRAS*, 1 *BRAF* y 1 *NF1* + *MAP2KI*), 7 casos (26%) con mutaciones en la vía de reparación del ADN por Recombinación Homóloga (3 *ATM*, 3 *BRCA1* y 1 *ATM* + *BRCA2*), 6 casos (22%) con mutaciones en la vía PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase) (1 *PIK3CA*(x2) + *PIK3R2*, 4 *PIK3CA*, 1 *MTOR*) y 6 casos (22%) con mutaciones en la vía Wnt/ β -catenina (4 *APC* y 2 *CTNNB1*). Las mutaciones en las diferentes vías de señalización mencionadas no ocurrieron de manera excluyente en la misma muestra tumoral, pero se realizó el análisis para estudiar la posible relación clínica entre las diferentes vías encontrándose que no existe relación estadísticamente significativa entre las mismas (Tabla 5).

Tabla 5. Relación entre las diferentes vías en el subgrupo de 27 ITAC.

	No PI3K		Si PI3K		Test Fisher
	N	%	N	%	<i>p</i> valor
No Wnt	18	87	3	50	0,101
Si Wnt	3	14	3	50	
No Rep. ADN	16	76	4	67	0,633
Si Rep. ADN	5	24	2	33	
No MAPK	17	81	3	50	0,29
Si MAPK	4	19	3	50	
	No Wnt		Si Wnt		Chi cuadrado
	N	%	N	%	<i>p</i> valor
No Rep. ADN	15	71	5	83	1
Si Rep. ADN	6	29	1	17	
No MAPK	17	81	3	50	0,29
Si MAPK	4	19	3	50	
	No Rep. ADN		Si Rep. ADN		Test Fisher
	N	%	N	%	<i>p</i> valor
No MAPK	16	80	4	57	0,328
Si MAPK	4	20	3	43	

5.3.2 Estudio de la relación entre las variables clínicas y la presencia o número de mutaciones en el subgrupo de 27 ITAC

No se encontraron diferencias entre aquellas muestras con mutaciones y aquellas en las que no encontramos variantes somáticas relevantes en cuanto al consumo de tabaco, el subtipo histológico o la clasificación T (Tabla 6). Tampoco existieron diferencias entre encontrar mutaciones somáticas y la edad (test de Student, $pvalor=0,83$) o el tiempo de exposición al polvo de madera (test de Wilcoxon, $pvalor=0,788$).

Tabla 6. Relación entre los parámetros clínico-patológicos y la presencia de mutaciones somáticas en el subgrupo de 27 pacientes calculada mediante el test de Fisher.

Característica	N	Se encontraron mutaciones somáticas (%)	<i>pvalor</i>
Tabaco			
Si	16	13 (81)	0,391
No	11	7 (64)	
Subtipo histológico			
Bajo riesgo	17	12 (71)	0,678
Alto riesgo	10	8 (80)	
T			
T1-T2	12	8 (67)	0,662
T3-T4	15	12 (80)	
Casos totales	27	20	

Sin embargo, sí se encontró asociación entre el mayor número de mutaciones y el consumo de tabaco ($pvalor=0,044$) pero no con el subtipo histológico o la clasificación T (Tabla 7).

Tabla 7. Relación entre los parámetros clínico-patológicos y el número de mutaciones somáticas en el subgrupo de 27 ITAC calculada mediante el test de Wilcoxon.

Característica	Mediana	P25-P75	<i>p</i> valor
Tabaco			
Si	2,5	1-4	0,044
No	1	0-1,5	
Subtipo histológico			
Bajo riesgo	2	0-3	0,556
Alto riesgo	1	1-2	
T			
T1-T2	2	0-3,25	1
T3-T4	2	1-3	

Tampoco se encontró relación lineal estadísticamente significativa entre el mayor número de mutaciones y la edad ($r = -0,061$; $p\text{valor} = 0,763$) o el mayor tiempo de exposición al polvo de madera ($r = 0,014$; $p\text{valor} = 0,949$), calculados mediante el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman (según se cumpla o no la hipótesis de normalidad) y representados a continuación en la Figura 14 en forma de diagrama de dispersión.

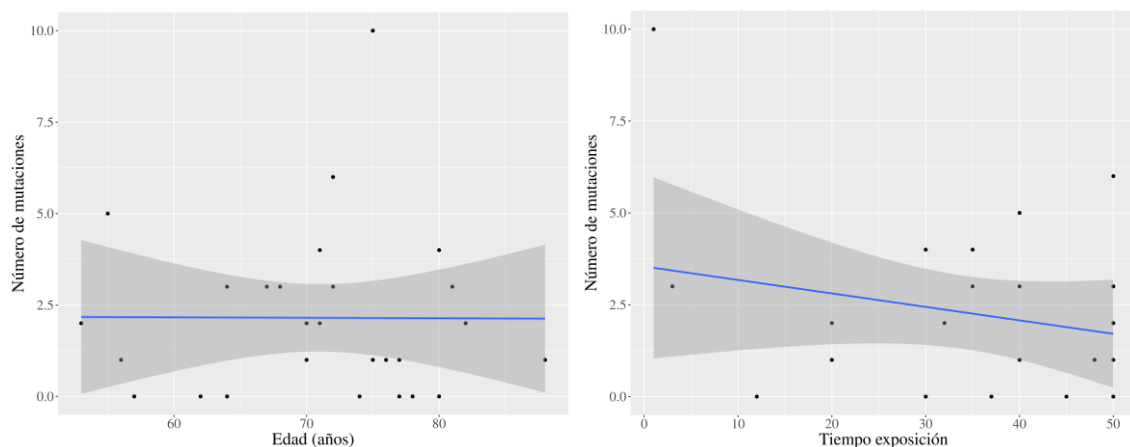


Figura 14. Diagrama de dispersión que muestra la ausencia de relación lineal entre el número de mutaciones y la edad o el tiempo de exposición.

5.3.3 Estudio de la relación entre las variables clínicas y las diferentes rutas de señalización mutadas en el subgrupo de 27 ITAC

La Tabla 8 resume la relación entre la mutación en las diferentes vías con el consumo de tabaco, subtipo histológico y clasificación T. La mutación en la ruta MAPK fue la única que mostró asociación clínica con algún parámetro clínico. Esta vía se asoció de forma significativa al consumo de tabaco y a subtipos histológicos de bajo riesgo (colónico y papilar). Dicho de otro modo, las mutaciones somáticas en la vía MAPK se observaron solamente en pacientes fumadores con subtipos de bajo riesgo.

Tabla 8. Relación entre los parámetros clínico-patológicos y las diferentes rutas de señalización en el subgrupo de 27 ITAC calculada mediante el test de Fisher.

Característica	N	MAPK mutada (%)	pvalor	PI3K mutada (%)	pvalor
Tabaco					
Si	16	7 (100)	0,022	4 (67)	1
No	11	0 (0)		2 (33)	
Subtipo histológico					
Bajo riesgo	17	7 (100)	0,026	3 (50)	0,638
Alto riesgo	10	0 (0)		3 (50)	
T					
T1-T2	12	4 (57)	0,662	4 (67)	0,357
T3-T4	15	3 (43)		2 (33)	
Casos totales	27	7		6	
Característica	N	Rep. ADN mutada (%)	pvalor	Wnt mutada (%)	pvalor
Tabaco					
Si	16	6 (87)	0,183	4 (67)	1
No	11	1 (14)		2 (33)	
Subtipo histológico					
Bajo riesgo	17	5 (71)	0,678	4 (67)	1
Alto riesgo	10	2 (29)		2 (33)	
T					
T1-T2	12	3 (43)	1	3 (50)	1
T3-T4	15	4 (57)		3 (50)	
Casos totales	27	7		6	

Se buscó calcular un punto de corte para la edad y el tiempo de exposición al polvo de madera que fuera discriminativo para la mutación de las cuatro rutas mencionadas, es decir, un punto de corte a partir del cual se observara una diferente probabilidad de mutación de las rutas. Para esto, se calculó el punto de corte óptimo según el índice de Youden para cada vía proporcionando Se (sensibilidad), Sp (especificidad), valor AUC (área bajo la curva), así como su significación (*pvalor*) y se representaron mediante curvas ROC como se muestra en la Figura 15 y en la Figura 16.

Únicamente hallamos como punto de corte significativo la edad en la ruta de reparación del ADN observando que los pacientes con edades inferiores a 71 años tienen una probabilidad significativamente mayor (*pvalor*=0,005) de tener mutaciones en esta vía. Este punto de corte muestra una Se del 86%, una Sp del 65% y un AUC del 74% (Figura 15).

EDAD	Punto de corte	Dirección hacia sano	Se	Sp	AUC (IC95%)	pvalor
MAP/ERK	72	>	0,85	0,55	0,657 (0,424-0,891)	0,234
PI3K	71	<	0,83	0,48	0,643 (0,389-0,897)	0,307
Rep.ADN	71	>	0,86	0,65	0,743 (0,544-0,942)	0,050
Wnt	80	<	0,50	0,90	0,623 (0,318-0,928)	0,381

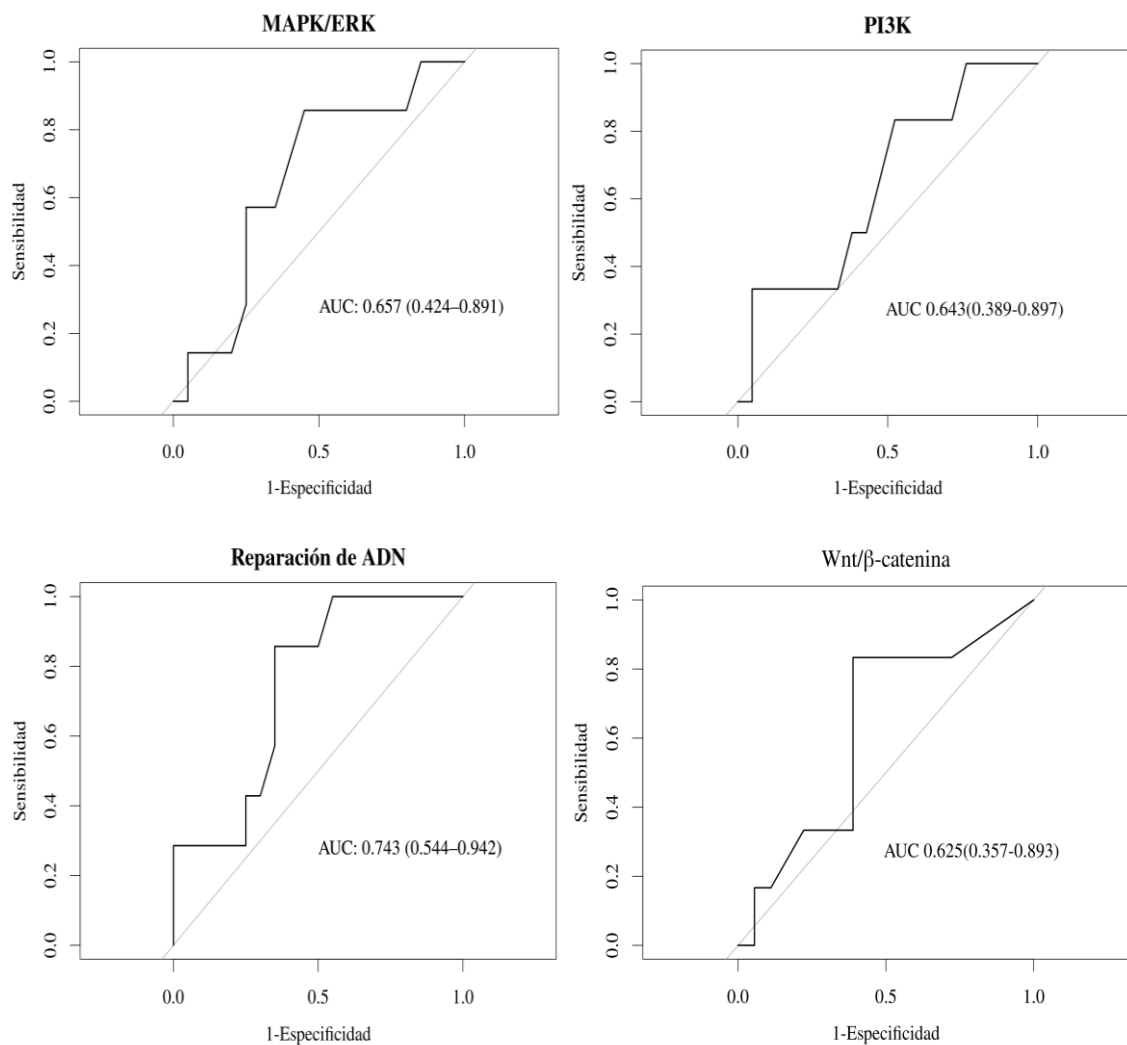


Figura 15. Representación gráfica mediante curvas ROC del punto de corte según el índice de Youden para la edad y la mutación en las diferentes rutas.

Leyenda: Se= Sensibilidad; Sp= Especificidad; AUC=Área bajo la curva.

Curvas ROC: Representación de la efectividad de estos puntos de corte. El eje de ordenadas mide la sensibilidad, la capacidad de detectar los casos positivos correctamente, y el eje de abscisas mide 1-especificidad, es decir aquellos resultados positivos que son incorrectos (falsos positivos).

TIEMPO EXPOSICIÓN	Punto de corte	Dirección hacia sano	Se	Sp	AUC (IC95%)	pvalor
MAP/ERK	35	<	0,71	0,71	0,529 (0,266-0,793)	0,847
PI3K	35	>	0,67	0,56	0,560 (0,243-0,87)	0,686
Rep.ADN	3	>	0,33	1	0,588 (0,271-0,905)	0,544
Wnt	35	>	0,83	0,61	0,625 (0,357-0,893)	0,381

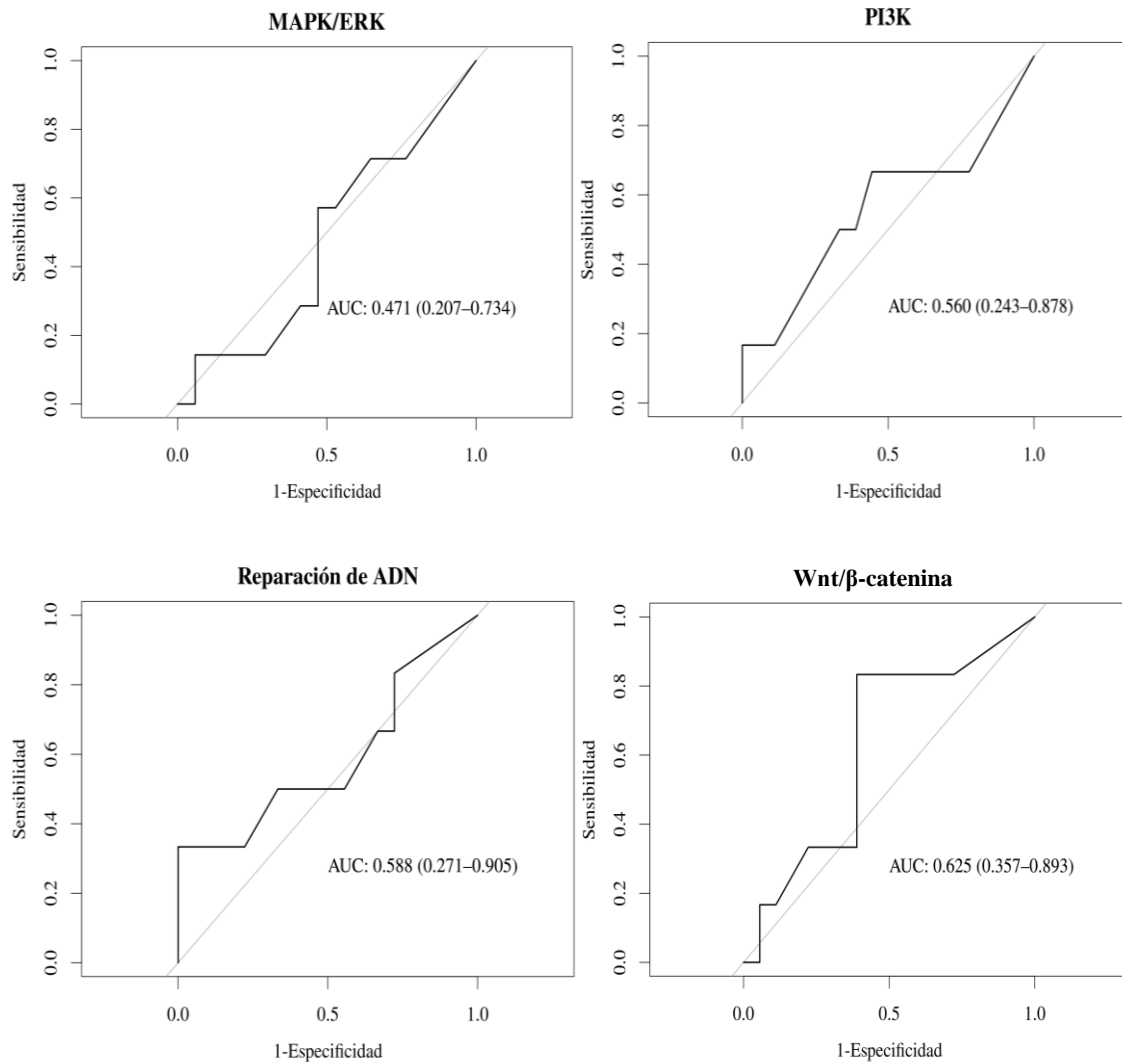


Figura 16. Representación gráfica mediante curvas ROC del punto de corte según el índice de Youden para el tiempo de exposición al polvo de madera y la mutación en las diferentes rutas.

Leyenda: Se= Sensibilidad; Sp= Especificidad; AUC=Área bajo la curva.

Curvas ROC: Representación de la efectividad de estos puntos de corte. El eje de ordenadas mide la sensibilidad, la capacidad de detectar los casos positivos correctamente, y el eje de abscisas mide 1-especificidad, es decir aquellos resultados positivos que son incorrectos (falsos positivos).

5.3.4 Estudio de la relación entre la recidiva tumoral y las diferentes rutas mutadas en el subgrupo de 27 ITAC

No se encontraron asociaciones significativas entre la presencia de recidiva o tipo de recidiva y la mutación en las diferentes vías (Tabla 9).

Tabla 9. Relación entre la recidiva tumoral y las diferentes rutas de señalización en el subgrupo de 27 ITAC calculada mediante el test de Fisher.

Característica	N	MAPK mutada (%)	<i>p</i> valor	PI3K mutada (%)	<i>p</i> valor
Recidiva					
Si	28	3 (43)	0,665	3 (50)	1
No	19	4 (57)		3 (50)	
Tipo recidiva					
Local	21	2 (67)	0,517	2 (67)	0,517
Distancia	2	0 (0)		0 (0)	
Local+Regional+Distancia	1	0 (0)		0 (0)	
Local+Distancia	1	1 (33)		1 (33)	
Casos totales	47	13		8	
Característica	N	Rep. ADN mutada (%)	<i>p</i> valor	Wnt mutada (%)	<i>p</i> valor
Recidiva					
Si	28	4 (67)	0,652	1 (17)	0,065
No	19	2 (33)		5 (83)	
Tipo recidiva					
Local	21	3 (75)	0,635	1 (100)	1
Distancia	2	0 (0)		0 (0)	
Local+Regional+Distancia	1	1 (25)		0 (0)	
Local+Distancia	1	0 (0)		0 (0)	
Casos totales	47	21		13	

Sin embargo, con el fin de determinar si el número de recidivas durante el seguimiento difiere según la mutación en las diferentes rutas de señalización mutadas, se han realizado diversos contrastes observando que aquellos ITAC con mutaciones en la ruta Wnt tienen, frente al resto, un número significativamente menor de recidivas durante el seguimiento (Tabla 10).

Tabla 10. Relación entre el número de recidivas y la mutación en las diferentes rutas en el subgrupo de 27 ITAC calculada mediante el test de Wilcoxon.

Ruta de señalización	N	Mediana	P25-P75	<i>p</i> valor
MAPK				
Si	7	0	0-1,5	0,581
No	19	1	0-2	
PI3K				
Si	6	1	0-1,75	0,698
No	20	0,5	0-2	
Rep. ADN				
Si	6	0,5	0,25-1,75	0,923
No	20	1	0-2	
Wnt				
Si	6	0	0	0,033
No	20	1	0-2	

5.3.5 Estudio de la relación entre las diferentes vías de señalización y la supervivencia en el subgrupo de 27 ITAC: Test log-rank y Curvas Kaplan Meier

Mediante el test de log-rank y curvas Kaplan Meier se compararon las curvas de supervivencia y las rutas de señalización mutadas (Figura 17, Figura 18 y Figura 19) sin mostrar diferencias significativas. Sin embargo, se observó una tendencia a una mejor supervivencia libre de enfermedad (*p*valor=0,069) y específica para enfermedad (*p*valor=0,059) en aquellos ITAC con mutaciones en la ruta Wnt/ β -catenina (Figura 17 y Figura 19).

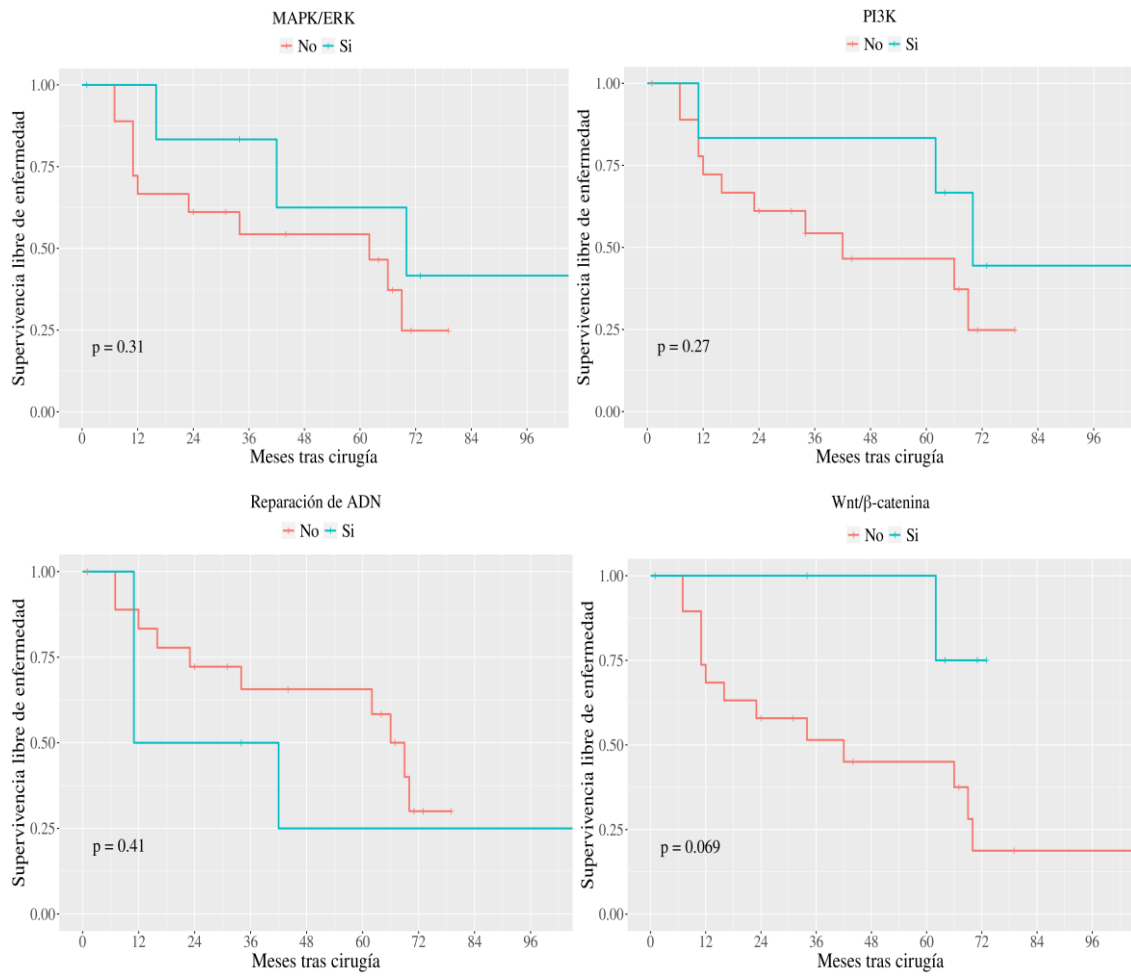


Figura 17. Comparación entre la supervivencia libre de enfermedad y las diferentes rutas de señalización.

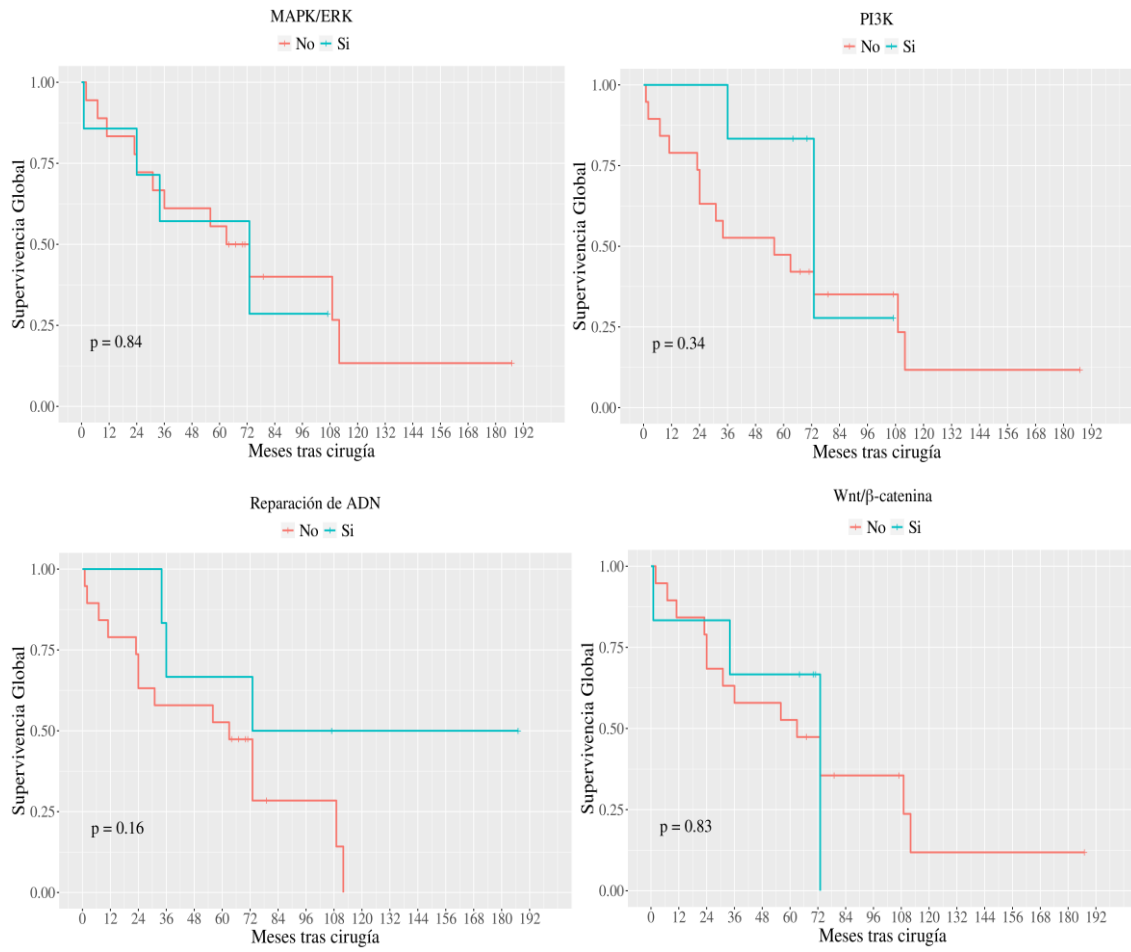


Figura 18. Comparación entre la supervivencia global y las diferentes rutas de señalización.

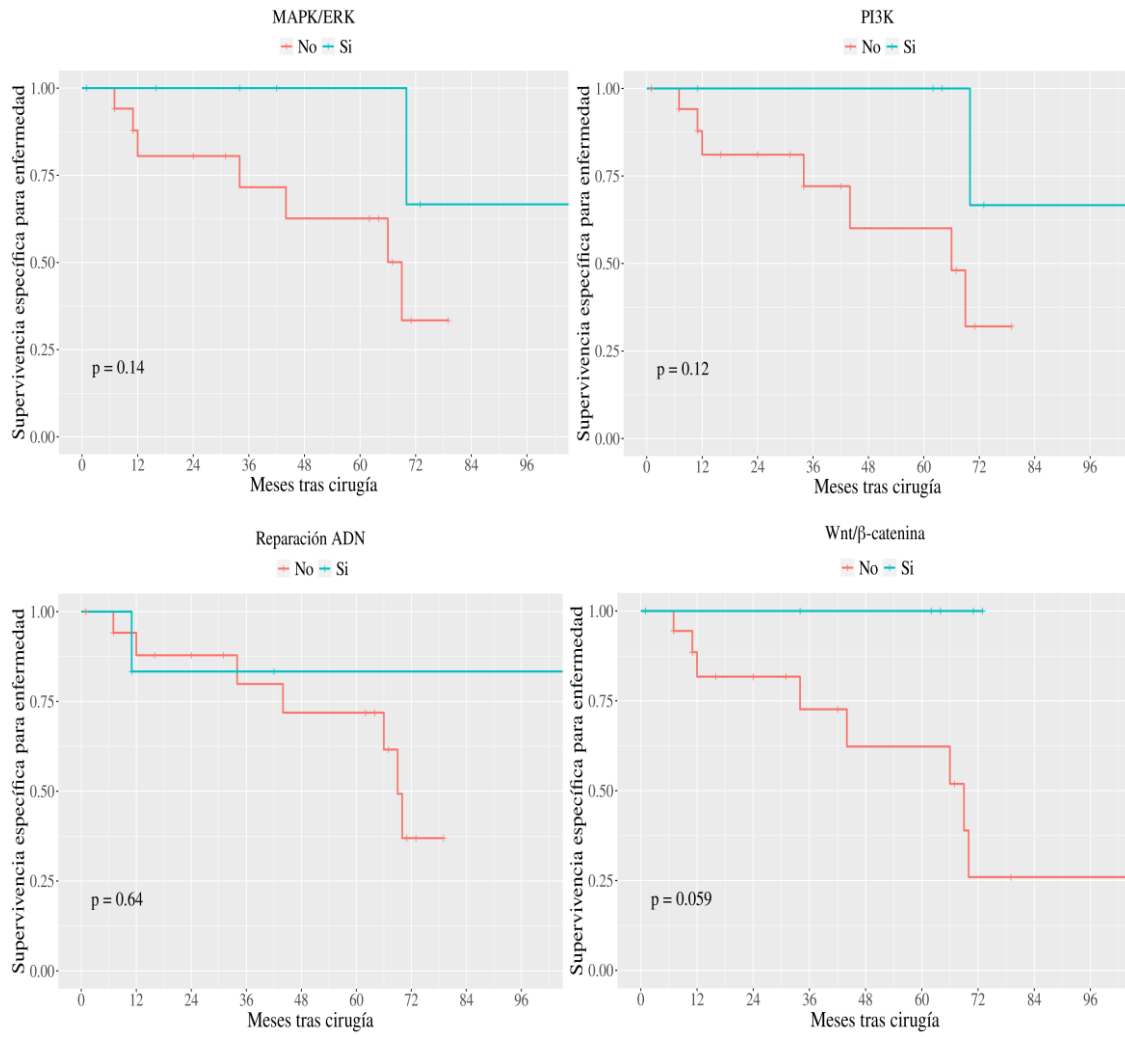


Figura 19. Comparación entre la supervivencia específica para enfermedad y las diferentes rutas de señalización.

5.3.6 Estudio de la relación entre las diferentes variables y la supervivencia en el subgrupo de 27 ITAC: Modelo de regresión de Cox

Para estudiar la relación entre las diferentes variables y la supervivencia en el subgrupo de 27 ITAC se construyeron modelos de regresión de Cox (univariante y multivariante) para cada una de las variables predictivas consideradas: edad, consumo tabáquico, tiempo de exposición al polvo de madera, subtipo histológico (bajo riesgo/alto riesgo), clasificación T (T1-T2/T3-T4), RT adyuvante, tipo de abordaje (endoscópico/externo), y ruta de señalización mutada. No se consideró incluir la vía Wnt en el modelo para la SEE por poder resultar en estimaciones incorrectas al existir un número insuficiente de casos para algunas comparaciones.

El modelo univariante y multivariante simplificado en forma de Hazard Ratio (HR) con su intervalo de confianza al 95% (95%IC) y significación (*p*valor) para la SLE, SG y SEE figuran a continuación (Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13).

Tabla 11. Modelo univariante y multivariante de los factores de riesgo para la supervivencia libre de enfermedad en el subgrupo de 27 ITAC.

Variable	HR univariante (95%IC)	<i>p</i> valor	HR multivariante (95%IC)	<i>p</i> valor
Edad	0,990 (0,921-1,06)	0,785		
Consumo tabáquico	0,715 (0,243-2,1)	0,543		
Tiempo de exposición al polvo de madera	0,997 (0,956-1,04)	0,894		
Subtipo alto riesgo	1,1 (0,362-3,32)	0,872		
Clasificación T3-T4	3,69 (1,04-13,2)	0,044	8,559 (1,931-37,927)	0,005
RT adyuvante	0,493 (0,169-1,44)	0,195	0,213 (0,063-0,719)	0,013
Abordaje externo	1,61 (0,494-5,24)	0,430		
MAPK mutada	0,513 (0,14-1,88)	0,315		
PI3K mutada	0,489 (0,132-1,8)	0,282		
Rep. ADN mutada	1,69 (0,525-5,47)	0,378		
Wnt mutada	0,185 (0,024-1,42)	0,105		

Tabla 12. Modelo univariante y multivariante de los factores de riesgo para la supervivencia global en el subgrupo de 27 ITAC.

Variable	HR univariante (95%IC)	pvalor	HR multivariante (95%IC)	pvalor
Edad	1,030 (0,962-1,100)	0,39		
Consumo tabáquico	1,160 (0,423-3,19)	0,77	10,697 (1,936-59,112)	0,006
Tiempo de exposición al polvo de madera	0,987 (0,953-1,02)	0,453		
Subtipo alto riesgo	1,150 (0,402-3,28)	0,798		
Clasificación T3-T4	2,760 (0,995-7,67)	0,0512	14,806 (2,882-76,054)	0,003
RT adyuvante	1,040 (0,373-2,89)	0,943		
Abordaje externo	1,690 (0,614-4,66)	0,31		
MAPK mutada	1,150 (0,389-3,39)	0,801	1,150 (1,028-1,287)	0,015
PI3K mutada	0,574 (0,161-2,04)	0,391	0,292 (0,068-1,253)	0,098
Rep. ADN mutada	0,417 (0,118-1,47)	0,173	0,207 (0,049-0,871)	0,032

Tabla 13. Modelo univariante y multivariante de los factores de riesgo para la supervivencia específica para enfermedad en el subgrupo de 27 ITAC.

Variable	HR univariante (95%IC)	pvalor	HR multivariante (95%IC)	pvalor
Edad	0,964 (0,872-1,07)	0,469	1,163 (0,931-1,453)	0,182
Consumo tabáquico	1,320 (0,26-6,69)	0,739	81,453 (1,030-6439,495)	0,049
Tiempo de exposición al polvo de madera	1,010 (0,947-1,07)	0,799		
Subtipo alto riesgo	1,300 (0,301-5,61)	0,206	15,816 (1,058-236,401)	0,045
Clasificación T3-T4	2,190 (0,399-12)	0,368	69,251 (0,819-584,922)	0,061
RT adyuvante	0,373 (0,0866-1,61)	0,186	0,053 (0,002-1,319)	0,073
Abordaje externo	0,674 (0,0816-5,57)	0,714		
MAPK mutada	0,225 (0,0267-1,89)	0,169		
PI3K mutada	0,210 (0,0251-1,76)	0,15	0,012 (0,001-1,509)	0,073
Rep. ADN mutada	0,608 (0,0734-5,03)	0,644		

El modelo univariante mostró que pacientes con clasificación T3-T4, tenían una menor supervivencia libre de enfermedad con mayor riesgo de recidiva (HR=3,69; 95%IC=1,04-13,2; *p*valor=0,044). También mostraron una menor supervivencia global, pero sin llegar a la significación en este caso (HR=2,760; 95%IC=0,995-7,67; *p*valor=0,051). El resto de las variables analizadas no afectaron de forma significativa a la supervivencia según estos modelos univariantes (Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13).

El modelo multivariante se construyó para analizar de forma independiente la influencia en el pronóstico de las diferentes rutas mutadas y el resto de los parámetros clínico-patológicos. Para ello, se proporcionan los Hazard Ratio de sufrir recidiva o exitus, junto con los intervalos de confianza al 95% correspondientes.

Este modelo mostró que la presencia de una clasificación tumoral T3-T4 es predictor independiente de la disminución de la supervivencia libre de enfermedad (HR=8,559; 95%IC=1,931-37,927; *p*valor=0,005). Por otro lado, haber recibido RT adyuvante disminuye de forma significativa el riesgo de recidiva (HR=0,213; 95%IC=0,063-0,719; *p*valor=0,013) (Tabla 11).

La clasificación T3-T4 se mostró como predictor independiente de la disminución de la supervivencia global (HR=14,806; 95%IC=2,882-76,054; *p*valor=0,003) (Tabla 12), pero sin llegar a alcanzar significación en la supervivencia específica para enfermedad (Tabla 13).

El consumo de tabaco se mostró como factor de riesgo para la disminución de la supervivencia global y específica para enfermedad (HR=10,697; 95%IC=1,936-59,112; *p*valor= 0,006 y HR=81,453; 95%IC=1,030-6439,495; *p*valor=0,049) (Tabla 12 y Tabla 13).

El subtipo histológico de alto riesgo (sólido/mucinoso) se relacionó de forma independiente con la disminución de la supervivencia específica para enfermedad (HR=15,816; 95%IC=1,058-236,401; *p*valor=0,045) (Tabla 13).

La mutación en la ruta de reparación del ADN se mostró como factor protector independiente de la supervivencia global (HR=0,207; 95%IC=0,049-0,871; *p*valor=0,032) y la ruta MAPK/ERK como factor de riesgo de esta (HR=1,150; 95%IC=1,028-1,287; *p*valor=0,015).

6. DISCUSIÓN

La baja prevalencia de los ITAC supone un obstáculo para su estudio y dificulta que los centros acumulen experiencia a no ser que sean centros de referencia o que se diseñen estudios multi-institucionales con el riesgo de sesgo que esto conlleva. En nuestro caso, el hecho de ser un centro de referencia en su tratamiento, sumado a la mayor incidencia en el Norte de España, hace que los ITAC supongan el 60% de nuestros TNS a diferencia de lo que ocurre en otras series donde el ITAC supone el 10-20% de los tumores epiteliales nasosinusales⁴⁻⁷.

Además de su rareza, la amplia gama de histologías explica la alta tasa de discrepancias diagnósticas detectada después de la revisión por patólogos expertos^{173,174}. En nuestro caso, la revisión de la muestra tumoral por patólogo experto en ITAC supuso el cambio de subtipo histológico en el 13% de los casos.

Sumado a todo ello, las nuevas opciones de tratamiento para enfermedades raras presentan muchas barreras, no solo en términos de interés comercial y financiación, sino también para el desarrollo de investigaciones rigurosas.

En nuestra serie, los ITAC tienen una tasa de recidiva del 43% a los 5 años. A lo largo del seguimiento, los pacientes pueden sufrir varias recidivas tumorales a pesar de su adecuada exéresis quirúrgica, hasta cuatro recidivas resecables en un mismo paciente en este estudio y hasta veinte según nuestra experiencia. Las recidivas son la principal causa de mortalidad y se abordan de la misma manera que el tumor primario, pero con dificultades añadidas: (1) el tratamiento radioterápico no es un arma terapéutica con la que podamos contar cuando superamos la dosis de radiación máxima recomendada y (2) la cirugía y radioterapia previa pueden dificultar la preservación de órganos vecinos, como el globo ocular.

De esta forma, cuando la cirugía y la radioterapia están contraindicadas o ya no controlan la enfermedad con eficacia, no tenemos arsenal terapéutico eficaz. La indicación clásica de la QT en los ITAC, en este escenario, es paliativa.

La necesidad de mejorar el control local, aumentar la supervivencia y preservar la función del órgano nos ha llevado a buscar nuevas opciones terapéuticas. Por ello, nos propusimos describir las mutaciones accionables en una muestra de 48 ITAC basándonos en un panel de 119 genes que previamente diseñamos.

6.1 LA ONCOLOGÍA DE PRECISIÓN

Los datos moleculares de la línea germinal o del tumor de un paciente son usados en la actualidad para establecer el diagnóstico, el pronóstico, el tratamiento o la prevención de algunos tipos de cáncer. Se ha establecido que las terapias dirigidas a alteraciones genéticas específicas pueden ser más seguras y efectivas que las estrategias no personalizadas cuando se utilizan en una población de pacientes adecuada^{175,176}.

Los resultados alentadores de algunos ensayos clínicos impulsados molecularmente, como los llamados "basket trials", y los informes de casos de respondedores excepcionales a terapias dirigidas seleccionadas sobre la base de mutaciones somáticas, independientemente del sitio del tumor primario o la histología, están demostrando la utilidad de este enfoque transversal¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

Un ejemplo de esto es el inhibidor de la tirosina quinasa Imatinib (Gleevec®) o el anticuerpo monoclonal Trastuzumab, los cuales fueron inicialmente aprobados exclusivamente para el tratamiento de dos tipos de cáncer (LMC con la traslocación *BCR-ABL* y cáncer de mama con amplificación de *ERBB2*) con cambios dramáticos en la mejoría de la supervivencia¹⁸⁰⁻¹⁸². A posteriori fue demostrada su eficacia en otros tipos de tumores con alteraciones idénticas o similares como los tumores del estroma gastrointestinal con mutaciones en *KIT* o (Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha) y el cáncer gástrico con amplificación de *ERBB2*^{183,184}.

También se ha demostrado que las alteraciones moleculares pueden predecir el pronóstico y la respuesta a terapias específicas. Por ejemplo, las mutaciones en los codones 12 y 13 de *KRAS* predicen una mala respuesta a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) como Cetuximab y Panitumumab en el CCR¹⁸³. Otro ejemplo son las mutaciones en *IDH1* en pacientes con glioblastoma que predicen una mayor supervivencia global en comparación con aquellos sin tales cambios¹⁸⁵.

Las dianas moleculares pueden ser proteínas involucradas en rutas de señalización que regulan procesos como la proliferación, apoptosis, invasión tisular e inflamación o que participan en los mecanismos de respuesta o resistencia terapéutica. Estas dianas se denominan en inglés "actionable alterations" y se definen como alteraciones ligadas a la terapia anticancerígena que actúan sobre las moléculas donde ocurren dichas alteraciones

y para las cuales existen tratamientos aprobados por la FDA o EMA (para un tumor dado o en todos los tumores) o que están siendo investigados en algún ensayo clínico.

La caracterización de mutaciones accionables ya ha permitido: (1) selección de subconjuntos de pacientes para la participación en ensayos clínicos y en última instancia para la autorización de la comercialización basada en un mayor beneficio del tratamiento (por ejemplo, Erlotinib para el CPNM con deleciones en el exón 19 de EGFR), (2) restricción de las indicaciones etiquetadas de agentes específicos para evitar el tratamiento de pacientes que no se benefician (por ejemplo, falta de eficacia a Vemurafenib en pacientes con melanoma sin mutación en BRAFV600E) y (3) predicción del riesgo de toxicidad (por ejemplo, neutropenia y diarrea asociada a Irinotecán en pacientes con UGT 1A1 * 28 en homocigosidad).

La gran cantidad de datos generados por las tecnologías de secuenciación masiva y el elevado tiempo de respuesta no compatible con la práctica clínica diaria, nos llevaron a elegir los paneles como tecnología de secuenciación. El uso de los paneles de genes, a diferencia de los enfoques basados en el exoma o el genoma completo, permite una cobertura más profunda de las regiones de interés, una interpretación más sencilla y tiempos de análisis compatibles con la actividad clínica (2-3 semanas). Se considera, así, un enfoque de alta resolución para la detección de pequeñas alteraciones genéticas con una sensibilidad elevada que hace que podamos confiar en las mutaciones detectadas.

Sin embargo, se precisa que el panel sea rediseñado y revalidado a medida que surgen nuevos conocimientos sobre las alteraciones genómicas clínicamente relevantes. Por otra parte, debemos tener en cuenta que el limitar el estudio de un tumor a unos pocos genes reduce los conocimientos del perfil molecular y la comprensión de la carcinogénesis.

6.1.1 Identificación y anotación de variantes generadas por NGS

Las variantes somáticas de cada tumor lo convierten en distinto a los demás, y son las principales responsables de que todos los tumores considerados del mismo tipo no respondan por igual al mismo tratamiento. Por lo tanto, el conocimiento de las variantes genéticas somáticas de cada tumor individual y, en concreto, de aquellas variantes relevantes o responsables de su comportamiento agresivo, conocidas como mutaciones conductoras (del inglés “drivers”), es fundamental para lograr la personalización de los tratamientos oncológicos.

Aunque hay gran diversidad de mutaciones en el ser humano con cáncer, nuestra capacidad de anotar y evaluar las consecuencias funcionales y clínicas de las mutaciones se ha incrementado notablemente. Sin embargo, no es una tarea fácil sino todo un desafío no exento de errores. Para lograr esto, hemos tenido en cuenta varios parámetros de priorización y anotación de variantes para proporcionar una estimación más sólida de la importancia de estas variantes en nuestro trabajo:

1) Variables métricas bioinformáticas

Se pueden usar diferentes ajustes bioinformáticos para mejorar la detección de variantes o los artefactos de secuenciación, junto con las características de la muestra, incluida la pureza y la heterogeneidad del tumor ($VAF > 0.1$). Debe garantizarse una cobertura adecuada como en nuestro caso y priorizar las mutaciones “no sinónimas” como se ha realizado. Para considerar la variante como real y relevante, también se recomienda establecer un umbral de frecuencia de variante poblacional que en nuestro caso fue 0.01. No obstante, las variantes genéticas ya conocidas clínicamente generalmente se priorizan independientemente de la frecuencia de variante¹⁶⁷ y por este motivo fuimos flexibles y rescatamos 7 de ellas con umbral de 0.05.

2) Estudio en paralelo con la línea germinal

Cada tumor contiene variantes heredadas (línea germinal) y específicas del tumor (somáticas). Las alteraciones somáticas en protooncogenes y genes supresores de tumores podrían impulsar el desarrollo y el crecimiento del tumor por lo que suelen ser el objetivo de las terapias personalizadas. Restar la variación genética de un

genoma no canceroso de su contraparte cancerosa permite la identificación de los cambios somáticos que ocasionalmente pueden ser accionables. Sin embargo, este enfoque no se utiliza de forma generalizada en los estudios genéticos del cáncer y se utiliza de forma frecuente solo ADN tumoral. Esto es, probablemente, el resultado de dificultades logísticas para obtener una muestra de sangre o saliva, un mayor coste y una subestimación errónea del valor potencial de la muestra de ADN germinal¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

Una cuestión importante en el desarrollo y progresión del cáncer humano ha sido la contribución de las alteraciones de la línea germinal a la predisposición al cáncer. Por ello, es importante tener en cuenta que algunas alteraciones que pudiéramos interpretar como somáticas en el tejido tumoral, podrían ser mutaciones germinales con predisposición a padecer ciertos tipos de cáncer o vinculadas a la respuesta a medicamentos dirigidos (como las que inactivan BRCA1 / BRCA2 o APC en el cáncer de ovario y mama o colon).

Hoy en día, el análisis de una muestra de línea germinal paralelamente al estudio del tumor se considera deseable, pero no exigida, por los estándares y pautas más recientes para la interpretación de las variantes de secuencia en el cáncer (recomendación conjunta del consenso de la Asociación de Patología Molecular, la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica y el Colegio de Patólogos Estadounidenses)¹⁸⁹.

Debido a esto, evaluamos la efectividad de nuestro filtrado bioinformático en la detección de mutaciones somáticas en 27 pacientes con ITAC. Observamos que 79 de las 131 (60%) variantes informadas en el tumor tras el filtrado bioinformático, eran realmente de origen germinal cuando se hacía el estudio en paralelo (falsos positivos). Dicho de otro modo, el 40% eran indudablemente somáticas.

Este porcentaje (60%), es superior al publicado en trabajos recientes como el de *Jones S et al.*¹⁹⁰ que estudiaron por NGS 58 muestras de diferentes tumores en paralelo con su línea germinal con una tasa de mutaciones somáticas, detectadas por el filtrado bioinformático, falsamente positivas del 31%. Creemos que esto puede ser debido a que, en nuestro trabajo, hemos aplicado un filtrado bioinformático más estricto y hemos consultado un mayor número de bases de datos y modelos de predicción funcional que nos ha llevado a un número de variantes final más reducido tras el proceso bioinformático. Esto hace que el denominador de nuestra división, que corresponde a todas las variantes finalmente informadas en el tumor sin comparar con

la línea germinal sea menor (52/131) y pueda explicar una diferente tasa de falsos positivos.

Hemos de mencionar que el hacer un filtrado de variantes tan estricto, mejora la especificidad, pero es probable que aumente la fracción de variantes somáticas que se eliminan inadvertidamente, y con ellas algunas accionables, como es el caso de las 7 variantes que decidimos rescatar (Tabla 3).

A continuación, en la Figura 20, se representan todas las mutaciones detectadas tras el filtrado bioinformático de cada muestra de los 27 ITAC. Una a una se representan las variantes somáticas falsamente detectadas como tal (falsos positivos, color gris), las variantes somáticas detectadas correctamente como tal (verdaderos positivos, color verde) y las variantes somáticas que rescatamos tras ser erróneamente descartadas por el filtrado bioinformático (falsos negativos, color azul).

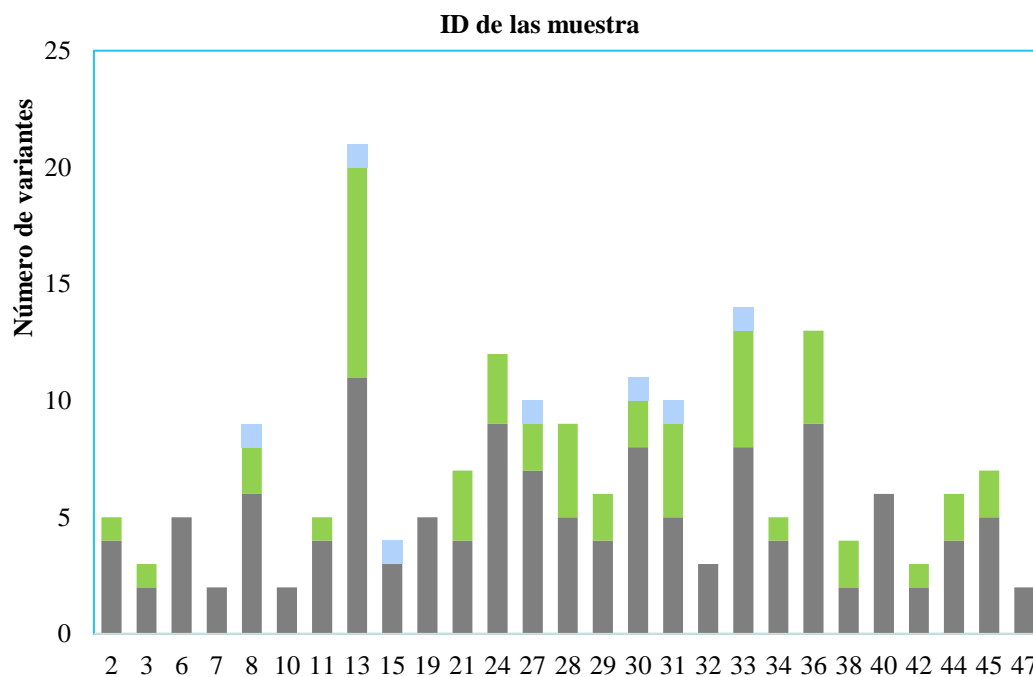


Figura 20. Representación gráfica del número de variantes somáticas verdaderas y falsas en las 27 muestras tumorales/germinales.

■ Variantes germinales; ■ Variantes somáticas; ■ Variantes rescatadas.

Todos estos datos demuestran que el enfoque de secuenciación de solo el ADN tumoral de los 48 ITAC no puede identificar fielmente las mutaciones somáticas. A nuestro parecer, las ventajas del estudio en paralelo germinal que permiten mejorar la sensibilidad y la especificidad en la detección de variantes somáticas son: (1) permite una asignación inequívoca del origen somático de la variante, (2) permite eliminar errores sistemáticos que ocurren a bajas frecuencias, que representan un ruido considerable para la identificación precisa de variantes somáticas subclonales o diluidas y 3) permite la comparación de las CNV tumor/línea germinal.

Por todo esto, consideramos que el análisis de secuenciación tumoral emparejado con tejido normal es esencial para la identificación e interpretación precisa de las alteraciones somáticas pudiendo tener implicaciones importantes en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con cáncer y, en este caso, de los pacientes con ITAC. Además, desde una perspectiva clínica, el ADN germinal se puede obtener de forma sencilla a partir de muestras de saliva y tejido resecado no afectado, además de sangre, lo que potencialmente simplifica los desafíos logísticos. En nuestro trabajo, por disponibilidad del paciente, solo logramos conseguir emparejar muestras tumor-sangre en 27 ITAC.

3) Bases de datos para la comparación de variantes

Una de las herramientas computacionales claves son las bases de información disponibles de forma pública (Anexo 2) que deben integrarse, para una interpretación adecuada ya que ninguna es lo suficientemente completa como para usarse de forma aislada. Existen bases de datos poblacionales, de datos en cáncer, de correlación genotipo-fenotipo y de datos funcionales, principalmente.

Su uso es necesario porque, incluso cuando se encuentra una mutación somática, evaluar si desempeña un papel conductor es difícil. Por ejemplo, si observamos que una variante es rara en la población sana tendrá más probabilidad de causar enfermedad y, contrariamente, aquellos genes que con frecuencia mutan en forma saludable es poco probable que causen enfermedades¹⁹¹.

4) Modelos de predicción para definir mutaciones dañinas / perjudiciales

Los modelos de predicción del supuesto efecto funcional de una mutación son importantes para filtrar variantes relacionadas con el cáncer cuando no existe un análisis funcional previo.

Es necesario tener en cuenta el impacto funcional de forma estricta ya que se ha demostrado que para mutaciones de novo o sin sentido raras casi la mitad de las inferidas como nocivas son mutaciones casi neutrales basándose en datos de genómica funcional¹⁹².

A menudo se utilizan algoritmos de predicción basados en patrones de conservación evolutivos (se infiere que los sitios con menos sustituciones observadas están bajo restricciones más estrictas y tienen más efectos nocivos cuando mutan)¹⁶⁷. Sin embargo, además de la baja especificidad, estos métodos generalmente tienen un valor limitado para anotar mutaciones de ganancia de función o de cambio de función¹⁹³.

Además, estudios recientes sugieren que ningún método o combinación de métodos, como es en nuestro caso, excede el 80% de precisión¹⁹⁴, lo que indica que todavía hay un margen significativo para mejorar la predicción funcional, como el desarrollo de algoritmos para diferentes clases de mutaciones.

Finalmente, hay que mencionar que en este estudio no se han realizado pruebas confirmatorias de variante de forma generalizada. La cobertura promedio fue de 964X en las muestras tumorales (rango de 423 a 1555) y de 347X en las muestras germinales (rango de 278 a 4269), dentro de los estándares recomendados, por lo que consideramos que se puede omitir la verificación de variantes, especialmente cuando existe análisis somático¹⁵⁵. Además, ya se ha descrito que los paneles de NGS con controles de calidad apropiados cumplen con un rendimiento clínico adecuado no recomendando las pruebas confirmatorias de variante de rutina¹⁹⁵⁻¹⁹⁹. Sin embargo, los laboratorios deben tener una política que documente claramente cualquier indicación para las pruebas confirmatorias, así como también cualquier dato de validación sobre el cual decidan que tales pruebas no son necesarias.

6.2 COMPARACIÓN DE LA MUESTRA Y DATOS CLÍNICOS CON OTRAS SERIES DESCRITAS

Le media de edad al diagnóstico fue 68 años, ligeramente superior que en otras publicaciones que la sitúan más frecuentemente entre los 50 y 60 años^{3,5,25}.

Aunque es conocida la predominancia en varones (6:1), reflejando probablemente el riesgo ocupacional, en nuestra muestra no hay ninguna mujer, por lo que no pudimos analizar relaciones en cuanto al sexo. Tampoco en cuanto a exposición a diferentes carcinógenos pues todos los pacientes, a excepción de un caso, habían estado expuestos al polvo de madera. Queda claramente reflejada la asociación, ya muy conocida, entre los ITAC y el polvo de madera.

Se ha relacionado el desarrollo tumoral con la exposición al polvo de madera durante más de 15 años³². En nuestra serie, el tiempo medio de exposición fue 30 años, pero encontramos un rango de duración de la exposición desde 1 a 50 años. Creemos que el desarrollo tumoral en pacientes con escaso tiempo de exposición puede estar relacionado con la exposición temprana, como ya ha sido propuesto por otros autores³².

En términos de exposición al polvo de madera y tabaco, clasificación T y subtipo histológico nuestra serie es comparable con otras publicadas^{4,11,13}.

El 58% de los pacientes desarrollaron recidiva en un tiempo promedio de seguimiento de 51 meses, siendo la media del tiempo libre de enfermedad de 3 años. La tasa de recidiva (local, regional y/o a distancia) es ligeramente superior a otras publicaciones recientes con un periodo de seguimiento similar^{4,13,56}.

En los 48 ITAC, la tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fue del 43%, la tasa de supervivencia global del 42% y la tasa de supervivencia específica para enfermedad del 52%. Estos datos de supervivencia son más bajos que los datos más recientes en los que la SLE a los 5 años se sitúa entre el 62 y el 74%, la SG entre el 64 y el 69% y la SEE entre el 64% y el 82%^{4,11-13}. Esto sucede así porque los ITAC son los únicos TNS que han mejorado su supervivencia y control regional a lo largo de los años y en esta serie tenemos pacientes tratados desde 1998 hasta 2014 debido a un largo período de recolección de pacientes. En este trabajo, aquellos pacientes tratados entre los años 1998 y 2006 tuvieron una peor supervivencia que aquellos tratados entre el 2007 y 2014 con una mediana de supervivencia global de 32.5 meses versus 56 meses y una mediana de supervivencia específica para enfermedad de 12 meses versus 69 meses,

respectivamente. De hecho, como observamos previamente (apartado 5.2.1 y 5.2.2), el subgrupo de 27 ITAC tiene tasas de supervivencia mejores y más próximas a las actuales (SLE 57% a los 5 años, SG 56% a los 5 años, SEE 73% a los 5 años) porque son pacientes tratados más recientemente, el 89% (24/27) entre los años 2003 y 2014.

Esto también se demuestra si se observan publicaciones más antiguas donde la tasa de supervivencia descrita es menor^{108,112}.

A pesar de esta diferencia, nuestra serie refleja las características clínicas conocidas de los ITAC, como lo demuestra el valor pronóstico independiente de la clasificación T (SLE: HR=8,559; 95%IC=1,931-37,927; *p*valor=0,005 / SG: HR=14,806; 95%IC=2,882-76,054; *p*valor=0,003)^{3,6,7,13,25} y del subtipo histológico (SEE: HR=15,816; 95%IC=1,058-236,401; *p*valor=0,045)^{1,111}.

Hemos de señalar que, en base a nuestros criterios para la indicación de radioterapia, haber recibido RT adyuvante disminuye de forma significativa el riesgo de recidiva (HR=0,213; 95%IC=0,063-0,719; *p*valor=0,013).

Además, aunque no se ha demostrado asociación entre los ITAC y el tabaco, como en otras publicaciones³⁵, el consumo de tabaco se mostró como factor de riesgo independiente para la disminución de la supervivencia global y específica para enfermedad (HR=10,697; 95%IC=1,936-59,112; *p*valor= 0,006 y HR=81,453; 95%IC=1,030-6439,495; *p*valor=0,049).

6.3 RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN

Tras comparar las mutaciones en las 27 muestras tumorales con su línea germinal, no encontramos diferencias entre las muestras con mutaciones y las que carecían de ellas (7) en cuanto a edad, tiempo de exposición, subtipo histológico o clasificación T tumoral. Sí encontramos relación significativa ($p_{valor}=0,044$) entre el mayor número de mutaciones y el consumo de tabaco (Tabla 7), aunque, como comentamos, no existe relación entre el consumo de tabaco y el desarrollo de los ITAC².

En el subgrupo de 27 ITAC las mutaciones somáticas probablemente patogénicas más frecuentes incluyeron los genes *PIK3CA*, *APC* y *ATM*. Agrupando todos los genes mutados de acuerdo con las vías de señalización más frecuentemente afectadas, identificamos 7 casos (26%) con mutaciones en la vía RAS-RAF-MEK-ERK (2 *NF1*, 3 *KRAS*, 1 *BRAF* y 1 *NF1-MAP2K1*), 7 casos (26%) con mutaciones en la vía de reparación del ADN por Recombinación Homóloga (3 *ATM*, 3 *BRCA1* y 1 *ATM-BRCA2*), 6 casos (22%) con mutaciones en la vía PI3K-AKT-mTOR (1 *PIK3CA*(x2)-*PIK3R2*, 4 *PIK3CA*, 1 *MTOR*) y 6 casos (22%) con mutaciones en la vía Wnt/ β -catenina (4 *APC* y 2 *CTNNB1*).

No encontramos relación entre las vías de señalización mencionadas y la clasificación T. En otra serie de nuestro grupo, tampoco evidenciamos diferencias entre los estadios clínicos de ITAC y las mutaciones *KRAS* o la expresión de β -catenina que son miembros claves de dos de estas rutas¹¹⁸. Tampoco encontramos relación entre las vías de señalización y la presencia o el tipo de recidiva, pero sí observamos que aquellos ITAC con mutaciones en la ruta Wnt tienen un menor número de recidivas a lo largo del seguimiento (Tabla 10, $p_{valor}=0,03$). Con estas escasas asociaciones, aún nos queda por conocer y detallar cuáles son los factores moleculares predictivos de invasión y recidiva en ITAC.

A continuación, discutiremos los resultados obtenidos en relación con las rutas de señalización más frecuentemente mutadas.

6.3.1 Receptores tirosina quinasa en relación con las rutas MAPK y PI3K

En los 27 ITAC comparados con la línea germinal encontramos mutaciones somáticas en los genes que codifican para varios receptores tirosina quinasa (RTK) como *KIT* (4%; 1/27), *ROS1* (4%; 1/27), *DDR2* (Discoidin Domain Receptor 2) (4%; 1/27) y la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER*, Human Epidermal growth factor Receptor) *ERBB2*, *ERBB3* y *ERBB4* (15%; 4/27). Por otro lado, hemos de señalar que no encontramos mutaciones somáticas en *ERBB1* (*EGFR*), *IGFR1* (Insulin-like Growth Factor Receptor 1) y sus ligandos *IGF1* e *IGF2*, *PDGFRA* (Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha), *ALK* o *MET*. En los 21 ITAC sin co-análisis germinal encontramos mutaciones en otros RTK que no podemos confirmar como somáticas por lo que no tendremos en cuenta.

De estos últimos, la expresión de *MET* y *ALK* fue previamente estudiada en ITAC encontrándose sobreexpresión de *MET* en el 64% de los ITAC y nula de *ALK*^{105,135}.

Las mutaciones en los RTK resultan de interés pues se han relacionado con el pronóstico en otros tumores similares y son dianas terapéuticas para los inhibidores tirosina quinasa (ITK).

La unión de estos receptores con sus ligandos activa una cascada de señalización mitogénica a través de dos vías principales, la vía de las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) y la vía PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) que son dos de las vías que más frecuentemente encontramos mutadas en nuestro trabajo (Figura 21). Otra de las vías que pueden ser activadas es JAK/STAT (Janus-Kinase/Signal-Transduction and Activator of Transcription) que en nuestro caso encontramos mutada en un solo caso (Tabla 3; ID 31). Estas vías activadas están involucradas en la regulación de procesos clave que controlan la progresión tumoral, incluida la proliferación, la angiogénesis, la invasión y las metástasis²⁰⁰⁻²⁰².

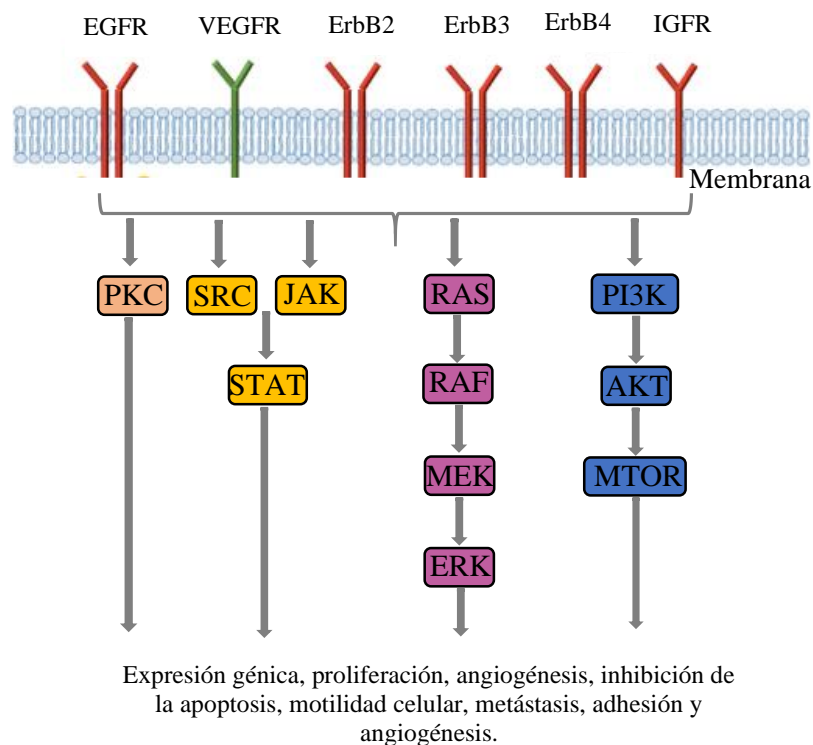


Figura 21. Modelo jerárquico de las cascadas de señalización activadas por los receptores tirosina quinasa.

Las vías de señalización de muchas TK incluyen PKC (Protein Kinase C), JAK/STAT, RAS-RAF-MEK-ERK y PI3K-AKT-mTOR. Las cascadas de señalización posteriores influyen en la expresión génica, proliferación, angiogénesis, inhibición de la apoptosis, motilidad celular, metástasis, adhesión y angiogénesis.

Podemos decir finalmente que más de la mitad de los ITAC, el 52% (14/27), tuvieron mutaciones en alguno de los receptores tirosina quinasa estudiados o en las vías de señalización relacionadas con los mismos (MAPK, PI3K o JAK/STAT) (Tabla 3).

Una de las familias de receptores tirosina quinasa más estudiadas en cáncer es la familia de receptores del factor de crecimiento humano por lo que merece una mención especial. Esto es así porque su mutación es frecuente en varias neoplasias humanas y porque existen muchos inhibidores de estos receptores aprobados en cáncer.

En nuestro trabajo, encontramos mutaciones en los genes que codifican para miembros de la familia HER en el 15% (4/27) de los ITAC a expensas de un caso con mutación en *ERBB2*, dos casos con mutación en *ERBB3* y un caso con mutación en

ERBB4 (Tabla 3). Sin embargo, como hemos dicho, no encontramos mutaciones en *EGFR* (*ERBB1*).

De estos receptores, solo los genes *EGFR* y *ERBB2* han sido estudiados previamente en ITAC. Se ha descrito la sobreexpresión de *ERBB2* en el 0-8% de los ITAC^{103,115,134}, sin resultados previos que estudien su frecuencia mutacional, pero siendo del 4% en nuestro trabajo (1/27).

En cuanto a *EGFR*, nuestro trabajo es congruente con lo previamente publicado en ITAC que sitúa la tasa de mutación de este gen entre 0-5,5%^{101,102,123,133}, al igual que ocurre en otros tumores de cabeza y cuello (<1%)^{203,204} y en CCR (2,5%)²⁰⁵ y a diferencia de lo que ocurre en CPNM (20-60%)^{206,207}.

A pesar de su baja frecuencia mutacional, los estudios IHQ hasta la fecha han mostrado sobreexpresión de *EGFR* en el 20-33% de los ITAC^{101,133,208} siendo una tasa inferior a la encontrada en otros tumores nasosinusales (39% en CENS¹⁴⁴ y 27% en carcinoma indiferenciado nasosinusal²⁰⁹), en CCR (36%)²¹⁰, en adenocarcinoma de pulmón (34-84%)²¹¹ y en CECC (80%)^{203,212}. Esta sobreexpresión del receptor EGFR está descrita especialmente en el subtipo colónico de ITAC y menos frecuentemente en el subtipo mucinoso.

Además, se ha descrito una ganancia en el número de copias de *EGFR* en el 38-55% de los ITAC, según la técnica utilizada, y un alto nivel de amplificaciones de la región cromosómica 7p12 donde se encuentra *EGFR*^{125-127,208}. La frecuencia de ganancias de *EGFR* en ITAC es próxima a la descrita en CENS (44%)¹⁴⁴, algo inferior a la descrita en CCR^{145,213} y CPNM (60% respectivamente)²¹¹ y superior a la descrita en CECC (10-24%)^{203,214,215}.

En ITAC no se ha demostrado correlación entre la sobreexpresión de *EGFR* y el número de copias^{101,118,144,145} o mutaciones del gen^{101,102,123,133} por lo que estudiaremos en el futuro la sobreexpresión de este gen en esta muestra de ITAC.

En ITAC, tampoco se ha demostrado relación entre las alteraciones de *EGFR* y los diferentes parámetros clínico-patológicos^{101,123,128,133,144,208}, a diferencia de lo que ocurre en el CCR²¹⁰, en el CPNM^{206,216} y en el CECC²⁰³ donde la ganancia del número de copias de *EGFR* se ha descrito como un factor pronóstico.

Varios inhibidores biológicos (anticuerpos monoclonales) y de molécula pequeña (ITK) han sido aprobados en los últimos años frente a estos RTK y muchos se encuentran actualmente en fase preclínica o en desarrollo clínico.

Un ejemplo de inhibidores biológicos de los RTK son los anticuerpos monoclonales anti-EGFR, Cetuximab (Erbix®) y Panitumumab (Vectibix®), aprobados por la FDA para su uso en el tratamiento del CECC y del CCR y solo del CECC, respectivamente. En nuestro campo, Cetuximab se aprobó en 2006 en combinación con RT en la enfermedad localmente avanzada o como agente único para el CECC recurrente o metastásico después del fracaso de las terapias con platino. Nimotuzumab, un anticuerpo anti-EGFR, se encuentra bajo ensayo clínico en CECC avanzado²¹⁷.

Los ITK son moléculas pequeñas con características lipofílicas adecuadas para atravesar la membrana plasmática, generalmente por transporte no mediado. Son capaces de bloquear la actividad quinasa evitando la unión de ATP en el bolsillo catalítico de los receptores²¹⁸. Dado que existe una gran similitud de secuencia entre miembros evolutivos de la familia de receptores tirosina quinasa, especialmente con respecto a la estructura del bolsillo de unión de ATP, es muy probable que una molécula que se une a un RTK específico pueda estar predispuesta a interactuar con otras proteínas de la misma familia. Por eso, a diferencia de los anticuerpos monoclonales que tienen gran especificidad antígeno-anticuerpo, los ITK permiten una estrategia terapéutica capaz de bloquear los receptores tirosina quinasa de muchos factores de crecimiento, lo que permite atacar el cáncer en varios frentes; la célula tumoral y el microambiente. De este modo, existen inhibidores multiquinasa (DDR2, KIT, ROS, RET, ALK, PDGF, FGFR etc) aprobados por la FDA como el Imatinib (Gleevec®), Crizotinib (Xalkori®), Cabozantinib (Cabometyx®, Cometriq®), Ponatinib (Iclusig®), Regorafenib (Stivarga®), Sorafenib (Nexavar®), Sunitinib (Sutent®) y Vandetanib (Caprelsa®) para el tratamiento de varias neoplasias malignas como el carcinoma medular de tiroides, el CPMN, la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), el CCR, el tumor del estroma gastrointestinal (GIST) y el carcinoma renal o hepático, entre otros²¹⁹. Por otro lado, existen inhibidores selectivos de la familia HER como Erlotinib (Tarceva®) o Afatinib (Gilotrif®) aprobados en el CPNM avanzado o metastásico o Lapatinib (Tykerb®) aprobado en el cáncer de mama metastásico HERB2+.

Sin embargo, la respuesta a estos tratamientos depende de varios factores que se comprenden solo parcialmente, incluida la expresión del receptor y el estado del gen codificador, pero también de otros componentes posteriores de las vías MAPK y PI3K que comentaremos más adelante. Por ejemplo, la expresión de *EGFR* detectada por IHQ no es considerada un predictor significativo de la respuesta al tratamiento con Gefitinib (Iressa®) en el CPNM, pero sí lo es la presencia de mutaciones activadoras de *EGFR*^{220,221}. Al contrario, en el CCR las mutaciones somáticas de *EGFR* ocurren con baja frecuencia y no están relacionadas con la respuesta a los tratamientos anti-EGFR¹⁰². También se ha sugerido que la ganancia del número de copias de *EGFR* puede predecir la respuesta al tratamiento con fármacos anti-EGFR en CPNM²²².

Por este motivo, a pesar de la baja tasa de mutaciones en *EGFR* en ITAC y la ausencia de ellas en nuestro estudio, seguimos considerando que puede ser de interés estudiar la respuesta a fármacos anti-EGFR en ITAC con aumento del número de copias o sobreexpresión de este gen, para así valorar si se considera un predictor de respuesta a fármacos anti-EGFR (independiente del estado del gen) contrariamente a lo que ocurre con el CPNM^{220,221}.

6.3.2 La vía MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK)

La vía MAPK tiene interés en ITAC dada su similitud histológica con el CCR, donde ha sido estudiada, y por su importancia a la hora de plantear terapias destinadas a bloquear la cascada de señalización de los RTK.

La vía RAS-RAF-MEK-ERK, como hemos comentado, es activada por varios factores de crecimiento conocidos y citoquinas que actúan a través de RTK. En cáncer, esta vía puede ser activada por mutaciones activadoras en estos mismos receptores, pero también por mutaciones en protooncogenes que codifican componentes de la vía inferiores como *RAS* y *RAF*^{223,224}.

RAS activa varias vías, incluida la cascada RAF-MEK-ERK (Figura 22) que transmite señales ulteriores y da como resultado la transcripción de genes implicados en el control de varios mecanismos celulares relacionados con un mayor crecimiento, diferenciación y supervivencia celular y, en última instancia, desarrollo del cáncer²²⁵⁻²²⁷.

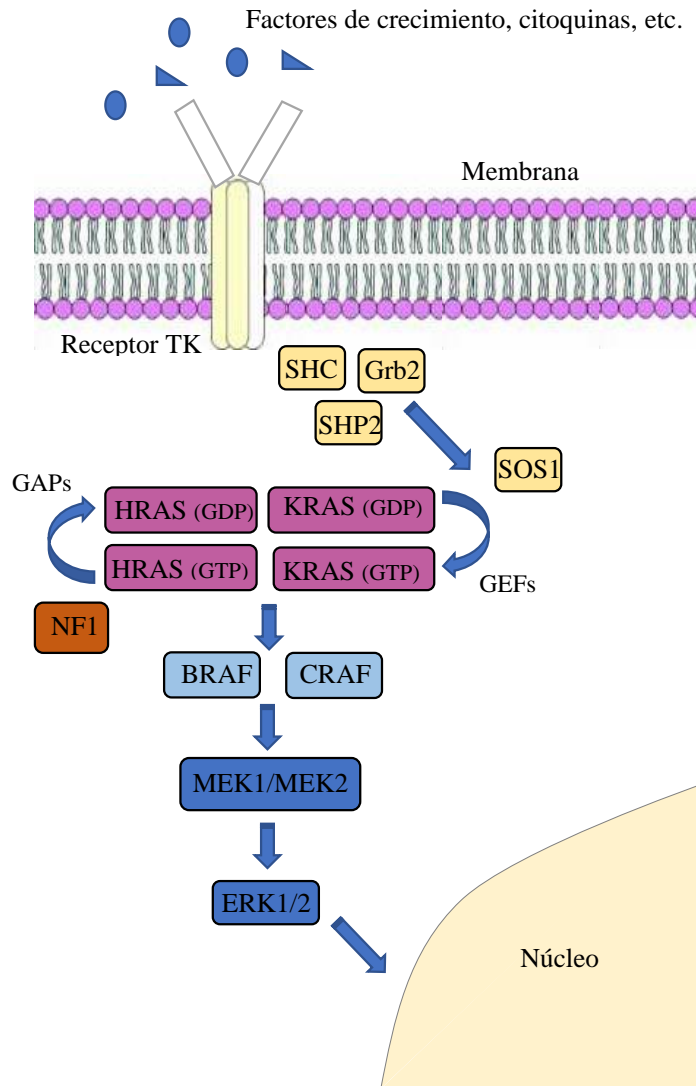


Figura 22. Modelo jerárquico resumido de la vía RAS-RAF-MEK-ERK.

La unión del ligando al RTK induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de residuos de tirosina específicos en la región C-terminal. Esto genera sitios de unión para proteínas adaptadoras (GRB2, SHC y SHP2) encargadas de reclutar a la GEF SOS1 que activa a RAS al favorecer estados unidos a GTP. Por otro lado, RAS se desactiva por proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) que dan como resultado estados unidos a GDP²²⁸. NF1 tiene actividad GAP por lo que se relaciona con el control negativo de RAS²²⁹. En su conformación unida a GTP, RAS se combina con RAF que actúa como una MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK) para activar MEK1 y MEK2, que, a su vez, catalizan la activación de las quinasas efectoras ERK1 y ERK2 y su translocación al núcleo. ERK1 y ERK2 activadas fosforilan varios genes efectoras nucleares y citoplasmáticos involucrados en diversas respuestas celulares como la proliferación celular, supervivencia, diferenciación, motilidad y angiogénesis²³⁰.

Leyenda: SHC=Src Homology and Collagen; GRB2=Growth factor Receptor-Bound 2; SHP2= Protein Tyrosine Phosphatase; SOS= Son Of Sevenless; NF1=Neurofibromin 1; MEK=Mitogen-activated Protein Kinase Kinase; ERK= Extacellular signal- Regulated Kinase; GEF=Guanine-nucleotide Exchange Factor; GAP= GTPase Activating Protein.

Aunque RAS puede activar otros mediadores como PI3K²³⁰, y RAF también puede ser activado por activadores independientes de RAS²³¹, existe una considerable evidencia experimental que indica que la cascada RAF-MEK-ERK es el mediador principal de la oncogénesis inducida por RAS²³⁰.

6.3.2.1 Comparación de nuestros resultados en la vía RAS-RAF-MEK-ERK con otras series

En nuestro estudio, el 26% (7/27) de los ITAC comparados con la línea germinal albergaron mutaciones somáticas probablemente patogénicas en la vía RAS-RAF-MEK-ERK a expensas de un 11% (3/27) de mutaciones en *KRAS* y *NF1* y de un 4% (1/27) de mutaciones en *BRAF* y *MAP2K1* (también conocido como *MEK1*). No encontramos mutaciones en *HRAS*, *NRAS*, *RAF1* ni en otros genes codificadores para otras MAP quinasa quinasa (MAP2K) como *MAP2K2* (*MEK2*) o *MAP2K4* (*MKK4*).

Hemos de mencionar, que en los 21 ITAC sin co-análisis germinal encontramos 3 muestras (Tabla 4; ID 4, ID 9 e ID 26) con mutaciones en *KRAS* ya descritas como oncogénicas (p.G12D y p.A59G), por lo que deberían ser consideradas en ausencia de línea germinal, y dos mutaciones en *NF1* (Tabla 4; ID 16) de las cuales una es una mutación frameshift que dará un producto truncado.

La tasa de mutación encontrada de *KRAS* y *BRAF* es concordante con lo previamente publicado en ITAC que la sitúan entre el 6-15% y el 0-6%, respectivamente^{101,102,118,123,124,133,136}.

KRAS es la isoforma de RAS alterada con mayor frecuencia en el cáncer humano (30%) y constituye el 86% de las mutaciones de RAS. A pesar de que dos publicaciones describen mutaciones del gen *KRAS* en el 43-50% de los ITAC^{123,137}, en términos generales, se sitúa entre un 6% y un 15%, siendo más frecuente que en CENS (0-1%)^{124,136}, cercana al CECC (0-16%)^{232,233} y menos frecuente que en CPNM (10-25%)²³⁴, CCR (30-45%)²³⁵ y cáncer de páncreas (90%)²³⁰.

En todos los casos de *KRAS* mutado, salvo uno de los no co-analizados (Tabla 4; ID 9), observamos la transición G→A, hecho típicamente encontrado en los ITAC como ya comentamos previamente y que se relaciona con la exposición al polvo de madera^{101,120,121,123,124}.

La mutación de *KRAS* en ITAC también se ha asociado por otros autores con los subtipos histológicos de bajo riesgo; colónico y papilar^{118,119,124,136}. Del mismo modo, en nuestro estudio, todas las mutaciones de *KRAS* y demás componentes de la ruta fueron hallados exclusivamente en estos dos subtipos. De este modo, la mutación de la vía RAS-RAF-MEK-ERK se asoció de forma significativa con los subtipos colónico y papilar (Tabla 8). Estos hallazgos son congruentes con lo evidenciado en el CCR y CPNM, donde las mutaciones en *KRAS* son encontradas en estadios tumorales tempranos^{236,237}.

Otras isoformas de las proteínas RAS como *HRAS* y *NRAS* tendrían un efecto similar a *KRAS* cuando muta. Aunque en ITAC, las mutaciones en el gen *HRAS* se han descrito en el 16% siendo, en este caso, más frecuentes las transiciones G→T en el codón 12 y relacionándose con un peor pronóstico¹²⁰, no hemos encontrado mutaciones en *HRAS* en nuestro estudio. Tampoco en *NRAS* como previamente se había publicado¹²⁰, aunque sí encontramos un aumento muy significativo del número de copias de este gen en un caso. Las mutaciones en *HRAS* y *NRAS* también son poco frecuentes en CCR y CPNM.

Los miembros de la familia RAF son serina / treonina quinasas altamente conservadas de la ruta MAPK codificadas por los genes *ARAF*, *BRAF* y *CRAF* o *RAF1*. *BRAF* es el más frecuente mutado en una amplia variedad de tumores humanos, especialmente en melanoma maligno, carcinomas de tiroides y colon^{230,238}. En nuestro trabajo, la tasa de mutación que describimos (4%) es francamente menor que la evidenciada en CCR (12%) y similar a la descrita en cáncer de pulmón (2%)²³⁰.

Entre las diferentes mutaciones de *BRAF*, una sustitución de una sola base (T por A en el nucleótido 1799) que sustituye valina por ácido glutámico en el codón 600 (V600E) del dominio quinasa (exón 15) es la más prevalente en cáncer humano, representando los melanomas (39%) y los cánceres de tiroides (38%) las neoplasias con los niveles más altos de la misma²³⁰. Esta mutación lleva a un aumento de la actividad quinasa que hiperactiva la vía. Por este motivo, esta mutación es la base de la indicación de terapias como Vemurafenib (Zelboraf®) y Dabrafenib (Tafinlar®) en el melanoma. En nuestro caso, no encontramos mutaciones V600E en *BRAF* en concordancia con los estudios previos que ya reconocen esta mutación como extremadamente rara en ITAC^{101,123,136,137}. La mutación encontrada fue D594N (Tabla 3; ID 21) que también

afecta al exón 15. Se han identificado mutaciones que afectan al codón D594 en muchos tumores sólidos, siendo más frecuentes en CCR²³⁹. Las mutaciones D594 producen una actividad quinasa alterada²⁴⁰, puede inducir aneuploidía²³⁹ y pueden impulsar la tumorigénesis mediante cooperación con RAS mutante²⁴¹.

Las mutaciones somáticas en *NFI* se han observado en varios tipos de cáncer²⁴². Su mutación se ha establecido como uno de los impulsores clave en el desarrollo del melanoma encontrándose mutaciones en él en el 12-18% de los casos y especialmente en el melanoma desmoplásico (45-93%)²⁴²⁻²⁴⁴. Curiosamente, la pérdida de *NFI* en el melanoma, a menudo, se asocia con mutaciones concurrentes en *RAS* y se cree que las mutaciones pueden actuar sinérgicamente²⁴². Sin embargo, las mutaciones en *RAS* y *BRAF* son casi siempre mutuamente excluyentes. En nuestro subgrupo de 27 ITAC, encontramos un 11% de mutaciones en *NFI*, frameshift y stopgain (Tabla 3; ID 28, ID 31 e ID 36), no demostradas previamente en ITAC y que no asocian mutaciones concurrentes con *RAS*²⁴⁵.

En definitiva, las mutaciones somáticas en la vía MAPK son menos frecuentes que las encontradas en CCR y CPNM y se relacionan con los subtipos papilar y colónico. No obstante, estos resultados deben ser confirmados en futuros estudios con una mayor cohorte y comparados con estudios con una metodología similar.

6.3.2.2 RAS-RAF-MEK-ERK como factor pronóstico

En nuestro estudio, la mutación de la vía RAS-RAF-MEK-ERK se relacionó con un peor pronóstico y menor supervivencia global (HR=1,150; 95%IC=1,028-1,287; *p*valor=0,015) al igual que ocurre en el CCR, donde la mutación en *KRAS* y V600-*BRAF* es un factor pronóstico independiente y predictivo de la resistencia al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR²⁴⁶⁻²⁴⁸. Sin embargo, *Szablewski V et al.*¹²³ observaron una SG significativamente mejor en pacientes afectados por ITAC con mutaciones en el gen *KRAS*. Estos autores analizaron por PCR el exón 15 de *KRAS* en 43 ITAC observando una tasa de mutación del 43%, que como comentamos previamente, es de las más altas descritas en la literatura. Sin embargo, no realizaron el estudio en paralelo con el ADN germinal pudiendo sobreestimar este resultado a expensas de mutaciones germinales.

Por lo tanto, sería de interés aclarar el valor pronóstico de esta vía dado que, en nuestro trabajo, a pesar de que la mutación se asocie a subtipos de bajo riesgo histológico, se relaciona con una peor supervivencia global.

6.3.2.3 RAS-RAF-MEK-ERK como diana terapéutica

Dada la frecuencia mutacional de *KRAS* en cáncer, se han buscado infinidad de terapias dirigidas a RAS, pero décadas de esfuerzo no han logrado obtener medicamentos aprobados. En principio, debería ser posible diseñar moléculas pequeñas que se unan directamente al sitio de unión de GTP y *KRAS* inhibiendo su interacción, similar al enfoque que se ha utilizado con éxito para el descubrimiento de inhibidores competitivos de ATP de proteína quinasas. Sin embargo, este enfoque se considera actualmente como "misión imposible", dada la extremadamente alta afinidad de la proteína *KRAS* por GTP y la abundancia de GTP en el citoplasma celular (0,5 mmol / L)²⁴⁹.

A pesar de ello, siguen realizándose esfuerzos por accionar lo que ha sido inaccionable hasta ahora. La mutación de *KRAS* G12D, que es la encontrada en 2 de los 3 casos mutados que se han encontrado en nuestro estudio (Tabla 3; ID 30 e ID 33), es una de las dianas de *KRAS* bajo estudios preclínicos²⁵⁰.

Otras alternativas terapéuticas para esta vía son los inhibidores selectivos de la proteína BRAF (Vemurafenib [Zelboraf®] y Dabrafenib [Tafinlar®]), inhibidores de doble especificidad de MEK1/MEK2 (Trametinib [Mekinist®] y Cobimetinib [Cotellic®]) que ya han sido aprobados para tratar el melanoma con mutación en *BRAF* V600. Otros inhibidores de MEK1/MEK2 están bajo estudio, como el Selumetinib (Koselugo®), ya aprobado para la neurofibromatosis tipo I pediátrica y que junto con Docetaxel ha mostrado una supervivencia libre de progresión significativamente superior a placebo en un ensayo en fase II de CPNM²⁵¹. Las quinasas ERK1/2 también han sido objeto de intensos estudios²⁵². Además, la inhibición de factores de transcripción, como el antígeno 1 similar a Fos (FOSL1), también se presentó como una promesa terapéutica en el cáncer de pulmón y páncreas con mutación en *KRAS*²⁵³.

En definitiva, son pocas las terapias aprobadas para mutaciones potencialmente patogénicas en esta vía de señalización, pero muchas están aún bajo estudio.

No debemos olvidar que en nuestro trabajo hemos visto CNAs y mutaciones frecuentes potencialmente patogénicas en RTKs que pueden activar esta vía de señalización y para las que sí existen multitud de terapias aprobadas. Sin embargo, el estado de esta vía puede considerarse predictor de respuesta/resistencia a estos inhibidores. Por ello, consideramos que los pacientes con ITAC podrían beneficiarse del estudio de la respuesta a inhibidores multiquinasa (Lapatinib, Afatinib, Imatinib, Sorafenib, Sunitinib, etc.) pero teniendo en cuenta las mutaciones en esta vía que pueden obligarnos a optar por enfoques alternativos.

No obstante, es importante mencionar que el valor predictivo de la respuesta a tratamientos anti-EGFR, basado en las mutaciones de *KRAS*, es variable, a pesar de que de forma general se ha asociado a resistencia terapéutica. De hecho, en el CECC las mutaciones de *KRAS* no indican claramente una resistencia endógena a Cetuximab como ocurre en el CCR²³³. En este sentido, el único dato presente hasta la fecha es un único caso publicado por *Cabezas-Camarero S et al.*¹⁰⁴ donde un paciente con ITAC fue tratado con terapia anti-EGFR (Cetuximab) sin respuesta, relacionándose esto con la presencia de *KRAS* mutado detectado por biopsia líquida.

6.3.3 La vía PI3K-AKT-mTOR

La vía PI3K-AKT-mTOR es activada por receptores acoplados a proteína G y receptores tirosina quinasa, como los receptores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (ErbB), los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1R). En el cáncer, esta vía puede ser activada por mutaciones activadoras en los genes que codifican para estos mismos receptores, pero también por mutaciones en protooncogenes que codifican componentes inferiores de la vía como *PIK3CA*, *AKT* y *MTOR* o genes supresores de tumores como *PTEN*, *TSC1*, *TSC2* y *STB1*²⁵⁴. La proteína RAS activada también puede estimular a PI3K como comentamos con anterioridad.

Las células humanas expresan tres clases de enzimas PI3K; clase I, II y III. Las PI3K de clase I, con frecuencia, están implicadas en la patogenia del cáncer y son lípido quinasas heterodiméricas que se componen de una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. Se dividen en dos subgrupos; IA y IB. Las PI3K IA están compuestas por una de las isoformas de la subunidad catalítica p110 llamadas p110 α , p110 β o p110 δ

codificadas por los genes *PIK3CA*, *PIK3CB* y *PI3KCD*, respectivamente. Las subunidades reguladoras que las componen son p85 α , p55 α y p50 α todas ellas codificadas por *PIK3R1*, p85 β codificada por *PIK3R2* o p55 γ codificada por *PIK3R3*.

Por otro lado, las PI3K de clase IB están formadas por la subunidad catalítica p110 γ codificada por el gen *PIK3CG* y la subunidad reguladora p101 o p87 codificada por el gen *PIK3R5* o *PIK3R6*.

Las subunidades reguladoras ayudan a colocar a PI3K cerca de la membrana plasmática donde se muestra accesible para la señalización de RAS.

PI3K activa varios efectores, pero de forma más universal se activan los miembros de la subfamilia AKT (AKT1, AKT2, AKT3)²⁵⁵. De hecho, la fosforilación de AKT, a menudo, sirve como una lectura sustituta de la activación de PI3K de clase I²⁵⁶. PTEN también tiene un papel determinante en la señalización de PI3K impidiendo la activación de AKT (Figura 23).

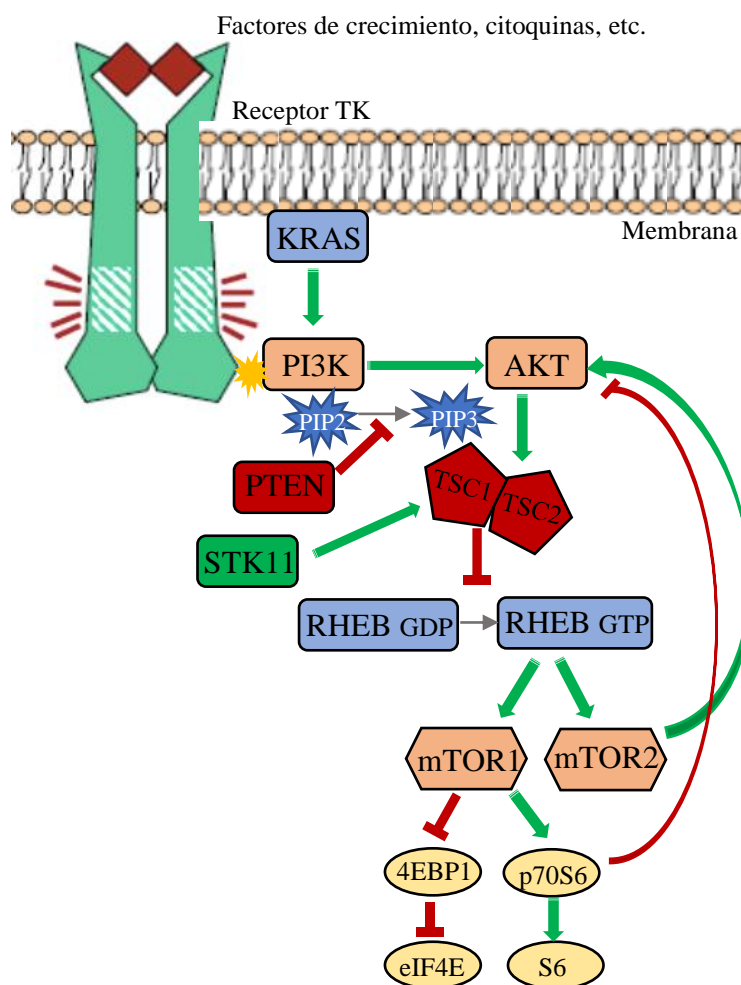


Figura 23. Modelo jerárquico resumido de la vía PI3K-AKT-mTOR.

La unión de los RTK a sus ligandos correspondientes activa a PI3K de clase IA (p110 α , β , δ y γ) que interactúa con las subunidades reguladoras (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p55 γ y p110) que ayudan a colocar a PI3K cerca de la membrana plasmática. PI3K activada cataliza la fosforilación de PIP2 para generar PIP3 que es necesaria para la activación de AKT. PTEN antagoniza funcionalmente la actividad de PI3K al desfosforilar PIP3 y convertirlo en PIP2. AKT fosforila a TSC2, que inhibe al complejo TSC1/TSC2 y permite la activación de mTOR por RHEB, permitiendo así la propagación de la señal. STK11, también llamado LKB1, regula el complejo TSC1/TSC2. mTOR forma dos complejos; mTORC1 y mTORC2. La activación de mTORC1 estimula la actividad de 4EBP1, que conduce a la liberación eIF4E, y la quinasa p70S6, que fosforila a la proteína S6 ribosómica. S6 produce retroalimentación negativa sobre AKT. Contrariamente a mTORC1, mTORC2 regula positivamente la vía por fosforilación de AKT siendo necesaria para su completa activación.

Leyenda: PI3K=Phosphatidylinositol 3-Kinase; AKT o PKB= Protein Kinase-B; PTEN=Phosphatase and Tensin homolog; STK11=Serine/Threonine Kinase 11; TSC=Tuberous Sclerosis; RHEB=Ras Homolog Enriched in Brain; mTOR=Mammalian Target of Rapamycin.

Cuando AKT es fosforilada actúa sobre varios sustratos implicados en la proliferación celular, el metabolismo, la supervivencia y la motilidad, siendo el principal sustrato activado mTOR (Figura 23). Otros de los sustratos sobre los que AKT ejerce una regulación negativa son FOXO1, BAD y GSK3 que regulan procesos celulares tales como la supervivencia celular (efecto antiapoptótico) y el metabolismo (gluconeogénesis). GSK3 es una serina/treonina quinasa que juega un papel central en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina fosforilando a β -catenina para favorecer su degradación vía proteosoma como comentaremos en el siguiente apartado. De este modo, la activación de AKT también se relaciona con la vía canónica de Wnt ya que produce la inhibición de GSK3 que puede resultar en la acumulación de β -catenina citoplasmática²⁵⁷.

mTOR forma dos complejos celulares conocidos como mTORC1 y mTORC2, con distinta composición de subunidades y selectividad de sustrato. La actividad de mTORC1 puede incrementarse también mediante otras señales mitogénicas como la vía MAPK²⁵⁸. mTORC1, contrariamente a mTORC2, está implicado en una poderosa regulación de retroalimentación negativa de la señalización del receptor del factor de crecimiento, de modo que la inhibición de mTORC1 puede conducir a una activación elevada de PI3K, AKT y la vía MAPK^{259,260}.

Si bien la relevancia clínica de las mutaciones de la línea germinal en esta vía está bien establecida, el significado de las mutaciones somáticas en sus componentes se está desarrollando. Las mutaciones de la línea germinal en la señalización de PI3K-AKT-mTOR pueden causar trastornos hereditarios asociados con una alta incidencia de cánceres. Algunos ejemplos incluyen el síndrome de Cowden asociado con mutaciones en *PTEN*²⁶¹, la Esclerosis Tuberosa causada por una mutación en *TSC1* o *TSC2*²⁶² y el Síndrome de Peutz-Jeghers, que está relacionado con la mutación del gen *STK11*²⁶³. Por otro lado, la vía PI3K-AKT-mTOR se activa con frecuencia en muchos tumores malignos como el cáncer de mama, endometrio, ovario, tumores cerebrales, próstata, colon, pulmón o cabeza y cuello, estando asociada de forma frecuente con la resistencia a fármacos y un peor pronóstico^{264,265,266}.

6.3.3.1 Comparación de nuestros resultados en la vía PI3K-AKT-mTOR con otras series

En nuestro estudio, el 22% (6/27) de los ITAC comparados con la línea germinal albergaron mutaciones somáticas probablemente patogénicas en la vía PI3K-AKT-mTOR a expensas de un 19% (5/27) de mutaciones en *PIK3CA* y un 4% (1/27) en *PIK3R2* y *MTOR*. No encontramos mutaciones somáticas relevantes en otros genes que codifican proteínas de la vía como *PIK3R1*, *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *TSC1*, *TSC2*, *STK11* o *PTEN*.

Hemos de mencionar, que en los 21 ITAC sin co-análisis germinal encontramos 6 muestras con mutaciones *TSC2* (Tabla 4; ID 18, ID 26, ID 35, ID 37, ID 41 e ID 43) y una con mutación en *AKT1* (Tabla 4; ID 18), sin embargo, del mismo modo que en los 27 casos agrupados habíamos encontrado 3 mutaciones en *TSC2* (Tabla 3; ID 19, ID 27 e ID 38) y una en *TSC1* (Tabla 3; ID 30) que fueron demostradas germinales, no podemos establecer conclusión alguna sobre las demás por lo que no serán tenidas en cuenta.

Las subunidades catalíticas de PI3K p110 α y p110 β se encuentran ubicuamente en todos los tejidos, sin embargo, p110 δ y p110 γ están exclusivamente en células del sistema hematopoyético. Además, p110 α es la isoforma más frecuentemente mutada en cáncer²⁶⁷ y es por lo que nos limitamos al estudio de su gen codificador, *PIK3CA*, en nuestro panel. Aproximadamente el 80% de las mutaciones de *PIK3CA* ocurren dentro de tres puntos críticos (“hotspot”) uno codifica para el dominio quinasa de la subunidad catalítica p110 α (H1047R) y otros dos para el dominio helicoidal de *PIK3CA* (E542K y E545K)²⁶⁸. Todos ellos conducen a la hiperactividad de la enzima PI3K, que aumenta de forma aberrante la señalización de AKT-mTOR en las células cancerosas afectadas²⁵⁴. En nuestra muestra, el hotspot H1047R. fue encontrado en un caso (Tabla 3; ID 33).

En TNS, esta vía ha sido estudiada en CENS, en términos de expresión proteica, por *Muñoz-Cordero et al.*²⁶⁹ demostrando un 61% de pérdida de expresión de PTEN y una sobreexpresión de AKT, mTOR y pS6 del 35%, 15% y 87%, respectivamente. Recientemente, *Brown et al.*²⁷⁰ estudiaron el perfil genético de CENS derivados de papiloma nasosinusal encontrando un 14% (4/29) de mutaciones no sinónimas en *PIK3CA*, un 7% (2/29) de CNA en *PIK3CA*, un 7% (2/29) de mutaciones en *PIK3R1* y un 3% (1/29) de deleciones en PTEN.

Sin embargo, hasta la fecha, no hay estudios publicados sobre esta ruta en ITAC por lo que nuestros resultados son la primera descripción existente en ITAC.

Los estudios previos de esta vía en otras neoplasias revelaron que los genes *PIK3CA* y *PTEN*, los dos más vitales de la vía PI3K-AKT-mTOR, son genes alterados con gran frecuencia en cánceres humanos. De hecho, en un metaanálisis de estudios de secuenciación del genoma del cáncer, se encontró que *PIK3CA* y *PTEN* eran el segundo y tercer gen con mayor frecuencia mutacional²⁷¹.

A pesar de lo mencionado, *PTEN* no apareció mutado en nuestro estudio de ITAC y la frecuencia mutacional de *PIK3CA* fue inferior (19%) a la descrita en cáncer de endometrio (22-53%) y mama (20-50%), similar a la descrita en cáncer de cabeza y cuello (20-30%), colorrectal (13-20%) y de pulmón (15-23%) y superior a la descrita en glioblastoma (10%)^{254,266,272}.

Las mutaciones en las subunidades reguladoras (codificadas por *PIK3R1* y *PIK3R2*), son frecuentemente oncogénicas y ocurren de forma más frecuente en cánceres de endometrio y próstata^{256,266}. Las mutaciones de *PIK3R1* están descritas en el 20-33% de los cánceres de endometrio, 2-9% de los glioblastomas y el 1-6% de los cánceres colorrectales^{254,266}. No encontramos mutaciones en *PIK3R1* en nuestra serie de ITAC. Sin embargo, encontramos un caso con mutación en *PIK3R2*. La mutación de este último gen es poco frecuente en la mayoría de los tumores a excepción del cáncer de endometrio (3-5%)^{254,266}.

En cuanto a las mutaciones en *MTOR*, estas ocurren de forma algo más frecuente en el cáncer de endometrio (10-13%), renal (6-8%), colorrectal (6-8%) y pulmonar (5%)²⁵⁴. En nuestro estudio, parecen ser mutaciones poco frecuentes en ITAC (4%).

Finalmente, las mutaciones en el resto de los genes mencionados en la vía son menos estudiadas, aunque se han relacionado con ciertos tipos de cáncer como; *AKT* en cáncer colorrectal y mama, *TSC* en cáncer de tracto urinario y endometrio, y *STB11* en cáncer de cabeza y cuello y *CPNM*^{254,266}.

6.3.3.2 PI3K-AKT-mTOR como factor pronóstico

Esta vía de señalización se ha relacionado de forma general con mal pronóstico²⁶⁶. En CENS, la pérdida de expresión de *PTEN* se relacionó con un mayor riesgo de invasión intracraneal y metástasis regionales²⁶⁹.

En el cáncer de endometrio mama, próstata y glioblastoma las mutaciones en *PIK3CA* se han asociado con una disminución de la supervivencia²⁷³⁻²⁷⁶. Otros ejemplos son el cáncer de cabeza y cuello y cáncer de pulmón donde la sobreexpresión de la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR se ha asociado con una mayor agresividad²⁷⁴ o el CCR donde aproximadamente el 14% muestra mutaciones hotspot H1047R de *PIK3CA* asociándose con invasión y progresión²⁷⁷.

También se ha relacionado con la resistencia a terapias en algunos tipos de cáncer. En el cáncer de mama HER2-positivo la pérdida de la expresión de *PTEN* y las mutaciones oncogénicas en *PIK3CA* se han descrito como predictoras de resistencia a Trastuzumab²⁷⁸. Esto ha proporcionado el fundamento preclínico para investigar la terapia combinada anti-HER2 con la inhibición de la vía PI3K. Otro ejemplo es el CCR con *KRAS* mutante, donde las líneas celulares con mutaciones *PIK3CA* y *PTEN* se asociaron con resistencia a la inhibición de la proteína MEK²⁷⁹ o el CECC donde la activación de la vía PI3K se ha relacionado con la resistencia a la RT y QT basada en platino²⁸⁰.

Estos hallazgos han planteado la posibilidad de que los inhibidores de la vía de PI3K dirigidos puedan potencialmente restaurar la sensibilidad a los tratamientos existentes en varios tipos de cáncer²⁸¹.

A pesar de todo ello, en nuestro trabajo, las mutaciones en la vía PI3K no se relacionaron con el estadio ni el subtipo histológico. Tampoco tuvieron influencia significativa en la supervivencia o la recidiva tumoral.

6.3.3.3 PI3K-AKT-mTOR como diana terapéutica

Se han estudiado preclínicamente muchos inhibidores de molécula pequeña para componentes de esta vía. Sin embargo, solo algunos de los inhibidores de PI3K y mTOR están aprobados actualmente para el tratamiento del cáncer^{254,282,283}.

Los cuatro inhibidores de PI3K aprobados por la FDA son: Idelalisib (Zydelig®); un inhibidor de PI3K δ , Copanlisib (Aliqopa®); un inhibidor predominantemente de las isoformas PI3K α y PI3K δ , Duvelisib (Copiktra®); un inhibidor dual oral de PI3K δ y PI3K γ y Alpelisib (Piqray®); un inhibidor de PI3K α . Alpelisib ha sido aprobado para el cáncer de mama metastásico con receptor hormonal positivo, HER2 negativo y *PIK3CA* mutado. El resto de ellos fueron aprobados para el tratamiento de neoplasias hematológicas (Leucemia Linfática Crónica [LLC], Linfoma No Hodgkin [LNH] células B folicular, Linfoma Linfocítico Pequeño [LLP] y Linfoma Folicular [LF]) recidivantes, o refractarias a dos terapias previas.

En cuanto a los fármacos experimentales actuales que interactúan con PI3K se pueden dividir en diferentes grupos. El primer grupo de fármacos consta de inhibidores de todas las isoformas de PI3K de clase I, competitivos de ATP y reversibles, también conocidos como inhibidores selectivos de PI3K de clase I o inhibidores de pan-PI3K, como GDC0941, XL147, BKM120 o BAY80 6946. Actualmente se está desarrollando un inhibidor irreversible de pan-PI3K, PX 866²⁵⁴.

Otro grupo importante de fármacos experimentales que interactúan sobre PI3K está compuesto por inhibidores específicos de isoformas, cada uno de los cuales interactúa directamente con una isoforma específica del dominio catalítico de la enzima. Estos se han buscado con el objetivo de disminuir la toxicidad de estos fármacos. Los inhibidores selectivos de p110 α INK1117 y BYL719 y el inhibidor selectivo de p110 δ CAL 101 (GS-1101) son algunos de ellos²⁵⁴.

En cuanto a los inhibidores de mTOR, existen inhibidores de primera generación que suprimen mTORC1, pero no mTORC2, e inhibidores de segunda generación que suprimen ambos complejos.

Los conocidos fármacos aprobados por la FDA Sirolimus (Rapamune®), Everolimus (Afinator®) y Temsirolimus (Torisel®) son inhibidores de primera generación. El Sirolimus (Rapamune®) está aprobado como inmunosupresor para prevenir el rechazo de trasplantes mientras que Everolimus (Afinator®) y Temsirolimus (Torisel®) han sido aprobados para el tratamiento del carcinoma renal avanzado, cáncer de mama receptor hormonal positivo y HER2-negativo en combinación con hormonoterapia y tumores neuroendocrinos pancreáticos, gastrointestinales o pulmonares.

Actualmente, varios inhibidores de mTOR de segunda generación, como BI860585 (Boehringer), CC-223 (Celgene), DS-3078a (Daiichi), GDC-0349 (Genentech), ME-344 (Novogen), OSI-027 (OSI), P529 (BioVision, Inc.), Sapanisertib (TAK-228) se encuentran en ensayos clínicos, pero ninguno ha llegado aún a la clínica²⁵⁴.

Dado que la inhibición de mTOR estimula a AKT a través de la pérdida de retroalimentación negativa, se han buscado inhibidores duales de PI3K y mTOR (SF1126, BEZ235, XL765)²⁵⁴.

Otros inhibidores estudiados son los inhibidores de AKT. Sin embargo, la Miltefosina, es el único inhibidor de AKT aprobado actualmente para el tratamiento de la Leishmaniasis visceral y cutánea, pero no para el tratamiento de neoplasias malignas. En cáncer, los resultados obtenidos de estudios preclínicos revelaron que los inhibidores de AKT MK-2206 y GDC-0068 son probablemente los más útiles contra los tumores con pérdida de expresión de *PTEN* o mutaciones en *PIK3CA*²⁸³.

A pesar de que se estudiaron muchos inhibidores en estudios preclínicos y que estos inhibidores han demostrado inhibir AKT in vitro e in vivo en modelos experimentales, sólo un número limitado de estos inhibidores ha entrado en ensayos clínicos²⁸³. Y de estos, la mayoría, mostraron un efecto clínico limitado en monoterapia con alta toxicidad.

Es importante destacar que, en general, el uso de los inhibidores de esta vía en monoterapia tiene solo un efecto modesto en cáncer y están asociados a importantes toxicidades. Los esfuerzos se han centrado en identificar los factores moleculares que subyacen en la escasa respuesta y en el uso de terapia combinada. Los estudios preclínicos demostraron que la mutación en *PIK3CA*, especialmente H1047R, puede servir como biomarcador predictivo de la sensibilidad a los inhibidores de la vía PI3K-AKT-mTOR. Por otro lado, como es esperable, las mutaciones en *PTEN* son causa de resistencia a inhibidores de la vía^{254,284}. No obstante, las aberraciones de *PIK3CA* y *PTEN* simultáneas son muy infrecuentes.

También se ha visto que los pacientes con mutaciones simultáneas de *PIK3CA* y *KRAS* en el codón 12 o 13 tienen tasas de respuesta más bajas a los inhibidores de la vía en comparación con aquellos sin mutación simultánea de *KRAS* (0% y 23%, respectivamente)²⁸⁵.

Actualmente, la inhibición dual y las combinaciones de terapias dirigidas y no dirigidas se están estudiando clínicamente y a la espera de resultados prometedores^{283,286}.

En base a la mencionada tasa de mutación del 22% encontrada en la ruta PI3K en este trabajo en ITAC, consideramos que los inhibidores de esta ruta deben ser tenidos en cuenta en futuros estudios de terapias dirigidas si existen alteraciones en PI3K-AKT-mTOR ya sea en monoterapia o en combinación con QT y/o RT. Una comprensión cuidadosa de los mecanismos de resistencia y sensibilidad a los inhibidores de la vía puede mejorar la selección de pacientes y el éxito de las terapias combinadas. En nuestro estudio de ITAC no encontramos mutaciones en *PTEN* que puedan predecir la resistencia a estos inhibidores, pero sí mutaciones simultáneas en *KRAS* y *PI3KCA* en un caso que puede condicionar la respuesta a estas terapias (Tabla 3; ID 33). Por otro lado, solo un caso mostró mutación hotspot H1047R relacionada con la buena respuesta a estos inhibidores, siendo poco predecible la respuesta esperable en el resto de los casos con mutaciones en esta vía.

6.3.4 La vía Wnt/ β -catenina

La ruta de señalización Wnt/ β -catenina es de las más ampliamente estudiadas en los ITAC dada la similitud histológica con el CCR, donde la alteración en esta ruta es de las más importantes en su desarrollo.

La ruta Wnt tiene dos vías principales de señalización; la vía no canónica y la vía canónica. La vía no canónica la componen; la vía de la Polaridad Celular Planar (PCP), implicada en la división y migración celular, y la vía Wnt/Ca²⁺, implicada en la regulación del calcio.

La vía canónica (Wnt/ β -catenina) juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular. Como consecuencia, está involucrada en numerosas anormalidades del desarrollo embrionario, del crecimiento y la homeostasis, fruto de la activación de la vía a nivel de las células pluripotenciales. Sabemos que la vía Wnt/ β -catenina está relacionada con un significativo número de vías de señalización celular, entre ellas NOTCH, Hedgehog, RAC-RAS y PI3K-AKT-mTOR, vías que también tienen como objetivo central coordinar el desarrollo de órganos o mantener la homeostasis en ciertos tejidos^{257,287,302}.

Las proteínas Wnt son glicoproteínas de secreción que actúan como ligandos. El actor central de la vía canónica es la β -catenina, una proteína codificada por el gen *CTNNB1* localizado en el cromosoma 3p. Si la β -catenina se libera de la fosforilación, se estabiliza y se acumula en el núcleo, donde actúa como un factor de transcripción de genes diana como *CCND1*, *C-MYC*, *FGF20*, *DKK1*, *WISP1* (Figura 24). Una perturbación de los niveles de ligandos Wnt o una alteración de las proteínas necesarias para la transducción de su señal pueden provocar un defecto en el desarrollo embrionario o contribuir a la etiología del cáncer.

El mecanismo principal de activación de la vía Wnt en cáncer es la pérdida de función de *APC*²⁸⁸⁻²⁹⁰, el cual funciona como regulador participando en la ubiquitinación de β -catenina junto a otros elementos del complejo de destrucción (Figura 24).

La importancia de la función de este gen supresor en la vía queda ilustrada por el síndrome hereditario de Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) causado por la mutación de *APC* en la línea germinal. Aquí, la pérdida de la función de la proteína APC conduce a la formación de cientos o miles de adenomas colorrectales, algunos de los cuales pueden progresar a cáncer. Otras manifestaciones de la PAF incluyen un mayor riesgo de carcinoma de tiroides, hepatoblastoma y cáncer de páncreas.

La mutación somática en *APC* es también bien conocida en CCR, donde se considera un evento temprano en la tumorigénesis, e incluso se ha identificado en lesiones colorrectales premalignas¹⁴⁰.

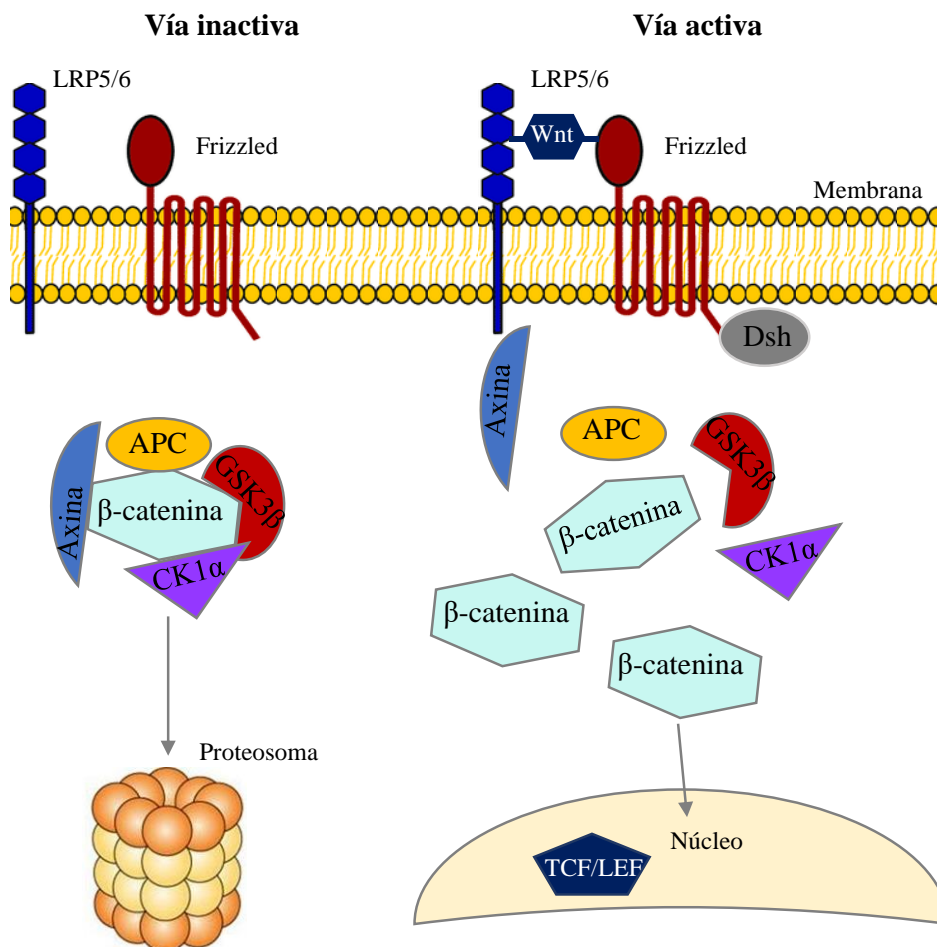


Figura 24. Modelo jerárquico resumido de la vía Wnt/ β-catenina.

En ausencia de ligandos Wnt, la vía Wnt/β-catenina está inactiva, la β-catenina se encuentra en el complejo de destrucción junto a APC, Axina y las quinasas CK1α (Ser 45) y GSK3β (Ser33, Ser37, Thr41), que fosforilan a β-catenina. Esta modificación es indispensable para la posterior ubiquitinación y degradación en el proteosoma de la proteína, lo que impide su acumulación en el citoplasma y su translocación al núcleo.

La vía Wnt/β-catenina se activa tras la unión del ligando Wnt a un receptor Frizzled y su correceptor LRP5/6 que desestabiliza el complejo destructor. La formación del complejo Wnt-Fz-LRP5/6 induce la fosforilación del dominio intracelular de LRP5/6 a través de acciones combinadas de CK1α y GSK3β. El dominio LRP5/6 hiperfosforilado se une a la proteína Axina con alta afinidad y es inactivada y/o degradada, alejándola del complejo de destrucción. Los cofactores Frat1 y Dsh inhiben la fosforilación de β-catenina acumulándose ésta en el citoplasma. Posteriormente es trasladada al núcleo para unirse a los factores de transcripción TCF/LEF y al ADN y activar la expresión de genes diana Wnt que promueven la supervivencia, proliferación y diferenciación celular, entre los que podemos destacar *CCND1*, *C-MYC*, *FGF20*, *DKK1* y *WISP1*.

Leyenda: LRP5/6= Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6; Dsh= Dishvelled; APC= Adenomatosis Poliposis Coli; GSK3β = Glycogen Synthase Kinase 3β; CK1α = Casein Kinase 1α.

6.3.4.1 Comparación de nuestros resultados en la vía Wnt/ β -catenina con otras series

En nuestro estudio, el 22% (6/27) de los ITAC comparados con la línea germinal albergaron mutaciones somáticas probablemente patogénicas en la vía Wnt/ β -catenina a expensas de un 15% (4/27) de mutaciones en *APC* y un 7% (2/27) de mutaciones en *CTNNB1*.

Hemos de mencionar, que en los 21 ITAC sin co-análisis germinal encontramos 5 muestras con mutaciones en *APC* (Tabla 4; ID 9, ID 20, ID 23, ID 25 e ID 35) de las cuales 3 fueron mutaciones stopgain o frameshift (Tabla 4; ID 9, ID 23 e ID 35). Sin embargo, del mismo modo que en los 27 casos agrupados habíamos encontrado 3 mutaciones en *APC* (Tabla 3; ID 8, ID 30 e ID 33) que fueron demostradas germinales, no podemos establecer conclusión alguna sobre las demás por lo que no serán tenidas en cuenta.

*Yom SS et al.*²⁹¹ no encontraron mutaciones en *APC* en el estudio de 7 ITAC. Sin embargo, *Frattini M et al.*¹³⁷ describieron una tasa de mutación de *APC* del 28% (5/18) en ITAC y *Sjöstedt S y cols.*¹⁴⁰ del 37% (7/19). *Frattini M et al.*¹³⁷ mostraron 5/18 ITAC con mutaciones en *APC* todas ellas missense. *Sjöstedt S et al.*¹⁴⁰ mostraron 7 de 19 ITAC con mutaciones en *APC*, sin embargo, solo 3 fueron mutaciones claramente inactivadoras (frameshift y stopgain). Ninguno de los autores realizó co-análisis con la línea germinal.

En nuestro estudio, sin realizar comparación con la línea germinal hubiéramos descrito una tasa de mutación de *APC* del 22% (6/27; Figura 12), próxima a la descrita por *Frattini M et al.*¹³⁷. Sin embargo, tras estudiar la línea germinal, dos de ellas fueron descartadas como somáticas presentando entonces 3 mutaciones stopgain y una mutación frameshift (Tabla 3). Consideramos, por lo tanto, que el estricto filtrado de nuestro trabajo es el responsable de presentar una tasa de mutación de *APC* del 15%, inferior a otros autores.

Hasta hoy, más de 700 mutaciones somáticas han sido citadas en *APC*²⁹². Como ocurre con el CCR, y la mayoría de los tumores relacionados con esta vía, en nuestro trabajo las mutaciones en *APC* fueron halladas con más frecuencia que las mutaciones en *CTNNB1*. La mayoría de ellas (95%) son mutaciones nonsense o frameshift que conducen a un producto proteico truncado con una función anormal. En nuestro caso hallamos una mutación frameshift y 3 mutaciones stopgain (Tabla 3; ID 8, ID 28, ID 44 e ID 45).

Hasta donde sabemos, no se han descrito previamente mutaciones en *CTNNB1* en ITAC. Por lo tanto, describimos por primera vez mutaciones en *CTNNB1* en el 7% (2/27) de los ITAC, frecuencia mutacional similar a la encontrada en el adenocarcinoma pulmonar (2-6%)^{293, 294} y en el CCR (5-8%)^{294,295}.

Ambas mutaciones encontradas en *CTNNB1* son conocidas. Una de ellas fue encontrada en el exón 7, codificador de parte del dominio de unión a APC / axina (p.K335I; Tabla 3; ID 21). La otra mutación fue hallada en el exón 3, donde se han descrito los mayores cambios en este gen, y el cual codifica parte del dominio N-terminal de la proteína β -catenina donde se ubican los residuos de Serina (Ser44, Ser37 y Ser33) y Treonina (Thr41) que son blanco de las quinasas GSK3 β y CK1 α (p.Ser45del; Tabla 3; ID 24)²⁹⁶.

Por otro lado, la activación de la vía, detectada como expresión nuclear de β -catenina, se ha descrito por otros autores en aproximadamente el 30-40% de los ITAC^{114,137}, aunque hay resultados con nula expresión nuclear^{138,139}. Estos resultados son sustancialmente inferiores al 90% de activación de la vía del adenocarcinoma colorrectal esporádico²⁹⁷ y más próximos a los resultados del CPNM (50%)²⁹⁸.

En cuanto a su relación clínico-patológica con los ITAC, se ha descrito previamente una mayor proporción de activación de esta vía en los subtipos de ITAC papilar y colónico^{114,138,139}. En nuestro estudio, aunque las mutaciones de *APC* y *CTNNB1* se observaron más frecuente en los subtipos de bajo riesgo (Tabla 9), no se alcanzó la significación estadística en probable relación con el escaso número de casos.

6.3.4.2 Wnt/ β -catenina como factor pronóstico

En nuestro grupo se estudió en el pasado la expresión IHQ de β -catenina, E-cadherina, C-myc y Ciclina D¹¹⁴. Se describió la expresión nuclear de β -catenina como un factor de mal pronóstico independiente del estadio tumoral y del subtipo histológico de ITAC.

En el CCR y el CPNM las alteraciones en esta ruta también se han relacionado con un mal pronóstico, mayor riesgo de metástasis y con la resistencia a la RT, QT y terapia dirigida al inducir propiedades similares a las de las células madre^{299,300}.

En nuestro trabajo no observamos relación significativa entre las mutaciones en la ruta Wnt/ β -catenina (*APC* y *CTTN1B*) y el pronóstico de estos pacientes, por lo que el valor pronóstico de esta vía, en términos de expresión proteica y mutación, debe aún de ser aclarado en futuros estudios con mayor tamaño muestral.

6.3.4.3 Wnt/ β -catenina como diana terapéutica

Esta ruta ha sido un objetivo interesante para la inhibición durante muchos años debido a que se encuentra mutada en muchas neoplasias malignas, tanto hematológicas (LMC) como sólidas (adenocarcinoma colorrectal, endometrial, estómago, ovario, mama y CPNM) y por su relación con la resistencia a terapias en cáncer.

Hasta ahora, no se han aprobado medicamentos para atacar esta vía, aunque se han realizado grandes esfuerzos por desarrollar inhibidores de moléculas pequeñas e inhibidores biológicos, habiendo algunos de ellos entrado en ensayos clínicos³⁰¹.

Entre los inhibidores de esta vía Wnt/ β -catenina destacan los inhibidores de la tanquirasa para las mutaciones en el gen *APC*³⁰². Las tanquirasas (isoformas PARP5a y PARP5b) son proteínas de poliribosa-adenosin fosfato, con actividad polimerasa que aumentan la degradación de la Axina vía ubiquitín-proteasoma³⁰³. La inhibición de las tanquirasas puede prolongar la vida media de la proteína Axina y promover la degradación de β -catenina vía proteosoma. Son pocos los inhibidores de tanquirasa estudiados, algunos de ellos son XAV939 e IWR-1³⁰².

Otros inhibidores que actúan sobre los diferentes componentes de la vía en ensayos clínicos son los inhibidores de ligandos Wnt (LGK974, ETC-159) también conocidos como inhibidores del puercospín (una omicron-aciltransferasa que contribuye a la secreción y función de los ligandos Wnt), los inhibidores del receptor Frizzled (Ipafricept [OMP-54F28] y Vantictumab [OMP-18R5]) o los inhibidores de la acción de β -catenina (PRI.724, CWP29)³⁰¹.

Por otro lado, varios fármacos que fueron aprobados originalmente para tratar otras enfermedades inhiben la señalización de Wnt, y por lo tanto podrían utilizarse como tratamiento adyuvante en el cáncer con activación de esta vía. Algunos de los propuestos son el Ácido Etacrínico (diurético), Pamoato de Pirvinio, Niclosamida (antiparasitarios), Pimozida (antipsicótico), Sulindanc y Celecoxib (AINEs)³⁰¹.

El Sorafenib (Nexavar®), un inhibidor de la tirosina quinasa aprobado por la FDA para el tratamiento del carcinoma hepatocelular, renal y tiroideo, y el Refametinib, un inhibidor de MEK en estudios preclínicos, han demostrado inactivación de la señalización de β -catenina por lo que se han propuesto como tratamiento alternativo a la mutación de la vía Wnt en otros tipos de cáncer³⁰⁴.

Por la preocupación legítima de que pueda afectarse la población normal de células madre dependientes de Wnt con la inhibición de la ruta Wnt/ β -catenina, es importante aclarar en futuros estudios las implicaciones de esta ruta en el desarrollo, pronóstico y tratamiento de los ITAC.

Para ello, debería estudiarse la mutación de los genes y la expresión de proteínas relacionadas con la ruta en los diferentes puntos de esta (ligandos Wnt, receptores Frizzled y LRP5/6, β -catenina, etc.). Esto es fundamental de cara a plantear una estrategia que quizá (según los hallazgos) deba apuntar hacia componentes de señalización específicos en la parte inferior de la ruta de β -catenina, en lugar de usar agentes que supriman directamente los niveles de β -catenina a través de Wnt como los inhibidores del puercospín.

6.3.5 La vía de reparación del ADN (Recombinación Homóloga)

Aproximadamente 450 genes están implicados en la respuesta y reparación del daño del ADN³⁰⁵. Estos genes se pueden agrupar según tres funciones fundamentales; (1) la reparación de errores de apareamiento (MMR, Mismatch Repair) que reconoce y elimina las bases desapareadas del ADN, (2) la reparación del daño de cadena única por escisión de base (BER, Base Excision Repair) o reparación por escisión de nucleótido (NER, Nucleotide Excision Repair) que elimina (escinde) y reemplaza la región dañada y (3) la reparación de roturas de doble cadena del ADN (DSB, Double Strand Breaks).

Los defectos en MMR son los responsables del fenotipo de "inestabilidad de microsatélites " conocido en el Síndrome de Lynch y en una gran variedad de tumores, pero ya estudiado anteriormente por nuestro grupo en ITAC sin hallazgos³⁰⁶.

La alteración de la reparación del ADN por escisión de base, como hemos comentado con anterioridad, fue relacionada con la exposición al polvo de madera en otros modelos tumorales mediante la disminución de la enzima OGG1, implicada en la reparación por escisión de base de 8-oxodG, y acumulación de bases de ADN oxidadas.

Las DSB de ADN son el insulto más letal del genoma. Su reparación se realiza por dos mecanismos; unión de extremos (EJR, End-Joining Repair) o Recombinación Homóloga (HR, Homologous recombination). En la EJR las roturas de doble cadena son esencialmente detectadas, recortadas y ligadas nuevamente. Por este motivo, este mecanismo produce de por sí inestabilidad genómica, mutaciones y potencial carcinogénesis³⁰⁷. Sin embargo, en la HR la reparación es más exquisita; las DSB se reparan al alinearse con secuencias homólogas de ADN (Figura 25). Si se altera este mecanismo de recombinación homóloga la reparación de la ruptura de la doble cadena queda a cargo de EJR favoreciendo entonces los errores en la reparación.

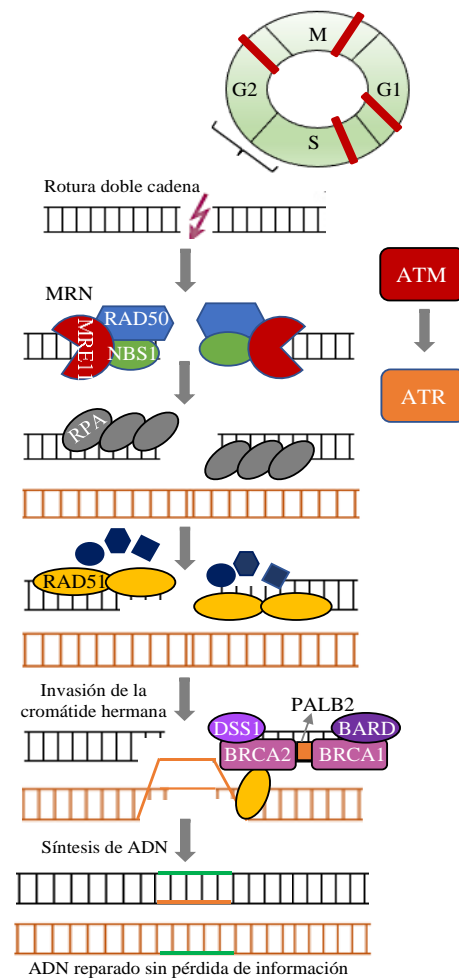


Figura 25. Modelo jerárquico resumido del complejo multiprotéico de reparación de roturas del ADN de doble cadena

Durante la fase S y G2 del ciclo celular, una DSB es reconocida por el complejo MRN formado por; las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1. La actividad exonucleasa 5´-3´ de este complejo, junto con la ayuda del complejo BRCA1-BARD, degrada los extremos de la doble cadena de ADN para dejar expuestos los extremos 3´ en forma de ADN monocatenario (ADNss). La localización de MRN activa la señalización de factores de reparación aguas abajo mediada por ATM. Después de la resección mediada por MRN, RPA estabiliza los salientes de ADNss recién producidos. RAD51 se ensambla al extremo 3´-ADNss, bajo la mediación de otras proteínas relacionadas con RAD51 como SWS1AP1, XRCC2, XRCC3, RAD51B, C y D. El complejo mediador BRCA (DSS1-BRCA2-PALB2-BRCA1-BARD1) también facilita el ensamblaje de RAD51. El complejo DSS1-BRCA2 se ancla a RAD 51 y facilita su unión en el sitio requerido de ADNss. BRCA1-BARD1 se une al complejo DSS1-BRCA2, junto con PALB2, interactuando físicamente con RAD51 y mejorando la actividad recombinasa de RAD51. Finalmente, RAD51, junto con la ayuda de RAD52 y 54 logra la invasión de la cadena saliente de ADNss en una región homóloga, generalmente una cromátida hermana, para la síntesis de ADN de la zona de rotura³⁰⁸.

Leyenda: MRE11= Meiotic Recombination 11; NBS1= Nijmegen Breakage Syndrome 1; RPA= Replication Protein A; BRCA= Breast Cancer susceptibility; BARD1= BRCA1 Associated Ring Domain 1; ATM= Ataxia-Telangiectasia Mutated; ATR= Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related.

ATM y ATR son miembros de la familia de quinasas relacionadas con PI3K (PIKK) de clase IV, junto con la proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK) y mTOR (que no juega un papel identificable en la vigilancia del genoma). Sin embargo, ATM y ATR carecen de actividad lipídico quinasa; en lugar de eso, fosforilan proteínas que contienen residuos de Ser o Thr seguidos de Gln y se clasifican por separado de las proteínas quinasas clásicas.

ATM y ATR responden a diferentes tipos de lesiones del ADN. ATM responde principalmente a roturas de doble cadena de ADN, mientras que ATR protege la integridad de la replicación de los cromosomas. ATR también es activado por roturas de doble cadena, pero a través de un mecanismo que depende de ATM y del complejo MRN. Tanto ATM como ATR regulan positivamente las vías de control del ciclo celular, induciendo la detención del ciclo celular y reparación del ADN. ATM también media en cascadas de señalización que no están relacionadas con los eventos de reparación del ADN, sino que participan en el mantenimiento de la homeostasis celular.

ATM y ATR se expresan en la mayoría de los tejidos, y las mutaciones germinales en los genes codificadores dan como resultado trastornos autosómicos recesivos como la Ataxia Telangiectasia y el Síndrome de Seckel, respectivamente.

Otras dos proteínas esenciales para la reparación de DSB son las proteínas BRCA1 y BRCA2. BRCA1, es un componente crítico del punto de control de señalización y reparación de ADN, y es un objetivo directo e indirecto de la fosforilación por ATM y ATR. BRCA2 se une a BRCA1 junto con PALB2, y otros mediadores, para facilitar la recombinación de la cadena homóloga por proteínas RAD (Figura 25).

Si bien la relevancia clínica de las mutaciones de *BRCA* de la línea germinal es ampliamente establecido, el significado de las mutaciones somáticas en el gen *BRCA* se está desarrollando. Las mutaciones heterocigotas de *BRCA1* o *BRCA2* en línea germinal están presentes en el 9% y 8% de los cánceres de ovario³⁰⁹ y en el 14% y 8% de los cánceres de mama³¹⁰, respectivamente. Estas mutaciones proporcionan un riesgo conocido de por vida de desarrollar cáncer de ovario (*BRCA1* 40-60%; *BRCA2* 11-30%)^{311,312} y cáncer de mama (*BRCA1* 55-65%; *BRCA2* 45%)³¹³.

De forma general, sabemos que los genes que codifican proteínas relacionadas con la HR proporcionan una barrera a la progresión tumoral al inducir la detención del ciclo celular y la apoptosis. De este modo, su mutación promueve la supervivencia celular y da como resultado un aumento de las aberraciones moleculares y de la propensión de una célula a volverse cancerosa y progresar³¹⁴.

6.3.5.1 Comparación de nuestros resultados en la vía de Recombinación Homóloga con otras series

En nuestro estudio, el 26% (7/27) de los ITAC comparados con la línea germinal albergaron mutaciones somáticas probablemente patogénicas en la vía de la Recombinación Homóloga a expensas de un 15% (4/27) de mutaciones en *ATM*, un 11% (3/27) de mutaciones en *BRCA1* y un 4% (1/27) de mutaciones en *BRCA2*, pero no en *ATR* (Tabla 3).

Hemos de mencionar, que en los 21 ITAC sin co-análisis germinal encontramos 4 muestras con 5 mutaciones en *ATM* (Tabla 4; ID 1, ID 16, ID 22 e ID 37), 4 muestras con 5 mutaciones en *BRCA1* (Tabla 4; ID 17, ID, 18, ID 23 e ID 41), una de ellas frameshift, y 2 muestras con 4 mutaciones en *BRCA2* (Tabla 4; ID 20 e ID 46), una de ellas stopgain. Sin embargo, del mismo modo que en los 27 casos agrupados habíamos encontrado 3 mutaciones en *ATM* (Tabla 3; ID 27, ID 32 e ID 42), la misma mutación en frameshift en *BRCA1* (Tabla 3; ID 13) y 2 mutaciones en *BRCA2* (Tabla 3; ID 24 e ID 36) que fueron demostradas germinales, no podemos establecer conclusión alguna sobre las demás, a excepción de una variante de *BRCA1* (ID 23; p.R1347G) que se demostró somática en el subgrupo de 27 (ID 31).

Se han descrito distintas mutaciones somáticas en *ATM* en diferentes neoplasias malignas humanas, con menor frecuencia que en ITAC³¹⁵⁻³¹⁷, que incluyen el cáncer de pulmón (7%)³¹⁵, colorrectal (3.4%)^{318,319}, mama (8.3%)³²⁰ y ovario (2%)³⁰⁹. Aunque la opinión actual en el campo es que la señalización de *ATM* y *ATR* inhibe la progresión tumoral en lugar de promover el cáncer³²¹⁻³²³ ha habido varios informes de sobreexpresión de *ATM* o *ATR*, o de activación de las vías descendentes en diferentes cánceres³²⁴⁻³²⁷.

Por otro lado, algunos tumores exhiben deficiencias somáticas del gen *BRCA*, y otros componentes de la HR, como el cáncer de ovario, mama y colorrectal. Las mutaciones somáticas de *BRCA* ocurren en aproximadamente el 5-7% de los casos de

cáncer de ovario^{309,328}, en el 0-3.5% de los cánceres de mama^{329,330} y en el 2% de los CCR³¹⁸ con implicaciones terapéuticas e incluso pronósticas.

En base a lo mentado, las mutaciones somáticas en la ruta de HR son más frecuentes en ITAC que en otros tumores más estudiados. Dado que estos genes median en la respuesta al daño del ADN, este dato podría ser de interés a la hora de evaluar la tasa de mutaciones de los ITAC frente a otros tumores sin mutaciones en esta ruta.

6.3.5.2 Recombinación Homóloga como factor pronóstico

En nuestro trabajo, los pacientes con ITAC con alteraciones en *ATM* o *BRCA* tienen una probabilidad de morir inferior que el resto (HR=0,207; 95%IC=0,049-0,871; *p*valor=0,032), por lo que podrían considerarse un subgrupo con un mejor pronóstico.

De forma similar ocurre con el cáncer de ovario hereditario, donde los pacientes con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* germinal tienen una mejor supervivencia y mayor probabilidad de respuesta a platino que aquellos cánceres de ovarios no relacionados con *BRCA*³³¹⁻³³⁴. Sin embargo, no está del todo claro si los efectos biológicos de albergar mutaciones somáticas o germinales de *BRCA1* o *BRCA2* son los mismos. *Hennessy BT et al.*³³⁵ demostraron que, al igual que aquellos cánceres de ovario con mutaciones de la línea germinal *BRCA1* y *BRCA2*, la supervivencia libre de progresión (SLP) fue más prolongada en pacientes con mutaciones somáticas de *BRCA* en comparación con los casos de tipo salvaje. Sin embargo, no se observó una asociación significativa con la supervivencia global. *Pennington KP et al.*³³⁴ compararon la sensibilidad al platino y la SG en pacientes con cáncer de ovario con mutaciones en un gen de la HR en línea germinal y somática con aquellos sin mutación. Este estudio concluyó que la presencia de mutaciones en HR en línea germinal y somática fueron altamente predictivas de la sensibilidad primaria al platino (*p*valor = 0,0002) y de una mejor SG (*p*valor = 0,0006). Sin embargo, aunque la supervivencia global en pacientes con mutaciones somáticas fue similar a la de los portadores de mutaciones de la línea germinal, en esta serie, no hubo diferencias significativas entre los grupos de mutación somática y sin mutación.

En el cáncer de mama, el pronóstico de las mutaciones en HR es más controvertido. Algunos estudios demostraron que las mujeres portadoras de la mutación *BRCA1* o *BRCA2* con cáncer de mama tenían una peor supervivencia global, otros no mostraron diferencias significativas en comparación con las no portadoras y algunos

estudios incluso mostraron que los portadores de la mutación *BRCA* tenían una mejor supervivencia que las no portadoras³¹⁰.

6.3.5.3 Recombinación Homóloga como diana terapéutica

Teniendo en cuenta estos genes como supresores de tumores y facilitadores en la mediación de las respuestas al daño del ADN se han considerado durante mucho tiempo como posibles dianas farmacológicas para la terapia del cáncer.

El principal objetivo terapéutico de esta vía de reparación del ADN ha sido la proteína PARP1 (Poly ADP-Ribose Polymerase 1). Aunque PARP1 juega un papel fundamental en la reparación de las rupturas de cadena simple (BER), también media la activación de ATM tan necesaria para la recombinación homóloga.

De este modo, los inhibidores de PARP1 (PARPi) interfieren directamente con estas funciones, pero también atrapan a PARP1 en el ADN dañado, lo que provoca un bloqueo de la horquilla de replicación y transcripción, y la posterior ruptura del ADN de doble hebra. Esto lleva a una mayor inestabilidad del genoma que la célula no puede superar, cuando también están presentes defectos de HR, y lleva a la apoptosis (concepto conocido como “letalidad sintética”)³³⁶. Este concepto viene a explicar que ni la inhibición de PARP ni la deficiencia de *BRCA* por sí solas son letales para la célula, pero la combinación de ambas sí lo es.

De forma general, los PARPi son efectivos en células que tienen defectos funcionales en las vías de reparación de DSB, pero más notablemente en células con mutación *BRCA*³³⁷⁻³⁴⁰. También se ha visto letalidad sintética en pacientes con mutaciones en *ATM*, *ATR* u otros genes relacionados con la HR lo que amplió el uso de estos inhibidores en cáncer³⁴¹⁻³⁴⁴.

Los PARPi se han utilizado como agentes contra el cáncer desde principios de la década del 2000³⁴¹ y el primer PARPi, Olaparib (Liparza®), fue aprobado en 2014 por la FDA para el cáncer de ovario avanzado con mutación germinal de *BRCA*. La aprobación actual de la FDA de los PARPi (Olaparib [Liparza®], Talazoparib [Talzenna®], Niraparib [Zejula®] y Rucaparib [Rubraca®]) se otorgó fundamentalmente para el tratamiento del cáncer de mama, ovario y próstata avanzado. Algunos de ellos están indicados en presencia de mutaciones tanto somáticas como germinales en el gen

BRCA (Olaparib, Niraparib, Rucaparib) e incluso en otras formas de disfunción de la HR como ocurre en el cáncer de próstata y ovario (Olaparib).

Los PARPi no solo pueden inducir letalidad sintética en cánceres con alteraciones de la HR, sino que también puede aumentar la sensibilidad a los tratamientos convencionales como la QT o la RT al retrasar la reparación de la rotura de cadena única y provocar la posterior generación de la DSB³⁴⁵. Los inhibidores de la HR alteran la reparación del daño causado en el ADN por la RT o por la QT citotóxica³⁴⁶⁻³⁵⁵. Sin embargo, el aumento de los eventos adversos en terapia combinada es un desafío por superar³⁵⁶⁻³⁵⁸.

Otros objetivos atractivos para interrumpir la reparación del ADN en las células cancerosas son los inhibidores de ATR (ATRi) y los inhibidores de ATM (ATMi). Varios estudios preclínicos han identificado una letalidad sintética a ATRi y ATMi en presencia de sus mutaciones³⁵⁹.

Todos estos hallazgos han llevado a ampliar el estudio de estos inhibidores a otros cánceres con alteraciones somáticas en la HR. En el cáncer de pulmón se ha visto que la pérdida de expresión de la proteína ATM aumenta la sensibilidad a PARPi y ATRi³⁶⁰. Sin embargo, debido al número limitado de modelos preclínicos estudiados, estos resultados deben confirmarse en cohortes mayores. Además, por su poder radiosensibilizante, han sido estudiados en combinación con RT en varios modelos preclínicos y en modelos de ratón de cáncer pulmón, CCR y CECC, entre otros, mostrando una mayor eficacia que la RT exclusiva³⁴⁵. De hecho, los PARPi y ATRi se han propuesto como alternativa terapéutica en combinación con QT y QRT en el CCR con mutaciones en HR^{318,360-363}.

Por este motivo, consideramos que cualquier tumor con deficiencia en la ruta de la Recombinación Homóloga es un objetivo potencial para los inhibidores de PARP ya aprobados en cáncer. Debido a esto, y ante los hallazgos de nuestro estudio, consideramos que los PARPi deben ser tenidos en cuenta en futuros estudios de terapias dirigidas en ITAC con alteraciones en HR ya sea en monoterapia o, especialmente, en combinación con RT y/o QT.

6.4 INTERPRETACIÓN DE VARIANTES

El éxito de una terapia dirigida contra el cáncer es la interpretación de la variante genética tumoral, es decir, es identificar un objetivo biológico que como resultado de su mutación o expresión anormal determine el desarrollo y la progresión del cáncer.

De hecho, aunque entendemos el cáncer como una enfermedad multigénica, las evidencias experimentales nos demuestran que el fenotipo de las células tumorales está frecuentemente apoyado por ciertas proteínas claves cuya función es aberrante como consecuencia de la mutación o afectación de su gen supresor o protooncogén^{364,365}.

Este fenómeno ha llevado en las últimas décadas a realizar grandes esfuerzos de investigación para el desarrollo de terapias contra un objetivo único. No obstante, la filosofía de un fármaco-una diana no siempre es adecuada para desarrollar terapias para una enfermedad compleja y poligénica como es el cáncer, y así lo hemos visto con los inhibidores de la ruta PI3K o los inhibidores de la proteína KRAS. De hecho, incluso si la monoterapia con un objetivo único resulta particularmente eficaz para ciertos tipos de neoplasias con ciertas mutaciones, existen casos con una respuesta pobre al fármaco. Esto es así porque la sensibilidad es específica del contexto del tumor y está influenciada por alteraciones genómicas concomitantes³⁶⁶. Sin embargo, se parte de la hipótesis de que si una mutación es predictiva de una respuesta farmacológica en una neoplasia puede haber alguna probabilidad de que la misma droga pueda ser efectiva en otros tumores con la misma mutación, y de ahí surgen los ensayos para su estudio riguroso.

No obstante, y aumentando la complejidad, hemos de conocer el concepto de heterogeneidad intratumoral. Esto quiere decir que existen poblaciones de células subclonales genéticamente distintas que pueden exhibir ventajas selectivas en el crecimiento celular, potencial metastásico, y resistencia al tratamiento³⁶⁷⁻³⁶⁹. Por ello, una única biopsia puede no ser suficiente para capturar por completo la diversidad genómica de los tumores sólidos más avanzados. Por este motivo, hemos usado como parte del filtrado de las variantes la VAF (> 10%), entendida ésta como la carga clonal o como el porcentaje de células tumorales que albergan una mutación específica, asumiendo una muestra relativamente pura. A pesar de esto, los datos clínicos disponibles sugieren que las mutaciones individuales pueden ser altamente concordantes incluso entre sitios primarios y metastásicos y que las mutaciones identificadas en tumores primarios predicen beneficios para ciertos medicamentos en pacientes con enfermedad metastásica.

Por ejemplo, la concordancia de mutaciones en *KRAS* en CCR primarios y en sus metástasis fue del 96% en dos series publicadas por *Knijn N et al.*³⁷⁰ y *Santini D et al.*³⁷¹. En CPNM, *Kalikaki A et al.*³⁷² describieron una concordancia entre tumor primario y recidiva para mutaciones en *EGFR* y *KRAS* del 74% y 76%, respectivamente.

Además, la presencia de mutaciones somáticas en un tumor puede cambiar con el tiempo por la propia evolución biológica del cáncer, el desarrollo de resistencias o los tratamientos realizados. En nuestro trabajo, analizamos mediante biopsia quirúrgica tumores primarios de ITAC que previamente no habían recibido ningún tratamiento, por lo que en un futuro hemos de realizar estos estudios en pacientes con recidivas de ITAC (locorregionales y a distancia) o tratados con QRT previamente.

Finalmente, hay que considerar que, aun habiendo encontrado una diana terapéutica clave y su fármaco eficaz, invariablemente se acaban produciendo mecanismos de resistencia, con una mitigación de la respuesta al fármaco. Esto es debido a los efectos amortiguadores con los que el sistema biológico es capaz de activar vías de señalización alternativas^{373,374}.

Debido a todo lo mencionado y entendiendo la complejidad de la terapia dirigida, nuestra elección de los 119 genes ya fue realizada en base al criterio de que fueran genes relacionados con la sensibilidad o resistencia a terapias específicas en cáncer. Además, una vez obtenidos los resultados de la secuenciación del panel, el filtrado tuvo como objetivo identificar variantes probablemente patogénicas para aumentar la potencial sensibilidad terapéutica.

En base al objetivo último de identificar terapias para nuestros pacientes con ITAC, definimos aquellas variantes concretas para las que hubiera terapias disponibles con alguna evidencia de beneficio clínico. Hay bases de datos que integran recomendaciones para la práctica clínica como “Precision Oncology Knowledge Base (OncoKB)”. La información de OncoKB está disponible públicamente a través de un sitio web interactivo³⁷⁵ donde se pueden contrastar las alteraciones genómicas de los pacientes con la información contenida en esta base de datos resumiendo sus efectos biológicos e implicaciones clínicas. Los eventos mutacionales individuales están anotados en varios niveles de evidencia que respaldan o no el uso de ciertos medicamentos.

Al momento de escribir, 15 variantes de las confirmadas como somáticas y potencialmente patogénicas del presente estudio estaban asociadas, según OncoKB, con

terapias contra el cáncer en el 41% (11/27) de los ITAC. No obstante, muchas de las asociaciones predictivas son aún emergentes. Decir que el 41% de los casos podría beneficiarse de la secuenciación del tumor/ línea germinal es un dato esperanzador para pacientes con ITAC y de acuerdo con los datos recientes sobre la utilidad analítica y clínica de los paneles genéticos en cáncer. Sin embargo, puede resultar menor que lo encontrado en otras publicaciones que de forma global la sitúan en torno a un 77-90% pero que evalúan muchos tipos de tumores distintos^{155,190,376}, con la variabilidad que esto conlleva ya que existen tumores mucho más prevalentes que los ITAC y con más estudios preclínicos. Además, hay ciertos tipos de tumores, como el cáncer colorrectal y el melanoma estudiados en estos trabajos, que tienen una fracción mucho mayor de cambios accionables que otros, como pueden ser los TNS. Además, es importante concretar cuál ha sido el filtrado para identificar las variantes, dado que un filtrado más permisivo aumenta el número de variantes finalmente identificadas. También es importante saber qué entendemos por accionable pues la mayoría de los cambios procesables se asocian con ensayos clínicos actuales en lugar de terapias establecidas, siendo esta proporción bastante similar a la nuestra.

Resumimos en la Tabla 14 las 15 variantes predictivas de respuesta a fármacos y su grado de evidencia tras la búsqueda de todas las variantes filtradas en OncoKB. De estas, el 25% (4/16) son biomarcadores de atención estándar actualmente (Niveles 1 y 2 de OncoKB) por lo que podrían beneficiarse de ensayos clínicos.

Tabla 14. Se muestran las 15 variantes presentes en 11 ITAC predictivas de respuesta a fármacos según OncoKB.

Gen	Variante	Efecto	Evidencia	Enfermedad	Tratamiento
PIK3CA	Q546R	Ganancia de función	1	Cáncer mama	Fulvestrant + Alpelisib
	H1047R		3a	Cáncer mama	GDC-007
	D939G		3a	Cáncer mama	Copanlisib + Fulvestrant
	K111E E726K				
BRCA1	P1603Rfs*13	Pérdida de función	1	Cáncer ovario	Rucaparib Niraparib
			2	Cáncer ovario	Olaparib
			2	Cáncer mama	Talazoparib Olaparib
IDH1	R132C	Switch	1	LMA	Ivosidenib
			3a	Colangiocarcinoma	Ivosidenib
ERBB2	S310F	Ganancia de función	2	CPNM	Ado-Trastuzumab Emtansine
		Ganancia de función	3a	CPNM Cáncer mama	Neratinib
BRAF	D594N	Ganancia de función	3a	Histiocitosis	Cobimetinib
KRAS	G12D G13D	Ganancia de función	3a	Histiocitosis	Cobimetinib
		Ganancia de función	4	Tumores sólidos	Cobimetinib Trametinib Binimetinib
		Ganancia de función	R1	CCR	Cetuximab Panitumumab
CDKN2A	R58*	Pérdida de función	4	Tumores sólidos	Ribociclib Abemaciclib Palbociclib
NFI	R2237* S2649* T2423Nfs*4	Pérdida de función	4	Tumores sólidos	Trametinib Cobimetinib

Nivel 1 de OncoKB= medicamento aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tipo de tumor que se indica; Nivel 2= biomarcador de atención estándar predictivo de respuesta para el tipo de tumor que se indica, no necesariamente reconocido por la FDA;

Nivel 3A= biomarcador predictivo de respuesta para el tipo de tumor que se indica pero aún no aplicado en atención estándar; Nivel 4= evidencia preclínica de biomarcador como predictor de respuesta a fármacos; R1= biomarcador de atención estándar predictivo de resistencia a un medicamento aprobado por la FDA en el tipo de tumor que se indica.

Leyenda: LMA= Leucemia Mieloide Aguda; CPNM= Carcinoma Pulmonar No Microcítico; CCR= Carcinoma Colorrectal.

En ocasiones, priorizar la terapia cuando existen múltiples alteraciones accionables, como ocurre en alguno de nuestros pacientes, no es tarea sencilla, especialmente cuando ambos medicamentos dirigidos aún se encuentran en las primeras fases del desarrollo clínico. Además, son bases de datos que están en continuo cambio y deben consultarse de forma frecuente para tomar la mejor decisión.

Finalmente, debemos recalcar que interpretar el significado clínico de las variantes que no han sido previamente descritas como accionables es desafiante. No obstante, el ritmo acelerado de los avances en la comprensión de la genómica del cáncer enfatiza aún más la importancia de mostrar todas las variantes que hemos filtrado, como hemos hecho en la Tabla 3 y Tabla 4, ya que pueden convertirse en biomarcadores útiles en un futuro cercano. El enfoque más práctico para manejar las variantes de importancia biológica / clínica probable es presentarlas o agruparlas de acuerdo con la vía principal afectada por la alteración y así lo hemos presentado a lo largo del trabajo con las cuatro rutas de señalización aparentemente claves en ITAC. Esto hace que el panel diseñado pueda y deba ser modificado en un futuro eliminando aquellos genes que no mostraron representación alguna y añadiendo otros que no fueron incluidos y que ahora nos parece que podrían ser importantes si tenemos en cuenta estas cuatro rutas de señalización.

7. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo, aunque aumenta la probabilidad de que el perfil genómico pueda beneficiar a pacientes con ITAC, supone una primera aproximación a potenciales terapias y rutas de señalización celular de interés en el desarrollo y tratamiento de estos tumores. En el futuro, serán necesarios más estudios similares para valorar el papel clínico de las mutaciones en estas rutas dado que reconocemos la limitación del escaso tamaño muestral para establecer conclusiones firmes.

Como hemos comentado, el beneficio potencial de las terapias planteadas resulta incierto. Será necesario llegar a diseñar ensayos clínicos basados en genómica en el estudio de nuevos agentes o combinaciones terapéuticas en pacientes con ITAC con el fin potencial de beneficiar directamente al paciente y acelerar el proceso de desarrollo de fármacos. Reconocemos que cuando se encuentra una opción terapéutica prometedora para un paciente con cáncer dado, a menos que se apruebe para la indicación del caso, la mayoría de las veces es muy difícil y con frecuencia imposible acceder al medicamento, incluso para los aprobados para otras indicaciones. Sin embargo, es de esperar que, del mismo modo que el diseño de los ensayos clínicos está cambiando, como ha ocurrido con los “basket trials”¹⁷⁸, la aprobación de medicamentos comercializados para nuevas indicaciones en cáncer y el acceso a medicamentos aún no autorizados también se adapte a las enormes posibilidades de la oncología transversal.

El potencial de cualquier paciente con cáncer de beneficiarse de la medicina de precisión no es solo especulativo o algo a tener en cuenta para el futuro, sino evidente y para el presente. El enfoque presentado aquí es especialmente adecuado para pacientes con ITAC en estadio avanzado que no han respondido al tratamiento estándar. No obstante, aunque la secuenciación del ADN de estos genes proporciona una gran cantidad de información, sabemos que las alteraciones genómicas son solo uno de los muchos factores biológicos importantes en cáncer. Como consecuencia, se entiende que estos genes no serán suficientes para seleccionar de manera óptima a los pacientes para todas las clases de terapia dirigida. Por este motivo, aquellos ITAC que no mostraron mutaciones accionables (7/27) podrían beneficiarse de estudios basados en el genoma completo, secuenciación de transcriptoma, perfil de metilación del ADN, perfil de microARN o las matrices de fosfoproteína.

8. CONCLUSIONES

En base a los resultados previamente presentados en este trabajo, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Nuestra serie refleja las características clínicas conocidas de los ITAC, como lo demuestra el valor pronóstico independiente de la clasificación T y del subtipo histológico.

2. El estudio en paralelo de la muestra tumoral y la línea germinal ha permitido descartar un 60% de variantes germinales previamente seleccionadas como potencialmente somáticas y patogénicas tras el filtrado bioinformático. Por este motivo, comparar la muestra tumoral con su línea germinal es necesario para la correcta interpretación de los datos de secuenciación.

3. Los genes que codifican para proteínas que participan en las vías de señalización RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT-mTOR, Wnt/ β -catenina y Recombinación Homóloga se encuentran frecuentemente mutados en ITAC y han de ser considerados para futuras terapias y estudios.

4. No se encontraron mutaciones en *EGFR*, pero sí en otros receptores tirosina quinasa como *ERBB2* (4%), *ERBB3* (7%), *ERBB4* (4%), *KIT* (4%), *ROS1* (4%) y *DDR2* (4%), aunque con baja frecuencia.

5. Las mutaciones en la vía RAS-RAF-MEK-ERK (*RAS*, *BRAF*, *NF1* y *MEK1*) se relacionaron de forma significativa con los subtipos histológicos de bajo riesgo. Sin embargo, su mutación también se mostró con un factor de mal pronóstico independiente.

6. Las mutaciones en la vía PI3K-AKT-mTOR (*PIK3CA*, *PIK3R2*, *MTOR*) no fueron relacionadas con el estadio ni subtipo histológico. Tampoco tuvieron influencia en la supervivencia a diferencia de lo evidenciado en otros tumores que la relacionan de forma general con un mal pronóstico y resistencia a terapias.

7. Las mutaciones en la vía Wnt/ β -catenina (*APC*, *CTTNB*) no fueron relacionadas con el subtipo histológico o pronóstico de estos pacientes en discordancia con estudios previos sobre esta vía.

8. Las mutaciones en la vía de la Recombinación Homóloga (*ATM*, *BRCA*), que ocurrieron en un 26% de la muestra, definen un subgrupo de ITAC con mejor pronóstico.

9. El 41% de los pacientes con ITAC podría beneficiarse terapéuticamente de la secuenciación del tumor/ línea germinal mediante este panel según datos actuales de OncoKB.

9. ANEXOS

Anexo 1. Clasificación TNM tumores de cavidad nasal y etmoidal, 8ª edición⁵⁴.

T1	Tumour restricted to one subsite of nasal cavity or ethmoid sinus, with or without bony invasion
T2	Tumour involves two subsites in a single site or extends to involve an adjacent site within the nasoethmoidal complex, with or without bony invasion
T3	Tumour extends to invade the medial wall or floor of the orbit, maxillary sinus, palate, or cribriform plate
T4a	Tumour extends to invade the medial wall or floor of the orbit, maxillary sinus, palate, or cribriform plate
T4b	Tumour invades any of the following: orbital apex, dura, brain, middle cranial fossa, cranial nerves other than V2, nasopharynx, or clivus
N1	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less in greatest dimension without extranodal extension
N2a	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension without extranodal extension
N2b	Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension, without extranodal extension
N2c	Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension, without extranodal extension
N3a	Metastasis in a lymph node more than 6 cm in greatest dimension without extranodal extension
N3b	Metastasis in a single or multiple lymph nodes with clinical extranodal extension
M0	No distant metástasis
M1	Distant metástasis

Stage 0	Tis N0 M0
Stage I	T1 N0 M0
Stage II	T2 N0 M0
Stage III	T3 N0 M0
	T1, T2, T3 N1 M0
Stage IVA	T1, T2, T3 N2 M0
	TN0, N1, N2 M0
Stage IVB	T4b Any N M0
	Any T N3 M0
Stage IVC	Any T Any N M1

Anexo 2. Bases de datos para la identificación y anotación de variantes.

Asunto	Base de datos/ Algoritmo	URL
Polimorfismos línea germinal	dbSNP, dbVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
	1000 Genomes Project	http://browser.1000genomes.org/
	ESP	https://esp.gs.washington.edu/drupal/
	ExAC	http://exac.broadinstitute.org
Variante somáticas en cáncer	COSMIC	http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
	ICGC	https://dcc.icgc.org/
	cBioPortal	http://www.cbioportal.org/
	My Cancer Genome	https://www.mycancergenome.org/
	CIViC	https://civic.genome.wustl.edu/#/home
	Personalized Cancer Therapy, MD Anderson Cancer Center	https://pct.mdanderson.org/#/
Variante con asociación genotipo- fenotipo	ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
	Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
	Leiden Open Variation Database	http://www.lovd.nl/3.0/home
Predicción funcional	dbNSFP	http://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
	Ensembl	http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html
	CCDS	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcdsBrowse.cgi
	RefSeq	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/
	Pfam	http://pfam.xfam.org/

10. BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC. 2017; 60-61:126-27.
- ² Llorente, JL, Pérez-Escuredo, J, Alvarez-Marcos C, Suárez C, Hermesen M. Genetic and clinical aspects of wood dust related intestinal-type sinonasal adenocarcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009; 266(1):1-7.
- ³ Turner JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: A historical analysis of population-based data. *Head Neck.* 2012; 34:877-85.
- ⁴ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, Liétin B, Marandas P, Babin E, De Raucourt D, Reyt E, Cosmidis A, Makeiff M, Dehesdin D; GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope.* 2008; 118(3):437-43.
- ⁵ Kuijpers JH, Louwman MW, Peters R, Janssens GO, Burdorf AL, Coebergh JW. Trends in sinonasal cancer in The Netherlands: more squamous cell cancer, less adenocarcinoma. A population-based study 1973-2009. *Eur J Cancer.* 2012; 48(15):2369-74.
- ⁶ Ansa B, Goodman M, Ward K, Kono SA, Owonikoko TK, Higgins K, Beitler JJ, Grist W, Wadsworth T, El-Deiry M, Chen AY, Khuri FR, Shin DM, Saba NF. Paranasal sinus squamous cell carcinoma incidence and survival based on surveillance, epidemiology, and end results data, 1973 to 2009. *Cancer.* 2013; 119(14):2602-10.
- ⁷ Lund VJ, Stammberger H, Nicolai P, Castelnovo P, Beal T, Beham A, Bernal-Sprekelsen M, Braun H, Cappabianca P, Carrau R, Cavallo L, Clarici G, Draf W, Esposito F, Fernandez-Miranda J, Fokkens W, Gardner P, Gellner V, Hellquist H, Hermann P, Hosemann W, Howard D, Jones N, Jorissen M, Kassam A, Kelly D, Kurschel-Lackner S, Leong S, McLaughlin N, Maroldi R, Minovi A, Mokry M, Onerci M, Ong YK, Prevedello D, Saleh H, Sehti DS, Simmen D, Snyderman C, Solares A, Spittle M, Stamm A, Tomazic P, Trimarchi M, Unger F, Wormald PJ, Zanation A; European Rhinologic Society Advisory Board on Endoscopic Techniques in the Management of Nose, Paranasal Sinus and Skull Base Tumours. European position paper on endoscopic management of tumours of the nose, paranasal sinuses and skull base. *Rhinol Suppl.* 2010; 22:1-143.
- ⁸ Slootweg PJ, Ferlito A, Cardesa A, Thompson LD, Hunt JL, Strojjan P, Takes RP, Triantafyllou A, Woolgar JA, Rinaldo A, Devaney KO, Barnes L. Sinonasal tumors: a clinicopathologic update of selected tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013; 270(1):5-20.
- ⁹ Franchi A, Palomba A, Cardesa A. Current diagnostic strategies for undifferentiated tumours of the nasal cavities and paranasal sinuses. *Histopathology.* 2011; 59(6):1034-45.
- ¹⁰ Rampinelli V, Ferrari M, Nicolai P. Intestinal-type adenocarcinoma of the sinonasal tract: an update. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018; 26(2):115-21.
- ¹¹ Nicolai P, Schreiber A, Bolzoni Villaret A, Lombardi D, Morassi L, Raffetti E, Donato F, Battaglia P, Turri-Zanoni M, Bignami M, Castelnovo P. Intestinal type adenocarcinoma of the ethmoid: outcomes of a treatment regimen based on endoscopic surgery with or without radiotherapy. *Head Neck.* 2016; 38 Suppl 1:996–1003.

-
- ¹² Camp S, Van Gerven L, Poorten VV, Nuyts S, Hermans R, Hauben E, Jorissen M. Long-term follow-up of 123 patients with adenocarcinoma of the sinonasal tract treated with endoscopic resection and postoperative radiation therapy. *Head Neck*. 2016; 38(2):294-300.
- ¹³ Bhayani MK, Yilmaz T, Sweeney A, Calzada G, Roberts DB, Levine NB, DeMonte F, Hanna EY, Kupferman ME. Sinonasal adenocarcinoma: a 16-year experience at a single institution. *Head Neck*. 2014; 36(10):1490-96.
- ¹⁴ McKinney CD, Mills SE, Franquemont DW. Sinonasal intestinal-type adenocarcinoma: immunohistochemical profile and comparison with colonic adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 1995; 8(4):421-26.
- ¹⁵ Mills SE, Fechner RE, Cantrell RW. Aggressive sinonasal lesion resembling normal intestinal mucosa. *Am J Surg Pathol*. 1982; 6(8):803-9.
- ¹⁶ Barnes L. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Pathol*. 1986; 10(3):192-202.
- ¹⁷ Kleinsasser O, Schroeder HG. Adenocarcinomas of the inner nose after exposure to wood dust. Morphological findings and relationships between histopathology and clinical behavior in 79 cases. *Arch Otorhinolaryngol*. 1988; 245(1):1-15.
- ¹⁸ Leivo I. Intestinal-type adenocarcinoma: classification, immunophenotype, molecular features and differential diagnosis. *Head Neck Pathol*. 2017; 11(3):295-300.
- ¹⁹ Kennedy MT, Jordan RCK, Berean KW, Perez-Ordoñez B. Expression pattern of CK7, CK20, CDX-2, and villin in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004; 57(9):932-37.
- ²⁰ Franchi A, Massi D, Palomba A, Biancalani M, Santucci M. CDX-2, cytokeratin 7 and cytokeratin 20 immunohistochemical expression in the differential diagnosis of primary adenocarcinomas of the sinonasal tract. *Virchows Arch*. 2004; 445(1):63-7.
- ²¹ Projetti F, Serrano E, Vergez S, Bissainthe AC, Delisle MB, Uro-Coste E. Is neuroendocrine differentiation useful to discriminate primary sinonasal intestinal-type adenocarcinomas from metastatic colorectal adenocarcinomas? *J Clin Pathol*. 2015; 68(1):79-82.
- ²² Skalova A, Sar A, Laco J, Metelkova A, Miesbauerova M, Steiner P, Švajdler M, Michal M. The Role of SATB2 as a diagnostic marker of sinonasal intestinal-type adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018; 26(2):140-46.
- ²³ Vivanco B, Llorente JL, Perez-Escuredo J, Álvarez Marcos C, Fresno MF, Hermsen MA. Benign lesions in mucosa adjacent to intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Pathology Research International*. 2011; 2011:230147.
- ²⁴ Franchi A, Palomba A, Miligi L, Ranucci V, Innocenti DR, Simoni A, Pepi M, Santucci M. Intestinal metaplasia of the sinonasal mucosa adjacent to intestinal-type adenocarcinoma. A morphologic, immunohistochemical, and molecular study. *Virchows Arch*. 2015; 466(2):161-8.
- ²⁵ Youlden DR, Cramb SM, Peters S, Porceddu SV, Møller H, Fritschi L, Baade PD. International comparisons of the incidence and mortality of sinonasal cancer. *Cancer Epidemiol*. 2013; 37(6):770-9.
- ²⁶ RARECARENet- Information Network on Rare Cancers. <http://www.rarecarenet.es/rarecarenet/>.

- ²⁷ Binazzi A, Corfiati M, Di Marzio D, Cacciatore AM, Zajacová J, Mensi C, Galli P, Miligi L, Calisti R, Romeo E, Franchi A, Marinaccio A. Sinonasal cancer in the Italian national surveillance system: Epidemiology, occupation, and public health implications. *Am J Ind Med.* 2018; 61(3):239-50.
- ²⁸ Kılıç S, Samarrai R, Kılıç SS, Mikhael M, Baredes S, Eloy JA. Incidence and survival of sinonasal adenocarcinoma by site and histologic subtype. *Acta Otolaryngol.* 2018; 138(4):415-21.
- ²⁹ Bonzini M, Battaglia P, Parassoni D, Casa M, Facchinetti N, Turri-Zanoni M, Borchini R, Castelnovo P, Ferrario MM. Prevalence of occupational hazards in patients with different types of epithelial sinonasal cancers. *Rhinology.* 2013; 51(1):31-6.
- ³⁰ Cantu G, Solero CL, Mariani L, Lo Vullo S, Riccio S, Colombo S, Pompilio M, Perrone F, Formillo P, Quattrone P. Intestinal type adenocarcinoma of the ethmoid sinus in wood and leather workers: a retrospective study of 153 cases. *Head Neck.* 2011; 33(4):535-42.
- ³¹ IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2012; 100(Pt C):11-465.
- ³² Binazzi A, Ferrante P, Marinaccio A. Occupational exposure and sinonasal cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2015; 15:49.
- ³³ Andersson M, Selin F, Jarvholm B. Asbestos exposure and the risk of sinonasal cancer. *Occup Med (Lond).* 2016; 66(4):326-31.
- ³⁴ Hayes RB, Raatgever JW, de Bruyn A, Gerin M. Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses, and formaldehyde exposure. *Int J Cancer.* 1986; 37(4):487-92.
- ³⁵ World Health Organization International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Tobacco smoke and involuntary smoking. Vol. 83. Lyon, France: IARC; 2004.
- ³⁶ Pérez Escuredo J, Llorente JL, Melón S, de Oña M, García Martínez J, Alvarez Marcos C, Hermsen M. Viral infection of Herpes simplex, Epstein-Barr, Varicella Zoster, Human Papilloma, Cytomegalovirus, or Adenovirus are not related to sinonasal adenocarcinomas. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2007; 58(7):311-5.
- ³⁷ Pérez-Escuredo J, Martínez JG, Vivanco B, Marcos CÁ, Suárez C, Llorente JL, Hermsen MA. Wood dust-related mutational profile of TP53 in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2012; 43(11):1894-901.
- ³⁸ Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Genetic damage in wood dust-exposed workers. *Mutagenesis.* 2009; 24(1):59-65.
- ³⁹ Smailyte G. Cancer incidence among workers exposed to softwood dust in Lithuania. *Occup Environ Med.* 2012; 69(6):449-51.
- ⁴⁰ Bornholdt J, Saber AT, Sharma AK, Savolainen K, Vogel U, Wallin H. Inflammatory response and genotoxicity of seven wood dusts in the human epithelial cell line A549. *Mutat Res.* 2007; 632(1-2):78-88.
- ⁴¹ Siew SS, Kauppinen T, Kyyrönen P, Heikkilä P, Pukkala E. Occupational exposure to wood dust and formaldehyde and risk of nasal, nasopharyngeal, and lung cancer among Finnish men. *Cancer Manag Res.* 2012; 4:223-32.
- ⁴² Amati M, Tomasetti M, Scartozzi M, Mariotti L, Alleva R, Pignotti E, Borghi B, Valentino M, Governa M, Neuzil J, Santarelli L. Profiling tumor-associated markers for early detection of malignant mesothelioma: an epidemiologic study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(1):163-70.

- ⁴³ Ohnishi S, Ma N, Thanan R, Pinlaor S, Hammam O, Murata M, Kawanishi S. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013:387014.
- ⁴⁴ Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta*. 2006; 365(1-2):30-49.
- ⁴⁵ Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*. 2004; 567(1):1-61.
- ⁴⁶ Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, Seeberg E, Lindahl T, Barnes DE. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(23):13300-5.
- ⁴⁷ Staffolani S, Manzella N, Strafella E, Nocchi L, Bracci M, Ciarapica V, Amati M, Rubini C, Re M, Pugnali A, Pasquini E, Tarchini P, Valentino M, Tomasetti M, Santarelli L. Wood dust exposure induces cell transformation through EGFR-mediated OGG1 inhibition. *Mutagenesis*. 2015; 30(4):487-97.
- ⁴⁸ Hoeben A, van de Winkel L, Hoebens F, Kross K, Driessen C, Slootweg P, Tjan-Heijnen VC, van Herpen C. Intestinal-type sinonasal adenocarcinomas: The road to molecular diagnosis and personalized treatment. *Head Neck*. 2016; 38(10):1564-70.
- ⁴⁹ Mortuaire G, Leroy X, Vandenhende-Szymanski C, Chevalier D, Thisse AS. Comparison of endoscopic and external resections for sinonasal intestinal-type adenocarcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016; 273(12):4343-4350.
- ⁵⁰ Vergez S, du Mayne MD, Coste A, Gallet P, Jankowski R, Dufour X, Righini C, Reyt E, Choussy O, Serrano E, Crampette L, Debry C, de Gabory L. Multicenter study to assess endoscopic resection of 159 sinonasal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21(4):1384-90.
- ⁵¹ Donhuijsen K, Kollecker I, Petersen P, Gaßler N, Schulze J, Schroeder HG. Metastatic behaviour of sinonasal adenocarcinomas of the intestinal type (ITAC). *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016; 273(3):649-54.
- ⁵² Kawaguchi M, Kato H, Tomita H, Mizuta K, Aoki M, Hara A, Matsuo M. Imaging characteristics of malignant sinonasal tumors. *J Clin Med*. 2017; 6(12):116.
- ⁵³ Felix-Ravelo M, Bey A, Arous F, Paris-Grandpierre S, Jankowski R, Nguyen DT. Relationship between ¹⁸F-FDG-PET and different types of sinonasal malignancies. *Acta Otolaryngol*. 2017; 137(2):191-95.
- ⁵⁴ Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours AJCC-UICC. Eighth Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2017. 241 p
- ⁵⁵ Llorente JL, López F, Suárez C, Hermsen MA. Sinonasal carcinoma: Clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 ;11(8):460-72.
- ⁵⁶ Donhuijsen K, Kollecker I, Petersen P, Gaßler N, Wolf J, Schroeder HG. Clinical and morphological aspects of adenocarcinomas of the intestinal type in the inner nose: a retrospective multicenter analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016; 273(10):3207-13
- ⁵⁷ López F, Grau JJ, Medina JA, Alobid I. Consenso español para el tratamiento de los tumores nasosinuales. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2017; 68(4):226-34.
- ⁵⁸ Farber NI, Povolotskiy R, Bavier RD, Riccardi J, Eloy JA, Hsueh WD. Impact of palliative treatment on survival in sinonasal malignancies. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019; 9(12):1499-507.

-
- ⁵⁹ Meccariello G, Deganello A, Choussy O, Gallo O, Vitali D, De Raucourt D, Georgalas C. Endoscopic nasal versus open approach for the management of sinonasal adenocarcinoma: A pooled-analysis of 1826 patients. *Head Neck*. 2016; 38 (Suppl 1):2267-74.
- ⁶⁰ Antognoni P, Turri-Zanoni M, Gottardo S, Molteni M, Volpi L, Facco C, Freguia S, Mordacchini C, AlQahtani A, Bignami M, Capella C, Castelnuovo P. Endoscopic resection followed by adjuvant radiotherapy for sinonasal intestinal-type adenocarcinoma: Retrospective analysis of 30 consecutive patients. *Head Neck*. 2015; 37(5):677-84.
- ⁶¹ Grosjean R, Gallet P, Baumann C, Jankowski R. Transfacial versus endoscopic approach in the treatment of woodworker's nasal adenocarcinomas. *Head Neck*. 2015; 37(3):347-56.
- ⁶² Nicolai P, Battaglia P, Bignami M, Bolzoni Villaret A, Delù G, Khrais T, Lombardi D, Castelnuovo P. Endoscopic surgery for malignant tumors of the sinonasal tract and adjacent skull base: a 10-year experience. *Am J Rhinol*. 2008; 22(3):308-16.
- ⁶³ Castelnuovo P, Battaglia P, Turri-Zanoni M, Tomei G, Locatelli D, Bignami M, Villaret AB, Nicolai P. Endoscopic endonasal surgery for malignancies of the anterior cranial base. *World Neurosurg*. 2014; 82 (Suppl 6):22-31.
- ⁶⁴ Schreiber A, Ferrari M, Mattavelli D, Rampinelli V, Taboni S, Vural A, Bignami M, Castelnuovo P, Nicolai P. Unilateral endoscopic resection with transnasal craniectomy for sinonasal intestinal-type adenocarcinoma: A bi-institutional case-control study on 54 patients. *Oral Oncol*. 2018; 87:89-96.
- ⁶⁵ Battaglia P, Turri-Zanoni M, De Bernardi F, Dehgani Mobaraki P, Karligkiotis A, Leone F, Castelnuovo P. Septal flip flap for anterior skull base reconstruction after endoscopic resection of sinonasal cancers: preliminary outcomes. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2016; 36(3):194-8.
- ⁶⁶ Bozkurt G, Leone F, Arosio AD, Dehgani Mobaraki P, Elhassan HA, Seyhun N, Turri-Zanoni M, Castelnuovo P, Battaglia P. Septal flip flap for anterior skull base reconstruction after endoscopic transnasal craniectomy: long-term outcomes. *World Neurosurg*. 2019; 128:409-16.
- ⁶⁷ Hadad G, Bassagasteguy L, Carrau RL, Mataza JC, Kassam A, Snyderman CH, Mintz A. A novel reconstructive technique after endoscopic expanded endonasal approaches: vascular pedicle nasoseptal flap. *Laryngoscope*. 2006; 116(10):1882-6.
- ⁶⁸ Llorente JL, Lopez F, Camporro D, Fueyo A, Rial JC, de Leon RF, Suarez C. Outcomes following microvascular free tissue transfer in reconstructing skull base defects. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2013; 74(5):324-30.
- ⁶⁹ Santamaría A, Langdon C, López-Chacon M, Cordero A, Enseñat J, Carrau R, Bernal-Sprekelsen M, Alobid I. Radio-anatomical analysis of the pericranial flap "money box approach" for ventral skull base reconstruction. *Laryngoscope*. 2017; 127(11):2482-89.
- ⁷⁰ Ferrari M, Vural A, Schreiber A, Mattavelli D, Gualtieri T, Taboni S, Bertazzoni G, Rampinelli V, Tomasoni M, Buffoli B, Doglietto F, Rodella LF, Deganello A, Nicolai P. Side-door temporoparietal fascia flap: a novel strategy for anterior skull base reconstruction. *World Neurosurg*. 2019; 126:360-70.
- ⁷¹ Macía G, Picón M, Nuñez J, Almeida F, Alvarez I, Acero J. The use of free flaps in skull base reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016; 45(2):158-62.

- ⁷² Reyes C, Solares CA, Fritz MA, Groves M, Bentley H. Fascia lata free flap anastomosed to the superior trochlear system for reconstruction of the anterior skull base. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2017; 78(5):393-98.
- ⁷³ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, Liétin B, Marandas P, Babin E, De Raucourt D, Reyt E, Cosmidis A, Makeieff M, Dehesdin D. Role of radiotherapy in the treatment of nasoethmoidal adenocarcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 136(2):143-6.
- ⁷⁴ Turri-Zanoni M, Battaglia P, Lambertoni A, Giovannardi M, Schreiber A, Volpi L, Bolzoni-Villaret A, Lombardi D, Bignami M, Magnoli F, Facco C, Antognoni P, Nicolai P, Castelnuovo P. Treatment strategies for primary early-stage sinonasal adenocarcinoma: a retrospective bi-institutional case-control study. *J Surg Oncol*. 2015; 112(5):561-7.
- ⁷⁵ Licitra L, Suardi S, Bossi P, Locati LD, Mariani L, Quattrone P, Lo Vullo S, Oggionni M, Olmi P, Cantù G, Pierotti MA, Pilotti S. Prediction of TP53 status for primary cisplatin, fluorouracil, and leucovorin chemotherapy in ethmoid sinus intestinal-type adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22(24):4901-6.
- ⁷⁶ Bossi P, Perrone F, Miceli R, Cantù G, Mariani L, Orlandi E, Fallai C, Locati LD, Cortelazzi B, Quattrone P, Potepan P, Licitra L, Pilotti S. Tp53 status as guide for the management of ethmoid sinus intestinal-type adenocarcinoma. *Oral Oncol*. 2013; 49(5):413-9.
- ⁷⁷ Bossi P, Saba NF, Vermorken JB, Stojan P, Pala L, de Bree R, Rodrigo JP, Lopez F, Hanna EY, Haigentz M, Takes RP, Slootweg PJ, Silver CE, Rinaldo A, Ferlito A. The role of systemic therapy in the management of sinonasal cancer: a critical review. *Cancer Treat Rev*. 2015; 41(10):836-43.
- ⁷⁸ Khoury T, Jang D, Carrau R, Ready N, Barak I, Hachem RA. Role of induction chemotherapy in sinonasal malignancies: a systematic review. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019; 9(2): 212-219.
- ⁷⁹ LoRusso P, Tapazoglou E, Kish JA, Ensley JF, Cummings G, Kelly J, al-Sarraf M. Chemotherapy for paranasal sinus carcinoma. A 10-year experience at Wayne State University. *Cancer*. 1988; 62(1):1-5.
- ⁸⁰ Björk-Eriksson T, Mercke C, Petruson B, Ekholm S. Potential impact on tumor control and organ preservation with cisplatin and 5-fluorouracil for patients with advanced tumors of the paranasal sinuses and nasal fossa. A prospective pilot study. *Cancer*. 1992; 70(11):2615-20.
- ⁸¹ Lee MM, Vokes EE, Rosen A, Witt ME, Weichselbaum RR, Haraf DJ. Multimodality therapy in advanced paranasal sinus carcinoma: superior long-term results. *Cancer J Sci Am*. 1999; 5(4):219-23.
- ⁸² Hanna EY, Cardenas AD, DeMonte F, Roberts D, Kupferman M, Weber R, Rosenthal D, Kies M. Induction chemotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the paranasal sinuses. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011; 137(1):78-81.
- ⁸³ Kuo P, Manes RP, Schwam ZG, Judson BL. Survival outcomes for combined modality therapy for sinonasal undifferentiated carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017; 156(1):132-36.
- ⁸⁴ Hirakawa H, Hanai N, Ozawa T, Suzuki H, Nishikawa D, Matayoshi S, Suzuki M, Hasegawa Y. Prognostic impact of pathological response to neoadjuvant chemotherapy followed by definitive surgery in sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016; 38 (Suppl 1):1305-11.
- ⁸⁵ Patil VM, Joshi A, Noronha V, Sharma V, Zanwar S, Dhupal S, Kane S, Pai P, D'Cruz A, Chaturvedi P, Bhattacharjee A, Prabhash K. Neoadjuvant chemotherapy in L locally advanced and borderline resectable nonsquamous sinonasal tumors (esthesioneuroblastoma and sinonasal tumor with neuroendocrine differentiation). *Int J Surg Oncol*. 2016; 2016:6923730.

- ⁸⁶ Noronha V, Patil VM, Joshi A, Krishna MV, Dhumal S, Juvekar S, Pai P, Chatturvedi P, Chaukar DA, Agarwal JP, Ghosh S, Murthy V, D'cruz A, Prabhash K. Induction chemotherapy in technically unresectable locally advanced carcinoma of maxillary sinus. *Chemother Res Pract.* 2014; 2014:487872.
- ⁸⁷ Choi IJ, Kim DW, Kim DY, Lee CH, Rhee CS. Predictive markers for neoadjuvant chemotherapy in advanced squamous cell carcinoma of maxillary sinus: Preliminary report. *Acta Otolaryngol.* 2013; 133(3):291-6.
- ⁸⁸ Licitra L, Locati LD, Cavina R, Garassino I, Mattavelli F, Pizzi N, Quattrone P, Valagussa P, Gianni L, Bonadonna G, Solero CL, Cantu G. Primary chemotherapy followed by anterior craniofacial resection and radiotherapy for paranasal cancer. *Ann Oncol.* 2003; 14(3):367-72.
- ⁸⁹ Fernström E, Nyman J, Hammerlid E, Holmberg E, Haugen-Cange H, Petruson K, Abel E, Björk-Eriksson T. Results of preoperative chemoradiotherapy for patients with advanced cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Acta Otolaryngol.* 2017; 137(12):1292-300.
- ⁹⁰ Homma A, Oridate N, Suzuki F, Taki S, Asano T, Yoshida D, Onimaru R, Nishioka T, Shirato H, Fukuda S. Superselective high-dose cisplatin infusion with concomitant radiotherapy in patients with advanced cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses: a single institution experience. *Cancer.* 2009; 115(20):4705-14.
- ⁹¹ Amit M, Abdelmeguid AS, Watcherporn T, Takahashi H, Tam S, Bell D, Ferrarotto R, Glisson B, Kupferman ME, Roberts DB, Su SY, Raza SM, DeMonte F, Hanna EY. Induction chemotherapy response as a guide for treatment optimization in sinonasal undifferentiated carcinoma. *J Clin Oncol.* 2019; 37(6):504-12.
- ⁹² Jardeleza C, Seiberling K, Floreani S, Wormald PJ. Surgical outcomes of endoscopic management of adenocarcinoma of the sinonasal cavity. *Rhinology.* 2009; 47(4):354-61.
- ⁹³ Almeyda R, Capper J. Is surgical debridement and topical 5 fluorouracil the optimum treatment for woodworkers' adenocarcinoma of the ethmoid sinuses? A case-controlled study of a 20-year experience. *Clin Otolaryngol.* 2008; 33(5):435-41.
- ⁹⁴ Singh N, Wong E, Huang J, Riffat F. Trans-Frontal Five-Fluorouracil (TraFFF): a novel technique for the application of adjuvant topical chemotherapeutic agents in sinonasal adenocarcinoma. *BMJ Case Rep.* 2018; 2018: bcr2018226234.
- ⁹⁵ Claus J, Jorissen M, Vander Poorten V, Nuyts S, Hermans R, Casteels I, Clement PMJ. Clinically relevant response to cisplatin-5-fluorouracil in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma with loss of vision: a case report. *Case Rep Oncol.* 2019; 12(1):277-81.
- ⁹⁶ Knecht PP, Ah-See KW, vd Velden LA, Kerrebijn J. Adenocarcinoma of the ethmoidal sinus complex: surgical debulking and topical fluorouracil may be the optimal treatment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 127(2):141-6.
- ⁹⁷ Harb W, Fan A, Tran T, Danila DC, Keys D, Schwartz M, Ionescu-Zanetti C. Mutational analysis of circulating tumor cells using a novel microfluidic collection device and qPCR assay. *Transl Oncol.* 2013; 6(5):528-38.
- ⁹⁸ Grasselli J, Elez E, Caratù G, Matito J, Santos C, Macarulla T, Vidal J, Garcia M, Viéitez JM, Paéz D, Falcó E, Lopez Lopez C, Aranda E, Jones F, Sikri V, Nuciforo P, Fasani R, Tabernero J, Montagut C, Azuara D, Dienstmann R, Salazar R, Vivancos A. Concordance of blood- and tumor-based detection of

RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2017; 28(6):1294-301.

⁹⁹ Spindler KG, Boysen AK, Pallisgård N, Johansen JS, Tabernero J, Sørensen MM, Jensen BV, Hansen TF, Sefrioui D, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Cell-Free DNA in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncologist.* 2017; 22(9):1049-1055.

¹⁰⁰ Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(45):16368-73.

¹⁰¹ García-Inclán C, López F, Pérez-Escuredo J, Cuesta-Albalad MP, Vivanco B, Centeno I, Balbín M, Suárez C, Llorente JL, Hermsen MA. EGFR status and KRAS/BRAF mutations in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. *Cell Oncol (Dordr).* 2012; 35(6):443-50.

¹⁰² Franchi A, Innocenti DR, Palomba A, Miligi L, Paiar F, Franzese C, Santucci M. Low prevalence of K-RAS, EGF-R and BRAF mutations in sinonasal adenocarcinomas. Implications for anti-EGFR treatments. *Pathol Oncol Res.* 2014; 20(3):571-9.

¹⁰³ Maffei V, Cappellesso R, Zanon A, Cazzador D, Emanuelli E, Martini A, Fassina A. HER2 status in sinonasal intestinal-type adenocarcinoma. *Pathol Res Pract.* 2019; 215(6):152432.

¹⁰⁴ Cabezas-Camarero S, de la Orden García V, García-Barberán V, Mediero-Valeros B, Subhi-Issa AI, Llovet García P, Bando-Polaino I, Merino Menéndez S, Pérez-Segura P, Díaz-Rubio E. Nasoethmoidal intestinal-type adenocarcinoma treated with Cetuximab: role of liquid biopsy and BEAMing in predicting response to anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Oncologist.* 2019; 24(3):293-300.

¹⁰⁵ Progetti F, Mesturoux L, Coulibaly B, Durand K, Chaunavel A, Léobon S, Gadeaud E, Caire F, Bessède JP, Labrousse F. Study of MET protein levels and MET gene copy number in 72 sinonasal intestinal-type adenocarcinomas. *Head Neck.* 2015; 37(11):1563-8.

¹⁰⁶ Riobello C, Vivanco B, Reda S, López-Hernández A, García-Inclán C, Potes-Ares S, Cabal VN, López F, Llorente JL, Hermsen MA. Programmed death ligand-1 expression as immunotherapeutic target in sinonasal cancer. *Head Neck.* 2018; 40(4):818-27.

¹⁰⁷ Cantu G, Solero CL, Miceli R, Mattana F, Riccio S, Colombo S, Pompilio M, Lombardo G, Formillo P, Quattrone P. Anterior craniofacial resection for malignant paranasal tumors: a monoinstitutional experience of 366 cases. *Head Neck.* 2012; 34(1):78-87.

¹⁰⁸ Llorente JL, Núñez F, Rodrigo JP, Fernández León R, Alvarez C, Hermsen M, Suárez C. Adenocarcinomas nasosinusales: nuestra experiencia. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2008; 59(5):235-8.

¹⁰⁹ Hoeben A, van de Winkel L, Hoebens F, Kross K, Driessen C, Slootweg P, Tjan-Heijnen VC, van Herpen C. Intestinal-type sinonasal adenocarcinomas: The road to molecular diagnosis and personalized treatment. *Head Neck.* 2016; 38(10):1564-70.

¹¹⁰ Chen MM, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. Predictors of survival in sinonasal adenocarcinoma. *J Neurol Surg B Skull Base.* 2015; 76(3):208-13.

¹¹¹ Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the head and neck. Vol 9. Lyon: IARC Press; 2005.

¹¹² Suarez C, Llorente JL, Fernandez De Leon R, Maseda E, Lopez A. Prognostic factors in sinonasal tumors involving the anterior skull base. *Head Neck.* 2004; 26(2):136-44.

- ¹¹³ Fiaux-Camous D, Chevret S, Oker N, Turri-Zanoni M, Lombardi D, Choussy O, Duprez F, Jorissen M, de Gabory L, Malard O, Herman P, Nicolai P, Castelnovo P, Verillaud B. Prognostic value of the seventh AJCC/UICC TNM classification of intestinal-type ethmoid adenocarcinoma: Systematic review and risk prediction model. *Head Neck*. 2017; 39(4):668-678.
- ¹¹⁴ Díaz-Molina JP, Llorente JL, Vivanco B, Martínez-Cambor P, Fresno MF, Pérez-Escuredo J, Álvarez-Marcos C, Hermsen MA. Wnt-pathway activation in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Rhinology*. 2011; 49(5):593-9.
- ¹¹⁵ Vivanco Allende B, Pérez-Escuredo J, Fuentes Martínez N, Fresno Forcelledo MF, Llorente Pendás JL, Hermsen M. Intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. Immunohistochemical profile of 66 cases. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2013; 64(2):115-23.
- ¹¹⁶ Pylkkänen L, Stockmann-Juvala H, Alenius H, Husgafvel-Pursiainen K, Savolainen K. Wood dusts induce the production of reactive oxygen species and caspase-3 activity in human bronchial epithelial cells. *Toxicology*. 2009; 262(3):265-70.
- ¹¹⁷ Holmila R, Cyr D, Luce D, Heikkiila P, Dictor M, Steiniche T, Stjernvall T, Bornholdt J, Wallin H, Wolff H, Husgafvel-Pursiainen K. COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *Int J Cancer*. 2008; 122(9): 2154-9.
- ¹¹⁸ López-Hernández A, Pérez-Escuredo J, Vivanco B, García-Inclán C, Potes-Ares S, Cabal VN, Riobello C, Costales M, López F, Llorente JL, Hermsen MA. Genomic profiling of intestinal-type sinonasal adenocarcinoma reveals subgroups of patients with distinct clinical outcomes. *Head Neck*. 2018; 40(2):259-273.
- ¹¹⁹ Llorente JL, Aldama P, Alvarez-Marcos C, Escudero J, Alonso-Guervós M, Fresno F, Suárez C, Hermsen M. Análisis genético molecular con MLPA en los adenocarcinomas nasosinusales. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2008; 59(4):151-8.
- ¹²⁰ Pérez P, Dominguez O, González S, González S, Triviño A, Suárez C. Ras gene mutations in ethmoid sinus adenocarcinoma: prognostic implications. *Cancer*. 1999; 86(2):255-64.
- ¹²¹ Saber AT, Nielsen LR, Dictor M, Hagmar L, Mikoczy Z, Wallin H. K-ras mutations in sinonasal adenocarcinomas in patients occupationally exposed to wood or leather dust. *Cancer Lett*. 1998; 126(1):59-65.
- ¹²² Perrone F, Oggionni M, Birindelli S, Suardi S, Tabano S, Romano R, Moiraghi ML, Bimbi G, Quattrone P, Cantu G, Pierotti MA, Licitra L, Pilotti S. TP53, p14ARF, p16INK4a and H-ras gene molecular analysis in intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Int J Cancer*. 2003; 105(2):196-203.
- ¹²³ Szablewski V, Solassol J, Poizat F, Larrieux M, Crampette L, Mange A, Bascoul-Molleivi C, Costes V. EGFR Expression and KRAS and BRAF Mutational Status in Intestinal-Type Sinonasal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(3):5170-81.
- ¹²⁴ López F, García Inclán C, Pérez-Escuredo J, Álvarez Marcos C, Scola B, Suárez C, Llorente JL, Hermsen MA. KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer. *Oral Oncol*. 2012; 48(8):692-7.
- ¹²⁵ Ariza M, Llorente JL, Álvarez-Marcos C, Baragaño L, Salas A, Rodríguez Prado N, Hermsen M, Suárez C, Sampedro A. Comparative genomic hybridization in primary sinonasal adenocarcinomas. *Cancer*. 2004; 100(2):335-41.

- ¹²⁶ Korinth D, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Hattenberger S, Bockmühl U, Dietel M, Schroeder HG, Donhuijsen K, Petersen I. Chromosomal imbalances in wood dust-related adenocarcinomas of the inner nose and their associations with pathological parameters. *J Pathol*. 2005; 207(2):207-15.
- ¹²⁷ Hermsen MA, Llorente JL, Pérez-Escuredo J, López F, Ylstra B, Álvarez-Marcos C, Suárez C. Genome-wide analysis of genetic changes in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Head Neck*. 2009; 31(3):290-7.
- ¹²⁸ Pérez-Escuredo J, López-Hernández A, Costales M, López F, Ares SP, Vivanco B, Llorente JL, Hermsen MA. Recurrent DNA copy number alterations in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Rhinology*. 2016; 54(3):278-86.
- ¹²⁹ Pérez-Escuredo J, García Martínez J, García-Inclán C, Vivanco B, Costales M, Álvarez Marcos C, Llorente JL, Hermsen MA. Establishment and genetic characterization of an immortal tumor cell line derived from intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011; 34(1):23-31.
- ¹³⁰ Nakao K, Mehta KR, Fridlyand J, Moore DH, Jain AN, Lafuente A, Wiencke JW, Terdiman JP, Waldman FM. High-resolution analysis of DNA copy number alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Carcinogenesis*. 2004; 25(8):1345-57.
- ¹³¹ The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014; 511(7511):543-50
- ¹³² Wu TT, Barnes L, Bakker A, Swalsky PA, Finkelstein SD. K-ras-2 and p53 genotyping of intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Mod Pathol*. 1996; 9(3):199-204.
- ¹³³ Progetti F, Durand K, Chaunavel A, Léobon S, Lacorre S, Caire F, Bessède JP, Moreau JJ, Coulibaly B, Labrousse F. Epidermal growth factor receptor expression and KRAS and BRAF mutations: study of 39 sinonasal intestinal-type adenocarcinomas. *Hum Pathol*. 2013; 44(10):2116-25.
- ¹³⁴ Nazar G, González MV, García JM, Llorente JL, Rodrigo JP, Suárez C. Amplification of CCND1, EMS1, PIK3CA, and ERBB oncogenes in ethmoid sinus adenocarcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 135(1):135-9.
- ¹³⁵ Pacheco E, Llorente JL, López-Hernández A, García-Inclán C, Costales M, Potes Ares S, López F, Vivanco B, Hermsen MA. Absence of chromosomal translocations and protein expression of ALK in sinonasal adenocarcinomas. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2017; 68(1):9-14.
- ¹³⁶ Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, Dictor M, Antonsen A, Wolff H, Schlünssen V, Holmila R, Luce D, Vogel U, Husgafvel-Pursiainen K, Wallin H. K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer*. 2008; 8:53.
- ¹³⁷ Frattini M, Perrone F, Suardi S, Balestra D, Caramuta S, Colombo F, Licitra L, Cantù G, Pierotti MA, Pilotti S. Phenotype-genotype correlation: challenge of intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Head Neck*. 2006; 28(10):909-15.
- ¹³⁸ Franchi A, Palomba A, Fondi C, Miligi L, Paglierani M, Pepi M, Santucci M. Immunohistochemical investigation of tumorigenic pathways in sinonasal intestinal-type adenocarcinoma. A tissue microarray analysis of 62 cases. *Histopathology*. 2011; 59(1):98-105.
- ¹³⁹ Perez-Ordóñez B, Huynh NN, Berean KW, Jordan RC. Expression of mismatch repair proteins, beta catenin, and E cadherin in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004; 57(10):1080-3.

- ¹⁴⁰ Sjöstedt S, Schmidt AY, Vieira FG, Willemoe GL, Agander TK, Olsen C, Nielsen FC, von Buchwald C. Major driver mutations are shared between sinonasal intestinal-type adenocarcinoma and the morphologically identical colorectal adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020.
- ¹⁴¹ Costales M, López-Hernández A, García-Inclán C, Vivanco B, López F, Llorente JL, Hermsen MA. Gene Methylation Profiling in Sinonasal Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2016; 155(5):808-15.
- ¹⁴² Huang D, Sun W, Zhou Y, Li P, Chen F, Chen H, Xia D, Xu E, Lai M, Wu Y, Zhang H. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2018; 37(1):173-87.
- ¹⁴³ Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, Morgan MB, Fulton L, Fulton RS, Zhang Q, Wendl MC, Lawrence MS, Larson DE, Chen K, Dooling DJ, Sabo A, Hawes AC, Shen H, Jhangiani SN, Lewis LR, Hall O, Zhu Y, Mathew T, Ren Y, Yao J, Scherer SE, Clerc K, Metcalf GA, Ng B, Milosavljevic A, Gonzalez-Garay ML, Osborne JR, Meyer R, Shi X, Tang Y, Koboldt DC, Lin L, Abbott R, Miner TL, Pohl C, Fewell G, Haipek C, Schmidt H, Dunford-Shore BH, Kraja A, Crosby SD, Sawyer CS, Vickery T, Sander S, Robinson J, Winckler W, Baldwin J, Chirieac LR, Dutt A, Fennell T, Hanna M, Johnson BE, Onofrio RC, Thomas RK, Tonon G, Weir BA, Zhao X, Ziaugra L, Zody MC, Giordano T, Orringer MB, Roth JA, Spitz MR, Wistuba II, Ozenberger B, Good PJ, Chang AC, Beer DG, Watson MA, Ladanyi M, Broderick S, Yoshizawa A, Travis WD, Pao W, Province MA, Weinstock GM, Varmus HE, Gabriel SB, Lander ES, Gibbs RA, Meyerson M, Wilson RK. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008; 455(7216):1069-75.
- ¹⁴⁴ López F, Llorente JL, Oviedo CM, Vivanco B, Marcos CÁ, García-Inclán C, Scola B, Hermsen MA. Gene amplification and protein overexpression of EGFR and ERBB2 in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2012; 118(7):1818-26.
- ¹⁴⁵ Campanella C, Mottolese M, Cianciulli A, Torsello A, Merola R, Sperduti I, Melucci E, Conti S, Diodoro MG, Zeuli M, Paoletti G, Cognetti F, Garufi C. Epidermal growth factor receptor gene copy number in 101 advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy plus Cetuximab. *J Transl Med*. 2010; 8:36.
- ¹⁴⁶ Hanski C, Tiecke F, Hummel M, Hanski ML, Ogorek D, Rolfs A, Schmitt-Gräff A, Stein H, Riecken EO. Low frequency of p53 gene mutation and protein expression in mucinous colorectal carcinomas. *Cancer Lett*. 1996; 103(2):163-70.
- ¹⁴⁷ Hanski C. Is mucinous carcinoma of the colorectum a distinct genetic entity? *Br J Cancer*. 1995; 72(6):1350-6.
- ¹⁴⁸ Campo E, de la Calle-Martin O, Miquel R, Palacin A, Romero M, Fabregat V, Vives J, Cardesa A, Yague J. Loss of heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal carcinomas. *Cancer Res*. 1991; 51(16):4436-42.
- ¹⁴⁹ Lanza G Jr, Maestri I, Dubini A, Gafa R, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L. p53 expression in colorectal cancer: relation to tumor type, DNA ploidy pattern and short-term survival. *Am J Clin Pathol*. 1996; 105(5):604-12.
- ¹⁵⁰ Holmila R, Bornholdt J, Heikkilä P, Saitiala T, Févotte J, Cyr D, Hansen J, Snellman SM, Dictor M, Steiniche T, Schlünssen V, Schneider T, Pukkala E, Savolainen K, Wolff H, Wallin H, Luce D, Husgafvel-

Pursiainen K. Mutations in TP53 tumor suppressor gene in wood dust-related sinonasal cancer. *Int J Cancer*. 2010; 127(3):578-88.

¹⁵¹ Holmila R, Bornholdt J, Suijala T, Cyr D, Dictor M, Steiniche T, Wolff H, Wallin H, Luce D, Husgafvel-Pursiainen K. Profile of TP53 gene mutations in sinonasal cancer. *Mutat Res*. 2010; 686(1-2):9-14.

¹⁵² Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15):2114-20.

¹⁵³ Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; (este me mandaste poner punto pero antes ya había puesto otros sugrupos de autores con ;.. No se como quieres ponerlo) 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25(16):2078-9.

¹⁵⁴ Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío JM, López C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011; 475(7354):101-5.

¹⁵⁵ Cabanillas R, Diñeiro M, Castillo D, Pruneda PC, Penas C, Cifuentes GA, de Vicente Á, Durán NS, Álvarez R, Ordóñez GR, Cadiñanos J. A novel molecular diagnostics platform for somatic and germline precision oncology. *Mol Genet Genomic Med*. 2017; 5(4):336-59.

¹⁵⁶ Shin HT, Choi YL, Yun JW, Kim NKD, Kim SY, Jeon HJ, Nam JY, Lee C, Ryu D, Kim SC, Park K, Lee E, Bae JS, Son DS, Joung JG, Lee J, Kim ST, Ahn MJ, Lee SH, Ahn JS, Lee WY, Oh BY, Park YH, Lee JE, Lee KH, Kim HC, Kim KM, Im YH, Park K, Park PJ, Park WY. Prevalence and detection of low-allele-fraction variants in clinical cancer samples. *Nat Commun*. 2017; 8(1):1377.

¹⁵⁷ Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol*. 2010; 6(12):e1001025.

¹⁵⁸ Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; (lo mismo que 152) ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17(5):405-24.

¹⁵⁹ Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009; 4(7):1073-81.

¹⁶⁰ Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012; 7(10):e46688.

-
- ¹⁶¹ Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(17):118.
- ¹⁶² Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014; 11(4):361-2.
- ¹⁶³ Chun S, Fay JC. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res.* 2009; 19(9):1553-61.
- ¹⁶⁴ Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K, Liu X. Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet.* 2015; 24(8):2125-37.
- ¹⁶⁵ Shihab HA, Gough J, Mort M, Cooper DN, Day IN, Gaunt TR. Ranking non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on disease concepts. *Hum Genomics.* 2014; 8(1):11.
- ¹⁶⁶ Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, Guturu H, Stenson PD, Cooper DN, Bernstein JA, Bejerano G. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet.* 2016; 48(12):1581-6.
- ¹⁶⁷ Dienstmann R, Dong F, Borger D, Dias-Santagata D, Ellisen LW, Le LP, Iafrate AJ. Standardized decision support in next generation sequencing reports of somatic cancer variants. *Mol Oncol.* 2014; 8(5):859-73.
- ¹⁶⁸ Den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS Recommendations for the description of sequence variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016; 37(6):564-9.
- ¹⁶⁹ R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2018.
- ¹⁷⁰ Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, Müller M. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics.* 2011; 12:77.
- ¹⁷¹ Lopez-Raton M, Rodriguez-Alvarez MX, Cadarso Suarez C, Gude Sampedro F. OptimalCutpoints: an R Package for selecting optimal cutpoints in diagnostic tests. *Journal of Statistical Software.* 2014; 61(8): 1-36
- ¹⁷² Therneau T, Grambsch PM. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. New York: Springer; 2000.
- ¹⁷³ Kronz JD, Westra WH. The role of second opinion pathology in the management of lesions of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 13(2):81-4.
- ¹⁷⁴ Mehrad M, Chernock RD, El-Mofty SK, Lewis JS Jr. Diagnostic Discrepancies in Mandatory Slide Review of Extradepartmental Head and Neck Cases: Experience at a Large Academic Center. *Arch Pathol Lab Med.* 2015; 139(12):1539-45.
- ¹⁷⁵ Schwaederle M, Zhao M, Lee JJ, Lazar V, Leyland-Jones B, Schilsky RL, Mendelsohn J, Kurzrock R. Association of biomarker-based treatment strategies with response rates and progression-free survival in refractory malignant neoplasms: a meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2016; 2(11):1452-9.
- ¹⁷⁶ Stegmeier F, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M. Targeted cancer therapies in the twenty-first century: lessons from imatinib. *Clin Pharmacol Ther.* 2010; 87(5):543-52.

- ¹⁷⁷ Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM, Hodis E, Jacobus S, Supko JG, Stewart M, Choueiri TK, Gandhi L, Cleary JM, Elfiky AA, Taplin ME, Stack EC, Signoretti S, Loda M, Shapiro GI, Sabatini DM, Lander ES, Gabriel SB, Kantoff PW, Garraway LA, Rosenberg JE. Activating mTOR mutations in a patient with an extraordinary response on a phase I trial of everolimus and pazopanib. *Cancer Discov.* 2014; 4(5):546-53.
- ¹⁷⁸ Redig AJ, Jänne PA. Basket trials and the evolution of clinical trial design in an era of genomic medicine. *J Clin Oncol.* 2015; 33(9):975-7.
- ¹⁷⁹ Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay JY, Wolf J, Raje NS, Diamond EL, Hollebecque A, Gervais R, Elez-Fernandez ME, Italiano A, Hofheinz RD, Hidalgo M, Chan E, Schuler M, Lasserre SF, Makrutzki M, Sirzen F, Veronese ML, Tabernero J, Baselga J. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med.* 2015; 373(8):726-36.
- ¹⁸⁰ Bower H, Björkholm M, Dickman PW, Höglund M, Lambert PC, Andersson TM. Life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia approaches the life expectancy of the general population. *J Clin Oncol.* 2016; 34(24):2851-7.
- ¹⁸¹ Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001; 344(11):783-92.
- ¹⁸² Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Heeson S, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Cortés J;(lo mismo) CLEOPATRA Study Group. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2015; 372(8):724-34.
- ¹⁸³ Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(10):1626-34.
- ¹⁸⁴ Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA;(lo mismo) IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006; 355(23):2408-17.
- ¹⁸⁵ Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008; 321(5897):1807-12.
- ¹⁸⁶ Fumagalli D, Gavin PG, Taniyama Y, Kim SI, Choi HJ, Paik S, Pogue-Geile KL. A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes. *BMC Cancer.* 2010; 10:101.

- ¹⁸⁷ Lin MT, Mosier SL, Thiess M, Beierl KF, Debeljak M, Tseng LH, Chen G, Yegnasubramanian S, Ho H, Cope L, Wheelan SJ, Gocke CD, Eshleman JR. Clinical validation of KRAS, BRAF, and EGFR mutation detection using next-generation sequencing. *Am J Clin Pathol*. 2014; 141(6):856-66.
- ¹⁸⁸ Wong NA, Gonzalez D, Salto-Tellez M, Butler R, Diaz-Cano SJ, Ilyas M, Newman W, Shaw E, Tanriere P, Walsh SV;(lo mismo) Association of clinical Pathologists Molecular Pathology and Diagnostics Group. RAS testing of colorectal carcinoma- a guidance document from the association of clinical pathologists molecular pathology and diagnostics group. *J Clin Pathol*. 2014; 67(9):751-7.
- ¹⁸⁹ Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, Nikiforova MN. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017; 19(1):4-23.
- ¹⁹⁰ Jones S, Anagnostou V, Lytle K, Parpart-Li S, Nesselbush M, Riley DR, Shukla M, Chesnick B, Kadan M, Papp E, Galens KG, Murphy D, Zhang T, Kann L, Sausen M, Angiuoli SV, Diaz LA Jr, Velculescu VE. Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. *Sci Transl Med*. 2015; 7(283):283ra53.
- ¹⁹¹ Nelson MR, Wegmann D, Ehm MG, Kessner D, St Jean P, Verzilli C, Shen J, Tang Z, Bacanu SA, Fraser D, Warren L, Aponte J, Zawistowski M, Liu X, Zhang H, Zhang Y, Li J, Li Y, Li L, Woollard P, Topp S, Hall MD, Nangle K, Wang J, Abecasis G, Cardon LR, Zöllner S, Whittaker JC, Chissoe SL, Novembre J, Mooser V. An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. *Science*. 2012; 337(6090):100-4.
- ¹⁹² Miosge LA, Field MA, Sontani Y, Cho V, Johnson S, Palkova A, Balakishnan B, Liang R, Zhang Y, Lyon S, Beutler B, Whittle B, Bertram EM, Enders A, Goodnow CC, Andrews TD. Comparison of predicted and actual consequences of missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(37):5189-98.
- ¹⁹³ Flanagan SE, Patch AM, Ellard S. Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010; 14(4):533-7.
- ¹⁹⁴ Gnad F, Baucom A, Mukhyala K, Manning G, Zhang Z. Assessment of computational methods for predicting the effects of missense mutations in human cancers. *BMC Genomics*. 2013; 14 (Suppl 3):S7.
- ¹⁹⁵ Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, Wang K, Downing SR, He J, Schnall-Levin M, White J, Sanford EM, An P, Sun J, Juhn F, Brennan K, Iwanik K, Maillet A, Buell J, White E, Zhao M, Balasubramanian S, Terzic S, Richards T, Banning V, Garcia L, Mahoney K, Zwirko Z, Donahue A, Beltran H, Mosquera JM, Rubin MA, Dogan S, Hedvat CV, Berger MF, Pusztai L, Lechner M, Boshoff C, Jarosz M, Vietz C, Parker A, Miller VA, Ross JS, Curran J, Cronin MT, Stephens PJ, Lipson D, Yelensky R. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2013; 31(11):1023-31.
- ¹⁹⁶ Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, Chandramohan R, Liu ZY, Won HH, Scott SN, Brannon AR, O'Reilly C, Sadowska J, Casanova J, Yannes A, Hechtman JF, Yao J, Song W, Ross DS, Oultache A, Dogan S, Borsu L, Hameed M, Nafa K, Arcila ME, Ladanyi M, Berger MF. 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. *J Mol Diagn.* 2015; 17(3):251-64.

¹⁹⁷ Fisher KE, Zhang L, Wang J, Smith GH, Newman S, Schneider TM, Pillai RN, Kudchadkar RR, Owonikoko TK, Ramalingam SS, Lawson DH, Delman KA, El-Rayes BF, Wilson MM, Sullivan HC, Morrison AS, Balci S, Adsay NV, Gal AA, Sica GL, Saxe DF, Mann KP, Hill CE, Khuri FR, Rossi MR. Clinical validation and implementation of a targeted Next-Generation Sequencing assay to detect somatic variants in non-small cell lung, melanoma, and gastrointestinal malignancies. *J Mol Diagn.* 2016; 18(2):299-315.

¹⁹⁸ Pritchard CC, Salipante SJ, Koehler K, Smith C, Scroggins S, Wood B, Wu D, Lee MK, Dintzis S, Adey A, Liu Y, Eaton KD, Martins R, Stricker K, Margolin KA, Hoffman N, Churpek JE, Tait JF, King MC, Walsh T. Validation and implementation of targeted capture and sequencing for the detection of actionable mutation, copy number variation, and gene rearrangement in clinical cancer specimens. *J Mol Diagn.* 2014; 16(1):56-67.

¹⁹⁹ Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, van Spaendonck-Zwarts KY, van Tintelen JP, Sijmons RH, Jongbloed JD, Sinke RJ. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat.* 2013; 34(7):1035-42.

²⁰⁰ Rosenberg L, Yoon CH, Sharma G, Bertagnolli MM, Cho NL. Sorafenib inhibits proliferation and invasion in desmoid-derived cells by targeting Ras/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathways. *Carcinogenesis.* 2018; 39(5):681-8.

²⁰¹ Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011; 4:51.

²⁰² Costa RLB, Han HS, Gradishar WJ. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat.* 2018; 169(3):397-406.

²⁰³ Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ, Mao L. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25(16):2164-70.

²⁰⁴ Wang DS, Lai HC, Huang JM. Epidermal growth factor receptor mutations in Chinese patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2014; 134(6):631-5

²⁰⁵ Metzger B, Chambeau L, Begon DY, Faber C, Kayser J, Berchem G, Pauly M, Boniver J, Delvenne P, Dicato M, Wenner T. The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in its tyrosine kinase domain. *BMC Med Genet.* 2011; 12:144.

²⁰⁶ John T, Liu G, Tsao MS. Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene.* 2009; 28 (Suppl 1):S14-23.

²⁰⁷ Liang Z, Zhang J, Zeng X, Gao J, Wu S, Liu T. Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas. *BMC Cancer.* 2010; 10:376.

²⁰⁸ Franchi A, Fondi C, Paglierani M, Pepi M, Gallo O, Santucci M. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in sinonasal intestinal type adenocarcinoma. *Oral Oncol.* 2009; 45(9):835-8.

- ²⁰⁹ Chernock RD, Perry A, Pfeifer JD, Holden JA, Lewis JS Jr. Receptor tyrosine kinases in sinonasal undifferentiated carcinomas evaluation for EGFR, c-KIT, and HER2/neu expression. *Head Neck*. 2009; 31(7):919-27.
- ²¹⁰ Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, De Vita F, Castellano P, Orditura M, Imperatore V, La Mura A, La Manna G, Pinto M, Catalano G, Pignatelli C, Ciardiello F. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann Surg Oncol*. 2006; 13(6):823-35.
- ²¹¹ Gaber R, Watermann I, Kugler C, Reinmuth N, Huber RM, Schnabel PA, Vollmer E, Reck M, Goldmann T. Correlation of EGFR expression, gene copy number and clinicopathological status in NSCLC. *Diagn Pathol*. 2014; 9:165.
- ²¹² Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2002; 62(24):7350-6.
- ²¹³ Ljuslinder I, Melin B, Henriksson ML, Öberg Å, Palmqvist R. Increased epidermal growth factor receptor expression at the invasive margin is a negative prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2011; 128(9):2031-7.
- ²¹⁴ Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Bosch FX, Lichter P, Hofele C. Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63(6):1179-82.
- ²¹⁵ Morrison LE, Jacobson KK, Friedman M, Schroeder JW, Coon JS. Aberrant EGFR and chromosome 7 associate with outcome in laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 2005; 115(7):1212-8.
- ²¹⁶ Dahabreh IJ, Linardou H, Kosmidis P, Bafaloukos D, Murray S. EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2011; 22(3):545-52.
- ²¹⁷ Crombet Ramos T, Mestre Fernández B, Mazorra Herrera Z, Iznaga Escobar NE. Nimotuzumab for patients with inoperable cancer of the head and neck. *Front Oncol*. 2020; 10:817.
- ²¹⁸ Roskoski R. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*. 2015; 100:1-23.
- ²¹⁹ Gentile C, Martorana A, Lauria A, Bonsignore R. Kinase inhibitors in multitargeted cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2017; 24(16):1671-86.
- ²²⁰ Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib. *N Engl J Med*. 2004; 350(21):2129-39.
- ²²¹ Taron M, Ichinose Y, Rosell R, Mok T, Massuti B, Zamora L, Mate JL, Manegold C, Ono M, Queralt C, Jahan T, Sanchez JJ, Sanchez-Ronco M, Hsue V, Jablons D, Sanchez JM, Moran T. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(16):5878-85.
- ²²² Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2009; 28 (Suppl 1):S32-7.

-
- ²²³ McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773(8):1263-84.
- ²²⁴ Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature*. 1964; 204:1104-5.
- ²²⁵ McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773(8):1263-84.
- ²²⁶ Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol*. 2000; 10(4):147-54.
- ²²⁷ McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 2007; 26(22):3113-21.
- ²²⁸ Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001; 294(5545):1299-304.
- ²²⁹ Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*. 1990; 62(3):599-608.
- ²³⁰ Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012; 16(1):103-19.
- ²³¹ Roskoski R. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 399(3):313-7.
- ²³² De Carvalho TG, De Carvalho AC, Maia DC, Ogawa JK, Carvalho AL, Vettore AL. Search for mutations in signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2013; 30(1):334-40.
- ²³³ Weidhaas JB, Harris J, Schae D, Chen AM, Chin R, Axelrod R, El-Naggar AK, Singh AK, Galloway TJ, Raben D, Wang D, Matthiesen C, Avizonis VN, Manon RR, Yumen O, Nguyen-Tan PF, Trotti A, Skinner H, Zhang Q, Ferris RL, Sidransky D, Chung CH. The KRAS-variant and Cetuximab response in head and neck squamous cell cancer: A secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. 2017; 3(4):483-91.
- ²³⁴ Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, John W, Paz-Ares L, Schmid-Bindert G. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*. 2018; 124:53-64.
- ²³⁵ Custodio A, Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013; 85(1):45-81.
- ²³⁶ Kadota K, Sima CS, Arcila ME, Hedvat C, Kris MG, Jones DR, Adusumilli PS, Travis WD. KRAS mutation is a significant prognostic factor in early-stage lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40(12):1579-90.
- ²³⁷ Watson R, Liu TC, Ruzinova MB. High frequency of KRAS mutation in early onset colorectal adenocarcinoma: implications for pathogenesis. *Hum Pathol*. 2016; 56:163-70.

- ²³⁸ Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417(6892):949-54.
- ²³⁹ Kamata T, Hussain J, Giblett S, Hayward R, Marais R, Pritchard C. BRAF inactivation drives aneuploidy by deregulating CRAF. *Cancer Res*. 2010; 70(21):8475-86.
- ²⁴⁰ Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004; 116(6):855-67.
- ²⁴¹ Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, Hussain J, Reis-Filho JS, Springer CJ, Pritchard C, Marais R. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell*. 2010; 140(2):209-21.
- ²⁴² Kiuru M, Busam KJ. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Lab Invest*. 2017; 97(2):146-57.
- ²⁴³ Krauthammer M, Kong Y, Bacchicocchi A, Evans P, Pornputtapong N, Wu C, McCusker JP, Ma S, Cheng E, Straub R, Serin M, Bosenberg M, Ariyan S, Narayan D, Sznol M, Kluger HM, Mane S, Schlessinger J, Lifton RP, Halaban R. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet*. 2015; 47(9):996-1002.
- ²⁴⁴ Mar VJ, Wong SQ, Li J, Scolyer RA, McLean C, Papenfuss AT, Tothill RW, Kakavand H, Mann GJ, Thompson JF, Behren A, Cebon JS, Wolfe R, Kelly JW, Dobrovic A, McArthur GA. BRAF/NRAS wild-type melanomas have a high mutation load correlating with histologic and molecular signatures of UV damage. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(17):4589-98.
- ²⁴⁵ Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(5):349-61.
- ²⁴⁶ Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to Panitumumab or Cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26(35):5705-12.
- ²⁴⁷ Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, Fontanini G, Basolo F, Falcone A, Graziano F. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to Cetuximab plus Irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009; 101(4):715-21.
- ²⁴⁸ Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lievre A, Landi B, Boige V, Ducreux M, Ychou M, Bibeau F, Bouché O, Reid J, Stone S, Penault-Llorca F. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from Cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27(35):5924-30.

- ²⁴⁹ Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13(11):828-51.
- ²⁵⁰ Liu P, Wang Y, Li X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2019; 9(5):871-9.
- ²⁵¹ Jänne PA, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, Barrios C, Franke FA, Grinsted L, Zazulina V, Smith P, Smith I, Crinò L. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013; 14(1):38-47.
- ²⁵² Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018; 8(4):552-62.
- ²⁵³ Vallejo A, Perurena N, Guruceaga E, Mazur PK, Martinez-Canarias S, Zandueta C, Valencia K, Arricibita A, Gwinn D, Sayles LC, Chuang CH, Guembe L, Bailey P, Chang DK, Biankin A, Ponz-Sarvisé M, Andersen JB, Khatri P, Bozec A, Sweet-Cordero EA, Sage J, Lecanda F, Vicent S. An integrative approach unveils FOSL1 as an oncogene vulnerability in KRAS-driven lung and pancreatic cancer. *Nat Commun*. 2017; 8:14294.
- ²⁵⁴ Polivka J Jr, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther*. 2014; 142(2):164-75.
- ²⁵⁵ Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Curr Opin Cell Biol*. 2017; 45:62-71.
- ²⁵⁶ Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell*. 2017; 170(4):605-35.
- ²⁵⁷ Huang J, Guo X, Li W, Zhang H. Activation of Wnt/ β -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes. *Sci Rep*. 2017; 7:40716.
- ²⁵⁸ Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol*. 2015; 25(9):545-55.
- ²⁵⁹ Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*. 2008; 118(9):3065-74.
- ²⁶⁰ Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*. 2017; 169(2):361-71.
- ²⁶¹ Aslam A, Coulson IH. Cowden syndrome (multiple hamartoma syndrome). *Clin Exp Dermatol*. 2013; 38(8):957-9.
- ²⁶² Kohrman MH. Emerging treatments in the management of tuberous sclerosis complex. *Pediatr Neurol*. 2012; 46(5):267-75.
- ²⁶³ Kuwada SK, Burt R. A rationale for mTOR inhibitors as chemoprevention agents in Peutz-Jeghers syndrome. *Fam Cancer*. 2011; 10(3):469-72.
- ²⁶⁴ Chen, J. The Src/PI3K/Akt signal pathway may play a key role in decreased drug efficacy in obesity-associated cancer. *J. Cell. Biochem*. 2010; 110(2): 279-80.
- ²⁶⁵ Chen J, Huang XF, Qiao L, Katsifis A. Insulin caused drug resistance to Oxaliplatin in colon cancer cell line HT29. *J Gastrointest Oncol*. 2011; 2(1):27-33.

- ²⁶⁶ LoRusso PM. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in solid tumors. *J Clin Oncol*. 2016; 34(31):3803-15.
- ²⁶⁷ Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(5):329-41.
- ²⁶⁸ Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004; 304(5670):554.
- ²⁶⁹ Muñoz-Cordero MG, López F, García-Inclán C, López-Hernández A, Potes-Ares S, Fernández-Vañes L, Llorente JL, Hermsen M. Predictive value of EGFR-PI3K-pAKT-mTOR-pS6 pathway in sinonasal squamous cell carcinomas. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2019; 70(1):16-24.
- ²⁷⁰ Brown NA, Plouffe KR, Yilmaz O, Weindorf SC, Betz BL, Carey TE, Seethala RR, McHugh JB, Tomlins SA, Udager AM. TP53 mutations and CDKN2A mutations/deletions are highly recurrent molecular alterations in the malignant progression of sinonasal papillomas. *Mod Pathol*. 2020.
- ²⁷¹ Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014; 505(7484):495-501.
- ²⁷² Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, Lu Y, Zhang Q, Du Y, Gilbert BR, Freilino M, Sauerwein S, Peyser ND, Xiao D, Diergaarde B, Wang L, Chiosea S, Seethala R, Johnson JT, Kim S, Duvvuri U, Ferris RL, Romkes M, Nukui T, Kwok-Shing Ng P, Garraway LA, Hammerman PS, Mills GB, Grandis JR. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*. 2013; 3(7):761-9.
- ²⁷³ Wang LE, Ma H, Hale KS, Yin M, Meyer LA, Liu H, Li J, Lu KH, Hennessy BT, Li X, Spitz MR, Wei Q, Mills GB. Roles of genetic variants in the PI3K and RAS/RAF pathways in susceptibility to endometrial cancer and clinical outcomes. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012; 138(3):377-85.
- ²⁷⁴ Narayanankutty A. PI3K/ Akt/ mTOR pathway as a therapeutic target for colorectal cancer: a review of preclinical and clinical evidence. *Curr Drug Targets*. 2019; 20(12):1217-26.
- ²⁷⁵ Bitting RL, Armstrong AJ. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2013; 20(3):R83-99.
- ²⁷⁶ Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008; 321(5897):1807-12.
- ²⁷⁷ Zhang J, Roberts TM, Shivdasani RA. Targeting PI3K signaling as a therapeutic approach for colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2011;141(1):50-61.
- ²⁷⁸ Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, Linn SC, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Hauptmann M, Beijersbergen RL, Mills GB, van de Vijver MJ, Bernards R. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of Trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007; 12(4):395-402.

- ²⁷⁹ Wee S, Jagani Z, Xiang KX, Loo A, Dorsch M, Yao YM, Sellers WR, Lengauer C, Stegmeier F. PI3K pathway activation mediates resistance to MEK inhibitors in KRAS mutant cancers. *Cancer Res.* 2009; 69(10):4286-93.
- ²⁸⁰ Avan A, Narayan R, Giovannetti E, Peters GJ. Role of Akt signaling in resistance to DNA-targeted therapy. *World J Clin Oncol.* 2016; 7(5):352-69.
- ²⁸¹ West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat.* 2002; 5(6):234-48.
- ²⁸² Tewari D, Patni P, Bishayee A, Sah AN, Bishayee A. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: a novel therapeutic strategy. *Semin Cancer Biol.* 2019; S1044-579X(19)30405-5.
- ²⁸³ Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside. *Semin Cancer Biol.* 2019; 59:125-32.
- ²⁸⁴ Juric D, Castel P, Griffith M, Griffith OL, Won HH, Ellis H, Ebbesen SH, Ainscough BJ, Ramu A, Iyer G, Shah RH, Huynh T, Mino-Kenudson M, Sgroi D, Isakoff S, Thabet A, Elamine L, Solit DB, Lowe SW, Quadt C, Peters M, Derti A, Schegel R, Huang A, Mardis ER, Berger MF, Baselga J, Scaltriti M. Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI3K α inhibitor. *Nature.* 2015; 518(7538):240-4.
- ²⁸⁵ Janku F, Wheler JJ, Naing A, Falchook GS, Hong DS, Stepanek VM, Fu S, Piha-Paul SA, Lee JJ, Luthra R, Tsimberidou AM, Kurzrock R. PIK3CA mutation H1047R is associated with response to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors in early-phase clinical trials. *Cancer Res.* 2013; 73(1):276-84.
- ²⁸⁶ Soulières D, Faivre S, Mesía R, Remenár É, Li SH, Karpenko A, Dechaphunkul A, Ochsenreither S, Kiss LA, Lin JC, Nagarkar R, Tamás L, Kim SB, Erfán J, Alyasova A, Kasper S, Barone C, Turri S, Chakravarty A, Chol M, Aimone P, Hirawat S, Licitra L. Buparlisib and Paclitaxel in patients with platinum-pretreated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (BERIL-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18(3):323-35.
- ²⁸⁷ Jeong WJ, Ro EJ, Choi KY. Interaction between Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of β -catenin and RAS by targeting the Wnt/ β -catenin pathway. *NPJ Precis Oncol.* 2018; 2(1):5.
- ²⁸⁸ Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass JR, Jeffreys AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature.* 1987; 328(6131):616-9.
- ²⁸⁹ Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet.* 1992; 1(4):229-33.
- ²⁹⁰ Kim JC, Koo KH, Roh SA, Cho YK, Kim HC, Yu CS, Kim HJ, Kim JS, Cho MK. Genetic and epigenetic changes in the APC gene in sporadic colorectal carcinoma with synchronous adenoma. *Int J Colorectal Dis.* 2003; 18(3):203-9.
- ²⁹¹ Yom SS, Rashid A, Rosenthal DI, Elliott DD, Hanna EY, Weber RS, El-Naggar AK. Genetic analysis of sinonasal adenocarcinoma phenotypes: distinct alterations of histogenetic significance. *Mod Pathol.* 2005;18(3):315-9.

- ²⁹² Bérout C, Collod-Bérout G, Boileau C, Soussi T, Junien C. UMD (Universal mutation database): a generic software to build and analyze locus-specific databases. *Hum Mutat.* 2000; 15(1):86-94.
- ²⁹³ Sunaga N, Kohno T, Kolligs FT, Fearon ER, Saito R, Yokota J. Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (beta-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001; 30(3):316-21.
- ²⁹⁴ Busch EL, Hornick JL, Umeton R, Albayrak A, Lindeman NI, MacConaill LE, Garcia EP, Ducar M, Rebbeck TR. Somatic mutations in CDH1 and CTNNB1 in primary carcinomas at 13 anatomic sites. *Oncotarget.* 2017; 8(49):85680-91.
- ²⁹⁵ Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, Hechtman JF, Cercek A, Sanchez-Vega F, Jayakumaran G, Middha S, Zehir A, Donoghue MTA, You D, Viale A, Kemeny N, Segal NH, Stadler ZK, Varghese AM, Kundra R, Gao J, Syed A, Hyman DM, Vakiani E, Rosen N, Taylor BS, Ladanyi M, Berger MF, Solit DB, Shia J, Saltz L, Schultz N. Clinical sequencing defines the genomic landscape of metastatic colorectal cancer. *Cancer Cell.* 2018; 33(1):125-36.
- ²⁹⁶ Lee HS, Park MH, Yang SJ, Park KC, Kim NS, Kim YS, Kim DI, Yoo HS, Choi EJ, Yeom YI. Novel candidate targets of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Life Sci.* 2007; 80(7):690-8.
- ²⁹⁷ Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1653(1):1-24.
- ²⁹⁸ Akiri G, Cherian MM, Vijayakumar S, Liu G, Bafico A, Aaronson SA. Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma. *Oncogene.* 2009; 28(21):2163-72.
- ²⁹⁹ Emons G, Spitzner M, Reineke S, Möller J, Auslander N, Kramer F, Hu Y, Beissbarth T, Wolff HA, Rave-Fränk M, Heßmann E, Gaedcke J, Ghadimi BM, Johnsen SA, Ried T, Grade M. Chemoradiotherapy resistance in colorectal cancer cells is mediated by Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cancer Res.* 2017; 15(11):1481-90.
- ³⁰⁰ Yang J, Chen J, He J, Li J, Shi J, Cho WC, Liu X. Wnt signaling as potential therapeutic target in lung cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2016; 20(8):999-1015.
- ³⁰¹ Harb J, Lin PJ, Hao J. Recent development of Wnt signaling pathway inhibitors for cancer therapeutics. *Curr Oncol Rep.* 2019; 21(2):12.
- ³⁰² Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2018; 62:50-60.
- ³⁰³ Arqués O, Chicote I, Puig I, Tenbaum SP, Argilés G, Dienstmann R, Fernández N, Caratù G, Matito J, Silberschmidt D, Rodon J, Landolfi S, Prat A, Espín E, Charco R, Nuciforo P, Vivancos A, Shao W, Tabernero J, Palmer HG. Tankyrase inhibition blocks Wnt/ β -catenin pathway and reverts resistance to PI3K and AKT inhibitors in the treatment of colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(3):644-56.
- ³⁰⁴ White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology.* 2012; 142 (2): 219-32.
- ³⁰⁵ Pearl LH, Schierz AC, Ward SE, Al-Lazikani B, Pearl FMG. Therapeutic opportunities within the DNA damage response. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(3):166-80.

-
- ³⁰⁶ Martínez JG, Pérez-Escuredo J, López F, Suárez C, Alvarez-Marcos C, Llorente JL, Hermsen MA. Microsatellite instability analysis of sinonasal carcinomas. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2009; 140(1):55-60.
- ³⁰⁷ Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010; 79:181-211.
- ³⁰⁸ Hoeijmakers JH. Genome Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001; 411(6835):366-74.
- ³⁰⁹ Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011; 474: 609–15.
- ³¹⁰ Zhu Y, Wu J, Zhang C, Sun S, Zhang J, Liu W, Huang J, Zhang Z. BRCA mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2016; 7(43):70113-27.
- ³¹¹ Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(1):265-71.
- ³¹² Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998; 62(3):676-89.
- ³¹³ Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007; 25(11):1329-33.
- ³¹⁴ Awasthi P, Foiani M, Kumar A. ATM and ATR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2015; 128(23):4255-62.
- ³¹⁵ Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, Morgan MB, Fulton L, Fulton RS, Zhang Q, Wendl MC, Lawrence MS, Larson DE, Chen K, Dooling DJ, Sabo A, Hawes AC, Shen H, Jhangiani SN, Lewis LR, Hall O, Zhu Y, Mathew T, Ren Y, Yao J, Scherer SE, Clerc K, Metcalf GA, Ng B, Milosavljevic A, Gonzalez-Garay ML, Osborne JR, Meyer R, Shi X, Tang Y, Koboldt DC, Lin L, Abbott R, Miner TL, Pohl C, Fewell G, Haipek C, Schmidt H, Dunford-Shore BH, Kraja A, Crosby SD, Sawyer CS, Vickery T, Sander S, Robinson J, Winckler W, Baldwin J, Chirieac LR, Dutt A, Fennell T, Hanna M, Johnson BE, Onofrio RC, Thomas RK, Tonon G, Weir BA, Zhao X, Ziaugra L, Zody MC, Giordano T, Orringer MB, Roth JA, Spitz MR, Wistuba II, Ozenberger B, Good PJ, Chang AC, Beer DG, Watson MA, Ladanyi M, Broderick S, Yoshizawa A, Travis WD, Pao W, Province MA, Weinstock GM, Varmus HE, Gabriel SB, Lander ES, Gibbs RA, Meyerson M, Wilson RK. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature.* 2008; 455(7216):1069-75.
- ³¹⁶ Goldgar DE, Healey S, Dowty JG, Da Silva L, Chen X, Spurdle AB, Terry MB, Daly MJ, Buys SM, Southey MC, Andrulis I, John EM, Khanna KK, Hopper JL, Oefner PJ, Lakhani S, Chenevix-Trench G. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(4):R73.
- ³¹⁷ Guarini A, Marinelli M, Tavolaro S, Bellacchio E, Magliozzi M, Chiaretti S, De Propriis MS, Peragine N, Santangelo S, Paoloni F, Nanni M, Del Giudice I, Mauro FR, Torrente I, Foà R. ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica.* 2012; 97(1):47-55.

- ³¹⁸ Reilly NM, Novara L, Di Nicolantonio F, Bardelli A. Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2019; 13(4):681-700.
- ³¹⁹ Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, Poisson LM, Lazar AJ, Cherniack AD, Kovatich AJ, Benz CC, Levine DA, Lee AV, Omberg L, Wolf DM, Shriver CD, Thorsson V. Cancer Genome Atlas Research Network, Hu H. An integrated TCGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics. *Cell.* 2018; 173(2):400-16.
- ³²⁰ Chang YS, Chang CM, Lin CY, Chao DS, Huang HY, Chang JG. Pathway mutations in breast cancer using Whole-Exome Sequencing. *Oncol Res.* 2020; 28(2):107-116.
- ³²¹ Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Ørntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 2006; 444(7119):633-7.
- ³²² Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 2005; 434(7035):907-13.
- ³²³ Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008; 319(5868):1352-5.
- ³²⁴ Albiges L, Goubar A, Scott V, Vicier C, Lefèbvre C, Alsafadi S, Commo F, Saghatchian M, Lazar V, Dessen P, Delalogue S, André F, Quidville V. Chk1 as a new therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Breast.* 2014; 23(3):250-8.
- ³²⁵ Bhatia N, Xiao TZ, Rosenthal KA, Siddiqui IA, Thiyagarajan S, Smart B, Meng Q, Zuleger CL, Mukhtar H, Kenney SC, Albertini MR, Jack Longley B. MAGE-C2 promotes growth and tumorigenicity of melanoma cells, phosphorylation of KAP1, and DNA damage repair. *J Invest Dermatol.* 2013; 133(3):759-67.
- ³²⁶ Sarmiento LM, Póvoa V, Nascimento R, Real G, Antunes I, Martins LR, Moita C, Alves PM, Abecasis M, Moita LF, Parkhouse RM, Meijerink JP, Barata JT. CHK1 overexpression in T-cell acute lymphoblastic leukemia is essential for proliferation and survival by preventing excessive replication stress. *Oncogene.* 2015; 34(23):2978-90.
- ³²⁷ Xu J, Li Y, Wang F, Wang X, Cheng B, Ye F, Xie X, Zhou C, Lu W. Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene.* 2013; 32(8):976-87.
- ³²⁸ Moschetta M, George A, Kaye SB, Banerjee S. BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2016; 27(8):1449-55.
- ³²⁹ Kwong A, Cheuk IW, Shin VY, Ho CY, Au CH, Ho DN, Wong EY, Yu SW, Chen J, Chan KK, Ngan HY, Chan TL, Ma ES. Somatic mutation profiling in BRCA-negative breast and ovarian cancer patients by multigene panel sequencing. *Am J Cancer Res.* 2020; 10(9):2919-32.
- ³³⁰ Lang GT, Shi JX, Hu X, Zhang CH, Shan L, Song CG, Zhuang ZG, Cao AY, Ling H, Yu KD, Li S, Sun MH, Zhou XY, Huang W and Shao ZM. The spectrum of BRCA mutations and characteristics of BRCA-

associated breast cancers in China: screening of 2,991 patients and 1,043 controls by next-generation sequencing. *Int J Cancer*. 2017; 141:129-142.

³³¹ Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, De Greve J, Lubinski J, Shanley S, Messiou C, A'Hern R, Tutt A, Ashworth A, Stone J, Carmichael J, Schellens JH, de Bono JS, Kaye SB. Poly (ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol*. 2010; 28(15):2512-9.

³³² Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, Scott C, Weitzel JN, Oaknin A, Loman N, Lu K, Schmutzler RK, Matulonis U, Wickens M, Tutt A. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor Olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010; 376(9737):245-51.

³³³ Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott CL, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Fielding A, Spencer S, Dougherty B, Orr M, Hodgson D, Barrett JC, Matulonis U. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15(8):852-61.

³³⁴ Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, Lee MK, Pennil CC, Rendi MH, Thornton A, Norquist BM, Casadei S, Nord AS, Agnew KJ, Pritchard CC, Scroggins S, Garcia RL, King MC, Swisher EM. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(3):764-75.

³³⁵ Hennessy BT, Timms KM, Carey MS, Gutin A, Meyer LA, Flake DD 2nd, Abkevich V, Potter J, Pruss D, Glenn P, Li Y, Li J, Gonzalez-Angulo AM, McCune KS, Markman M, Broaddus RR, Lanchbury JS, Lu KH, Mills GB. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(22):3570-6.

³³⁶ Maya-Mendoza A, Moudry P, Merchut-Maya JM, Lee M, Strauss R, Bartek J. High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature*. 2018; 559(7713):279-84.

³³⁷ Cortesi L, Toss A, Cucinotto I. PARP inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018; 18(9):877-93.

³³⁸ Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*. 2017; 355(6330):1152-8.

³³⁹ Mittica G, Ghisoni E, Giannone G, Genta S, Aglietta M, Sapino A, Valabrega G. PARP inhibitors in ovarian cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2018; 13(4):392-410.

³⁴⁰ Sunada S, Nakanishi A, Miki Y. Crosstalk of DNA double-strand break repair pathways in poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor treatment of breast cancer susceptibility gene 1/2-mutated cancer. *Cancer Sci*. 2018; 109(4):893-99.

³⁴¹ McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, Giavara S, O'Connor MJ, Tutt AN, Zdzienicka MZ, Smith GC, Ashworth A. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res*. 2006; 66(16):8109-15.

- ³⁴² Turner NC, Lord CJ, Iorns E, Brough R, Swift S, Elliott R, Rayter S, Tutt AN, Ashworth A. A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *EMBO J*. 2008; 27(9):1368-77.
- ³⁴³ Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:814-81
- ³⁴⁴ Michels J, Vitale I, Saparbaev M, Castedo M, Kroemer G. Predictive biomarkers for cancer therapy with PARP inhibitors. *Oncogene*. 2014; 33(30):3894-907.
- ³⁴⁵ Jannetti SA, Zeglis BM, Zalutsky MR, Reiner T. Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) Inhibitors and Radiation Therapy. *Front Pharmacol*. 2020; 11:170.
- ³⁴⁶ Dréan A, Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitor combination therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 108:73-85.
- ³⁴⁷ Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, De Greve J, Lubinski J, Shanley S, Messiou C, A'Hern R, Tutt A, Ashworth A, Stone J, Carmichael J, Schellens JH, de Bono JS, Kaye SB. Poly (ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol*. 2010; 28(15):2512-9.
- ³⁴⁸ Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P, Jonkers J. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(44):17079-84.
- ³⁴⁹ Xu K, Chen Z, Cui Y, Qin C, He Y, Song X. Combined Olaparib and Oxaliplatin inhibits tumor proliferation and induces G2/M arrest and γ -H2AX foci formation in colorectal cancer. *Onco Targets Ther*. 2015; 8:3047-54.
- ³⁵⁰ Nguewa PA, Fuertes MA, Cepeda V, Alonso C, Quevedo C, Soto M, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor 3-aminobenzamide enhances apoptosis induction by platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells. *Med Chem*. 2006; 2(1):47-53.
- ³⁵¹ Donawho CK, Luo Y, Luo Y, Penning TD, Bauch JL, Bouska JJ, Bontcheva-Diaz VD, Cox BF, DeWeese TL, Dillehay LE, Ferguson DC, Ghoreishi-Haack NS, Grimm DR, Guan R, Han EK, Holley-Shanks RR, Hristov B, Idler KB, Jarvis K, Johnson EF, Kleinberg LR, Klinghofer V, Lasko LM, Liu X, Marsh KC, McGonigal TP, Meulbroek JA, Olson AM, Palma JP, Rodriguez LE, Shi Y, Stavropoulos JA, Tsurutani AC, Zhu GD, Rosenberg SH, Giranda VL, Frost DJ. ABT-888, an orally active poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(9):2728-37.
- ³⁵² Evers B, Drost R, Schut E, de Bruin M, van der Burg E, Derksen PW, Holstege H, Liu X, van Drunen E, Beverloo HB, Smith GC, Martin NM, Lau A, O'Connor MJ, Jonkers J. Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and Cisplatin. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(12):3916-25.
- ³⁵³ Hastak K, Alli E, Ford JM. Synergistic chemosensitivity of triple-negative breast cancer cell lines to poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition, Gemcitabine, and Cisplatin. *Cancer Res*. 2010; 70(20):7970-80.

- ³⁵⁴ Reaper PM, Griffiths MR, Long JM, Charrier JD, McCormick S, Charlton PA, Golec JM, Pollard JR. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nat Chem Biol.* 2011; 7(7):428-30.
- ³⁵⁵ Shi Q, Shen LY, Dong B, Fu H, Kang XZ, Yang YB, Dai L, Yan WP, Xiong HC, Liang Z, Chen KN. The identification of the ATR inhibitor VE-822 as a therapeutic strategy for enhancing Cisplatin chemosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2018; 432:56-68.
- ³⁵⁶ Dent RA, Lindeman GJ, Clemons M, Wildiers H, Chan A, McCarthy NJ, Singer CF, Lowe ES, Watkins CL, Carmichael J. Phase I trial of the oral PARP inhibitor Olaparib in combination with Paclitaxel for first- or second-line treatment of patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2013; 15(5):R88.
- ³⁵⁷ Lee JM, Hays JL, Annunziata CM, Noonan AM, Minasian L, Zujewski JA, Yu M, Gordon N, Ji J, Sissung TM, Figg WD, Azad N, Wood BJ, Doroshow J, Kohn EC. Phase I/Ib study of Olaparib and Carboplatin in BRCA1 or BRCA2 mutation-associated breast or ovarian cancer with biomarker analyses. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 106(6):dju089.
- ³⁵⁸ Balmaña J, Tung NM, Isakoff SJ, Graña B, Ryan PD, Saura C, Lowe ES, Frewer P, Winer E, Baselga J, Garber JE. Phase I trial of Olaparib in combination with Cisplatin for the treatment of patients with advanced breast, ovarian and other solid tumors. *Ann Oncol.* 2014; 25(8):1656-63.
- ³⁵⁹ Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, Yap TA. Targeting DNA repair in cancer: beyond PARP inhibitors. *Cancer Discov.* 2017; 7(1):20-37.
- ³⁶⁰ Schmitt A, Knittel G, Welcker D, Yang TP, George J, Nowak M, Leeser U, Büttner R, Perner S, Peifer M, Reinhardt HC. ATM deficiency is associated with sensitivity to PARP1 and ATR inhibitors in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2017; 77(11):3040-56.
- ³⁶¹ Clark CC, Weitzel JN, O'Connor TR. Enhancement of synthetic lethality via combinations of ABT-888, a PARP inhibitor, and Carboplatin in vitro and in vivo using BRCA1 and BRCA2 isogenic models. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11(9):1948-58.
- ³⁶² Davidson D, Wang Y, Aloyz R, Panasci L. The PARP inhibitor ABT-888 synergizes irinotecan treatment of colon cancer cell lines. *Invest New Drugs.* 2013; 31(2):461-8.
- ³⁶³ Shelton JW, Waxweiler TV, Landry J, Gao H, Xu Y, Wang L, El-Rayes B, Shu HK. In vitro and in vivo enhancement of chemoradiation using the oral PARP inhibitor ABT-888 in colorectal cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013; 86(3):469-76.
- ³⁶⁴ Faber AC, Wong KK, Engelman JA. Differences underlying EGFR and HER2 oncogene addiction. *Cell Cycle.* 2010; 9(5):851-2.
- ³⁶⁵ Huang H, Weng H, Zhou H, Qu L. Attacking c-Myc: targeted and combined therapies for cancer. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(42):6543-54.
- ³⁶⁶ Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, Beijersbergen RL, Bardelli A, Bernards R. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature.* 2012; 483(7387):100-3.
- ³⁶⁷ Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp

-
- G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012; 366(10):883-92.
- ³⁶⁸ Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JMC, Papaemmanuil E, Brewer DS, Kallio HML, Högnäs G, Annala M, Kivinummi K, Goody V, Latimer C, O'Meara S, Dawson KJ, Isaacs W, Emmert-Buck MR, Nykter M, Foster C, Kote-Jarai Z, Easton D, Whitaker HC, Neal DE, Cooper CS, Eeles RA, Visakorpi T, Campbell PJ, McDermott U, Wedge DC, Bova GS. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature.* 2015; 520(7547):353-7.
- ³⁶⁹ Hong MK, Macintyre G, Wedge DC, Van Loo P, Patel K, Lunke S, Alexandrov LB, Sloggett C, Cmero M, Marass F, Tsui D, Mangiola S, Lonie A, Naeem H, Sapre N, Phal PM, Kurganovs N, Chin X, Kerger M, Warren AY, Neal D, Gnanapragasam V, Rosenfeld N, Pedersen JS, Ryan A, Haviv I, Costello AJ, Corcoran NM, Hovens CM. Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nat Commun.* 2015; 6:6605.
- ³⁷⁰ Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer JW, Tebar M, Riemersma S, van Krieken JH, Punt CJ, Nagtegaal ID. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2011; 104(6):1020-6.
- ³⁷¹ Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist.* 2008; 13(12):1270-5.
- ³⁷² Kalikaki A, Koutsopoulos A, Trypaki M, Souglakos J, Stathopoulos E, Georgoulas V, Mavroudis D, Voutsina A. Comparison of EGFR and K-RAS gene status between primary tumours and corresponding metastases in NSCLC. *Br J Cancer.* 2008; 99(6):923-9.
- ³⁷³ Mellinger IK, Sawyers CL. The emergence of resistance to targeted cancer therapeutics. *Pharmacogenomics.* 2002; 3(5):603-23.
- ³⁷⁴ Khamisipour G, Jadidi-Niaragh F, Jahromi AS, Zandi K, Hojjat-Farsangi M. Mechanisms of tumor cell resistance to the current targeted-therapy agents. *Tumour Biol.* 2016; 37(8):10021-39.
- ³⁷⁵ Memorial Sloan Kettering Cancer Center: OncoKB. <http://oncokb.org>.
- ³⁷⁶ 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.