



DR. FERRAN LOSA



Oncólogo médico, especialista en tumores digestivos y COD. Jefe de Servicio del Hospital de Sant Joan Despí y Jefe de Proceso Asistencial de Oncología Médica del ICO-Hospitalet en Barcelona. Fundador y presidente del Grupo Español en Cáncer de Origen Desconocido (GECOD).



NANOSTRING: ¿EN QUÉ CONSISTE Y QUÉ NOS OFRECE?

La tecnología Nanostring permite cuantificar digitalmente moléculas de RNA, DNA y proteínas directamente gracias a un sistema de identificación mediante un código de colores asociado a cada molécula.

Este sistema de análisis digital utiliza dos pares de sondas específicas que se hibridan directamente con la muestra del ácido nucleico, eliminando reacciones enzimáticas que podrían introducir sesgos en los resultados. Una es la llamada *sonda reporter*, que está marcada con seis fluorocromos de cuatro colores diferentes, y cuya combinación dispuesta en serie de éstos da lugar a un “código de color” único para cada diana. La *sonda capture* está conjugada con biotina, y se usa para la inmovilización del complejo sonda/diana en el cartucho recubierto con estreptavidina.

Entre sus muchas aplicaciones, destaca el análisis cuantitativo de la expresión génica, por no necesitar retrotranscripción ni amplificación posterior. Esto hace que esta tecnología sea ideal para estudios en donde el ácido nucleico es aislado de muestras con componentes que favorecen su degradación como, por ejemplo, los bloques de biopsia FFPE, puesto que la detección es directa y sólo precisa de 100 nucleótidos continuos. Además, es capaz de multiplexar hasta 800 marcadores en una sola muestra, permitiendo obtener una gran cantidad de información de forma coherente y reproducible a partir de bajas cantidades de RNA.

NanoString ofrece la posibilidad de realizar determinaciones de cualquier gen de interés. Es posible personalizar estas sondas, llamadas CodeSets consistentes en una pareja de sondas que hibrida específicamente con un determinado gen de manera directa y que incluye la *sonda reporter* y la *sonda capture*.

Los códigos de barras moleculares son secuencias de colores. Con esta secuencia de colores podemos marcar diferentes moléculas. Estas moléculas pueden ser RNA, DNA o proteínas. Una vez tenemos una muestra, comprobamos que todas las moléculas de esa muestra quedan marcadas y veremos a través del microscopio cómo están todas las moléculas marcadas. Por tanto, con un microscopio podemos visualizar los códigos de barras y cuantificar las moléculas de una manera digital.

Las sondas las seleccionamos y confeccionamos a partir de secuencias de RNAm. Seleccionamos un tramo de 100 nucleótidos mediante un algoritmo computerizado para que no exista en ningún otro gen. La secuencia de 100 nucleótidos, la dividimos en 2 secuencias de 50. Son las secuencias que van a ser usadas tanto en la *sonda reporter* como *capture*.

Posteriormente sucede el fenómeno de hibridación, consistente en la adhesión de la secuencia de la muestra objetivo a la *sonda reporter* más la *sonda capture*.



Finalmente se realiza el proceso de contar los códigos. Como los códigos han sido asignados a diferentes genes, en realidad lo que se está haciendo es contar genes. Si los códigos han sido pegados a DNA, entonces estamos contando moléculas de DNA. Igualmente, si han sido

pegados a RNA, entonces estamos contando RNA. Y también proteínas si los códigos están pegados a anticuerpos.

RNA:

- determinación de RNA
- determinación de micro RNA
- determinación de fusiones genéticas

(* lo podemos hacer con un límite de detección de una sola célula)

DNA:

- determinación en la variación del número de copias de genes
- determinación de mutaciones a nivel de un solo nucleótido (single nucleotide variation).

Proteínas:

- utilizamos anticuerpos que reconocen las proteínas con una secuencia de DNA pegada. A esa secuencia de DNA se le asocia una sonda RNA Nanostring con código de barras de color.

La tecnología Nanostring permite el recuento de la expresión de hasta 800 genes simultáneamente de una muestra y realizar un análisis bioinformático de los datos y resultados. Permite además analizar los 3 tipos de moléculas (RNA, DNA y proteínas) simultáneamente y reunir los resultados en un solo grupo de datos.

Como aplicaciones de la tecnología Nanostring cabe destacar:

- Instrumentos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento
- Investigación genética
- Desarrollo de tecnología en biología molecular
- Inmunohistoquímica automatizada
- Secuenciación genómica

En el campo de su utilización como herramienta diagnóstica destaca la utilización de la plataforma multigénica Prosigna/PAM50.

The Cancer Genome Atlas (TCGA) analizó las firmas de expresión génica de 525 tumores de cáncer de mama y los agrupó en 4 subtipos intrínsecos. La investigación determinó que hay diversas alteraciones genéticas y epigenéticas que convergen fenotípicamente en los siguientes 4 subtipos intrínsecos principales de cáncer de mama definidos por el PAM50: luminal A, luminal B, HER2 enriquecido y de tipo basal¹,



y mostró una gran concordancia tanto con los análisis de agrupamiento supervisados y no supervisados ($P < 0,001$), lo cual respalda su papel como instrumento sólido para clasificar el cáncer de mama según su subtipo intrínseco^{2,3}.

De acuerdo de las guías de St. Gallen, se debería seguir la clasificación del subtipo intrínseco para recomendar la terapia sistémica. Los subtipos intrínsecos son tipos biológicos y clínicamente diferenciados de cáncer de mama caracterizados por diferentes firmas de expresiones génicas^{4,5}.

Prosigna está indicada para mujeres postmenopáusicas con receptor hormonal positivo y ganglios negativos o ganglios positivos (estadíos I, II ó IIIA) susceptibles de tratarse con terapia endócrina adyuvante. Calcula un valor de Riesgo de Recidiva (ROR) a partir de un algoritmo

basado en la firma genética PAM50, que mide la expresión de 50 genes para clasificar los tumores en 1 de 4 subtipos intrínsecos, el tamaño del tumor, la afectación ganglionar y el

índice de proliferación. El ROR se presenta como un índice numérico en una escala de 0 a 100 que estima la probabilidad de recidiva a distancia en un plazo de 10 años^{6,7}.

También se proporciona la clasificación del riesgo para permitir la interpretación del índice ROR usando puntos de corte relacionados con los resultados clínicos en poblaciones de pacientes estudiadas. Se definen tres grupos de categorías de riesgo (riesgo bajo, intermedio y alto) partiendo del riesgo predicho de recidiva a distancia en un plazo de 10 años⁸. Mide tanto el riesgo de recidiva del cáncer de mama tanto recidiva local como metástasis.