

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR**



**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

# **Heterogeneidad Terapéutica en Cáncer**

Máster Universitario en Bioinformática y Biología  
Computacional

**Autor:** MARTÍN-SERRANO GARCÍA, Guillermo

**Tutor:** AL-SHAHROUR NÚÑEZ, Fátima  
Unidad de Bioinformática,  
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

**FECHA:** Septiembre de 2018



## **ÍNDICE**

### **1. RESUMEN**

### **2. INTRODUCCIÓN**

### **3. OBJETIVOS**

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

1. Selección de muestras a partir de datos de la literatura
2. Obtención del perfil terapéutico de los clones
3. Agrupación de fármacos en familias de drogas

### **5. RESULTADOS**

1. Pacientes, clones y alteraciones
2. Asignación de terapias por clon utilizando PanDrugs
3. Agrupación de fármacos en familias de drogas

### **6. DISCUSIÓN**

1. Pacientes, clones y alteraciones
2. Asignación de terapias por clon utilizando PanDrugs
3. Agrupación de fármacos en familias de drogas
4. Tratamiento detallado del paciente DC4
5. Tratamiento detallado del paciente DC16
6. Tratamiento detallado de los pacientes DC18 y DC20
7. Heterogeneidad terapéutica intertumoral

### **7. CONCLUSIONES**

### **8. BIBLIOGRAFÍA**

### **9. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

## **RESUMEN**

El tratamiento de tumores de forma dirigida supone todavía un reto en la investigación contra el cáncer. Las terapias dirigidas tratan de evitar el desarrollo de la neoplasia mediante el uso de fármacos inhibidores de proteínas relevantes en el desarrollo tumoral. Potenciada por los avances tecnológicos y los estudios de los genomas del cáncer, la oncología de precisión procura adecuar las terapias propuestas al perfil molecular del paciente. Para ello, haciendo uso de las NGS (*Next Generation Sequencing*), se extrae la información mutacional del tumor y en base a estas alteraciones se le recomienda un tratamiento. Sin embargo, pese a ser una de las principales líneas de investigación en el tratamiento del cáncer, por el momento solo ha demostrado su efectividad frente a tumores muy determinados mientras que la mayoría de pacientes han de recurrir a terapias tradicionales.

Uno de los principales obstáculos de la oncología de precisión reside en la heterogeneidad intrínseca que presentan los tumores, la heterogeneidad intratumoral. Este concepto se define como las distintas subpoblaciones celulares, o clones, que aparecen en un mismo tumor a consecuencia de la diferenciación de una o varias fracciones de células, al desarrollar estas alteraciones moleculares distintas a las que presentan el resto de células. Así, esta heterogeneidad tumoral contribuye a que las terapias no sean todo lo eficientes que debieran a causa principalmente de la dificultad en la detección y estimación de las diferentes subpoblaciones así como con la aparición de nuevos clones como consecuencia de la adquisición de mecanismos de resistencia a determinados fármacos. Por lo tanto, en este proyecto se presenta el concepto de la heterogeneidad terapéutica. Este concepto recoge las diferentes posibilidades terapéuticas del paciente, valorando las diferentes subpoblaciones presentes en el tumor y priorizando y prescribiendo terapias acorde a las alteraciones moleculares de cada clon. Además, la heterogeneidad terapéutica debe tener en cuenta las vulnerabilidades de cada clon de manera que la prescripción terapéutica disminuya o retarde la aparición o expansión de clones resistentes.

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster es el estudio de la heterogeneidad terapéutica partiendo del perfil mutacional de diversas muestras extraídas de datos públicos resultantes de estudios de NGS en cáncer, tratando de demostrar nuestra hipótesis inicial que sostiene que, con el diagnóstico adecuado, la heterogeneidad terapéutica es sensiblemente menor que la heterogeneidad mutacional. De este modo, se resaltarán la importancia de la heterogeneidad intratumoral en la oncología de precisión y cómo ésta determina a su vez el posible abordaje terapéutico de la enfermedad en cada paciente.

Para cumplir tal objetivo se parte de los datos genómicos (exoma) de seis pacientes de carcinoma ductal de mama y tras obtener los perfiles mutacionales de cada subpoblación tumoral, se utilizará la metodología apropiada para jerarquizar los distintos fármacos disponibles para el tratamiento de cada clon. Posteriormente, las terapias obtenidas se agruparán en familias de drogas de manera que se pueda comparar el tratamiento indicado para cada paciente. Por último, se propone brevemente el tratamiento recomendado para cada uno de los pacientes.

Tras el estudio de las muestras se comprueba la relevancia de considerar las diferencias moleculares existentes entre las distintas poblaciones celulares presentes en el tumor. Al tener en cuenta la heterogeneidad intratumoral, se puede proponer una terapia ajustada a los distintos clones que aparecen en un mismo paciente, disminuyendo así la heterogeneidad terapéutica y minimizando la aparición de resistencia y la exposición del paciente a la toxicidad propia de los fármacos antineoplásicos.

## **INTRODUCCIÓN**

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países occidentales, sólo superada por las enfermedades cardiovasculares<sup>[1]</sup>. Solo en 2015, fallecieron a causa de esta enfermedad casi 9 millones de personas en todo el mundo, siendo el cáncer la causa de una de cada seis muertes registradas<sup>[2]</sup>. Históricamente, el tratamiento de esta enfermedad, se ha realizado teniendo en cuenta las características clínicas del paciente, junto con los rasgos histológicos del tumor<sup>[3]</sup> siendo en general la cirugía para la extirpación del tumor la terapia contra el cáncer más extendida seguida por la radioterapia<sup>[4]</sup> y la quimioterapia<sup>[5]</sup>, aunque no son las únicas terapias que se emplean en la actualidad<sup>[6-7]</sup>.

Uno de los principales avances médicos durante los últimos años ha sido el desarrollo y la implantación clínica de nuevas terapias dirigidas, consistentes en el uso de moléculas que inhiben la actividad de proteínas relevantes en el desarrollo del tumor. Estos tratamientos se han visto favorecidos por el desarrollo de la tecnología de secuenciación de última generación (o NGS, por sus siglas en inglés, *Next Generation Sequencing*), que permite la identificación sistemática y eficiente de biomarcadores<sup>[8]</sup>. Esta tecnología nos permite secuenciar el genoma (DNAseq) o transcriptoma (RNAseq) de una población celular de una forma rápida, barata y sencilla<sup>[9]</sup>. Además permite obtener información sobre los sitios de unión entre DNA y proteína (ChIPseq) o información sobre el metiloma (mediante la secuenciación por bisulfito). También es relevante mencionar el lanzamiento de proyectos como el *International Cancer Genome Consortium* (ICGG) o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Estos proyectos tienen como objetivo caracterizar los genomas de los diferentes tipos de cáncer determinando los genes frecuentemente alterados, qué mutaciones actúan como conductoras (o *drivers*) en la iniciación y progresión del tumor y cuáles como pasajeras (o *passengers*) o las frecuencias mutacionales, entre otros objetivos. Para ello utilizan decenas de miles de muestras tumorales de pacientes, generando así una base de datos que contiene información relativa a las mutaciones que aparecen en esta enfermedad<sup>[10-11]</sup>, entre otro tipo de datos (de expresión, metilomas...). Este conocimiento permite una mejora en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, aplicando lo que hoy en día se conoce como oncología de precisión.

La oncología de precisión, por lo tanto, pretende personalizar los tratamientos antitumorales, utilizando los datos y la información obtenida de los proyectos de los genomas del cáncer con el fin de seleccionar un tratamiento individualizado para cada paciente, en base a su perfil genómico y a las mutaciones que éste acumula. Es un hecho que no todos los fármacos antitumorales son eficientes en todos los pacientes. De esta manera, el fin último de la oncología de precisión consiste en seleccionar una terapia para tratar al paciente en función de su perfil mutacional (que podrá ser diferente al perfil de otros pacientes), aumentando las probabilidades de éxito del tratamiento<sup>[12-13]</sup>.

Sin embargo, uno de los principales problemas que presenta la oncología de precisión reside en la heterogeneidad intrínseca que presentan los tumores. No se trata de las diferencias presentes entre tumores de la misma naturaleza desarrollados en distintos pacientes (a la que nos referimos como heterogeneidad intertumoral), ya que el planteamiento actual de la medicina personalizada se centra en atajar estas diferencias. Se trata, en este caso, de las diferencias mutacionales, o clones que se desarrollan dentro de la población de células tumorales que aparecen en un mismo paciente. Esta última, es la que se conoce como heterogeneidad intratumoral<sup>[14-17]</sup>. Así, la heterogeneidad intratumoral se define como las distintas subpoblaciones de células, o clones, que aparecen en un mismo tumor, como consecuencia de la diferenciación de una o varias fracciones de células al desarrollar alteraciones moleculares distintas a las que presenta el resto de la población tumoral.

Pese a los grandes avances acontecidos en el campo de la oncología clínica, tanto por la aparición de la medicina personalizada, como por el aumento del número de terapias disponibles, la heterogeneidad intratumoral contribuye notoriamente en el aumento de la resistencia del cáncer a determinados fármacos, provocando que las terapias no sean todo lo eficientes que podrían ser en caso de que las diferencias entre las distintas poblaciones tumorales se tuviesen en cuenta, como señalan numerosos estudios<sup>[3, 18-21]</sup>.

Esta heterogeneidad intratumoral, por lo tanto, puede traducirse en una heterogeneidad terapéutica intratumoral. Este concepto recoge las diferentes posibilidades terapéuticas teniendo en cuenta las diferencias mutacionales dentro de la subpoblación clonal presente en el tumor de un mismo paciente. De este modo, la heterogeneidad terapéutica debe tener en cuenta las vulnerabilidades de cada subpoblación clonal en el tumor y podrá implicar la prescripción de terapias, en combinación o secuencial, que disminuyan o retarden la aparición o expansión de clones resistentes a los fármacos. Por lo tanto, un abordaje terapéutico que tuviese en cuenta esta heterogeneidad clonal (inicialmente la molecular y posteriormente la terapéutica) permitiría aumentar las probabilidades de éxito del tratamiento<sup>[19]</sup>.

Así pues, el tratamiento de la heterogeneidad clonal intratumoral requiere en primer lugar caracterizar las distintas subpoblaciones tumorales presentes en el paciente. Para ello, existen dos alternativas: uno de los métodos más comúnmente utilizado hoy en día es el *single-cell sequencing*<sup>[22-28]</sup>. Esta técnica permite obtener un perfil de expresión (secuenciación de ARN) o un perfil mutacional (secuenciación de el ADN completo (genoma), o más comúnmente, solo sus regiones codificantes (exoma)) de una célula individual<sup>[29-30]</sup>. Tras obtener los perfiles de cada célula tumoral, éstas pueden ser agrupadas en subpoblaciones celulares, o clones, que comparten un mismo perfil genético o de expresión. Otro abordaje posible para obtener esta información se basa en inferir la evolución clonal a partir las alteraciones halladas al secuenciar un conjunto de células a la vez (o *bulk sequencing*) y las frecuencias de estas mutaciones<sup>[31]</sup>. Tras establecer las distintas subpoblaciones del tumor, se debería proponer el tratamiento más preciso posible para cada uno de estos clones. Para este último paso, es necesario utilizar una metodología<sup>[32]</sup> que permita jerarquizar los distintos fármacos propuestos en función de los perfiles mutacionales de los pacientes.



## **OBJETIVOS**

Este proyecto pretende remarcar la relevancia de la heterogeneidad intratumoral, y cómo ésta determina a su vez el posible abordaje terapéutico que varía en función de dicha heterogeneidad, propia de cada paciente. A partir de datos de NGS y utilizando herramientas de computación se permitirá describir un perfil terapéutico de distintos pacientes. De esta manera se podrá comprobar el peso de las diferencias intratumorales en la heterogeneidad terapéutica, o en cómo varían los tratamientos propuestos en función de las distintas subpoblaciones celulares descritas. Así pues, podríamos comprobar si nuestra hipótesis inicial, que sostiene que pese a las diferencias moleculares existentes en las distintas subpoblaciones, si los perfiles mutacionales se tienen en cuenta para el diagnóstico, la heterogeneidad terapéutica será sensiblemente menor.

Por lo tanto, el objetivo principal de este proyecto de fin de máster será el de obtener un perfil de heterogeneidad terapéutica partiendo de un perfil mutacional de distintas muestras. Estas muestras serán obtenidas a partir de datos públicos adquiridos de experimentos de NGS en distintos tipos de cáncer. Para ello, se realizará una búsqueda exhaustiva en la literatura y una posterior selección de los datos de partida. Tras la extracción de los perfiles mutacionales, se procederá a obtener los distintos perfiles terapéuticos utilizando herramientas bioinformáticas y por último se ordenarán y visualizarán los resultados para su posterior discusión. Así pues, se esperaría poder discriminar entre fármacos que ataquen a todas las poblaciones tumorales y fármacos cuya diana sean específicamente subpoblaciones de dicho tumor. Todo ello, permitiría, al tener en cuenta la heterogeneidad intratumoral y terapéutica, personalizar aún más el tratamiento recomendado a cada paciente.

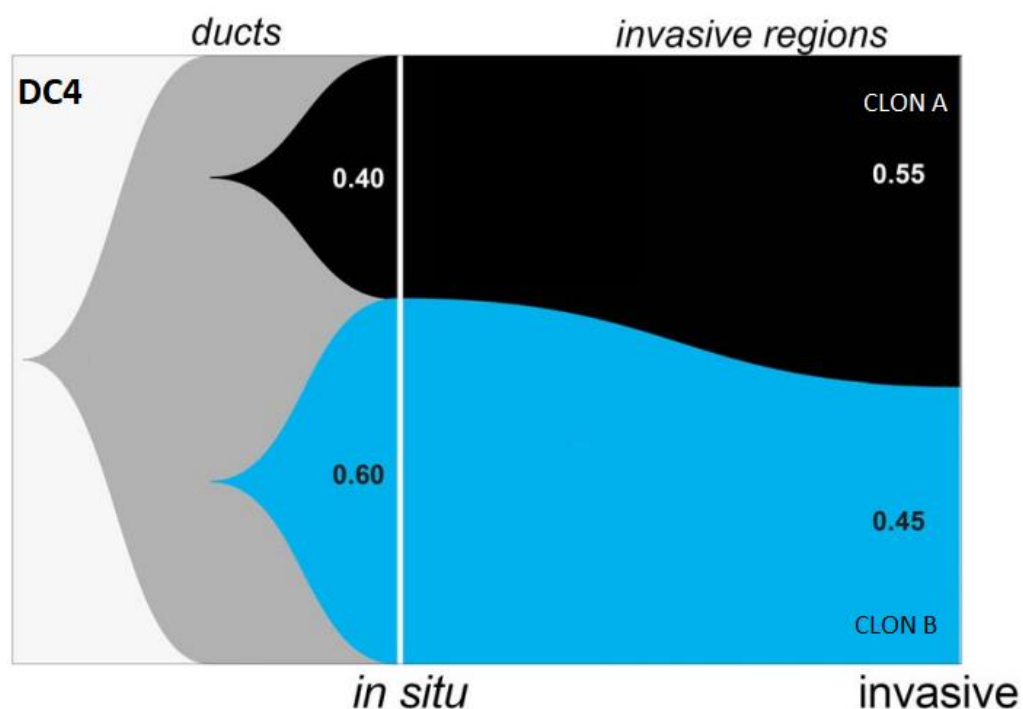
## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 1. Selección de muestras a partir de datos de la literatura

El primer paso del presente estudio, es la selección de las muestras idóneas para estudiar la heterogeneidad terapéutica. Para ello, se planteó la búsqueda en la literatura de distintos proyectos que, estudiando heterogeneidad tumoral, incluyesen datos públicos. Específicamente, durante la primera selección de estudios se priorizaron aquellos que hubiesen utilizado tecnología de secuenciación de células individuales (o *single-cell sequencing*) para identificar mutaciones somáticas de cada célula secuenciada, dentro de un mismo paciente<sup>[24, 30, 33-34]</sup>. Esto permitiría agrupar las células en subpoblaciones clonales que comparten un perfil mutacional. De esta manera, se determinaría la heterogeneidad intratumoral a partir de las subpoblaciones celulares existentes y se estudiarían las posibles dianas terapéuticas de cada subpoblación para poder estimar la heterogeneidad terapéutica.

Tras la revisión de 18 artículos susceptibles de ser analizados (la información relativa a estos artículos se puede consultar en el material suplementario; Tabla S1) se seleccionó el estudio de Casasent y colaboradores<sup>[35]</sup> por dos motivos principales: en primer lugar, este trabajo analiza en detalle la clonalidad de un número mayor de pacientes (n=10) comparado con el resto de estudios de la literatura. 6 de estos 10 pacientes muestran la heterogeneidad intratumoral necesaria para este proyecto. Por otro lado, infieren la evolución clonal presente en las distintas muestras, agrupando así las distintas subpoblaciones celulares, facilitando el manejo de datos, reduciendo su volumen y su complejidad. En este estudio de Casasent et al. se plantean el objetivo de modelizar la evolución que sigue un carcinoma ductal de mama, pasando de ser un carcinoma *in situ* a un tumor invasivo. Se concluye que la evolución del tumor sigue un modelo multiclonal, en el que algunas células desarrollan mutaciones que les facilitan la salida de los ductos y la migración a tejido adyacente. Para ello, secuencian el exoma de distintas células tumorales, en pacientes que presentan ambos tipos de tumor (*in situ* e invasivo). Así pues, utilizando el software TimeScape (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/timescape.html>) generan un

gráfico (Figura 1) en el que resumen la evolución clonal en cada paciente. En estos gráficos (también conocidos como *fish plots* o *muller plots*), como se puede observar en la Figura 1, se evidencia la existencia de distintas subpoblaciones en un mismo tumor. En este tipo de gráficos, el eje X suele representar la evolución cronológica del tumor. En este caso en concreto, representa la localización de los clones, en función de si se encuentra en tejido *in situ* (a la izquierda de la gráfica) o en el tejido invasivo (a la derecha de la misma). En el eje Y, se representa la fracción celular que representa cada subpoblación con respecto al total del tumor. Por lo tanto, siguiendo el ejemplo de la figura 1, podemos ver como en el paciente DC4 existen dos poblaciones (clon A y clon B) y cómo a medida que el tumor migra, se va enriqueciendo la fracción celular representada por el clon A (pasando de un 40% a un 55% de las células tumorales). Estos conceptos son relevantes a la hora de recomendar uno u otro tratamiento a los pacientes, pues en función de la fracción celular que represente cada clon o la tendencia que siga (creciente o decreciente), podrá ser más beneficioso inhibir a uno u otro clon.



**Figura 1.** Ejemplo de gráfico de clonalidad. En él se representa la fracción celular que representa cada clon con respecto al total de células tumorales, dependiendo de la zona tumoral estudiada (el tumor *in situ* o el tumor invasivo). Imagen modificada de Casasent et al. (2018).

Cabe destacar que las muestras fueron tomadas antes de cualquier tratamiento. Esto permite descartar que las alteraciones estudiadas provengan del desarrollo de resistencia a los fármacos empleados en una primera instancia. De este modo, solo contamos con mutaciones desarrolladas intrínsecamente por la población tumoral.

Por lo tanto, partimos de los datos de 6 pacientes (DC4, DC13, DC14, DC16, DC18 y DC20) que cuentan con distintas subpoblaciones clonales tumorales (entre 2 y 5 cada paciente), formando un total de 17 clones. A cada uno de estos clones se le asocia una lista de genes alterados que caracterizan a la población clonal. Son estos genes los que marcan la heterogeneidad intrínseca de cada tumor y por lo tanto, los que determinarán el tratamiento propuesto. Estos datos se resumen en la figura 3 consultable en el apartado de resultados (Figura 3) y en el material suplementario en formato de tabla (Tabla S2)

## 2. Obtención del perfil terapéutico de los clones

Una vez obtenido el perfil mutacional de los distintos clones, el siguiente paso es la obtención del perfil terapéutico de cada uno de ellos. Para ello, se utilizará la herramienta PanDrugs, recientemente desarrollada por la Unidad de Bioinformática del CNIO<sup>[32]</sup>. PanDrugs es un método para la selección de terapias a partir del análisis de alteraciones moleculares presentes en cáncer. La aproximación metodológica de PanDrugs ha permitido implementar una base de datos dedicada a la identificación de alteraciones moleculares accionables (PanDrugddb). Este método ofrece las terapias que tienen como diana dichas alteraciones, estableciendo una jerarquía en función de criterios como la información biológica o la información sobre la relevancia clínica de los genes alterados entre otros. Esta herramienta también incluye información sobre la familia del fármaco recomendado y su estado de aprobación, agrupándolos en fármacos aprobados, en ensayo clínico o en estado experimental. Asimismo, la herramienta da la información sobre el área patológica de la droga ofrecida, define si se trata de un target directo o un biomarcador de respuesta a tratamiento y también se incluye entre otras cosas, información de resistencia o sensibilidad a

droga y el tipo de alteración molecular. PanDrugs integra datos de 24 fuentes distintas, con los distintos niveles de información antes mencionados, incluyendo datos de estudios experimentales en líneas celulares de cáncer. Actualmente, PanDrugsdb, contiene alrededor de 50.000 asociaciones droga-diana para aproximadamente 5.000 genes y 9.000 fármacos, constituyendo la mayor base de datos de interacciones gen-fármaco de la actualidad, si bien, aún existen genes para los cuales aún no se ha descrito una droga que lo tenga como diana. Por lo tanto, esta herramienta permite jerarquizar los distintos fármacos disponibles, en función del perfil mutacional de cada paciente. En definitiva, PanDrugs establece un ranking para cada paciente, que ordena los distintos fármacos en función de las dianas terapéuticas que presenta dicho paciente. Para ello, utiliza un score calculado en función de i) el estado en el que se encuentra la droga (aprobada, en ensayos clínicos o en fase experimental), ii) el número de bases de datos curadas que avalan la relación entre el fármaco y el gen y iii) las consecuencias de la mutación de dicho gen, su relevancia en el desarrollo del tumor, su esencialidad y las implicaciones clínicas en función de su patogenicidad. A partir de este score, los distintos fármacos se ordenan, estableciendo un ranking de fármacos ordenados de más a menos adecuados para el tratamiento del paciente. Otra ventaja de consideración, es que esta herramienta se ejecuta desde un portal web<sup>[36]</sup>, sencillo e intuitivo, facilitando, el manejo de datos.

Por lo tanto, a través del portal web de PanDrugs, se lanzó una búsqueda para cada clon, introduciendo las alteraciones genómicas presentes en cada uno de ellos (17 búsquedas en total, una por clon). Tras cada búsqueda, el portal permite la obtención de una tabla con el resumen de los resultados, la cual fue descargada para cada una de los clones. En estas tablas, se recoge cada fármaco recomendado para el tratamiento, acompañado de su gen diana, la familia de drogas a la que pertenece y un score que determina el ranking de los distintos fármacos. De este modo, se obtiene una lista jerarquizada de drogas adecuadas para tratar a la subpoblación analizada en ese momento.

### 3. Agrupación de fármacos en familias de drogas

Como se describe en el apartado anterior, PanDrugs devuelve en sus resultados todos los fármacos disponibles en su base de datos (PanDrugsdb) que sugieran la inhibición de la actividad de las proteínas molecularmente alteradas teniendo en cuenta el perfil mutacional del clon. Esto se traduce en una lista de centenares de fármacos por cada clon. Con el fin de reducir el volumen de datos, nuestro siguiente paso fue el de agrupar los fármacos recomendados por PanDrugs en familias de drogas definidas por la base de datos KEGG y el proyecto *Connectivity map*, o *cmap*, del *Broad Institute*<sup>[37-38]</sup>. Para ello se generó una colección de firmas de familias de drogas a partir de PanDrugsdb. Este fichero se puede consultar en el material suplementario (Tabla S3) donde se recoge en cada línea el nombre de la familia de drogas seguido de sus componentes.

Una vez generadas las firmas de familias de drogas, con el fin de agrupar los fármacos indicados por PanDrugs en sus respectivas familias, y con el fin de comprobar qué familias están más representadas en el tratamiento recomendado, se utilizó el software GSEA<sup>[39]</sup>. Este método se aplica frecuentemente para el análisis funcional de datos de expresión génica obtenidos a partir de experimentos de transcriptómica (*RNAseq* o microarrays). Se utiliza para comprobar el enriquecimiento de ciertos conjuntos de genes que comparten una función biológica, localización cromosómica o regulación, en una determinada muestra. Para ello, utiliza una matriz de expresión de genes, o un ranking de los mismos (ordenados en función de su nivel de expresión). Con estos datos, el software evalúa el peso de cada firma en función de cuan representados están sus componentes realizando un test Kolmogorov–Smirnov. Posteriormente calcula la significancia estadística del resultado mediante un test de permutación que devuelve un p-valor. Por último, realiza un ajuste por FDR (False Discovery Rate). De esta manera, determina si una determinada firma está enriquecida en nuestra muestra, o no. En este caso, se utilizó esta metodología para comprobar qué familias de drogas están más enriquecidas en cada clon. Se emplearon las firmas de familias generadas a partir de PanDrugs para saber a qué familia pertenece cada fármaco y al carecer de una matriz de expresión, se utilizaron los rankings de drogas devueltos por PanDrugs para cada uno de los clones. Los distintos

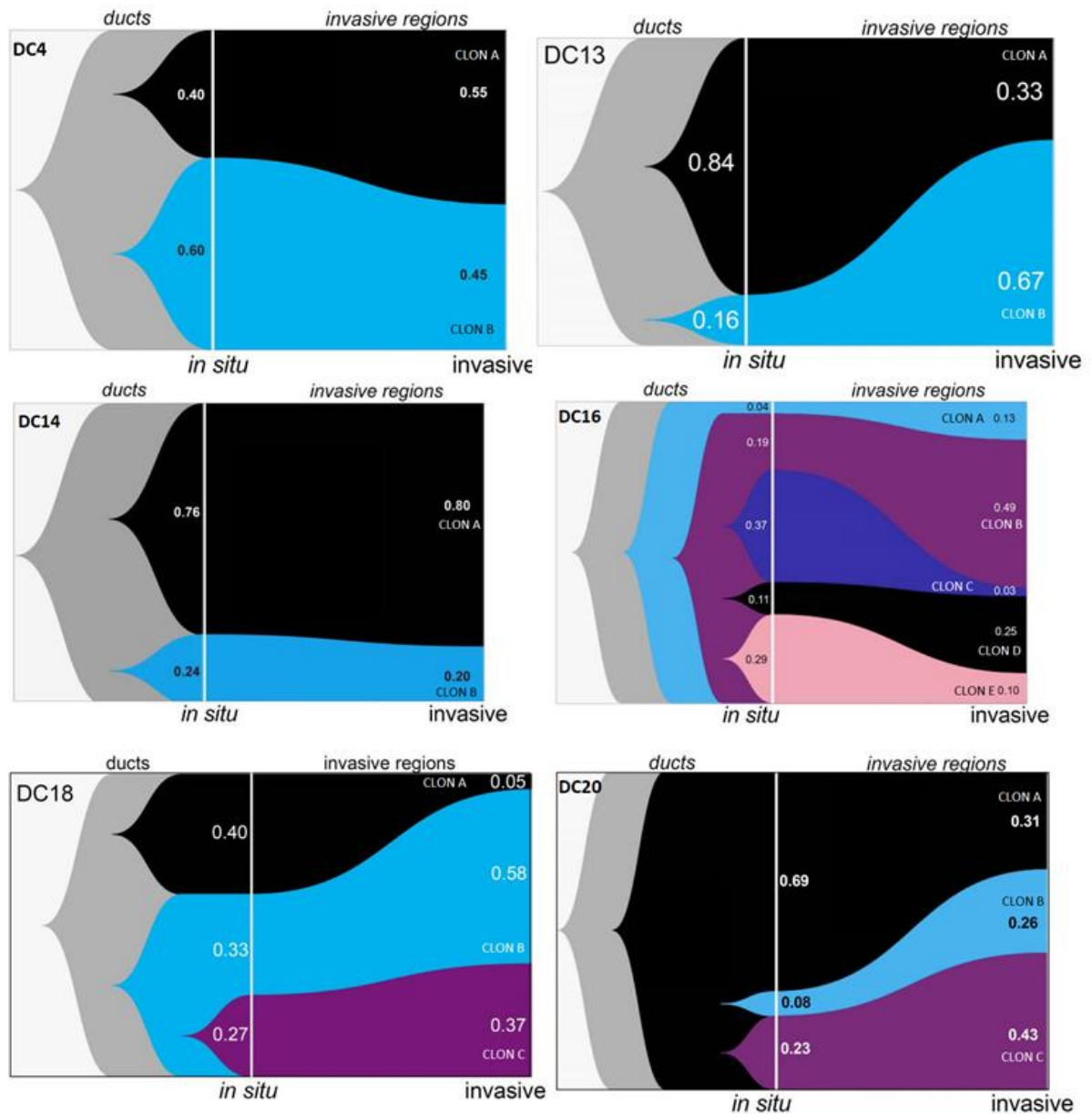
rankings pueden consultarse en el material suplementario (Tablas S4-S20). En cuanto a las familias de drogas, cabe destacar que muchas de estas familias se encuentran compuestas por un único fármaco. Esto provoca que el FDR aumente considerablemente en estos análisis, de manera que se optó por descartar el uso de este estadístico y se trabajó con el p-valor, asumiendo que de esta forma obtenemos una mayor tasa de falsos positivos. Así pues, tras ejecutar el programa, se obtuvo una lista en la que se resume qué familias de drogas están enriquecidas en los resultados de PanDrugs para cada clon. Estos resultados sugieren qué familias pueden ser más efectivas para tratar a cada subpoblación tumoral, y qué fármacos son los que más contribuyen a ello.

## **RESULTADOS**

### 1. Pacientes, clones y alteraciones

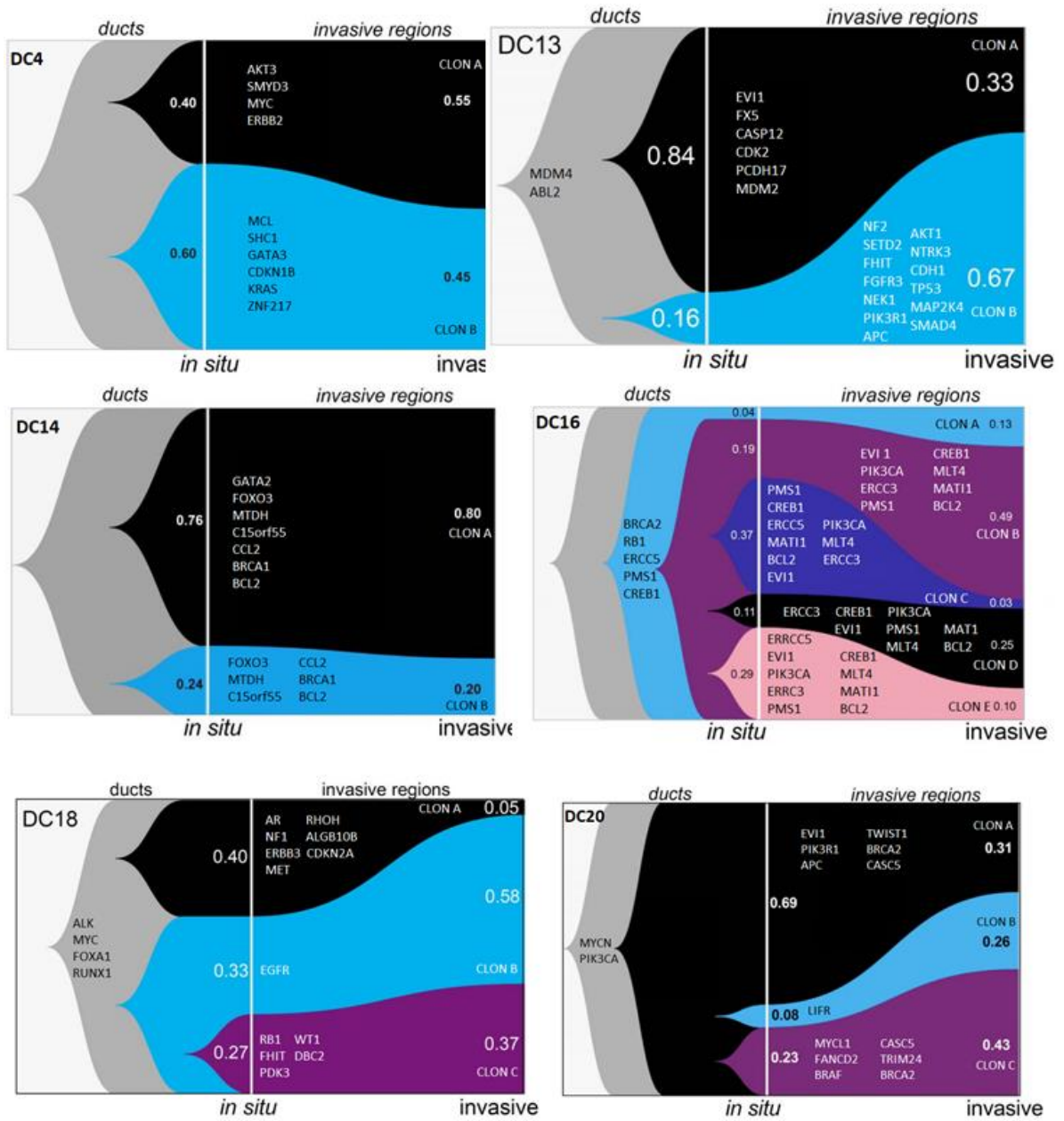
Como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos, partimos de una muestra total de 6 pacientes extraídos del artículo de Casasent y colaboradores. Estos son los pacientes DC4, DC13, DC14, DC16, DC18 y DC20. Como se puede comprobar en la figura 2, cada paciente presenta entre 2 y 5 clones. En el gráfico correspondiente a cada paciente, se puede consultar las fracciones celulares que representa cada clon en el tumor. Por ejemplo, en el paciente DC4, el clon A aparece y representa al 40% de las células tumorales en el tejido no invasivo, creciendo hasta un 55% en el tejido invasivo. Por otra parte, el clon B en un inicio representa el 60% de las células tumorales decreciendo hasta representar un 45% en el tumor invasivo.





**Figura 2.** Resumen de las fracciones celulares que representa cada clon con respecto al total de las células tumorales de cada paciente. Imagen modificada de Casasent et al. (2018).

En la figura 3, se observa como cada clon en cada tumor presenta diversas alteraciones genómicas (Figura 3). Adicionalmente, en la tabla 1 se puede consultar el porcentaje de mutaciones que aparecen en todos los clones del mismo paciente (Tabla 1). Estos datos, sirven como indicativo para mostrar la heterogeneidad molecular existente entre los distintos clones de cada paciente.



**Figura 3.** Resumen de las alteraciones moleculares que ha desarrollado cada clon presente en la muestra. Imagen modificada de Casasent et al. (2018).

Paciente	% mutaciones solapantes para todos los clones
DC4	0
DC13	10
DC14	86
DC16	18
DC18	21
DC20	15

**Tabla 1.** Recoge el porcentaje de las mutaciones que aparecen en todos los clones de un mismo paciente.

## 2. Asignación de terapias por clon utilizando PanDrugs

Tras lanzar una búsqueda en PanDrugs por cada clon (n=17), el método devuelve una tabla con los distintos resultados para cada clon. Estos resultados oscilan entre 100 y 700 fármacos en función del clon analizado, si bien no todas se encuentran aprobadas (Tabla 2). Las tablas en las cuales se amplían los resultados completos son consultables en el material suplementario (Tablas S21-S37). Sin embargo, para su mejor visualización, un resumen de los resultados se puede consultar en la figura 4, donde se ejemplifican los fármacos con un mejor score para el tratamiento de los distintos clones de cada paciente (Figura 4). Adicionalmente, a modo de resumen, en la tabla 2, se recoge el total de drogas recomendadas por la metodología para cada clon, así como un desglose de las mismas en función del estado de la droga (Tabla 2). Por último, en la tabla 3 se evidencia el porcentaje de todos los fármacos candidatos (en función del score devuelto por PanDrugs) que se recomiendan para todos los clones del paciente (Tabla 3).

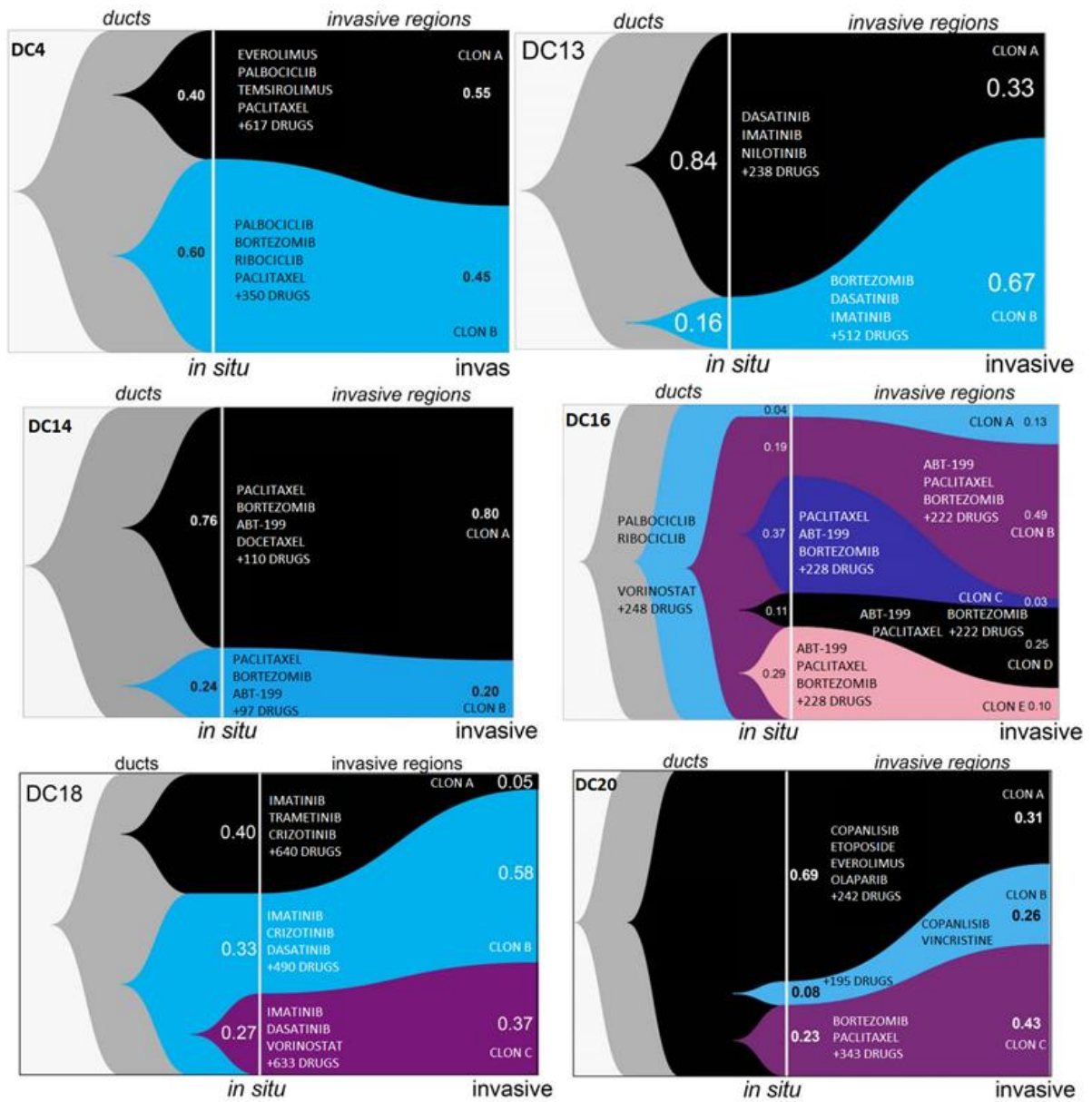


Figura 4. Resumen de los fármacos recomendados por PanDrugs para cada clon de cada paciente. Imagen modificado de Casasent et al. (2018).

Clon	Drogas aprobadas	Drogas en fase de ensayo clínico	Drogas en fase experimental	Total
DC4a	104	167	350	621
DC4b	68	108	178	354
DC13a	31	47	153	231
DC13b	96	154	265	515
DC14a	36	35	42	113
DC14b	33	32	36	101
DC16a	40	51	160	251
DC16b	57	91	77	225
DC16c	57	92	82	231
DC16d	57	91	77	225
DC16e	57	92	82	231
DC18a	116	168	359	643
DC18b	104	162	227	493
DC18c	111	179	346	636
DC20a	60	93	93	246
DC20b	50	80	67	197
DC20c	73	120	152	345

**Tabla 2.** Número total de drogas recomendadas por PanDrugs para cada clon y su desglose en función de su estado (aprobación, ensayo clínico o experimental).

Paciente	% fármacos solapantes para todos los clones
DC4	35
DC13	34
DC14	90
DC16	10
DC18	33
DC20	53

**Tabla 3.** Recoge el porcentaje de los fármacos recomendados para todos los clones de un mismo paciente, en función del total de drogas recomendadas por PanDrugs.

Adicionalmente, debido al elevado número de fármacos a manejar y con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, se consideró oportuno agrupar todos estos fármacos en familias de drogas, utilizando para ello el software GSEA (más información en Material y Métodos). Esta aproximación permite comparar los resultados de una manera más sencilla e intuitiva, tanto a la hora de manejar los datos como a la hora de la visualización de los resultados. Los resultados de este agrupamiento se pueden consultar en el apartado 3 de Resultados.

### 3. Agrupación de fármacos en familias de drogas

Tras lanzar GSEA para cada uno de los clones (n=17), obtuvimos una tabla de resultados por clon. Estas tablas se pueden consultar en el material suplementario (Tablas S38-S54). En estos documentos se recogen las familias de drogas enriquecidas en cada uno de los clones; esto es, las familias de drogas que se ven más representadas en los resultados de PanDrugs en cada clon. En definitiva, los fármacos recogidos en estas familias son los más recomendados por PanDrugs para el tratamiento del clon. Una vez más, para facilitar su visualización, en la figura 5 se resumen los principales resultados de este análisis de enriquecimiento de familias (Figura 5). Adicionalmente, en la tabla 4, se recoge el porcentaje de familias enriquecidas para todos los clones de un mismo paciente

(Tabla 4). Por último, en la tabla 5 se recoge la notoria reducción en el volumen de datos que se produce al agrupar los fármacos en las distintas familias de drogas definidas, si bien el porcentaje de solapamiento se mantiene estable en todos los pacientes a excepción del DC16 en el cual se incrementa desde un 10% a un 41% (Tabla 5).

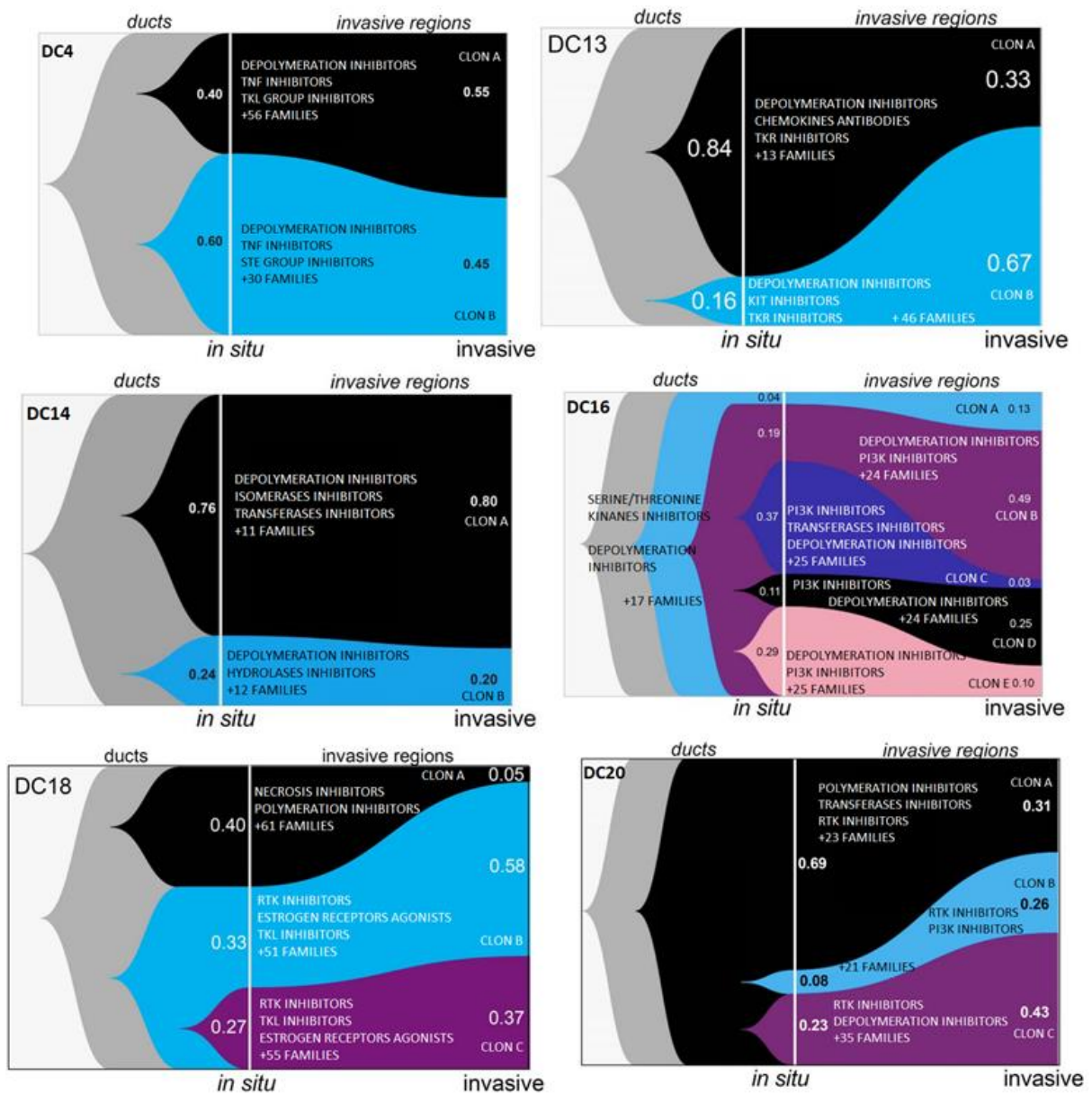


Figura 5. Resumen de las familias de drogas enriquecidas en cada clon de cada paciente. Imagen modificada de Casasent et al. (2018).

Paciente	% familias enriquecidas solapantes para todos los clones
DC4	30
DC13	23
DC14	100
DC16	41
DC18	45
DC20	62

**Tabla 4.** Recoge el porcentaje de las familias enriquecidas en todos los clones de un mismo paciente, en función del total de las familias enriquecidas.

Paciente	Nº fármacos solapantes	% fármacos solapantes	Nº familias solapantes	% familias solapantes
DC4	255	35	21	30
DC13	189	34	12	23
DC14	101	90	14	100
DC16	49	10	14	41
DC18	296	33	37	45
DC20	193	53	23	62

**Tabla 5.** Resumen de fármacos y familias enriquecidas solapantes en todos los clones de cada paciente, acompañado del porcentaje de las mismas.



## **DISCUSIÓN**

### 1. Pacientes, clones y alteraciones

A la vista de los datos expuestos en el apartado de Resultados, más concretamente en la figura 3, se concluye que la muestra de 6 pacientes de cáncer de mama analizada representa una buena elección al reflejar la heterogeneidad intratumoral que queremos estudiar, ya que los 6 pacientes analizados cuentan con distintas poblaciones clonales. Dentro de cada paciente, cada clon cuenta con una lista determinada de alteraciones genómicas que marcan su perfil molecular. Como se recoge en la tabla 1, podemos comprobar que el porcentaje de solapamiento (y por tanto de mutaciones que comparten) entre los distintos clones de cada tumor es inferior al 25% a excepción de uno de los pacientes, el DC14, que representa el paciente con menos heterogeneidad de nuestra muestra. Por otro lado, aunque a priori el paciente DC16 parece ser el que mayor heterogeneidad presenta, al observarse 5 subpoblaciones clonales en su tumor, los clones C, D y E proceden de un antecesor común, el clon B, por lo que comparten muchas de sus mutaciones. Es por lo tanto, el paciente DC4, pese a tener solo dos poblaciones clonales, el que presenta mayor heterogeneidad, al no compartir ninguna de sus alteraciones genómicas entre ellas. Por lo tanto, podemos concluir que la muestra presenta heterogeneidad genómica interclonal independientemente del número de clones que presente cada paciente, siendo esta suficiente en todos los casos estudiados para abordar el análisis de la heterogeneidad terapéutica.

### 2. Asignación de terapias por clon utilizando PanDrugs

Los resultados de la asignación de fármacos a cada clon (Figura 4 y Tabla 3), sugieren que en todos los pacientes exista una elevada cantidad de drogas recomendadas para tratar a cada uno de los clones existentes en el tumor. En todos los casos se supera el 30% de similitud a excepción del anteriormente mencionado paciente DC16. Sin embargo, si se estudia el porcentaje de similitud entre los clones que derivan de un mismo clon (B, C, D y E), se puede comprobar como el porcentaje de similitud de los fármacos recomendados por PanDrugs se

incrementa desde un 10% a un 90%. Este porcentaje tan elevado se puede observar también el paciente DC14, el cual hemos descrito como el menos heterogéneo, y por tanto resulta razonable encontrar esta similitud en el tratamiento propuesto para ambos clones.

Estos resultados, por lo tanto, denotan que al traducir la heterogeneidad intratumoral, estudiada en el apartado anterior, a heterogeneidad terapéutica (también intratumoral), se observa una disminución en las diferencias presentadas entre los clones de cada paciente. Esto quiere decir que, pese a que es evidente que las distintas subpoblaciones clonales presentan diferencias moleculares que se pueden traducir en una mayor o menor agresividad, los clones pueden a) ser susceptibles a responder a una misma terapia, b) sugerir el uso de tratamientos clon-específicos que podrían proporcionar un mayor tiempo de respuesta al tratamiento por parte del paciente y c) podrían mitigar la expansión de clones minoritarios y la aparición de posibles resistencias tras la administración de los fármacos, y así con todo ello obtener respuestas a tratamientos personalizados más eficaces y posibilidades de un mejor pronóstico para los pacientes de cáncer.

Además, cabe mencionar que, al lanzar PanDrugs, algunos de los genes alterados no se encuentran recogidos en su base de datos, PanDrugsdb. Sin duda, esto puede alterar los resultados, ya que al no reflejar el total de las mutaciones que presenta cada clon, podemos estar dejando de lado algún fármaco idóneo para el tratamiento de dicha población tumoral, o por el contrario, recomendar alguna droga que pueda resultar nociva al paciente. Sin embargo, en ningún clon el número de genes que no se recogen en PanDrugsdb excede los 3 genes, como se puede observar en la tabla 6 (Tabla 6). Aunque esto debe tenerse en cuenta a la hora de aplicar el diagnóstico clínico, los resultados obtenidos deberían seguir siendo igualmente válidos.

Clon	Nº de genes introducidos	Nº de genes en PanDrugs	Nº de genes que no recogidos
DC4a	4	3	1
DC4b	6	5	1
DC13a	8	5	3
DC13b	15	15	0
DC14a	7	6	1
DC14b	6	5	1
DC16a	5	5	0
DC16b	8	5	3
DC16c	9	6	3
DC16d	8	5	3
DC16e	9	6	3
DC18a	13	10	3
DC18b	7	6	1
DC18c	10	8	2
DC20a	8	6	2
DC20b	3	3	0
DC20c	8	8	0

**Tabla 6.** Resumen de genes introducidos en PanDrugs en la búsqueda de fármacos recomendados para cada clon, junto con el número de genes que aparecen y no aparecen en PanDrugsdb, en cada paciente.

### 3. Agrupación de fármacos en familias de drogas

Una vez más, al agrupar los distintos fármacos recomendados por PanDrugs para tratar a cada clon en las distintas familias de drogas definidas por KEGG y cMAP, podemos comprobar como en todos los casos estudiados encontramos familias de fármacos para tratar a la totalidad de los clones presentes en una misma población tumoral. Se debe recordar que en el presente estudio se consideró

estadísticamente significativo el enriquecimiento de las familias con un p-valor < 0.05, sin considerar el FDR. Esto se debe a que existen numerosas familias conformadas por una única droga. De esta manera, al ejecutar la corrección por FDR este valor se veía aumentado. Una manera de evitar esto en futuros estudios sería el filtrado de las familias conformadas por un número de drogas que se considere por debajo de un umbral (e.g: todas aquellas familias de fármacos que contengan menos de 10 drogas).

De nuevo, el mayor exponente en cuanto a similitud en familias enriquecidas lo presenta el paciente DC14 que muestra las mismas familias enriquecidas para ambos clones. Al ser el paciente que presentaba una menor heterogeneidad tumoral, también presenta la menor heterogeneidad terapéutica, como cabía esperar. En la tabla 5 podemos observar cómo los porcentajes de fármacos y familias solapantes se mantienen más o menos estables, variando en no más de un 11% en todos los casos, a excepción del paciente DC16, que al agrupar los fármacos adecuados para su tratamiento en familias, ve como el porcentaje de solapamiento crece hasta un 41% (Tabla 5). Todos estos datos, no hacen sino reforzar la evidencia de que, pese a las diferencias moleculares presentes en las distintas subpoblaciones, la heterogeneidad terapéutica, aún existiendo, no es tan marcada y con el diagnóstico adecuado puede atenuarse, puesto que todos los clones dentro de un mismo tumor comparten familias de fármacos recomendados para su tratamiento.

#### 4. Tratamiento detallado del paciente DC4

El paciente DC4 es, como se ha mencionado a lo largo del estudio, el paciente que presenta una mayor heterogeneidad intratumoral, puesto que los clones que lo conforman, no comparten ninguna de sus alteraciones genómicas (Tabla 1). Genéricamente, la terapia propuesta para el tratamiento de estas dos subpoblaciones debería seguir un criterio que primase el tratamiento del clon más agresivo, más abundante o que pueda expandirse tras la administración del fármaco al no ser sensible al tratamiento. Sin embargo, en este paciente, ambas subpoblaciones tienen una frecuencia de aparición bastante equilibrada en el tejido invasivo (el 55% de las células tumorales pertenecen al clon A, mientras

que el 45% pertenecen al clon B; Figura 2). En este caso, al presentar el tumor una fracción mayor de células del clon A que el clon B en el tumor invasivo, podríamos primar su tratamiento. Sin embargo, como a lo largo de este estudio hemos comprobado que existen fármacos capaces de inhibir a ambas poblaciones (como Bortezomib o Palbociclib), sería una buena idea escoger una de estas terapias. Los pacientes DC13 y DC14 seguirían una estrategia de tratamiento similar, al compartir muchas características con el paciente DC4, si bien sus clones son ligeramente menos heterogéneos.

#### 5. Tratamiento detallado del paciente DC16

El paciente DC16 es, a simple vista, el que mayor heterogeneidad presenta de nuestro estudio, al definir los autores cinco subpoblaciones clonales en base a sus perfiles moleculares (Figura 3). Sin embargo, al estudiar la heterogeneidad que presenta, podemos comprobar como los clones C, D y E derivan del clon B y por lo tanto comparten un gran porcentaje de mutaciones, haciendo que la heterogeneidad entre estas cuatro poblaciones sea mucho menor, de la que presentan con el clon A. Es por ello, que el tratamiento adecuado para este paciente sería uno capaz de eliminar a todos los clones (como por ejemplo el Carboplatino). Sin embargo, en el caso de que no existiese esa posibilidad, deberíamos proponer una terapia combinada para reducir al clon A por un lado y al resto de clones por el otro, combinando, por ejemplo fármacos como el Ribociclib (que podría eliminar al clon A) y el Paclitaxel (para los clones B, C, D y E; Figura 4). En caso de priorizar el tratamiento a los clones derivados del clon B, parece lógico primar una terapia guiada por las mutaciones presentes en los clones B y D, puesto que estos son los clones que más proliferación celular presentan en el tejido invasivo (49 y 25% de las células respectivamente), mientras que los clones C y E representan un 3 y 10% respectivamente de las células tumorales, por lo que parecen menos agresivos (Figura 2).

#### 6. Tratamiento detallado de los pacientes DC18 y DC20

En cuanto al paciente DC18, presenta un caso ligeramente similar al del paciente DC16. Presenta tres subpoblaciones, aunque sin embargo, el clon C deriva del

clon B, por lo cual, los tratamientos propuestos para estos dos clones coinciden en gran medida, si bien también aparecen fármacos comunes para el tratamiento de los tres clones (como el Imatinib; Figura 4). Adicionalmente, observando la evolución de las frecuencias de aparición de células de cada clon en los distintos tejidos tumorales, podemos comprobar cómo solo el 5% de las células tumorales invasivas de este paciente pertenecen a la subpoblación A. En caso de no existir un tratamiento común, esto condicionaría el tratamiento a ofrecer primariamente un fármaco que tuviese como diana a los clones B y C, y si fuese necesario, añadir al tratamiento una droga que eliminase al clon B. Por su parte, el paciente DC20 seguiría una estrategia similar, puesto que los clones B y C derivan del A. En este caso, las frecuencias de cada población son similares (26, 31 y 46%), por lo que la terapia propuesta sería eliminar primero al clon A, esperando que los clones B y C también se puedan ver afectados por el fármaco. En el caso contrario, por supuesto, se debería proponer una droga que tuviese como dianas los clones B y C que podrían expandirse al no mostrar sensibilidad ni respuesta al tratamiento sugerido por el perfil mutacional del clon A.

## 7. Heterogeneidad terapéutica intertumoral

A lo largo de este estudio se ha abordado el análisis de distintas subpoblaciones procedentes de 6 pacientes de cáncer de mama distintos. Sin embargo, el grueso del estudio se centra en la heterogeneidad terapéutica intratumoral (es decir, la relativa a un mismo paciente). Sin embargo, merece la pena mencionar brevemente la heterogeneidad terapéutica intertumoral (o entre los 6 pacientes) presente. Destaca cómo con esta muestra concreta se encuentran familias de fármacos enriquecidas para tratar a la mayor parte de los pacientes. Una muestra de ello es la familia de inhibidores de la despolimerización (formada entre otros por Paclitaxel, Taxol o Docetaxel), la cual aparece enriquecida en todos los clones analizados en 5 de 6 pacientes (a excepción del paciente DC16). Además, en 4 de los pacientes aparece sobrerrepresentada en todos los clones la familia de los inhibidores de la polimerización (e.g. VCR, Vinorelbine y Vincristine). Por último, una familia que aparece enriquecida en todos los clones de todos los pacientes, a excepción del paciente DC4, es la familia de inhibidores de los receptores tirosina kinasa (e.g. Dasatinib y Nilotinib). Por supuesto, en cada paciente aparecen

enriquecidas de manera específica familias de fármacos inhibidores de oncogenes en cuyas rutas aparecen genes mutados para los distintos pacientes (e.g. JNK, MYC, EGFR, CDK, mTOR).

Todo esto nos indica que, si bien cada paciente guarda cierta heterogeneidad debido a los distintos perfiles moleculares de sus subpoblaciones, al estar estudiando pacientes con un mismo tipo de tumor, podemos encontrar muchas similitudes en sus tratamientos, por lo que la heterogeneidad terapéutica intertumoral también se ve reducida.

## **CONCLUSIONES**

El presente trabajo de fin de máster aborda el estudio de la heterogeneidad terapéutica en cáncer a partir de la heterogeneidad intratumoral presente en las distintas poblaciones que componen el tumor de un mismo paciente. Para ello, se seleccionaron las muestras más apropiadas de aquellas disponibles en la literatura, presentando la suficiente heterogeneidad intratumoral y un mayor número de pacientes que el resto de estudios consultados. Tras comprobar que reunían los requisitos necesarios para realizar el estudio (presentar distintos pacientes con distintas subpoblaciones tumorales), se propuso una terapia para cada uno de los clones. Tras la obtención de los resultados de PanDrugs, se procedió a agrupar los fármacos obtenidos en familias de drogas para ver cuáles estaban más representadas entre las posibles terapias de cada clon y tratar así de comprobar nuestra hipótesis inicial que sostiene que la heterogeneidad intratumoral existente entre las distintas poblaciones clonales se traduce en una heterogeneidad terapéutica menor. Así, se comprobó que pese a las diferencias iniciales la heterogeneidad en la terapia se ve reducida aunque exista la presencia de clones con diferentes perfiles mutacionales en una misma población tumoral y por lo tanto, con un comportamiento variable. Por ello, existirán clones más agresivos que otros y algunos que serán más propensos a desarrollar resistencia frente a determinadas drogas. Sin embargo, al proponer terapias jerarquizando los distintos tratamientos disponibles, comprobamos que existen diversos fármacos (e incluso familias de fármacos) que podrían ser eficaces para eliminar todos los clones en cada uno de los pacientes testados.

A su vez, se realiza un breve comentario sobre el concepto de la heterogeneidad intertumoral que se puede apreciar en este estudio: debido a la semejante naturaleza de las muestras analizadas (puesto que todas ellas tienen su origen en un carcinoma ductal de mama) se puede comprobar como no solo la heterogeneidad terapéutica intratumoral disminuye con el diagnóstico adecuado, sino que los pacientes analizados comparten familias de fármacos capaces de inhibir el crecimiento de sus subpoblaciones tumorales. En otras palabras, la heterogeneidad terapéutica intertumoral también se ve reducida.



Cabe destacar que este estudio es una primera aproximación al concepto de la heterogeneidad terapéutica y al abordaje de la misma a través de la heterogeneidad intratumoral que presenta un paciente. En un futuro, una manera de continuar con el presente estudio sería aumentar la cohorte de pacientes estudiados, así como incluir distintos tipos de tumores, y no solo centrarse en el carcinoma ductal de mama. Por otro lado, el manejo de bases de datos de fármacos no siempre es una tarea sencilla debido a la falta de estandarización en la nomenclatura de los mismos. Por ello, una mejora plausible para este proyecto sería la depuración de las firmas de drogas utilizadas para clasificar cada fármaco en una familia. Adicionalmente, como se comenta en el apartado 3 de la discusión, al realizar el análisis de enriquecimiento de las familias de fármacos, el FDR se ve aumentado notablemente debido a la gran cantidad de familias de drogas conformadas por un único fármaco, por lo que una depuración de este análisis, filtrando aquellas firmas de fármacos que no cumplan los requisitos (e.g. estar compuestas por 10 o más drogas), sería recomendable en análisis posteriores, para reducir el número de falsos positivos y aportar robustez los resultados de este estudio. Además, pese a que el número de genes descartados no es elevado, sería aconsejable no descartar nada de información sobre las variantes genómicas presentes en las subpoblaciones del paciente, intentando completar la información de las bases de datos utilizadas, pese a que esto depende de estudios capaces de establecer las relaciones entre un fármacos y genes diana.

Así pues, este estudio es un indicativo de que, si bien la heterogeneidad intratumoral es un problema real en la terapia contra el cáncer, con el diagnóstico adecuado, la heterogeneidad terapéutica, disminuye notablemente. Esta primera conclusión aún a falta de más estudios sistemáticos con validaciones experimentales y clínicas podría proporcionar beneficios en el tratamiento oncológico ya que: i) proporciona una prescripción terapéutica más ajustada al perfil molecular del paciente, ii) propone tratamientos en combinación y/o secuenciales según la frecuencia de las poblaciones tumorales, iii) reduciría la toxicidad a la que es comúnmente expuesto el paciente ajustando el tipo y número de fármacos administrados y, iv) permitiría adelantarse terapéuticamente a la adquisición de mecanismos moleculares de resistencias a fármacos, una de

las principales razones por las que los tratamientos oncológicos no son efectivos o lo son sólo durante un periodo reducido de tiempo. Este proyecto, por lo tanto, hace hincapié en la relevancia de la medicina de precisión en enfermedades tan complejas como el cáncer y como la integración de los datos clínicos del paciente junto a su perfil molecular incluyendo las diferentes poblaciones tumorales podría, en un futuro cercano, convertirse en el método estándar de diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad.

**BIBLIOGRAFÍA:**

1. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
2. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, última visita: 09/2018.
3. Schmitt, M. W., Loeb, L. A., & Salk, J. J. (2016). The influence of subclonal resistance mutations on targeted cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 13(6), 335.
4. Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 104(6), 1129-1137.
5. Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., ... & Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(4), 271-289.
6. Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252.
7. Colon Cancer Laparoscopic or Open Resection Study Group. (2005). Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: short-term outcomes of a randomised trial. *The lancet oncology*, 6(7), 477-484.
8. Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31.
9. TAXONOMY, D. S. B. (2010). THE SEQUENCE EXPLOSION. *Nature*, 464, 1.
10. International Cancer Genome Consortium. (2010). International network of cancer genome projects. *Nature*, 464(7291), 993.
11. Tomczak, K., Czerwińska, P., & Wiznerowicz, M. (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary oncology*, 19(1A), A68.
12. Biankin, A. V. (2017). The road to precision oncology. *Nature genetics*, 49(3), 320.

13. Collins, F. S., & Varmus, H. (2015). A new initiative on precision medicine. *New England Journal of Medicine*, 372(9), 793-795.
14. McGranahan, N., & Swanton, C. (2017). Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell*, 168(4), 613-628.
15. Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., ... & Kiezun, A. (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 499(7457), 214.
16. Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., ... & Varela, I. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New England journal of medicine*, 366(10), 883-892.
17. Alizadeh, A. A., Aranda, V., Bardelli, A., Blanpain, C., Bock, C., Borowski, C., ... & Esteller, M. (2015). Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nature medicine*, 21(8), 846.
18. Schmitt, M. W., Prindle, M. J., & Loeb, L. A. (2012). Implications of genetic heterogeneity in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267(1), 110-116.
19. Marusyk, A., Almendro, V., & Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?. *Nature Reviews Cancer*, 12(5), 323.
20. Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J., & Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501(7467), 338.
21. Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer research*.
22. Shapiro, E., Biezuner, T., & Linnarsson, S. (2013). Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nature Reviews Genetics*, 14(9), 618.
23. Wang, Y., & Navin, N. E. (2015). Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Molecular cell*, 58(4), 598-609.
24. Xu, X., Hou, Y., Yin, X., Bao, L., Tang, A., Song, L., ... & He, W. (2012). Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell*, 148(5), 886-895.

25. Navin, N., Kendall, J., Troge, J., Andrews, P., Rodgers, L., McIndoo, J., ... & Muthuswamy, L. (2011). Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, *472*(7341), 90.
26. Zong, C., Lu, S., Chapman, A. R., & Xie, X. S. (2012). Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, *338*(6114), 1622-1626.
27. Song, Y., Tian, T., Shi, Y., Liu, W., Zou, Y., Khajvand, T., ... & Yang, C. (2017). Enrichment and single-cell analysis of circulating tumor cells. *Chemical science*, *8*(3), 1736-1751.
28. Gawad, C., Koh, W., & Quake, S. R. (2016). Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nature Reviews Genetics*, *17*(3), 175.
29. Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., ... & Louis, D. N. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, *344*(6190), 1396-1401.
30. Hou, Y., Song, L., Zhu, P., Zhang, B., Tao, Y., Xu, X., ... & Wu, H. (2012). Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell*, *148*(5), 873-885.
31. Jiao, W., Vembu, S., Deshwar, A. G., Stein, L., & Morris, Q. (2014). Inferring clonal evolution of tumors from single nucleotide somatic mutations. *BMC bioinformatics*, *15*(1), 35.
32. Piñeiro-Yáñez, E., Reboiro-Jato, M., Gómez-López, G., Perales-Patón, J., Troulé, K., Rodríguez, J. M., ... & Al-Shahrour, F. (2018). PanDrugs: a novel method to prioritize anticancer drug treatments according to individual genomic data. *Genome medicine*, *10*(1), 41.
33. Karlsson, J., Valind, A., Mengelbier, L. H., Bredin, S., Cornmark, L., Jansson, C., ... & Börjesson, A. (2018). Four evolutionary trajectories underlie genetic intratumoral variation in childhood cancer. *Nature genetics*, *1*.
34. Wu, H., Zhang, X. Y., Hu, Z., Hou, Q., Zhang, H., Li, Y., ... & Pan, X. (2017). Evolution and heterogeneity of non-hereditary colorectal cancer revealed by single-cell exome sequencing. *Oncogene*, *36*(20), 2857.

35. Casasent, A. K., Schalck, A., Gao, R., Sei, E., Long, A., Pangburn, W., ... & Navin, N. E. (2018). Multiclonal invasion in breast tumors identified by topographic single cell sequencing. *Cell*, 172(1-2), 205-217.
36. <https://www.pandrugs.org/#/>, última visita: 09/2018.
37. Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M., & Hirakawa, M. (2009). KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic acids research*, 38(suppl\_1), D355-D360.
38. Lamb, J., Crawford, E. D., Peck, D., Modell, J. W., Blat, I. C., Wrobel, M. J., ... & Reich, M. (2006). The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *science*, 313(5795), 1929-1935.
39. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., ... & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15545-15550.

### **MATERIAL SUPLEMENTARIO**

El material suplementario citado en el texto se puede encontrar en la siguiente URL:

[https://www.dropbox.com/s/hbmo6xgt8npkz5z/Heterogeneity\\_in\\_Cancer\\_MartinSerrano\\_Guillermo\\_TFM\\_SuppMat.rar?dl=0](https://www.dropbox.com/s/hbmo6xgt8npkz5z/Heterogeneity_in_Cancer_MartinSerrano_Guillermo_TFM_SuppMat.rar?dl=0)

