

## **Proyecto: Implementación de técnicas de secuenciación de nueva generación a partir de RNA para el apoyo al diagnóstico de tumores infantiles en el HUCA.**

Dirección del proyecto: Dra Milagros Balbín Felechosa  
Laboratorio de Oncología Molecular-IUOPA  
Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA)  
AGC Laboratorio de Medicina  
Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA)

### **Justificación del proyecto y objetivos**

A lo largo de las últimas décadas estamos asistiendo a la generalización de la terminología tipo “medicina de precisión” y “medicina personalizada” para llamar la atención sobre la necesidad de enfocar el tratamiento de la enfermedad del modo más acertado posible en cada paciente. Así, uno de los objetivos principales del programa Horizonte 2020 de la Comisión Europea ha sido adaptar de manera efectiva los enfoques y tratamientos profilácticos, en función del "perfil personal" de un individuo, objetivo que se ajusta en cierto modo a una posible definición de medicina personalizada.

La tecnología de secuenciación genética “masiva” o de segunda generación (NGS), ha sido una de las revoluciones tecnológicas y conceptuales que han permitido abrir esperanzas al conocimiento del perfil genético individual y con ello la posibilidad de la aplicación de tratamientos específicos (Manolio et al 2019), estando este último punto pendiente de avance en la mayoría de las áreas de la medicina aplicada.

En el campo de la oncología, podemos destacar el importante avance en el conocimiento básico del perfil mutacional de los tumores, gracias a los estudios globales realizados por consorcios internacionales como el TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) y el ICGC (*International Cancer Genome Consortium*). Los resultados de estos estudios, publicados en decenas de artículos en los últimos años, han permitido clarificar algunos conceptos en la tumorigénesis, definir nuevas vías de señalización celular alteradas en la célula tumoral, conocer el importante número de mutaciones que acumulan los tumores, la presencia de firmas mutagénicas, y describir subgrupos específicos de tumores con distintos perfiles genéticos, primeros pasos para poder decidir la terapia más adecuada contra un tumor (Bailey et al 2018; Ding et al 2018; Bignell et al 2010;; Lawrence et al 2014, Watson et al 2013). Y aún reconociendo avances muy significativos en el conocimiento de la genética, epigenética y genómica del cáncer, en nuestra opinión aún estamos solamente “ante la punta del iceberg”.

En relación a los tumores pediátricos, existen diferencias relevantes con los tumores de adultos, que se han ido conociendo recientemente (Grobner et al 2018; Ma et al 2018; Ryall et al 2020), y que se pueden resumir en los siguientes puntos: La frecuencia mutacional y el número de variantes estructurales es menor en los tumores pediátricos que en los adultos, lo que apoya la idea de que las mutaciones se van acumulando con la edad (Stratton et al 2009). En segundo lugar, los tumores pediátricos se caracterizan frecuentemente por una única alteración “driver” o

conductora, y el número de casos que son debidos a variantes patogénicas en línea germinal es mayor que en adultos. En tercer lugar, los genes implicados en el desarrollo tumoral pediátrico pueden ser diferentes que los de los tumores de adultos, y las mutaciones conductoras suelen ser específicas de cada tipo tumoral y no solapan entre diferentes tipos de cáncer, lo que sí suele ocurrir en tumores adultos.

La aplicación de la NGS a nivel clínico se está introduciendo de forma desigual en los Hospitales españoles, ya que implica importantes desafíos, que la rigidez del sistema público impide afrontar de forma ágil y eficaz. Así, se necesita una **inversión económica** importante para afrontar la **nueva tecnología**, se necesita **personal cualificado** con nuevos conocimientos y habilidades técnicas y bioinformáticas que no están presentes en el perfil educativo de la sanidad actual. También significa un reto tanto a nivel técnico como regulatorio, en términos de manejo de datos, interpretación de resultados e información al clínico. Por otra parte, al menos en el campo de la oncología, aunque ya en marcha, aún está pendiente la definición de una cartera de servicios nacional que regule un mínimo de biomarcadores que deberían determinarse en los estudios de caracterización tumoral.

En este escenario, en el Área de Gestión Laboratorio de Medicina del HUCA, en los laboratorios de Genética y de Oncología Molecular-IUOPA hemos llevado a cabo la introducción en la clínica de estudios genéticos con tecnología NGS en distintos niveles en los últimos años. En relación con la oncología, en el Laboratorio de Oncología Molecular hemos aplicado esta tecnología principalmente para los estudios de *predisposición genética a cáncer*, con más de 500 familias analizadas en los últimos tres años. Por otra parte, en la caracterización específica de tumores, recientemente hemos puesto en marcha los estudios de NGS para el apoyo diagnóstico en tumores sólidos de adultos, centrándonos en el melanoma maligno y en los gliomas de adultos, con unos 50 estudios de validación realizados en el año 2021.

Con relación a los tumores pediátricos, tanto hematológicos como otros tumores raros, aún no se ha llegado a implantar el estudio mutacional al diagnóstico de forma rutinaria en nuestro Hospital. Tanto los médicos como otros profesionales implicados en el diagnóstico, en el tratamiento y en el seguimiento de los pacientes pediátricos con estas patologías, **consideramos que es de gran interés y relevancia** implementar la tecnología de secuenciación de los tumores al diagnóstico como forma de **mejorar y personalizar la asistencia**.

Es en este contexto en el que se centra este proyecto, *que forma parte de un objetivo más amplio del Laboratorio de Oncología Molecular para los dos próximos años*, que es la implantación de las técnicas de secuenciación de RNA (*RNAseq*) para caracterización tumoral, y para la validación funcional de resultados de secuenciación de ADN en estudios de predisposición hereditaria a cáncer.

### Los **objetivos concretos del presente proyecto** son

- Utilización de tecnología de secuenciación de RNA (*RNAseq*) dirigida a la caracterización de alteraciones tumorales (fusiones/traslocaciones génicas, cambios en la expresión y variantes patogénicas) en tumores hematológicos pediátricos y otros tumores raros pediátricos.
- Comparación de dos métodos de RNAseq (dirigida con selección de panel de genes o completa) en cuanto a rendimiento, información generada, interpretación de resultados y facilidad de utilización en un laboratorio asistencial.
- Comparación de los datos de RNAseq con los de secuenciación de ADN mediante paneles específicos de genes para cada tipo de tumor.
- Diseño de protocolo de trabajo para implantación de la tecnología en la rutina asistencial

Con estos objetivos se pretende alcanzar el conocimiento técnico específico y funcional que permita a continuación el poder implantar en la rutina del diagnóstico asistencial la caracterización genética de tumores pediátricos mediante NGS-RNAseq.

Los beneficios de la implantación de esta tecnología en la rutina asistencial se pueden resumir en:

- La mejora en el diagnóstico, primer punto clave imprescindible para que la posterior toma de decisiones terapéuticas sea la más adecuada.
- La posibilidad de detectar alteraciones genéticas específicas en cada paciente que sirven como marcadores individualizados de seguimiento de la enfermedad.

### **Plan de trabajo**

El esquema del plan de trabajo para conseguir la realización de los objetivos es el siguiente:

#### Bloque 1

- Solicitud al comité de ética de la investigación de la aprobación del presente estudio.
- Diseño de un consentimiento informado para los padres/madres/tutores para aprobar la realización de los estudios moleculares de validación utilizando muestras recogidas previamente y casos nuevos de forma prospectiva que se encuentran en el banco de tumores o se encuentre depositada en la colección del Laboratorio de Oncología Molecular (LBOM) del HUCA, como muestras sobrantes de diagnóstico.
- Selección del grupo de casos a estudio, entre 8 y 12 casos, en colaboración con los clínicos oncólogos y hematólogos pediatras del HUCA.

#### Bloque 2

- Selección de paneles específicos de RNAseq (técnica 1)

- Selección de estudio comparador de RNAseq completo (técnica 2)
- Preparación de librerías técnica 1 / técnica 2
- Secuenciación de librerías 1 / 2
- Realización de estudios de secuenciación a partir de DNA

#### Bloque 3

- Análisis de los datos bioinformáticos
- Comparación de resultados con estudios estandarizados

#### Bloque 4

- Diseño del protocolo de trabajo asistencial.

Propuesta de calendario para la realización de los distintos bloques del plan de trabajo

Bloque 1 Mes 1-3

Bloque 2 Mes 4-8

Bloque 3 Mes 9-11

Bloque 4 Mes 12

La **financiación** irá dedicada a compra de reactivos / compra de servicios para completar estudios del laboratorio y estudios estandarizados

Kits de reactivos para RNAseq (panel de genes) 600€ / muestra x 16 = 9600 €

Secuenciación RNAseq completa: 800€ /muestra x 12 = 9600 €

Reactivos/servicios de secuenciación a partir de DNA = 9000 €

#### **Equipo de trabajo**

Equipo del Laboratorio de Oncología Molecular-IUOPA: Consta de 2 facultativos, 3 Titulados Superiores y 4 técnicos de laboratorio. Varios miembros del equipo tienen experiencia en la preparación, manejo y secuenciación de librerías con metodología NGS para secuenciadores *MiSeq* de *Illumina*. Un miembro del equipo tiene experiencia en desarrollo y aplicación de líneas de trabajo bioinformáticas para el análisis de datos de RNAseq. Contamos con la colaboración y asesoramiento del equipo del Dr Xose A. Suárez Puente, catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Oviedo y con amplia experiencia en análisis genómico del cáncer y con quien realizamos estudios de colaboración de forma habitual referencias xxx).

Para la selección y discusión de casos a estudio: colaboración con los pediatras oncólogos y hematólogos del HUCA.

Consideramos necesaria la incorporación de un investigador para dedicación amplia al proyecto. Dado que el grupo disfruta de financiación por parte de la Fundación Caja Rural, de Asturias se solicitará la contratación de personal investigador con cargo al convenio con Caja Rural.

## Resumen

El desarrollo de este proyecto, con vocación traslacional, permitirá evaluar la utilidad, en el contexto de un laboratorio de diagnóstico clínico, de las técnicas de secuenciación masiva a partir de RNA para la identificación de alteraciones somáticas que puedan emplearse para el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento de enfermedad mínima residual en pacientes oncológicos pediátricos.

Los datos obtenidos con este proyecto permitirán evaluar la aplicabilidad de esta tecnología compleja en el ámbito hospitalario, lo que implica una cercanía con el clínico responsable del paciente, una ayuda en la interpretación de los resultados y una evaluación continua de la efectividad de estos estudios.

Este proyecto contribuirá además a la formación de personal especializado en el análisis e interpretación de este tipo de técnicas tan novedosas, una de las necesidades más relevantes hoy en día en nuestro sistema sanitario.

## Referencias

Trabajos del grupo y colaboraciones relacionadas con estudios de secuenciación.

- Oshima K, Zhao J, Pérez-Durán P, Brown JA, Patiño-Galindo JA, Chu T, Quinn A, Gunning T, Belver L, Ambesi-Impiombato A, Tosello V, Wang Z, Sulis ML, Kato M, Koh K, Paganin M, Basso G, Balbin M, Nicolas C, Gastier-Foster JM, Devidas M, Loh ML, Paietta E, Tallman MS, Rowe JM, Litzow M, Minden M, Meijerink J, Rabadan R & Ferrando A. Mutational and functional genetics mapping of chemotherapy resistance mechanisms in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Nature Cancer* 2020; 1: 1113–1127.
- Gutiérrez-Abril J, Santamaría I, Pitiot AS, Gutiérrez-Fernández A, Alvarez-Eguiluz Á, Vicente JM, Sanzo C, González-Muñiz S, Balbín M, Puente XS. A t(1;9) translocation involving CSF3R as a novel mechanism in unclassifiable chronic myeloproliferative neoplasm. *Haematologica*. 2017 Dec;102(12):e510-e513.
- Fernández-Martínez L, Villegas JA, Santamaría Í, Pitiot AS, Alvarado MG, Fernández S, Torres H, Paredes Á, Blay P, Balbín M. Identification of somatic and germ-line DICER1 mutations in pleuropulmonary blastoma, cystic nephroma and rhabdomyosarcoma tumors within a DICER1 syndrome pedigree. *BMC Cancer*. 2017 Feb 21;17(1):146.
- Valdés-Mas R, Gutiérrez-Abril J, Pitiot AS, Santamaría I, Puente DA, Muñiz Lobato S, Balbín M, Puente XS. Transplacental transfer of essential thrombocythemia in monozygotic twins. *Blood*. 2016; 128(14):1894-1896.
- Oshima K, Khiabani H, da Silva-Almeida AC, Tzoneva G, Abate F, Ambesi-Impiombato A, Sanchez-Martin M, Carpenter Z, Penson A, Perez-Garcia A, Eckert C, Nicolas C, Balbin M, Sulis ML, Kato M, Koh K, Paganin M, Basso G, Gastier-Foster JM, Devidas M, Loh ML, Kirschner-Schwabe R, Palomero T, Rabadan R, Ferrando AA. Mutational landscape,

clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Oct 4; 113 (40): 11306-11311.

- Palomero T, Couronné L, Khiabani H, Kim MY, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, Carpenter Z, Abate F, Allegretta M, Haydu JE, Jiang X, Lossos IS, Nicolas C, Balbín M, Bastard C, Bhagat G, Piris MA, Campo E, Bernard OA, Rabadan R, Ferrando AA. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet*. (2014) Feb;46(2):166-70

Otras referencias citadas en el texto

Bailey et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations 2018, *Cell* 173, 371–385

Bignell, G., Greenman, C., Davies, H. et al. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature* 463, 893–898 (2010). <https://doi.org/10.1038/nature08768>

Ding et al. Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. *Cell* 2018; 173, 305–320

Gröbner, S. N. et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):321-327. doi: 10.1038/nature25480.

Lawrence, M. S. et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumor types *Nature* 505, 495–501 (2014).

Ma, X. et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):371-376. doi: 10.1038/nature25795.

Manolio TA et al. Genomic Medicine. Opportunities, resources, and techniques for implementing genomics in clinical care. *The Lancet* 2019; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31140-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31140-7)

Ryall S et al. Integratd Molecular and Clinical Analysis of 1,000 Pediatric Low-Grade Gliomas. *Cancer Cell* 2020; 37: 569–583.

Stratton MR et al. The cancer genome. *Nature* 2009; 458: 719-724

Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet*. 2013 Oct;14(10):703-18.