

La secuenciación de nueva generación como herramienta diagnóstica, pronóstica y predictiva en la oncología de precisión.

Daniela Escobar Pausa^{1,2,a}, Sara Palacios Zambrano²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Departamento de Anatomía Patológica-Laboratorio de Dianas Terapéuticas LDT, Hospital Universitario HM Sanchinarro, 28050, Madrid, España.

a. daniela.escobar.ep@gmail.com

Palabras clave: cáncer; oncología de precisión; NGS; secuenciación dirigida; variante genética; diana terapéutica

Resumen

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Con la revolución en las técnicas moleculares y el inicio de la era de la secuenciación de nueva generación o NGS, el manejo del paciente oncológico se ha transformado enormemente y la oncología de precisión, impulsada en gran parte por la implementación de estas técnicas a la práctica clínica, es ya una realidad. El diagnóstico molecular y las pruebas genómicas permiten que el manejo clínico se adapte a cada paciente en función de las alteraciones moleculares presentes en las células tumorales. Así, estas técnicas se pueden aplicar para detectar biomarcadores o dianas que permitan clasificar distintos tumores, predecir el pronóstico y/o guiar las decisiones terapéuticas. La NGS ha revolucionado el campo de la genómica del cáncer al proporcionar una secuenciación rápida de grandes regiones del genoma, permitiendo identificar variantes genéticas potencialmente relevantes a nivel clínico. Sin embargo, aún existen algunas limitaciones para implementarla de manera eficiente a la práctica clínica de rutina, como la sensibilidad analítica, áreas del genoma que son difíciles de secuenciar o analizar o poseer el conocimiento necesario para interpretar la gran cantidad de resultados que se pueden generar. Este trabajo tiene por objetivo resaltar la importancia de las técnicas de biología molecular, y en concreto la NGS, en el ámbito de la oncología, así como mostrar la realidad de la práctica clínica en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital Universitario HM Sanchinarro. Para ello se exponen diferentes casos de pacientes oncológicos que se han podido beneficiar de algunas de las aplicaciones de la secuenciación dirigida empleando paneles de genes específicos.

Cita: Escobar Pausa, Daniela; Palacios Zambrano, Sara (2023) La secuenciación de nueva generación como herramienta diagnóstica, pronóstica y predictiva en la oncología de precisión. *dianas* 12 (2): e202309fa03. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202309fa03 <https://dianas.web.uah.es/journal/e202309fa03>.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>. DOI <https://doi.org/10.37536/DIANAS>

Copyright: © Escobar-Pausa D, Palacios-Zambrano S. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

El cáncer constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, con casi 10 millones de muertes en todo el mundo en 2020 según la *International Agency for Research on Cancer* (IARC). A pesar de los importantes avances que se están realizando en el ámbito de la oncología médica, se estima que en 2040 su incidencia alcanzará los 28,4 millones de casos como consecuencia del aumento de la población y del envejecimiento de esta [1, 2].

Numerosos proyectos globales como *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) que analizan datos genómicos, epigenómicos, transcriptómicos y proteómicos de diferentes tipos tumorales han demostrado que existe una elevada heterogeneidad genética, epigenética y de expresión génica entre los distintos tumores [3, 4]. Esta variabilidad interindividual lleva a clasificarlos en subtipos moleculares caracterizados por determinadas mutaciones, anomalías cromosómicas, cambios epigenéticos y perfiles de expresión génica [5].

El diagnóstico convencional en oncología implica la evaluación histopatológica del tumor y sus órganos de origen, en base a la cual se selecciona la terapia más adecuada. Sin embargo, las clasificaciones moleculares, que a menudo están estrechamente asociadas con perfiles únicos, permiten un diagnóstico y pronóstico más precisos que la clasificación tradicional. Como consecuencia de ello, en los últimos años está cobrando una gran importancia el diagnóstico molecular, y con él la medicina personalizada [6].

Los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de cáncer implican un gran número de alteraciones genéticas que promueven la supervivencia y proliferación celular. Estas variaciones en el perfil genético permiten distinguir las células tumorales de las que no lo son, lo que las convierte en potenciales biomarcadores y/o dianas terapéuticas [7]. Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), un biomarcador es “una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros fluidos corporales o tejidos y que es un signo de un proceso normal o anormal, o de una afección o enfermedad” [8]. Los biomarcadores se pueden clasificar en tres grupos principales: biomarcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos. En concreto en

oncología, los primeros permiten la clasificación del tumor, mientras que los segundos ayudan a predecir la evolución clínica de este tanto en ausencia de tratamiento como con la terapia convencional. Por último, los biomarcadores predictivos ayudan a optimizar las decisiones terapéuticas, ya que brindan información sobre la posibilidad de respuesta a un determinado tratamiento [9]. En relación al desarrollo de fármacos, en los últimos años la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos y/o la Agencia Europea del Medicamento (EMA, por sus siglas en inglés) han aprobado el uso de nuevas terapias frente a dianas específicas para el tratamiento de distintos tipos de tumores. Un ejemplo es el osimertinib, dirigido frente a deleciones del exón 19 del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o sustituciones en el exón 21 de dicho gen en cáncer de pulmón de célula no pequeña metastásico. A su vez, la identificación de una determinada diana molecular puede servir como criterio de inclusión para acceder a una terapia dirigida disponible en ensayos clínicos. Por tanto, el creciente interés en identificar y caracterizar biomarcadores pronósticos y predictivos está conduciendo a un cambio de paradigma en la estrategia terapéutica, desde un tratamiento citotóxico no específico hacia uno dirigido y personalizado basado en el perfil genómico y mutacional de cada tumor [10].

La adaptación del manejo clínico a cada paciente en función de las alteraciones moleculares presentes en las células cancerosas ha sido posible gracias a las pruebas genómicas y, en concreto, ha sido facilitado en gran medida por la implementación de la secuenciación de nueva generación o secuenciación masiva (*next generation sequencing*, NGS) en la práctica clínica. La NGS es una tecnología de alto rendimiento que permite el análisis simultáneo de múltiples regiones del genoma, lo cual posibilita el estudio de una gran cantidad de dianas en un solo ensayo, frente a las técnicas de detección de una única diana, como la PCR convencional seguida de la secuenciación de Sanger gen a gen [10]. Las dos principales plataformas de secuenciación disponibles en el mercado utilizan la tecnología SBS (secuenciación por síntesis), basada en la amplificación del ADN, en la que la secuencia molde inmovilizada sobre un soporte se copia mediante la elongación de un cebador gracias a la acción de una ADN polimerasa. Entre las más destacadas se encuentran la secuenciación por semiconducción (*Ion Torrent Sequencing*), comercializada por la empresa Thermo Fisher Scientific, en la que las reacciones tienen lugar en un chip semiconductor que detecta los iones H⁺ producidos durante la polimerización del ADN; o la secuenciación por terminación cíclica reversible, basada en la utilización de nucleótidos marcados con fluoróforos, empleada por Illumina [11].

Actualmente, los enfoques para realizar NGS van desde el genoma completo (*whole genome sequencing*, WGS), el exoma completo (*whole exome sequencing*, WES), el transcriptoma completo (RNA-seq) y la secuenciación dirigida de regiones específicas del genoma (*targeted sequencing*), en la que solo se secuencian un número de genes determinado. Esta última ofrece un método más asequible y específico para identificar variantes genómicas, puesto que al secuenciarse solo una pequeña fracción del genoma se puede lograr una profundidad de lectura mucho mayor, lo que permite identificar mutaciones con menor frecuencia alélica. Esto es especialmente relevante en la secuenciación de tumores, donde se espera encontrar una población celular heterogénea en la que las mutaciones presentes en el tejido (somáticas) pueden no ser mayoritarias. Asimismo, en el contexto de la oncología solo un número limitado de genes tiene algún tipo de manejo clínico por lo que no estaría indicado realizar estudios más amplios [11].

El análisis y la interpretación de los resultados procedentes de la NGS es un paso fundamental en el proceso de secuenciación, a pesar de que puede resultar complicado debido al gran número de variantes genéticas que pueden detectarse a partir de una muestra tumoral. Con el objetivo de alcanzar un consenso en la estandarización de la interpretación de dichas variantes, el *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) y la *Association for Molecular Pathology* (AMP) han elaborado y publicado unas guías con una serie de recomendaciones y pautas que han sido adoptadas por los laboratorios en la práctica clínica. Por un lado, la ACMG definió un marco de cinco niveles para clasificar las variantes según su repercusión clínica como "patogénicas", "probablemente patogénicas", "de significado incierto (VUS)", "probablemente benignas" o "benignas" de acuerdo con criterios que abordan los niveles de evidencia de patogenicidad [12]. Por otro lado, la clasificación propuesta por la AMP consta de cuatro categorías o niveles en función del impacto clínico de las variantes somáticas: nivel I, variantes con fuerte significado clínico (evidencia de nivel A y B); nivel II, variantes con significado clínico potencial (evidencia de nivel C o D); nivel III, variantes con significado clínico desconocido; y nivel IV, variantes que son benignas o probablemente benignas. A pesar de ello, la genómica del cáncer es un campo en constante y rápida evolución, por lo que la importancia clínica de cualquier variante debe reevaluarse de manera continua [13].

Las variantes genéticas se pueden clasificar en base a otros criterios. Según el tipo de células afectadas pueden ser germinales o somáticas. Una variante de la línea germinal se define como una alteración genética que ocurre en las células germinales (óvulo o espermatozoide), de modo que puede transmitirse a las generaciones posteriores y la descendencia podría presentar dicha mutación en todas las células del organismo. Por el contrario, una variante somática es una alteración genética que se produce en cualquiera de las células del organismo, excepto en las germinales, y por tanto no se transmite a las generaciones posteriores. Las variantes detectadas en tejido tumoral en la mayoría de las ocasiones serán variantes somáticas. En relación a las clasificaciones previamente mencionadas, la propuesta por la ACMG está más orientada hacia variantes germinales, a diferencia de la de la AMP, que se refiere a las somáticas [13].

En función del efecto que provoquen, las variantes genéticas pueden ser activadoras, como una mutación de cambio de sentido, lo que resulta en una ganancia de función de la proteína; o inactivantes, como mutaciones sin sentido, inserciones/deleciones que impliquen un cambio en el marco de lectura, o mutaciones en el sitio de *splicing*, lo que provoca una pérdida de función de genes supresores de tumores. Los tipos de variantes observados incluyen variantes de un solo nucleótido (SNV), duplicaciones, deleciones, inserciones o inserciones y deleciones juntas en una ubicación particular. También es común en la patogenia del cáncer cambios en el número de copias, conocidas como variación en el número de copias (CNV), como la ganancia (amplificación) del oncogén *ERBB2* en el carcinoma de mama invasivo. Además, los reordenamientos estructurales o fusiones de genes, incluidas las translocaciones, deleciones, duplicaciones o inversiones cromosómicas, se identifican con frecuencia en el ADN o ARN tumoral y dan como resultado proteínas de fusión con nuevas propiedades que promueven el desarrollo de cáncer [13].

Con la publicación de un número cada vez mayor de proyectos de secuenciación del genoma a gran escala para una variedad de tipos de tumores, se está generando y consolidando una gran cantidad de información genómica en muchas bases de datos públicas a nivel mundial. Las bases de datos de cáncer, genómicas, poblacionales, de mutaciones en línea germinal, de secuencias de referencia, etc, proporcionan información necesaria para la clasificación óptima de las variantes genéticas [13]. Algunas de las más destacadas son: COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), cBioportal (cBioportal.org), VarSome (<https://varsome.com/>) [14], ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), *Leiden Open Variation Database* (LOVD) (<https://www.lovd.nl/>) o Franklin (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>), entre otras.

En el presente trabajo se exponen diferentes casos clínicos con el objetivo de enfatizar la importancia del diagnóstico molecular mediante NGS que se realiza en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital Universitario HM Sanchinarro, y se discuten los grandes beneficios de este en el pronóstico, diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Materiales y métodos

Los pasos básicos para la NGS incluyen la extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN), la preparación de las librerías y el templado, la secuenciación de los fragmentos obtenidos y el procesamiento, análisis e interpretación de los datos.

Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

El primer paso para llevar a cabo los estudios de NGS es seleccionar aquellos bloques tumorales con un porcentaje tumoral óptimo. Para ello, los cortes teñidos con hematoxilina-eosina fueron revisados por un patólogo, que seleccionó los bloques o áreas enriquecidas con más de un 20% de celularidad tumoral, mínimo porcentaje requerido para la correcta realización de esta técnica dada la sensibilidad de la misma. Tras la elección del material, a partir de un número variable de secciones de 5 µm de espesor de tejido de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE), se llevó a cabo la extracción de ácidos nucleicos.

El aislamiento del ADN se realizó empleando el kit de extracción *Cobas® DNA Sample Preparation* (Roche Molecular Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la determinación de la concentración y pureza del ADN se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Para aislar el ARN se utilizó el kit *High pure FFPE RNA Isolation* (Roche Molecular Diagnostics) según indica el fabricante. La concentración y calidad del ARN se evaluaron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Una vez cuantificado, el ARN se concentró mediante la utilización del kit *GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit* (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, para obtener una cuantificación más precisa, tanto el ADN como el ARN fueron cuantificados por Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

Posteriormente se realizó la retrotranscripción del ARN a cADN, para lo que se empleó la polimerasa *SuperScript IV Reverse Transcriptase VILO* (Thermo Fisher Scientific).

Preparación de librerías

Tras la extracción y aislamiento de los ácidos nucleicos se prepararon las librerías para la secuenciación. Se llevó a cabo una secuenciación dirigida en la que se utilizaron dos paneles de genes específicos. Por un lado, el panel *OncoPrint™ Comprehensive Assay v3* (OCAv3, Thermo Fisher Scientific) está diseñado para el análisis de variantes de los 161 genes *drivers* más relevantes asociados a distintos tipos de cáncer, permitiendo detectar mutaciones puntuales (análisis de ADN: sustituciones, inserciones o deleciones), alteraciones en el número de copias o CNV (análisis de ADN) y reordenamientos (análisis de ARN).

Por otro lado, se empleó el panel *OncoPrint™ Tumor Mutation Load* (TML), que proporciona una cuantificación precisa de la carga mutacional tumoral (TMB). El TMB mide el número de mutaciones puntuales somáticas no sinónimas por megabase dentro de un genoma tumoral (mutaciones/Mb) y es un

biomarcador emergente muy prometedor de respuesta a la inmunoterapia [15]. El panel cubre 1,65 Mb del genoma donde se localizan 409 oncogenes relevantes en los principales tipos de cáncer.

Se prepararon, por tanto, 3 librerías: una librería de ADN del panel OCAv3, otra de ARN del mismo panel, y una última de ADN del panel de carga mutacional. El proceso de amplificación y generación de librerías está automatizado y se realizó partiendo de 20 ng de ADN/ARN utilizando la plataforma de *Ion Chef™ System* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Templado

Una vez preparadas las librerías se siguió con el templado, que tiene como objetivo crear múltiples copias del mismo amplicón para así amplificar la señal durante la secuenciación. En este caso, al emplear la secuenciación *Ion Torrent*, se realizó mediante una PCR de emulsión de forma automatizada gracias a la plataforma de *Ion Chef™ System* (Thermo Fisher Scientific). Así, tras la amplificación se obtuvieron miles de copias de un mismo fragmento de ADN ligadas a microesferas. Posteriormente, dichas microesferas se cargaron en el chip *Ion 540™*, empleando uno para las librerías de ADN y ARN, y otro para la de TML.

Secuenciación

Tras el templado, los dos chips se secuenciaron empleando el secuenciador *Ion S5™* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Procesamiento y análisis de los datos

El procesamiento de los datos brutos obtenidos tras la secuenciación y su traducción a resultados informativos para el oncólogo y el paciente requiere varios pasos. La parte bioinformática se dividió en el análisis primario, secundario y terciario.

En primer lugar, con el software *Torrent Suite™* (Thermo Fisher Scientific) se analizaron los datos brutos (análisis de señales), con el objetivo de transformarlos en secuencias legibles (*base calling*) y medir su calidad. Tras este análisis primario se generó un archivo uBAM (mapa de alineación binaria sin mapear).

En segundo lugar, si las lecturas de las secuencias tenían suficiente calidad, estas se alinearon con el genoma de referencia (GRCh37/hg19) y como resultado se generó un archivo BAM (mapa de alineación binaria). Posteriormente se realizó lo que se conoce como el llamado de variantes o *variant calling*, que tiene como fin identificar las variantes genéticas a partir del archivo BAM. Este paso se realizó con el plugin *variant caller* del servidor *Ion Torrent* conocido como *Torrent Variant Caller* (TVC), que emplea diferentes filtros para generar un archivo VCF (*variant calling format*) donde se reportan las diferentes variantes detectadas (SNPs, indels, CNVs, etc). Además, contiene información sobre la posición cromosómica, la base de referencia, la base o bases alternativas identificadas y el genotipo de las muestras para cada posición, entre otros. Todos estos pasos se llevaron a cabo con el software *Ion Reporter™ v5.18* (Thermo Fisher Scientific).

Por último, en el análisis terciario se abordó la interpretación de los datos obtenidos. Este comenzó con la anotación de las variantes encontradas, que ofreció un contexto biológico para todas ellas, es decir, en qué gen se encuentra, su posición dentro de este y el impacto de la variación (*missense*, *nonsense*, sinónimo, etc.). Para dar sentido clínico a las variantes halladas se continuó con un paso adicional de filtrado y posterior clasificación. Con el fin de eliminar posibles falsos positivos, las variantes se filtraron según el número total de lecturas y la cobertura, descartando así aquellas que tuvieran un bajo número de lecturas (<100) y poca cobertura (<500). También se tuvieron en cuenta otros parámetros como la longitud de los homopolímeros, la frecuencia alélica, la frecuencia de alelos menores (MAF) y la localización en el genoma (exónica, intrónica o en sitio de *splicing*). Seguidamente se realizó la clasificación de las variantes de acuerdo a las guías proporcionadas por la ACMG y la AMP [13] con la ayuda de diferentes bases de datos poblacionales y de mutaciones para línea germinal y somática:

COSMIC	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic ,
cBioportal	http://cbioportal.org ,
gnomAD	https://gnomad.broadinstitute.org/ ,
VarSome	https://varsome.com/ ,
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ ,
<i>the SingleNucleotide Polymorphism Database</i> (dbSNP)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/ ,
LOVD	https://www.lovd.nl/ ,
Franklin	https://franklin.genoox.com/clinical-db/home y
<i>BRCA Exchange</i>	https://brcaexchange.org/ .

Finalmente, tras la interpretación de las variantes en el contexto clínico del paciente se generó un informe con información sobre las variantes clínicamente relevantes halladas (aquellas patogénicas, probablemente patogénicas y VUS) y que ofreció orientación hacia terapias y ensayos clínicos aprobados actualmente.

Ensayo *FoundationOne CDx Cancer Genome Profile*

En algunos casos, alternativamente a los paneles OCAv3 y TML, se realizó NGS utilizando la plataforma *FoundationOne Medicine CDx*, proporcionada por *Foundation Medicine* (Cambridge, MA, EE. UU.) para la realización del ensayo *FoundationOne CDx Cancer Genome Profile* (F1CDx). Este se clasifica como una prueba integral de perfil genómico (CGP) basada en secuenciación NGS que utiliza la tecnología Illumina. Esta prueba cubre un total de 324 genes y permite la detección de sustituciones de bases, inserciones, deleciones y CNVs en 309 genes, así como fusiones de 36 genes, inestabilidad de microsatélites (MSI) y TMB [16]. Las bloques de tejido y las tinciones de hematoxilina-eosina se enviaron a la plataforma externa *Foundation One Medicine CDx*, a partir de los cuales se analizó el ADN tumoral de muestras de tejido FFPE.

Resultados

A continuación se presentan 4 casos clínicos recibidos en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital HM Sanchinarro entre los meses de marzo y junio de 2023 de pacientes oncológicos en los que se empleó la secuenciación NGS como herramienta diagnóstica, así como para detectar posibles dianas terapéuticas o biomarcadores predictivos para tratamientos aprobados o en ensayos clínicos.

Caso clínico nº1

Paciente varón de 72 años diagnosticado de adenocarcinoma de páncreas, tratado mediante resección quirúrgica y actualmente en tratamiento con quimioterapia (mFOLFIRINOX). El oncólogo solicitó la realización de un estudio de NGS para la caracterización molecular del tumor empleando los paneles OCAv3 y TML. La biopsia utilizada presentaba un 40% de celularidad tumoral según el informe del patólogo asignado. Tras la secuenciación masiva dirigida, se detectaron variantes en los genes *KRAS* y *ATM* que, en base a la evidencia actual, se clasificaron como patogénicas (Tabla 1). Además, de acuerdo con los criterios propuestos por la ACMG se identificaron dos variantes clasificadas como VUS por las diferentes bases de datos empleadas en los genes *SMO* y *PMS2*, por lo que no se les podría atribuir un papel oncogénico. Asimismo, mediante el análisis del ARN se confirmó la ausencia de reordenamientos en los genes cubiertos por el panel. Por otro lado, mediante el panel TML se obtuvo un valor de TMB de 3,43 mutaciones/Mb.

Variante genética	Clasificación	Frecuencia alélica
<i>KRAS</i> (c.35G>T, p.Gly12Val)	Patogénica	7%
<i>ATM</i> (c.5791_5791delGinsCCT, p.Ala1931Profs*7)	Patogénica	53%
<i>SMO</i> (c.943G>A, p.Val315Ile)	VUS	48%
<i>PMS2</i> (c.1798A>G, p.Met600Val)	VUS	49%

Tabla 1.- Resumen de los resultados obtenidos mediante NGS. VUS, variante de significado incierto.

Caso clínico nº2

Paciente mujer de 62 años que en 1999 fue diagnosticada de cáncer de cérvix, del que fue tratada con cirugía. En 2023 le detectaron un tumor en tejido óseo cuyo perfil inmunofenotípico obligó a diagnosticarlo como un carcinoma de origen desconocido, por lo que ante la ausencia de un diagnóstico claro, el oncólogo decidió iniciar un tratamiento quimioterápico consistente en la combinación de paclitaxel y carboplatino. De forma paralela se solicitó la realización de un estudio genómico mediante NGS para la caracterización molecular del tumor a partir de una biopsia que presentaba un 50% de celularidad tumoral. Para ello se empleó la plataforma *FoundationOne Medicine CDx* (Roche), mediante la que se identificaron variantes patogénicas en los genes *NRAS* y *PAX5* (Tabla 2) y ausencia de reordenamientos. Por otro lado, se obtuvo un valor de TMB de 6 mutaciones/Mb. Además, en el informe se notificó la presencia de secuencias de ADN propias del virus del papiloma humano (HPV). Pese a que el test de *FoundationOne* no está aprobado clínicamente para dicha detección, ante tal sospecha se decidió confirmar el resultado mediante otra técnica validada para ello. Por ello, se procedió a realizar un estudio para la detección y tipificación del HPV en el tejido tumoral de la paciente mediante *PCR-reverse dot blot* en un laboratorio externo (*data not shown*). A través del estudio se confirmó la presencia de secuencias de ADN de HPV de genotipo 18 (alto riesgo).

Variante genética	Clasificación	Frecuencia alélica
<i>NRAS</i> (c.35G>A, p.Glu12Asp)	Patogénica	19,8%
<i>PAX5</i> (c.70G>A, p.Glu24Arg)	Patogénica	11,1%

Tabla 2.- Resumen de los resultados obtenidos mediante NGS.

Caso clínico nº3

Paciente mujer de 77 años diagnosticada de cáncer de mama en 2002, superado tras tratamiento, y de adenocarcinoma de pulmón en 2016, tratado con cirugía. En 2019 sufrió una recaída de su segundo tumor y, ante la imposibilidad de resección y con el fin de encontrar alguna diana tratable, el oncólogo solicitó un estudio de NGS con el panel OCAv3, que se realizó sobre la biopsia de 2016, y en el que el análisis del ARN reveló una fusión de la proteína RET (Tabla 3).

Variante genética	Interpretación
KIF5B(15)-RET(12)	Ganancia de función

Tabla 3.- Resumen de los resultados obtenidos mediante NGS en la biopsia de 2016.

En 2023, ante la progresión de la enfermedad, se solicitó la repetición de dicho estudio sobre una nueva biopsia empleando los paneles OCAv3 y TML. La muestra de tejido presentaba un 30% de celularidad tumoral, según indicó el patólogo. Tras la realización de la secuenciación NGS se detectó una delección en el gen *EGFR*, que resultó de especial importancia dado el contexto clínico del paciente y que se clasificó como patogénica. Asimismo se detectó un aumento en el número de copias del gen *MYCL* (Tabla 4), lo cual indicaría una amplificación de dicho gen. Adicionalmente, el análisis del ARN confirmó la ausencia de reordenamientos en los genes cubiertos por el panel. Por último, mediante el panel TML se obtuvo un valor de TMB de 7,01 mutaciones/Mb.

Variante genética	Clasificación	Frecuencia alélica
<i>EGFR</i> (c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC, p.Glu746_Ala750del)	Patogénica	37%
Gen (región cromosómica)	Interpretación	Número de copias
<i>MYCL</i> [1p34.2(40362966-40367017)]	Aumento	8,18

Tabla 4.- Resumen de los resultados obtenidos mediante NGS en la biopsia actual.

Caso clínico nº4

Paciente mujer de 69 años fumadora con adenocarcinoma de pulmón, que actualmente se encuentra en tratamiento inmunoterápico con nivolumab e ipilimumab. Tras presentar numerosos efectos secundarios durante la inmunoterapia y con el fin de encontrar otra diana terapéutica, el oncólogo solicitó la realización de un estudio molecular del tumor mediante NGS utilizando los paneles OCAv3 y TML. La biopsia analizada presentaba un 70% de celularidad tumoral, según el informe del patólogo asignado. Los resultados obtenidos después de la secuenciación dirigida advirtieron de la presencia de variantes en los genes *KRAS*, *STK11* y *SMARCA4* (Tabla 5). Las dos primeras se clasificaron como patogénicas y la última se trataba de una variante no descrita previamente a la que los algoritmos de predicción le confirieron un efecto probablemente patogénico. Asimismo, mediante el análisis del ARN se corroboró la ausencia de reordenamientos en los genes cubiertos por el panel. Por último, tras el procesamiento de los datos obtenidos con el panel TML se obtuvo un valor de TMB de 13,66 mutaciones/Mb.

Variante genética	Clasificación	Frecuencia alélica
<i>KRAS</i> (c.34G>T, p.Gly12Cys)	Patogénica	18%
<i>STK11</i> (c.598-1G>T, p.?)	Patogénica	10%
<i>SMARCA4</i> (c.733delG, p.Ala245Hisfs*58)	Probablemente patogénica	8%

Tabla 5.- Resumen de los resultados obtenidos mediante NGS.

Discusión y conclusiones

La aplicación a la clínica de la NGS ha supuesto una gran revolución en el ámbito de la oncología médica y un gran avance en la medicina de precisión. Debido a la elevada prevalencia de cáncer en todo el mundo, la creciente incidencia relacionada con el envejecimiento de la población y la disponibilidad de tratamientos dirigidos, así como el hecho de que dicha patología sigue siendo una de las principales causas de mortalidad, convierten esta área en ideal para la aplicación de estas nuevas tecnologías genómicas de alto rendimiento [1, 16].

En la actualidad, la secuenciación genómica dirigida mediante paneles específicos tiene una gran aplicación en entornos clínicos, puesto que se dirige a genes con relevancia clínica, tiene una mayor sensibilidad, un tiempo de respuesta más rápido y un coste más bajo [17]. Gracias a la identificación de variantes genéticas mediante NGS se puede obtener un diagnóstico más preciso, que ayude a guiar las decisiones terapéuticas y predecir la efectividad de un determinado tratamiento, así como a evitar que los pacientes reciban tratamientos potencialmente ineficaces [10, 16]. Los casos clínicos aportados en el presente trabajo son un reflejo de las numerosas aplicaciones y ventajas que tiene la NGS en la práctica clínica en el ámbito de la oncología (Figura 1).

En el caso nº1, se presenta el caso de un paciente diagnosticado de adenocarcinoma de páncreas en el que mediante NGS se identificó una variante en el gen *ATM* que presentaba una frecuencia alélica del 53%, lo que podría ser indicativo de su presencia en línea germinal. A pesar de que las pruebas moleculares realizadas sobre tejido tumoral no se deben usar para inferir de manera concluyente la presencia de una variante germinal, sí pueden servir como indicación para realizar las pruebas correspondientes que lo confirmen [18]. Las mutaciones hereditarias de los genes implicados en la reparación del ADN, como *ATM*, *BRCAl/2*, *TP53*, etc, dan como resultado una mayor susceptibilidad a desarrollar diferentes tipos de cáncer [19]. En concreto, las personas portadoras de una variante patogénica en *ATM* a nivel germinal tienen entre un 20-40% de riesgo de padecer cáncer de mama y entre un 5-10% de cáncer de páncreas, a diferencia de aquellas que no portan este tipo de mutaciones, que presentan un 10-12% y un 1-2%, respectivamente [20, 21]. Tras exponer el caso en el comité de tumores del hospital, se decidió derivar al paciente a la Unidad de Consejo Genético. En dicha consulta se elaboró el árbol genealógico y se informó al paciente de las características clínico-biológicas del Síndrome de predisposición de cáncer asociado a *ATM*, sus implicaciones heredo-familiares y las estrategias reductoras de riesgo disponibles. Tras ello, se realizó el estudio de la variante genética hallada en *ATM* en sangre y finalmente se confirmó la presencia de la misma a nivel germinal. Las recomendaciones actuales de atención médica para las personas con variantes patogénicas de *ATM* se centran en el seguimiento del paciente con el fin de diagnosticar el cáncer en la etapa más temprana posible. En el caso del cáncer de mama el manejo se basa en la realización de mamografías anuales a partir de los 40 años [20, 21]. Para la detección temprana del cáncer de páncreas se harían cribados mediante resonancia magnética o endoscopia de ultrasonidos. Además, para el seguimiento de la familia se pueden realizar test como el que se ha desarrollado en la Unidad de Prevención y Diagnóstico Hipertemprano Oncológico del Hospital Universitario HM Sanchinarro, indicado para familiares de primer grado de pacientes con cáncer de páncreas o algún síndrome hereditario de predisposición genética al cáncer. Por tanto, gracias a la realización del estudio molecular mediante NGS se pudo detectar una variante potencialmente germinal, que fue confirmada posteriormente, pudiendo iniciar así un seguimiento preventivo del paciente y los familiares de primer grado.

El caso clínico nº2 se trata de una paciente que había sido diagnosticada anteriormente de un carcinoma de cérvix y que en la actualidad presenta un tumor de origen desconocido. La realización de NGS en la biopsia actual permitió identificar la presencia de material genético procedente del genotipo 18 de HPV, poniendo de manifiesto la importancia de dicha técnica para diagnosticar correctamente un caso. Asimismo, mediante otras técnicas complementarias posteriores como la inmunohistoquímica se detectó la expresión de p16 en la biopsia tumoral, lo cual se considera un marcador subrogado de la infección por HPV en carcinoma de cérvix [22]. El HPV ha sido identificado como la causa principal de desarrollo de carcinoma de cérvix, la cual es una de las principales neoplasias ginecológicas a nivel mundial. Entre los genotipos de HPV, los que se asocian principalmente con la progresión tumoral son el 16 y 18 [23]. Estudios anteriores ya han demostrado la utilidad de la secuenciación NGS para detectar diferentes marcas genéticas del virus del papiloma humano en muestras tumorales [24–26]. Las pruebas de HPV basadas en estas técnicas pueden

ser más específicas que otros métodos y en un futuro podrían considerarse el estándar de referencia para la genotipificación. En algunos de estos trabajos se emplea lo que se denomina la “captura de HPV”, que brinda información acerca del estado molecular viral (integrado o no integrado), los sitios de integración, las variantes genotípicas o distintas marcas moleculares y firmas génicas en la muestra tumoral, lo cual podría informar ampliamente sobre el proceso oncogénico viral y podría permitir la estratificación del tumor en función de la información virológica [27]. Concretamente este caso, gracias a los hallazgos previamente mencionados, se reclasificó como una recaída tumoral del adenocarcinoma de cérvix que la paciente había padecido 23 años antes. Además, en base a este resultado, adicionalmente al tratamiento de quimioterapia se decidió añadir bevacizumab, terapia estándar para el cáncer de cérvix recurrente que no responde a terapia local curativa [28], siguiendo los protocolos de primera línea para carcinoma de cérvix. Por tanto, la identificación de secuencias de ADN propias de HPV mediante NGS empleando la plataforma *FoundationOne Medicine CDx* permitió un diagnóstico correcto del caso, modificando en consecuencia el esquema de tratamiento a uno acorde al diagnóstico.

En el caso de la paciente nº3, diagnosticada de un adenocarcinoma de pulmón en 2016, mediante NGS se identificó una fusión de RET en la biopsia inicial, gracias a lo cual la paciente accedió al ensayo clínico AcceleRET Lung con el inhibidor de RET pralsetinib (NCT04222972, ClinicalTrials.gov). Ante la recaída clínica, en la biopsia pulmonar actual se volvió a repetir el estudio de NGS. Dado que se suponía que se trataba de una recidiva del tumor inicial, lo esperado era identificar la misma fusión. Pese a ello, tras el análisis de NGS se detectó una delección en el exón 19 del gen *EGFR*. Dicha mutación confiere sensibilidad a fármacos inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKI) para *EGFR*, y se asocia con un mejor resultado en comparación con otras mutaciones de este gen, como la p.L858R [29]. Sin embargo, las fusiones de RET son mutuamente excluyentes con otras alteraciones oncogénicas en este tipo de tumores [30], por lo que se pudo concluir que el tumor actual no correspondía a una metástasis del adenocarcinoma inicial que presentaba la alteración en el gen RET, sino que se trataba de un nuevo tumor primario. Por tanto, gracias a la identificación de una nueva diana terapéutica se pudo retirar el tratamiento al que se estaba sometiendo la paciente, que no tendría efecto terapéutico, y además, podría acceder a un nuevo tratamiento con algún TKI aprobado frente a mutaciones en *EGFR*, como el osimertinib.

En el caso nº4, paciente diagnosticada de un adenocarcinoma de pulmón, gracias a la secuenciación NGS se identificó la variante p.G12C del gen *KRAS*, un oncogén que se encuentra alterado en aproximadamente el 20-30% de los adenocarcinomas de pulmón [31-33]. El cambio de la glicina por la cisteína conlleva una activación constitutiva de la proteína GTPasa que codifica dicho gen, lo que mantiene permanentemente activa la vía de señalización MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), conduciendo a la desregulación de la proliferación celular [32, 33]. A pesar de su prevalencia y potencial como diana terapéutica, dicha mutación ha permanecido durante décadas sin una opción terapéutica dirigida. No fue hasta mayo de 2021, que la FDA aprobó el uso del inhibidor sotorasib, una molécula pequeña que bloquea específicamente a KRAS p.G12C en su estado inactivo, inhibiendo así la señalización oncogénica. El abordaje terapéutico dirigido al bloqueo específico de esta mutación ha demostrado recientemente beneficio clínico en numerosos ensayos en los que se mostró una seguridad y eficacia prometedoras, así como una actividad antitumoral rápida, profunda y duradera [31-33]. Aunque la EMA también aprobó su uso en Europa en 2022, en España actualmente no tiene precio reembolso [34, 35], por lo que para poder beneficiarse de los efectos de este inhibidor la opción es acceder a un ensayo clínico que lo incluya. En este caso, el tratamiento estaba ocasionándole a la paciente numerosos efectos adversos, por lo que la detección de una diana tratable en el estudio de NGS como es la variante de *KRAS* p.G12C supuso una alternativa terapéutica para entrar en algún ensayo clínico con sotorasib.

Los casos expuestos ponen en evidencia la importancia de la implementación de comités multidisciplinares o comités moleculares de tumores (*molecular tumor boards*, MTB), debido a la creciente complejidad del manejo del cáncer. En ellos se reúnen especialistas de diferentes áreas como oncólogos, patólogos, biólogos moleculares, genetistas, profesionales de consejo genético, personal de ensayos clínicos, etc, con el fin de combinar e interpretar la información clínica y molecular para llegar de manera colaborativa a una decisión clínica óptima [17, 36]. Se ha demostrado recientemente que los MTB logran resultados clínicos significativamente mejores para los pacientes cuyos médicos siguieron las recomendaciones de la discusión del MTB, en comparación con los que no lo hicieron [37].

A pesar de las numerosas ventajas que ofrece la NGS en la práctica clínica, posee algunas limitaciones, como que su precisión para identificar variantes genéticas puede variar en función de la calidad o tipo de muestra. Probablemente una de las más importantes es la dificultad que supone el análisis de la enorme cantidad de información que proporciona. Otra limitación es la detección de variantes que actualmente están catalogadas como variantes de significado incierto, cuya relevancia clínica se desconoce. Esto hace que sea necesario llevar a cabo reanálisis periódicos, para comprobar si una o varias de esas variantes de significado incierto se han reclasificado y actuar en consecuencia.

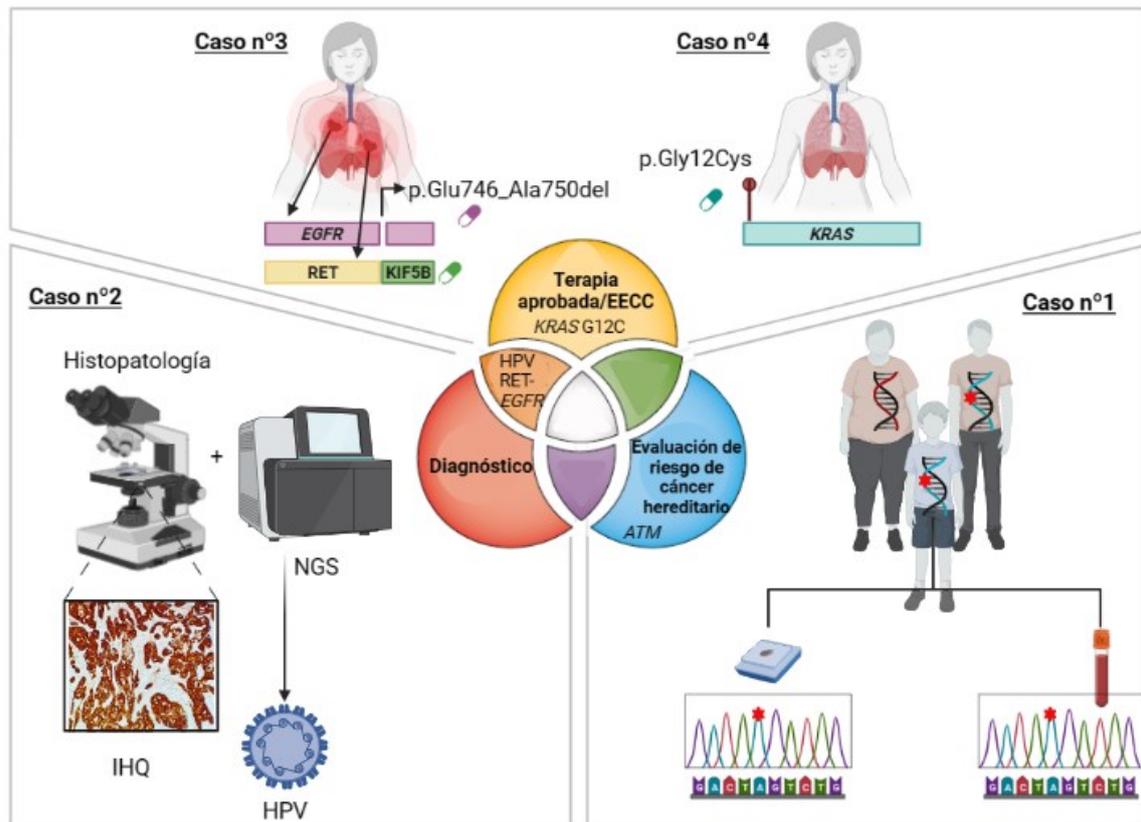


Figura 1.- Aplicaciones de la NGS en los casos clínicos expuestos. EECC, ensayos clínicos. IHQ, inmunohistoquímica, HPV, *human papillomavirus*. Adaptada de Chakravarty, D.; Solit, D. 2021. Clinical cancer genomic profiling. *Nature Reviews Genetics*. 22 (8): 483-501.

En conclusión, los avances revolucionarios en las pruebas genómicas han hecho posible el uso rutinario de datos genómicos para guiar el manejo clínico del paciente. Las enormes innovaciones en oncología molecular han impulsado la medicina de precisión y, al mismo tiempo, han generado nuevos desafíos, como determinar cómo procesar, almacenar y administrar grandes cantidades de datos de secuenciación, determinar cómo interpretar y priorizar los hallazgos moleculares, y la coordinación de profesionales de la salud de múltiples disciplinas. La oncología de precisión sigue siendo un campo dinámico, ya que tanto la tecnología molecular como sus aplicaciones continúan evolucionando rápidamente [18]. Las nuevas tecnologías de diagnóstico y las herramientas bioinformáticas han contribuido a la base de conocimientos de la biología del cáncer, anunciando una nueva era de la medicina oncológica de precisión [10].

Referencias

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71 (3): 209–249.
2. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2022. Las Cifras Del Cáncer En España 2022.
3. The Cancer Genome Atlas Program (TCGA). In National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>
4. Zolotovskaia, M. A. *et al.* 2023. Pan-Cancer Antagonistic Inhibition Pattern of ATM-Driven G2/M Checkpoint Pathway vs Other DNA Repair Pathways. *DNA Repair (Amst)*. 123 (127): 103448.
5. Pe'er, D.; Ogawa, S.; Elhanani, O.; Keren, L.; Oliver, T. G.; Wedge, D. 2021. Tumor Heterogeneity. *Cancer Cell*, 39 (8): 1015–1017.
6. Nalejska, E.; Mączyńska, E.; Lewandowska, M. A. 2014. Prognostic and Predictive Biomarkers: Tools in Personalized Oncology. *Mol. Diagnosis Ther.* 18 (3): 273–284.
7. Lee, Y. T.; Tan, Y. J.; Oon, C. E. 2018. Molecular Targeted Therapy: Treating Cancer with Specificity. *Eur. J. Pharmacol.* 834 (January): 188–196.
8. Biomarker. In National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker>
9. Henry, N. L.; Hayes, D. F. 2012. Cancer Biomarkers. *Mol. Oncol.* 6 (2): 140–146.

10. Lassen, U. N.; Makaroff, L. E.; Stenzinger, A.; Italiano, A.; Vassal, G.; Garcia-Foncillas, J.; Avouac, B. 2021. Precision Oncology: A Clinical and Patient Perspective. *Futur. Oncol.* 17 (30): 3995–4009.
11. Paolillo, C.; Londin, E.; Fortina, P. 2016. Next Generation Sequencing in Cancer: Opportunities and Challenges for Precision Cancer Medicine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 76 (August): S84–S91.
12. Zhang, J.; Yao, Y.; He, H.; Shen, J. 2020. Clinical Interpretation of Sequence Variants. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 106 (1): e98.
13. Li, M. M.; Datto, M.; Duncavage, E. J.; Kulkarni, S.; Lindeman, N. I.; Roy, S.; Tsimberidou, A. M.; Vnencak-Jones, C. L.; Wolff, D. J.; Younes, A.; Nikiforova, M. N. 2017. 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. Diagnostics.* 19 (1): 4–23.
14. Kopanos, C.; Tsiolkas, V.; Kouris, A.; Chapple, C. E.; Albarca Aguilera, M.; Meyer, R.; Massouras, A. 2019. VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. *Bioinformatics.* 35 (11): 1978–1980.
15. L. M. Sholl *et al.* 2020. The Promises and Challenges of Tumor Mutation Burden as an Immunotherapy Biomarker: A Perspective from the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J. Thorac. Oncol.* 15 (9): 1409–1424.
16. Frampton, G. M. *et al.* 2013. Profiling Test Based on Massively Parallel DNA Sequencing. *Nat. Biotechnol.* 31 (11): 1023–1031.
17. Angerilli, V.; Galuppini, F.; Pagni, F.; Fusco, N.; Malapelle, U.; Fassan, M. 2021. The Role of the Pathologist in the Next-Generation Era of Tumor Molecular Characterization. *Diagnostics.* 11 (2): 1–15.
18. Brown, N. A.; Elenitoba-Johnson, K. S. J. 2020. Enabling Precision Oncology through Precision Diagnostics. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15: 97–121.
19. Choi, M.; Kipps, T.; Kurzrock, R. 2016. ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* 15 (8): 1781–1791.
20. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). 2023. Genetic / Familial High-Risk Assessment : Breast , Ovarian , and Pancreatic.
21. Massachusetts General Hospital. 2021. Information for Families with a Pathogenic Variant in the ATM Gene.
22. S. da Mata *et al.* 2021. P16 and hpv genotype significance in hpv-associated cervical cancer-a large cohort of two tertiary referral centers. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (5): 1–13.
23. Bhattacharjee, R. *et al.* 2022. Mechanistic Role of HPV-Associated Early Proteins in Cervical Cancer: Molecular Pathways and Targeted Therapeutic Strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 174 (March): 103675.
24. Lechner, M. *et al.* 2013. Targeted Next-Generation Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Identifies Novel Genetic Alterations in HPV+ and HPV- Tumors. *Genome Med.* 5 (5): 49.
25. Morel, A. *et al.* 2019. Mechanistic Signatures of Human Papillomavirus Insertions in Anal Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel).* 11 (12): 1–15.
26. Holmes, A.; Lameiras, S.; Jeannot, E.; Marie, Y.; Castera, L.; Sastre-Garau, X.; Nicolas, A. Mechanistic Signatures of HPV Insertions in Cervical Carcinomas. *npj Genomic Med.* 2016, 1 (January).
27. Augustin, J. G.; Lepine, C.; Morini, A.; Brunet, A.; Veyer, D.; Brochard, C.; Mirghani, H.; Péré, H.; Badoual, C. 2020. HPV Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: What Is the Issue? *Front. Oncol.* 10 (September): 1–13.
28. Cohen, P. A.; Jhingran, A.; Oaknin, A.; Denny, L. 2019. Cervical Cancer. *Lancet.* 393 (10167): 169–182.
29. Rossi, S.; Toschi, L.; Finocchiaro, G.; Di Noia, V.; Bonomi, M.; Cerchiaro, E.; Ceresoli, G. L.; Beretta, G. D.; D'Argento, E.; Santoro, A. 2019. Impact of Exon 19 Deletion Subtypes in EGFR-Mutant Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With First-Line Tyrosine Kinase Inhibitors. *Clin. Lung Cancer.* 20 (2): 82–87.

30. Kohno, T. *et al.* 2019. KIF5B-RET Fusions in Lung Adenocarcinoma Takashi. *Natl. Institutes Heal.* 18 (3): 375–377.
31. Yang, S. R.; Schultheis, A. M.; Yu, H.; Mandelker, D.; Ladanyi, M.; Büttner, R. 2022. Precision Medicine in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Applications and Future Directions. *Semin. Cancer Biol.* 84 (July 2020): 184–198.
32. Skoulidis, F. *et al.* 2021. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N. Engl. J. Med.* 384 (25): 2371–2381.
33. Rohatgi, A.; Govindan, R. 2022. Targeting KRAS G12C Mutation in Lung Adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 165 (August 2021): 28–33.
34. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2022. Informe de Evaluación SEOM de Sotorasib En Pacientes Con Cáncer de Pulmón No Microcítico (CPNM) Avanzado Con Mutaciones Del Gen KRAS Tipo G12C Que Han Progresado a Al Menos Un Tratamiento Sistémico Previo.
35. BIFIMED: Buscador de la Información sobre la situación de financiación de los medicamentos - Nomenclátor de JUNIO - 2023. In Ministerio de Sanidad. <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/medicamentos.do?metodo=verDetalle&cn=739028>
36. Horak, P. *et al.* 2022. Standards for the Classification of Pathogenicity of Somatic Variants in Cancer (Oncogenicity): Joint Recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). *Genet. Med.* 24 (5): 986–998.
37. Kato, S. *et al.* 2020. Real-World Data from a Molecular Tumor Board Demonstrates Improved Outcomes with a Precision N-of-One Strategy. *Nat. Commun.* 11 (1), 1–9.