

El papel de la secuenciación de nueva generación (NGS) en la identificación de dianas terapéuticas en el cáncer de pulmón.

Laura Ramos Beltrán^{1, 2, a}, Sara Palacios Zambrano^{2, b}

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, Hospital Universitario HM Sanchinarro, 28050, Madrid, España.

a. lramosb2002@gmail.com b. spalacios@hnhospitales.com

Palabras clave: cáncer; NGS; diana terapéutica; variante genética; terapia dirigida

Resumen

El cáncer de pulmón constituye una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial. Esto se debe, en gran parte, a su mal pronóstico, pues se suele diagnosticar en estadios avanzados. Esta detección tardía se relaciona con la baja sensibilidad de los métodos convencionales para identificar el cáncer de manera precoz. La secuenciación de nueva generación (NGS) se presenta como una herramienta innovadora permitiendo un análisis exhaustivo del genoma, siendo capaz de identificar las alteraciones genéticas relevantes. Gracias a esta nueva tecnología se ha podido demostrar la elevada heterogeneidad que presentan los tumores pulmonares, con múltiples variantes genéticas. Las terapias dirigidas surgen para actuar sobre dianas terapéuticas específicas, reduciendo los efectos adversos asociados a los tratamientos convencionales y ofreciendo mejores resultados. La NGS no solo facilita la detección de alteraciones genéticas que coexisten en el microambiente tumoral, sino que además permite adaptar el tratamiento a las características moleculares de cada paciente, impulsando la medicina de precisión. Asimismo, esta herramienta ofrece la posibilidad a los pacientes de acceder a ensayos clínicos, permitiendo que éstos puedan tener acceso a terapias totalmente emergentes e innovadoras, pudiendo verse beneficiados. El objetivo del presente trabajo es realizar la revisión de todos los casos de cáncer de pulmón analizados en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas (LDT) del Hospital HM Sanchinarro desde 2021 hasta la actualidad, con el fin de evaluar cómo la identificación de dianas terapéuticas ha contribuido a mejorar el pronóstico y a ofrecer un tratamiento personalizado al paciente.

Cita: Ramos Beltrán, Laura; Palacios Zambrano, Sara (2025) El papel de la secuenciación de nueva generación (NGS) en la identificación de dianas terapéuticas en el cáncer de pulmón. *dianas* 14 (2): e202509fp05. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202509fp05 <https://dianas.web.uah.es/journal/e202509fp05>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>. DOI <https://doi.org/10.37536/DIANAS>

Copyright: © Ramos-Beltrán L, 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 un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la proliferación excesiva de células anormales, dividiéndose sin control y llegando a diseminarse a otras partes del cuerpo. Mientras que las células normales son capaces de dividirse y morir cada cierto tiempo, las células cancerosas pierden esta capacidad dando lugar a una masa de células cancerosas comúnmente conocida como tumor o neoplasia [1]. El desarrollo del cáncer está relacionado con la acumulación progresiva de mutaciones en diversos genes que regulan funciones esenciales como la división celular, supervivencia, proliferación o invasión, entre otros [2]. A día de hoy, se han identificado más de 1.000 genes alterados en los tumores, lo que permite una caracterización cada vez más precisa de los mecanismos moleculares implicados en las células cancerosas, que contribuyen a la progresión tumoral y diseminación metastásica [3].

La medicina de precisión es un concepto que ha ido desarrollándose a lo largo de los últimos años y que ha tomado gran peso en oncología, debido a la necesidad de desarrollar terapias personalizadas que se ajusten a cada paciente. La integración de los datos clínicos, junto con los anatomopatológicos y moleculares consiguen proporcionar un tratamiento óptimo adaptado al perfil biológico del tumor [4]. En relación a las características moleculares es importante conocer la utilidad de la identificación de biomarcadores en el manejo clínico de los paciente oncológicos.

Un biomarcador se define como una característica biológica que se puede medir de manera objetiva y que sirve como indicador de procesos fisiológicos normales, condiciones patológicas o respuestas del cuerpo a una intervención terapéutica. Los biomarcadores, además de facilitarnos la realización de un diagnóstico, van a permitirnos predecir la evolución de la enfermedad (biomarcador pronóstico), la respuesta a un tratamiento específico (biomarcador predictivo) o el análisis de la progresión de una enfermedad o la efectividad de un tratamiento (biomarcador de monitoreo) [5].

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Según la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) en 2022 se diagnosticaron 18,7 millones de casos nuevos y estiman que dicha cifra llegará a las 32,6 millones en 2050. Además, se estima que en España se alcancen los 296.103 casos en el año 2025 según la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Entre los distintos tipos de cáncer, el de pulmón es de los más frecuentes, siendo el más diagnosticado en el mundo en el año 2022, superando al cáncer de mama. Asimismo, este cáncer se sitúa en el primer cáncer responsable del mayor número de fallecimientos a nivel mundial, por ello, a pesar de su alta frecuencia, debido a su alta mortalidad su prevalencia a los 5 años es relativamente baja [6].

Los tumores pulmonares se dividen histológicamente en dos grandes grupos: carcinomas de células pequeñas (*small cell lung cancer*, SCLC), que representan el 10-15% de los cánceres de pulmón, y carcinomas de células no pequeñas (*non small cell lung cancer*, NSCLC), entre los que se encuentran el carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y carcinoma de células grandes. Los dos primeros son los más frecuentes, ambos están altamente relacionados con el hábito tabáquico y es en ellos donde tiene gran relevancia la identificación de biomarcadores predictivos [7].

Los biomarcadores más relevantes en este tipo de tumores se detallan en la siguiente tabla (Tabla 1).

Gen	Alteración genética	Prevalencia estimada	Fármaco
KRAS	p.G12C	12%	Sotorasib, adagrasib
EGFR	Deleción exón 19, p.L858R	15-50%	Osimertinib, gefitinib, erlotinib, amivantamab, entre otros
	Inserciones exón 20	2%	
	p.T790M (exón 20)	60%	
	Otras	10%	
ALK	Fusión	5%	Alectinib, brigatinib, crizotinib, entre otros
RET	Fusión	1-2%	Pralsetinib, selpercatinib
MET	Pérdida o <i>skipping</i> exón 14	3%	Capmatinib, tepotinib
BRAF	V600	2%	Dabrafenib, trametinib, vemurafenib
ROS1	Fusión	1-2%	Crizotinib, entrectinib
NTRK1, NTRK2, NTRK3	Fusión	<1%	Entrectinib, larotrectinib

Tabla 1.- Biomarcadores más prevalentes en NSCLC metastásico y fármacos aprobados de acuerdo a las guías de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) [8].

Anteriormente, debido al conocimiento limitado que se tenía sobre los genes implicados en el desarrollo del cáncer, se recurría a la secuenciación Sanger para la detección de cambios de un nucleótido o inserciones/deleciones en uno o varios genes específicos. Sin embargo, gracias al avance en la identificación de múltiples genes asociados a distintos tipos de cáncer y considerando la frecuencia con la que se dispone de cantidades limitadas de DNA, la secuenciación de nueva generación (“*Next Generation Sequencing*”, NGS) ha supuesto una verdadera revolución [4].

La NGS es una técnica que permite el análisis simultáneo de amplias regiones genómicas, o incluso del genoma completo, en un tiempo y coste asequible. Mediante esta metodología podemos detectar alteraciones genómicas como inserciones, deleciones, sustituciones, variaciones en el número de copias y reordenamientos genéticos. Esta tecnología ha dado el salto a la práctica clínica, contribuyendo al trabajo de los patólogos en la elaboración de un diagnóstico clínico, además de aportar información respecto al pronóstico y el valor predictivo [9].

Por otro lado, a pesar de la existencia de la secuenciación completa del genoma y del exoma, su uso en la actualidad no es tan frecuente principalmente debido a la dificultad en la interpretación de los resultados. Por ello, se suele recurrir a la secuenciación de un panel de genes específico, reduciendo el número de genes y centrándose en aquellos relacionados con una patología o grupo de patologías determinadas y donde el paciente se pueda ver beneficiado por una determinada terapia [10].

Existen varias plataformas de NGS, siendo las más reconocidas las desarrolladas por las empresas de Illumina y por Thermo Fisher [10]. Sin embargo, independientemente de la tecnología de secuenciación

utilizada, se requiere de un proceso de enriquecimiento dirigido a las regiones genómicas de interés (ROIs). Existen dos principales aproximaciones: las metodologías basadas en amplicones y las basadas en captura híbrida. Ambas metodologías difieren en que, mientras que la NGS basada en amplicones usa cebadores específicos para amplificar los ROIs, en la captura híbrida se lleva a cabo la fragmentación del genoma y utiliza sondas marcadas con biotina para seleccionar estas regiones de interés [11].

Este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión de todos los casos de cáncer de pulmón analizados en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital HM Sanchinarro mediante la tecnología de NGS desde 2021. Asimismo, se propone identificar los biomarcadores más relevantes y frecuentes en este tipo de cáncer, así como evaluar la aplicación clínica de la NGS en el tratamiento del cáncer de pulmón.

Materiales y métodos

El tejido sigue siendo el material de referencia para el estudio de las alteraciones moleculares en el cáncer, por lo que el primer paso es la extracción de ácidos nucleicos partiendo de una muestra de tejido fijado en formol e incluida en parafina (FFPE). Previamente a esto, tras revisar los cortes de tejido teñidos con hematoxilina-eosina, un patólogo se ha encargado de seleccionar el bloque con el mayor porcentaje tumoral y evalúa la necesidad de enriquecer este porcentaje mediante macrodissección. El porcentaje tumoral mínimo requerido para la realización de la secuenciación masiva es del 20%, sin embargo, siempre se puede valorar el caso con el patólogo o biólogo a cargo.

Extracción de ácidos nucleicos

A partir de un número variable de secciones de 5 µm de tejido FFPE, se llevó a cabo la extracción de ácidos nucleicos. Para el aislamiento del DNA, se utilizó el kit de extracción *Cobas DNA Sample Preparation* (Roche Molecular Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por otro lado, para el aislamiento del RNA se empleó el kit *High pure FFPET RNA Isolation* (Roche Molecular Diagnostics) según indica el fabricante.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), pudiendo obtener información respecto a la concentración, calidad y pureza de los ácidos nucleicos. Sin embargo, para garantizar una cuantificación más exacta se utilizó Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

Una vez extraídos los ácidos nucleicos, se llevó a cabo la retrotranscripción del RNA empleando el kit *Ion Torrent NGS Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific), y a partir del DNA y cDNA se prepararon las librerías para la secuenciación.

Preparación de librerías y templado

A pesar de la existencia de la preparación automática de librerías, en este trabajo se realizaron de manera manual. Se partió de 20 ng de material FFPE, tanto de DNA como RNA, y, siguiendo las instrucciones del fabricante, se prepararon las librerías empleando los siguientes paneles: *Oncomine Comprehensive Assay v3*, *Oncomine Comprehensive Assay Plus* y *Oncomine Tumor Mutation Load Assay* (Thermo Fisher).

La generación de estas librerías permite, por un lado, asegurar una cobertura homogénea de la superficie de secuenciación gracias a la digestión de los amplicones de interés. Por otro lado, el uso de oligonucleótidos con secuencias que sirven como identificadores únicos (*barcodes*) unidos a una secuencia universal (adaptadores) facilita su posterior anclaje a la superficie bidimensional en la que se llevará a cabo la secuenciación. Finalmente, mediante la purificación y cuantificación por qPCR de las librerías, conseguiremos tener una mezcla equimolar de éstas con el objetivo de que todas ellas se lean con una cobertura similar [12].

Una vez generadas las librerías, se realizó el templado con el fin de obtener múltiples copias de los amplicones de interés que han sido amplificados. Este proceso se hace por PCR de emulsión de manera automatizada en el *Ion Chef System*, donde también tiene lugar la carga del chip de secuenciación.

Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo con el secuenciador *Ion S5* de Thermo Fisher, utilizando un chip Ion 550 compatible con el sistema *Ion GeneStudio S5*. Debido a que este trabajo abarca todos los casos de cáncer de pulmón desde 2021 hasta la actualidad, se han empleado diferentes paneles. Desde 2021 a mediados de 2023 se estuvieron utilizando dos paneles. En primer lugar, el panel *Oncomine Comprehensive Assay v3* (OCAv3), que permite analizar variaciones en un único nucleótido (SNVs), inserciones y deleciones (indels), variaciones en el número de copias (CNVs) y fusiones más relevantes de 161 genes, pudiendo estudiar los biomarcadores más importantes en el desarrollo del cáncer. Por otro lado, se empleó el panel *Oncomine Tumor Mutation Load Assay*, gracias al cual podemos medir la carga mutacional tumoral (TMB) medida por mutaciones/megabase (Mb). Esta información nos aporta una gran ventaja a la hora de evaluar si el paciente se puede beneficiar o no de la inmunoterapia.

A mediados de 2023 se comenzó a utilizar un único panel, también comercializado por Thermo Fisher, el *Oncomine Comprehensive Assay Plus* (OCA Plus). Este panel integral incluye el estudio de 517 genes, analizando CNVs, SNVs, indels y fusiones entre genes. Adicionalmente, este panel cuenta con el análisis de la inestabilidad de microsatélites (MSI), además del TMB, proporcionándonos información acerca del estado de los genes de reparación de errores de apareamiento (MMR).

Por otro lado, es importante señalar que las fusiones génicas desempeñan un gran papel como impulsores oncogénicos y su detección es esencial para la selección terapéutica, ya que existen actualmente fármacos dirigidos hacia muchas de estas fusiones, lo que podría traducirse en un beneficio clínico para los pacientes.

Respecto al análisis de las fusiones génicas hay que destacar las diferencias que existen dependiendo del material del que se parte, DNA o RNA. A pesar de que ambas moléculas sean válidas para detectar estos reordenamientos, cada una presenta ventajas e inconvenientes. En cuanto al uso del DNA, aunque sea considerada una molécula estable y capaz de detectar estas fusiones, debido a la complejidad del genoma, particularmente de las regiones intrónicas, y la variedad de cambios que pueden ocurrir a nivel de DNA (reordenamientos genéticos y variantes de empalme) es complicado identificar dónde ocurre la fusión en el genoma. Además, diferentes alteraciones en el DNA pueden dar lugar a un mismo resultado funcional en el RNA, como una fusión génica o variante de empalme concreta. Algunos estudios han demostrado por tanto que el análisis basado en RNA presenta mayor sensibilidad respecto al basado en DNA debido a una mayor detección de mutaciones [13].

Asimismo, empleando el RNA se identifican solo aquellos genes de fusión expresados consiguiendo discriminar las isoformas de empalme. Además, a diferencia del DNA, al no verse afectado por las regiones intrónicas, la eficiencia de la secuenciación no se ve perjudicada [14]. Las directrices de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomiendan el uso de la secuenciación basada en RNA para maximizar la detección de fusiones en pacientes diagnosticados con NSCLC. Diversos estudios han confirmado una mayor detección de reordenamientos genéticos con la secuenciación a partir de RNA que de DNA [18]. A pesar de la gran sensibilidad de esta técnica, algunas de sus principales limitaciones sería la inestabilidad del ácido nucleico generándonos falsos negativos [15].

Análisis e interpretación de los datos

Tras la secuenciación, disponemos de una inmensa cantidad de datos generados por la NGS, por lo que es esencial el uso de métodos computacionales para analizar e interpretar estos datos. Gracias al uso de algoritmos y diversas herramientas bioinformáticas somos capaces de procesar los datos en bruto y obtener información biológica significativa [16].

Existen 3 etapas en el análisis bioinformático: análisis primario, el cual se encarga de convertir los datos brutos obtenidos por el secuenciador a secuencias de ácidos nucleicos en ficheros FASTQ, aportándonos información sobre la calidad de cada nucleótido; análisis secundario, donde se produce un filtrado basado en la calidad de las lecturas y el alineamiento de éstas con un genoma o secuencia de referencia, obteniendo un fichero de tipo BAM ("*Binary Alignment/Map Format*"). Además, en esta etapa el equipo es capaz de generar un fichero en formato VCF ("*Variant Calling Format*") tras realizar la identificación de variantes. Tanto el análisis primario como secundario se realizó con el software Ion Reporter (v5.20). Finalmente, en el análisis terciario se realiza la interpretación de las variantes detectadas, identificando aquellas más significativas, y realizando un informe clínico final.

El análisis terciario es el paso más desafiante. En primer lugar, se analizan diversos parámetros acerca de la calidad de la secuenciación; por ejemplo, la longitud de los amplicones generados, las lecturas totales de las muestras, la uniformidad (si se han leído todas las secuencias de manera similar) y la cobertura, definida como el número de veces que es leído cada nucleótido. Por consiguiente, se debe de hacer la identificación de las variantes más relevantes y para ello se hace un primer filtrado eliminando: polimorfismos comunes en la población (teniendo en cuenta la MAF, frecuencia del alelo minoritario), variantes sinónimas y aquellas que tengan una cobertura o una frecuencia alélica limitada.

En cuanto a la clasificación de las variantes, el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) recomienda seguir la siguiente nomenclatura: "patogénica", "probablemente patogénica", "significado incierto", "probablemente benigna" y "benigna" para clasificar aquellas variantes en genes que causan desórdenes mendelianos [17]. Hoy en día existen multitud de bases de datos que nos facilitan a realizar la clasificación de las variantes como son Franklin (<https://franklin.genoox.com/>), VarSome (<https://varsome.com/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), OncoKB (<https://www.oncokb.org/>), cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>), entre otras.

Resultados

El cáncer de pulmón es considerado un reto a la salud pública debido a su mal pronóstico. Esto se debe a que la mayoría de los pacientes (>75%) son diagnosticados con un estadio avanzado de la enfermedad, reduciendo la tasa de supervivencia a los 5 años [18]. Anteriormente las técnicas de inmunohistoquímica

(IHC), hibridación in situ fluorescente (FISH) o la secuenciación Sanger eran las encargadas de identificar las alteraciones genómicas causantes del cáncer; sin embargo, gracias al avance de la NGS la medicina de precisión se ha visto impulsada descubriendo un mayor número de genes involucrados en el cáncer de pulmón y pudiendo ofrecer una terapia dirigida [7].

Este trabajo pretende hacer una revisión de todos los casos de cáncer de pulmón analizados en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital HM Sanchinarro utilizando la tecnología NGS desde principios de 2021 hasta la actualidad.

Análisis de los principales biomarcadores en cáncer de pulmón

En este trabajo se analizaron 98 muestras de cáncer de pulmón recogidas y analizadas entre enero de 2021 y mayo de 2025 mediante la metodología NGS. Respecto a la clasificación histológica, el adenocarcinoma fue el tipo tumoral más frecuente observándose en 81 de las 98 muestras (82,7%), seguido del carcinoma de células escamosas (9,2%). El tipo histológico menos frecuente fue el cáncer de células pequeñas, representando únicamente el 1% del total de las muestras. Por otro lado, hubo un porcentaje que no pudo ser valorado (5 de 98 muestras, 5,1%), bien por carecer de una celularidad tumoral óptima o debido a que la secuenciación no se realizó a la profundidad de lectura necesaria. Además, del total de muestras 66 fueron analizadas utilizando los panel genéticos OCAv3 y TML (67,3%) mientras que 32 muestras fueron estudiadas utilizando el panel OCA Plus (32,7%).

Las alteraciones genéticas más prevalentes fueron las SNVs (81,6%), seguido de los indels (33,7%), CNVs (26,5%) y finalmente fusiones (6,1%). Los genes que estuvieron más frecuentemente mutados fueron *KRAS* (29 de 98 muestras, 29,6%) y *EGFR* (22 de 98 muestras, 22,4%), representando las mutaciones más prevalentes en más de la mitad de las muestras. El resto presentaron mutaciones en genes como *MET* (5 de 98, 7,1%), *PIK3CA* (5 de 98, 5,1%), *ALK* (4 de 98, 4,1%), *BRAF* (4 de 98, 4,1%), *PTEN* (1 de 98, 1%), *POLE* (1 de 98, 1%) y *RET* (1 de 98, 1%) (Figura 1).

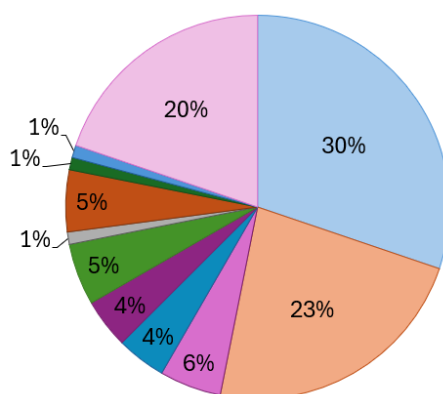


Figura 1.- Frecuencia de las principales mutaciones en muestras de cáncer de pulmón utilizando la metodología NGS. Los porcentajes se calcularon respecto al total de muestras analizadas (N= 98). (■) *KRAS*, (■) *EGFR*, (■) No valorable, (■) *ALK*, (■) *BRAF*, (■) *PIK3CA*, (■) *POLE*, (■) *MET*, (■) *PTEN*, (■) *RET*, (■) Otras.

90 muestras presentaron una o más alteraciones genéticas (91,8%) mientras que cinco de ellas no pudieron ser valoradas y tres no presentaron ninguna mutación. De las muestras mutadas, 11 pacientes presentaron únicamente una mutación (12,2%), 23 presentaron dos mutaciones (25,6%), 30 tres mutaciones (33,3%), 12 presentaron 4 mutaciones (13,3%), 7 cinco mutaciones (7,8%) y finalmente en 7 muestras se observaron seis o más mutaciones (Figura 2A). Además, se observó que las muestras analizadas con el panel OCA Plus presentaron un número mayor de mutaciones, mientras que aquellas estudiadas con OCAv3 mostraron en su mayoría un menor número de alteraciones genéticas, acorde a la diferencia en la cantidad de genes incluidos en cada panel (Figura 2B).

Por otro lado, *TP53* estuvo mutada en la mitad de las muestras (50 de 90, 55,6%), únicamente presentándose como mutación única en 3 muestras de 90 (3,3%). En la mayoría de los casos se presentó junto a otra mutación (47 de 90, 52,2%), mientras que el resto de las muestras no tuvo este gen mutado (40 de 90, 44,4%).

Únicamente 3 muestras no presentaron ninguna alteración de variantes patogénicas o probablemente patogénicas, representando el 3,2% frente al resto de muestras (descartando aquellas no valorables) que representan el 96,8% con alguna alteración genética relevante.

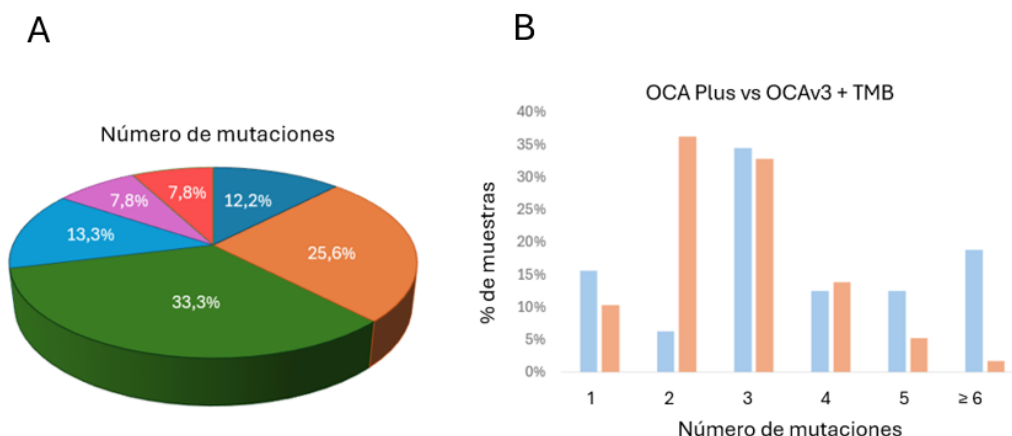


Figura 2.- (A) Distribución del número de mutaciones en 91 pacientes con cáncer de pulmón. () 1 mutación, () 2 mutaciones, () 3 mutaciones, () 4 mutaciones, () 5 mutaciones y () 6 o más mutaciones. (B) Distribución del número de mutaciones dependiendo del panel genético utilizado: () OCA Plus, () OCAv3 + TMB.

KRAS

KRAS fue el gen que estuvo mutado en mayor frecuencia, representando el 29,6% del total de muestras. La gran mayoría de muestras sufrieron un cambio de glicina por uno de cisteína en la posición 12 (G12C, 34%), seguido del cambio de glicina por valina en la posición 12 (G12V, 17%). En menor porcentaje encontramos muestras mutadas en residuos de aspártico (G12D, 20%) y alanina (G12A, 10%), entre otros (Figura 3A).

EGFR

Respecto a las mutaciones en el gen de *EGFR* la gran mayoría se dieron en el exón 19 (7 de 22, 31,8%), seguido de la mutación puntual L858R en el exón 21 (6 de 22, 27,3%). Asimismo, se observaron CNVs en 5 muestras, representando el 22,7%, mutaciones en el exón 20 (3 de 22, 13,6%) y, finalmente, en el exón 21 distintas a L858R (1 de 22, 4,5%) (Figura 3B).

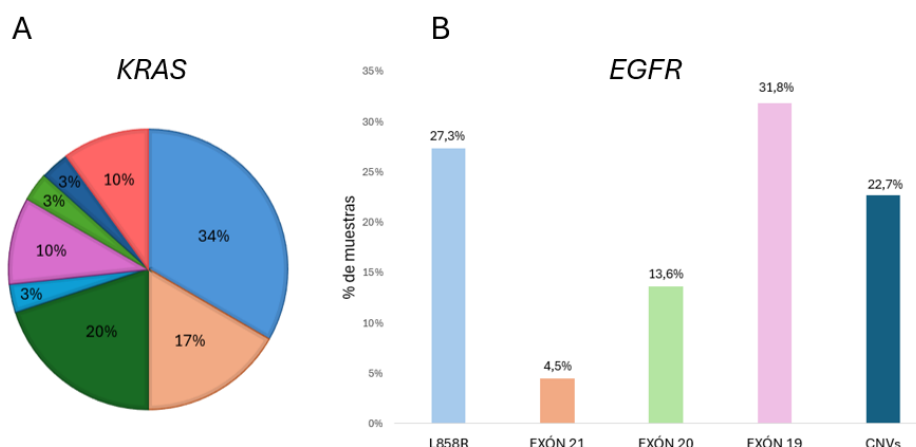


Figura 3.- Distribución de las principales mutaciones en los genes *KRAS* y *EGFR* en muestras de cáncer de pulmón utilizando la metodología NGS. (A) Frecuencia de los subtipos de mutaciones de *KRAS* (N=29) () G12C, () G12V, () G12D, () G12R, () G12A, () G12L, () G13C, () Otros. (B) Frecuencia de los subtipos de mutaciones de *EGFR* (N=22).

En menor porcentaje encontramos mutaciones en las siguientes dianas terapéuticas: *ALK*, *MET*, *BRAF* y *RET*. Se observaron 4 muestras con la mutación en *ALK*, y el 100% de éstas estuvo fusionado con el gen *EML4*. Dos de ellas correspondieron a la variante 1, una a la variante 2 y una muestra no fue posible especificar. Por otro lado, se identificaron 5 muestras portadoras de una alteración genética en *MET*: dos muestras presentaron variaciones en un solo nucleótido, otras dos presentaron la pérdida o *skipping* del exón 14 y una muestra presentó una amplificación del gen (9,38 copias). Las mutaciones en *BRAF* fueron

observadas en 4 muestras; sin embargo, todas presentaron SNVs diferentes a la que suele ser la mutación más frecuente y candidata a recibir un inhibidor específico (V600E). Por último, se identificó una única muestra que presentaba una mutación en *RET*, fusionado con *KIF5B*. Finalmente, la carga mutacional tumoral también fue analizada en 88 de las muestras analizadas (89,8%). 44 muestras (50%) presentaron un TMB bajo, mientras que un 29,5% mostró un TMB intermedio y un 20,5% un TMB alto.

Discusión

Durante las últimas dos décadas, las terapias dirigidas han adquirido un papel cada vez más importante en el tratamiento del cáncer, ofreciendo una alternativa más específica frente a las terapias clásicas, las cuales a pesar de disminuir la mortalidad siguen presentando desafíos como la recurrencia tumoral. A diferencia de los tratamientos clásicos, que se dirigen tanto a células cancerosas como sanas, las terapias dirigidas actúan sobre proteínas o moléculas determinadas, identificando dianas moleculares específicas mejorando la eficacia del tratamiento y reduciendo los efectos adversos [19, 20]. Este éxito ha sido posible gracias al avance tecnológico de la secuenciación, pudiendo conocer con mayor profundidad el perfil mutacional del cáncer y la implicación de diversos genes como impulsores en el desarrollo de los distintos tumores [19]. En el caso del cáncer de pulmón, cuya alta mortalidad se relaciona con un diagnóstico tardío, la identificación de biomarcadores específicos resulta fundamental para un buen abordaje terapéutico [18]. La revisión de los casos de cáncer de pulmón que llegan diariamente al Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital HM Sanchinarro constituye un claro ejemplo de cómo el uso de la NGS permite adaptar la terapia de forma más personalizada ajustándose al perfil molecular de cada tumor.

Respecto a los resultados, el NSCLC fue el tipo histológico predominante, representando casi la totalidad de las muestras analizadas. Además, dentro de este grupo, el adenocarcinoma de pulmón fue el subtipo más frecuente, coincidiendo con ser el tumor pulmonar primario más común en la población. Por otro lado, debido a que el SCLC representa únicamente el 10-15% de todos los cánceres de pulmón y a que, a diferencia del NSCLC, no presenta dianas terapéuticas, en nuestro estudio se vio reflejado representando el 1% del total de muestras [18].

Los carcinomas NSCLC son el grupo de tumores con mayor número de dianas terapéuticas identificadas, algunas con gran utilidad clínica desde los estadios más precoces y es por esto por lo que se considera esencial el estudio de mutaciones en los siguientes genes: *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *MET*, *ALK*, *ROS1*, *NTRK* y *RET*. Además, se han descrito otros biomarcadores de interés en estos pacientes como *HER2*, TMB, inestabilidad de microsatélites (MSI), *NRG1*, *STK11* y *KEAP1* [21, 22].

Las alteraciones genómicas más prevalentes en la revisión fueron aquellas que afectaron a los genes *KRAS* y *EGFR*. Esto concuerda con las recomendaciones de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) para el uso de la NGS en el NSCLC no escamoso avanzado, donde tanto *EGFR* como *KRAS* representan los porcentajes más altos en cuanto a prevalencia [21]. En el estudio se detectaron mutaciones en el gen *EGFR* en el 22,4% de las muestras analizadas, predominando las alteraciones en el exón 19 y seguido de la mutación puntual L858R en el exón 21. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la bibliografía, donde el 90% de las mutaciones de *EGFR* se concentran en estos dos tipos [23]. Las mutaciones de *EGFR* pueden clasificarse en dos grupos: sensibilizadoras, comunes en pacientes con NSCLC y que afectan a mutaciones de los exones 18-21; y resistentes, generalmente ubicadas en el exón 20. Las mutaciones que afectan al exón 19, generalmente delecciones que conservan el marco de lectura son las más frecuentes y se relacionan con la sensibilidad a inhibidores de tirosin-quinasa (*tyrosine kinase inhibitor*, TKI), reforzando su relevancia clínica [24].

El gen *EGFR* regula funciones como el crecimiento, proliferación, supervivencia y la metástasis de las células tumorales, además de estar presente en el 40-89% de los pacientes con NSCLC, lo que lo convierte en una gran diana terapéutica. Por ello, el desarrollo de fármacos para inhibir las vías activadas por el receptor *EGFR* ha sido de interés clínico. Fármacos como erlotinib y gefitinib han sido aprobados como tratamientos de primera línea para el NSCLC, prolongando la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes [25]. Sin embargo, debido al alto grado de heterogeneidad tumoral y a las vías de señalización adaptativas en el cáncer de pulmón provocan que el 4-10% de los pacientes presenten resistencia primaria y hasta el 60% presenten resistencia adquirida (mutación T790M) [21].

La mutación en *KRAS* representó casi el 30% del total de muestras analizadas, siendo la mutación G12C la mayoritaria. Diversos estudios han descrito a *KRAS* como el impulsor oncogénico más común en el NSCLC, estando presente en el 25% de los adenocarcinomas y 3% de los carcinomas de células escamosas. [26]. Además, entre todas las diferentes mutaciones existentes, la mutación G12C es considerada la más común [27]. Sin embargo, debido a la gran heterogeneidad que *KRAS* presenta, el valor pronóstico de las mutaciones sigue sin estar claro. Es también debido a esta heterogeneidad por lo que es complicado obtener buenos resultados en ensayos dirigidos a *KRAS* y la ausencia de terapias dirigidas de primera línea [26]. Los pacientes con la mutación G12C en NSCLC se les administra inmunoterapia como tratamiento de primera línea seguido de quimioterapia. Sin embargo, la baja supervivencia conseguida con estos tratamientos clásicos ha hecho que se potencie la búsqueda para desarrollar tratamientos anti-*KRAS*. El

sotorasib es un inhibidor de *KRAS* G12C aprobado por la Agencia Europea de medicamentos (EMA) en 2022 indicado para pacientes con NSCLC avanzado con mutaciones del tipo G12C del gen *KRAS* después del fallo de al menos un tratamiento sistémico previo [28]. Sin embargo, debido a la ausencia de una terapia dirigida de primera línea contra *KRAS* sigue siendo esencial la búsqueda de nuevos inhibidores.

En menor proporción se observaron mutaciones en los genes *ALK*, *MET*, *BRAF* y *RET*. La presencia de mutaciones en estas dianas terapéuticas va a suponer un beneficio al paciente debido a que existen tratamientos de primera línea dirigidos específicamente a estos genes. En primer lugar, *ALK* pertenece a la familia de los receptores de tirosina quinasa y participa en la regulación del crecimiento celular [29]. En el cáncer de pulmón se han identificado más de 90 genes capaces de fusionarse con *ALK* [30], siendo la fusión *EML4-ALK* de las más prevalentes y representando un evento impulsor en el 5% de todos los casos de NSCLC. La fusión *EML4-ALK* puede originar diferentes variantes estructurales dependiendo del punto de ruptura, siendo las variantes 1 y 3 las más frecuentes [29]. No obstante, los datos que se tienen actualmente sobre la influencia de las distintas variantes en la respuesta a los inhibidores de *ALK* es contradictoria, por lo que aún se desconoce si alguna variante confiere una ventaja terapéutica [31]. Hasta la fecha se han aprobado seis inhibidores de la tirosina quinasa *ALK* (*ALK*-TKI) para uso clínico. Estos fármacos han demostrado mejorar significativamente la supervivencia libre de progresión en comparación con la quimioterapia convencional [29]. En segundo lugar, se observaron mutaciones en el gen *MET*. De las cinco muestras con alteraciones en este gen, dos de ellas presentaban la delección o *skipping* del exón 14, mientras que las restantes correspondían a SNVs o a amplificación génica. Varios estudios han demostrado que pacientes con NSCLC que presentan mutaciones en el exón 14 de *MET* pueden beneficiarse del tratamiento con inhibidores de *MET* como capmatinib y tepotinib, teniendo estos pacientes la posibilidad de utilizar estos fármacos como una opción terapéutica de primera línea. Sin embargo, siguen existiendo desafíos relacionados con la aparición de resistencias adquiridas a los TKIs de *EGFR* y *ALK* lo que subraya la necesidad de estudiar otros enfoques terapéuticos para retrasar o superar esta resistencia [32].

Finalmente, se identificaron mutaciones en dos muestras que afectaban al gen *BRAF* y *RET*. Respecto a *BRAF*, hay evidencias que afirman que los tumores con la mutación V600E se asocian a un peor pronóstico en comparación con los no V600E. No obstante, la EMA aprobó en 2016 el vemurafenib como tratamiento del NSCLC avanzado en pacientes con la mutación *BRAF* V600E, por lo que, aunque sea considerada esta mutación de mal pronóstico, existen este fármaco que se ha visto que presenta una buena supervivencia libre de progresión y una tasa alta de respuesta frente al tratamiento proporcionando buenos resultados [33]. En relación con *RET*, se identificó una fusión de este gen con *KIF5B* en una única muestra, siendo esta la pareja de fusión más frecuentemente descrita en la bibliografía. Al contrario que lo observado en *ALK*, las tasas de respuesta a los inhibidores de multiquinasas en cánceres de pulmón con fusiones de *RET* han sido más bajas, además de asociarse a una mayor toxicidad. Sin embargo, el desarrollo de inhibidores selectivos de *RET*, como selpercatinib o pralsetinib, dirigidos específicamente contra las fusiones *RET* oncogénicas como *KIF5B-RET*, representan una opción terapéutica prometedora para los pacientes con este tipo de mutaciones [34].

Todos estos hallazgos demuestran el valor de la NGS, no solo para la identificación de alteraciones genéticas relevantes, las cuales podrían pasar desapercibidas con otras técnicas convencionales, sino para guiar las decisiones terapéuticas de cada paciente, permitiendo que éstos se beneficien de una terapia totalmente dirigida. En este trabajo hemos comprobado que la mayoría de los pacientes presentan alteraciones en dianas terapéuticas conocidas, muchas de las cuales con un tratamiento dirigido específico ya disponible. Además, la NGS proporciona la posibilidad de incluir a determinados pacientes, que carecen de una terapia aprobada, en ensayos clínicos, ampliando así las oportunidades terapéuticas de estos pacientes [35].

En cuanto al uso de diferentes paneles de NGS, se puede observar que el panel OCA Plus, que analiza 517 genes, permite detectar un mayor número de mutaciones por muestra en comparación con el panel OCA v3, en el que predominan muestras con 2-3 mutaciones. No obstante, a pesar de estas diferencias en la capacidad de detección, ambos paneles incluyen las principales dianas terapéuticas para las cuales ya existen tratamientos dirigidos aprobados o en desarrollo, por lo que resultan igual de válidos en cuanto a la decisión terapéutica. El uso de un panel de genes más amplio puede permitir la detección de mutaciones adicionales que pueden estar implicadas en la evolución tumoral o en mecanismos de resistencia, además de aportar información adicional sobre la heterogeneidad molecular del tumor, pudiendo profundizar más en la elección del tratamiento.

En el estudio, el 5,1% de las muestras no pudieron ser valoradas, principalmente por la baja celularidad tumoral o por una cobertura insuficiente en la secuenciación. Este tipo de limitaciones suele ocurrir en muestras obtenidas mediante biopsia (aguja gruesa o aspiración fina), que en un número bastante considerable de ocasiones son las que se suelen utilizar para realizar NGS. La obtención de este tipo de muestras conlleva riesgos clínicos y pueden requerir la repetición del procedimiento si la NGS falla, retrasando el diagnóstico y el inicio del tratamiento [36]. Ante estas complicaciones, la biopsia líquida se presenta como una alternativa prometedora. Las células tumorales son capaces de liberar DNA tumoral

circulante (ctDNA) a la sangre periférica, pudiendo detectar de manera no invasiva las alteraciones genéticas más relevantes mediante NGS. Esto supone, no solo una mejora para el paciente, sino que también optimiza recursos y tiempos de diagnóstico para el sistema de salud [37].

En conclusión, la NGS representa una herramienta innovadora y altamente prometedora para la identificación de alteraciones genéticas, pudiendo obtener cada vez más información acerca de la complejidad y heterogeneidad tumoral. Su aplicación permite tener un mayor conocimiento sobre el pronóstico del paciente, a la vez que facilita la selección de tratamientos personalizados y abre la posibilidad de incluir a los pacientes en ensayos clínicos según criterios moleculares específicos. Aun así, la investigación sigue siendo fundamental para seguir ampliando el desarrollo de nuevas terapias dirigidas y promover su incorporación en la práctica clínica.

Referencias

1. Fearon, E. R. (1999). Cancer progression. *Current Biology*: CB, 9(23), R873-5.
2. Chakravarty, D., & Solit, D. B. (2021). Clinical cancer genomic profiling. *Nature Reviews. Genetics*, 22(8), 483–501.
3. Swanton, C., Bernard, E., et al. (2024). Embracing cancer complexity: Hallmarks of systemic disease. *Cell*, 187(7), 1589–1616.
4. Calabria, I., Pedrola, L., et al. (2016). El nuevo reto en oncología: la secuenciación NGS y su aplicación a la medicina de precisión. *Anales de pediatría (Barcelona, Spain: 2003)*, 85(5), 273.e1-273.e7.
5. Passaro, A., Al Bakir, et al. (2024). Cancer biomarkers: Emerging trends and clinical implications for personalized treatment. *Cell*, 187(7), 1617–1635.
6. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2025. Las Cifras Del Cáncer En España 2025. Pág 6.
7. J Saller, J., & Boyle, T. A. (2022). Molecular pathology of lung cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 12(3), a037812.
8. Hendriks, L. E., Kerr, K. M., et al. (2023). Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 34(4), 339–357.
9. Cappello, F., Angerilli, V., et al. (2022). FFPE-based NGS approaches into clinical practice: The limits of glory from a pathologist viewpoint. *Journal of Personalized Medicine*, 12(5), 750.
10. Rubio, S., Pacheco-Orozco, et al. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2).
11. Singh, R. R. (2022). Target enrichment approaches for next-generation sequencing applications in oncology. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(7), 1539.
12. López Causapé, C., González Candelas, F., et al. (2021). Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la microbiología clínica. En E. Cercenado Mansilla & R. Cantón Moreno (Eds.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (2.ª ed., pp. 11–12). Madrid.
13. Boyle, T. A., & Bossler, A. D. (2023). RNA sequencing steps toward the first line. *Cancer*, 129(15), 2294–2296.
14. Bruno, R., & Fontanini, G. (2020). Next generation sequencing for gene fusion analysis in lung cancer: A literature review. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(8), 521.
15. Heyer, E. E., Deveson, I. W., et al. (2019). Diagnosis of fusion genes using targeted RNA sequencing. *Nature Communications*, 10(1), 1388.
16. Satam, H., Joshi, K., et al. (2023). Next-generation sequencing technology: Current trends and advancements. *Biology*, 12(7).
17. Richards, S., Aziz, N., et al. (2015). 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. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424.
18. Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and future development in lung cancer diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8661.
19. Waarts, M. R., Stonestrom, A. J., Park, Y. C., & Levine, R. L. (2022). Targeting mutations in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(8).
20. Restrepo, J. C., Martínez Guevara, D., Pareja López, A., Montenegro Palacios, J. F., & Liscano, Y. (2024). Identification and application of emerging biomarkers in treatment of non-small-cell lung cancer: Systematic review. *Cancers*, 16(13), 2338.
21. Isla, D., Lozano, M. D., et al. (2023). Nueva actualización de las recomendaciones para la determinación de biomarcadores predictivos en el carcinoma de pulmón no célula pequeña: Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. *Revista española de*

- patología: publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Anatomia Patologica y de la Sociedad Espanola de Citologia, 56(2), 97–112.
22. Riely, G. J., Wood, D. E., et al. (2024). Non-Small Cell Lung Cancer, version 4.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 22(4), 249–274.
 23. Mosele, M. F., Westphalen, C. B., et al. (2024). Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancer in 2024: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Annals of Oncology*, 35(7), 588–606.
 24. Castellanos, E., Feld, E., & Horn, L. (2017). Driven by mutations: The predictive value of mutation subtype in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 12(4), 612–623.
 25. Leonetti, A., Sharma, S., Minari, R., Perego, P., Giovannetti, E., & Tiseo, M. (2019). Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 121(9), 725–737.
 26. Judd, J., Abdel Karim, N., et al. (2021). Characterization of KRAS mutation subtypes in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(12), 2577–2584.
 27. Lee, A. (2022). Sotorasib: A review in KRAS G12C mutation-positive non-small cell lung cancer. *Targeted Oncology*, 17(6), 727–733.
 28. 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. Seom.org. Recuperado el 12 de junio de 2025, de
 29. Elshatlawy, M., Sampson, J., Clarke, K., & Bayliss, R. (2023). EML4-ALK biology and drug resistance in non-small cell lung cancer: a new phase of discoveries. *Molecular Oncology*, 17(6), 950–963.
 30. Xiang, Y., Zhang, S., Fang, X., Jiang, Y., Fang, T., Liu, J., & Lu, K. (2022). Therapeutic advances of rare ALK fusions in non-small cell lung cancer. *Current Oncology* (Toronto, Ont.), 29(10), 7816–7831.
 31. Sabir, S. R., Yeoh, S., Jackson, G., & Bayliss, R. (2017). EML4-ALK variants: Biological and molecular properties, and the implications for patients. *Cancers*, 9(9), 118.
 32. Spagnolo, C. C., Ciappina, G., Giovannetti, E., Squeri, A., Granata, B., Lazzari, C., Pretelli, G., Pasello, G., & Santarpia, M. (2023). Targeting MET in non-small cell lung cancer (NSCLC): A new old story? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12).
 33. Roviello, G., D'Angelo, A., Sirico, M., Pittacolo, M., Conter, F. U., & Sobhani, N. (2021). Advances in anti-BRAF therapies for lung cancer. *Investigational New Drugs*, 39(3), 879–890.
 34. Chen, M. F., Repetto, M., Wilhelm, C., & Drilon, A. (2024). RET inhibitors in RET fusion-positive lung cancers: Past, present, and future. *Drugs*, 84(9), 1035–1053.
 35. Siu, L. L., Conley, B. A., Boerner, S., & LoRusso, P. M. (2015). Next-generation sequencing to guide clinical trials. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(20), 4536–4544.
 36. Morris, S. M., Subramanian, J., Gel, E. S., Runger, G. C., Thompson, E. J., Mallery, D. W., & Weiss, G. J. (2018). Performance of next-generation sequencing on small tumor specimens and/or low tumor content samples using a commercially available platform. *PloS One*, 13(4), e0196556.
 37. Lin, C., Liu, X., Zheng, B., Ke, R., & Tzeng, C.-M. (2021). Liquid biopsy, ctDNA diagnosis through NGS. *Life* (Basel, Switzerland), 11(9), 890.