



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular

**Utilidad de la biopsia líquida y de los estudios
genómicos somáticos y germinales en pacientes
oncológicos en estadios iniciales y oligometastásicos
tratados con radioterapia**

TESIS DOCTORAL

Guadalupe Álvarez Cifuentes

Septiembre 2023



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Utilidad de la biopsia líquida y de los estudios genómicos somáticos y germinales en pacientes oncológicos en estadios iniciales y oligometastáticos tratados con radioterapia	Inglés: Utility of liquid biopsy and somatic and germline genomic tests in early-stage and oligometastatic cancer patients treated with radiotherapy
2.- Autor	
Nombre: Guadalupe Álvarez Cifuentes	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado – Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

Los estudios de secuenciación genómica presentan múltiples aplicaciones en Oncología. No obstante, aunque más del 50 % de los pacientes oncológicos requieren radioterapia, la Genómica aún no se ha integrado en la práctica clínica de la Oncología Radioterápica. En los últimos años, la biopsia líquida, herramienta no invasiva que permite el análisis de biomarcadores tumorales en diversos fluidos corporales, ha ganado relevancia como alternativa a las biopsias de tejido, principalmente a consecuencia de la aplicación de la secuenciación genómica para el análisis del ADN tumoral circulante (ctDNA) en sangre. Ante la necesidad de biomarcadores que permitan estratificar a los pacientes, personalizar los tratamientos y el seguimiento, la presente tesis doctoral evalúa el potencial de la biopsia líquida y de los estudios genómicos para mejorar el manejo de pacientes tratados con radioterapia.

Para ello se empleó un enfoque integrativo basado en la aplicación de paneles de secuenciación genómica para analizar una biopsia tumoral, una biopsia líquida y una muestra germinal de 50 pacientes con cáncer en estadio inicial u oligometastático. A partir de los resultados obtenidos de los paneles, se seleccionaron variantes tumorales específicas para ser utilizadas como biomarcadores personalizados en un estudio longitudinal con biopsias líquidas recogidas a lo largo del tratamiento y el seguimiento, mediante una técnica basada en PCR dirigida y secuenciación de nueva generación.

En primer lugar, gracias a la integración de la secuenciación germinal, se determinó que sólo el 31,1 % de variantes identificadas en la biopsia líquida eran verdaderas variantes de ctDNA, mientras que el resto eran germinales o derivadas de la hematopoyesis clonal. La comparación de los hallazgos en la biopsia de tejido y la biopsia líquida mostró una concordancia global del 15,3 %, superior en pacientes con mayor carga tumoral y en aquéllos cuya biopsia de tejido procedía de la lesión activa.

En segundo lugar, en cuanto a la accionabilidad clínica de los resultados, conjuntamente se identificaron alteraciones asociadas con terapias dirigidas en un 73,9 % de los pacientes, incluyendo terapias aprobadas para el tipo de tumor del paciente portador de la alteración (19,6 %). Se identificaron alteraciones con valor pronóstico (23,9 %), que podrían facilitar la entrada a ensayos clínicos (63,0 %) y asociadas a predisposición al desarrollo de cáncer (10,9 %). Se identificaron variantes con potencial para su uso como biomarcadores de ctDNA en todos los pacientes.

La presencia de niveles detectables de ctDNA antes de iniciar el tratamiento se asoció significativamente con la supervivencia libre de progresión. Asimismo, el estudio longitudinal de los biomarcadores en ctDNA durante el seguimiento mostró concordancia con el estado clínico en un 92,0 % de los pacientes analizados que presentaban niveles detectables de ctDNA (N=25). Además, en un 38,5 % de los casos con progresión tumoral tras el tratamiento, la biopsia líquida se adelantó a las pruebas de diagnóstico por imagen en la detección de la recidiva.

En resumen, este trabajo demuestra que los estudios genómicos somáticos y germinales proporcionan información complementaria y relevante en todas las fases del manejo clínico de los pacientes con cáncer tratados con RT y apoya el enfoque integrativo multiplataforma. Nuestros resultados permiten concluir que los biomarcadores de biopsia líquida son una herramienta útil y complementaria a los métodos diagnósticos de rutina para la estratificación de pacientes candidatos a radioterapia según su pronóstico, para identificar opciones personalizadas de tratamiento y optimizar su seguimiento.



RESUMEN (en Inglés)

Genomic profiling has multiple applications in Oncology. However, although more than 50% of cancer patients require radiotherapy, Genomics has not yet been integrated into the clinical practice of Radiation Oncology. In recent years, liquid biopsy, a non-invasive tool that allows the analysis of tumour biomarkers in various body fluids, has gained relevance as an alternative to tissue biopsies, mainly as a result of the application of genomic sequencing for the analysis of circulating tumour DNA (ctDNA) in blood. Given the need for biomarkers to stratify patients and personalise treatments and follow-up, this PhD thesis evaluates the potential of liquid biopsy and genomic studies to improve the management of patients treated with radiotherapy.

An integrative approach based on the application of genomic sequencing panels was used to analyse a tumour biopsy, a liquid biopsy and a germline sample from 50 patients with early stage or oligometastatic cancer. From the results obtained from the panels, specific tumour variants were selected to be used as personalised biomarkers in a longitudinal study with liquid biopsies collected throughout the treatment and the follow-up, using a technique based on targeted-PCR and next-generation sequencing.

Firstly, thanks to the integration of germline sequencing, it was determined that only 31.1% of variants identified by the liquid biopsy panel were true ctDNA variants, while the rest were of germline origin or derived from clonal haematopoiesis. The comparison of tissue biopsy and liquid biopsy findings showed an overall concordance of 15.3%, greater in patients with higher tumour burden and in those whose tissue biopsy came from the active tumor lesion.

Secondly, in terms of clinical actionability, the comprehensive genomic approach revealed variants associated with targeted therapies (73.9%), including therapies approved for the type of tumour of the patient carrying the alteration (19.6%), and also variants with prognostic value (19.6%), clinical trials enrolment (63.0%) or associated with predisposition to cancer development (6.5%). Potential ctDNA biomarkers were identified in all patients.

The presence of detectable ctDNA levels before radiotherapy was significantly associated with progression-free survival. Furthermore, longitudinal monitoring of ctDNA biomarkers during the follow-up showed concordance with clinical status in 92.0% of the tested patients who had detectable ctDNA levels (N=25). Moreover, in 38.5% of cases in which tumour progression was diagnosed after treatment, the liquid biopsy approach anticipated the observation of relapse compared to imaging tests.

In summary, this work shows that somatic and germline genomic profiling provide complementary and relevant information in all the aspects of the clinical management of cancer patients treated with RT and supports the multi-platform integrative and comprehensive approach. Our results allow us to conclude that liquid biopsy biomarkers are a useful and complementary tool to routine diagnostic methods for the stratification of patients who are candidates for radiotherapy according to their prognosis, to identify personalised options for their treatment, to optimise their follow-up and to provide genetic counselling.

Índice de abreviaturas y siglas

ACMG - Colegio Americano de Genética Médica y Genómica

AD - Autosómico Dominante

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AMP - *Association for Molecular Pathology*, Asociación de Patología Molecular (americana)

AR - Autosómico Recesivo

ARN - Ácido Ribonucleico

BAG - Biopsia con Aguja Gruesa

CA-125 - *Carbohydrate Antigen 125*, antígeno carbohidrato 125

CAPP-Seq - *Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing*

cc - centímetros cúbicos

CDx - *Companion Diagnostic*

CEA - *Carcinoembryonic Antigen*, antígeno carcinoembrionario

cfDNA - *cell-free DNA*, ADN libre circulante

CFRT - *Conventional Fractionated Radiotherapy*, Radioterapia de Fraccionamiento Convencional

CGP - *Comprehensive Genomic Profiling*, Análisis genómico exhaustivo

CHIP - *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*, hematopoyesis clonal de potencial indeterminado

CMOH - Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario

CNV - *Copy Number Variation*, Variación en el número de copias

COB_{ALT} - cobertura del alelo alternativo

COB_{REF} - cobertura del alelo de referencia

CPCP - Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas

CPNM - Cáncer de pulmón no microcítico

CR - *Complete Response*, respuesta completa

CTC - *Circulating Tumor Cell*, célula tumoral circulante

ctDNA - *circulating tumor DNA*, ADN tumoral circulante

CTV - *Clinical Target Volume*, volumen blanco clínico

dNTP - desoxinucleótido trifosfato

EE. UU. - Estado Unidos

EMA - *European Medicines Agency*, Agencia Europea de Medicamentos

ESCAT - *ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets*, escala de accionabilidad clínica de dianas moleculares de ESMO

ESMO - *European Society of Medical Oncology*, Sociedad Europea de Oncología Médica

EtOH - Etanol

FA - Frecuencia alélica

FAO - Frecuencia alélica observada

FDA - *Food and Drug Administration*, Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

FDG - Fluorodesoxiglucosa F-18

FFPE - *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, embebido en parafina fijado en formalina

FN - Falso Negativo

FNA - *Fine Needle Aspirarion*, aspiración con aguja fina

FP - Falso Positivo

GTV - *Gross Tumor Volume*, volumen tumoral macroscópico

HC - Hematopoyesis Clonal

HER2 - *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HFRT - *Hypofractionated Radiotherapy*, Radioterapia Hipofraccionada

ICRU - *International Commission on Radiation Units and Measurements*, Comisión Internacional de Unidades y Medidas Radiológicas

IG-VMAT - *Image-Guided Volumetric Modulated Arc Therapy*, arcoterapia volumétrica de intensidad modulada guiada por imagen

IGRT - *Image-Guided Radiotherapy*, radioterapia guiada por imagen

IMOMA - Instituto de Medicina Oncológica y Molecular de Asturias

IMRT - *Intensity Modulated Radiotherapy*, radioterapia de intensidad modulada

IMT - inmunoterapia

Indel - Inserción-delección

ITV - *Internal Target Volume*, volumen blanco interno

MMR - *Mismatch Repair*, reparación de emparejamientos erróneos

MRD - *Minimal Residual Disease*, enfermedad mínima residual

IRM - Imagen por resonancia magnética

MSI - *Microsatellite Instability*, inestabilidad de microsatélites

NCCN - *National Comprehensive Cancer Network*

NGS - *Next Generation Sequencing*, secuenciación de nueva generación

OAR - *Organs At Risk*, órganos en riesgo

PARP - Poli (ADP-Ribosa) Polimerasas

pb - pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PD - *Progressive Disease*, enfermedad en progresión

PET - *Positron Emission Tomography*, tomografía de emisión de positrones

PR - *Partial Response*, respuesta parcial

PSA - *Prostate-Specific Antigen*, antígeno prostático específico

PRV - *Planning organ at Risk Volume*, volumen de planificación del OAR

PTV - *Planning Target Volume*, volumen blanco de planificación

qPCR - PCR cuantitativa

QT - Quimioterapia

R. U. - Reino Unido

RE – Reordenamiento

RM - Resonancia Magnética

RS - *Radiosurgery*, radiocirugía

RT - radioterapia

SBRT - *Stereotactic Body Radiotherapy*, radioterapia estereotáxica corporal

SD - *Stable Disease*, enfermedad estable

SEOM - Sociedad Española de Oncología Médica

SLP - Supervivencia Libre de Progresión

SNV - *Single Nucleotide Variant*, variante de un solo nucleótido

SRS - *Stereotactic Radiosurgery*, radiocirugía estereotáxica

SUVmax - *Maximum Standardized Uptake Value*, valor máximo de captación estándar

TAm-Seq - *Tagged-Amplicon deep Sequencing*

TC - Tomografía Computarizada

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

TKI - *Tyrosine Kinase Inhibitor*, inhibidor de la tirosina quinasa

VP - Verdadero Positivo

U. E. - Unión Europea

WES - *Whole Exome Sequencing*, secuenciación de exoma completo

WGS - *Whole Exome Sequencing*, secuenciación de genoma completo

Tabla de contenido

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	17
EL CÁNCER.....	19
Cifras del cáncer	21
Diagnóstico y tratamiento del cáncer	22
LA RADIOTERAPIA	26
Qué es la radioterapia y cuáles son sus indicaciones	26
Historia de los inicios de la radioterapia	27
Avances en el campo de la radioterapia	27
Radioterapia estereotáxica corporal (SBRT).....	29
La personalización de los tratamientos con radioterapia.....	30
Seguimiento en los tratamientos con radioterapia	31
Radiobiología de los tratamientos con radioterapia.....	31
LA GENÓMICA DEL CÁNCER.....	33
La secuenciación genómica.....	33
Aplicaciones de la genómica en la oncología.....	36
Secuenciación genómica exhaustiva en oncología.....	40
LA ONCOLOGÍA DE PRECISIÓN.....	46
Las <i>ómicas</i> en la Oncología de Precisión	47
LA BIOPSIA LÍQUIDA.....	47
Tipos de analitos en una biopsia líquida.....	48
Tipos de biopsia líquida.....	49
El ADN libre circulante.....	50
Hematopoyesis clonal.....	53
Técnicas de estudio del ADN tumoral circulante.....	54
La biopsia líquida en la oncología	55
Uso actual de la biopsia líquida en la práctica clínica.....	57
GENÓMICA Y BIOPSIA LÍQUIDA EN LA RADIOTERAPIA.....	59
Biomarcador predictivo	59
Biomarcador pronóstico y estratificación del riesgo.....	60
Adaptación del tratamiento a tiempo real	60
Enfermedad mínima residual	61
Seguimiento.....	62
OBJETIVOS.....	63
METODOLOGÍA.....	67
INDIVIDUOS	69
Pacientes sometidos a radioterapia	69
Individuos control sanos.....	72
OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	72

Recogida de muestras de sangre periférica y separación de plasma.....	72
Extracción de ADN germinal a partir de muestras de sangre.....	73
Extracción de cfDNA a partir de muestras de plasma sanguíneo	73
Extracción de ADN a partir de muestras de biopsia tumoral.....	74
CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE ADN.....	75
ESTUDIOS GENÓMICOS	76
ONCOgenics Complete TM : panel NGS sobre ADN tumoral y germinal	76
ESTUDIO LONGITUDINAL DE BIOMARCADORES EN ctDNA.....	80
Preparación de PCRs	80
Secuenciación, análisis bioinformático, filtrado de resultados.....	81
Sensibilidad y especificidad del método	82
ESTUDIO DE LA CONCORDANCIA ENTRE ctDNA Y ESTADO CLÍNICO	83
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84
ASPECTOS ÉTICOS	84
RESULTADOS	85
COHORTE	87
TRATAMIENTOS CON RADIOTERAPIA Y TOMA DE MUESTRAS	89
ANÁLISIS GENÓMICO EXHAUSTIVO	93
Subpanel germinal	93
Subpanel somático sobre biopsia de tejido.....	96
Panel somático sobre biopsia líquida.....	97
Comparación de resultados de los estudios somáticos.....	101
Accionabilidad global del análisis genómico exhaustivo	105
SELECCIÓN DE BIOMARCADORES PARA BIOPSIA LÍQUIDA.....	112
LA BIOPSIA LÍQUIDA EN RT	113
Estudio de los cambios en la [cfDNA] en los tratamientos con RT.....	114
Estudio de los cambios en el ctDNA en los tratamientos con RT	118
La biopsia líquida durante el tratamiento con radioterapia.....	121
La biopsia líquida después del tratamiento con radioterapia	124
DISCUSIÓN	133
Análisis genómico integrativo y exhaustivo.....	136
Biomarcadores de biopsia líquida en Oncología Radioterápica.....	141
Futuras líneas de investigación	149
CONCLUSIONES	151
REFERENCIAS.....	155
APÉNDICES	165

INTRODUCCIÓN

EL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad en la que la homeostasis de los organismos pluricelulares se ve alterada, permitiendo que algunas células crezcan de manera descontrolada. Está causado por la adquisición de alteraciones en el genoma una célula que le confieren capacidades biológicas aberrantes, transformándola en célula cancerígena que, al reproducirse, origina tumores. Hanahan y Weinberg, en su famoso artículo *"The hallmarks of cancer"*, publicado en la revista *Cell* en el año 2000 [1] y revisitado y actualizado en 2011 [2], definen como *hallmark* ("propiedades fundamentales") a cada una de las capacidades funcionales distintivas que adquieren las células al entrar en un proceso neoplásico y que, en conjunto, las habilitan para formar tumores malignos (con capacidad para invadir y metastatizar) (Figura 1).



Figura 1. Los hallmarks del cáncer. Las hallmarks o capacidades que adquieren las células cancerosas (en azul) y las características habilitantes que permiten que estas adquieran dichas capacidades (en verde) propuestas por Hanahan y Weinberg; se incluyen como "emergentes" las nuevas aportaciones de Hanahan. (Adaptación de figura tomada de Hanahan [3]).

Los autores proponen un total de 8 *hallmarks* y 2 características habilitantes:

-
1. Mantenimiento de las señales de proliferación: las células tumorales pueden producir sus propias señales de crecimiento para su proliferación, haciendo posible su crecimiento y división independientemente de señales externas.
 2. Evasión de los supresores del crecimiento: las células tumorales no son sensibles a los inhibidores de la matriz extracelular o en la membrana de las células adyacentes y pueden progresar a través del ciclo celular descontroladamente.
 3. Inmortalidad replicativa: las células tumorales desarrollan mecanismos para escapar del límite replicativo natural de las células normales que las conduce a senescencia, alcanzando un potencial ilimitado para crecer y dividirse.
 4. Activación de la invasión y metástasis: las células tumorales rompen las barreras que las confinan en su tejido de origen penetrando los tejidos adyacentes, y colonizan tejidos no adyacentes, dando lugar a tumores secundarios distantes.
 5. Inducción de la angiogénesis: las células tumorales son capaces de formar nuevos vasos sanguíneos, permitiendo un suministro continuo de oxígeno y nutrientes.
 6. Evasión de la muerte celular: las células cancerosas adquieren alteraciones que les permiten eludir la apoptosis o muerte celular programada.
 7. Evasión de la respuesta inmune: propuesto como "*hallmark* emergente" [2], describe la capacidad por la cual las células tumorales para evitar que las células del sistema inmunológico las reconozcan como células malignas y las destruyan.
 8. Reprogramación metabólica: "*hallmark* emergente" que se refiere al empleo de vías metabólicas alternativas, como por ejemplo el conocido efecto Warburg.

Se definen como "características habilitantes" a aquellos rasgos adquiridos que facilitan que las células cancerosas adopten los *hallmarks*, y se han propuesto dos:

1. Inestabilidad genómica y mutación: la acumulación de mutaciones facilita la adquisición de los *hallmarks* mediante alteraciones puntuales en genes implicados en la reparación de daños y control del ciclo celular o alteraciones estructurales que afectan a la estabilidad cariotípica.
2. Inflamación crónica: las células inflamatorias producen moléculas que pueden actuar promoviendo varios *hallmarks*.

Se han desarrollado diversos fármacos antitumorales (aprobados o en investigación) que interfieren en cada una de estas capacidades adquiridas con la intención de inhibir estos procesos esenciales para la progresión del tumor. [2]

En el año 2022 Hanahan publicó un nuevo artículo en el que vuelve a actualizar los *hallmarks* del cáncer, presentando dos nuevos:

- Desbloqueo de la plasticidad fenotípica: normalmente restringida en tejidos adultos, permite a las células tumorales evadir o escapar del estado de diferenciación terminal, lo que puede facilitar su malignización.
- Senescencia celular: pese a ser un conocido mecanismo protector contra el cáncer, nuevas evidencias apuntan a que las células senescentes pueden fomentar la carcinogénesis transmitiendo moléculas de señalización.

Asimismo, también propone dos nuevas características habilitantes:

- Microbiomas polimórficos: se ha establecido que existen microbiomas promotores de tumores, en los que intervienen especies bacterianas específicas.
- Reprogramación epigenética no mutacional: en las células tumorales se producen cambios en la expresión génica puramente regulados por factores epigenéticos.

A pesar de la alta heterogeneidad de los distintos tipos de cáncer, habiéndose descrito más de 150 subtipos que pueden afectar a la mayoría de órganos y tejidos [4], en todos los procesos neoplásicos malignos van adquiriéndose estas capacidades.

Cifras del cáncer

En diciembre de 2020 se publicó la última actualización de la base de datos GLOBOCAN, del Observatorio Mundial del Cáncer, en la que se estima que en el año 2020 fueron diagnosticados 19,3 millones de casos de cáncer en el mundo y se produjeron 10 millones de muertes a causa de esta enfermedad. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, por detrás de las enfermedades cardiovasculares. [5, 6] Del mismo modo, según el informe anual de 2023 "Las cifras del cáncer en España", elaborado por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) en colaboración con

la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) [7], el cáncer continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en España, estimándose que alcanzará los 279.260 casos en el año 2023. De la mano del incremento en la incidencia que se espera a nivel mundial, en España se estima que en 2040 la incidencia alcance los 341.000 casos, lo que supone un incremento de más del 30 % con respecto al año 2020. Mientras que los cánceres más frecuentemente diagnosticados en España en 2023 serán los de colon y recto (42.721 nuevos casos), mama (35.001), seguidos de pulmón (31.282) y próstata (29.002), es el cáncer de pulmón el que presenta mayores tasas de mortalidad (22.438 fallecimientos al año, un 72 % de su incidencia). [7]

En contraposición a los datos de incidencia, la tasa global de mortalidad por cáncer ha descendido desde principios de la década de 1990 más de un 30 %. [8] Esta evolución decreciente de la mortalidad por cáncer observada a nivel mundial, que también reproducen los datos de España, se debe principalmente a la mejora de los tratamientos y a las medidas de prevención: por un lado, medidas de prevención primarias, que incluyen los programas de fomento de hábitos de vida saludable; y, por otro lado, medidas de prevención secundarias, como los programas de detección precoz.

Diagnóstico y tratamiento del cáncer

Tipos de tratamiento del cáncer

Un pilar fundamental en la lucha contra el cáncer son los avances terapéuticos. En la actualidad, el oncólogo dispone de una amplia variedad de tratamientos:

- Cirugía: consiste en extirpar el tumor y se considera el método de tratamiento más antiguo. Asimismo, sirve como método diagnóstico, permite la obtención de tejidos tumorales que se analizan para determinar si una lesión es maligna, así como para evaluar su grado de diseminación.
- Radioterapia (RT): consiste en el uso de radiación ionizante para destruir las células tumorales. Debido a la relevancia de esta modalidad de tratamiento para la presente Tesis Doctoral, más adelante se profundizará en ella.

-
- Quimioterapia (QT): consiste en el uso de fármacos de acción citotóxica contra las células tumorales, que fundamentalmente atacan la mayor capacidad proliferativa de éstas. Debido a esto y a que se administra de manera sistémica, afecta también negativamente a las células sanas que más se replican.
 - Hormonoterapia: terapia sistémica basada en el uso de fármacos que actúan sobre determinadas hormonas, principalmente bloqueándolas, y se utilizan para tratar aquellos tipos de cáncer que dependen de hormonas para su progresión.
 - Terapia dirigida: se basa en el uso de fármacos que, aunque se administran sistémicamente, actúan específicamente sobre células tumorales que tienen una determinada característica (p.ej. genética). Por su relevancia para la presente Tesis Doctoral, este tipo de terapias se abordarán en detalle más adelante.
 - Inmunoterapia: se fundamenta en el uso de fármacos, administrados sistémicamente, que producen que el sistema inmunitario del paciente reconozca a las células cancerosas como aberrantes y las combata.

Estos tratamientos a menudo se combinan entre sí. Existen diferentes regímenes:

- Neo-adyuvancia: el tratamiento neoadyuvante (generalmente QT) es aquel que se administra antes del tratamiento principal a fin de reducir el tamaño del tumor para facilitar su eliminación posterior (generalmente, por cirugía o RT).
- Adyuvancia: el tratamiento adyuvante es aquel que se administra tras el tratamiento principal para eliminar los restos de células cancerígenas que pueda haber en el organismo, con la intención de prevenir las recurrencias y metástasis.
- Concomitancia: el tratamiento concomitante (generalmente QT) es aquel que se administra a la vez que otro tratamiento (generalmente RT, conocido como "quimiorradioterapia"). Ambos tratamientos actúan de manera sinérgica mejorando los resultados. Generalmente se emplea en enfermedad avanzada.

Los tratamientos oncológicos no dejan de avanzar y constantemente entran en juego nuevas herramientas complementarias: desde la introducción de la robótica en la cirugía o las sofisticadas técnicas de imagen en tiempo real que se integran en los

tratamientos con RT, pasando por la personalización de tratamientos farmacológicos basada en estudios moleculares, hasta las nuevas técnicas de edición génica que han permitido, entre otros, el desarrollo de la prometedora terapia con células CAR-T. Entre las nuevas tendencias, el uso de la inteligencia artificial para integrar la información clínica y molecular está marcando ya el futuro inmediato de la oncología.

Programas de cribado para detección precoz y seguimiento

Los programas de cribado o *screening* permiten identificar individuos con hallazgos sugestivos de cáncer o de un estado precanceroso, normalmente seleccionados por grupos de edad o factores de riesgo. El objetivo es aumentar la supervivencia mediante una identificación temprana de la enfermedad (meses/años antes de que produzca síntomas), aumentando la probabilidad de que se encuentre en estadios iniciales, que, en general, son más curables. [8] En España hay varios programas de cribado del cáncer, de diverso nivel de implantación en las diferentes comunidades autónomas, los principales: cribado de cáncer de mama por mamografía en mujeres de entre 50 y 69 años [9, 10], el cribado de cáncer de cérvix dirigido a mujeres entre 25 y 65 años mediante citología o la detección de cepas de HPV de alto riesgo [11], y el cribado de cáncer colorrectal dirigido a personas entre los 50 y 69 años basado en la detección de sangre oculta en heces [12]. Las técnicas de cribado también pueden diagnosticar casos de cáncer precoz que, aunque no hubieran sido detectados, no llegarían a representar un problema de salud real para el paciente, fenómeno conocido como "sobrediagnóstico", produciendo un incremento en la incidencia, no en la mortalidad. [8]

Además de los programas de cribado poblacional para el diagnóstico precoz, en los propios pacientes oncológicos se lleva a cabo de manera regular, y según lo indicado en las guías clínicas (*National Comprehensive Cancer Network, NCCN* [13]), la observación detallada de la evolución tras los tratamientos a modo de vigilancia. Por lo general, se emplean las pruebas de imagen diagnóstica y los biomarcadores.

PRUEBAS DE IMAGEN: hay 3 tipos ampliamente utilizadas en oncología:

- Tomografía axial computarizada (TAC o TC): procedimiento que emplea rayos X para crear imágenes detalladas, o exploraciones, de regiones internas del cuerpo.
- Tomografía por emisión de positrones (*Positron Emission Tomography*, PET): procedimiento que utiliza moléculas radiactivas para generar las imágenes; como la fluorodesoxi-glucosa F-18 (FDG). Las células cancerígenas presentan un metabolismo más activo y tienen una mayor tasa de absorción de FDG, por lo que, en la imagen las regiones cancerosas se ven marcadas con mayor intensidad.
- Imagen por resonancia magnética (IRM): procedimiento que utiliza imanes y ondas de radio para generar imágenes del cuerpo. No emplea radiación ionizante.

Estas pruebas se pueden realizar tras el tratamiento para evaluar la respuesta y periódicamente en el seguimiento, para controlar recidivas. [13] Se trata de pruebas muy útiles y no invasivas, aunque presentan desventajas como la exposición repetida a radiación, el alto coste y la lista de espera por saturación de los servicios. [14]

BIOMARCADORES MOLECULARES: se define como biomarcador molecular a una molécula biológica que puede encontrarse en la sangre u otros fluidos o tejidos corporales que se emplea para el seguimiento de procesos fisiológicos o patológicos. [15] En rutina asistencial llevan muchos años utilizándose diversos biomarcadores para el seguimiento del paciente oncológico, principalmente proteínas. Algunos ejemplos:

- antígeno prostático específico (*prostate-specific antigen*, PSA): proteína producida por las células de la próstata que a menudo está elevada en sangre en pacientes con cáncer de próstata (aunque también en afecciones benignas). La PSA en plasma se utiliza tanto para vigilar los casos de cáncer como para cribado. [16]
- antígeno carcinoembrionario (*carcinoembryonic antigen*, CEA): glicoproteína del endodermo embrionario que puede permanecer mínimamente en el colon. Su presencia en sangre se ha relacionado con procesos oncológicos. Se utiliza para la monitorización del cáncer de colon y no está recomendado para cribado. [17]
- antígeno carbohidrato 125 (CA-125): glicoproteína elevada en sangre en casos de cáncer de ovario y se utiliza para monitorizar la enfermedad. [18]

Se han establecido umbrales en cuanto a los niveles de un determinado biomarcador que guían las decisiones terapéuticas, no obstante, al no tratarse de moléculas exclusivamente producidas por los tumores, es necesario apoyarse en otros datos clínicos. Por ello, también en estos casos se debate la problemática del sobrediagnóstico y el sobretratamiento. Es necesario descubrir biomarcadores más específicos de las células tumorales que ayuden en la toma de decisiones clínicas.

LA RADIOTERAPIA

Qué es la radioterapia y cuáles son sus indicaciones

El tipo de radiaciones ionizantes más empleadas en RT son los rayos X (producidos por fotones, al igual que los rayos gamma), pero también se pueden utilizar haces de otras partículas como electrones o protones. A lo largo del siglo XX, la oncología radioterápica evolucionó desde la aplicación experimental de rayos X, tras su descubrimiento, hasta convertirse en la herramienta terapéutica fundamental y altamente sofisticada que es hoy en día. Se estima que más del 60 % de los pacientes diagnosticados de cáncer en España requerirán RT a lo largo de su enfermedad, esperándose un incremento del 25 % para el año 2025. [19] Una de las causas de este incremento son los programas de detección precoz, que permiten la detección de cánceres más localizados, susceptibles de tratamientos con RT.

Las principales indicaciones de la RT son:

1. Con intención curativa en monoterapia como alternativa a la cirugía.
2. Para potenciar otros tratamientos, por ejemplo, como tratamiento neoadyuvante a la cirugía o concomitante junto con QT.
3. Para reducir el riesgo de recaída, como tratamiento adyuvante tras la cirugía
4. Con objetivo paliativo, para reducir los síntomas en caso de que no haya posibilidad de curación.

Historia de los inicios de la radioterapia

En el año 1895, el físico alemán Wilhelm Conrad Röntgen descubrió los rayos X, hallazgo por el cual le fue otorgado el primer premio Nobel de Física de la historia, en 1901. [20] Entre los hitos más relevantes en este campo cabe destacar el descubrimiento de la radiactividad por Antoine Henri Becquerel en 1896, o el descubrimiento del radio en 1898 por Marie Skłodowska-Curie y Pierre Curie. [21] Menos de un año después del descubrimiento de Röntgen, en 1896, el médico francés François-Victor Despeignes administró el que se considera el primer tratamiento con rayos X, a un paciente con cáncer de estómago; aunque otros médicos se disputan dicho hito, como Grubbé, Voigt y Freund. [22] Existen diferentes fechas propuestas, pero se considera que el inicio de la oncología radioterápica como especialidad médica data del año 1899, en una reunión de la Sociedad sueca de Medicina en la que se presentaron simultánea e independiente dos casos documentados de curación de cáncer de piel tras tratamientos con RT. [23, 24]

Avances en el campo de la radioterapia

En la década de los 50 fueron apareciendo nuevas metodologías: en 1951, en Ontario, se administró el primer tratamiento con cobalto radiactivo Co-60 (rayos gamma) [25] y en 1953, en Londres, se estableció el primer prototipo de acelerador lineal de partículas, dispositivos eléctricos que se encargan de producir la radiación sin recurrir a materia radiactiva [26] (*Figura 2*).



Figura 2. Sistema de radioterapia TrueBeam. Fotografía del sistema de radioterapia TrueBeam STx Powered by Novalis (Varian Oncology, EE. UU.) instalado en el IMOMA/Centro Médico de Asturias, un modelo de acelerador lineal utilizado para administrar radioterapia de alta precisión.

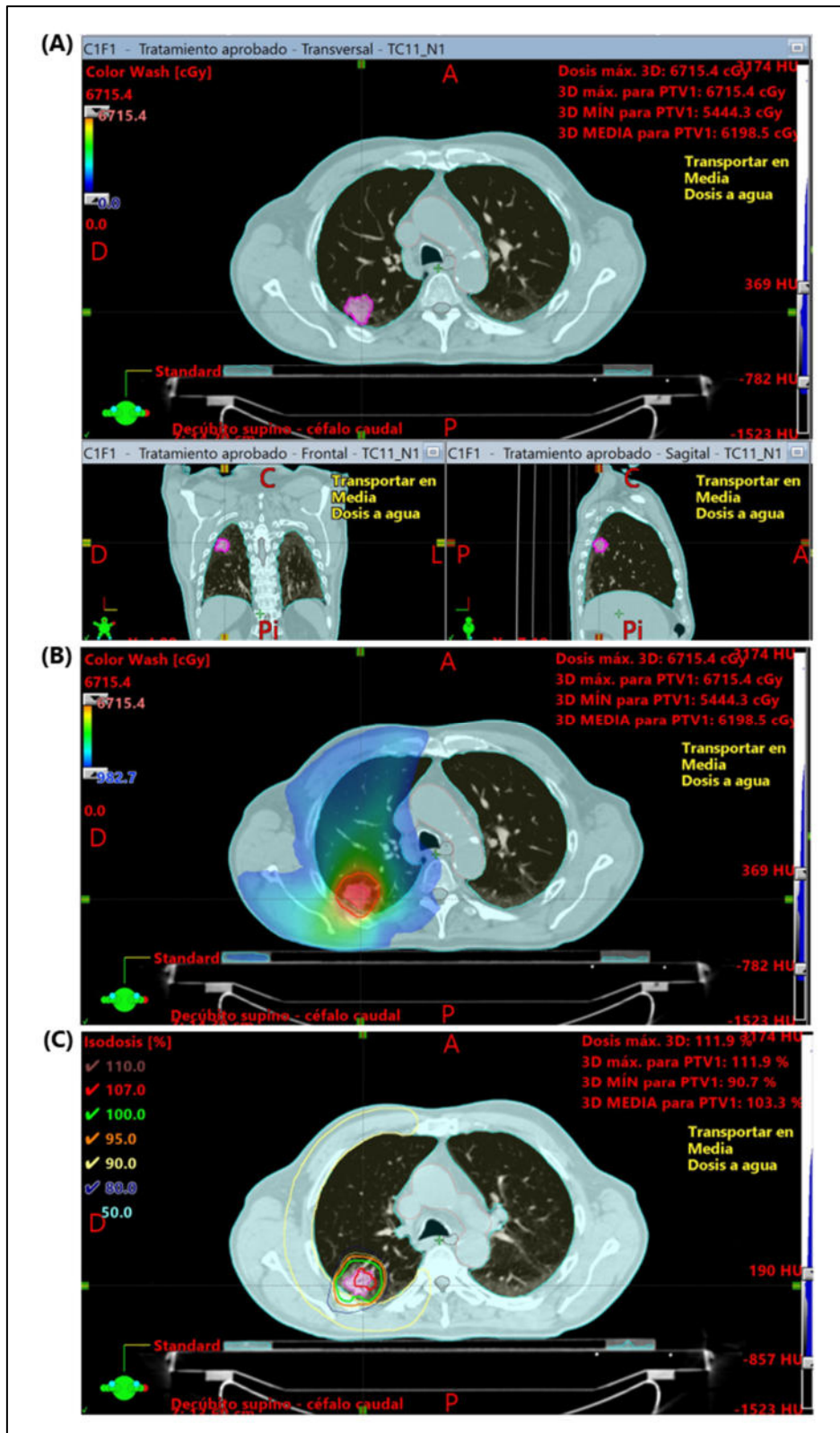


Figura 3. Planificación dosimétrica de un tratamiento con radioterapia estereotáxica fraccionada (SBRT) de un adenocarcinoma de pulmón estadio I. A) TC tórax (corte transversal, corte frontal y corte sagital). La lesión tumoral está contorneada (coloreada) en violeta (9.47 cc). B) Corte transversal de TC de tórax. La dosis terapéutica prescrita se define en color rojo sobre el PTV. (En rojo se marca el PTV). En colores se muestra el gradiente de radiación que reciben los órganos próximos a la zona a tratar. C) Corte transversal de TC de tórax. En rojo aparece contorneado el PTV, y en distintos colores, las curvas de isodosis.

En las siguientes décadas, diversos avances tecnológicos facilitaron el desarrollo de los tratamientos de los que disponemos hoy en día: a la RT en 2 dimensiones planificada a partir de las radiografías convencionales (~1970), le siguió la integración de la TC y la dosimetría tridimensional (~1980) o la IRM y el PET, que permiten la planificación de los tratamientos de manera mucho más precisa (~1990), constituyendo la RT 3D. Entre la década de 1980 y 1990 se desarrollaron la RT de intensidad modulada (*Intensity Modulated Radiotherapy*, IMRT), modalidad en la cual la dosis se conforma a la estructura tridimensional del tumor, y la RT guiada por imagen *Image-Guided Radiotherapy*, IGRT), en la que se utilizan las imágenes médicas para mejorar el tratamiento, de manera que podamos limitar de manera muy precisa dónde administrar la radiación (*Figura 3*). Se denomina RT 4D a aquella que tiene en cuenta también la dimensión temporal y administra la radiación en función del ciclo respiratorio del paciente, especialmente útil en órganos que se mueven con la respiración. [27]

Radioterapia estereotáctica corporal (SBRT)

Normalmente, la RT se administra en diferentes sesiones o fracciones de radiación diaria. En los tratamientos de RT con fraccionamiento convencional (CFRT), los tratamientos suelen consistir en dosis de que oscilan entre 180 y 200 cGy (Gy = gray, unidad de medida de la dosis absorbida de radiaciones ionizante; cGy = centigray), administrados una vez al día, 5 días a la semana durante 6-7 semanas. En 1949 el neurocirujano sueco Lars Leksell desarrolló la radiocirugía (*Radiosurgery*, RS), una técnica de RT externa en la que se administra una dosis única de irradiación con alta precisión (milimétrica) sobre un volumen pequeño, localizado en el cerebro. [28] Se denomina radiocirugía estereotáctica (*Stereotactic Radiosurgery*, SRS) a los tratamientos de radiocirugía que se administran de manera fraccionada en varias sesiones, primera técnica de RT hipofraccionada (*Hypofractionated Radiotherapy*, HFRT) desarrollada.

Posteriormente se acuñó el término RT estereotáctica corporal (*Stereotactic Body Radiotherapy*, SBRT) para referirse a la extensión de este tipo de tratamientos hipofraccionados a regiones del cuerpo fuera del cráneo. [29] Los buenos resultados observados en la tasa de control local aplicando la SBRT a tumores primarios de pulmón

llevaron a la adopción generalizada de esta técnica en pacientes con tumores no resecables. [30, 31] En 1995, Samuel Hellman y Ralph Weichselbaum introdujeron por primera vez el término "oligometástasis", que hace referencia a un estado intermedio entre la enfermedad local y el cáncer metastásico avanzado en el que el proceso de metástasis es limitado tanto en la localización, afectando a órganos específicos, como en el número de lesiones tumorales (entre 1 y 5 lesiones adicionales). [32, 33] De aquí nació la hipótesis clínica de que algunas de las modalidades de tratamiento oncológico reservadas para el cáncer localizado, como la cirugía o los tratamientos de SBRT, podrían ser efectivas para los pacientes con oligometástasis. Tras los primarios de pulmón, la SBRT se comenzó a aplicar en el tratamiento de metástasis pulmonares [34, 35], hepáticas [36] y otras lesiones con muy buenos resultados [37-40]. Por tanto, la oligometástasis se puede manejar como una fase de cáncer avanzado potencialmente curable y optar por tratamientos curativos, clásicamente destinados a estadios iniciales.

La personalización de los tratamientos con radioterapia

Los tratamientos con RT han alcanzado un alto nivel de personalización en cuanto a la precisión en su administración. La radiación se administra teniendo en cuenta la histología del tumor, la anatomía del paciente e, incluso, el movimiento corporal causado por la respiración. Los volúmenes de tejido que reciben radiación están calculados de manera sofisticada para minimizar el efecto sobre los tejidos sanos. No obstante, todavía hay grandes grupos de pacientes que reciben las mismas dosis y fraccionamiento o el mismo plan de seguimiento, puesto que no se dispone de información para modular el tratamiento más allá de los factores clínico-patológicos. Aunque no existen marcadores que permitan estratificar a todos los pacientes y diseñar tratamientos más personalizados en lo que respecta a intensidad o cantidad de dosis en función de las características del individuo y su enfermedad. Aunque existen algunos ejemplos en los que se utilizan biomarcadores moleculares para ayudar en la toma de decisiones de los tratamientos con RT, estas metodologías se limitan casi exclusivamente a la decisión de aplicar RT en contexto de adyuvancia, no se han implementado de manera generalizada en la práctica rutinaria y precisan de más estudios de validación que demuestren su utilidad clínica.

Seguimiento en los tratamientos con radioterapia

Por lo general, el seguimiento de los pacientes sometidos a tratamientos de intención curativa en primera línea, como es la SBRT, implica seguimiento clínico y pruebas de diagnóstico por imagen (CT) periódicas (p.ej., en pulmón: cada 3-6 meses durante 2 años). [13] Estas técnicas detectan recurrencia a nivel macroscópico, siendo capaces de detectar lesiones partir de 1 cm de diámetro y, con cierta frecuencia, los resultados son no concluyentes debido a las modificaciones que los tejidos sufren tras la RT. Concretamente en el caso de los pacientes con cáncer de pulmón, se estima que entre un 60 % y un 100 % desarrollarán cambios radiográficos tras el tratamiento con SBRT (por ejemplo, inflamación, consolidación pulmonar u opacidad "en vidrio esmerilado", difusos o parcheados) que pueden imitar los patrones de imagen de una recurrencia tumoral en pruebas diagnósticas de rutina. [41-43] Estos fenómenos también se han observado en lesiones hepáticas. [44] En pacientes en los que persiste la dificultad para discernir entre recurrencia tumoral o estos artefactos, se puede realizar un PET/TC. La vigilancia mediante pruebas de imagen puede llevar a un retraso en la detección de recaídas, lo que repercute en el éxito de las opciones terapéuticas posteriores, y puede hacer que un paciente pierda la oportunidad de someterse a intervenciones curativas a tiempo. Por otro lado, el aumento de la supervivencia ha hecho que crezca el número de pruebas radiológicas realizadas en un paciente, aumentando la carga de radiación recibida, con sus riesgos biológicos asociados.

Actualmente no se dispone de otro tipo de marcadores que permitan evaluar la respuesta a un tratamiento con RT, por lo que urge la necesidad de descubrir biomarcadores moleculares específicos que no se vean afectados por los cambios tisulares observados tras la RT y puedan detectar enfermedad mínima residual (*Minimal Residual Disease*, MRD) de manera más sencilla y segura que las pruebas de imagen.

Radiobiología de los tratamientos con radioterapia

La radiobiología se encarga de estudiar el efecto de la radiación sobre la materia viva. Conocer mejor la radiobiología de los tratamientos con RT ayuda a entenderlos en profundidad y, en último término, mejorarlos. Tradicionalmente, el modelo

radiobiológico clásico, denominado “modelo lineal-cuadrático”, postula que la radiación causa daños en el ADN que pueden llevar a la muerte celular tanto por acción directa como indirecta a través de radicales libres. Los buenos resultados obtenidos con las nuevas técnicas de HFRT con respecto a la CFRT sugieren que la explicación de su especial eficiencia podría requerir el desarrollo de otro modelo radiobiológico. Este es aún un asunto controvertido y en discusión, pero por general se acepta que en los tratamientos HFRT, se producen los mismos fenómenos que en el modelo clásico, con algunos factores adicionales como una mayor dosis biológica efectiva, el daño al tejido vascular y una respuesta inmune potenciada. [45, 46]

El principal mecanismo de muerte celular inducido por la RT es la apoptosis, pero posteriormente se han asociado otros procesos que se ilustran en la *Figura 4*. [47]

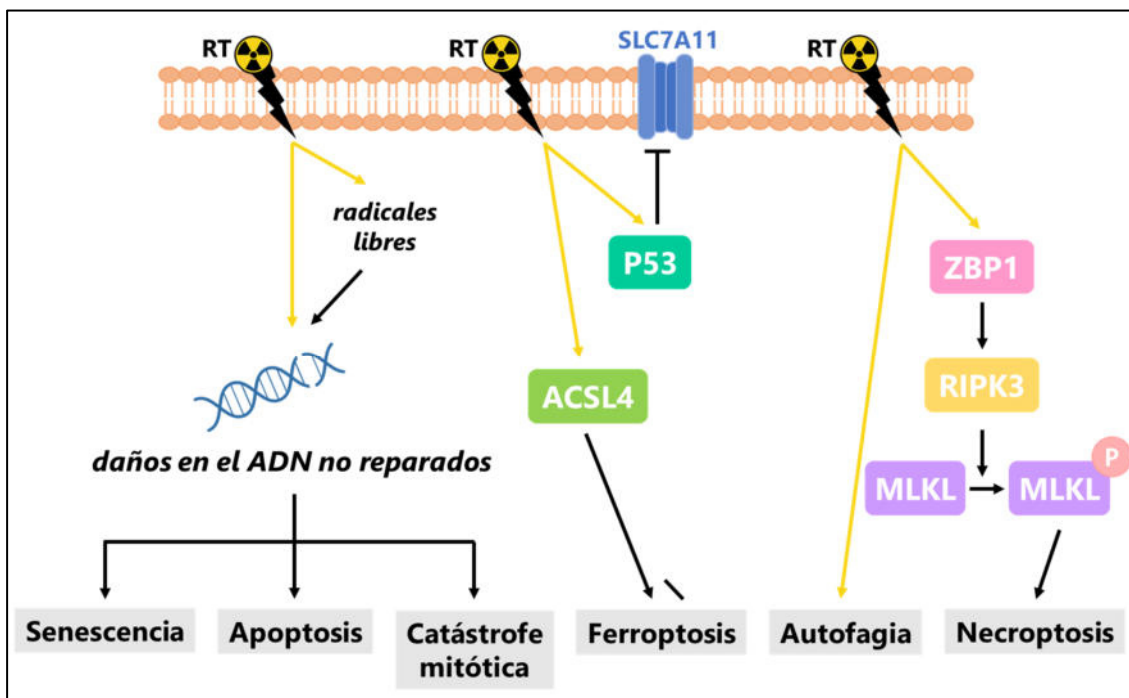


Figura 4. Procesos celulares inducidos por la radioterapia (RT). La RT puede actuar sobre el ADN, directamente o indirectamente a través de la generación de radicales libres, provocando roturas de doble cadena/cadena sencilla. Si estos daños no son reparados pueden dar lugar a diferentes procesos de muerte celular, como apoptosis o catástrofe mitótica, o conducir a senescencia. La RT puede inducir también la ferroptosis (por la expresión de las proteínas ACSL4 y P53) o la necroptosis (cascada ZBP1-RIPK3-MLKL), así como la autofagia. ACSL4: acyl-CoA synthetase long-chain family member 4; ZBP1: Z-DNA-binding protein 1; RIPK3: receptor-interacting serine/threonine kinase 3; MLKL: mixed-lineage kinase domain-like pseudokinase.

LA GENÓMICA DEL CÁNCER

La genómica es la rama de la biología que se ocupa del estudio de todo el ADN de un organismo, es decir, su genoma. Se centra en la identificación y caracterización de todos los genes y elementos funcionales del genoma de un organismo y de sus interacciones. El cáncer es una enfermedad del genoma y, gracias al desarrollo y avances en el campo de la genómica, se han podido descubrir no solo alteraciones genéticas puntuales asociadas con el desarrollo de esta patología, sino también mapas de interacciones génicas importantes en los procesos oncológicos.

La secuenciación genómica

Iniciativas de secuenciación del genoma humano

Tras la publicación del primer borrador de la secuencia del genoma humano en 2001 [48, 49], multitud de iniciativas han continuado contribuyendo al conocimiento de la genómica de la salud y de las enfermedades humanas. Cabe destacar el "Cancer Genome Project" lanzado en el año 2000 por el *Wellcome Trust Sanger Institute* (Reino Unido, R. U.) o el programa "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) iniciado en 2006 e impulsado por el *National Cancer Institute* y el *National Human Genome Research Institute* (EE. UU.). En 2008 se creó el "Consortio Internacional del Genoma del Cáncer", así como otras iniciativas que han contribuido a profundizar en las bases moleculares del cáncer. [50, 51]

El Servicio Nacional de Salud británico estableció en 2013 la empresa *Genomics England* para ejecutar el proyecto "100,000 Genomes" con el objetivo de secuenciar el genoma de pacientes con enfermedades raras y sus familias, así como cánceres frecuentes. El proyecto piloto, con 4660 individuos, se concluyó con éxito en 2018, tras lo cual el nuevo objetivo es secuenciar 5 millones de genomas en 5 años. [52, 53] Por otro lado, en 2018 nació la iniciativa europea "1+ Million Genomes" con el objetivo de disponer de 1 millón de genomas secuenciados asociados a información fenotípica de los individuos, para investigar en cáncer, enfermedades raras o enfermedades infecciosas. [54] En la revista *Nature* en 2020 se publicó un compendio de artículos con

resultados del proyecto “Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes” del *Consortio Internacional del Genoma del Cáncer* y el TCGA consistente en la secuenciación genómica de más de 2600 tumores y sus respectivos tejidos sanos de 38 tipos de cáncer, prestando especial atención a las regiones menos exploradas del genoma como regiones reguladoras o ARNs no codificantes estableciendo patrones comunes entre los diferentes tipos de tumores. [55]

A pesar de los múltiples esfuerzos, no es hasta marzo de 2022 cuando se publica la secuencia completa del genoma humano, fruto del consorcio *Telomere-to-Telomere* “T2T”, incluyendo el 8 % que continuaba sin elucidar, compuesto principalmente por regiones de heterocromatina. Estas partes del genoma se corresponden con satélites centroméricos, regiones teloméricas, repeticiones de bajo número de copias o los brazos cortos de cromosomas acrocéntricos. El genoma de referencia resultante (“T2T-CHM13”) contiene 3055 millones de pares de bases (pb), corrige errores de las versiones previas e introduce 200 millones de pb que se predicen 1956 genes, siendo 99 potencialmente codificantes de proteína. [56] La anterior versión, denominada “GRCh38”, fue publicada en 2017 [57] y la última actualización (GRCh38.p14) data de marzo de 2022. [58] En el año 2023 se ha publicado la primera versión del “pangenoma humano”, construido gracias a la secuenciación del genoma de 47 individuos genéticamente diversos, y que espera completarse con un total de 350 individuos para 2024; este nuevo pangenoma de referencia refleja mejor la diversidad genética de la especie humana y supone un avance para estudio de genoma y enfermedad. [59]

Técnicas de secuenciación

Desde el descubrimiento de la estructura del ADN en 1953 por Watson y Crick [60], con las aportaciones de Rosalind Franklin, no es hasta la década de 1970 cuando aparecen las primeras técnicas de secuenciación de ADN [61]. A continuación, se describen las diferentes técnicas que se han ido desarrollando:

Secuenciación de primera generación: se denomina así a dos tipos de secuenciación: la basada en el *método enzimático de terminación de cadena* (método de los didesoxinucleótidos marcados radiactivamente), desarrollada por Frederick Sanger y

la basada en el *método de fragmentación química*, desarrollado por Walter Gilbert, ambas de 1977. Supusieron aportaciones de gran relevancia, pero de baja aplicabilidad en la clínica ya que se trataba de técnicas altamente manuales y tediosas, que implicaban el uso de compuesto nocivos (radiactivos). En la década de 1990, basándose en el método Sanger y empleando didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia y con la integración de procesos automáticos y la electroforesis capilar, se creó la técnica de secuenciación de ADN que aún hoy se utiliza en la clínica diaria. El "Proyecto Genoma Humano" se completó empleando esta técnica, que pese a los avances analiza las moléculas de una manera lineal, base a base, y por ello es lenta y costosa. [61]

Secuenciación de segunda generación o secuenciación de nueva generación (*Next-Generation Sequencing*, NGS): conjunto de tecnologías capaces de obtener de manera masiva y en paralelo las secuencias de gran cantidad de fragmentos de ADN que son comparadas y ensambladas contra un genoma de referencia para obtener la secuencia completa de interés, empleando métodos bioinformáticos. Estas técnicas pudieron desarrollarse gracias al acceso al primer genoma humano de referencia (*Proyecto Genoma Humano*) y permiten obtener las secuencias de manera más rápida, automática y barata. Las más extendidas son: a) la *secuenciación por síntesis* o tecnología Illumina (*Illumina*, EE. UU.), que emplea la desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) fluorescentes; y b) la *secuenciación por semiconducción* o tecnología Ion Torrent (*Thermo Fisher Scientific*, EE. UU.), que mide un cambio de voltaje generado por la liberación de un protón al añadirse los dNTPs. [62]

Secuenciación de tercera generación: en el año 2011, *Pacific Biosciences* (EE. UU.) comercializó el primer dispositivo basado en la técnica de secuenciación a tiempo real de molécula única, consistente en la lectura de la secuencia a partir de una única molécula de ADN empleando dNTPs marcados fluorescentemente y diseñada para proporcionar lecturas altamente precisas y más largas, lo que facilita el posterior ensamblado. Por otro lado, *Oxford Nanopore* (R. U.) desarrolló en 2014 la secuenciación por nanoporos, en la que molécula de ADN va pasando por un nanoporo mientras se va midiendo la corriente eléctrica que se va generando. La secuencia completa del genoma humano publicada en 2022 se obtuvo gracias al empleo de estas técnicas de secuenciación de tercera generación. [56, 63]

La secuenciación masiva reduce de manera drástica los costes (Figura 5) y el tiempo de análisis, y genera una cantidad de información sin precedentes que ha potenciado el desarrollo de la Bioinformática, que combina las matemáticas y la estadística con la computación para poder procesar, analizar e interpretar los datos.

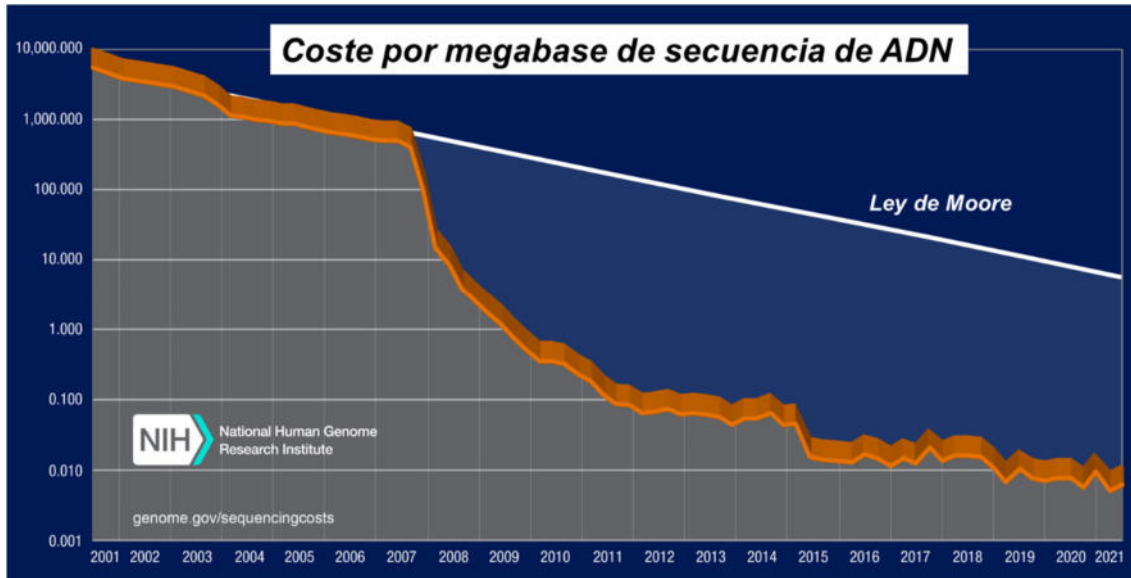


Figura 5. Evolución del coste de la secuenciación del ADN. Comparación entre la evolución del coste por megabase de ADN secuenciada frente a la "Ley de Moore". En el año 1965 el cofundador de Intel, Gordon Moore, formuló la conocida como "ley de Moore", que dice que "mientras el número de transistores por pulgada cuadrada en circuitos integrados se duplica cada dos años, los costes se reducen a la mitad" [64], una observación aplicada al campo de la computación que hoy en día aún se utiliza para evaluar el avance en este campo. A partir del año 2007, gracias a la llegada de la secuenciación masiva, la tendencia en los costes de la secuenciación de ADN se aparta y supera con creces la ley de Moore. En naranja: el coste en dólares de determinar una megabase (un millón de bases) de secuencia de ADN; en blanco: la Ley de Moore. (Adaptación de figura tomada del National Human Genome Research Institute [65]).

Aplicaciones de la genómica en la oncología

Más allá de su uso en investigación para elucidar los procesos moleculares subyacentes al cáncer, la aplicación de la genómica en la rutina asistencial puede proporcionar información relevante en diferentes etapas del manejo del paciente.

Diagnóstico

Conocer las alteraciones genéticas que tiene un tumor puede ser relevante para definir el diagnóstico. Esto cobra especial relevancia en el caso de los tumores

hematológicos. Según los datos tomados de la base de datos "Precision Oncology Knowledge Base" (ONCOKB) del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* [66] hay un total de 33 asociaciones gen-tumor recogidas por la FDA requeridas para la emisión del diagnóstico (implicando 22 genes diferentes y 27 tipos de cáncer). Algunos ejemplos son: la detección de la fusión *BCR-ABL* ("cromosoma de Filadelfia") para el diagnóstico de la leucemia mieloide crónica o, recientemente, de la leucemia mieloide aguda. [67, 68]

Pronóstico

Aun restringiéndonos a un tipo de cáncer concreto, existen mucha variabilidad entre los pacientes y algunas alteraciones presentes en el tumor pueden asociarse a mayor o menor supervivencia, determinar la agresividad del tumor, etc. Por ejemplo, el estado mutacional de *TP53* tiene un importante valor pronóstico en diversos tipos de cáncer, asociándose su alteración genética a mal pronóstico. [69] En cáncer colorrectal, por ejemplo, la presencia de MSI se asocia con mejor pronóstico. [70] En un trabajo publicado en 2022, se analiza información genómica de más de 10000 pacientes e identifican alteraciones relacionadas con el pronóstico en 32 tipos de cáncer. [71]

Tratamiento

Se denomina "terapias dirigidas" a aquellos fármacos que tienen como diana proteínas implicadas en el crecimiento, la división y la progresión del cáncer. Según la FDA, hoy en día existen más de 100 fármacos dirigidos aprobados en oncología cuyas fichas técnicas recogen indicaciones guiadas por biomarcadores. [72] Se conoce como farmacogenómica al estudio de cómo el genoma afecta a la respuesta de un tumor/paciente a un determinado fármaco.

Desde la pionera aprobación por la FDA del tamoxifeno en 1977 para pacientes con cáncer de mama positivo para receptor de estrógenos, considerado el primer fármaco dirigido contra el cáncer [73], se han aprobado diversas terapias dirigidas para tratar a pacientes portadores de biomarcadores específicos. Otro hito emblemático es la aprobación en 1998 del fármaco trastuzumab, un anticuerpo monoclonal para el

tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). [74] Otro fármaco dirigido que ilustra el poder de las terapias personalizadas es el imatinib, un inhibidor de la tirosina quinasa (*Tyrosine Kinase Inhibitor*, TKI) aprobado en 2001 para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica positiva para el cromosoma de Filadelfia, que actualmente está aprobado para 7 indicaciones más. [75] Estos tratamientos han supuesto un beneficio sustancial para los pacientes y los sistemas sanitarios. En los últimos años, la FDA ha aprobado 7 indicaciones de fármacos guiadas por biomarcador sin restricciones en cuanto al tipo histológico, las denominadas terapias “tejido/tumor-agnósticas”: desde 2017, pembrolizumab está indicado en pacientes con tumores sólidos que presenten inestabilidad de microsatélites (*Microsatellite Instability*, MSI) elevada o con deficiencia de reparación de emparejamientos erróneos (*Mismatch Repair*, MMR). Posteriormente, se aprobaron larotrectinib y entrectinib en tumores portadores de fusión del gen *NTRK*, en 2018 y 2019, respectivamente. [76-78] Estas indicaciones fueron aprobadas también por la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA) meses después. [79] En 2021, la FDA aprobó el uso de dostarlimab para tumores MMR-deficientes, y en 2022, la combinación dabrafenib+trametinib para tumores con la variante V600E en *BRAF*, así como selpercatinib para tumores portadores de fusión de *RET*. [80-83]

La farmacogenómica también estudia la presencia de alteraciones en el tumor que le otorguen resistencia a un determinado fármaco o alteraciones germinales que puedan asociarse con altas toxicidades en el paciente. [84]

Asesoramiento genético en cáncer hereditario

Las variantes genéticas germinales son aquellas que afectan a la línea germinal, es decir, a las células reproductoras de un organismo (óvulos o espermatozoides) y se transmiten a todas las células de la progenie. Se estima que solo el 5-10 % de los casos de cáncer tienen una causa hereditaria [85], siendo lo que se hereda una mayor susceptibilidad a padecer cáncer que el resto de la población. Se han descrito más de 50 síndromes hereditarios de predisposición al cáncer. [86]

Los más característicos se muestran en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Principales síndromes de predisposición al cáncer

Síndrome de cáncer hereditario	Principales genes asociados	Modo de herencia	Incidencia [87]	Principales tumores asociados
Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	AD	1/500-2.500	Cáncer de mama, de ovario y de próstata
Síndrome de Lynch	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>EPCAM</i>	AD	1/200-1000	Cáncer colorrectal, de endometrio, ovario, gástrico, urotelial, etc.
Neurofibromatosis tipo 1	<i>NF1</i>	AD	1/2500	Neurofibroma, glioma del nervio óptico, neurofibrosarcoma
Poliposis adenomatosa familiar	<i>APC</i>	AD	1/8.000-13.000	> 100 adenomas colónicos, cáncer colorrectal
Poliposis asociada a <i>MUTYH</i>	<i>MUTYH</i>	AR	1/8.000	10- > 100 adenomas colónicos, cáncer colorrectal
Retinoblastoma familiar	<i>RB1</i>	AD	1/13.500-25.000	Retinoblastoma bilateral infantil
Neoplasia endocrina múltiple tipo 1	<i>MEN1</i>	AD	2-10/100.000	Cáncer de paratiroides, cáncer de páncreas, tumor hipofisario
Neoplasia endocrina múltiple tipo 2	<i>RET</i>	AD	1/25.000	Carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma
Síndrome de tumor hamartoma - <i>PTEN</i>	<i>PTEN</i>	AD	1/200.000	Hamartoma
Síndrome de Von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>	AD	1/36.000-45.00	Carcinoma renal de células claras
Síndrome de Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	AD	desconocida, muy poco frecuente	Gran variedad: sarcoma, leucemia, tumores cerebrales, cáncer de la glándula suprarrenal, cáncer de mama, etc.

AD: autosómico dominante. AR: autosómico recesiva Fuentes: SEOM [87] y <https://www.orpha.net/>

La mayoría de estos síndromes presentan modo de herencia autosómico dominante (AD), penetrancia elevada (la mayor parte de los portadores padecerá alguno de los tipos de cáncer que conforman el síndrome) y expresividad variable (no todos los portadores afectados desarrollan el mismo tipo de cáncer). Las técnicas de secuenciación masiva han permitido el descubrimiento de nuevos genes responsables de diversos síndromes de cáncer hereditario, pero también han revelado variantes genéticas que confieren un riesgo moderado de desarrollo de cáncer (genes de predisposición al cáncer de baja penetrancia). [87, 88]

Mientras que la agregación de casos de cáncer en una familia hace sospechar de la presencia de una predisposición, es la propia identificación de la variante genética causante la que permite hacer un diagnóstico definitivo y confirmar que el paciente tiene un síndrome de predisposición al cáncer. La confirmación genética del diagnóstico facilita la realización de un asesoramiento genético integral para adaptar el manejo clínico del paciente y de su familia desde diferentes aproximaciones, permitiendo:

- conocer el pronóstico del tumor (capacidad de malignización) y del paciente (aparición de segundos primarios)
- establecer pautas de seguimiento adecuadas y personalizadas
- optar a medidas profilácticas preventivas
- tomar decisiones reproductivas
- realizar asesoramiento genético a la familia

Seguimiento

Existen diversos marcadores moleculares de seguimiento, principalmente proteínas, que derivan de las células tumorales y circulan por la sangre. Las fluctuaciones en los niveles de estos marcadores se utilizan para hacer un seguimiento de la enfermedad. Si el tumor se diferencia de las células normales por sus alteraciones en el genoma, es lógico pensar que dichas alteraciones genéticas pueden actuar como biomarcadores más específicos que las proteínas que también producen las células normales, aunque en menor medida. Las alteraciones genéticas diferenciales de un tumor pueden monitorizarse mediante el estudio del ctDNA. Este tema se abordará en detalle más adelante, en el apartado "La biopsia líquida".

Secuenciación genómica exhaustiva en oncología

Atendiendo a su alcance, se pueden definir varios tipos de estudios genéticos:

- Estudios dirigidos a una variante concreta: Los estudios genéticos más sencillos, en los que se interroga una posición concreta del genoma a fin de conocer si el paciente (o su tumor) es portador de una determinada alteración puntual. Para este tipo de

estudios la técnica más utilizada es la secuenciación Sanger. A día de hoy los estudios dirigidos se aplican principalmente en estos escenarios: (1) estudio germinal para evaluar si un individuo es portador de una variante patogénica puntual identificada en la familia (conocido como "estudio de portadores"), (2) en estudios somático de farmacogenómica para fármacos que se han asociado a respuesta/resistencia/toxicidad a una única variante genética concreta. En test farmacogenómicos, se recurre típicamente también a estudios que interrogan un pequeño número de posiciones del genoma, generalmente dentro del mismo gen, recurrentemente alteradas y que se asocian con una determinada patología o respuesta a un fármaco ("hotspot mutacionales").

- Estudios de un gen completo: Las pruebas de secuenciación de un gen único normalmente están indicadas para establecer un diagnóstico genético de una patología de la que hay sospecha clínica, cuando existen múltiples variantes de un mismo gen que se han asociado a la misma. Tradicionalmente se ha utilizado para este fin la secuenciación Sanger, aunque, cada vez está más extendida la NGS.
- Estudios exhaustivos: Dada la complejidad de la enfermedad oncológica y la sofisticada red de interacciones moleculares/metabólicas en cáncer, poco a poco va creciendo el número de genes que se ha demostrado que están implicados, así como el número de dianas terapéuticas. Se conoce como análisis genómico exhaustivo (*Comprehensive Genomic Profiling, CGP*) a la detección simultánea de distintos tipos de alteraciones genómicas en un gran número de genes mediante un único test. Suelen basarse en el uso de la NGS y podríamos definir varios subtipos:
 - o paneles multigénicos: este tipo de pruebas se emplea con fines diagnósticos ante un caso que presenta una sintomatología que pueden corresponder a una amplia gama de afecciones o cuando la patología puede estar causada por alteraciones en varios genes. En oncología, los paneles multigénicos se utilizan en las siguientes situaciones: a) estudios germinales en casos de sospecha de cáncer hereditario con antecedentes familiares que no se asocian a un único gen; b) estudios somáticos de farmacogenómica para analizar el perfil mutacional de un tumor e identificar terapias personalizadas. [88, 89]

-
- exomas: consisten en la secuenciación de todo el conjunto de regiones codificantes de proteínas del genoma, lo que constituye aproximadamente un 2 % del genoma. Estos estudios están menos integrados en la clínica y se utilizan en el caso de pacientes con sospecha de alteración germinal sin indicios claros de una patología concreta o con fines de investigación.
 - genomas: los estudios de genoma completo se encargan de secuenciar todo el material genético (exoma y regiones reguladoras o de función no conocida) a fin de encontrar nuevas alteraciones asociadas a enfermedad. Presenta un mayor coste e implica la necesidad de almacenar gran cantidad de datos.

Centrándonos en los estudios CGP con utilidad clínica en oncología y atendiendo al tipo de muestras que analizan, estos pueden ser somáticos o germinales.

Estudios somáticos exhaustivos

Los estudios somáticos son aquellos que se ocupan de analizar las alteraciones presentes en el tumor. Dado el alto y creciente número de terapias dirigidas guiadas por información genómica, los estudios genéticos han adquirido una notable importancia en los procedimientos de selección de terapias en las consultas de oncología y, debido al drástico abaratamiento de los costes de secuenciación, los estudios exhaustivos, (principalmente los paneles multigénicos) son, a menudo, la primera opción por su capacidad para revelar simultáneamente todo el espectro de variantes asociadas a terapias dirigidas aprobadas. Concretamente, en el contexto del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado, con un considerable número de dianas terapéuticas identificadas y accionables con fármacos dirigidos, el enfoque CGP ha demostrado mejorar el rendimiento de la accionabilidad, en comparación con las pruebas genéticas secuenciales, sin un aumento significativo de los costes o del tiempo de respuesta. [90] No obstante, mientras que múltiples trabajos demuestran que esta estrategia también identifica alteraciones genómicas accionables en la mayoría de los pacientes de diversos tipos de tumores [91-93], sigue existiendo cierta controversia sobre la indicación universal de los estudios CGP en la práctica clínica diaria. Esto se debe a que aún no está claro si el enfoque CGP y la terapia dirigida aportan ventajas reales a los resultados de

los pacientes. Para responder a esta cuestión se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos que comparan diferentes acontecimientos clínicos o *endpoints* (supervivencia global, supervivencia libre de progresión (SLP), etc.) en pacientes tratados con terapia dirigida o terapia convencional. Zhang y col. presentan una amplia recopilación de diferentes ensayos clínicos que abordan este asunto, concluyendo que la evidencia a favor de la eficacia de la aproximación CGP es prometedora, pero no sólida aún. [94]

En la regulación americana, para que los test CGP puedan usarse en la rutina asistencial han de ser autorizados por la FDA como test de diagnóstico requerido para una determinada indicación de un fármaco (*Companion Diagnostic, CDx*), es decir, que los test sean reconocidos como método diagnóstico válido para proporcionar una determinada información (p.ej. la presencia de un biomarcador específico) esencial para decidir si el paciente debe ser tratado con un fármaco y que eso conste en la ficha técnica. En el año 2017, la FDA aprobó los primeros CDx basados en paneles NGS multigénicos: los paneles *OncoPrint™ Dx Target Test (Thermo Fisher)*, *MSK-IMPACT® (Memorial Sloan Kettering Cancer Center)* y *FoundationOne®CDx (Foundation Medicine)*. [95]

Por su parte, la regulación de la EMA para los productos diagnósticos *in vitro* exige que estos dispongan de marcado CE-IVD (asimilable a la denominación CDx) para poder ser utilizados con fines diagnósticos, pero de momento no se les otorga una autorización específica para una indicación biomarcador-fármaco. No obstante, Europa va muy por detrás en la regulación de la aplicación de test genéticos de diagnóstico. En España, en marzo de 2023, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios informó de la publicación y entrada en vigor del Reglamento (UE) 2023/607, que supone una extensión de los periodos transitorios del Reglamento (UE) 2017/746 de diagnóstico *in vitro* (IVDR) por el que son regulados estos productos, pero que no se están aplicando de manera generalizada hasta la fecha, por lo que se espera que en los próximos meses haya mayor uniformidad en el territorio. [96]

Estudios germinales exhaustivos

Las guías clínicas actuales recomiendan la aplicación de un test genético germinal en pacientes con una sospecha de cáncer hereditario, ya sea por la aparición de cáncer

a edad temprana, una alta incidencia de cáncer en una familia, la presencia del mismo tipo de cáncer en varios miembros de una familia, la aparición en un individuo de tumores bilaterales, multifocales, varios tipos de tumor o determinados subtipos raros altamente asociados a casos de predisposición familiar, como el cáncer de ovario de tipo seroso de alto grado, por ejemplo. En estos casos se recomienda realizar test genéticos dirigidos específicamente a la sospecha clínica concreta. Por su parte, los test exhaustivos germinales permiten interrogar simultáneamente todos los genes asociados con cáncer hereditario, haciendo posible la identificación de la variante causante de la patología, especialmente en aquellos casos en los que la historia familiar no orienta hacia un síndrome de cáncer familiar concreto. Múltiples estudios han demostrado que la aplicación de un test genómico germinal exhaustivo en todos los pacientes permite identificar alteraciones accionables en el doble de individuos, en comparación a la estrategia de aplicación limitada a pacientes con sospecha familiar. [97-99]

En cierto sentido, el uso de paneles multigénicos germinales es más controvertido que el de los somáticos. Esto se debe, entre otras cosas, a que un resultado positivo acompañará al paciente toda su vida y, potencialmente, a varias generaciones de su familia, pudiéndose tener implicaciones clínicas relevantes. A su vez, los paneles pueden incluir genes que, *a priori*, no están estrictamente asociados con la patología del paciente, lo que puede revelar hallazgos incidentales, añadiendo un grado de complejidad al proceso de asesoramiento genético. En el año 2013, el *Colegio Americano de Genética Médica y Genómica* (ACMG) publicó unas guías en las que proponen 56 genes para los cuáles la detección de una alteración genética patogénica es de recomendada notificación al paciente, al estar asociadas con alta predisposición a trastornos clínicos relevantes para los cuáles se dispone de medidas preventivas o tratamiento. Muchos de estos genes están asociados a síndromes de predisposición hereditaria al cáncer, aunque también a otras patologías accionables, como varios tipos de miocardiopatías [100]; en el año 2022 se publicó la última actualización [101]. La detección de alteraciones de este tipo se suele considerar un "hallazgo incidental" o "hallazgo secundario". Los pacientes sometidos a estudios germinales exhaustivos deben ser informados de la posibilidad de obtener dichos resultados y tienen el derecho de decidir si no desean recibir información asociada a una patología diferente a la que es objeto de estudio.

La secuenciación germinal no solo tiene relevancia en cuanto a la identificación de una predisposición hereditaria, sino que también tiene un importante valor metodológico. Acompañar los estudios somáticos de secuenciación germinal permite elucidar el origen de las variantes identificadas en el tumor, ya que este también será portador de las variantes germinales del paciente, y eso tiene relevancia para identificar dianas terapéuticas o biomarcadores genómicos de seguimiento. [97, 98]

Genómica y ensayos clínicos

Otra valiosa aplicación de la NGS en oncología es la selección de pacientes para ensayos clínicos en base a criterios genómicos, ya que los paneles multigénicos pueden maximizar las posibilidades de acceso de los pacientes a esos estudios clínicos. Sin embargo, en la práctica aparecen muchas barreras para el acceso a uno de estos ensayos; con frecuencia, sólo una pequeña proporción de los pacientes se beneficia de los resultados de las pruebas; ya sea por la imposibilidad de acceder al fármaco diana, la existencia de terapias estándar prioritarias o la esperanza de vida demasiado corta de los pacientes, que los excluiría de la mayoría de los ensayos clínicos. [91, 102]

Ante este escenario, existe una clara necesidad de rediseñar los ensayos clínicos para acelerar la aprobación de nuevos fármacos dirigidos y ampliar la aplicación de los ya aprobados, así como para hacerlos más integradores para la heterogeneidad de los pacientes oncológicos. Para satisfacer estas necesidades, nacen los ensayos clínicos conocidos como "protocolos maestros", procedimientos con múltiples subestudios que pueden tener objetivos diferentes, coordinando la evaluación de uno o más fármacos en uno o más tipos de enfermedad dentro del marco de un único ensayo clínico. El tipo más extendido de protocolos maestros son los ensayos clínicos guiados por biomarcadores y agnósticos respecto al tipo de tumor, conocidos como "ensayos en cesta" (*basket trials*), utilizados para evaluar nuevos fármacos basados en variantes moleculares específicas y/o fenotipos inmunitarios que incluyen a pacientes con tipos tumorales o histologías heterogéneos. Este novedoso enfoque refuerza la aplicabilidad de los paneles multigénicos en la mayoría de los pacientes con cáncer. [103, 104]

LA ONCOLOGÍA DE PRECISIÓN

La Medicina de Precisión se basa en un enfoque asistencial cuyo objetivo principal es determinar qué intervenciones pueden ser más beneficiosas para cada paciente en función de las características del individuo y de su enfermedad. [105] El concepto "Medicina de Precisión" se ha popularizado especialmente durante la última década, sustituyendo al término "Medicina Personalizada", actualmente menos extendido y en desuso. Se considera que "Medicina de Precisión" empezó a formar parte del léxico científico-médico a partir de 2008, cuando Clayton Christensen, un economista de la Harvard Business School (Boston), acuñó la expresión para describir cómo los médicos pueden valerse del diagnóstico molecular para realizar un diagnóstico inequívoco sin recurrir a la intuición. El término trascendió en 2011, cuando el Consejo Nacional de Investigación de EE. UU. presentó un proyecto para modernizar la clasificación de las patologías en base a información molecular, sustituyendo al sistema taxonómico basado en la sintomatología. [106, 107] La Medicina de Precisión deja atrás el enfoque terapéutico "talla única" ("*one-size-fits-all*"), basado en aplicar el mismo procedimiento para todos los pacientes con una misma patología, pasando a considerar idealmente toda la idiosincrasia de un paciente: su genoma y otra información molecular, su microbioma, la historia familiar, el entorno, el estilo de vida, etc. Con esa información más detallada se elabora una estrategia diagnóstica, terapéutica y preventiva personalizada. Desde el punto de vista terapéutico, el objetivo no es diseñar un fármaco o un seguimiento único para cada paciente, sino disponer de herramientas para poder definir subpoblaciones de pacientes que responderán de modo similar a una terapia o que tienen la misma susceptibilidad a una enfermedad. [108]

Pese a las múltiples fuentes de información que nutren las decisiones en esta forma de hacer medicina, la genómica ha sido la clara impulsora de la Medicina de Precisión. Tratándose el cáncer de una enfermedad genética de gran impacto social y económico, la oncología ha sido la especialidad médica por la que la Medicina de Precisión ha penetrado en la investigación y en la clínica, popularizándose el término "Oncología de Precisión". De la mano de los avances en genómica, la proliferación de las terapias dirigidas ha potenciado notablemente la Oncología de Precisión.

Las ómicas en la Oncología de Precisión

Los avances en NGS no solo han permitido descifrar las alteraciones en la secuencia del ADN presentes en los tumores y su relación con los procesos de carcinogénesis, sino que también han facilitado la investigación de las alteraciones en los perfiles de expresión génica o en las modificaciones postraduccionales en proteínas, dando lugar a otras estrategias “ómicas” que profundizan en el conocimiento de los procesos biológicos subyacentes al cáncer. Entre ellas, cabe destacar:

- Transcriptómica: estudio del conjunto de moléculas de ARN producto de la transcripción de un genoma, es decir, del perfil de expresión de los genes.
- Epigenómica: estudio del conjunto de modificaciones epigenéticas para determina el estado de activación/silenciamiento de genes/regiones genómicas
- Proteómica: estudio del conjunto de proteínas expresadas, sus modificaciones postraduccionales, su distribución en la célula o sus interacciones.
- Metabolómica: estudio de las pequeñas moléculas (metabolitos) que participan en los procesos metabólicos de un organismo.
- Metagenómica: estudio de todos los genomas presentes en una muestra de un determinado hábitat, como puede ser el propio ser humano. El metagenoma intestinal está formado por el propio genoma humano y el de otros organismos que habiten allí como bacterias, virus y hongos.

LA BIOPSIA LÍQUIDA

En el “Simposio Internacional sobre Cáncer Mínimo Residual” celebrado en Atenas en el año 2009, el oncólogo americano Howard Scher, del *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (Nueva York), utilizó el término “biopsia líquida” para referirse a la aplicación del estudio de las células tumorales circulantes (*Circulating Tumor Cells*, CTCs) para evaluar la idoneidad de dos terapias dirigidas en cáncer de próstata asociadas a alteraciones moleculares específicas. [109] Se cree que esa fue la primera vez que se

utilizó el término, que fue popularizándose hasta acuñarse definitivamente tras un artículo de Pantel y Alix-Panabières de 2013, en el que definen la “biopsia líquida” como un “análisis de sangre de una sensibilidad tan alta que es capaz de detectar una sola célula tumoral escondida entre mil millones de células hematopoyéticas normales”. [110] En la actualidad, el concepto de biopsia líquida se ha expandido y con él se hace referencia de manera global a todas las pruebas de detección y análisis de diversos tipos de analitos, no sólo células, que están en diferentes fluidos corporales y permiten hacer un seguimiento de la enfermedad de manera menos invasiva que las biopsias de tejido.

Tipos de analitos en una biopsia líquida

Una biopsia líquida de sangre consiste en una muestra de sangre periférica y contiene multitud de analitos diferentes, entre ellos:

- Células sanguíneas: glóbulos blancos (principal fuente de ADN constitucional de una muestra de sangre, derivada de tejidos hematopoyéticos, pero empleada habitualmente como representativa del ADN germinal en test genómicos que tienen por objeto identificar variantes germinales), glóbulos rojos o plaquetas (ambas, células anucleadas que no contienen material genético)
- Células somáticas circulantes: además de las células propiamente sanguíneas, en la sangre pueden encontrarse otras células circulantes que deriven de otros tejidos del cuerpo, entre ellas habrá una porción derivada del tumor, las conocidas como células tumorales circulantes (*Circulating Tumor Cells, CTCs*). Las CTCs proceden de un tumor primario o metástasis y migran por el sistema circulatorio ocasionando procesos metastásicos; desde los ganglios linfáticos a la médula ósea y hasta la sangre periférica, y pueden llegar a órganos distantes. Las CTCs son muy escasas, en pacientes metastásicos se pueden detectar 1-10 CTCs por mililitro de sangre. Su estudio tiene muchas aplicaciones, aunque se requieren técnicas altamente sensibles y sofisticadas, como la citometría de flujo. [111, 112]
- Ácidos nucleicos libres circulantes: en la sangre se pueden detectar fragmentos de ácidos nucleicos libres, entre los que cabe destacar el ADN libre circulante

(*cell-free DNA*, cfDNA), conjunto de fragmentos de ADN generados a partir de procesos de muerte celular por los que las células se fragmentan y liberan al medio extracelular sus componentes. También se puede encontrar ARN libre circulante y microARNs. Más adelante se dedica un apartado específico al cfDNA.

- **Exosomas:** pequeñas vesículas membranosas que se liberan al medio a partir de las células y pueden contener ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, etc. Tienen funciones de comunicación intercelular y son una fuente de material genético derivado de las células del organismo y, potencialmente, del tumor. [113]
- **Proteínas:** en la sangre se pueden encontrar multitud de glicoproteínas o antígenos, comúnmente utilizadas como biomarcadores de enfermedad.

Tipos de biopsia líquida

Las biopsias líquidas pueden obtenerse de diversos fluidos corporales:

- **Sangre:** el fluido corporal por excelencia del que se toman las biopsias líquidas, la mayoría de estudios sobre biopsia líquida se realizan sobre muestras de sangre. Para el estudio del cfDNA, la sangre se procesa mediante centrifugación, formándose varias fracciones separadas, de la que se selecciona el plasma, que es la fracción acelular que contiene los ácidos nucleicos libres (*Figura 6*).

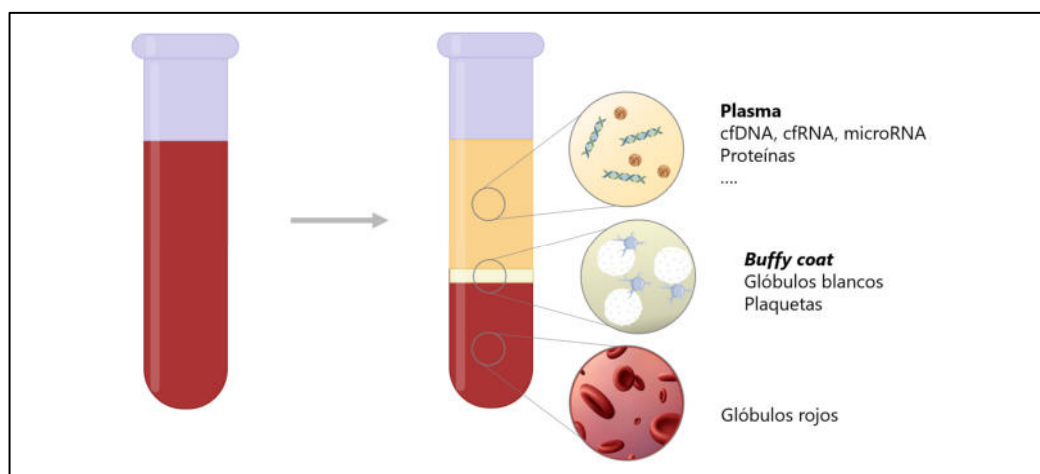


Figura 6. La biopsia líquida de sangre. Mediante la centrifugación de una muestra de sangre se forman varias fracciones: plasma, fracción superior, acelular, donde se encuentran los ácidos nucleicos circulantes; buffy coat (capa leucoplaquetar), fracción intermedia donde están glóbulos blancos y plaquetas, y, en la parte inferior, la fracción de los glóbulos rojos.

-
- Orina: se puede emplear tanto para el estudio de cáncer de riñón o de vejiga, como para otros tipos de cáncer, puesto que se ha demostrado que el ADN liberado a la circulación es filtrado por los riñones a la orina. [114, 115]
 - Líquido pleural: principalmente empleado en cáncer de pulmón. Cuando las células malignas invaden el espacio pleural (entre el pulmón y la pared torácica) se forma una acumulación de líquido que bloquea el drenaje normal (derrame pleural maligno), pudiendo contener células y otros analitos circulantes. [116]
 - Líquido cefalorraquídeo: ha demostrado ser útil para el estudio de tumores cerebrales, como el glioma, en los cuáles no se libera cfDNA a sangre, por lo que el plasma sanguíneo no es un buen espécimen para este analito. [117]

El ADN libre circulante

En el año 1948, Mandel y Métais publicaron el artículo "Ácidos nucleicos en el plasma sanguíneo humano" ("*Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme*"), en el que describen por primera vez la presencia de fragmentos de ADN libres en la sangre en pacientes con lupus eritematoso sistémico [118]; por aquel entonces, ni siquiera Watson y Crick habían descrito la estructura del ADN y el descubrimiento del ADN circulante no captó demasiada atención en la comunidad científica. Pasaron 30 años hasta que, en 1977, Leon y col. caracterizaron el cfDNA presente en plasma de pacientes con cáncer, demostrando que estos presentan generalmente niveles más altos de cfDNA que los individuos sanos, siendo aún mayor su concentración en casos de metástasis. [119] Se ha demostrado que niveles elevados de cfDNA en sangre no necesariamente se relacionan con procesos oncológicos, puesto que también se han detectado en mujeres embarazadas o pacientes trasplantados; a su vez, el ejercicio físico o varios procesos patológicos no malignos, como inflamación, diabetes, traumatismos, infecciones, etc. pueden producir un aumento del cfDNA. [120-123]

El cfDNA está compuesto principalmente por ADN bicatenario altamente fragmentado y presenta un tamaño de 160-180 pb, siendo su tamaño predominante 167 pb (*Figura 7*). Este tamaño se corresponde con la longitud de la molécula de doble hélice de ADN que se enrolla alrededor de un octámero de histonas formando un nucleosoma

cuando el ADN se encuentra en forma de cromatina, más unas decenas de pb adicionales del segmento de ADN que une dos nucleosomas (conector) (Figura 8). En procesos de apoptosis, las nucleasas cortan la cromatina accediendo a las regiones del conector internucleosómico de tal forma que se liberan fragmentos de ADN con ese tamaño característico. [124, 125]

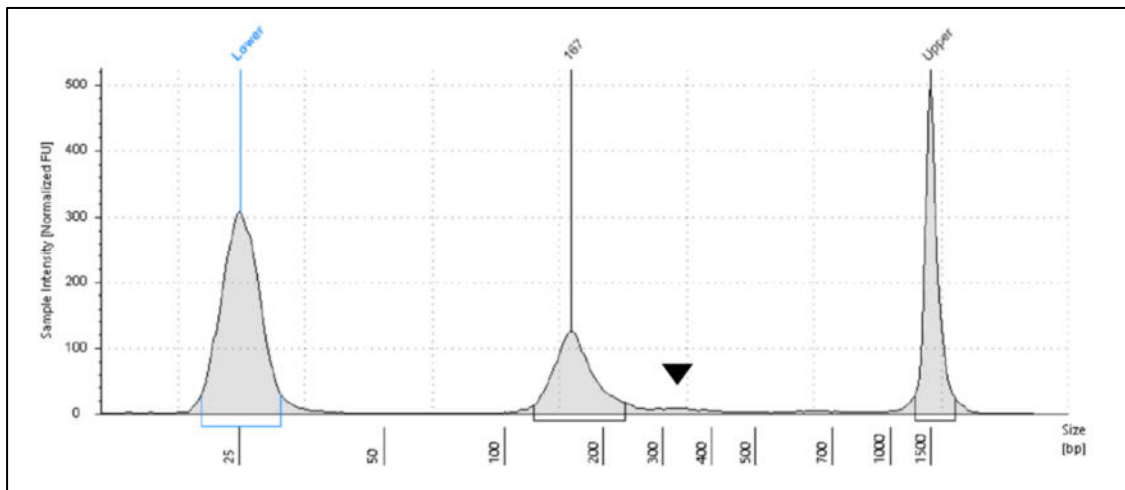


Figura 7. Control de calidad de una muestra de ADN libre circulante (cfDNA). Gráfica resultante de analizar una muestra de cfDNA de plasma con el equipo de electroforesis capilar TapeStation (Agilent). En la zona central se observa un pico de un tamaño de 167 pb correspondiente a las moléculas de cfDNA. Señalado con un triángulo negro se observa un pico minoritario de un tamaño aproximado de ~350 pb que se correspondería con fragmentos de ADN enrollados en dos nucleosomas consecutivos. En los extremos de la gráfica se observan los picos correspondientes a los marcadores de control de tamaño molecular (lower y upper).

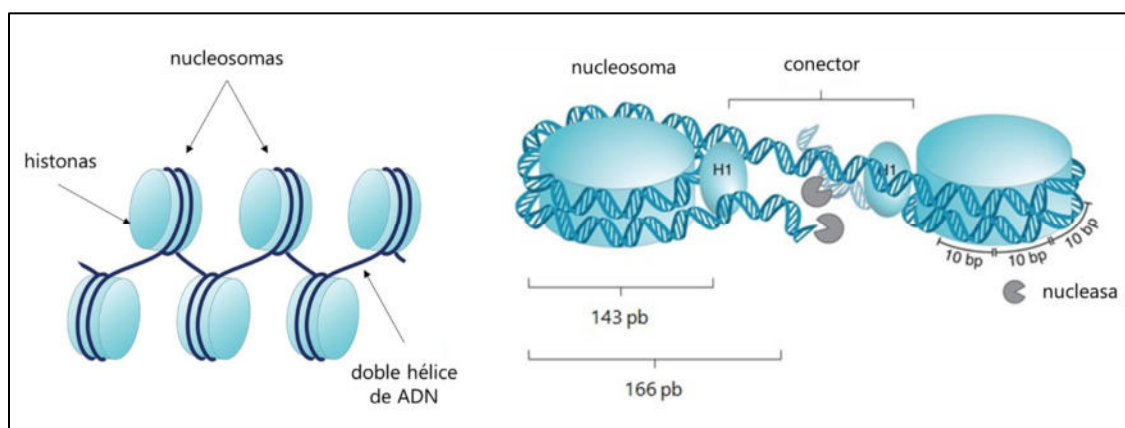


Figura 8. Nucleosomas. Representación del enrollamiento de la doble hélice de ADN alrededor de los octámeros de histonas para formar los nucleosomas en la estructura característica "collar de perlas" para el empaquetamiento de la cromatina. A la derecha se indica la longitud de estas moléculas de ADN y las regiones a las que pueden acceder las nucleasas para dar lugar a los fragmentos característicos del cfDNA. (Adaptación de figura tomada de Lo y col. [125]).

Se ha demostrado que en individuos sanos la mayor parte del cfDNA deriva de las células hematopoyéticas. [126] En pacientes oncológicos, se conoce como ADN tumoral circulante (*circulating tumor DNA*, ctDNA) a la porción de cfDNA que derivada del tumor y, por consiguiente, portará las alteraciones propias de este. El ctDNA se detectó por primera vez en 1989: Stroun y col. identificaron la presencia de ctDNA en sangre empleando una prueba basada en la estabilidad reducida de las hebras de ADN de las células tumorales. [127] Tras ello, en 1994 Vasioukhin y col. detectaron variantes tumorales en *KRAS* en muestras de plasma de casos de cáncer hematológico [128], y en 1996 Chen y col. identificaron alteraciones en microsatélites en ctDNA de cáncer de pulmón [129]. El ctDNA puede proceder tanto de células que han experimentado muerte celular en el tumor y cuyo material genético se ha trasvasado al torrente sanguíneo como de las propias CTCs que mueren mientras circulan por la sangre.

La concentración de cfDNA en plasma en individuos sanos puede variar entre 0 y 100 ng/mL de plasma, con una media de 30 mg/mL, mientras que en individuos con cáncer puede llegar hasta 1 µg/mL, con una media de 180 ng/mL. [130] El ctDNA puede representar entre el 0,01 % y el 10 % del total de cfDNA en sangre, dependiendo del tamaño, la localización, la vascularización y el recambio celular del tumor. [131] Se ha demostrado la presencia de ctDNA en la mayoría de los tipos de cáncer, estando presente de manera más extendida en cáncer de pulmón, colorrectal, de mama, de ovario y de cabeza y cuello y siendo menos abundante en cáncer cerebral, renal o prostático. Bettegowda y col. refirieron una menor concentración de ctDNA en enfermedad localizada en comparación con cáncer metastásico en varios tipos de cáncer. [132]

Por otro lado, se ha observado que el tamaño de los fragmentos de ctDNA es sensiblemente menor (~134-144 bp) al del cfDNA en controles. Una explicación probable es que el ADN de las células tumorales está globalmente hipometilado, lo que da lugar a que el ADN se enrolle de manera más holgada, haciendo que la cromatina esté más accesible y, por tanto, facilitando el acceso de las nucleasas. [133]

Está ampliamente aceptado que la principal fuente de cfDNA son los procesos de apoptosis de las células, principalmente por la acción de la ADNasa activada por caspasa, endonucleasa que genera roturas de doble hebra en las regiones internucleosómicas de la cromatina. [134] No obstante, en las células tumorales existe una importante actividad

antiapoptótica (uno de los *hallmarks* del cáncer), por lo que también se han postulado otros procesos por los cuales el cfDNA es liberado, como la necrosis (dando lugar a fragmentos de más de 1000 pb) y la secreción activa por células vivas, mediante exosomas. Asimismo, se discute la contribución de otros procesos más recientemente descritos como la NETosis, la formación de trampas extracelulares de neutrófilo, estructuras compuestas de redes de cromatina y proteínas que son liberadas al medio extracelular por los neutrófilos. [135-137] Rostami y col., sostienen que los mecanismos de muerte celular que dan lugar a la liberación de cfDNA están condicionados por los estímulos que reciben las células. [136, 138]

Diversos estudios han demostrado que la vida media del cfDNA varía entre 16 minutos y 2,5 h; posteriormente, el cfDNA puede ser aclarado por la acción de nucleasas y excretado por la orina, absorbido por el hígado o el bazo y degradado por macrófagos. [131, 139, 140]

Hematopoyesis clonal

La hematopoyesis clonal (HC) describe la expansión asintomática de células sanguíneas que derivan de una única célula madre hematopoyética. Se ha demostrado que la probabilidad de presentar fenómenos de HC en la sangre es más frecuente con el envejecimiento. [141] Se conoce como hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (*Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*, CHIP) a los fenómenos de HC que presentan alguna alteración somática en algún gen asociado a enfermedades hematológicas, con una frecuencia alélica (*Allele Frequency*, AF) mayor del 2 % en ADN extraído de células mononucleares de sangre periférica, en ausencia de criterios diagnósticos que indique la presencia de patología hematológica. La CHIP es un importante factor de riesgo para el desarrollo de neoplasias mieloides o eventos cardiovasculares, por lo que es necesario establecer un plan de seguimiento. Se estima que la CHIP está presente en el 10-15 % de las personas de más de 70 años y en más de un 30 % de las personas con más de 85 años. [141] Puesto que gran parte del cfDNA deriva de las células sanguíneas, es lógico pensar que, en consecuencia, gran parte de las alteraciones somáticas que puedan detectarse en cfDNA de plasma procedan de las

propias células sanguíneas. Esto, junto con el hecho de que algunos de los genes asociados con CHIP están también alterados en diversos tipos de cáncer implica el riesgo de que estas alteraciones derivadas de HC sean catalogadas como tumorales (ctDNA), así como de que su persistencia tras un tratamiento lleve erróneamente a pensar que son señal de MRD. [142]

Técnicas de estudio del ADN tumoral circulante

Existe gran variedad de técnicas para el estudio del ctDNA [143] (*Tabla 2*). El requisito básico es que tengan la sensibilidad suficiente para detectar alteraciones una FA por debajo del 1 %. Por un lado, están las técnicas dirigidas basadas en PCR, métodos más rápidos y económicos, pero que se limitan al estudio de un número muy reducido de alteraciones, por lo general *hotspots* mutacionales. Por otro lado, las técnicas basadas en NGS, pese a su eficiencia, son métodos que requieren más tiempo y un procesamiento bioinformático, pudiendo ser dirigidas o no dirigidas.

Cabe destacar dos técnicas de estudios de ctDNA mediante NGS dirigida:

- TAm-Seq (*Tagged-Amplicon deep Sequencing*): consiste en la preparación de librerías a partir de amplicones; se realiza una PCR dirigida sobre las regiones de interés, para su amplificación, y, posteriormente, en un segundo paso de PCR se añaden los adaptadores con los index para su secuenciación NGS.
- CAPP-Seq (*Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing*): se basa en la secuenciación profunda de regiones de interés mediante el enriquecimiento con sondas de captura; mediante la incorporación de *barcodes* moleculares se consiguen una mayor sensibilidad, con la *Integrated Digital Error Suppression-enhanced CAPP-Seq* (iDES-enhanced CAPP-Seq). [144, 145]

Las técnicas de NGS no dirigida comprenden principalmente la secuenciación de exoma completo (*Whole Exome Sequencing, WES*) o genoma completo (*Whole Genome Sequencing, WGS*), para estudiar de manera exhaustiva el perfil genómico de un tumor permitiendo identificar nuevas variantes en detrimento de la sensibilidad y requiriendo métodos de procesamiento bioinformático mucho más complejos. [143]

Tabla 2. Principales técnicas de detección de ctDNA.

Tipo de análisis		Técnica	Límite de detección (AF)	Objeto de estudio	Ventajas	Limitaciones
Técnicas basadas en PCR	PCR digital	ddPCR	0.01–0.1%	<i>Hotspots</i> , fusión de genes, CNVs	Rápido, sencillo, alta sensibilidad	Multiplex limitado
		BEAMing	0.01–0.1%			
	PCR + MS	UltraSEEK	0.1–1%	Variantes conocidas	Multiplex	Limitación a variantes conocidas
Técnicas basadas en NGS	Dirigidas	Tam-Seq / eTamp-Seq	2% / 0.02%	SNVs, indels, CNVs, reordenamientos	Alta especificidad / Mejora sensibilidad	Amplicones afectados por el tamaño del ctDNA
		CAPP-Seq / iDES-enhanced CAPP-Seq	0.02% / 0.004%		Enriquecimiento no afectado por el tamaño del ctDNA/ Mejor sensibilidad	Menos exhaustivo que los métodos no dirigidos
	No dirigidas	WES	5%	Regiones codificantes, uniones intrón/exón, promotores, ARN no codificante	Descubrimiento de nuevas alteraciones, definición de la carga mutacional de un tumor y las firmas mutacionales	Alto coste, sensibilidad reducida
		WGS	5-10%	Aplicaciones de WES + variantes estructurales		
		WGBS-Seq	-	Patrones de metilación		

AF: frecuencia alélica; CNV: variación en el número de copias; ddPCR: PCR digital droplet; MS: espectrometría de masas; NGS: secuenciación de nueva generación; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; SNV: variantes de un único nucleótido; indels: inserciones/delecciones; WES: secuenciación de exoma completo; WGBS-Seq: secuenciación de genoma completo con bisulfito; WGS: secuenciación de genoma completo. (Adaptación de tabla de Bohers y col. [143]).

La biopsia líquida en la oncología

Debido a su naturaleza mínimamente invasiva y a ser altamente específico de las células tumorales, la oncología de precisión se centra cada vez más en las biopsias líquidas para el diagnóstico y la evaluación del tumor a lo largo de la enfermedad.

La biopsia líquida como alternativa a la biopsia de tejido

Tradicionalmente, los pacientes oncológicos son sometidos a biopsias de tejido por las que se obtiene una muestra de tejido tumoral que es analizada en los servicios

de anatomía patológica para establecer un diagnóstico. Esto permite definir si se trata de lesiones malignas e identificar el subtipo histológico concreto, lo que facilita adaptar el manejo del paciente. A partir de estas muestras, a menudo conservadas en bloques de parafina, se puede obtener material genético del tumor, que es empleado en estudios genómicos. Sin embargo, no siempre se dispone de biopsias de tejido ya sea porque los procedimientos puedan suponer un alto riesgo para el paciente o porque resulten técnicamente difíciles en función de la localización de la neoplasia.

En ocasiones, cuando el paciente sufre una recaída, aunque las nuevas lesiones metastásicas no se puedan biopsiar, se conserva la muestra del primario previamente tratado que fue biopsiado o intervenido quirúrgicamente. Aunque las muestras de tejido tumoral en parafina son duraderas, se ha demostrado que los tumores primarios y las metástasis posteriores pueden presentar diferencias en sus perfiles genómicos, por procesos de evolución clonal. Además, estudios de secuenciación multirregional de una misma lesión han revelado una alta heterogeneidad intratumoral. [146-149] En consecuencia, la biopsia líquida puede superar las limitaciones de la biopsia de tejido.

Muchos trabajos han mostrado una buena correlación en el perfil genómico de los tumores obtenido por las dos estrategias, especialmente en pacientes en estadios avanzados y en aquellos casos en los que las biopsias se han obtenido con menor intervalo de tiempo [150-154], mientras que otros estudios presentan mayores tasas de discordancia, dependiendo del tamaño, la ubicación anatómica de las lesiones o el estadio. [150, 154-156] En un estudio prospectivo de cáncer gastrointestinal publicado por Parikh y col. se demuestra que la biopsia líquida es capaz de detectar alteraciones asociadas a resistencia en un alto % de casos en los que la biopsia de tejido no fue capaz, poniendo de manifiesto que la heterogeneidad tumoral es un importante foco de desarrollo de resistencia a terapias y que la biopsia líquida se muestra ventajosa frente a la biopsia de tejido. [157] Por tanto, las biopsias líquidas no sólo han surgido como una alternativa cuando no se dispone de una muestra tumoral, sino que también aspiran a convertirse en la primera opción para la CGP en la práctica clínica.

Aplicaciones de la biopsia líquida en diferentes fases de la enfermedad

En los últimos años, el estudio del ctDNA ha mostrado un prometedor potencial como biomarcador altamente sensible y específico para un amplio espectro de aplicaciones en todas las fases de la enfermedad, desde el diagnóstico y la estadificación, la selección y seguimiento del tratamiento hasta la detección de MRD o de recaídas. Además, se ha propuesto que el genotipado basado en ctDNA agiliza y facilita la inscripción de pacientes en ensayos clínicos. [158]

Uso actual de la biopsia líquida en la práctica clínica

En el año 2004, la FDA aprobó el primer test de biopsia líquida para monitorizar la enfermedad en pacientes con cáncer de mama metastásico. La prueba *Cell Search Circulating Tumor Cell Test* (actualmente comercializado por *Menarini Silicon Biosystems*, Italia), basado en el estudio de CTCs, es capaz de detectar y enumerar CTCs de origen epitelial; la presencia de CTCs en sangre se relaciona con el pronóstico de la paciente. [159] Doce años más tarde, la prueba *cobas EGFR Mutation Test v2 (Roche)* se convirtió en el primer test genético de biopsia líquida en recibir la aprobación de la FDA. Este test emplea la técnica de PCR cuantitativa (qPCR). Su uso se aprobó para evaluar la presencia de determinadas alteraciones activadoras del gen *EGFR* (deleciones del exón 19 y alteración L858R), cuya detección permite el acceso de pacientes con CPNM al tratamiento con erlotinib (inhibidor de EGFR). [160, 161] Por su parte, en 2020 se anunció la aprobación de la FDA de la primera prueba de biopsia líquida basada en NGS, el test *FoundationOne Liquid CDx (Foundation Medicine Inc.)* [162], indicado para identificar variantes clínicamente accionables en los genes *BRCA1/BRCA2* a partir de una muestra de cfDNA de plasma sanguíneo en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración y candidatos a tratamiento con rucaparib, un inhibidor de la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP). En los meses subsiguientes se amplió su aprobación como *companion diagnostic* para múltiples biomarcadores adicionales. [163] En la *Tabla 3* se incluyen todos los test de biopsia líquida aprobados por la FDA.

Tabla 3. Test NGS de biopsia líquida aprobados por la FDA.

Test genético, año de aprobación por la FDA	Método	Tipo de tumor	Biomarcador analizado	Utilidad
CellSearch Circulating Tumor Cell Test , 2004 [159]	Citometría de flujo	Cáncer de mama, colon y de próstata	Cuantificación de CTCs de origen epitelial	Pronóstico
Epi proColon DNA methylation blood test , 2016 [164]	qPCR	Cáncer colorectal	<i>SEPTIN9</i> metilación de citosinas	Cribado
Cobas EGFR Mutation Test v2 , 2016 [161]	qPCR	CPNM	<i>EGFR</i> deleciones exon 19 <i>EGFR</i> L858R	Selección de terapia
ClonoSEQ , 2018 [165]	NGS	Leucemia linfoblástica, mieloma múltiple	Translocaciones y reordenamientos	MRD
Therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit , 2019 [166]	qPCR	Cáncer de mama	<i>PIK3CA</i> C420R, E542K, E545A, E545D, E545G, E545K, Q546E, Q546R, H1047L, H1047R, H1047Y	Selección de terapia
FoundationOne Liquid CDx , 2020 [167]	NGS	CPNM	<i>ALK</i> reordenamientos	Selección de terapia
			<i>EGFR</i> deleciones exon 19 <i>EGFR</i> L858R, T790M	Selección de terapia
			<i>MET</i> variantes causantes de salto del exon 14	Selección de terapia
		Cáncer de próstata	alteraciones patogénicas de <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> y <i>ATM</i>	Selección de terapia
			alteraciones patogénicas de <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	Selección de terapia
		Cáncer de ovario	alteraciones patogénicas de <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	Selección de terapia
		Cáncer de mama	<i>PIK3CA</i> C420R, E542K, E545A, E545D, E545G, E545K, Q546E, Q546R, H1047L, H1047R, H1047Y	Selección de terapia
Guardant360 , 2020 [168]	NGS	CPNM	<i>EGFR</i> deleciones exon 19 <i>EGFR</i> L858R, T790M	Selección de terapia
			<i>EGFR</i> inserciones exon 20	Selección de terapia
			<i>ERBB2/HER2</i> variantes activadoras (SNVs e inserciones exon 20)	Selección de terapia
			<i>KRAS</i> G12C	Selección de terapia

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico; NGS: secuenciación de nueva generación; SNV: variante de único nucleótido; MRD: enfermedad mínima residual.

En 2022 la Sociedad Europea de Oncología Médica (*European Society of Medical Oncology*, ESMO) publicó unas guías sobre el uso del ctDNA en la práctica clínica oncológica, revisando su validez clínica y analítica, así como su utilidad clínica real. Una de sus principales conclusiones es que no se recomienda el uso del ctDNA para evaluar la existencia de MRD, debido a la ausencia de estudios que demuestren que es útil para guiar la administración de tratamientos. [169] La biopsia líquida se está abriendo camino también en diversos campos de la Medicina como el diagnóstico prenatal [170], los trasplantes de órganos [171] o las enfermedades infecciosas [172]. Una demostración del

imparable aumento de sus aplicaciones es el creciente número de ensayos clínicos que conllevan algún tipo de estudio de cfDNA (*Figura 9*).

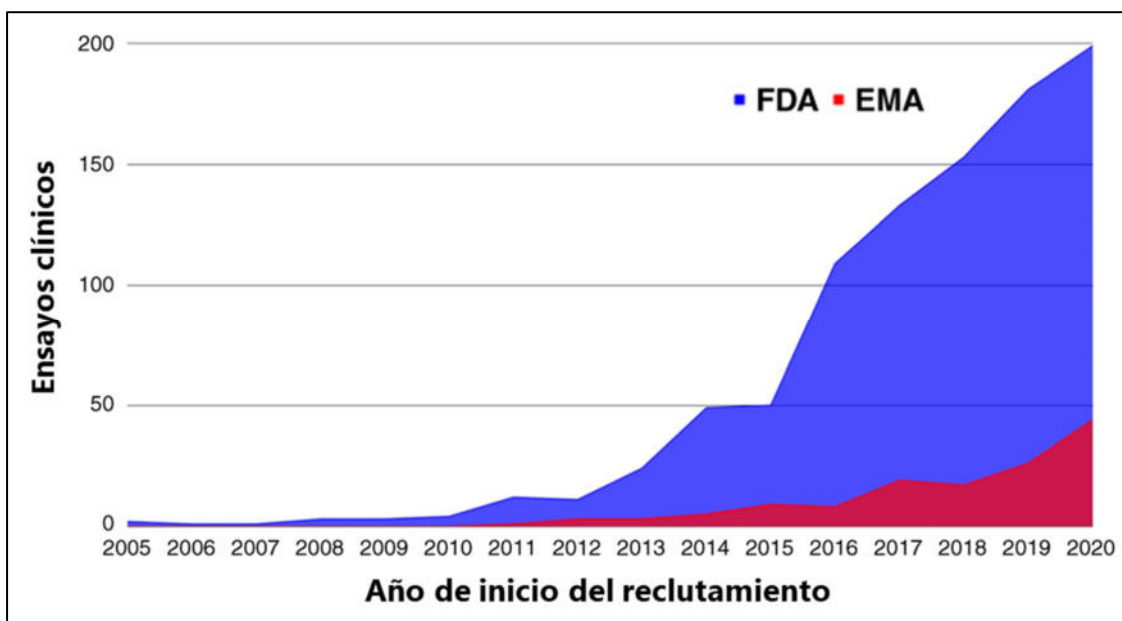


Figura 9. Ensayos clínicos que incluyen análisis de cfDNA. Ensayos clínicos identificados en la base de datos de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), en azul, y de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), en rojo. (Adaptación de figura de Cisneros-Villanueva y col. [173]).

GENÓMICA Y BIOPSIA LÍQUIDA EN LA RADIOTERAPIA

La mayoría de las aplicaciones de la genómica en la oncología se han desarrollado en pacientes sometidos a QT, mientras que la oportunidad de hacer avanzar la Oncología Radioterápica mediante el empleo de la genómica aún no ha despegado. Dado que a menudo no se dispone de suficiente tejido tumoral en pacientes tratados con RT radical, la biopsia líquida se plantea como una herramienta muy interesante en estos pacientes. A continuación, se presentan potenciales contextos clínicos en los que podría aplicarse.

Biomarcador predictivo

La secuenciación genómica de muestras tumorales antes y después de la RT ha demostrado que estos tratamientos pueden afectar a la arquitectura clonal, lo cual puede acabar derivando en la selección de clones resistentes. [174] Pese a la existencia de

numerosos estudios que identifican genes y rutas metabólicas implicadas en la sensibilidad a la radiación, no se dispone de marcadores genéticos predictivos validados para su uso en Oncología Radioterápica. [175] Entre los genes candidatos, cabe destacar aquellos implicados en la ruta NRF2: el gen *NFE2L2* codifica un factor de transcripción que regula la expresión de proteínas implicadas en mecanismos de protección de la célula ante daños en el DNA inducidos por la radiación. Por su parte, el gen *KEAP1* es mediador en la degradación de NRF2. Se ha demostrado que la presencia de alteraciones en *NFE2L2/KEAP1* en ctDNA de pacientes con CPNM se asocia con recurrencia tras RT, pero no tras cirugía o QT. [176]

Biomarcador pronóstico y estratificación del riesgo

La biopsia líquida podría aplicarse como biomarcador para evaluar el pronóstico antes del tratamiento y estratificar los pacientes en grupos de riesgo para adaptar la intensidad del tratamiento con RT, así como para valorar tratamientos adicionales con terapias adyuvantes. En la literatura se pueden encontrar diversos estudios analizan mediante biopsia líquida pacientes con carcinoma nasofaríngeo, utilizando como análogo de ctDNA el ADN del virus de Epstein-Barr, causante de esta patología. Se ha observado una correlación entre los niveles de ctDNA viral antes del tratamiento y el estadio clínico y la supervivencia, lo que plantea la posibilidad de utilizar el ctDNA viral para estratificar a los pacientes. Liang y col. Definen un punto de corte en el nivel de ctDNA viral en una cohorte de pacientes con carcinoma nasofaríngeo tratados con RT que discrimina entre pacientes que se benefician de la adición de QT en términos de supervivencia y aquéllos con menor nivel de ctDNA viral, que no van a experimentar mejoría, pudiendo evitarse la QT. [177, 178]

Adaptación del tratamiento a tiempo real

La naturaleza poco invasiva de la biopsia líquida, que posibilita que pueda realizarse repetidas veces en un paciente, junto a la corta vida media del ctDNA en sangre, plantean la posibilidad de utilizar la biopsia líquida como una herramienta de

monitorización casi a tiempo real para adaptar los tratamientos con RT. El estudio de los cambios en la señal de ctDNA durante el tratamiento podría ser útil para distinguir entre pacientes que están respondiendo y aquellos que no. Para ello es de suma importancia determinar qué procesos de muerte celular se producen a causa de las diferentes modalidades de tratamientos con RT, para luego profundizar en cómo afectan dichos procesos a la liberación de ctDNA a la sangre. Así se podrán definir los tiempos de extracción de sangre óptimos y el significado de la dinámica en los niveles de ctDNA durante el tratamiento. Los resultados del ensayo clínico BLEND revelan los efectos biológicos de la SBRT en pacientes con metástasis vertebrales de varios tipos de cáncer mediante el estudio anatomopatológico de biopsias tomadas antes y después del tratamiento. Pese al pequeño tamaño muestral, observan interesantes hallazgos, como el desarrollo de procesos de necrosis y apoptosis, así como densidad vascular reducida y un aumento de la desmoplasia (colagenización del estroma tumoral). [179]

Al mismo tiempo, el estudio de los perfiles de cfDNA/ctDNA puede ser una buena aproximación para entender los mecanismos y la dinámica de la muerte celular causada por la RT (patrones de fragmentación, picos de señal, etc.). Pese a que se han publicado algunos trabajos que buscaban monitorizar la liberación de ctDNA durante los tratamientos con RT, en la literatura escasean los datos reproducibles. [180-183]

Enfermedad mínima residual

La biopsia líquida en el futuro podría aplicarse para evaluar la respuesta a un tratamiento radical, guiando el posterior manejo clínico personalizado a fin de decidir, por ejemplo, si se aplica un tratamiento complementario. La MRD puede detectarse mediante el estudio de ctDNA en sangre o en otros fluidos. En los últimos 5 años se han publicado diversos trabajos en los que se muestra que el ctDNA es un buen biomarcador para detectar la MRD en distintos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón, de mama, colorrectal o esofágico. [176] Sin embargo, varios estudios presentan casos de recaída local aislada tras RT con resultados de ctDNA negativos en varios tipos de cáncer, probablemente debido a la baja carga tumoral de estos pacientes. [184] Otros trabajos sugieren que estas pruebas de MRD son menos sensibles en el caso de recidiva loco-

regional en comparación con las recidivas a distancia. [177] No se ha esclarecido la causa de esta observación, pero se cree que puede deberse al número de células tumorales (en caso de recurrencia a distancia, se puede asumir que hay más células circulantes, por ejemplo) o a efectos de la RT sobre los vasos sanguíneos, afectando a la capacidad del ctDNA de pasar al torrente sanguíneo. Esta alta tasa de falsos negativos sugiere que se trata de una buena estrategia principalmente para pacientes con mayor carga de enfermedad residual. En la actualidad se están llevando a cabo múltiples ensayos clínicos intervencionales que evalúan la utilidad de estas técnicas para la personalización de las terapias adyuvantes o de consolidación. [184]

Seguimiento

En el apartado previo "*Seguimiento en los tratamientos con radioterapia*" se expuso la problemática de los cambios radiológicos que se producen en los tejidos irradiados tras tratamientos con RT (especialmente mediante SBRT), que dificultan la detección de recaídas loco-regionales. En el caso de recaída a distancia, las limitaciones de las técnicas rutinarias derivan del hecho de que las pruebas de imagen son solo capaces de detectar nuevas lesiones cuando estas alcanzan un tamaño macroscópico determinado. La biopsia líquida abre la posibilidad de realizar un seguimiento periódico de manera más segura y sencilla.

OBJETIVOS

Existe una población de pacientes de baja carga tumoral, con cáncer en estadio inicial u oligometastásico, que, no siendo candidatos a cirugía, reciben tratamientos con RT, a menudo hipofraccionados. En general, se trata de pacientes de buen pronóstico, con una esperanza de vida mayor que los pacientes con enfermedad avanzada, por lo que el potencial de los estudios genómicos abarcaría no solo la búsqueda de nuevas terapias, sino también la evaluación del pronóstico, la prevención de recaídas o segundos primarios, etc. Al tratarse de pacientes no candidatos a cirugía, la biopsia líquida es especialmente valiosa para el estudio genómico de la enfermedad, ya que las biopsias tisulares podrían no estar disponibles, no proporcionar el material suficiente, no ser representativas o suponer un riesgo para el paciente que no compense el potencial beneficio. Dado que los pacientes con menor carga tumoral presentan menor proporción de ctDNA en plasma, y pese a la alta sensibilidad de las últimas técnicas de NGS, la caracterización genómica mediante biopsia líquida en estos pacientes plantea un importante desafío. [132, 145] Es necesario definir en primera instancia la correlación biopsia tisular-biopsia líquida en pacientes con baja carga tumoral, así como la utilidad de la biopsia líquida para monitorizar la enfermedad.

En la línea de lo expuesto, el objetivo principal de este trabajo es evaluar la utilidad clínica de la biopsia líquida y los estudios genómicos exhaustivos en pacientes con cáncer en estadios tempranos u oligometastásicos tratados con RT. Para ello se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Conocer las similitudes y diferencias entre los hallazgos genómicos obtenidos mediante biopsia tisular y biopsia líquida en pacientes con baja carga tumoral
2. Discernir el origen de las alteraciones genómicas identificadas en un test de biopsia líquida en pacientes con baja carga tumoral
3. Identificar la utilidad clínica de los hallazgos genómicos en pacientes con baja carga tumoral tratados con RT
4. Definir el potencial de la biopsia líquida para la monitorización a tiempo real de los tratamientos con RT
5. Establecer la utilidad de la biopsia líquida en el seguimiento de los tratamientos con RT

METODOLOGÍA

INDIVIDUOS

Pacientes sometidos a radioterapia

La cohorte analizada está compuesta por 50 pacientes con cáncer en estadio inicial u oligometastásico, no operables, que se sometieron a un tratamiento con RT en el Instituto de Medicina Oncológica y Molecular de Asturias (IMOMA) entre julio de 2017 y agosto de 2018.

Reclutamiento de los pacientes

A todos los pacientes se les propuso participar voluntariamente mediante una reunión presencial con el investigador en la que se les explicó el procedimiento, así como el consentimiento informado, con posibilidad de revocación. Todos los pacientes aceptaron formar parte del proyecto de investigación y firmaron el consentimiento informado.

Criterios de inclusión (necesario cumplir todos ellos):

- Pacientes mayores de 18 años
- Pacientes con diagnóstico de cáncer, bien con tumores primarios malignos en estadio inicial, o bien con oligometástasis
- Candidatos a tratamiento con radioterapia radical (estadios iniciales) o paliativa con intención localmente radical (enfermedad oligometastásica)
- Disponibilidad de biopsia de la lesión a irradiar, y de su primario previo o de otra lesión metastásica con el mismo primario de origen, en caso de oligometástasis
- Supervivencia estimada superior a 3 meses
- Consentimiento informado por escrito

Criterios de exclusión:

- Pacientes con contraindicaciones para las extracciones de sangre múltiples o la colocación de un catéter venoso periférico.

Tratamientos con RT

Los tratamientos con RT se llevaron a cabo en las instalaciones en el Servicio de Oncología Radioterápica del IMOMA. Para cada paciente, el plan de tratamiento se generó empleando el sistema de planificación de tratamiento *Eclipse (Varian Medical Systems, EE. UU.)*. La planificación y la administración del tratamiento se realizó con arcoterapia volumétrica de intensidad modulada guiada por imagen (*Image-Guided Volumetric Modulated Arc Therapy, IG-VMAT*), con un acelerador lineal *Varian Truebeam STx Powered by Novalis (Varian Medical Systems, EE. UU.)*. Se emplearon haces de fotones de 6 MV, con arcos coplanares o múltiples arcos no coplanares en función de las necesidades del tratamiento. La dosis prescrita para cada volumen diana planificado (*Planning Target Volumen, PTV*) y las restricciones de dosis para órganos en riesgo se prescribieron de acuerdo a las guías clínicas de la *Comisión Internacional de Unidades y Medidas Radiológicas (International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU)*. [185] Para asegurar la precisión, se realizó la inmovilización del paciente con cuna alfa de cuerpo entero o máscaras radioquirúrgicas (en tratamientos del sistema nervioso central y de cabeza y cuello). La simulación del tratamiento se realizó mediante TC, PET/TC o RM en función de la zona a tratar. En la simulación por TC en el caso de lesiones en la caja torácica o el abdomen se obtuvo una TC con control respiratorio (4DCT). Las reconstrucciones de un milímetro de grosor de corte en el plano axial, se transfirieron a la estación de planificación del tratamiento. Antes de cada sesión de tratamiento se emplearon el sistema de IGRT *Exactrac X-Ray 6D (Brainlab, Alemania)* y el sistema de TC *kilo-voltage cone-beam (Brainlab, Alemania)* para la correcta disposición del paciente.

En los procesos de planificación se definieron los siguientes volúmenes (*Figura 10*): el volumen tumoral macroscópico (*Gross Tumor Volume, GTV*), correspondiente al tumor visible en imágenes; el volumen blanco clínico (*Clinical Target Volume, CTV*): GTV + invasión subclínica no visible; el volumen blanco interno (*Internal Target Volume, ITV*): CTV + margen interno (a menudo debido al movimiento del órgano en cuestión) y el volumen blanco de planificación (*Planning Target Volume, PTV*): ITV + margen de seguridad. Se identificaron los órganos en riesgo (*Organ At Risk, OAR*) (tejido normal cuya sensibilidad a la radiación limita el tratamiento) para definir el volumen de planificación del OAR (*Planning organ at Risk Volume, PRV*). [186]

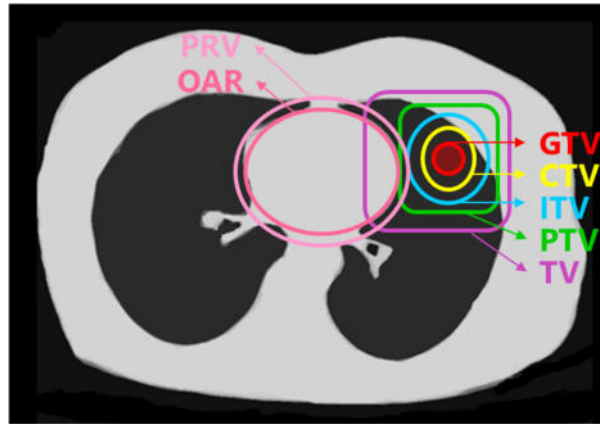


Figura 10. Conceptos de volumen empleados en la planificación de un tratamiento con RT. Se muestra de manera esquemática una posible configuración de tratamiento para una lesión localizada en el pulmón y con el corazón como OAR. CTV: volumen blanco clínico; GTV: volumen tumoral macroscópico; ITV: volumen blanco interno; PTV: volumen blanco de planificación; OAR: órgano en riesgo; PRV: volumen de planificación.

Para comparar el efecto de los distintos protocolos de tratamiento con diferente número de fracciones y dosis, se calculó la dosis biológica efectiva (DBE) utilizando el modelo lineal cuadrático, donde D es la dosis total, d es la dosis por fracción y la relación α/β es la respuesta de los tejidos a la radiación.

$$DBE = D \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right)$$

Recopilación de datos clínicos

Los pacientes fueron derivados al Servicio de Oncología Radioterápica del IMOMA desde sus centros de referencia para los tratamientos de RT bien desde hospitales del Servicio de Salud del Principado de Asturias (39 pacientes), centralizados desde el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario Central de Asturias, bien desde el Centro Médico de Asturias (11 pacientes). Todos los pacientes autorizaron la solicitud de su historia para la recopilación los datos clínicos necesarios previos al presente estudio. Tras la finalización del tratamiento y el primer mes de seguimiento del mismo, los pacientes retornaron a sus centros de referencia. Los participantes del estudio aceptaron acudir al IMOMA periódicamente para hacer un seguimiento mediante biopsia líquida, en paralelo a su seguimiento convencional. Los pacientes facilitaron la información clínica correspondientes al avance de su enfermedad

y los resultados de las pruebas diagnósticas realizadas en otros centros (marcadores, PET, etc.). La respuesta al tratamiento con RT, se evaluó según los criterios radiológicos RECIST 1.1 [187]: respuesta completa (*Complete Response*, CR), respuesta parcial (*Partial Response*, PR), enfermedad estable (*Stable Disease*, SD) y enfermedad en progresión (*Progressive Disease*, PD).

Individuos control sanos

Se contó con un grupo control de 7 individuos sanos a los que se realizaron distintas extracciones de sangre periférica seriadas emulando las biopsias líquidas recogidas a los pacientes de la cohorte durante el tratamiento.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Recogida de muestras de sangre periférica y separación de plasma

Se tomaron muestras de sangre periférica (biopsias líquidas) de los pacientes y de los individuos control mediante venopunción, recogidas en tubos EDTA de 9 mL, y se procesaron inmediatamente en el Laboratorio de Medicina Molecular del IMOMA. Estas biopsias líquidas se realizaron antes y después de cada sesión de RT, así como durante el seguimiento: al mes de acabar el tratamiento y periódicamente de manera trimestral, aproximadamente. En los pacientes que, durante el seguimiento, recibieron tratamientos con QT, la biopsia líquida se realizó antes de la administración de cada nuevo ciclo del fármaco, salvo en el caso de tratamientos continuos, en los que se tomaron biopsias líquidas periódicamente, aprovechando las extracciones necesarias para analizar biomarcadores estandarizados.

Las muestras de sangre-EDTA se procesaron inmediatamente para la separación del plasma sanguíneo: los tubos se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. A continuación, se transfirió el plasma a tubos de microcentrifuga *Eppendorf Safe-Lock* de 1,5 mL (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemania), que se centrifugaron de nuevo a 16.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, a fin de eliminar cualquier resto de células. El plasma aislado

se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ alicuotado en tubos criogénicos *Nalgene* de 2 mL (Thermo Scientific, Waltham, MA, UU.). En paralelo, tras la centrifugación del tubo EDTA, se recogió la capa leucocitaria (*buffy coat*) y se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL con 2 mL de tampón fosfato salino (PBS 1x), al que se añadieron también 5 mL de tampón de lisis FG1 del *Flexigen DNA kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). El tubo Falcon se centrifugó a $2000 \times g$ durante 5 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se almacenó el pellet de células a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para extracción de ADN germinal.

Por otro lado, las biopsias líquidas para el estudio genómico se realizaron mediante la recogida de dos tubos *Cell Free DNA Blood Collection Tubes* (Roche, Suiza) de 9 mL a cada paciente, mediante venopunción. Las muestras se enviaron a temperatura ambiente a los laboratorios de *Foundation Medicine Inc.* (EE. UU.) para la realización del estudio genómico *Foundation ACT™*.

Extracción de ADN germinal a partir de muestras de sangre

El ADN germinal se obtuvo a partir de los pellets de células congelados reservados durante la separación de plasma a partir de sangre periférica. Una vez descongelado, se añadió al pellet 1 mL de una mezcla de proteasa y tampón de desnaturalización FG2, del *Flexigen DNA kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). Se agitó en el vórtex y se incubó en baño a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. A continuación, se añadió 1 mL de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a $2.000 \times g$ durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y al pellet se le añadió 1 mL de etanol 70 %. Se mezcló con el vórtex, se volvió a centrifugar a $2.000 \times g$ durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 400 μL de tampón de hidratación FG3 del *Flexigen DNA kit* y se incubó durante 1 h a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, para la completa disolución del ADN genómico purificado.

Extracción de cfDNA a partir de muestras de plasma sanguíneo

Las muestras de plasma sanguíneo obtenidas a partir de sangre periférica se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para la extracción de cfDNA. Las alícuotas se

descongelaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se extrajo el cfDNA empleando el kit de purificación con bolas magnéticas *MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit* (Thermo Scientific, EE. UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Extracción de ADN a partir de muestras de biopsia tumoral

Las muestras de ADN tumoral se obtuvieron a partir de biopsias de tejido tumoral, biopsia con aguja gruesa (BAG), biopsia con aspiración de aguja fina (PAAF) o a partir de piezas quirúrgicas, en el caso de que el tumor del paciente hubiera sido resecado.

Las BAG o piezas quirúrgicas se preservaron como tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE), y la extracción de ADN se llevó a cabo a partir de cortes de las piezas realizadas con microtomo por el Servicio de Anatomía Patológica del Centro Médico de Asturias, como se describe a continuación. En primer lugar, se procedió al desparafinado de la muestra. Para ello se añadió a la muestra parafinada 1 mL de xilol, se agitó con vórtex durante 10 minutos a 800 rpm, se centrifugó a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante. Este lavado con xilol se repitió una vez más. Al pellet resultante se le añadió 1 mL de metanol, se agitó con vórtex durante 2 minutos a 800 rpm, se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm y se retiró el sobrenadante. Este lavado con metanol se repitió una vez más. A continuación, se añadió 1 mL de PBS 1X, se agitó con vórtex durante 2 minutos a 800 rpm, se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm y se retiró el sobrenadante. Este lavado con PBS se repitió una vez más. Por último, se añadió 1 mL de tiocianato de sodio 1 M (NaSCN) y se agitó en el vórtex durante 6 h. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm y se retiró el sobrenadante.

Una vez la muestra había sido desparafinada, se añadió al pellet 1 mL de PBS, se agitó en el vórtex, se centrifugó 2 minutos a 14000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se repitió el lavado con PBS y se dejó secar el pellet durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 180 µL de tampón de lisis ATL y 20 µL de proteinasa K, ambos del *QIAamp DNA Micro Kit* (Qiagen, Alemania), se agitó con vórtex y se dejó incubando toda la noche a 56 °C y en agitación a 1000 rpm. Una vez concluida la digestión de la muestra, se añadió el mismo volumen de tampón de lisis AL del *QIAamp DNA Micro Kit*, se agitó y se incorporó el mismo volumen de etanol 100 %. La mezcla se

transfirió a una columna *QIAamp MiniElute* y se procedió según las indicaciones del fabricante, con los lavados de la membrana con los tampones AW1, AW2 y, por último, la elución de ADN purificado con el tampón AE, siendo AW1, AE2 y AE componentes del *QIAamp DNA Micro Kit*.

Las PAAF se preservaron como extensión citológica y la extracción de ADN se llevó a cabo de la siguiente manera. En primer lugar, se sumergió el portaobjetos en xilol durante al menos 12 h, para despegar el cubreobjetos. A continuación, el portaobjetos descubierto se introdujo 1 h en un nuevo baño de xilol y, posteriormente en diferentes baños de etanol (EtOH), de la siguiente manera: EtOH 99 %, 1 min; EtOH 99 % 2 min; EtOH 96 % 3 min; y EtOH 70 % 3 min, dejándose secar al final. Se añadieron 100 µL de tampón de digestión ATL del *QIAamp DNA Micro Kit* a la superficie de la muestra y se rascó con la ayuda de una micropipeta para recoger el material y transferirlo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Este proceso (desde la adición del tampón ATL) se repitió 2 veces más. Se añadieron 20 µL de proteinasa K y se dejó incubando toda la noche a 56 °C y en agitación (equipo Thermomixer, VWR, EE. UU.) a 1000 rpm. Tras la incubación de digestión, se prosiguió de la misma forma descrita en el párrafo anterior para las muestras parafinadas (comenzando por la adición de tampón de lisis AL).

Antes de realizar el estudio genómico se realizó una estimación del % de celularidad tumoral de la muestra mediante la valoración al microscopio de un corte de tejido FFPE teñido con hematoxilina/eosina; este valor fue empleado para la normalización de las FA observadas en la muestra analizada.

CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE ADN

Las muestras de ADN germinal y de ADN de tejido se cuantificaron mediante un equipo de espectrofotometría *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific, EE. UU.) y un equipo de fluorimetría *Qubit® 2.0 Fluorometer*, con los kits *dsDNA BR Assay Kit* y *dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies, EE. UU.), según las especificaciones del fabricante.

Las muestras de cfDNA de plasma se caracterizaron empleado el equipo *4200 TapeStation system* y el kit *High Sensitivity D1000 ScreenTape assay* (Agilent

Technologies, EE. UU.), según las especificaciones del fabricante. Para calcular la concentración de la muestra se obtuvo el área bajo la curva de la región de 100-950 pb empleando el software del equipo. Para calcular la concentración de cfDNA ([cfDNA]) de la muestra de plasma inicial se aplicó la siguiente fórmula:

$$[cfDNA] \left(\frac{ng}{mL \text{ plasma}} \right) = [cfDNA]_{alícuota} \left(\frac{ng}{\mu L \text{ eluido}} \right) \times \frac{100 \mu L \text{ elución}}{2 mL \text{ plasma}}$$

donde el valor $[cfDNA]_{alícuota}$ es el valor de concentración que da el instrumento TapeStation de la muestra de cfDNA producto de la extracción.

ESTUDIOS GENÓMICOS

ONCOgenics Complete™: panel NGS sobre ADN tumoral y germinal

Para la realización de los estudios genómicos exhaustivos, en primer lugar, se analizó una muestra de ADN de tejido tumoral y una muestra de ADN germinal de cada paciente mediante el panel de NGS *ONCOgenics Complete™* (IMOMA, Oviedo, España). *ONCOgenics Complete™* ha sido descrito detalladamente por Cabanillas y col. [88] Este panel NGS está basado en la tecnología *SureSelect XT* (Agilent Technologies, EE. UU.) con enriquecimiento mediante captura por hibridación de los genes de interés, asociados con cáncer. Específicamente, incluye genes asociados a dianas terapéuticas (subpanel *ONCOgenics Tumor™*, sobre muestra de tejido tumoral) y genes asociados a predisposición al desarrollo de cáncer (subpanel *ONCOgenics Germline™*, sobre muestra germinal). En la *Tabla 4* se detallan los genes incluidos en el diseño: el subpanel somático incluye el estudio de 105 genes y reordenamientos seleccionados en 16 genes y el germinal, 149 genes.

Para cada subpanel, se partió de 50-200 ng de ADN de acuerdo a la cuantificación realizada con el equipo Qubit. Los productos de librerías obtenidos se analizaron en un secuenciador NGS *Nextseq 550* (Illumina, EE. UU.) en el Laboratorio de IMOMA, empleando cartuchos *NextSeq 500/550 High-Output v2.5 Kit (300 cycles)* (Illumina, EE. UU.), con lecturas pareadas de 150 pb. Se empleó alrededor de un 16 % y un 8 % del cartucho para la secuenciación del subpanel tumoral y el germinal, respectivamente, lo

que equivale aproximadamente a 128 y 64 millones de lecturas de 150 pb en cada caso. La generación de archivos *Fastq* y su desmultiplexado se realizaron a través de la plataforma de almacenamiento y computación en la nube *BaseSpace* (Illumina, EE. UU.).

Tabla 4. Genes incluidos en el diseño del panel ONCOgenics Complete™

Subpanel somático de biopsia de tejido								
Secuencia codificante completa:								
<i>ABL1</i>	<i>BTK</i>	<i>CDKN2C</i>	<i>FANCA</i>	<i>GNAS</i>	<i>JAK3</i>	<i>NF1</i>	<i>POLE</i>	<i>SMO</i>
<i>AKT1</i>	<i>CBL</i>	<i>CHEK2</i>	<i>FBXW7</i>	<i>HDAC2</i>	<i>KDR</i>	<i>NF2</i>	<i>PRKCH</i>	<i>SOCS1</i>
<i>ALK</i>	<i>CCND1</i>	<i>CRKL</i>	<i>FGFR1</i>	<i>HGF</i>	<i>KIT</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SRC</i>
<i>AR</i>	<i>CCND2</i>	<i>CSF1R</i>	<i>FGFR2</i>	<i>HRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>PTEN</i>	<i>STAG2</i>
<i>ARID1A</i>	<i>CCND3</i>	<i>CSF3R</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IGF1R</i>	<i>MAPK1</i>	<i>PALB2</i>	<i>RAC1</i>	<i>STK11</i>
<i>ARAF</i>	<i>CD274</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FGFR4</i>	<i>IDH1</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>RAD51C</i>	<i>TP53</i>
<i>ATM</i>	<i>CDK4</i>	<i>DDR2</i>	<i>FLCN</i>	<i>IDH2</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>PDPK1</i>	<i>RAF1</i>	<i>TSC1</i>
<i>ATR</i>	<i>CDK6</i>	<i>EGFR</i>	<i>FLT3</i>	<i>IGF2</i>	<i>MET</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>RB1</i>	<i>TSC2</i>
<i>BAP1</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>EPHA2</i>	<i>FRS2</i>	<i>IL7R</i>	<i>MITF</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>RET</i>	<i>VEGFA</i>
<i>BRAF</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>ERBB2</i>	<i>GATA3</i>	<i>INPP4B</i>	<i>MPL</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>RICTOR</i>	
<i>BRCA1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERBB3</i>	<i>GNA11</i>	<i>JAK1</i>	<i>MTOR</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>ROS1</i>	
<i>BRCA2</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>ERBB4</i>	<i>GNAQ</i>	<i>JAK2</i>	<i>MYD88</i>	<i>PLCG2</i>	<i>SH2B3</i>	
Reordenamientos seleccionados:								
<i>ALK</i>	<i>BRAF</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK2</i>	<i>NRG1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>RET</i>	<i>TFE3</i>	<i>TMPRSS2</i>
<i>BCR</i>	<i>ERBB4</i>	<i>FGFR3</i>	<i>MET</i>	<i>PDGFB</i>	<i>RAF1</i>	<i>ROS1</i>		
Subpanel germinal								
Secuencia codificante completa:								
<i>ALK</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>FANCB</i>	<i>ITK</i>	<i>NF1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>RTEL1</i>	<i>SOS2</i>	<i>WRN</i>
<i>APC</i>	<i>CHEK2</i>	<i>FANCC</i>	<i>KCNQ1OT1</i>	<i>NF2</i>	<i>PTCH2</i>	<i>RUNX1</i>	<i>SPINK1</i>	<i>WT1</i>
<i>ATM</i>	<i>CYLD</i>	<i>FANCD2</i>	<i>KHDC3L</i>	<i>NHP2</i>	<i>PTEN</i>	<i>SBDS</i>	<i>STIM1</i>	<i>XIAP</i>
<i>AXIN2</i>	<i>DDB2</i>	<i>FANCE</i>	<i>KIT</i>	<i>NLRP7</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SDHA</i>	<i>STK11</i>	<i>XPA</i>
<i>BAP1</i>	<i>DICER1</i>	<i>FANCF</i>	<i>KRAS</i>	<i>NOP10</i>	<i>RAD51C</i>	<i>SDHAF2</i>	<i>SUFU</i>	<i>XPC</i>
<i>BARD1</i>	<i>DIS3L2</i>	<i>FANCG</i>	<i>LZTR1</i>	<i>NSD1</i>	<i>RAD51D</i>	<i>SDHB</i>	<i>TERC</i>	
<i>BLM</i>	<i>DKC1</i>	<i>FANCI</i>	<i>MAX</i>	<i>NTHL1</i>	<i>RAF1</i>	<i>SDHC</i>	<i>TERT#</i>	
<i>BMPR1A</i>	<i>EGFR</i>	<i>FANCL</i>	<i>MC1R</i>	<i>PALB2</i>	<i>RB1</i>	<i>SDHD</i>	<i>TINF2</i>	
<i>BRAF</i>	<i>EPCAM</i>	<i>FANCM</i>	<i>MEN1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>RECQL4</i>	<i>SEC23B</i>	<i>TMEM127</i>	
<i>BRCA1</i>	<i>ERCC1</i>	<i>FAS</i>	<i>MET</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>RET</i>	<i>SERPINA1</i>	<i>TP53</i>	
<i>BRCA2</i>	<i>ERCC2</i>	<i>FASLG</i>	<i>MLH1</i>	<i>PMS2</i>	<i>RHBDF2</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>TRIM37</i>	
<i>BRIP1</i>	<i>ERCC3</i>	<i>FH</i>	<i>MNX1</i>	<i>POLD1</i>	<i>RIT1</i>	<i>SHOC2</i>	<i>TSC1</i>	
<i>BUB1B</i>	<i>ERCC4</i>	<i>FLCN</i>	<i>MRE11A</i>	<i>POLE</i>	<i>RPL11</i>	<i>SLC25A13</i>	<i>TSC2</i>	
<i>CBL</i>	<i>ERCC5</i>	<i>GPC3</i>	<i>MSH2</i>	<i>POLH</i>	<i>RPL35A</i>	<i>SLX4</i>	<i>UBE2T</i>	
<i>CDH1</i>	<i>EXT1</i>	<i>GREM1*</i>	<i>MSH6</i>	<i>POT1</i>	<i>RPL5</i>	<i>SMAD4</i>	<i>UNC13D</i>	
<i>CDK4</i>	<i>EXT2</i>	<i>H19</i>	<i>MTAP</i>	<i>PRF1</i>	<i>RPS19</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>VHL</i>	
<i>CDKN1B</i>	<i>FAH</i>	<i>HFE</i>	<i>MUTYH</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>RPS24</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>WNT10A</i>	
<i>CDKN1C</i>	<i>FANCA</i>	<i>HRAS</i>	<i>NBN</i>	<i>PRSS1</i>	<i>RPS7</i>	<i>SOS1</i>	<i>WRAP53</i>	

* solo duplicaciones # solo el promotor

Todo el procesamiento bioinformático hasta la obtención de las variantes genéticas identificadas en cada muestra, tras filtrado básico de calidad de secuencias, calidad de alineamiento, etc., acompañadas de información frecuencia poblacional funcional asociada a cada una de ellas, se realizó empleando el software *HD Genome One* (DREAMgenics, Oviedo, España) y la información de múltiples bases de datos, tal y como se describe por Cabanillas y col. [88]

El resultado fue una hoja de cálculo Excel en la que se incluyeron las variantes genéticas identificadas en la muestra analizada junto con información de interés asociada a cada una de ellas, como la FA en la muestra analizada y anotaciones extraídas de diferentes bases de datos para evaluar su significación clínica. Para su inclusión en el listado, las variantes fueron filtradas por su frecuencia poblacional y su efecto funcional sobre la proteína o el gen, descartando las variantes claramente benignas. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis del significado clínico de cada variante:

ONCOgenics GermlineTM: para analizar la relevancia clínica de las variantes germinales se aplicaron los criterios de clasificación del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) y la Asociación de Patología Molecular (AMP). [188]

ONCOgenics TumorTM: teniendo en cuenta también los resultados de la secuenciación de la muestra germinal, se confirmó si las variantes tenían origen germinal o somático. Se descartaron las variaciones en el número de copias (*Copy Number Variations*, CNV) con un número de copias estimado < 6. Para evaluar el efecto funcional de las variantes identificadas se consultaron las bases de datos *ONCOKB* [66], *CIVIC* [189] y se realizó una búsqueda en literatura científico-médica a través del repositorio PubMed. Las variantes se clasificaron de acuerdo a la escala de accionabilidad clínica de dianas moleculares de ESMO (*ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets*, ESCAT) [190], en las siguientes categorías: *tier-I*, aquellas variantes asociadas con respuesta a un determinado fármaco recogidas en las guías clínicas oficiales para el mismo tipo de tumor; *tier-II*, variantes que se han asociado a buena respuesta para un determinado fármaco en un tipo de tumor concreto, pero se necesita mayor evidencia/no están recogidas por las guías clínicas oficiales; *tier-III*, variantes que son potenciales dianas terapéuticas, bien porque el fármaco asociado está aprobado en otro tipo de tumor distinto al del paciente (*tier-IIIA*) o porque está indicado en presencia de una

determinada alteración genética con un efecto similar a la identificada en el paciente, pero no idéntica (*tier-IIIB*); *tier-IV*, variantes asociadas a sensibilidad a un fármaco apoyadas por evidencia preclínica; y *tier-X*, variantes sin evidencia de accionabilidad. La información acerca de ensayos clínicos en marcha se extrajo de ClinicalTrials.gov. [191]

Foundation ACT™: panel NGS sobre biopsia líquida

Tanto el procesamiento de las muestras como la interpretación de los resultados, que fueron reportados mediante un informe detallado, se realizó en los laboratorios de *Foundation Medicine Inc.* (EE. UU.). Este panel NGS se lleva cabo empleando el kit *NEBNext (NEB, EE. UU.)* y posterior enriquecimiento mediante captura por hibridación (*IDT, EE. UU.*) de los genes de interés, asociados con cáncer. En la *Tabla 5* se detallan el diseño del panel, que incluye la secuencia completa/parcial de 61 genes y reordenamientos seleccionados en 6 genes.

Tabla 5. Genes Foundation ACT™

Panel somático de biopsia líquida								
Secuencia codificante completa:								
<i>BRCA1</i>	<i>CD274</i>	<i>CDK6</i>	<i>EGFR</i>	<i>FGFR1</i>	<i>KRAS</i>	<i>MYC</i>	<i>PDCD1LG2</i>	<i>SMO</i>
<i>BRCA2</i>	<i>CDH1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERBB2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>MDM2</i>	<i>MYCN</i>	<i>PTEN</i>	<i>TP53</i>
<i>CCND1</i>	<i>CDK4</i>	<i>CRKL</i>	<i>ERRFI1</i>	<i>FOXL2</i>	<i>MET</i>	<i>NF1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>VEGFA</i>
Exones seleccionados:								
<i>ABL1</i> exones 4-9	<i>BRAF</i> exones 11-18	<i>ESR1</i> exones 4-8	<i>GNA11</i> exones 4,5	<i>IDH1</i> exón 4	<i>KIT</i> exones 8,11,12,17	<i>MTOR</i> exones 19,30,39,40,43-45,47,48, 53,56	<i>PDGFRA</i> exones 12,18	<i>RET</i> exones 11,13-16
<i>AKT1</i> exón 3	<i>BTK</i> exones 2,15	<i>EZH2</i> exón 16	<i>GNAQ</i> exones 4,5	<i>IDH2</i> exón 4	<i>MAP2K1</i> exones 2,3	<i>MYD88</i> exón 4	<i>PDGFRB</i> exones 12-21,23	<i>TERT</i> promotor
<i>ALK</i> exones 20-29	<i>CTNNB1</i> exón 3	<i>FGFR3</i> exones 7,9,14	<i>GNAS</i> exón 1	<i>JAK2</i> exón 14	<i>MAP2K2</i> exones 2-4,6,7	<i>NPM1</i> exones 4-6,8,10	<i>PIK3CA</i> exones 2,3,5-8, 10,14,19,21	
<i>ARAF</i> exones 4,5,7,11,13,15,16	<i>DDR2</i> exones 5,17,18	<i>FLT3</i> exones 14,15,20	<i>HRAS</i> exones 2,3	<i>JAK3</i> exones 5,11-13,15,16	<i>MPL</i> exón 10	<i>NRAS</i> exones 2,3	<i>RAF1</i> exones 3,4,6,7,10,14,15,17	
Reordenamientos seleccionados:								
<i>ALK</i>	<i>EGFR</i>	<i>FGFR3</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>RET</i>	<i>ROS</i>			

La secuenciación se realizó en un secuenciador NGS *HiSeq 4000* (Illumina, EE. UU.), con lecturas pareadas de 150 pb. El procedimiento técnico y el procesamiento

bioinformático detallados, así como la validación del método, están descritos por Clark y col. [152] En el informe de resultados de *Foundation ACT*[®] se exponen las variantes identificadas en la muestra analizada, así como su AF, su clasificación en cuanto a la relevancia clínica e información complementaria y referencias en la literatura. Dado que *Foundation Medicine Inc.* no realizó un estudio germinal o de tejido en paralelo, en sus informes no especifica el posible origen de las variantes.

Comparación de resultados genómicos, selección de biomarcadores

Para la comparación de los hallazgos entre los dos paneles somáticos (el de biopsia de tejido y el de biopsia líquida) se tuvieron en cuenta únicamente las regiones genómicas analizadas por ambos estudios y se aplicaron los mismos criterios de filtrado de variantes. Por otro lado, los datos de secuenciación germinal se utilizaron para identificar las variantes identificadas en el test de biopsia líquida con potencial origen hematopoyético. Por otro parte, para cada paciente se seleccionaron una serie de alteraciones genéticas detectadas en los paneles que se emplearon como biomarcadores para estudio longitudinal en ctDNA. La selección de variantes para este fin se realizó según los siguientes criterios, en orden de prioridad: 1) variantes identificadas en ambos paneles, 2) variantes tumorales identificadas en la biopsia líquida y 3) variantes identificadas en la biopsia de tejido, priorizando: FA más altas, variantes oncogénicas *versus* variantes VUS, variantes en regiones cubiertas por ambos paneles.

ESTUDIO LONGITUDINAL DE BIOMARCADORES EN ctDNA

Preparación de PCRs

Los biomarcadores seleccionados para cada paciente se analizaron en las muestras seriadas de biopsia líquida mediante una técnica basada en PCR dirigida multiplex y secuenciación NGS profunda. A partir de 1-10 ng de cfDNA (según disponibilidad), se llevó a cabo una primera PCR multiplex empleando una mezcla de oligonucleótidos específicos de las regiones flanqueantes a cada una de las posiciones a

interrogar en cada paciente, con colas en los extremos 3' correspondientes a la parte 5' de los adaptadores de Illumina. La secuencia 3' de los adaptadores, así como los índices específicos de cada muestra, se añadieron en una segunda PCR secuencial. Las secuencias de los oligonucleótidos se presentan en la *Tabla 6* (la secuencia específica de los oligonucleótidos cebadores para cada variante a interrogar se detalla en los *APÉNDICE 1* y *2*). Ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando la enzima *Herculase II Fusion Enzyme kit* (Agilent Technologies, EE. UU.), según las indicaciones del fabricante (*APÉNDICE 3*). Los productos de PCR se purificaron empleando las esferas magnéticas *AMPure XP* (Beckman Coulter, EE. UU.). Los productos purificados se analizaron empleado el equipo *4200 TapeStation system* y el kit *High Sensitivity D1000 ScreenTape assay*.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para las PCRs dirigidas multiplex

PCR específica (1ª PCR)	
Oligonucleótido	Secuencia
Directo (P5)	5'-ACACGACGCTCTCCGATCT_____secuencia específica_____3'
Reverso (P7)	5'-GACGTGTGCTCTCCGATCT_____secuencia específica_____3'
PCR de indexado (2ª PCR)	
Oligonucleótido	Secuencia
Directo (P5)	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC_index_ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT-3'
Reverso (P7)	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT_index_GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT-3'

En azul, la secuencia correspondiente al adaptador P5 de Illumina, en verde la del adaptador P7. En los oligonucleótidos de la PCR de indexado, en la parte central se incluye un índice de 8 nucleótidos que forman una combinación única. (Las secuencias completas de los oligonucleótidos se incluye en los *APÉNDICES 1* y *2*).

Secuenciación, análisis bioinformático, filtrado de resultados

Los productos de PCR se secuenciaron en el equipo NextSeq® 550. Para cada producto se dedicó un % de carrera proporcional al número de amplicones analizados en cada caso. Todo el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó con un algoritmo desarrollado internamente en lenguaje Python. En primer lugar, se llevó a cabo un control de calidad de los archivos FASTQ con el programa FastQC (v0.11.8). En segundo lugar, se descartaron las lecturas con calidad de base promedio menor de 20.

Dado que se trata de secuenciación de amplicones, no se realizó alineamiento contra el genoma de referencia y no se generaron los archivos SAM/BAM. Tomando como *input* un archivo CSV en el que se listan las variantes a interrogar en cada muestra, con sus coordenadas genómicas (en versión GRCh37 del Genoma Humano), el algoritmo diseña una ventana de 32 nucleótidos que contiene la región de interés y genera las secuencias *wild-type* y la secuencia alternativa de la variante indicada. En el caso de las variantes de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Variant, SNV*), las lecturas filtradas son comparadas contra ambas secuencias. Las lecturas que contienen más de un nucleótido diferente en las regiones flanqueantes son descartadas. El número de lecturas que encajan con la secuencia de referencia (cobertura, COB_{REF}) y el de las que encajan con la secuencia alternativa (COB_{ALT}) se utilizan para calcular la Frecuencia Alélica Observada (FAO):

$$FAO = \frac{COB_{ALT}}{COB_{REF} + COB_{ALT}} \times 100$$

Por otro lado, el algoritmo también otorga una puntuación de calidad (*Quality, Q*) que representa la frecuencia de la variante de interés en relación a la frecuencia de otras alteraciones diferentes en las posiciones contiguas. Se calcula considerando todas las alteraciones posibles en la posición de interés y en las posiciones +1, +2, -1 y -2, con respecto a éstas (COB_{other}). En el caso de las pequeñas inserciones-delecciones (Indel) el algoritmo presenta algunas limitaciones y se confirmaron los resultados en línea de comandos.

$$Q = \frac{COB_{ALT}}{COB_{ALT} + COB_{other}} \times 100$$

Sensibilidad y especificidad del método

Para calcular la sensibilidad y especificidad del método, así como para definir los puntos de corte de FAO y Q, se realizó un experimento utilizando controles positivos. Los controles positivos consistieron en 2 muestras de cfDNA previamente caracterizadas mediante el panel NGS de biopsia líquida *Foundation ACT™*. Cada una de las 2 muestras presentaba 4 variantes de FA conocidas. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras seleccionadas con cfDNA para disponer de un set de muestras de cfDNA con variantes a

diferentes FA conocidas, entre 0.1 % y 5 %. El procedimiento analítico se realizó tal y como se describió en los apartados anteriores para las muestras de los pacientes. Se calculó la sensibilidad para diferentes FA esperadas ($FA \geq 0,1 \%$, $FA \geq 0,2 \%$, $FA \geq 0,3 \%$ y $FA \geq 0,4 \%$), definida como la proporción de verdaderos positivos (VP) en comparación con el número de variantes totales identificadas, considerando los falsos negativos (FN). Por otro lado, con los datos del mismo experimento, se calculó la especificidad como la proporción de falsos positivos (FP) en relación a todas las posiciones analizadas.

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

$$Especificidad = \left(1 - \frac{FP}{todas\ las\ posiciones}\right) \times 100$$

Se realizaron los cálculos con diferentes valores de FAO y Q, y finalmente se definieron $FAO \geq 0.1 \%$ and $Q \geq 25 \%$ como valores umbral.

ESTUDIO DE LA CONCORDANCIA ENTRE ctDNA Y ESTADO CLÍNICO

Los cambios en la señal de ctDNA y el estado clínico se consideraron concordantes cuando al menos 1 prueba de biopsia líquida fue positiva durante el tratamiento con RT y, durante el seguimiento, la señal de ctDNA siguió siendo negativa en los pacientes que respondieron o positiva en caso de progresión de la enfermedad. Cuando las biopsias líquidas y las pruebas de diagnóstico por imagen se realizaron con más de cinco meses de diferencia (desincronización del seguimiento), se asumió que no se puede llegar a ninguna conclusión sobre la correlación, considerándose los puntos temporales anteriores para la evaluación de la concordancia. Se consideró que una biopsia líquida se anticipa a una prueba de imagen cuando se observó un aumento de la señal de ctDNA en comparación con la biopsia líquida previa en dos puntos temporales consecutivos, al menos para un biomarcador.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con Microsoft Excel y el software RStudio (versión 2021.9.0.351), con lenguaje R (versión 4.1.2). En el caso de variables cuantitativas, el ajuste a una distribución se evaluó empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la igualdad de las varianzas con la prueba de Levene. Para aquellas variables con distribución normal, la diferencia entre dos grupos se evaluó mediante la prueba t de Student paramétrica, para las variables no paramétricas se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. La asociación entre dos variables continuas se estudió mediante la aplicación del coeficiente de correlación de Pearson. La prueba Chi cuadrado (χ^2) de Pearson se empleó para evaluar la asociación entre dos variables cualitativas. La SLP se definió como el tiempo de supervivencia desde la finalización del tratamiento con RT hasta la progresión de la enfermedad, revelada en una prueba de imagen o la muerte por cáncer. Los casos de pacientes sin progresión o eventos de muerte fueron censurados en la fecha del último seguimiento. Las curvas de supervivencia se representaron utilizando el método de Kaplan-Meier y las comparaciones se realizaron mediante la prueba log-rank. Se consideraron significativos los valores de p menores de 0,05.

ASPECTOS ÉTICOS

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias, Proyecto# 88/17.

RESULTADOS

COHORTE

Para el estudio se seleccionaron 50 pacientes con baja carga tumoral candidatos a un tratamiento de RT en el Servicio de Oncología Radioterápica del IMOMA. Las principales características demográficas se recopilan en la *Tabla 7*. 18 pacientes tenían cáncer en estadio I y 32 tenían cáncer en estadio IV (31 pacientes con oligometástasis y 1 paciente con glioblastoma multiforme de alto grado). La cohorte se dividió en 3 grupos clínicos: el grupo de pacientes en estadio inicial no metastásico, grupo "EI" (17 pacientes); el grupo de pacientes con cáncer oligometastásico (con una o múltiples metástasis) sin enfermedad fuera del campo de tratamiento con RT, el grupo "OMT" (19 pacientes); y, por último, el grupo de pacientes con cáncer oligometastásico (con una o múltiples metástasis) que presentan enfermedad fuera del campo de tratamiento con RT, el grupo "OMT+" (14 pacientes) (*Figura 11*). En el estudio se incluyeron pacientes con distintos tipos de cáncer (*Figura 12*). Los datos demográficos y clínicos detallados se incluyen en el APÉNDICE 4.

Tabla 7. Datos demográficos de los pacientes

Sexo	Nº de casos (%)
Hombre	34 (68.0 %)
Mujer	16 (32.0 %)
Edad (mediana, rango)	
68 (41-87)	
Hábito tabáquico	Nº de casos (%)
Fumador	13 (26.0 %)
Exfumador	27 (54.0 %)
No fumador	10 (20.0 %)

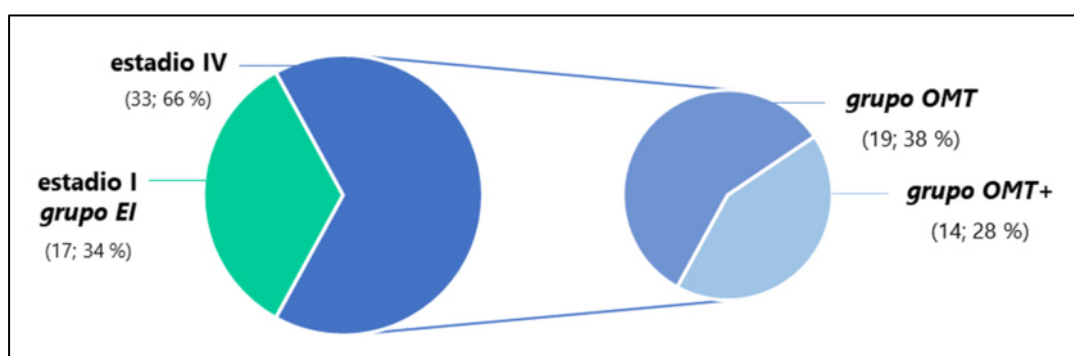


Figura 11. Estadio clínico de los pacientes y definición de subgrupos clínicos. EI: pacientes con cáncer en estadio inicial; OMT: pacientes oligometastásicos sin lesiones fuera de la región tratada con RT; OMT+: pacientes oligometastásicos con lesiones fuera de la región tratada con RT.

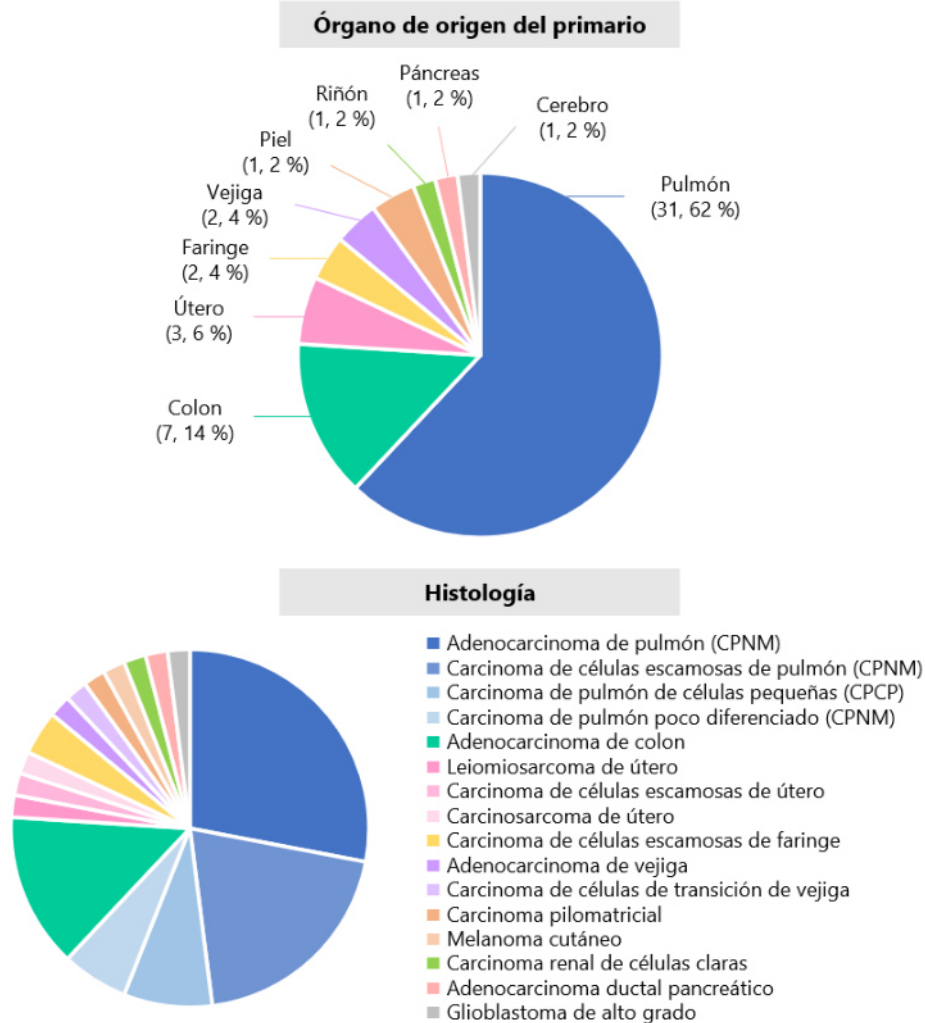


Figura 12. Histología de los tumores tratados. Arriba: órgano de origen del tumor primario de los pacientes de la cohorte. Abajo: desglose de las distintas histologías de los primarios. CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas; CPNM: cáncer de pulmón no microcítico.

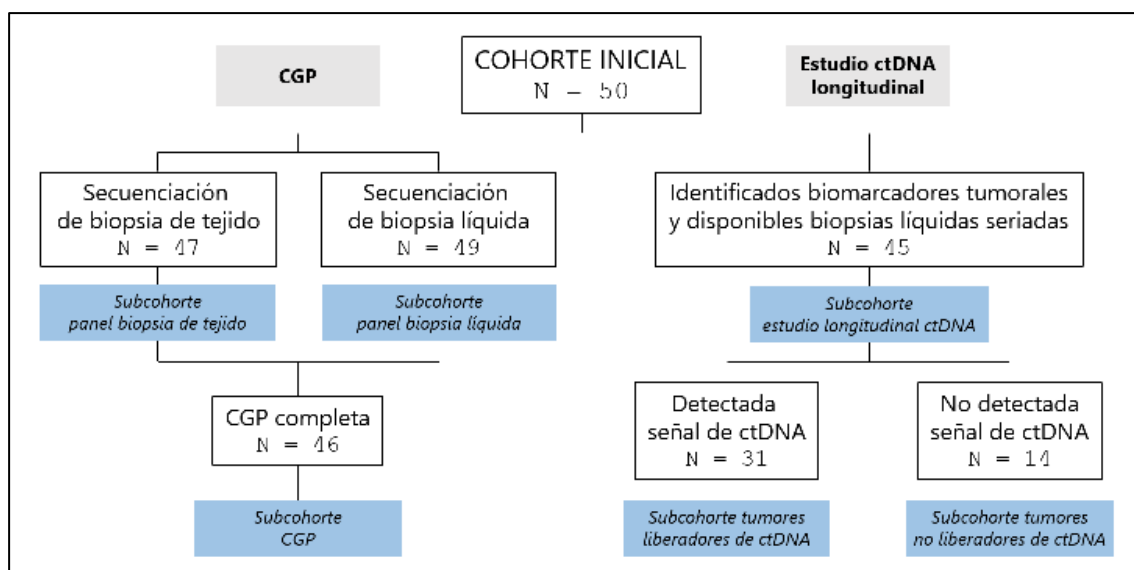


Figura 13. Cohorte inicial y definición de las diferentes subcohortes del estudio.

En las diferentes partes de este trabajo se consideraron subgrupos de pacientes distintos en función de la disponibilidad de muestras e información clínica. La cohorte inicial y las distintas subcohortes del estudio se esquematizan en la *Figura 13*.

TRATAMIENTOS CON RADIOTERAPIA Y TOMA DE MUESTRAS

La mayor parte de los pacientes recibieron tratamientos mediante HFRT (45; 90.0 %), y una pequeña parte fueron tratados con CFRT (5; 10.0 %). En la *Figura 14* se muestra la localización de las lesiones tratadas con RT. La mayoría de los tratamientos se realizaron sobre lesiones ubicadas en el pulmón considerando tanto primarios como lesiones metastásicas, sumando un 72 % del total (36 pacientes). Esto es reflejo de las características de los pacientes referidos a nuestro centro: pacientes no candidatos a cirugía, bien por el tamaño o localización de las lesiones metastásicas, la extensión de la enfermedad o su condición general y comorbilidades, por lo que se recurre a técnicas como la SBRT. En la *Tabla 8* se detalla el tipo de lesión tratada en cada paciente, así como el tratamiento con RT prescrito en cada caso.

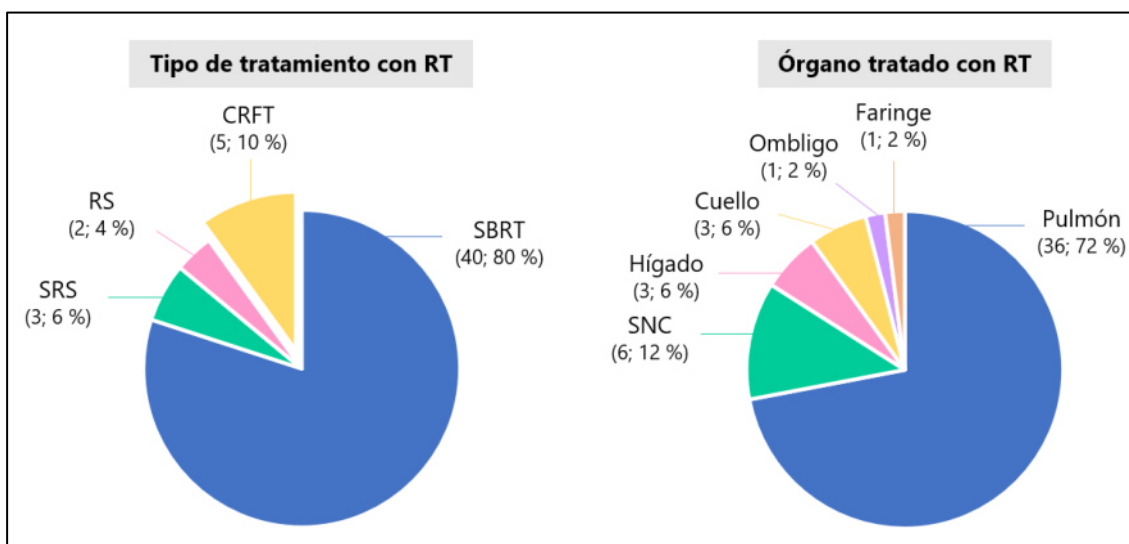


Figura 14. Tratamiento con radioterapia (RT). A la izquierda: tipo de tratamiento con RT administrado; a la derecha: localización anatómica de las lesiones tratadas con RT. CFRT: RT de fraccionamiento convencional; HFRT: RT hipofraccionada; RS: radiocirugía; SBRT: RT estereotáctica corporal; SRS: radiocirugía estereotáctica; SNC: sistema nervioso central.

Tabla 8. Tratamiento con radioterapia (RT) administrado a los pacientes de la cohorte.

Paciente #	Grupo clínico	Órgano de origen del primario	Histología del primario	Lesión irradiada (en caso de lesiones múltiples, el número)	Órgano irradiado	Fraccionamiento	Técnica RT	Nº de fracciones	Dosis total (Gy)	Dosis por fracción (Gy)
1	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	55	11
2	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	60	12
3	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma pobremente diferenciado)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	60	12
4	OMT+	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	55	11
5	OMT	Piel	Carcinoma pilomatricial	Metástasis	Pulmón	HFRT	SBRT	5	55	11
6	OMT+	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis	Hígado	HFRT	SBRT	5	50	10
7	OMT+	Útero	Leiomioma	Metástasis	Cuello (tejido blando)	HFRT	SBRT	5	30	6
8	OMT+	Útero	Carcinoma de célula escamosa	Metástasis	Pulmón	HFRT	SBRT	5	60	12
9	OMT+	Riñón	Carcinoma de células claras	Metástasis	Hígado	HFRT	SBRT	5	50	10
10	OMT	Útero	Carcinosarcoma	Metástasis	Pulmón	HFRT	SBRT	5	60	12
11	OMT	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Metástasis	Pulmón	HFRT	SBRT	5	50	10
12	OMT	Vejiga	Adenocarcinoma	Metástasis	Pulmón	HFRT	SBRT	5	55	11
13	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	60	12
14	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	55	11
15	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	55	11
16	OMT+	Pulmón	CPCP	Metástasis	Hígado	HFRT	SBRT	5	45	9
17	OMT	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis (5)	Pulmón	HFRT	SBRT	5	55	11
18	OMT	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario y metástasis	Pulmón	HFRT	SBRT	5	55	11
19	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma pobremente diferenciado)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	55	11
20	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	40	8
21	OMT	Páncreas	Adenocarcinoma ductal	Metástasis	Ombiligo	HFRT	SBRT	5	30	6
22	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	60	12
23	ES	Pulmón	CPCP	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	50	10
24	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	60	12
25	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	60	12

Paciente #	Grupo clínico	Órgano origen del primario	Histología del primario	Lesión irradiada (nº de lesiones múltiples)	Órgano irradiado	Fraciónamiento	Técnica RT	Nº de fracciones	Dosis total (Gy)	Dosis por fracción (Gy)
26	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	5	50	10
27	OMT	Vejiga	Carcinoma de célula de transición de alto grado	Metástasis (2)	Pulmón	HFRT	SBRT	8 / 5	60 / 55	7,5 / 11
28	OMT+	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis (5)	Pulmón	HFRT	SBRT	8 / 8 / 8 / 8 / 5	60 / 60 / 60 / 60 / 60	7,5 / 7,5 / 7,5 / 7,5 / 12
29	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma pobremente diferenciado)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	8	60	7,5
30	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	8	60	7,5
31	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	8	60	7,5
32	OMT+	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	8	60	7,5
33	OMT	Faringe	Carcinoma de célula escamosa	Metástasis (2)	Pulmón	HFRT	SBRT	8	60	7,5
34	OMT	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis	Pulmón	HFRT	SBRT	8	60	7,5
35	OMT	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Metástasis	Cuello (tejido blando)	HFRT	SBRT	3	27	9
36	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	3	54	18
37	OMT	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Metástasis	Pulmón	HFRT	SBRT	3	60	20
38	OMT+	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis (2)	Pulmón	HFRT	SBRT	3	60	20
39	OMT	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	HFRT	SBRT	3	54	18
40	OMT	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis	Pulmón	HFRT	SBRT	3	54	18
41	OMT+	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Metástasis	SNC	HFRT	SRS	3	27	9
42	OMT	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis (2)	SNC	HFRT	RS/SRS	1 / 3	20 / 27	20 / 9
43	OMT+	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Metástasis (3)	SNC	HFRT	RS	1	24	24
44	OMT	Piel	Melanoma	Metástasis	SNC	HFRT	RS	1	15	15
45	OMT	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Metástasis (4)	SNC	HFRT	SRS	10 / 10	30 / 40	3 / 4
46	OMT	SNC	Glioblastoma de alto grado	Primario	SNC	CFRT	.	30	60	2
47	OMT+	Faringe	Carcinoma de célula escamosa	Primario y metástasis	Faringe	CFRT	.	35	70	2
48	OMT+	Pulmón	CPCP	Primario y metástasis	Pulmón	CFRT	.	35	70	2
49	OMT+	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Metástasis	Cuello (tejido blando)	CFRT	.	33	69,96	2,12
50	OMT	Pulmón	CPCP	Primario	Pulmón	CFRT	.	30	60	2

Se desglosa el fraccionamiento de dosis de cada lesión en caso de lesiones múltiples con diferente esquema de tratamiento. CFRT: radioterapia de fraccionamiento convencional; CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas; CPNM: cáncer de pulmón no microcítico; HFRT: radioterapia hipofraccionada; RS: radiocirugía; SBRT: radioterapia estereotáctica corporal; SRS: sistema nervioso central; SNC: radiocirugía estereotáctica

Por otro lado, en la *Figura 15* se esquematiza el diseño del estudio y el flujo temporal de las diferentes fases, así como la estrategia analítica: la recopilación de muestras para los estudios genómicos (biopsia de tejido y muestra germinal) se llevó a cabo antes del tratamiento, como se detallará en el siguiente apartado.

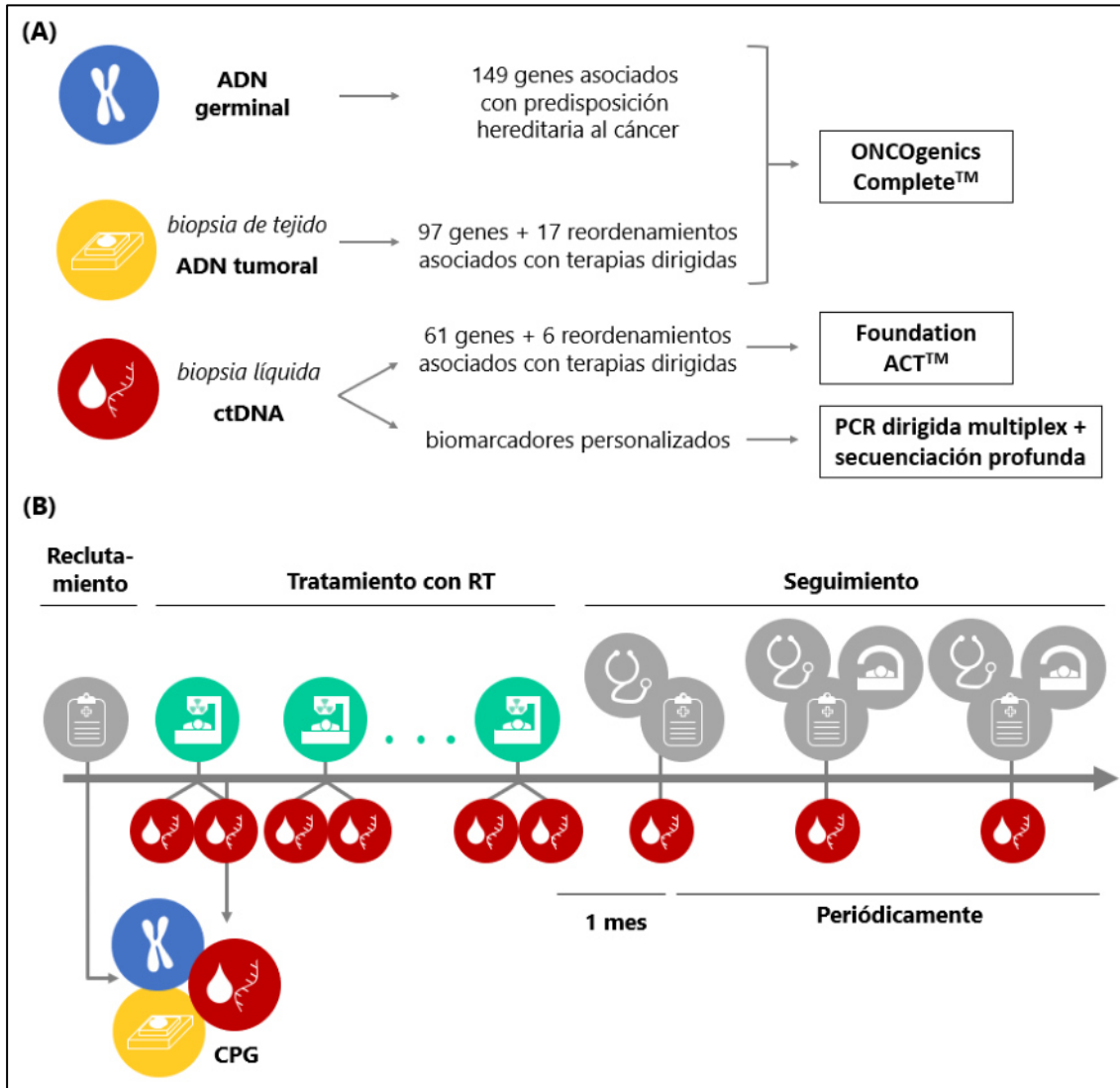


Figura 15. Diseño del estudio. (A) El estudio genómico exhaustivo (CPG) se basó en la aplicación de 2 paneles NGS: por un lado, ONCOgenics Complete™, que incluye secuenciación de ADN germinal y secuenciación de ADN tumoral obtenido a partir de una biopsia de tejido; y, por otro lado, Foundation ACT™, estudio de ctDNA a partir de biopsia líquida de sangre. En biopsias líquidas seriadas se realizó un estudio de biomarcadores personalizados basado en PCR dirigida multiplex y secuenciación NGS profunda, por el que se analizan en cada paciente simultáneamente 1-5 variantes genómicas detectadas por los paneles. (B) Diagrama temporal del desarrollo del estudio: en la fase de reclutamiento se recopilaron las diferentes muestras para los estudios genómicos y la información clínica relevante; durante el tratamiento se recogieron biopsias líquidas antes y después de las sesiones; y durante el seguimiento posterior, en paralelo a la recogida de biopsias líquidas periódicas, se recopilaron los datos clínicos derivados de las pruebas médicas realizadas.

Durante el tratamiento y a lo largo del seguimiento se recogieron muestras de biopsia líquida para la realización de un ensayo dirigido de biomarcadores personalizados. El seguimiento duró una media de 9 meses (rango 0 - 23 meses), que se interrumpió en algunos casos antes del objetivo inicial de 24 meses por diversos motivos: fallecimiento, abandono del estudio por voluntad del paciente e inicio de la pandemia de COVID-19, que interrumpió las visitas para recogida de muestras.

ANÁLISIS GENÓMICO EXHAUSTIVO

Subpanel germinal

La secuenciación de ADN germinal extraído de glóbulos blancos separados a partir de una muestra de sangre periférica se realizó en los 50 pacientes. El análisis mediante el subpanel germinal de *ONCOgenics Complete™* se llevó a cabo en 48 de ellos; en 2 pacientes la muestra germinal solo se empleó para apoyar la secuenciación tumoral. Considerando el subconjunto de 48 pacientes, se identificaron un total de 191 variantes (una vez aplicados los filtros básicos definidos en "*Metodología*"), con una media de 4 variantes por caso (rango 0-9 variantes). Las variantes fueron analizadas manualmente para identificar relevancia clínica asociada con predisposición al desarrollo de cáncer.

Hallazgos germinales clínicamente relevantes

En total se identificaron 5 variantes asociadas a predisposición genética al desarrollo de cáncer en 5 pacientes diferentes (10,4 %). Los casos clínicos se describen a continuación:

Paciente #4: varón de 82 años sometido a SBRT por un carcinoma de células escamosas de pulmón primario, sin otros antecedentes oncológicos personales. Mediante el estudio germinal se determinó que era portador heterocigoto de la variante truncante *EXT1* c.357C>A, p.Tyr119*, probablemente patogénica en base a los criterios ACMG/AMP y asociada a osteocondromas múltiples hereditarios. [192, 193] El tumor de pulmón del paciente no mostraba asociación con este hallazgo genético. Curiosamente,

la revisión retrospectiva de imágenes de PET/TC realizadas para la planificación del tratamiento con RT reveló la presencia de lesiones óseas en la pelvis compatibles con osteocondromas múltiples (*Figura 16*). El paciente tiene una amplia historia familiar de cáncer, incluyendo un "cáncer óseo" en su madre fallecida, de subtipo desconocido.

Paciente #5: varón de 51 años con metástasis pulmonares de un carcinoma pilomatricial. El carcinoma pilomatricial es un cáncer muy poco frecuente de tipo anexial que se origina inicialmente como un tumor benigno (pilomatrixoma) a partir de las células de la matriz del folículo piloso. Mediante el estudio germinal se identificó la variante probablemente patogénica *BRIP1* c.526_536del; p.Phe176Serfs*9 en heterocigosis. Las variantes patogénicas de la línea germinal en *BRIP1* confieren un alto riesgo de cáncer de ovario. [194] Este hallazgo no muestra relación con el tipo de tumor del paciente, pues hasta la fecha las variantes patogénicas en este gen no se han asociado con otro tipo de tumores. No obstante, sí había antecedentes familiares de cáncer de ovario en la familia; en la *Figura 17* se muestra el genograma. El asesoramiento genético en la hermana del probando permitió determinar que no era portadora de la variante patogénica por lo que no había heredado la predisposición familiar al cáncer de ovario.

Paciente #10: mujer de 64 años tratada de metástasis pulmonar de un carcinosarcoma de útero, sin antecedentes oncológicos en la historia familiar. El estudio germinal reveló que era portadora heterocigota de la variante patogénica *BRCA1* c.3331_3334del; p.Gln1111Asnfs*5, asociada al síndrome de cáncer de mama y ovario hereditarios. [195, 196] *A priori*, el carcinosarcoma de útero no se ha asociado a este síndrome. La familia declinó la propuesta de realizar un estudio familiar.

Por otro lado, el **paciente #16** y el **paciente #48** fueron ambos portadores heterocigotos de alteraciones patogénicas en el gen *MUTYH*, asociadas con el Síndrome de poliposis adenomatosa asociada a *MUTYH*, con un modo de herencia recesivo. Existe cierta controversia acerca de la probabilidad de desarrollar cáncer colorrectal en pacientes heterocigotos para alteraciones en *MUTYH* [197-199], por lo que no hay medidas de seguimiento específicas, pero se podría ofrecer técnicas de cribado de riesgo moderado según la historia clínica. Ninguno de los pacientes portadores de alteración tenía antecedentes personales ni familiares conocidos de poliposis.

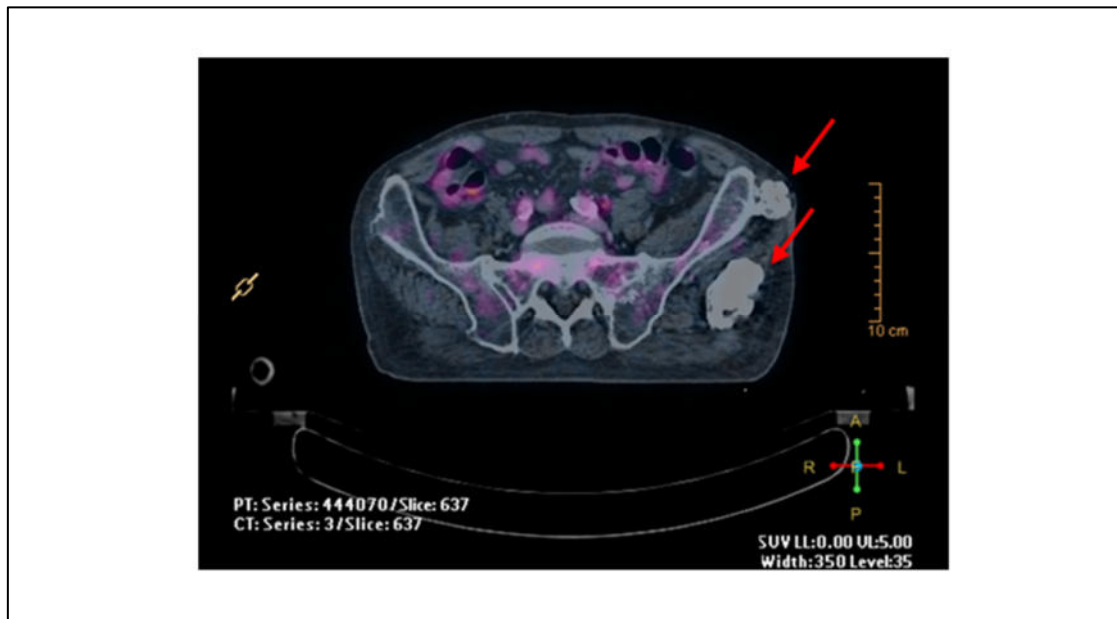


Figura 16. Osteocondromas múltiples en el paciente #4, portador de una variante patogénica en el gen *EXT1*. Imagen de PET/TC realizado en el contexto la planificación del tratamiento con RT en el que se aprecian varias lesiones óseas compatibles con osteocondromas (señalados con flechas rojas).

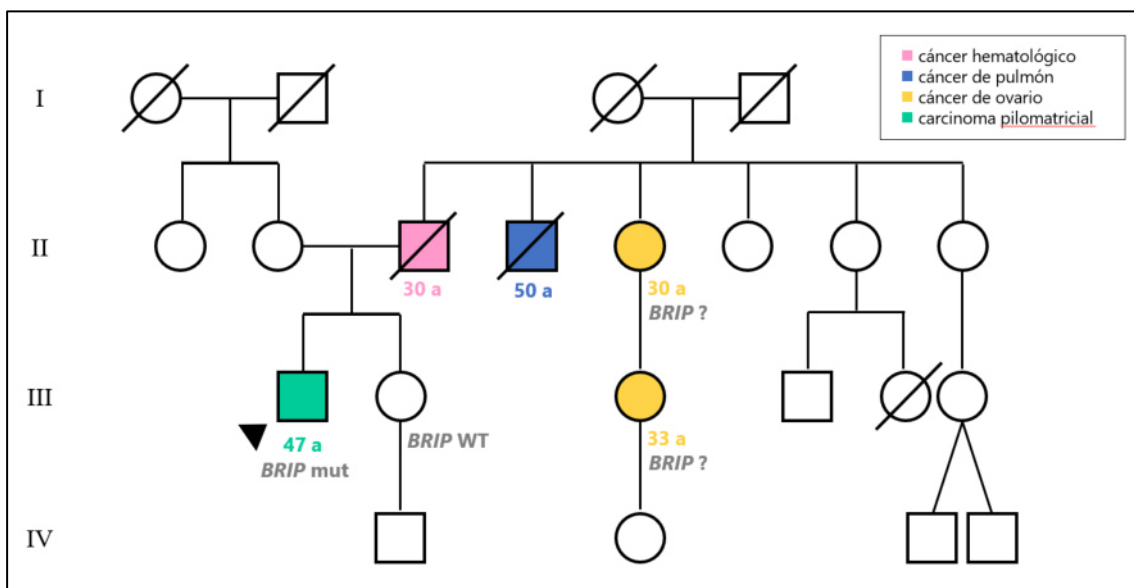


Figura 17. Genograma del paciente #5, portador de una variante patogénica en el gen *BRIP1*. El paciente #5 (probando) aparece señalado con una fecha negra. El fenotipo oncológico de los individuos se representa con diferentes colores y en la parte inferior se indica la edad al diagnóstico. Los individuos tachados están fallecidos. Se muestra el estado mutacional de *BRIP1* en la hermana del probando, con resultado negativo. No fue posible acceder a muestras de las familiares afectas de cáncer de ovario y altamente sospechosas de ser portadoras de la variante patogénica.

En la *Tabla 9* se recoge información sobre dichas alteraciones germinales, incluyendo la accionabilidad clínica con implicaciones reales en el manejo del paciente.

Tabla 9. Significado clínico de los hallazgos germinales.

Paciente #	Variante	Zigosidad	Clasificación ACMG	Criterios ACMG*	Fenotipo asociado (modo de herencia)	Accionabilidad clínica /Nivel de evidencia
4	<i>EXT1</i> c.357C>A p.Tyr119*	Heteroz.	Probablemente patogénica	PVS1, PM2_Supporting	Osteocondromas múltiples (AD)	Diagnóstico diferencial / Casos clínicos [192, 193]
5	<i>BRIP1</i> c.526_536del p.Phe176Serfs*9	Heteroz.	Probablemente patogénica	PVS1, PM2_Supporting	Cáncer de mama y ovario (AD)	Evaluación del riesgo, prevención, profilaxis, detección precoz / NCCN [13]
					Anemia de Fanconi (AR)	
10	<i>BRCA1</i> c.3331_3334del p.Gln1111Asnfs*5	Heteroz.	Patogénica	PVS1, PS3_Moderate, + revisión panel de expertos (ENIGMA)	CMOH (AD)	Evaluación del riesgo, prevención, profilaxis, detección precoz, terapia / NCCN [13]
16	<i>MUTYH</i> Deleción parcial (exones 4-16)	Heteroz.	Patogénica	PVS1, PM2_Supporting, PM3	Síndrome de poliposis adenomatosa asociada a <i>MUTYH</i> (AR)	Detección precoz / Casos clínicos [200]
48	<i>MUTYH</i> c.1187G>A p.Gly396Asp	Heteroz.	Patogénica	PS3, PM1, PM3, PP1, PP2, PP3		

* Nomenclatura de criterios ACMG según Richards y col., 2015 [188].

AD: modo de herencia autosómico dominante; AR: modo de herencia autosómico recesivo; CMOH: síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario; ENIGMA: Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles; Heteroz: heterocigosis.

Subpanel somático sobre biopsia de tejido

El ADN tumoral se obtuvo mayoritariamente a partir de muestras de tejido FFPE procedente de biopsia tumoral o pieza quirúrgica (44/50, 88.0%), y en otros casos se partió de aspiración con aguja fina (*Fine Needle Aspiration*, FNA) (6/50, 12.0 %).

En la mayoría de los casos, la muestra de tejido analizada en el test genómico tumoral procedía de una biopsia de la lesión activa y a tratar (59,6 %), mientras que en otros casos se disponía de una muestra del primario ya resecado del que deriva la metástasis a tratar actualmente (26,2 %) (Tabla 10). En los controles de calidad llevados a cabo antes de la preparación de la librería para el estudio genómico somático, las

muestras de 3 casos no alcanzaron los umbrales requeridos, no habiendo disponible más tejido, por lo que no se completó el estudio genómico. Por este motivo, de aquí en adelante se discutirán los hallazgos obtenidos en una subcohorte de 47 pacientes. Se identificaron un total de 728 variantes genéticas mediante el subpanel somático sobre muestras de tejido tumoral, con una media de 15,5 variantes por caso (rango 7-26).

Tabla 10. Origen de las muestras de tejido para el subpanel genómico somático (N=47).

Muestra de tejido analizada	Nº de casos (%)
biopsia de tejido de la lesión a tratar	28 (59,6 %)
biopsia del primario de la metástasis a tratar (<i>no actual</i>)	17 (36,2 %)
biopsia de metástasis del primario a tratar (<i>no actual</i>)	1 (2,1 %)
biopsia de otra metástasis (<i>no actual</i>)	1 (2,1 %)

Resultados corregidos por sustracción germinal

El panel genómico *ONCOgenics Tumor™* integra los datos de secuenciación germinal para determinar el origen de las variantes identificadas en las muestras de tejido. Este paso de "sustracción germinal" reveló que el 68,1 % de las variantes tenían un origen germinal (496/728). Si se consideran únicamente las variantes somáticas, se identificaron un total de 232 variantes, con una media de 4,9 variantes por caso (rango 1-12 variantes); se identificaron variantes somáticas en las muestras de los 47 pacientes. Las variantes somáticas mostraron una FA corregida media de 42,5 % (rango 1,5-99,8 %). La media de variantes somáticas por paciente es similar entre grupos clínicos. Si consideramos los 28 pacientes en los que se secuenció la biopsia de la lesión tratada (primario o metástasis, según corresponda), en los pacientes del grupo E1 se identificó una media de 4,7 variantes/caso y en los pacientes OMT y OMT+, una media de 6,3 variantes/caso, siendo la diferencia no significativa (valor $p > 0,05$, prueba t de Student).

Panel somático sobre biopsia líquida

En la mayoría de los casos, la recogida de la muestra de biopsia líquida a partir de la cual se llevó a cabo el estudio con el panel genómico *Foundation ACT™* se realizó una vez iniciado el tratamiento, bajo la hipótesis de que las primeras sesiones del

tratamiento pudieran aumentar el nivel de ctDNA en sangre, debido a la destrucción de las células tumorales inducida por la radiación. En el 95,6 % de los pacientes sometidos a tratamientos de HFRT, la muestra para *Foundation ACT™* se recogió tras las primera o segunda fracción de RT; en 4 de los 5 pacientes tratados mediante CFRT se recogió tras unas de las sesiones en torno a la mitad del tratamiento y en el restante (paciente #50) la muestra es de antes del inicio de tratamiento (momento específico indicado en el APÉNDICE 5).

El panel de biopsia líquida tuvo resultados válidos en un 98 % de los pacientes, en uno de los casos el análisis fue fallido y no pudo realizarse una nueva extracción. Por esta razón, a partir de aquí se considerará una subcohorta de 49 pacientes. Se identificaron un total de 90 variantes, con una media de 1,8 variantes por caso (rango 0-6 variantes); el test fue capaz de detectar variantes en un 75,5 % de las muestras analizadas (37/49 pacientes) y la FA media fue de 16,2 % (rango 0,1-64,9 %).

Origen de las variantes detectadas en biopsia líquida

El panel genómico *Foundation ACT™* no incluye la sustracción germinal puesto que no se lleva a cabo la secuenciación de una muestra germinal. A partir de los resultados facilitados por *Foundation Medicine* se simuló la sustracción germinal empleando los datos de *ONCOgenics Germline™*, complementando esta aproximación con un estudio dirigido de aquellas variantes cuyo origen no se pudo dilucidar con los resultados del panel NGS al no estar presentes en dichos resultados, lo que permitió definir el origen de las variantes detectadas mediante el panel de biopsia líquida. Los resultados que a continuación se exponen se representan en la *Figura 18* (todas las variantes se incluyen en el APÉNDICE 6).

En primer lugar, se confirmó que el 30,0 % de las variantes detectadas mediante el panel de biopsia líquida (27/90 variantes) tenían origen germinal y, por lo tanto, no eran elegibles como biomarcadores para el seguimiento. Estas variantes presentaban una FA media de 49,6 % (rango 24,1-64,9 %) en la biopsia líquida, valores sugestivos de origen germinal. Cabe destacar que en un caso se detectó una variante en el gen *TP53* con una FA compatible (47,3 %) que posteriormente, por su presencia en la muestra de

tejido y su ausencia en el análisis germinal, se confirmó que tenía origen tumoral; sin datos de secuenciación germinal, esta variante podría haberse inferido erróneamente como germinal y haber sido descartada como biomarcador tumoral. Por otro lado, una búsqueda dirigida de resto de variantes en los resultados de la secuenciación de la línea germinal (complementada con la información obtenida por PCR dirigida y NGS profunda) reveló que el 38,9 % de las variantes originalmente identificadas por el panel de biopsia líquida tenían origen hematopoyético (35/90 variantes); estas variantes presentaban una FA media de 0,7 % (rango 0,1-5,5 %) en la biopsia líquida.

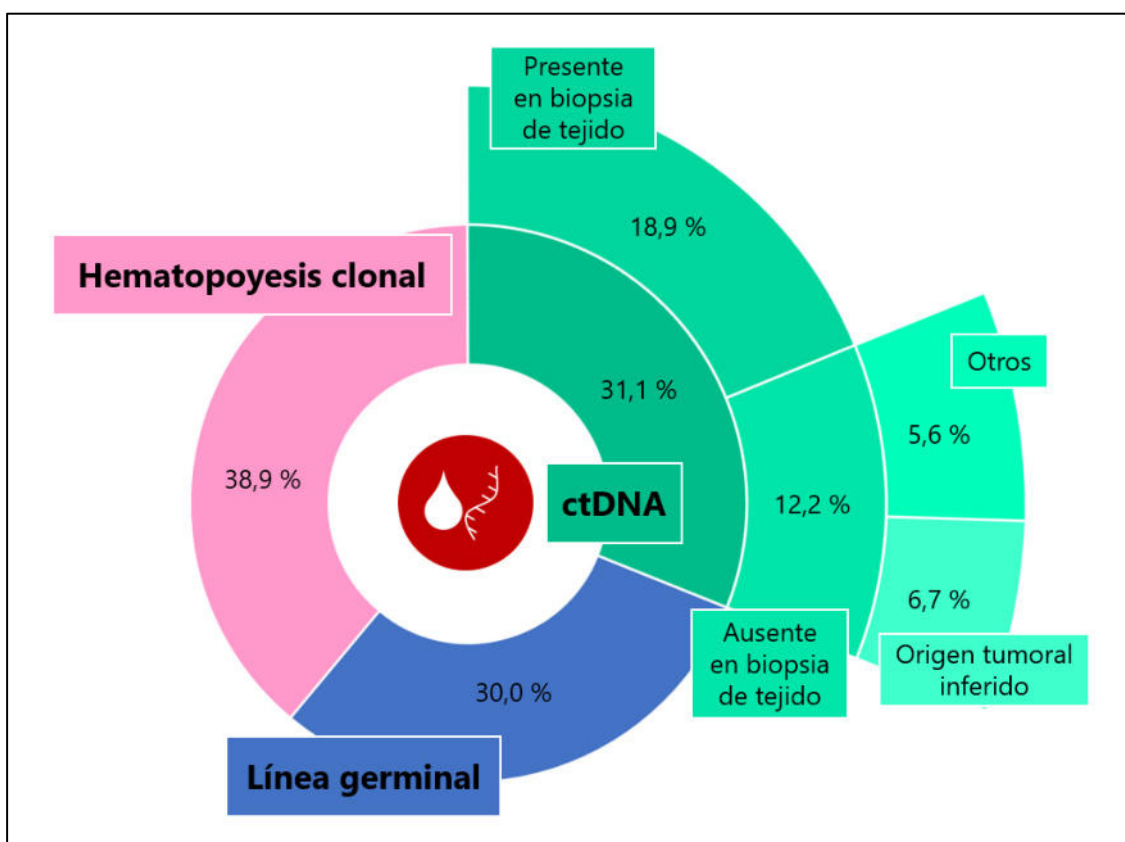


Figura 18. Origen de las variantes detectadas mediante biopsia líquida. Mediante el test de biopsia líquida se identificaron un total de 90 variantes en 37 pacientes; en 12 pacientes no se detectó ninguna alteración. El origen de estas variantes se investigó comparando los datos con los obtenidos mediante el panel genómico realizado sobre línea germinal y complementando esta aproximación con datos obtenidos de los ensayos dirigidos de PCR+NGS llevados a cabo posteriormente. Esta comparación reveló que un 30,0 % de las variantes tenían un origen germinal (azul), un 38,9 % derivaban de la hematopoyesis clonal (rosa), y el 31,1 % restante se consideran verdaderas variantes de ctDNA (verde). En cuanto a las variantes de ctDNA, más de la mitad estaban presentes en la biopsia de tejido analizada (18,9 % del total) y el resto no se detectaron (12,2 % del total). De las variantes ausentes en la biopsia tisular, aproximadamente en la mitad se asumió que procedían del tumor a la luz de los resultados de biopsias líquidas seriadas (6,7 % del total), mientras que no pudo determinarse el origen tumoral de la otra mitad 6 (5,6 % del total).

Considerando lo anteriormente expuesto, se determinó que sólo un 31,1 % de las variantes detectadas por el panel de biopsia líquida son verdaderas variantes de ctDNA (28/90 variantes). Un 60,7 % de las variantes identificadas en ctDNA (17/28 variantes totales) fueron detectadas en la biopsia de tumor mediante el panel genómico, confirmando su origen tumoral. En segundo lugar, se infirió que otro 17,9 % de las de ctDNA (5/28 variantes totales) tenía también un origen tumoral, de acuerdo a su comportamiento en el análisis dirigido por PCR+NGS, que siguió una tendencia similar a otras variantes tumorales confirmadas o mostró concordancia con el estado clínico del paciente (ver apartado "*Estudio de los cambios en el ctDNA en los tratamientos con RT*"). Por último, el origen del 21,4 % de variantes de ctDNA restantes (6/28 variantes) no se pudo determinar. En resumen, mediante el panel de biopsia líquida se identificaron variantes de ctDNA en 19 pacientes (38,8 %). Se observó un ligero enriquecimiento en variantes de ctDNA en estadios clínicos avanzados: un 45,2 % de los pacientes OMT/OMT+ presentaron al menos una variante de ctDNA frente a un 33,3 % de los pacientes del grupo EI, pero esta diferencia no fue significativa (valor $p > 0,05$, test Chi cuadrado).

Significado de las variantes derivadas de hematopoyesis clonal

Dado que una fracción importante de las variantes identificadas por el panel de biopsia líquida resultaron tener origen hematopoyético, se planteó explorar las posibles asociaciones entre el fenómeno de la HC y diferentes variables relacionadas con el cáncer. Las variantes relacionadas con HC mostraron una FA media de 0,73 % (con un rango de 0,11-5,45 %) en el panel de biopsia líquida. Las 33 variantes de HC observadas afectaban a 18 genes diferentes, siendo *TP53* (10 variantes), *NF1* (3), *PTEN* (3), *BRCA2* (2) y *JAK2* (2) los más recurrentes. Las variantes en los genes *TP53* y *JAK2* derivadas de HC se han asociado al fenómeno de CHIP. [141] Todas las variantes relacionadas con HC se detectaron en cfDNA durante el tratamiento y el seguimiento. Concretamente, los pacientes #14 y #24 eran ambos portadores de la variante patogénica *JAK2* c.1849G>T; p.Val617Phe, asociada a policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria. [201, 202] Ninguno de los dos pacientes tenían antecedentes de trastornos mieloproliferativos y en ambos la variante mantuvo mayoritariamente una FA inferior al

2 % (umbral para considerar que una variante puede proceder de CHIP [203]). La edad fue significativamente mayor en los pacientes portadores de variantes relacionadas con HC que en los no portadores (valor $p = 0,00001$, prueba t de Student). No se encontró ninguna asociación entre la presencia de variantes de HC y los tratamientos citotóxicos previos ni el hábito tabáquico en la cohorte (valor $p > 0,05$, prueba de Chi-cuadrado). Por tanto, al margen de la edad (un factor de riesgo conocido para la HC), ninguna de las variables exploradas se asoció con la HC en esta cohorte.

Comparación de resultados de los estudios somáticos

Escenario mutacional combinado

Para establecer un estudio comparativo entre los hallazgos genómicos de los dos paneles somáticos se consideró una subcohorte de 46 pacientes, correspondiente a aquellos casos en los que se completó con éxito tanto la secuenciación de la biopsia de tejido como la de la biopsia líquida. En la *Figura 19* se presenta un diagrama del espectro mutacional de los 46 pacientes, todos ellos con al menos una alteración somática. Entre las observaciones más relevantes se puede destacar que *TP53* es, con diferencia, el gen más frecuentemente mutado en toda la cohorte y en los distintos grupos clínicos; el 76,1 % de los pacientes presentan *TP53* alterado. Atendiendo a los listados de genes más mutados en la segregación por grupo clínico, pese a la variabilidad probablemente condicionada por el tamaño reducido de la muestra, hay diversas coincidencias. No se observaron diferencias entre el número total de variantes identificadas entre los diferentes grupos clínicos. Considerando un subgrupo formado por 28 pacientes de cáncer de pulmón, su perfil mutacional se comparó con el de pacientes de cáncer de pulmón del *Clinical Proteomic Tumour Analysis Consortium 3* (CPTAC-3) y se observaron varias semejanzas. Por ejemplo, 9 de los 15 genes más mutados coinciden en ambas cohortes, siendo *TP53* de nuevo el más frecuentemente mutado; asimismo, las variantes en *PIK3CA* y/o *NF1* tienden a ser mutuamente excluyentes con las de *KRAS*, y el número total de alteraciones identificadas es similar (espectro mutacional por grupos en *APÉNDICE 7* y listado de todas las variantes identificadas por ambos estudios en el *APÉNDICE 8*).

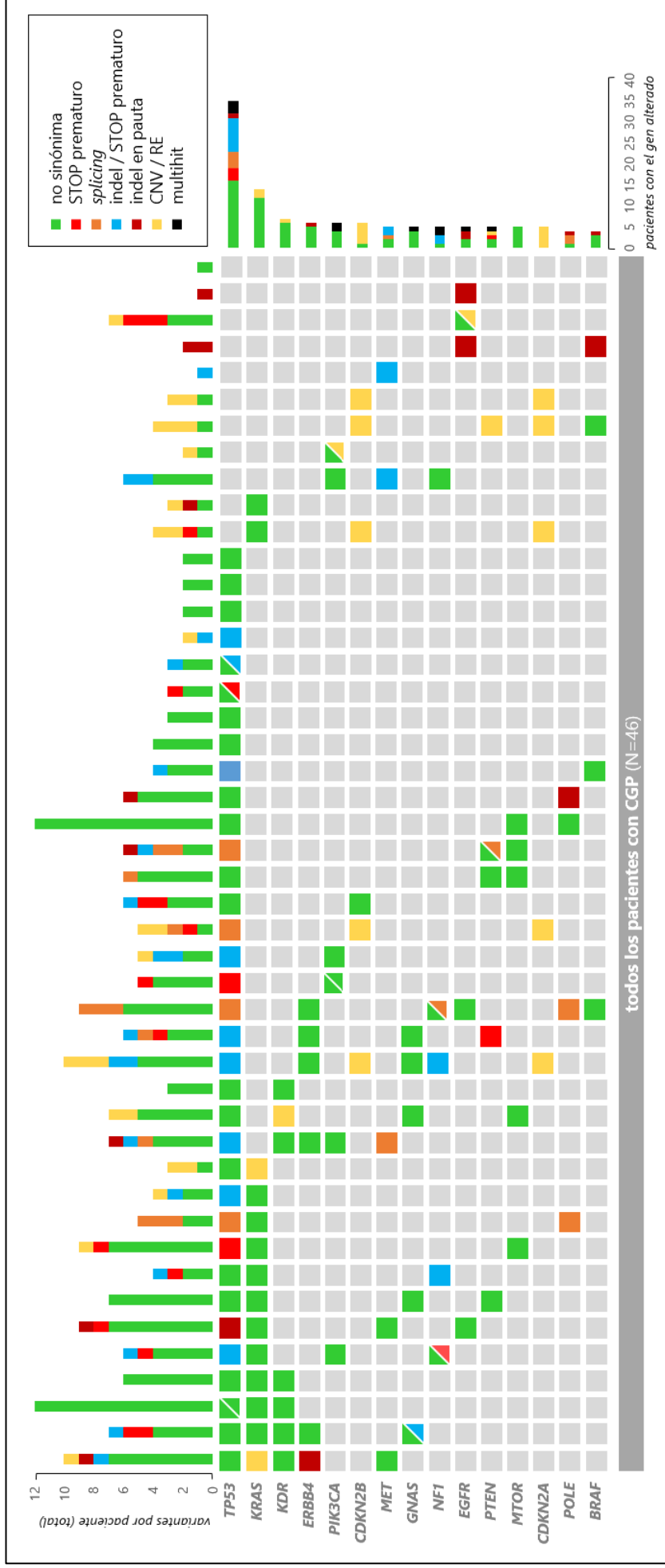


Figura 19. Espectro mutacional de los pacientes de la cohorte. El diagrama muestra conjuntamente las variantes somáticas identificadas en la biopsia de tejido y/o en la biopsia líquida. Las columnas representan los 46 pacientes en los que se completó la secuenciación de ambas biopsias, y las filas, los genes más frecuentemente mutados. En colores se muestran los diferentes tipos de alteración genómica. Las casillas con dos colores representan genes con varias alteraciones de distinto tipo ("multithit"). CNV: variación en el número de copias; indel: inserción-delección; RE: reordenamiento.

Concordancia biopsia de tejido-biopsia líquida

En este apartado se considera de nuevo la subcohorta de los 46 pacientes con ambos estudios somáticos completados y, a su vez, las variantes se restringen a aquellas que recaen en regiones genómicas cubiertas por ambos paneles. Esto deja una subcohorta final de 44 pacientes, puesto que en 2 de ellos no se identificaron variantes somáticas en las regiones genómicas coincidentes.

Considerando globalmente todas las variantes identificadas por uno o ambos estudios somáticos se detectaron un total de 111 variantes somáticas, con una media de 2,5 variantes por caso (rango 1-6 variantes) (*Figura 20*). El 15,3 % de todas las variantes somáticas identificadas fueron detectadas por ambos paneles, un valor sensiblemente inferior a los datos publicados en la literatura, en cohortes de enfermedad avanzada, con tasas de concordancia en torno al 80 %. [150-152, 154] El 75,7 % de las variantes fueron únicamente detectadas en la biopsia de tejido y el 9,0 % en la biopsia líquida. La concordancia global aumenta hasta el 18,2 % si se atiende únicamente a los 26 casos con biopsias coincidentes en el tiempo (en los que la biopsia de tejido analizada procedía de la lesión activa irradiada) (*Figura 20A*). Al segregar los pacientes por su grupo clínico, se observan diferencias en el porcentaje de concordancia global, alcanzándose los siguientes valores: 5,4 % para los pacientes del grupo EI, 11,6 % para los pacientes OMT y 32,3 % para los pacientes OMT+ (*Figura 20B*). Aplicando estas dos condiciones que incrementan la concordancia, si se restringe la comparativa a aquellos pacientes OMT+ con biopsias coincidentes, la concordancia global sube hasta un 41,7 %, aunque el tamaño muestral es muy reducido, de 5 pacientes en total. Estos mismos análisis revelan resultados similares si son aplicados únicamente sobre los pacientes de la cohorte que tienen cáncer de pulmón (*APÉNDICE 9*). En la *Figura 20C* se muestra el perfil de concordancias por paciente individual.

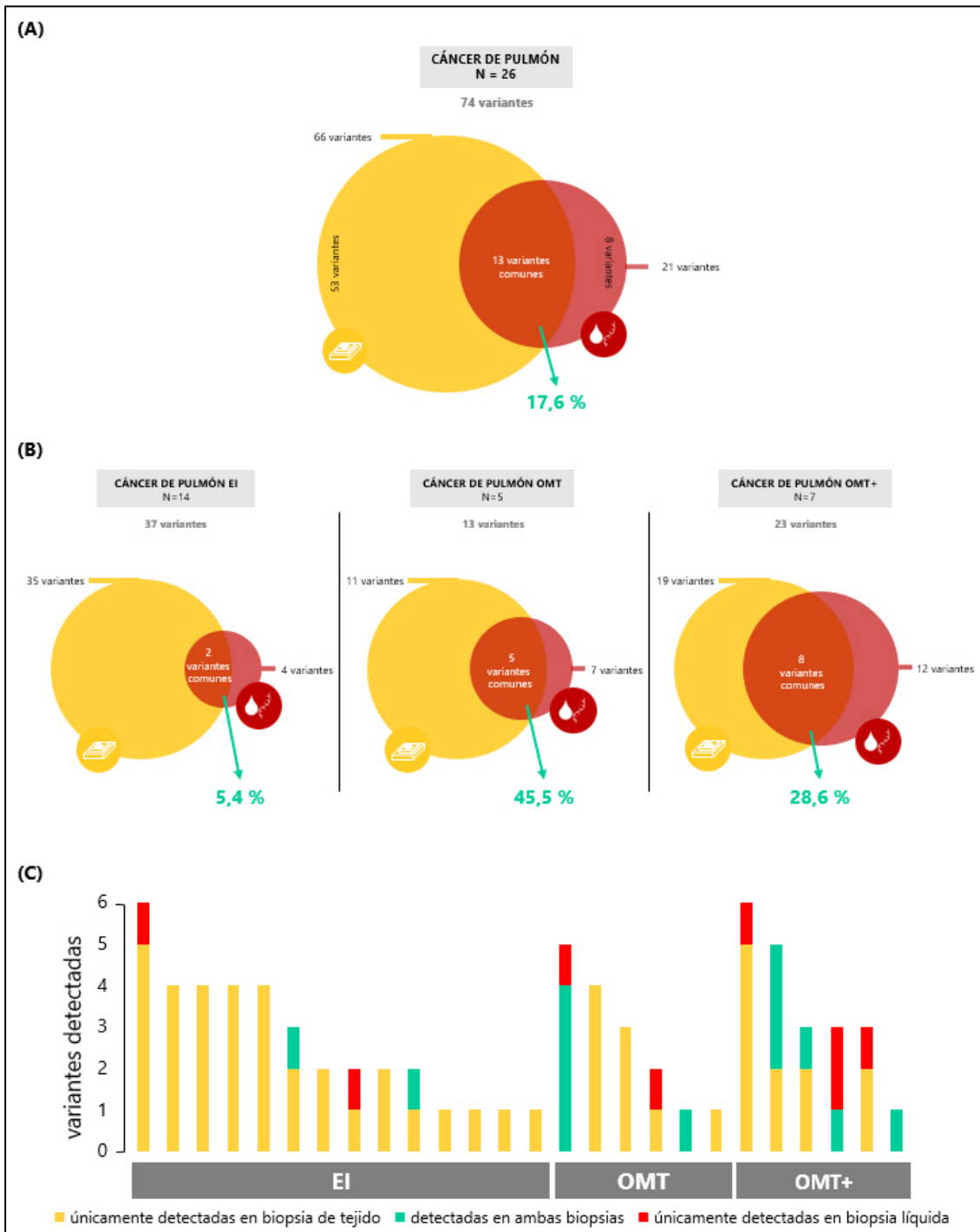


Figura 20. Concordancia entre la biopsia de tejido y la biopsia líquida. Representación del número de variantes detectadas en la biopsia de tejido (en amarillo) y en la biopsia líquida (en rojo), así como las variantes detectadas por ambos estudios (la intersección o en verde), en diferentes subgrupos de pacientes. Únicamente se representan las variantes que afectan a regiones cubiertas por los paneles genómicos de ambos estudios y se han excluido las variantes germinales y de hematopoyesis clonal. (A) Diagramas de Venn que representan las coincidencias entre ambos paneles somáticos: a la izquierda, se muestran las concordancias observadas en todos los pacientes; a la derecha, en el subgrupo de 26 pacientes en los que las biopsias eran coincidentes en el tiempo. (B) Diagramas de Venn que muestran las concordancias observadas separando los pacientes en función del grupo clínico. (C) Gráfico de columnas apiladas que representa la concordancia entre la biopsia líquida y la biopsia de tejido para cada paciente.

Accionabilidad global del análisis genómico exhaustivo

En la *Tabla 11* se muestra el listado de alteraciones genómicas clínicamente relevantes detectadas en la subcohorta de 46 pacientes. Se incluyen tanto las variantes detectadas en línea germinal, como las variantes somáticas y se clasifican según el tipo de accionabilidad clínica: asociación con terapia dirigida, valor pronóstico, potenciales biomarcadores o implicaciones para asesoramiento genético. En la *Figura 21* se ilustra la comparación de hallazgos accionables proporcionados por ambos estudios genómicos.

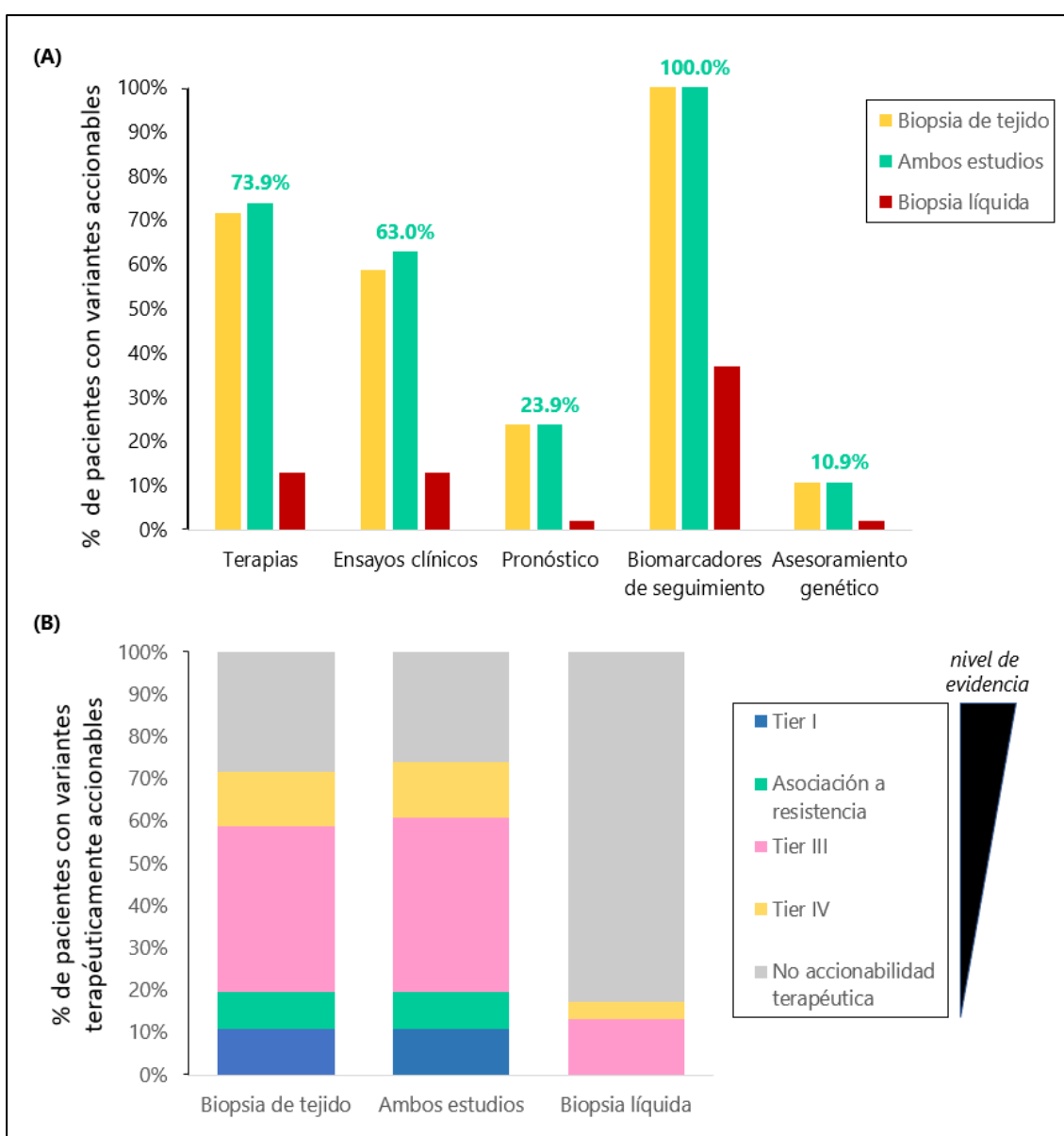


Figura 21. Accionabilidad de los estudios genómicos. (A) Porcentaje de pacientes en los que se identificaron variantes accionables asociadas con terapias, ensayos clínicos, pronóstico, biomarcadores o asesoramiento genético. (B) Porcentaje de pacientes en los que se identificaron variantes terapéuticamente accionables, según los distintos niveles de evidencia clínica definidos por los criterios ESMO-ESCAT [190]. Para cada paciente se consideró el nivel de evidencia más alto.

Tabla 11. Listado de variantes clínicamente accionables detectadas mediante CGP.

Paciente #	Tumor	Tratamiento		Ensayos clínicos		Biomarcadores de seguimiento		Otros tipos de accionabilidad	
		ESCAT tier	BT	BL	BT	BL	BT	BL	
1	CPNM (adenocarcinoma)	IV-A	KRAS p.Gly12Val cobimetinib, binimetinib, trametinib	-	NCT03170206, NCT04735068, NCT03948763	ATR p.Leu341Phe EGFR p.Gly517Cys GNA11 p.Glu245Lys IGF1R p.Glu979* KRAS p.Gly12Val MET p.Asp1222Asn ROS1 p.Met1181Ile TP53 p.Phe341_Arg342delinsLeu	FGFR2 p.Glu777Lys	KRAS p.Gly12Val PRONÓSTICO	-
2	CPNM (adenocarcinoma)	I-A	EGFR p.Glu746_Ala750del afatinib, dacomitinib, erlotinib, erlotinib + ramucicrumab, gefitinib, osimertinib	-	NA	EGFR p.Glu746_Ala750del	BRAF p.Asn486_Thr491delinsLys	-	-
		III-B	BRAF p.Asn486_Thr491delinsLys dabrafenib + trametinib	-	NCT04620330				
3	CPNM (carcinoma pobremente diferenciado)	-	-	-	-	BAP1 p.Ala134Thr JAK1 p.Ser1137Pro TP53 p.Tyr220Cys	-	-	-
4	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	III-A	PIK3CA p.Glu542Lys alpelisib + fulvestrant	-	NCT04073680, NCT04774952	IL7R p.Lys395Arg PIK3CA p.Glu110Lys / p.Glu542Lys RET p.Pro1053Ser TP53 p.Gln331*	PIK3CA p.Glu542Lys	EXT1 p.Tyr119* (germinal) ASESORAMIENTO GENÉTICO	-
		III-A	PIK3CA p.Glu110Lys alpelisib + fulvestrant	-	NCT04073680, NCT04774952				
5	Carcinoma pilomatricial	III-A	CTNNB1 p.Asp32Tyr everolimus + letrozol, imatinib, vinorelbina	-	-	CSF1R p.Arg579Trp CTNNB1 p.Asp32Tyr FGFR4 p.Arg606Gln TP53 p.Arg248Trp	-	BRP1 p.Phe176Serfs*9 (germinal) ASESORAMIENTO GENÉTICO	-
		III-A	BRP1 p.Phe176Serfs*9 olaparib	-	NCT04171700				
6	Adenocarcinoma de colon	III-A	FBXW7 p.Arg465Cys temsirolimus, veliparib, sirolimus, everolimus	-	-	FBXW7 p.Arg465Cys KDR p.Gln268Lys TP53 p.Arg273Cys	TP53 p.Arg273Cys	-	-
7	Leiomioma	-	-	-	-	TP53 p.Pro27Leufs*17	TP53 p.Pro27Leufs*17	-	-
8	Carcinoma de célula escamosa de útero	III-A	PIK3CA ampl. N=6 / p.Glu542Lys alpelisib + fulvestrant	-	NCT04073680, NCT04774952, NCT04836663	PIK3CA p.Glu542Lys	-	-	-
9	Carcinoma de células claras de riñón	-	-	-	-	CSF3R p.Asp172Asn	-	-	-
10	Carcinosarcoma de útero	III-A	BRCA1 p.Gln1111Asnfs*5 niraparib, olaparib, rucaparib, talazoparib	-	NCT04171700, NCT03552471	PIK3R1 p.Arg358Pro PIK3R1 p.Gln579* TP53 c.993+1G>A	-	BRCA1 p.Gln1111Asnfs*5 (germinal) ASESORAMIENTO GENÉTICO	-
		IV-A	PIK3R1 p.Gln579* inhibidores PI3K, inhibidores mTOR, inhibidores AKT	-	NCT04836663				
12	Adenocarcinoma de vejiga	IV-A	KRAS ampl. N=9 cobimetinib, binimetinib, trametinib	-	NCT03634982	TP53 p.Cys275Arg	-	CCND1 ampl. N=7 PRONÓSTICO	-
13	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	III-A	P TEN p.Gly165Glu everolimus, temsirolimus	-	NCT04591431, NCT02465060	IGF2 p.Thr40Asn JAK3 c.566+1G>T MTOR p.Ala1971Val PTEN p.Gly165Glu TP53 p.Pro250Leu TSC2 p.Arg344Met	-	-	-

Paciente #	Tumor	Tratamiento		Ensayos clínicos	Biomarcadores de seguimiento		Otros tipos de accionabilidad	
		ESCAT tier	BT		BL	BT	BL	BT
14	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	III-A	MAP2K1 p.Lys57Asn trametinib (otros tumores)	NCT04488003	MAP2K1 p.Lys57Asn TP53 p.Arg156Pro	TP53 p.Arg156Pro	-	-
15	CPNM (adenocarcinoma)	I-A	KRAS p.Gly12Cys sotorasib	NA	CCND3 p.Arg33Cys KRAS p.Gly12Cys	-	KRAS p.Gly12Cys PRONÓSTICO	-
16	CPCP	III-A	-	NCT04774952, NCT04591431	MTOR p.Gly1064Glu IL7R p.Gly215Phe ROSI p.Ser1279Cysfs*51 TP53 c.560-2A>G	PTEN p.His61Arg / c.635-1G>C TP53 c.560-2A>G	MUTYH delección parcial (germinal) ASESORAMIENTO GENÉTICO	-
17	Adenocarcinoma de colon	III-A	NF1 p.Gln786* selumetinib, trametinib	NCT02465060	KRAS p.Gly13Asp MITF p.Arg406Gln	-	-	-
		III-A	PIK3CA p.Glu545Lys alpelisib + fulvestrant	NCT04073680, NCT04774952	NF1 p.Gln786* / p.Ala1429Thr PIK3CA p.Glu545Lys TP53 p.Cys229Tyrfs*10	-	-	-
		IV-A / resistencia	KRAS p.Gly13Asp cobimetinib, binimetinib, trametinib / anticuerpos anti-EGFR (resistencia)	NCT04117087, NCT03948763	FRS2 p.Asp503Valfs*? GATA3 p.Ile351Ser / p.Gly361Asp MET p.Asn879Lysfs*23 PIK3CA p.Asp258Tyr	NF1 p.Ala1716Gly	-	-
18	CPNM (adenocarcinoma)	-	-	-	-	-	-	-
19	CPNM (carcinoma pobremente diferenciado)	-	-	-	FBXW7 p.Asp119Tyr TP53 p.Val1157Phe	-	-	-
20	CPNM (adenocarcinoma)	-	-	-	STK11 p.Cys132Arg	-	-	-
21	Adenocarcinoma ductal	III-A	ATM p.Arg2993* olaparib	NCT03611868, NCT03742895	ATM p.Arg2993* KRAS p.Gly12Arg	-	-	-
		IV-A	KRAS p.Gly12Arg cobimetinib, binimetinib, trametinib	NCT04348045, NCT04117087, NCT03948763	POLE p.Gln508Ala509delinsHisSer RET p.Val53Leu / p.Gln70Leu / p.Arg417Leu SMO p.Gly65Cys TP53 p.Arg158Leu	-	-	-
23	CPCP	-	-	-	-	-	-	-
24	CPNM (adenocarcinoma)	I-A	EGFR p.Glu746_Ser752delinsVal afatinib, dacomitinib, erlotinib, erlotinib + ramucirumab, gefitinib, osimertinib	NA	EGFR p.Glu746_Ser752delinsVal	-	-	-
26	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	III-A	PTEN p.Glu352* everolimus, temsirolimus	NCT04774952	ERBB4 p.Thr371Asn FGFR2 c.377-1G>A GNAS p.Pro22Thr PTEN p.Glu352* ROSI p.His1210Leu TP53 p.Asp184Gluufs*63	-	-	-
27	Carcinoma de célula de transición de alto grado de vejiga	III-A	ARID1A p.Gln2100* berzosertib	NCT04953104	ARID1A p.Gln2100* CDKN1A p.Pro12Hisfs*19 CDKN2B p.Asp110Asn JAK3 p.Asp671Asn PALB2 p.Glu3* TP53 p.His179A>G	-	-	-
		III-A	PALB2 p.Glu3* olaparib	NCT04171700	-	-	-	-

Paciente #	Tumor	ESCAT tier	Tratamiento		Ensayos clínicos	Biomarcadores de seguimiento		Otros tipos de accionabilidad	
			BT	BL		BT	BL	BT	BL
28	Adenocarcinoma de colon	IV-A / resistencia	KRAS p.Gly12Val cobimetinib, binimetinib, trametinib / anticuerpos anti-EGFR (resistencia)	-	NCT04117087, NCT03948763	KRAS p.Gly12Val TP53 p.Lys292Glyfs*52	PTPN11 p.Val428Met	KRAS p.Gly12Val PRONÓSTICO	-
29	CPNM (carcinoma pobremente diferenciado)	IV-A	KRAS p.Gly12Asp cobimetinib, binimetinib, trametinib	-	NCT03170206, NCT04735068, NCT03948763	GNAS p.Asp46Glu KRAS p.Gly12Asp MPL p.Leu234Val PRKCH p.Asp232Gly PTEN p.Asp107Val TP53 p.Arg249Ser TSC2 p.Val586Leu ERBB4 p.Gly1272Leu FANCA p.Arg751Trp GATA3 p.Arg312Glyfs*44 KDR p.Ile724Met KRAS p.Gly12Asp MAP2K2 p.Val1283Glu MEI1 p.Leu920Pro PDGFRA p.Val1084Met PIK3CB p.Ile428Phe TP53 p.Arg249Trp ATR p.Asn973Ser KRAS p.Gly12Val MTOR p.Asp2102Val PTCH1 p.Arg606Met RAD51C p.Leu61Val RICTOR p.Arg1670Trp / p.Pro1397Ser TP53 p.Gln317*		KRAS p.Gly12Asp PRONÓSTICO	-
30	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	IV-A	KRAS p.Gly12Asp cobimetinib, binimetinib, trametinib	-	NCT03170206, NCT04735068, NCT03948763				
31	CPNM (adenocarcinoma)	IV-A	KRAS p.Gly12Val cobimetinib, binimetinib, trametinib		NCT03170206, NCT04735068, NCT03948763		KRAS p.Gly12Val	KRAS p.Gly12Val PRONÓSTICO	
32	CPNM (adenocarcinoma)	III-A	PIK3CA p.Glu545Lys alpelisib + fulvestrant	-	NCT04073680, NCT0477495	ERBB4 p.Arg103His KDR p.Gly95Arg MITF p.Arg197_Ala198del PIK3CA p.Glu545Lys PTCH1 p.Val1137Leu TP53 p.Leu32Valfs*10	MET 1392+1G-A	-	-
33	Carcinoma de célula escamosa de faringe	-	-	-	-	ATR p.Ser1843Phe TP53 p.Pro190Leu TP53 p.Glu294*	-	-	-
34	Adenocarcinoma de colon	III-A	NFI p.Leu1246Cysfs*20 selumetinib, trametinib	-	NCT02465060	FLT3 p.Gln338* KRAS p.Ala146Val NFI p.Leu1246Cysfs*20 TP53 p.Arg175His			
		IV-A / resistencia	KRAS p.Gly12Val cobimetinib, binimetinib, trametinib / anticuerpos anti-EGFR (resistencia)	-	NCT04117087, NCT03948763				
35	CPNM (adenocarcinoma)	-	-	-	-	ALK p.Glu657Gln ARID1A p.Pro526Ser FLT3 p.Val106Phe IDH1 p.Gly310Val IDH2 p.Met293Ile INPP4B p.Gly146Arg JAK1 p.Ile928Met JAK3 p.Asp1025His MTOR p.Pro574Ser NF2 p.Glu442Gln POLE p.Phe695Ile TP53 p.Arg273Leu	TP53 p.Arg273Leu	-	-

Paciente #	Tumor	Tratamiento		Ensayos clínicos	Biomarcadores de seguimiento		Otros tipos de accionabilidad						
		ESCAT tier	BT		BL	BT	BL	BT	BL				
36	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	III-A	PALB2 p.Gly881Valfs*8 olaparib	-	NCT04171700	KIT p.Arg161Met PALB2 p.Gly881Valfs*8 PIK3CA p.Glu542Lys TP53 p.Arg156Profs*15	-	-	-				
		III-A	PIK3CA p.Glu542Lys alpelisib + fulvestrant	-	NCT04073680, NCT04774952	MET p.Gly872Valfs*4	-	-	-				
37	CPNM (adenocarcinoma)	-	-	-	-	IGF1R p.Asp654Val TP53 p.Asn131Lysfs*42	-	-	-				
38	Adenocarcinoma de colon	III-A	ATM p.Tyr2019Cys olaparib (otros tumores)	-	NCT03742895	ATM p.Tyr2019Cys KDR p.Ser971Arg KRAS p.Gly12Val	-	-	-				
		IV-A	KRAS p.Gly12Val cobimetinib, binimetinib, trametinib	-	NCT03170206, NCT04735068, NCT03948763	PIK3R1 p.Arg574Ile SMO p.Leu426Pro TP53 p.Gly154Val AR p.Met788Leu ATM p.Leu546Val CCND3 p.Glu253Asp ERBB2 p.Ala1216Asp ERBB3 p.Arg488Gln IGF1R p.Gly1330Ser IGF2 p.Arg128Lys KDR p.Cys482Arg KRAS p.Gly12Asp MAP2K1 p.Gly301Arg TP53 p.Arg267Ttp / p.Arg248Gln	-	-	KRAS p.Gly12Val PRONÓSTICO				
40	Adenocarcinoma de colon	IV-A	KRAS p.Gly12Asp cobimetinib, binimetinib, trametinib / anticuerpos anti-EGFR (resistencia)	-	NCT04117087, NCT03948763	AR p.Met788Leu ATM p.Leu546Val CCND3 p.Glu253Asp ERBB2 p.Ala1216Asp ERBB3 p.Arg488Gln IGF1R p.Gly1330Ser IGF2 p.Arg128Lys KDR p.Cys482Arg KRAS p.Gly12Asp MAP2K1 p.Gly301Arg TP53 p.Arg267Ttp / p.Arg248Gln	-	-	-	KRAS p.Gly12Asp PRONÓSTICO			
		III-A	NF1 c.6641+1G>C selumetinib, trametinib	-	NCT02465060	BRAF p.Asn581Ile BRCA2 p.His2537Leu ERBB4 p.Gly727Ala FGFR4 p.His727Gln NF1 c.6641+1G>C NF1 p.Leu1095Phe POLE c.3583-2A>T TP53 c.375+1G>T	-	-	-	-	EGFR p.Gln276His		
41	CPNM (adenocarcinoma)	III-A	POLE c.3583-2A>T pembrolizumab, nivolumab	-	NCT02715284	BRAF p.Val600Glu BRCA2 p.Ala2951Thr MPL p.Arg592Gln TP53 p.Ile232del	-	-	-	-	-	-	
		I-A	BRAF p.Val600Glu encorafenib + cetuximab	-	NA	BRAF p.Val600Glu BRCA2 p.Ala2951Thr MPL p.Arg592Gln TP53 p.Ile232del	-	-	-	BRAF p.Val600Glu PRONÓSTICO	-	-	
42	Adenocarcinoma de colon	I-A	BRAF p.Val600Glu encorafenib + cetuximab	-	NA	BRAF p.Val600Glu BRCA2 p.Ala2951Thr MPL p.Arg592Gln TP53 p.Ile232del	-	-	-	-	-	-	
		III-A	NF1 p.Arg262Valfs*19 selumetinib, trametinib	-	NCT02465060	ALK p.Gly939Ser ARID1A p.Ala1136Ser ERBB2 p.Ala21Gly ERBB4 p.Glu547Asp GNAS p.Arg201Cys NF1 p.Arg262Valfs*19 TP53 p.Ser315Leufs*30	-	-	-	-	-	ERBB2 p.Ala21Gly TP53 p.Ser315Leufs*30	
43	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	III-A	BRAF p.Val600Glu vemurafenib, dabrafenib, trametinib, dabrafenib + trametinib, vemurafenib + cobimetinib, encorafenib + binimetinib	-	NA	BRAF p.Val600Glu BRCA2 p.Arg286Lys	-	-	-	-	-	-	BRAF p.Val600Glu PRONÓSTICO
44	Melanoma	I-A	BRAF p.Val600Glu vemurafenib, dabrafenib, trametinib, dabrafenib + trametinib, vemurafenib + cobimetinib, encorafenib + binimetinib	-	NA	BRAF p.Val600Glu BRCA2 p.Arg286Lys	-	-	-	-	-	-	BRAF p.Val600Glu PRONÓSTICO
45	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	IV-A	KRAS p.Gln61Leu cobimetinib, binimetinib, trametinib	-	NCT03170206, NCT04735068	ALK p.Tyr1092* ERBB4 p.His470Asp GNAS p.Ser532Alafs*158 GNAS p.Ala548Pro KDR p.Tyr418His KRAS p.Gln61Leu TP53 p.Gln192*	-	-	-	-	-	-	-

Paciente #	Tumor	ESCAT tier	Tratamiento		Ensayos clínicos	Biomarcadores de seguimiento		Otros tipos de accionabilidad	
			BT	BL		BT	BL	BT	BL
46	Glioblastoma de alto grado	III-A	EGFR ampl. N>25 / p.Pro596Leu afatinib, dacomitinib, erlotinib, erlotinib + ramucicrumab, gefitinib, osimertinib	-	NCT04933422, NCT03618667	EGFR p.Pro596Leu INPP4B p.Ile83Met MIF p.Arg13* PTCH1 p.Tyr373* STAG2 p.Arg604* TSC1 p.Pro196Arg	-	-	-
		IV-A	PTCH1 p.Tyr373* vismodegib, sonidegib	-	-	-	-	-	-
		IV-A	STAG2 p.Arg604* olaparib, veliparib, rucaparib	-	-	-	-	-	-
48	CPCP	-	-	-	-	TP53 p.Leu145Gln TSC2 p.Asp1403Glu	TP53 p.Leu145Gln	MUTYH p.Gly396Asp (germinal) ASESORAMIENTO GENÉTICO	-
49	CPNM (adenocarcinoma)	III-A	POLE c.1686+1G>A pembrolizumab, nivolumab	-	NCT02715284	KRAS p.Gly12Val POLE c.1686+1G>A SH2B3 p.Asp241Asn STK11 c.374+1A>G TP53 c.375+1G>A	KRAS p.Gly12Val TP53 c.375+1G>A	-	-
		III-A	STK11 c.374+1A>G everolimus (otros tumores)	-	NCT04173507	-	-	-	-
		IV-A	KRAS p.Gly12Val cobimetinib, binimetinib, trametinib	-	NCT03170206	-	-	-	-
50	CPCP	III-A	sorafenib, ponatinib, nilotinib, dasatinib, regorafenib ripretinib, avapritinib	-	NCT04771520	KIT p.Asp816Val / p.Asp820Val TP53 p.Cys135Arg MITOR p.His1819Asn	KIT p.Asp816Val / p.Asp820Val TP53 p.Cys135Arg MITOR p.His1819Asn GNAS p.Arg547His	-	-

Los pacientes #11, #22, #25 y #47 no se incluyen al no haberse podido completar ambos estudios somáticos. ampl: amplificación; BL: Biopsia de Tejido; ESCAT tier: categoría en la escala de accionabilidad clínica de dianas moleculares de ESMO; CPCP: Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas; CPNM: Cáncer de Pulmón No Microcítico; SNC: Sistema Nervioso Central.

Globalmente, la estrategia CGP proporcionó potenciales opciones para la mejora del manejo del paciente en un 73,9 % de los casos (34/46), facilitando el acceso a terapias personalizadas, ensayos clínicos guiados por biomarcadores y/o procesos de asesoramiento genético para los pacientes y sus familias, además del descubrimiento de potenciales biomarcadores de seguimiento en el 100 % de los pacientes. *Figura 21A*

La mayoría de las variantes terapéuticamente accionables fueron detectadas en la biopsia de tejido, que permitió identificar potenciales terapias dirigidas en el 71,7 % de los pacientes (33/46 pacientes), mientras que en la biopsia líquida se identificaron alteraciones asociadas a terapias dirigidas en el 13,0 % (6/46). Curiosamente, a pesar de la baja carga tumoral, la biopsia líquida proporcionó opciones terapéuticas en un paciente con un CPCP en el cual la biopsia de tejido no relevó variantes accionables. Las variantes asociadas a terapias fueron categorizadas según la escala ESCAT de ESMO. [190] Únicamente se detectaron variantes clasificadas como *tier-I* o variantes asociadas a resistencia a terapias estandarizadas en la biopsia de tejido, en un 10,9 % y un 8,7 % de pacientes, respectivamente. Las variantes *tier-I* son aquellas que se asocian con respuesta a un determinado fármaco aprobado para el tipo de tumor del paciente, por lo que serían las opciones terapéuticas de acceso más inmediato. En esta cohorte se identificaron alteraciones oncogénicas en *EGFR* de respuesta a TKIs anti-EGFR en 2 casos de CPNM, la variante *KRAS* p.Gly12Cys asociada a respuesta al inhibidor de KRAS sotorasib (único fármaco para esta indicación, aprobado por la EMA en 2022) en otro CPNM, y la variante *BRAF* p.Val600Glu en un paciente con adenocarcinoma de colon, asociada a respuesta a la combinación encorafenib + cetuximab, y en otro paciente con melanoma, asociada a respuesta a inhibidores de BRAF e inhibidores de MEK en monoterapia y en varias combinaciones de los mismos. En segundo lugar, 4 pacientes con adenocarcinoma de colon presentaron variantes en *KRAS* asociadas a resistencia a anticuerpos anti-EGFR, terapia aprobada y ampliamente utilizada para este tipo de cáncer. En tercer lugar, en la biopsia de tejido se identificaron variantes *tier-III* en un 43,5 % de los pacientes (20/46) y en la biopsia líquida en un 8,7 % (4/46); el acceso a estas terapias requiere una autorización personalizada, accesible en caso de agotar otras opciones de tratamiento estándar o a través de uso compasivo. Por último, se identificaron alteraciones *tier-IV* en el 32,6 % de los pacientes (15/46) en la biopsia de

tejido, dos de ellas también en la biopsia líquida (4,3 %). 12 pacientes no presentaron variantes terapéuticamente accionables. *Figura 21B*

Se identificaron alteraciones contempladas como criterios de inclusión de ensayos clínicos en marcha para los que los pacientes eran elegibles en el 63,0 % de los casos, siendo mayor la proporción en la biopsia de tejido (58,7 % *versus* 13,0 %).

Asimismo, en la biopsia de tejido se detectaron variantes asociadas con el pronóstico en el 23,9 % de los pacientes (11/46), mientras que solamente una de dichas alteraciones se detectó en la biopsia líquida.

Por otro lado, todas las variantes asociadas con predisposición al desarrollo de cáncer identificadas en línea germinal se detectaron en la biopsia de tejido, mientras que solo 1 se identificó en la biopsia líquida, puesto que el resto de genes no estaban incluidos en el diseño del panel empleado. La variante germinal en *BRCA1*, detectada en ambas biopsias de la paciente #10 y que presenta a su vez potenciales implicaciones terapéuticas, se asignó a *tier-III* puesto que se asocia a respuesta a inhibidores de PARP aprobados para el tratamiento de otros tipos de tumor distintos al de la paciente.

Por último, se identificaron un total de 210 variantes somáticas en una o ambas biopsias potencialmente elegibles como biomarcadores de seguimiento de la enfermedad mediante biopsia líquida: por su parte, la secuenciación de la biopsia de tejido permitió detectar potenciales biomarcadores en el 100 % de los pacientes, mientras que la de biopsia líquida facilitó biomarcadores en el 37,0 % (17/46 pacientes).

SELECCIÓN DE BIOMARCADORES PARA BIOPSIA LÍQUIDA

De las variantes identificadas mediante CGP de la *Tabla 11* se seleccionaron una serie de biomarcadores para realizar un seguimiento longitudinal en ctDNA, basándose en los siguientes criterios de priorización: 1) variantes identificadas por el panel de biopsia líquida, 2) variantes identificadas por ambos paneles (biopsia de tejido y líquida) y 3) variantes identificadas por el panel de biopsia de tejido priorizando: mayor AF, variantes oncogénicas frente a VUS y en región cubierta por ambos paneles.

De acuerdo a dichos criterios, se seleccionó un total de 109 variantes de 45 pacientes (1-5 variantes por caso): 76 variantes (69,7%) afectaban a regiones cubiertas por ambos paneles y 33 (30,3%) eran solo detectables con el panel de biopsia de tejido. De las 76 variantes cubiertas por ambos paneles, 16 (21,1 %) fueron en efecto detectadas en ambas biopsias, 51 (67,1%) solo se detectaron en la biopsia de tejido y las 9 variantes restantes (11,8%) únicamente en la biopsia líquida. En cuanto a su relevancia clínica: 82 (75,2%) eran variantes oncogénicas o probablemente oncogénicas y 27 (24,8%) fueron VUS, probablemente benignas o benignas; en el 97.8 % de los pacientes (44/45) se monitorizó al menos 1 variante oncogénica o probablemente oncogénica.

LA BIOPSIA LÍQUIDA EN RT

El esquema de recogida de biopsias líquidas fue completo en 44 de los 50 pacientes de la cohorte. En 6 pacientes no se recogió biopsia líquida en algunos puntos del tratamiento principalmente por motivos logísticos, por ejemplo, por la dificultad de coger una vía al paciente. Las muestras post-sesión de RT se tomaron en una horquilla de 15-60 minutos una vez finalizada cada sesión de tratamiento; en el 72,0 % de los pacientes (36/50) las biopsias líquidas se recogieron a los 30 minutos; en el 16,0 % (8/50 pacientes) a los 60 minutos, y en un 8,0 % (4/50 pacientes) a los 15 minutos. Para comparar el impacto de dichos intervalos de tiempo tras el tratamiento en el contenido de cfDNA/ctDNA de las muestras, 4 pacientes fueron sometidos a múltiples extracciones post-sesión (15, 30, 45 y 60 minutos). (En el *APÉNDICE 5* se incluyen todos los puntos del tratamiento y el seguimiento en los que se recogió una biopsia líquida).

Se completó al menos un seguimiento de 4 meses en 40 de los 50 pacientes (80,0 %). En 6 pacientes solo se dispuso de 1 muestra de seguimiento recogida al mes de finalizar el tratamiento (3 abandonos y 3 fallecimientos); asimismo, en 4 pacientes no se dispuso de ninguna biopsia líquida de seguimiento (3 abandonos y 1 fallecimiento). El principal motivo de abandono del estudio fue la dificultad para el desplazamiento hasta el centro de toma de muestras o molestias asociadas a la extracción de sangre periférica.

Para abordar el estudio de la utilidad de la biopsia líquida para monitorizar la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo, se evaluaron 3 momentos clave: antes de iniciar el tratamiento con RT, el periodo de tiempo en el que se administra el tratamiento y el seguimiento durante los meses siguientes. Este trabajo se centró en dos variables cuantificables en la biopsia líquida: la [cfDNA] total y la presencia de alteraciones en ctDNA. Por un lado, se realizó una cuantificación de la [cfDNA] total en todas las biopsias líquidas (los valores obtenidos se incluyen en el *APÉNDICE 5*) y, por otro lado, se realizó el estudio dirigido de los 109 biomarcadores personalizados en ctDNA mediante PCR y secuenciación NGS profunda.

Se detectó señal de ctDNA en al menos una de las biopsias líquidas recogidas durante el tratamiento analizadas mediante el ensayo de dirigido con RT en 31 de los 45 pacientes ensayados (68,9 %), a partir de aquí se denominarán “pacientes con tumores liberadores de ctDNA”. Cabe destacar que un 60,0 % de los pacientes del grupo E1 y un 58,8 % de los pacientes OMT fueron liberadores de ctDNA, porcentajes inferiores al observado en los pacientes del grupo OMT+, de un 92,3 %. En 14 pacientes (31,1 %) no se registró señal de ctDNA, por lo que fueron categorizados como “pacientes con tumores no liberadores de ctDNA”. En el *APÉNDICE 10* se incluyen las gráficas de la dinámica de la señal de ctDNA de todos los pacientes analizados. A continuación, se presentan los principales hallazgos en cuanto a [cfDNA] total y señal de ctDNA.

Estudio de los cambios en la [cfDNA] en los tratamientos con RT

Para conocer en qué medida los cambios observados en la [cfDNA] total en sangre periférica en los pacientes de la cohorte se podrían atribuir a la enfermedad y al efecto de la RT y no a fluctuaciones normales o propias de la toma de muestras o del procesamiento de las mismas, se estudió el cambio en la [cfDNA] en biopsias líquidas recogidas a un grupo control de individuos sanos, emulando la toma de muestras de los pacientes sometidos a RT. En la *Figura 22* se muestran los cambios registrados en los individuos control, donde se puede observar que la [cfDNA] sigue una tendencia bastante estable (con varianzas entre 0,22 y 1,42 ng/mL para cada individuo).

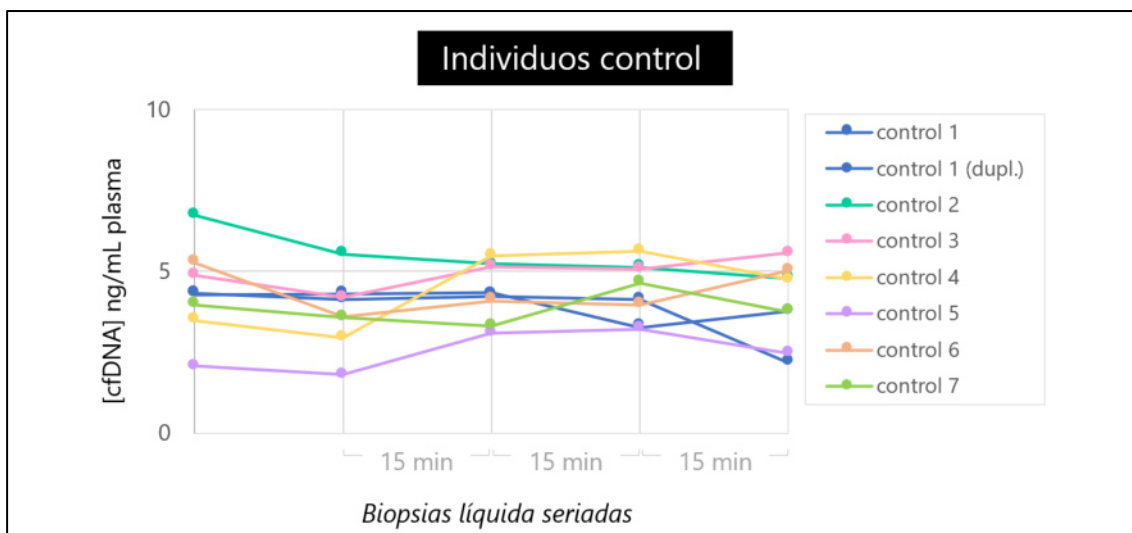


Figura 22. Cambios en la [cfDNA] en individuos control. El primer valor se correspondería con el equivalente a la biopsia líquida pre-sesión en los pacientes tratados; tras 45 min se tomó la siguiente biopsia líquida (tiempo estimado entre extracción pre-sesión y extracción 15 min post-sesión en los pacientes); posteriormente, se tomaron biopsias líquidas separadas intervalos de 15 min, emulando las extracciones post-sesión a los 15, 30, 45 y 60 min realizadas a los pacientes.

[cfDNA] antes de empezar el tratamiento con radioterapia

El valor basal de la [cfDNA] (antes de iniciar el tratamiento con RT) se obtuvo en 48 casos. La [cfDNA] basal de los pacientes ($10,9 \pm 7,2$ ng/mL) fue significativamente mayor que en los controles ($4,4 \pm 1,5$ ng/mL) (valor $p = 0,0035$, prueba U de Mann–Whitney). No obstante, en esta cohorte la [cfDNA] basal no mostró correlación con el estadio clínico ni con el grupo clínico (valor $p > 0,05$, prueba U de Mann–Whitney), ni con el tamaño de la lesión tumoral o la actividad metabólica medida como valor máximo de captación estándar (*Maximum Standardized Uptake Value, SUV_{max}*) en la prueba 18F-FDG PET/TC (valor $p > 0,05$, coeficiente de correlación de Pearson), como se observó en otros trabajos en pacientes de mayor carga tumoral. [204]

[cfDNA] durante el tratamiento con radioterapia

En términos globales, atendiendo a la dinámica de la [cfDNA] durante el tratamiento, no se observó una tendencia general en respuesta a la radiación, ni hubo patrones reconocibles en pacientes sometidos a tratamientos equivalentes.

En cuanto al punto del tratamiento con mayor [cfDNA] y considerando los 44 tratamientos de HFRT en los que se completó el esquema de recogida de biopsias líquidas planteado (extracciones antes y después de cada sesión), no se registró una tendencia ni una agregación de casos coincidentes en el pico de [cfDNA]. Restringiendo este análisis a los datos pre-sesión, potencialmente capaces de capturar el efecto de la radiación sobre la [cfDNA] a las 24, 48 o 72 h (en función de lo espaciadas que estuvieran las sesiones), se pudo apreciar que más de la mitad de los pacientes sometidos presentaban como valor máximo de [cfDNA] pre-sesión un punto del primer tercio del tratamiento (antes de administrarse un tercio de la radiación total prescrita), mientras que en más de un tercio de los pacientes el pico se registró antes de iniciar el tratamiento.

De cara a evaluar el efecto de la radiación en la [cfDNA] a muy corto plazo, durante los primeros 60 minutos tras la administración de cada sesión de tratamiento, 4 pacientes fueron sometidos a biopsias líquidas múltiples tras las sesiones de RT (experimento "multiextracción", en los pacientes #22, #29, #30 y #41, *Figura 23*). La varianza de los datos de [cfDNA] tras cada sesión es mucho mayor que la que se observa en el grupo control (media de las varianzas 18,8 ng/mL *versus* 0,55 ng/mL), por lo que parece que la radiación sí genera cambios en la [cfDNA] en los primeros 60 minutos post-sesión, sin embargo, no hay un patrón que se repita en los casos analizados (*Figura 22*, *Figura 23*). Las biopsias líquidas realizadas en los tiempos seleccionados no fueron capaces de capturar un momento post-sesión en el que se observe un pico en la [cfDNA] en respuesta a la radiación. De la misma manera, más allá del experimento de multiextracción, en el resto de caso no fue posible extraer patrones reproducibles.

El cambio en la [cfDNA] de las biopsias líquidas recogidas antes de la primera y de la segunda fracción del tratamiento podría ser un reflejo del efecto de la radiación a menos corto plazo, entre las 24-72 h (en función de lo espaciadas que estuvieran dichas sesiones de RT), cuando el tumor no lleva acumulada radiación, pero tampoco se observó ninguna tendencia en los datos disponibles. A modo de ejemplo, en la *Figura 24* se incluye el cambio en la [cfDNA] en un subconjunto más homogéneo de 7 pacientes del grupo E1 con cáncer de pulmón sometidos a SBRT fraccionada en 5 sesiones y que mostraron una buena respuesta al tratamiento. Pese a la homogeneidad clínica de este subconjunto de pacientes, no se observa comportamiento similar entre ellos.

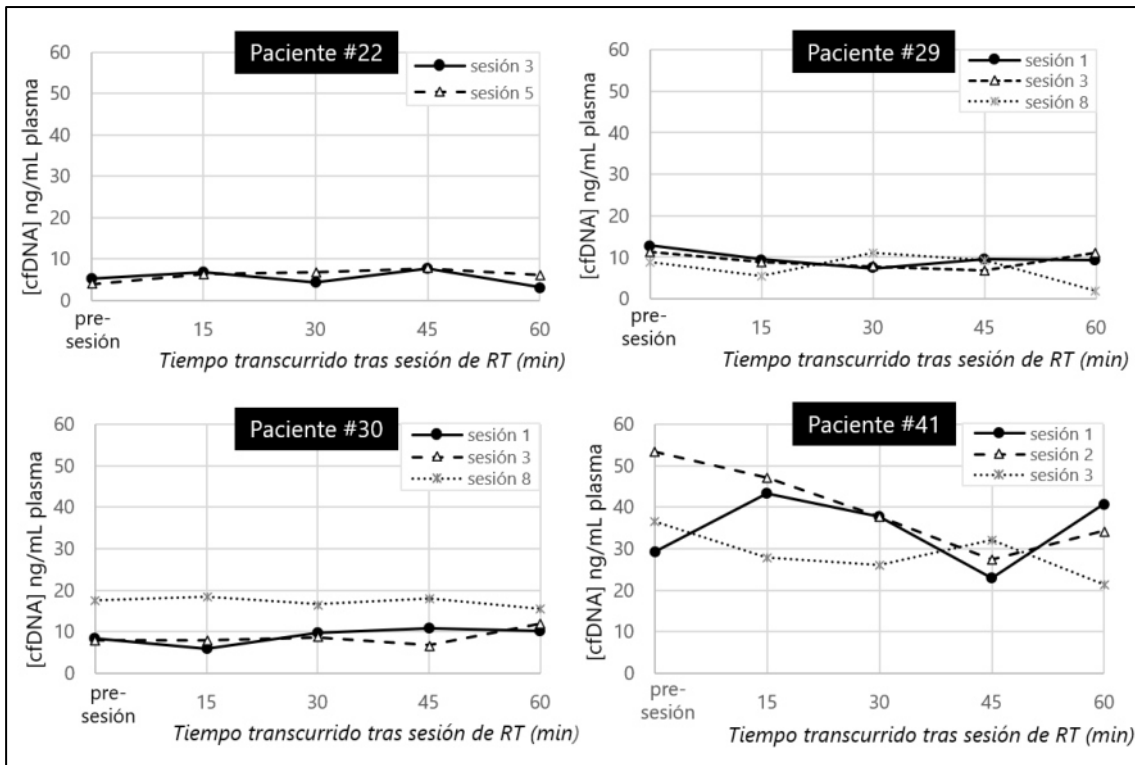


Figura 23. Cambios en la [cfDNA] en pacientes sometidos a extracciones múltiples post-sesión de RT. Se muestran los cambios en la [cfDNA] en múltiples biopsias líquidas recogidas tras las sesiones de RT, separadas en intervalos de 15 minutos, en 4 pacientes. Se observó una amplia variabilidad en la tendencia global tanto entre muestras de diferentes individuos como entre las muestras de diferentes sesiones de RT del mismo individuo.

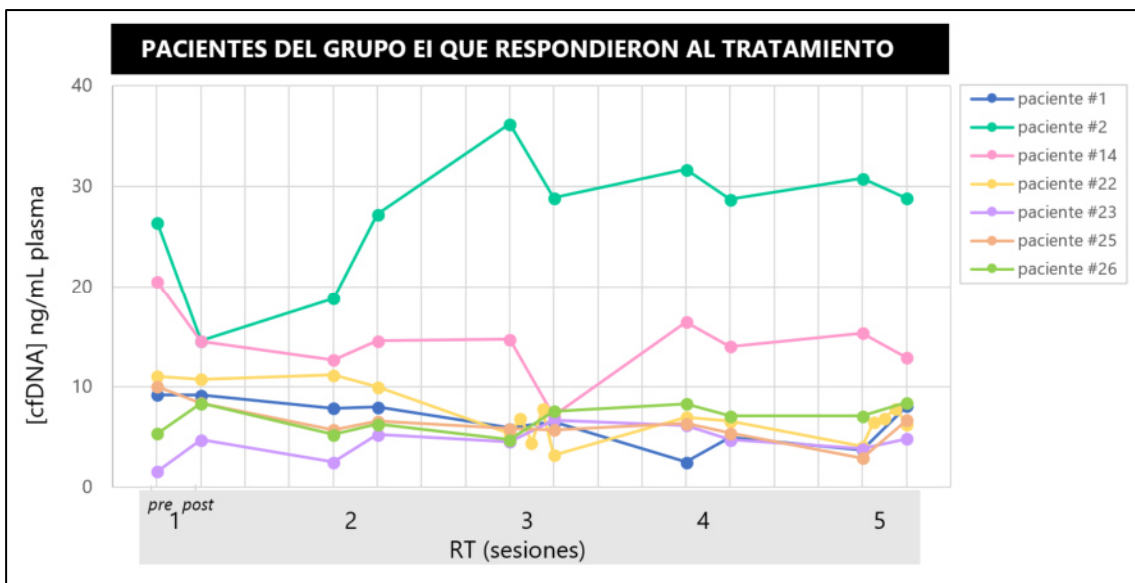


Figura 24. Cambios en la [cfDNA] en las biopsias líquidas pre-sesión y post-sesión de RT en pacientes del grupo E1 que respondieron al tratamiento. Se muestra la gráfica de los cambios observados en la [cfDNA] en 7 pacientes del grupo clínico E1, todos ellos con cáncer de pulmón, sometidos a tratamiento con RT fraccionado en 5 sesiones y los cuáles mostraron una buena respuesta clínica tras el tratamiento.

[cfDNA] después del tratamiento con radioterapia

La [cfDNA] registrada en las biopsias líquidas recogidas durante el seguimiento post-tratamiento no guardó relación con el estado clínico de los pacientes. Los valores registrados se mantuvieron en torno a los valores pre-tratamiento. Específicamente, no hubo diferencias significativas entre las medias de [cfDNA] basal y a 1 mes post-tratamiento (valor $p > 0,05$, test T Student de muestras emparejadas).

Estudio de los cambios en el ctDNA en los tratamientos con RT

Como alternativa al estudio de la [cfDNA] total, se evaluó la relación entre la señal de ctDNA, el estado clínico de los pacientes y su respuesta al tratamiento, un biomarcador más específico del tumor. Los siguientes apartados se enfocan en el estudio de la señal basal de ctDNA en los 31 casos "liberadores de ctDNA" (aquellos en los que se detecta ctDNA en al menos un punto del estudio). La técnica desarrollada para evaluar la presencia de señal de ctDNA en plasma se basa en el empleo de PCR dirigidas de las regiones genómicas de los biomarcadores seleccionados en cada paciente, seguida de secuenciación NGS profunda de los amplicones obtenidos. Antes de aplicar la técnica, se definió su sensibilidad y especificidad para la detección de alteraciones de distintas FA.

Cálculo de la sensibilidad y la especificidad de la técnica de PCR + NGS

Los valores de sensibilidad y especificidad del método se calcularon mediante el análisis de controles positivos de ctDNA y se presentan en la *Tabla 12*, para los valores de FAO $\geq 0,1$ % y Q ≥ 25 %, valores umbral definidos en el apartado de metodología.

Tabla 12. Sensibilidad y especificidad del método de PCR dirigida + NGS profunda.

	VP	FN	Sensibilidad	FP	Posiciones analizadas	Especificidad
AF $\geq 0,1$ %	97	25	79,5 %	252	3989	93,7 %
AF $\geq 0,2$ %	89	10	89,9 %			
AF $\geq 0,3$ %	80	4	95,2 %			
AF $\geq 0,5$ %	71	3	95,9 %			

AF: frecuencia alélica; FN: falso negativo; FP: falso positivo; VP: verdadero positivo.

Señal de ctDNA antes del tratamiento con radioterapia

En el 51,6 % de los casos (16/31 pacientes) se registraron niveles positivos de ctDNA antes de iniciar el tratamiento con RT (ctDNA basal positivo). La proporción de pacientes con señal basal positiva fue diferente en los grupos clínicos: 30,0 % (3/10) de los pacientes del grupo EI, 50,0 % (5/10) de los pacientes OMT y 72,7 % (8/11) de los OMT+, aunque esta diferencia no fue significativa. A su vez, se observó que los pacientes con señal basal positiva tendían a tener lesiones de mayor tamaño que los de señal negativa, sin alcanzarse significación estadística (valor $p > 0.05$, test U de Mann–Whitney). Tampoco se observó diferencia en la [cfDNA] basal entre los pacientes con señal basal de ctDNA positiva y aquéllos de señal negativa (valor $p > 0.05$, test U de Mann–Whitney). Se analizó la relación entre la señal basal de ctDNA y la SLP como indicador de respuesta al tratamiento según los criterios RECIST, empleando el estimador de Kaplan-Meier. La SLP fue significativamente mayor en pacientes con señal basal de ctDNA negativa que en aquellos con señal positiva (*Figura 25*). Esto indica que la señal basal de ctDNA es un buen biomarcador con valor pronóstico para esta cohorte.

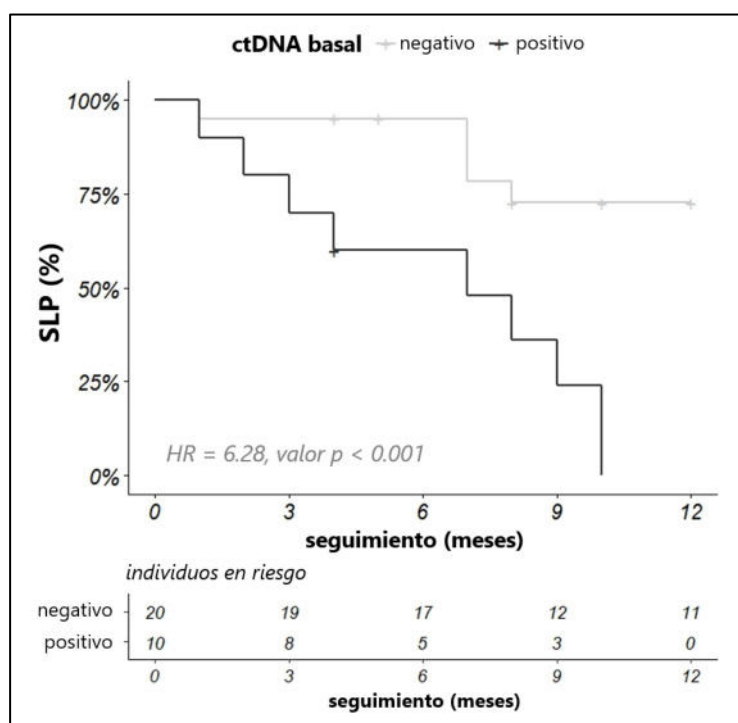


Figura 25. Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión (SLP) tras la RT según la señal basal de ctDNA. La significación estadística (valor p) y el cociente de riesgo (Hazard Ratio, HR) se calcularon empleando el modelo de regresión de riesgos proporcionales (o regresión de Cox). Bajo la gráfica se muestra la tabla de "individuos en riesgo" en cada punto. Los individuos censurados en la curva se muestran con una cruz.

Atendiendo a la SLP desglosada por grupo clínico, se observó que los pacientes del grupo OMT+ progresaban antes que los pacientes de los grupos EI y OMT, en concordancia con el hecho de que tienen focos de enfermedad fuera de la región sometida a tratamiento, por tanto, peor pronóstico teórico (Figura 26A).

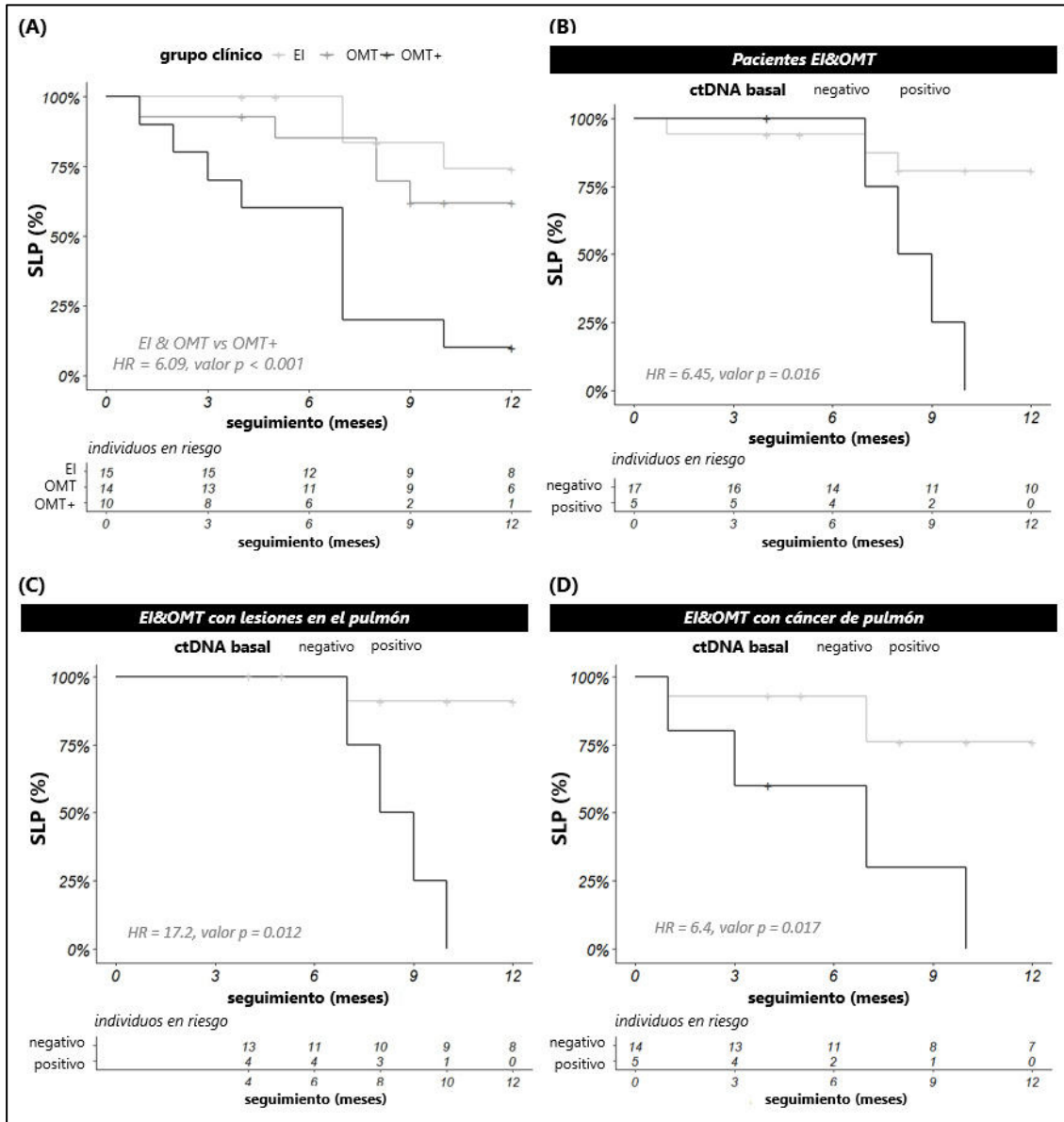


Figura 26. Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión (SLP) tras la RT para distintos subgrupos de la cohorte. (A) SLP de todos los pacientes en función de su grupo clínico (EI, OMT, OMT+). (B) SLP de los pacientes EI y OMT en función de la señal basal de ctDNA. (C) SLP de los pacientes EI y OMT tratados de una lesión localizada en el pulmón en función de la señal basal de ctDNA. (D) SLP de los pacientes EI y OMT con cáncer pulmón en función de la señal basal de ctDNA. La significación estadística (valor p) y el cociente de riesgo (Hazard Ratio, HR) se calcularon empleando el modelo de regresión de riesgos proporcionales (o regresión de Cox). Debajo de la gráfica se muestra la tabla de individuos a riesgo en cada punto. Los individuos censurados en la curva se muestran con una cruz.

El peor pronóstico del grupo OMT+ concuerda con el predominio de niveles basales positivos de ctDNA. Para que esto no produjese un sesgo en el análisis de supervivencia, se evaluó la relación entre el ctDNA basal y la SLP en los otros dos grupos clínicos. Del mismo modo que para la cohorte completa, la señal basal de ctDNA funcionó como biomarcador pronóstico en el caso de los pacientes de los grupos EI y OMT, pese a tratarse de un tamaño muestral reducido (N=22), lo cual limita la significación estadística (*Figura 26B*). A su vez, la señal de ctDNA basal también correlaciona con la SLP tanto en los pacientes tratados de lesiones en el pulmón como en aquellos con primarios de pulmón independientemente de la región tratada (*Figuras 26C, 26D*).

La biopsia líquida durante el tratamiento con radioterapia

Pese a que en este trabajo se recogió un elevado número de biopsias líquidas durante el tratamiento a diferentes tiempos, al igual que sucedió con los datos de la [cfDNA], no fue posible identificar patrones recurrentes en los cambios en la señal de ctDNA durante el tratamiento, antes y después de las sesiones.

En primer lugar, se compararon los perfiles de ctDNA de pacientes con enfermedad similar y con tratamientos equivalentes, sin poder identificarse picos comunes en la liberación de ctDNA.

Con el fin de eliminar la variabilidad inter-paciente, en segundo lugar, se atendió al comportamiento de la señal de ctDNA en cada paciente individual. Se analizaron pacientes en los que se había realizado el seguimiento simultáneo de varios biomarcadores y se observó que las FA para cada biomarcador no siguieron un patrón común a lo largo del tratamiento. En la *Figura 27A* se incluye el caso del paciente #4, en el que se observa que cada uno de los 3 biomarcadores monitorizados presentó un perfil de señal diferente (este comportamiento no uniforme entre biomarcadores se registró también en el caso de los pacientes #32, #35 o #36, entre otros, *APÉNDICE 10*).

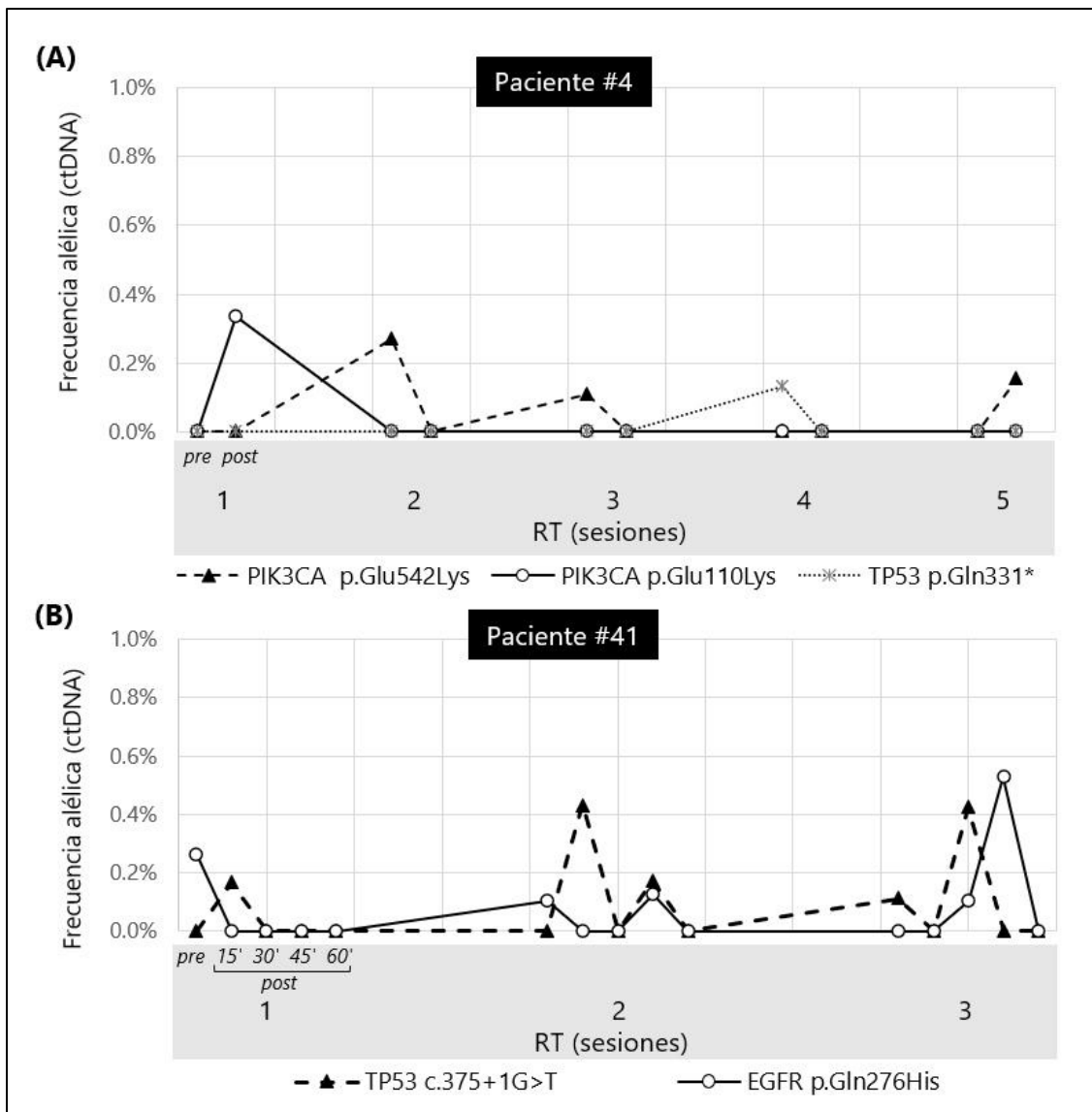


Figura 27. Cambios en la señal de ctDNA durante el tratamiento con RT. (A) Ejemplo del caso del paciente #4, con un primario de pulmón tratado con SBRT en 5 sesiones (grupo EI), en el que se monitorizaron 3 variantes en ctDNA que muestran un comportamiento diferente en las biopsias líquidas recogidas antes de cada sesión (pre) y 30 minutos tras la finalización de ésta (post). (B) Ejemplo del caso del paciente #41, tratado con SRS en 3 sesiones de una metástasis cerebral de un primario de pulmón, en el que se monitorizaron 2 variantes en ctDNA en biopsias líquida múltiples post-sesión (a los 15, 30, 45 y 60 minutos tras la sesión). No se observó un patrón consistente en la señal de ambas variantes en ctDNA.

En tercer lugar, solo 2 de los 4 pacientes incluidos en el experimento de multiextracción post-sesión eran “liberadores de ctDNA” (pacientes #29 y #41) y, por un lado, del mismo modo que la [cfDNA] no siguió dinámicas similares tras las distintas sesiones, tampoco se detectó ningún patrón en la señal de ctDNA post-sesión a los diferentes tiempos de extracción. Por otro lado, considerando concretamente el caso del paciente #41 en el que se realizó seguimiento de dos variantes en ctDNA, tampoco se

observó un comportamiento consistente entre sendos biomarcadores en las biopsias líquidas extraídas a diferentes tiempos post-sesión (*Figura 27B*).

Este comportamiento distinto entre variantes del mismo tumor puede deberse a la heterogeneidad espacial de las lesiones tratadas, pudiendo ser cada una representativa de regiones que responden de manera distinta al tratamiento y a la liberación de ctDNA. Por otra parte, también podría deberse a que las FA de las variantes están relativamente cerca de límite de detección de la técnica, por lo que, en algunos puntos, un valor negativo podría corresponderse con un positivo no detectado (FN). Cabe profundizar en el caso del paciente #41, perteneciente al grupo OMT+ y tratado mediante SRS de una lesión metastásica en el SNC derivada de un primario de pulmón que no había sido tratado; el paciente recibió la RT sobre la lesión metastásica aún con el primario puesto. Para su seguimiento en ctDNA, se seleccionaron 2 biomarcadores: una variante en *TP53*, detectada únicamente en la biopsia de tejido (del primario) y una variante en *EGFR*, detectada únicamente mediante el panel de biopsia líquida. El hecho de que no fueran variantes detectadas por ambos paneles podría sugerir que se trate de alteraciones que representasen clones diferentes, por lo que un comportamiento diferencial sería esperable.

En resumen, por lo que se refiere a la dinámica del ctDNA durante el tratamiento con RT, se pueden destacar tres observaciones principales: no se detectó un paralelismo en el comportamiento de los biomarcadores a lo largo del tratamiento entre diferentes pacientes (variabilidad "interpaciente"), tampoco se observó consistencia entre los biomarcadores analizados simultáneamente en un mismo paciente (variabilidad "intrapaciente") y, en el experimento de multiextracción, no se registró concordancia en la señal de dos biomarcadores analizados simultáneamente en un mismo paciente en las biopsias líquida recogidas tras la misma sesión de RT (variabilidad "intra-sesión").

La biopsia líquida después del tratamiento con radioterapia

De los 31 pacientes con tumores “liberadores de ctDNA”, fue posible recopilar información clínica completa y concluyente en 25 casos, en los que se evaluó la relación entre la señal de los biomarcadores de ctDNA y el estado clínico. En 23 de los 25 casos (92,0 %), la señal de ctDNA en el seguimiento mostró concordancia con los datos clínicos, tanto en casos de progresión, como en casos de respuesta al tratamiento. *Figura 28*

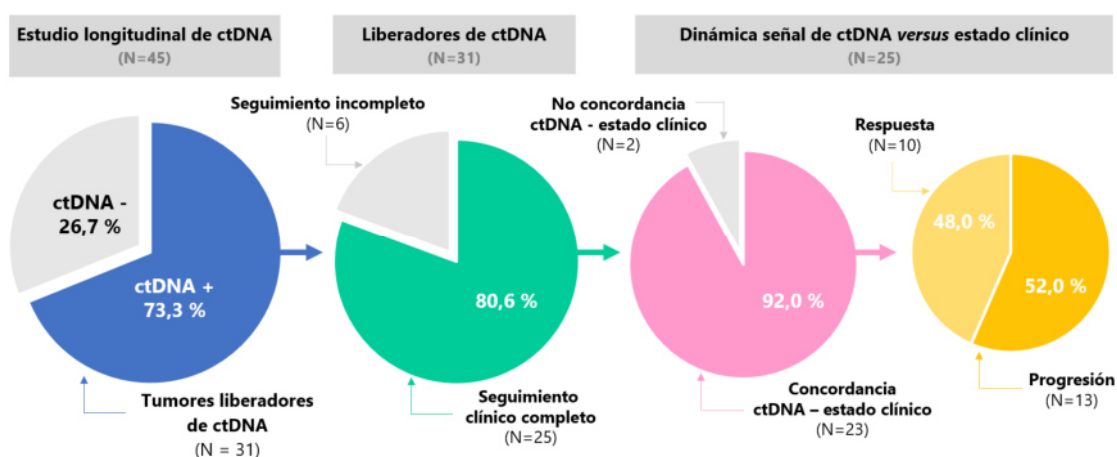


Figura 28. Casos en los que se realizó el estudio longitudinal del ctDNA. De los 45 pacientes analizados, 31 se consideraron portadores de tumores liberadores de ctDNA, al detectarse señal positiva de ctDNA en al menos alguna biopsia líquida del tratamiento. Se obtuvo información clínica completa en 25/31 casos, y en 23 de estos (92,0 %) se consideró que los cambios en la señal de ctDNA eran concordantes con las observaciones clínicas, tanto en casos de progresión de la enfermedad como de respuesta al tratamiento. En 6 pacientes el seguimiento fue incompleto, ya sea por abandono o por no poder establecerse un diagnóstico objetivo, por resultados no concluyentes.

Entre los 13 casos de progresión tras el tratamiento, cabe destacar que en 5 de ellos (38,5 %) la recaída fue detectada por la biopsia líquida con anterioridad a la detección por las pruebas de imagen, con una antelación media de 6,3 meses (pacientes #23, #28, #32, #33 and #48 en APÉNDICE 10).

Presentación de casos clínicos de estudio longitudinal de ctDNA

A continuación, se presentan varios casos clínicos en los que se realizó el estudio longitudinal de ctDNA que ilustran diversos escenarios; en el APÉNDICE 10 se incluyen las gráficas de todos los pacientes analizados.

LA BIOPSIA LÍQUIDA SE ANTICIPA A LA PRUEBA DE IMAGEN

En primer lugar, se describen 3 casos clínicos en los que la biopsia líquida se anticipa a las pruebas de imagen en la detección de recaída. *Figuras 29-31*

Paciente #23: varón de 68 años que recibió un tratamiento de SBRT con dosis total de 50 Gy en 5 fracciones sobre un CPCP primario de 9 cc, grupo E1. Mediante el panel de biopsia líquida no se detectaron variantes tumorales, por lo que se realizó el seguimiento en ctDNA de 3 variantes de la biopsia de tejido. Tras una buena respuesta inicial, de acuerdo a las pruebas de imagen y a niveles indetectables de ctDNA, las variantes monitorizadas empezaron a dar señal a los 10 meses de seguimiento, mientras que las pruebas de imagen no fueron concluyentes hasta los 18-19 meses. En este caso, se considera que la biopsia líquida se adelantó 8 meses en la detección de la recaída con respecto a las pruebas de imagen. *Figura 29.*

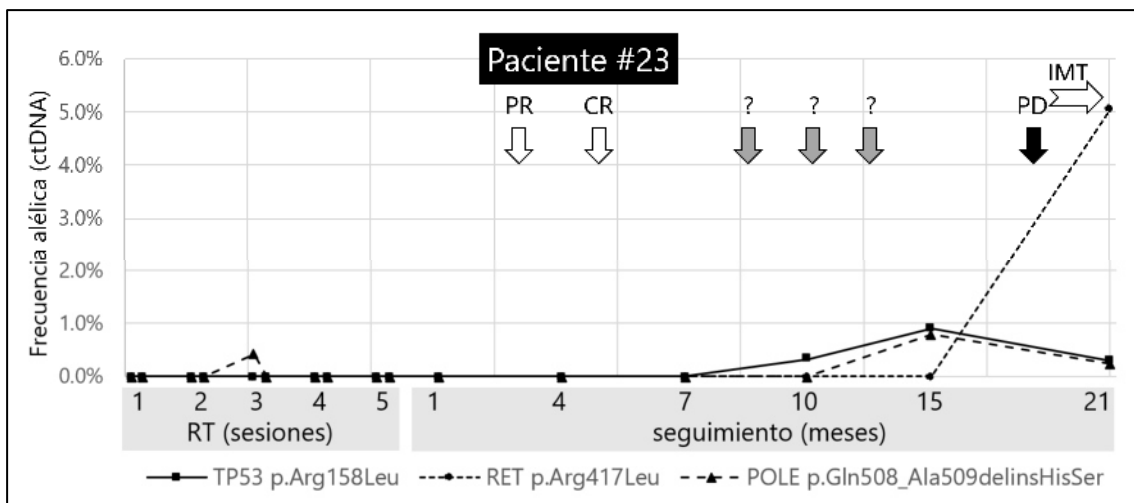


Figura 29. Estudio longitudinal de ctDNA en el paciente #23. Paciente del grupo E1 sometido a SBRT sobre un Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas (CPCP) primario. Se monitorizaron 3 variantes detectadas en la biopsia de tejido, en los genes TP53, RET y POLE. Durante el tratamiento, apenas se registró señal en ctDNA, compatible con el pequeño tamaño de la lesión. Tampoco se detectó en las biopsias líquidas a los 1, 4 y 7 meses tras la RT, en concordancia con las pruebas de imagen que indicaban en primer lugar respuesta parcial (PR) y posteriormente respuesta completa (CR) a los 5 meses. Los estudios de imagen a los 8 y 13 meses fueron no concluyentes: con cambios tisulares post-RT y algunas lesiones de probable etiología inflamatoria o ligero aumento de actividad metabólica (un nódulo fue biopsiado, descartándose malignidad). Las variantes en TP53 y POLE se detectaron en ctDNA a los 10 y 15 meses, mientras que la progresión se confirmó por imagen a los 18 meses, tras lo cual el paciente inició tratamiento con inmunoterapia (IMT). Curiosamente, al mes de iniciar la IMT, la señal de las variantes en TP53 y POLE en ctDNA decayó a FA de 0.2-0.3 %, mientras que la variante en RET, hasta entonces ausente en las biopsias líquidas, alcanza una FA en torno al 5 %. El seguimiento mediante biopsia líquida finalizó y no se dispone de más información sobre la dinámica que siguieron las variantes en ctDNA durante la IMT, aunque se podría especular acerca de que la variante en RET proviniese de un clon que estuviera escapando de la IMT.

Paciente #32: varón de 79 años sometido a un tratamiento de SBRT con dosis total de 60 Gy en 8 fracciones sobre un adenocarcinoma de pulmón de 28 cc y perteneciente al grupo OMT+ al presentar enfermedad oligometastásica en los ganglios linfáticos mediastínicos. Se realizó el seguimiento en ctDNA de dos variantes: una detectada en el panel de la biopsia de tejido y otra en el panel de biopsia líquida. Las variantes se comportaron de manera distinta en ctDNA, resultando aparentemente más informativa la que procedía del estudio genómico del tumor. Las pruebas de imagen tras el tratamiento indicaron PR a los 4 meses, compatible con la señal residual en ctDNA. Pese a que la señal en biopsia líquida fue aumentando, las pruebas de imagen siguieron indicando PR/resultado no concluyente. La progresión tumoral a nivel pulmonar se confirmó finalmente por imagen con 8 meses de retraso con respecto a la biopsia líquida.

Figura 30.

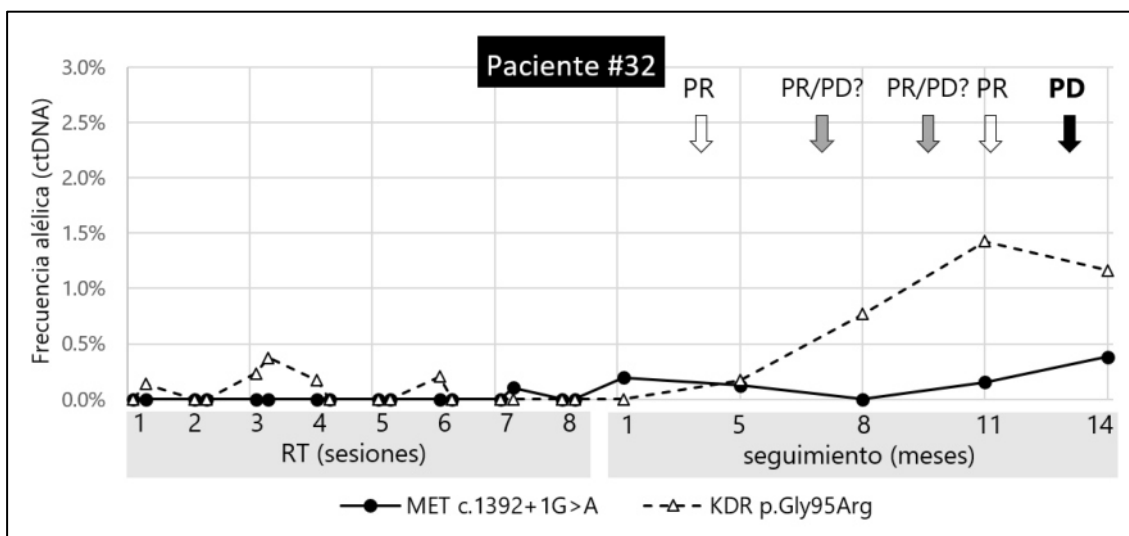


Figura 30. Estudio longitudinal de ctDNA en el paciente #32. Paciente del grupo OMT+ tratado con SBRT sobre un adenocarcinoma de pulmón, y con enfermedad oligometastásica en los ganglios linfáticos mediastínicos fuera de la región tratada. Se realizó el seguimiento de 1 variante en MET, detectada en la biopsia líquida, y 1 variante en KDR, detectada en la biopsia de tejido. La variante en MET se mantiene indetectable durante prácticamente todo el tratamiento y la variante en KDR muestra señal no uniforme. Tras la RT aparece señal de la variante en MET en ctDNA y, posteriormente, va apareciendo señal de la variante en KDR que va aumentando. Las pruebas de imagen indican respuesta parcial a los 4 meses, compatible con señal residual en ctDNA y, a medida que la señal en biopsia líquida va aumentando, las pruebas siguen indicando respuesta parcial o resultado no concluyente, de nuevo debido a cambios en el tejido que impiden una buena interpretación de las imágenes. La progresión se confirma a los 13 meses, con un retraso de 8 meses respecto a la biopsia líquida. En este caso fue mejor biomarcador la variante detectada en la biopsia tumoral, se desconoce si la variante en MET pudiera provenir de las lesiones mediastínicas (no biopsiadas) y no tratadas con RT.

Paciente #33: varón de 52 años que recibió un tratamiento de SBRT con una dosis total de 60 Gy en 8 fracciones sobre dos lesiones pulmonares oligometastásicas de un carcinoma de célula escamosa de faringe, de 7 y 4 cc, respectivamente. Paciente del grupo clínico OMT, sin otros focos de enfermedad fuera del área tratado. Mediante el panel genómico de biopsia líquida no se detectó ninguna variante tumoral, por lo que se realizó el seguimiento de 2 variantes detectadas en la biopsia de tejido. Durante el tratamiento con RT, ambas variantes se detectaron en varios puntos durante la primera mitad del tratamiento y, tras mantenerse negativas en la biopsia líquida al mes de finalizar el tratamiento, ambas aumentaron progresivamente a los 4 y 7 meses. En paralelo, las pruebas de imagen indicaban PR y un nuevo posible foco de enfermedad a nivel renal, aunque dudoso. La progresión tumoral se confirmó a los 10 meses, por lo que se puede considerar que la biopsia líquida se anticipó 7 meses a las pruebas de imagen. *Figura 31.*

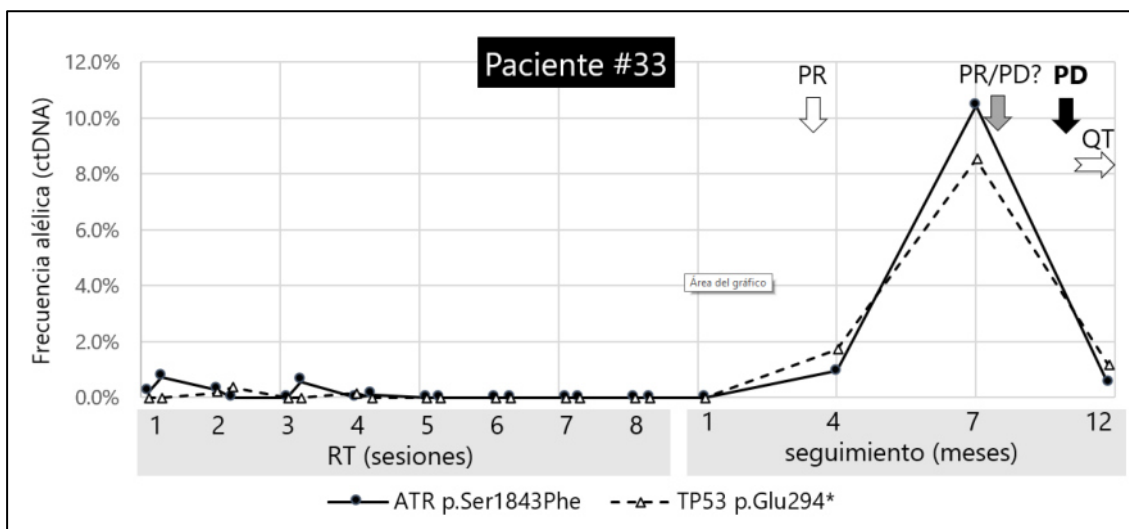


Figura 31. Estudio longitudinal de ctDNA en el paciente #33. Paciente del grupo OMT tratado mediante SBRT sobre 2 lesiones pulmonares oligometastásicas de 7 y 4 cc, de un carcinoma de célula escamosa de faringe. Se realizó el seguimiento de 1 variante en TP53 y 1 en MET, ambas detectada en la biopsia tejido. Ambas variantes se detectan durante la primera mitad del tratamiento con FA inferiores al 1,0 %, se negativizaron a lo largo del avance del tratamiento con RT y en la biopsia líquida tomada al mes de finalizar el mismo. Posteriormente, la señal en ctDNA de ambas aumentó en las biopsias líquida recogidas a los 4 y 7 meses, hasta FA de alrededor del 10.0 %, mientras, las pruebas de imagen indican respuesta parcial (PR) y resultados no concluyentes que sugieren progresión (PD?). La PD se confirma a los 10 meses y el paciente inicia tratamiento con quimioterapia (QT), viéndose reducida la carga de ctDNA en la biopsia líquida posterior.

RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Como ejemplo de un estudio de seguimiento en el que mediante biopsia líquida se obtuvieron resultados concordantes con las pruebas de imagen en las que se objetivaba buena respuesta al tratamiento, se muestra el caso del **paciente #31**. Se trata de un varón de 76 años sometido a un tratamiento con SBRT con una dosis total de 60 Gy en 8 fracciones sobre un adenocarcinoma primario de pulmón de 17 cc, grupo clínico EI. La señal de ctDNA de los biomarcadores analizados desapareció tras el tratamiento hasta el final del seguimiento (13 meses), en concordancia con las pruebas de imagen, que indicaban PR. *Figura 32A*. Otros ejemplos de casos con un comportamiento similar: pacientes #1, #2, #29, #31, #35, #36, #44 y #50 en *APÉNDICE 10*.

ENFERMEDAD ESTABLE

Un patrón diferente se observa en el **paciente #36**: varón de 50 años sometido a un tratamiento con SBRT con una dosis total de 54 Gy en 3 fracciones sobre un carcinoma de célula escamosa primario de pulmón de 6 cc, grupo clínico EI. Los biomarcadores de ctDNA fueron indetectables en la biopsia líquida antes de iniciar la RT, y tras registrarse valores positivos de ctDNA durante el tratamiento se negativizaron de nuevo en el seguimiento posterior, en concordancia con el diagnóstico de SD en pruebas de imagen. En este caso la radiación aumentó los niveles de ctDNA en sangre, que volvieron a ser indetectables una vez finalizado el tratamiento, aunque no ha habido CR o PR, el tumor no está creciendo, no hay progresión, lo que concuerda con que la señal de ctDNA permanezca estable y negativa como antes de empezar el tratamiento. *Figura 32B*.

DESINCRONIZACIÓN DE PRUEBAS DE SEGUIMIENTO

Cabe destacar también el caso de la **paciente #17**: mujer de 69 años del grupo OMT con 5 pequeñas lesiones oligometastásicas en el pulmón, con volúmenes ente 0.7-2 cc, derivadas de un adenocarcinoma de colon y tratadas con SBRT con una dosis total de 55 Gy en 5 sesiones. A 9 meses de finalizar la RT se registró PD en las pruebas de imagen por la aparición de dos nuevos nódulos, mientras que la biopsia líquida no fue capaz de capturar la recaída, manteniéndose una señal de ctDNA negativa. La biopsia líquida inmediatamente anterior (4 meses) presentaba un desfase temporal de 5 meses

con respecto a la prueba de imagen, y se especular que dicha desincronización podría ser responsable de la ausencia de correlación. La biopsia líquida posterior (12 meses) fue recogida cuando la paciente ya había iniciado el tratamiento con QT, por lo que la ausencia de señal de ctDNA podría ser indicativo de buena respuesta a dicho tratamiento. Se pueden plantear posibles hipótesis para explicar la ausencia de señal el ctDNA en la biopsia líquida previa a la recidiva clínica, como la delección del alelo portador de la alteración monitorizada o que la progresión sea producida por un clon diferente que no porta dichas alteraciones. *Figura 32C*. Este caso recalca la importancia de la sincronización de las pruebas de seguimiento a fin de comparar su rendimiento y poder evaluar correctamente la utilidad clínica, eliminando la variable del desfase temporal y poder atender a las variables clínicas y biológicas. Otros ejemplos de casos con un comportamiento similar: pacientes #4 y #20, en *APÉNDICE 10*.

NO CONCORDANCIA ENTRE BIOPSIA LÍQUIDA Y ESTADO CLÍNICO

Por último, se expone un caso clínico en el que la biopsia líquida no fue un buen biomarcador de seguimiento de la enfermedad, el del **paciente #14**: varón de 81 años sometido a un tratamiento con SBRT con dosis total de 55 Gy en 5 sesiones sobre un carcinoma de célula escamosa de pulmón primario de 15 cc, grupo clínico EI. Las pruebas de imagen revelaron SD (3-4 meses) y posterior PD (10-11 meses); pese a que durante el tratamiento se registraron niveles detectables de ctDNA, alejados del límite de detección, incluso en el momento basal y a disponer de biopsias líquidas prácticamente sincronizadas con las pruebas PET/TC, no se detectó señal de ctDNA, por lo que se considera que la biopsia líquida falló en la detección de la recaída. Se desconoce la causa y se especula que la PD podría haberse producido a partir de nuevos clones resistentes portadores de nuevas alteraciones genéticas no detectadas anteriormente. *Figura 32D*.

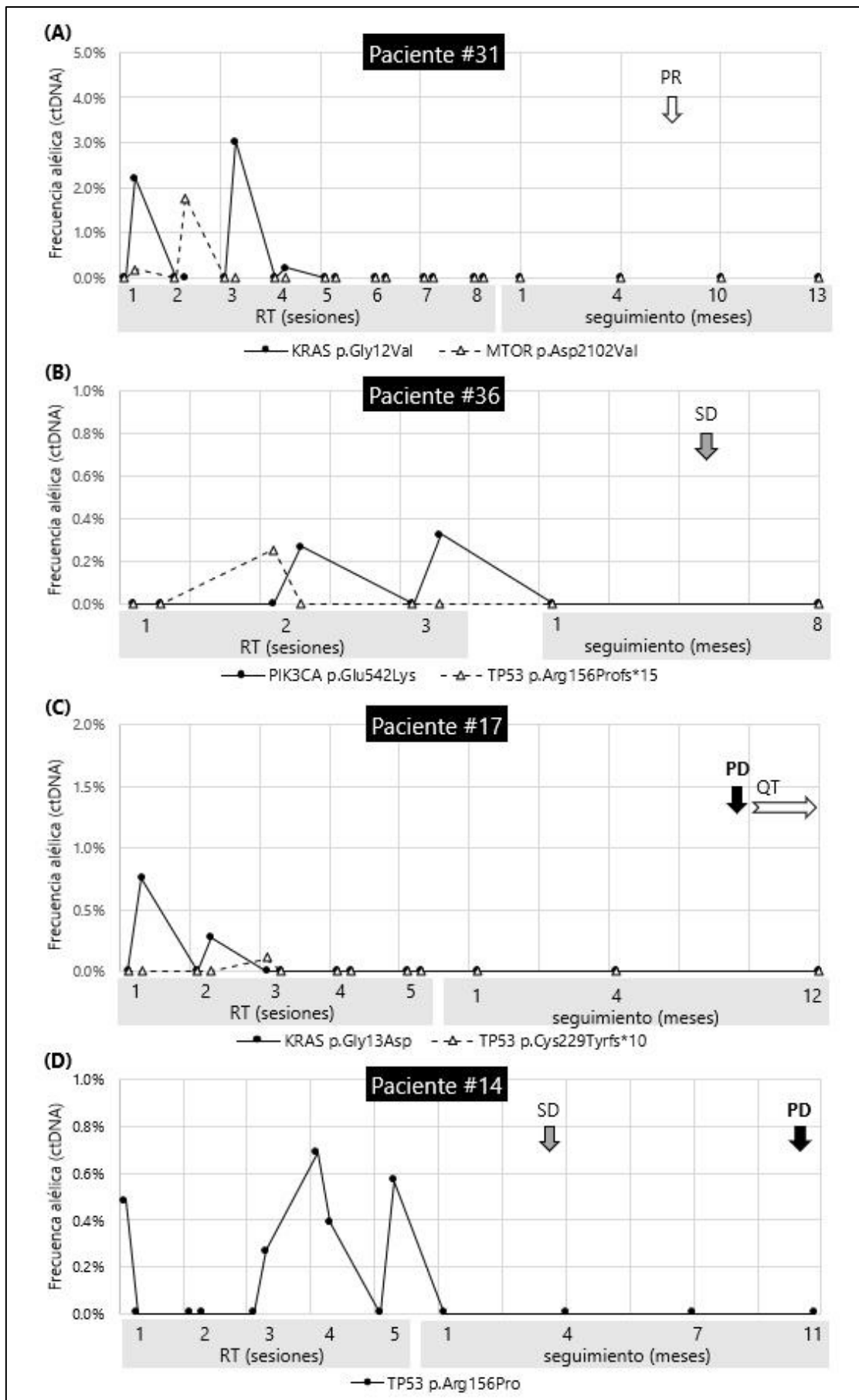


Figura 32. Ejemplos de estudio longitudinal de ctDNA y relación con el estado clínico.

(A) Estudio longitudinal de ctDNA en el paciente #31: SBRT en 8 sesiones sobre un adenocarcinoma primario de pulmón (grupo EI). Se realizó el seguimiento en ctDNA de una variante en el gen KRAS, identificada en ambas biopsias, y una variante en MTOR únicamente detectada en la biopsia de tejido, con menor frecuencia alélica. Tras las primeras sesiones de RT se registró un aumento de la señal de ctDNA que desapareció en la segunda mitad del tratamiento. Posteriormente, los biomarcadores permanecieron indetectables hasta el final del seguimiento a los 13 meses, en concordancia con las pruebas de imagen que indicaron PR sin indicios de progresión.

(B) Estudio longitudinal de ctDNA en el paciente #36: SBRT en 3 sesiones sobre un carcinoma de célula escamosa de pulmón primario (grupo EI). Se realizó el seguimiento en ctDNA de dos variantes identificadas en la biopsia de tejido, en los genes TP53 y PIK3CA. Antes de iniciar la RT ambos biomarcadores eran indetectables, registrándose algo de señal durante el tratamiento para volver a negativizarse en las biopsias líquidas recogidas durante el seguimiento. Por su parte, se realizó una prueba de imagen a los 5 meses en la que se pudo observar que no hubo respuesta significativa, ni enfermedad progresiva, por lo que se consideró SD. En este caso, el ctDNA no resulta muy informativo como biomarcador, pero concuerda con lo registrado en las pruebas de imagen.

(C) Estudio longitudinal de ctDNA en la paciente #17: SBRT en 5 sesiones de 5 pequeñas lesiones oligometastásicas en el pulmón derivadas de un adenocarcinoma de colon. Se realizó el seguimiento en ctDNA de dos variantes identificadas en la biopsia de tejido, en los genes KRAS y TP53. Tras las primeras sesiones de RT se registró un aumento de la señal de ctDNA que desapareció en la segunda mitad del tratamiento, posteriormente los biomarcadores permanecieron indetectables hasta el final del seguimiento a los 12 meses. A los 9 meses de finalizar el tratamiento con RT aparecieron 2 nuevos nódulos y la paciente comenzó tratamiento citostático. No se dispone de una biopsia líquida coincidente en el tiempo con el PET/TC, y la biopsia líquida inmediatamente anterior (4 meses) tiene un desfase temporal de 5 meses. La biopsia líquida posterior (12 meses) fue recogida cuando la paciente ya había iniciado el tratamiento con QT, por lo que la ausencia de señal de ctDNA podría ser indicativo de buena respuesta a dicho tratamiento.

(D) Estudio longitudinal de ctDNA en el paciente #14: varón de 81 años tratado de un carcinoma de célula escamosa de pulmón primario, de 15 cc. Se realizó el seguimiento en ctDNA de una variante en el gen TP53 detectada en los estudios genómicos de ambas biopsias. Antes de iniciar la RT la señal basal de ctDNA fue positiva, al igual que en diversos puntos durante el tratamiento. La biopsia líquida recogida al mes de finalizar el tratamiento fue negativa y así se mantuvo durante el posterior seguimiento de 11 meses. En contraposición a esto, a los 3-4 meses la prueba de imagen reveló SD, y posterior PD a los 10-11 meses; pese a disponer de biopsias líquidas prácticamente sincronizadas con estos PET/TC, están no mostraron resultados concordantes y fallaron en la detección de la recaída. QT: quimioterapia; PD: enfermedad en progresión; PR: respuesta parcial; SD: enfermedad estable.

DISCUSIÓN

En la práctica clínica de la Oncología, los estudios genómicos (incluyendo aquellos basados en la biopsia líquida) se han utilizado de manera más exhaustiva en pacientes con estadios avanzados, a menudo refractarios a los tratamientos convencionales, con el objetivo de seleccionar un fármaco dirigido bien a través de ensayos clínicos bien de uso compasivo. No obstante, el mal pronóstico y la corta esperanza de vida que caracterizan a los pacientes en estadios avanzados reducen las posibilidades de acceder a las terapias dirigidas. Además, en ese punto de la enfermedad, al enfocarse los esfuerzos en encontrar un tratamiento de manera urgente, quedan relegados a un segundo plano los múltiples beneficios adicionales de los estudios genómicos exhaustivos, como la prevención derivada del asesoramiento genético o el seguimiento de la enfermedad empleando biomarcadores genómicos.

En paralelo, muchos pacientes con cáncer en estadio inicial u oligometastásico reciben tratamientos con RT de alta precisión, no siendo candidatos a cirugía. Aunque los avances en este campo han mejorado mucho la eficacia y reducido la toxicidad de los tratamientos, persiste la necesidad de estratificar a los pacientes y adaptar la intensidad del tratamiento, así como diseñar protocolos de seguimiento más personalizados. El descubrimiento de nuevos biomarcadores es crucial para este fin, siendo la genómica un prometedor aliado.

En la presente tesis doctoral se interrogó el potencial de los estudios genómicos somáticos y germinales, incluyendo la biopsia líquida, en la práctica clínica de la Oncología Radioterápica y, más específicamente, en pacientes con baja carga tumoral. Para ello se exploró una cohorte de pacientes con cáncer en estadios tempranos u oligometastásicos, potencialmente curables y no operables, que recibieron un tratamiento con RT. Este grupo de pacientes, además de estar menos estudiados a nivel molecular que los pacientes con estadios avanzados y alta carga tumoral, cuentan con una ventana temporal más amplia para beneficiarse de la utilidad clínica de la genómica. Globalmente, los resultados muestran que, efectivamente, en pacientes con cáncer tratados con RT, la utilidad de los estudios genómicos va más allá de las terapias dirigidas, pudiendo contribuir a adaptar el tratamiento estándar, mejorar el seguimiento, prevenir segundos primarios, realizar un diagnóstico precoz de tumores sincrónicos desconocidos y facilitar los procedimientos de asesoramiento genético familiar.

Análisis genómico integrativo y exhaustivo

Uno de los aspectos más interesantes de este trabajo es la aplicación de un análisis genómico integrativo (multiplataforma) y exhaustivo (multigénico).

En primer lugar, el abordaje integrativo multiplataforma establecido, basado en la secuenciación genómica de tres tipos de muestra diferentes: biopsia de tejido tumoral, biopsia líquida recogida al inicio del tratamiento y muestra germinal, permitió combinar los resultados obtenidos, enriqueciendo la interpretación de los hallazgos de cada estudio individual. Al emplearse muestras de naturaleza distinta, la combinación de las distintas plataformas ayudó a maximizar la accionabilidad de los diferentes hallazgos genómicos.

Este enfoque integral evidenció que los hallazgos germinales no solo tienen valor por sí mismos, sino también lo tienen como herramienta complementaria a los hallazgos de los test somáticos. Así, la información de la línea germinal permitió determinar que más de dos tercios de las variantes detectadas en la biopsia de tejido y alrededor de un tercio de las variantes identificadas por el test de biopsia líquida eran variantes germinales (información fundamental para caracterizar el tumor), mientras que otro tercio de las variantes de biopsia líquida derivaban potencialmente de la HC. El fenómeno de la HC, caracterizado por la presencia de variantes somáticas hematopoyéticas en ADN libre circulante, es muy frecuente en personas de edad avanzada y en pacientes con cáncer y ha de ser tenido en cuenta cuando se aplica la biopsia líquida. Por ejemplo, dos pacientes presentaron una alteración patogénica en *JAK2* asociada a CHIP y su estudio longitudinal en las biopsias durante el seguimiento mostró que la FA en cfDNA se mostraba constante, sin sobrepasar el umbral definido como patológico. [141] De haber sido inferida como una variante somática procedente de los tumores sólidos de estos pacientes, habría fallado como biomarcador de la enfermedad en ambos. En cambio, su identificación en el ADN genómico de las células sanguíneas, con una FA similar a la observada en el cfDNA, permite descartarlas como biomarcadores tumorales y clasificarlas como potenciales variantes de HC (potenciales, por no haberse confirmado su presencia en una biopsia de la médula ósea). La proporción de variantes identificadas en biopsia líquida que derivan de HC en nuestra cohorte va en la línea de lo descrito en

la literatura, en torno al 50 % en pacientes con cáncer en estadio inicial, y llegando hasta un 90 % en individuos sanos. [205]

Más allá de los beneficios de la secuenciación genómica integrativa que combina secuenciación germinal y tumoral, en este estudio se pudo establecer una comparación entre los dos estudios somáticos empleados y valorar las ventajas e inconvenientes de cada uno. El panel basado en biopsia de tejido mostró mejores resultados en términos de accionabilidad terapéutica, identificando alteraciones asociadas a terapias dirigidas en 33 pacientes, en comparación con 6 pacientes por el panel de biopsia líquida. Esto puede explicarse, en primer lugar, por el simple hecho de que el panel de biopsia de tejido es más extenso e incluye el estudio de más genes que el panel de biopsia líquida. En segundo lugar, por la falta de variantes de ctDNA detectadas mediante el panel de biopsia líquida en más de la mitad de los pacientes, seguramente condicionada por su baja carga tumoral. Sin embargo, la proporción del total de variantes detectadas que son terapéuticamente accionables fue ligeramente superior para el panel de biopsia líquida (28,6 % frente a 23,6 %). Del mismo modo, el panel de biopsia tisular identificó variantes que potencialmente servirían como biomarcadores de seguimiento en todos los pacientes, mientras que el panel de biopsia líquida sólo lo hizo en un tercio. Por último, apoyando la idea de que la biopsia líquida proporciona información en tiempo real de la enfermedad, el 88,0 % de las variantes identificadas por el panel de biopsia líquida que se utilizaron como biomarcadores se detectaron en el estudio longitudinal del ctDNA mediante el método de PCR dirigida + NGS, en comparación con el 67,4 % de las variantes identificadas en la biopsia tisular empleadas con el mismo fin.

En la literatura se pueden encontrar valores de concordancia entre biopsia de tejido y biopsia líquida que oscilan entre 48-82 %, para estadios avanzados de diferentes tipos de tumor y del 0-54 %, para estadios iniciales. [150, 152, 155, 206] Un trabajo recientemente publicado muestra una concordancia en torno al 80 % al diagnóstico inicial que decrece hasta un 40 % en el momento de la progresión tras la primera línea de tratamiento, ilustrando la evolución clonal que experimenta un cáncer y que se refleja en su paisaje mutacional. [207] En el presente trabajo se alcanzaron valores perceptiblemente inferiores, de una concordancia global en torno al 15 %; esta discordancia puede deberse a diversos factores. Primero, la distancia temporal en la

realización de las biopsias: las biopsias líquidas representan la enfermedad actual, puesto que fueron recogidas al principio del tratamiento con RT, mientras que en las biopsias de tejido hay mayor variabilidad temporal. Así, cuando se comparan biopsias líquidas y de tejido emparejadas temporalmente, la tasa de concordancia aumenta. Segundo, la heterogeneidad espacial del tumor: la mayoría de las muestras de tejido analizadas proceden de biopsias locales y pueden no representar la totalidad del tumor o los clones predominantes. En el caso de oligometástasis, además, están presentes múltiples lesiones sincrónicas que podrían proceder de clones diferentes. Tercero, a la baja tasa de liberación de ctDNA al torrente sanguíneo: especialmente en pacientes en estadios tempranos o con lesiones pequeñas, con baja carga tumoral, y según el órgano en el que se localice la lesión. En cuarto lugar, el momento en el que se realizó el panel de biopsia líquida determina los resultados obtenidos. Se consideró importante que el tumor no hubiese experimentado grandes cambios derivados del tratamiento de RT, pero se creyó que las primeras dosis de radiación podrían potenciar la liberación de ctDNA, por lo que para la realización del estudio genómico se seleccionó una biopsia líquida recogida tras una de las primeras sesiones. Debido a las fluctuaciones observadas en la señal de ctDNA durante el tratamiento, el empleo de una muestra recogida en otro punto podría haber condicionado la obtención de valores de concordancia ligeramente diferentes. En quinto y último lugar, la variabilidad de la señal de ctDNA en sangre a lo largo del tiempo: las FA observadas están a veces cerca del límite de detección y es probable que, en algún momento, un aumento de la liberación total de cfDNA eclipse la señal de ctDNA, haciéndola indetectable. Por último, también ha de tenerse en cuenta que la sensibilidad para detectar CNVs es limitada en las biopsias líquidas: el panel de biopsia líquida utilizado en este trabajo sólo informa de ganancias de 8 o más copias, y su capacidad para detectarlas disminuye con fracciones de ctDNA más bajas, lo que probablemente contribuyó a la falta de CNV en los resultados de ese panel. [152]

Aunque la información que la biopsia líquida pueda ofrecer del paisaje genético de un tumor puede ser limitada dada la posibilidad de estar ante el caso de un paciente con un tumor no liberador de ctDNA, el hecho de que la biopsia líquida haya permitido conocer alteraciones genómicas tumorales relevantes apoya su uso cuando no se dispone de biopsia tisular tanto en pacientes en estadio temprano como en pacientes

oligometastásicos. Pese a que este trabajo requería una muestra de tejido para la inclusión de los participantes, no siempre está disponible en los pacientes candidatos a HFRT, a menudo con cánceres no resecables, un contexto en el que es probable que fallen las biopsias de tejido. En esta cohorte, pese al esfuerzo en la recopilación de biopsias de tejido, 3/50 muestras tumorales evaluadas no pasaron los controles de calidad para el estudio genómico.

Por otro lado, el enfoque CGP no solo hace referencia al abordaje multiplataforma o multimuestra, en el que se integra la información obtenida de diferentes estudios genómicos realizados sobre especímenes diferentes, sino que se vale de grandes paneles que analizan de manera simultánea cientos de genes, en lugar de emplear pequeños paneles o ensayos más dirigidos a alteraciones puntuales frecuentes o *hotspot*. Esta estrategia más exhaustiva permitió ampliar las opciones de identificar un biomarcador para su posterior seguimiento, puesto que no todos los tumores presentan las alteraciones típicas de su tipo histológico. Por ejemplo, en muchos casos el biomarcador seleccionado para seguimiento en ctDNA, aun no siendo una alteración claramente *driver* del tumor, permitió monitorizar el tumor en ausencia de alteraciones más reconocibles como oncogénicas. Por ejemplo, en el caso del paciente #32, se empleó como biomarcador la variante *KDR* p.Gly95Arg, catalogada como VUS, gracias a la cual fue posible anticipar la progresión. Asimismo, en los casos de los pacientes #33 y #48, la señal en ctDNA de 2 VUS (en *ATR* y *TSC2*, respectivamente) siguió la misma dinámica que variantes oncogénicas en *TP53*, reafirmando la información proporcionada por estas. En segundo lugar, el empleo de un panel genómico exhaustivo, tanto somático como germinal, hace posible disponer de un ensayo único aplicable a los diferentes tipos de tumor, con las consecuentes ventajas: en cuanto a la parte somática y el acceso a fármacos dirigidos, las terapias agnósticas de tejido cada vez cobran mayor importancia, por lo que merece la pena maximizar la información genómica a interrogar; en cuanto al estudio germinal, en todos los casos en los que se detectó una alteración germinal asociada con predisposición al cáncer no se cumplían los criterios convencionales para el estudio genético en la rutina asistencial.

Accionabilidad de los hallazgos genómicos

Las pruebas somáticas identificaron conjuntamente alteraciones genómicas con utilidad clínica en una proporción muy importante de los pacientes. En un 19,1 % de los casos, estas alteraciones eran predictivas de respuesta a terapias aprobadas, en un 53,2 % eran sugestivas de potencial beneficio de fármacos en fase de investigación, y en un 63,0 % se identificaron variantes que podrían servir como llave de entrada a ensayos clínicos en curso. Asimismo, en un 23,9 % de los pacientes se identificaron variantes tumorales con utilidad pronóstica. En este tipo de pacientes, con baja carga tumoral y sin urgencia extrema por encontrar alternativas terapéuticas, la disponibilidad de esta información con la premura suficiente podría aumentar sus probabilidades de acceder a fármacos personalizados y, por tanto, ser determinante para su supervivencia. Cuando las pruebas genómicas son el último recurso, los resultados suelen llegar tarde y los pacientes ya no pueden optar a los ensayos clínicos.

Por su parte, el estudio de la línea germinal reveló variantes asociadas a predisposición hereditaria al cáncer en el 10,6 % de los pacientes, todos ellos sin antecedentes sugestivos de cáncer familiar. Estos hallazgos modificaron notablemente el posterior tratamiento clínico y evaluación del riesgo de los pacientes de acuerdo con las directrices clínicas actuales, facilitando además el asesoramiento genético y el ofrecimiento de análisis en cascada a sus familiares. [208] Cabe destacar que, si bien una variante germinal puede servir también como potencial diana de terapias personalizadas, no debe seleccionarse como biomarcador de seguimiento, puesto que no es específica de las células tumorales, lo que subraya la importancia de confirmar su origen.

Globalmente, la estrategia empleada basada en análisis genómico exhaustivo e integrativo proporcionó potenciales opciones para la mejora del manejo del paciente en casi 3/4 de los pacientes, facilitando el acceso a terapias personalizadas, ensayos clínicos guiados por biomarcadores y/o procesos de asesoramiento genético para los pacientes y sus familias, además del descubrimiento de potenciales biomarcadores de seguimiento en todos los participantes. El elevado rendimiento apoya la incorporación del CGP en la rutina asistencial. No obstante, al tratarse de un estudio observacional, no se ha evaluado si efectivamente el empleo de la información repercutió positivamente en la supervivencia de los pacientes o el abaratamiento de costes tras el tratamiento de RT.

Biomarcadores de biopsia líquida en Oncología Radioterápica

La Medicina avanza hacia procedimientos cada día más personalizados de diagnóstico, de prevención y, por supuesto, de tratamiento. En la introducción se expuso la necesidad de tratamientos con RT más personalizados, por lo que, en la segunda parte de este trabajo, se abordó la aplicación de ensayos basados en biopsia líquida para monitorizar biomarcadores genómicos durante los tratamientos con RT y el seguimiento posterior para evaluar la respuesta y comprobar su utilidad para estratificar a los pacientes. A continuación, se discute la aproximación empleada para el seguimiento longitudinal en ctDNA y, seguidamente, su utilidad en los 3 puntos del manejo del paciente: antes, durante y después del tratamiento con RT.

Estrategia dirigida para el estudio longitudinal del ctDNA

Los biomarcadores genómicos personalizados monitorizados en el estudio longitudinal mediante biopsia líquida fueron seleccionados a partir de la información previa tomada de los resultados del CGP, ya que los paneles NGS somáticos y germinal realizados al inicio del tratamiento permitieron identificar alteraciones procedentes del tumor que podrían funcionar como biomarcadores para ctDNA en todos los pacientes.

Para el estudio longitudinal en ctDNA se seleccionó un método tipo TAm-Seq, que se basa en la amplificación mediante PCR dirigida de regiones que contienen las alteraciones detectadas mediante los paneles y secuenciación NGS. Mediante 2 fases de PCR se realiza la amplificación de la región de interés y la adición de los adaptadores en los extremos para su secuenciación a altas coberturas. Se trata de un método sencillo, rápido en cuanto al diseño y a su ejecución, versátil y barato. Permite secuenciar varias alteraciones simultáneamente en cada muestra (hasta 5) y la puesta a punto solo implica diseñar oligonucleótidos flanqueantes a la región de interés.

De entre todos los biomarcadores tumorales identificados con el CGP, se seleccionaron de 1 a 5 en cada caso, según la relevancia que pudieran tener para el tumor del paciente (AF, potencial oncogénico, etc.). Para seleccionarlos se atendió también a dos requisitos metodológicos: que se tratase de alteraciones puntuales y que fuera

posible el diseño de oligonucleótidos cebadores flanqueantes específicos para amplificar una región que contuviese la variante con un tamaño óptimo de ~120 pb; fragmentos más pequeños podrían bajar la eficiencia de la secuenciación, mientras que tamaños más grandes podrían ser incompatibles al emplearse el cfDNA como molde, que ya se halla originalmente fragmentado.

Al igual que otras técnicas que implican PCR, se podría estar produciendo cierto sesgo en la amplificación de los alelos que llevase a pequeños artefactos en los valores cuantitativos. Por consiguiente, la técnica aquí desarrollada se considera semicuantitativa: más allá del valor de FA observado, en lo que verdaderamente se pone el foco es en la tendencia que sigue la señal en el estudio longitudinal. No se ha definido un valor umbral de FA ni punto de corte con implicaciones clínicas, aunque sí se diferencia entre señal positiva o negativa (indetectable), teniendo en cuenta que a menudo las gráficas se mueven cerca del límite de detección. A su vez, en todos los ensayos realizados se incluyeron al menos 2 muestras de ADN germinal (obtenido a partir de 2 extracciones de sangre diferentes, preferiblemente de la biopsia líquida basal y de una biopsia líquida del final del tratamiento) por los siguientes motivos: (1) para apoyar los datos de secuenciación con el panel NGS germinal que indicaban que no se trataba de variantes derivadas de la HC, y (2) como control, por un lado, de amplificación, al tratarse de ADN genómico no fragmentado (a diferencia del cfDNA) y, por otro, como control negativo de artefactos de la PCR y la secuenciación. Como posible mejora para diseños experimentales futuros, la incorporación de identificadores moleculares únicos (UMI) para la supresión integrada de errores inducidos por la PCR podría permitir la obtención de resultados más fiables y sensibles. [209, 210]

En cuanto su aplicabilidad en la rutina asistencial, una posible limitación del método reside en la necesidad juntar un alto número de muestras para secuenciarlas conjuntamente en una misma carrera NGS, puesto que individualmente requieren un pequeño porcentaje de una carrera completa. Aunque el análisis en paralelo de múltiples muestras reduce los costes, a su vez condiciona de manera importante el tiempo de respuesta; pese a la rapidez del procedimiento técnico, en ocasiones no sería posible analizar una muestra y dar el resultado en un par de días, puesto que por lo general debería ser almacenada a la espera de un número de muestras considerable que analizar

conjuntamente. En centros con un alto volumen de muestras esto es factible, pero en centros pequeños-medianos en los que pueda transcurrir cierto tiempo hasta alcanzar el número de ensayos pertinente para secuenciar en paralelo, puede representar un hándicap muy relevante. En este trabajo los productos se secuenciaron en cartuchos *Mid Output* de 150 ciclos en un secuenciador *NEXTSeq 550* de *Illumina* y la versatilidad de estos secuenciadores permite analizar distintos tipos de librerías conjuntamente: paneles, exomas, amplicones, etc. preparados empleando distintos procedimientos, por lo que no sería necesario dedicar la carrera exclusivamente a este tipo de ensayos; un laboratorio o centro de secuenciación que disponga de un flujo más o menos continuo de librerías para secuenciar podría cumplir tiempos de respuesta compatibles con el manejo del paciente en tiempos y costes.

El ctDNA como biomarcador en tratamientos con radioterapia

En cuanto a la adaptación de los tratamientos estándar, aunque la mayoría de los pacientes de los grupos EI y OMT tienen un buen pronóstico *a priori*, actualmente no existen predictores individuales de la respuesta de sus tumores al tratamiento con RT. Los biomarcadores de ctDNA pueden ayudar a identificar a los pacientes con alto riesgo de recaída, que podrían beneficiarse de la intensificación de la RT o de otros tratamientos adyuvantes. La señal de ctDNA basal mostró un valor pronóstico sólido, revelando una fuerte correlación con la SLP, por lo que puede ser una interesante herramienta en la estratificación de los pacientes. Esta observación, obtenida en pacientes ES y OMT, concuerda con los resultados obtenidos a partir de una cohorte de pacientes con CPNM en estadios IA-IIIB tratados con intención curativa con diferentes abordajes terapéuticos (cirugía, QT y/o RT) [211], publicados durante la elaboración de nuestro manuscrito [212]. En estos pacientes, la detección de ctDNA antes del tratamiento se asoció a menores supervivencias, tanto global como libre de recidiva. [211]

En nuestra cohorte no se observó asociación estadísticamente significativa entre la señal de ctDNA y el estado clínico en el resto de momentos analizados [213, 214]. Una posible explicación es que las biopsias líquidas recogidas en otros puntos del tratamiento se vieron afectadas por el efecto de la propia radiación, que alteraría el

reservorio de cfDNA total, eclipsando la fracción de ctDNA, en especial en los pacientes con baja carga tumoral y, por consiguiente, baja proporción de cfDNA derivado del tumor. Al mismo tiempo, esto sugiere que su condición inicial de tumores no tratados convierte a la biopsia líquida basal en un mejor y más informativo indicador pronóstico-predictivo.

Al mismo tiempo, pese a pertenecer a estadios clínicos e histologías diferentes, los pacientes del grupo EI y del grupo OMT mostraron un comportamiento similar en términos de SLP. Dado que, en cierta medida, los tumores oligometastásicos se asemejan a la enfermedad localizada, las técnicas de RT curativa se integran actualmente en el tratamiento de las oligometástasis. [215] Los resultados aquí presentados apoyan esta estrategia e indican que el mismo enfoque de seguimiento basado en el ctDNA podría aplicarse a ambos grupos, reforzando el uso de la información del ctDNA basal para estratificar a los pacientes sometidos a RT, como plantean otros estudios recientemente publicados en pacientes en estadios avanzados o en otros contextos terapéuticos. [216-219] Los pacientes del grupo OMT+ se asemejarían más a pacientes en estadio IV avanzado, con peor pronóstico y niveles más altos de ctDNA; la presencia de estas lesiones fuera del campo de tratamiento podrían ser las responsables de la progresión, pero a su vez, son un indicativo de que las lesiones están activas y pueda haber otras micrometástasis no diagnosticadas y que no estén siendo sometidas a vigilancia.

A pesar de la ausencia de patrones en la cinética del ctDNA durante el tratamiento, sí se pudo observar una tendencia a una mayor señal de ctDNA al inicio del mismo, especialmente en los casos con buen pronóstico. Esto sugiere que la radiación induce la muerte celular en el tumor, provocando la liberación de ctDNA, aunque el pequeño tamaño de la muestra hizo difícil extraer conclusiones definitivas a este respecto. En esta línea, algunos autores han descrito un pico transitorio de ctDNA al inicio de tratamientos CFRT y su desaparición progresiva, pero este patrón aún no está bien establecido. [180-183] En los pacientes de esta cohorte, con baja carga tumoral y tratados con HFRT (con administración de altas dosis por fracción) no se replicaron dichos resultados de manera uniforme.

En las biopsias líquidas recogidas durante el tratamiento, se observó que las señales de los biomarcadores analizados en un mismo paciente a menudo no se comportaron de la misma manera. Posibles explicaciones para este comportamiento son la presencia de diversos clones en el tumor que responden de manera diferente al tratamiento o las limitaciones del método de detección, que no tiene una sensibilidad del 100 %, por lo que algunas ausencias de señal podrían ser falsos negativos, incluso el momento elegido para la extracción, dada la fluctuación en el tiempo de la [ctDNA], y la baja concentración esperable, en no pocas ocasiones próximas a los umbrales de detección.

Las pruebas de imagen son la técnica *gold standard* para la evaluación de la respuesta a la RT, pero a menudo la necrosis, la inflamación u otros cambios tisulares post-RT limitan su resolución. En este trabajo, la biopsia líquida permitió realizar un seguimiento molecular en un número significativo de pacientes, mostrando concordancia con las prácticas de vigilancia rutinarias establecidas, tanto en pacientes recidivantes como en buenos respondedores. De manera similar, aunque menos acusada, a lo que se observó en las biopsias líquidas recogidas durante el tratamiento, en algunos casos en los que se hizo seguimiento de más de un biomarcador en un mismo paciente, la señal de cada uno se comportó de manera ligeramente distinta, lo que podría explicarse por las hipótesis previamente mencionadas. En cuanto a las recidivas no detectadas, es probable que determinados subclones tumorales portadores de variantes adquiridas durante el tratamiento (o muy minoritarias previamente) sean los responsables de la progresión, por lo que la aplicación de un ensayo dirigido a variantes detectadas previamente limita la detección de la progresión molecular. En este caso, el uso de paneles amplios, no limitados a las variantes ya observadas previamente, permitiría descubrir nuevas alteraciones potencialmente útiles para detectar precozmente la progresión tumoral, aunque la especificidad de estas alteraciones como biomarcadores del tumor habrá de ser muy bien calibrada para evitar falsos positivos.

Nuestros resultados confirman que la biopsia líquida puede ser un muy buen complemento en aquellos casos en los que las pruebas de imagen no son concluyentes [220], siendo capaz de detectar la recurrencia molecular de la enfermedad antes que los estudios radiológicos. Esto está en concordancia con varios trabajos publicados

recientemente que apoyan que la señal de ctDNA tras cirugía, RT o quimio-RT es capaz de predecir la progresión tumoral adelantándose a las pruebas radiológicas en cohortes de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal o cáncer de esófago, entre otros, aunque su potencial para guiar un tratamiento adyuvante es limitado. [213, 221-223] A este respecto, se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos para determinar si en efecto la señal de ctDNA es un biomarcador adecuado para la administración de tratamientos adyuvantes tras SBRT, cirugía o QT en varios tipos de cáncer (identificadores en ClinicalTrials.gov: NCT05411809, NCT05411809, NCT05815082).

Múltiples trabajos que analizan la señal de ctDNA días/semanas después de la cirugía han mostrado su elevado valor pronóstico en pacientes con diversos tipos de cáncer. [224] Sin embargo, en nuestra cohorte no se observó relación entre los niveles de ctDNA tras el tratamiento y la respuesta al mismo: no se identificó asociación significativa con la repuesta ni en la señal de ctDNA después de la última sesión ni en la biopsia líquida inmediatamente posterior, al mes de la finalización del tratamiento. Aunque es posible que la selección de una cohorte más grande y más homogénea revelase relación entre estas variables, la eliminación de un tumor mediante RT no es comparable a los procedimientos quirúrgicos de resección en los que se elimina la masa tumoral en los que se elimina la masa tumoral de forma inmediata, mientras que la RT ejerce su efecto citotóxico sobre las células tumorales durante semanas tras finalizar el tratamiento, siendo necesario dejar transcurrir 8-12 semanas antes de evaluar la respuesta a la radiación, estando condicionado este periodo por variable como el esquema de tratamiento empleado.

Globalmente, los resultados obtenidos apoyan que la biopsia líquida puede desempeñar un papel importante en el manejo de los pacientes cometidos a RT, aunque para que esta tecnología se implante en la rutina asistencial es necesario seguir investigando y demostrar consistentemente el beneficio clínico. En la *Tabla 13* se muestran algunos ejemplos de ensayos clínicos abiertos en la actualidad que emplean la biopsia líquida en tratamientos con RT.

Tabla 13. Ensayos clínicos que emplean la biopsia líquida en tratamientos con RT.

Ensayo clínico (identificador en ClinicalTrials.gov)	Uso de la biopsia líquida	Objetivo	Participantes
NCT04646564	ctDNA – pronóstico, valor predictivo, MRD	Utilidad del ctDNA para evaluar la respuesta a terapia estándar + SBRT de pacientes con cáncer de mama metastásico	170 pacientes randomizados
NCT03548428 (StereosarcTrial)	ctDNA - seguimiento	Utilidad del ctDNA para evaluar la respuesta a SBRT + inmunoterapia en pacientes con sarcoma	103 pacientes randomizados
NCT05498805	ctDNA – pronóstico, valor predictivo	Valor pronóstico y predictivo del ctDNA en pacientes con melanoma tratados con inhibidores de PD-1 +/- SBRT	92 pacientes randomizados
NCT03223779	ctDNA - seguimiento	Utilidad del ctDNA para evaluar la respuesta a SBRT + trifluridina en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal	56 pacientes
NCT04563507	ctDNA - pronóstico	Utilidad del ctDNA para predecir la respuesta a terapia estándar +/- SBRT de pacientes con cáncer de mama metastásico	102 pacientes randomizados
NCT03774758	ctDNA - cribado	Utilidad del ctDNA para el cribado de cáncer de pulmón	590 pacientes
NCT04122469 (RADIANT)	ctDNA - seguimiento	Utilidad del ctDNA para evaluar la respuesta a SBRT en pacientes con oligoprogresión de cáncer de mama o genito-urinario	100 pacientes
NCT05067660 (TASTEPRO)	ctDNA - MRD	Utilidad del ctDNA para evaluar la respuesta a SBRT <i>versus</i> CFRT	40 pacientes randomizados
NCT05737589	ctDNA - pronóstico	Valor pronóstico del ctDNA para pacientes con metástasis cerebral de CPNM tratados con RT	50 pacientes (observacional, retrospectivo)
NCT04944173 (SCION Trial)	ctDNA - MRD	Efectividad de la combinación de RT + inmunoterapia y utilidad del ctDNA para determinar la duración de la inmunoterapia	94 pacientes randomizados
NCT05411809	ctDNA - MRD	Utilidad del ctDNA para decidir si administrar un fármaco adyuvante a pacientes con cáncer de pulmón en estadio inicial tras SBRT	180 pacientes randomizados

CFRT: radioterapia de fraccionamiento convencional; LCR: líquido cefalorraquídeo; MRD: enfermedad mínima residual; CPNM: cáncer de pulmón no microcítico; RT: radioterapia; SBRT: radioterapia estereotáxica corporal.

Principales limitaciones de este trabajo en la evaluación de la utilidad clínica de la biopsia líquida en el manejo de pacientes sometidos a radioterapia

Uno de los principales hitos para la implementación de la monitorización del ctDNA en la toma de decisiones clínicas es la definición de la estrategia de muestreo óptima. A pesar de haber realizado un considerable esfuerzo por tomar muestras representativas de distintos momentos relevantes en el manejo de los pacientes sometidos a RT, los resultados presentados están limitados por los puntos temporales analizados, por lo que podrían haberse pasado por alto algunos cambios transitorios en el ctDNA. La realización de proyectos de investigación más exhaustivos al respecto podría impulsar el avance hacia la adaptación de la terapia en tiempo real (intensificación, desescalada, interrupción, etc.).

Otra importante limitación asociada a la recogida de muestras fueron las dificultades logísticas durante el seguimiento posterior al tratamiento; la mayoría de los pacientes volvieron a sus centros de referencia, lo que imposibilitó la perfecta sincronización de las biopsias líquidas y las pruebas de diagnóstico por imagen. Una mayor sincronización habría permitido establecer una óptima comparación entre el rendimiento diagnóstico de estas dos técnicas. El retorno de los pacientes a sus centros de referencia fue también la principal causa tras de la mayoría de los casos de abandono del estudio, con la consiguiente reducción del tamaño de la muestra tras la RT.

Asimismo, como ya se mencionó en el apartado específico de discusión de la tecnología seleccionada para el seguimiento longitudinal, el uso de ensayos dirigidos de ctDNA adaptados e informados por paneles de NGS previos hace que el análisis sea más fiable y menos susceptible a resultados falsos positivos, pero no permite el descubrimiento de variantes adquiridas por evolución clonal. Para hacer frente a esta limitación, se podrían realizar periódicamente paneles completos de biopsia líquida entre los ensayos de PCR, aunque esto supondría un considerable aumento del coste.

Radioresistencia y radiosensibilidad

Por último, en este trabajo no se ha abordado el estudio de variantes genómicas que pudieran conferir radioresistencia o radiosensibilidad a los tejidos tratados con RT.

Aunque aún no hay bases firmemente establecidas, se han propuesto algunos genes implicados en estos fenómenos (57, 58). Las alteraciones genéticas asociadas con sensibilidad o resistencia a la radiación podrían ser determinantes para el éxito o fracaso de un tratamiento con RT, por lo que supone un aspecto muy relevante para la personalización y modulación de la RT que merece atención.

Futuras líneas de investigación

Al margen de seguir investigando para optimizar y perfeccionar las técnicas de secuenciación de ctDNA, no se debe subestimar el prometedor potencial que alberga la biopsia líquida y la gran variedad de analitos disponibles en la misma, por lo que resulta de máximo interés explorar nuevos biomarcadores moleculares o celulares circulantes, basados en otras ómicas que permitan disponer de ensayos más sensibles, rápidos y versátiles, como la fragmentómica, la epigenómica, la proteómica o la glicómica.

La integración de los datos de las diferentes "ómicas" está ganando relevancia en la investigación en cáncer. Los recientes conocimientos sobre la multi-ómica del cáncer han promovido la aparición de ensayos clínicos "N-de-1" (tamaño de muestra de 1), que tratan de encontrar combinaciones terapéuticas para cada paciente atendiendo a su contexto clínico y molecular. [225, 226] Beaubier y col. describen el uso de una plataforma que combina secuenciación genómica, RNA-seq y biomarcadores inmunológicos, gracias a la cual consigue un mayor rendimiento en la identificación de terapias dirigidas o ensayos clínicos. [227]

Por otro lado, en paralelo al destacado papel del sistema inmune en los procesos carcinogénicos y al reciente auge de la inmunoterapia, se ha propuesto que una respuesta inmunitaria antitumoral potenciada es, junto con el daño en el tejido vascular, el mecanismo principal por el cual los tratamientos de HFRT inducen de manera indirecta la muerte celular, diferenciándolos de los tratamientos de CFRT. Este impulso de la respuesta inmunitaria contra el tumor estaría causado, entre otros procesos, por la mayor presentación de antígenos, la liberación de neoantígenos/citoquinas o la producción de interferón tipo I, por parte de las células tumorales atacadas. [45] Durante algún tiempo se defendió el "efecto abscopal" de los tratamientos de SBRT, que sugería que dicho

impulso de la respuesta inmunitaria era suficiente para controlar otros tumores distintos y distantes al irradiado, por lo que no era necesario tratar todas las lesiones activas con RT, sino que el propio sistema inmune se encargaría de "tratar" el resto de lesiones, pero más recientemente esta teoría ha sido prácticamente desechada. [46] No obstante, la radiación administrada durante los tratamientos con HFRT tiene un demostrado efecto a nivel del sistema inmunológico, por lo que las investigaciones futuras en este sentido desde la perspectiva radiobiológica podrían descubrir biomarcadores alternativos de evaluación de la respuesta a la RT. [228]

CONCLUSIONES

1. Los estudios genómicos a partir de biopsia de tejido, biopsia líquida y muestra germinal proporcionan información complementaria y relevante en el manejo clínico de los pacientes con baja carga tumoral tratados con RT, yendo más allá de la selección de alternativas terapéuticas dirigidas y abarcando también la modulación y el seguimiento de los tratamientos, la prevención y el asesoramiento genético en la familia.
2. Algunos pacientes con baja carga tumoral no presentan niveles detectables de ctDNA en sangre, lo que determina que los estudios genómicos sobre biopsia de tejido puedan alcanzar una mayor tasa de accionabilidad que los realizados sobre biopsia líquida.
3. El hecho de que únicamente un tercio de las variantes genómicas identificadas en la biopsia líquida fueran verdaderas variantes de ctDNA revela la importancia de la integración de los hallazgos de los distintos estudios genómicos para optimizar el proceso de selección de biomarcadores, a fin de descartar variantes de origen germinal o derivadas de hematopoyesis clonal.
4. La hematopoyesis clonal es un fenómeno frecuente y debe ser tenido en cuenta en la aplicación de estudios genómicos basados en biopsia líquida.
5. La concentración de cfDNA en plasma sanguíneo en pacientes con baja carga tumoral sometidos a tratamiento con radioterapia no mostró relación con el estado clínico ni con la respuesta al tratamiento, por lo que no debe ser utilizada como biomarcador en este contexto.
6. El estudio del ctDNA antes de un tratamiento con radioterapia es útil en la evaluación del pronóstico y podría permitir estratificar a los pacientes según el riesgo para personalizar no solo el tratamiento prescrito sino el procedimiento de seguimiento.
7. El ctDNA es un biomarcador aplicable para el seguimiento de los tratamientos con radioterapia, llegando a anticiparse a otras pruebas diagnósticas, especialmente cuando las pruebas de imagen no son concluyentes por los cambios tisulares que se producen tras la radioterapia.

REFERENCIAS

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): p. 31-46.
4. National Cancer Institute (National Institutes of Health, NIH). *Cancer Types*. [Internet] 2023 03/22/2023 [cited 2023 27/03/2023]; Available from: <https://www.cancer.gov/types>.
5. Global Cancer Observatory (GCO). *GLOBOCAN estimates of cancer incidence and mortality*. [Internet] 2020 12/2020; Available from: <https://gco.iarc.fr/>.
6. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
7. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Las cifras del cáncer en España 2023*. [Internet] 2023 30/01/2023 [cited 2023 28/02/2023]; Available from: <https://seom.org/publicaciones/el-cancer-en-espanyacom>.
8. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2023*. CA Cancer J Clin, 2023. **73**(1): p. 17-48.
9. Duffy, S.W., et al., *Beneficial Effect of Consecutive Screening Mammography Examinations on Mortality from Breast Cancer: A Prospective Study*. Radiology, 2021. **299**(3): p. 541-547.
10. Gotzsche, P.C. and K.J. Jorgensen, *Screening for breast cancer with mammography*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **2013**(6): p. CD001877.
11. HPV Information Centre - Human Papillomavirus and Related Diseases Report (Spain). *The Catalan Institute of Oncology (ICO) and the International Agency for Research on Cancer (IARC)*. [Internet] 2023 10/03/2023 [cited 2023 07/04/2023]; Available from: <https://hpvcentre.net/statistics/reports/ESP.pdf>.
12. Hewitson, P., et al., *Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(6): p. 1541-9.
13. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). *NCCN Guidelines. Treatment by Cancer Type*. [Internet] 2023 28/03/2023 [cited 2023 28/03/2023]; Available from: https://www.nccn.org/guidelines/category_1.
14. Hadian, M., et al., *What is the impact of clinical guidelines on imaging costs?* J Educ Health Promot, 2021. **10**: p. 10.
15. National Cancer Institute (National Institutes of Health, NIH). *NCI Dictionary of Cancer Terms*. . [Internet] 2023 27/03/2023 [cited 2023 28/03/2023]; Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>.
16. Van Poppel, H., et al., *Serum PSA-based early detection of prostate cancer in Europe and globally: past, present and future*. Nat Rev Urol, 2022. **19**(9): p. 562-572.
17. Konishi, T., et al., *Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome*. JAMA Oncol, 2018. **4**(3): p. 309-315.
18. Charkhchi, P., et al., *CA125 and Ovarian Cancer: A Comprehensive Review*. Cancers (Basel), 2020. **12**(12).
19. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). *Acceso al tratamiento de Radioterapia en España*. [Internet] 2020 01/06/2020 01/03/2023]; Available from: <https://observatorio.contraelcancer.es/informes/acceso-al-tratamiento-de-radioterapia-en-espana>.
20. Donya, M., et al., *Radiation in medicine: Origins, risks and aspirations*. Glob Cardiol Sci Pract, 2014. **2014**(4): p. 437-48.
21. Muñoz-Páez, A., *Marie Skłodowska-Curie y la radioactividad*. Educ quim., 2013. **24**(2): p. 224-228.
22. Sgantzos, M., et al., *The physician who first applied radiotherapy, Victor Despeignes, on 1896*. Hell J Nucl Med, 2014. **17**(1): p. 45-6.
23. Berven, E., *The Development and Organization of Therapeutic Radiology in Sweden*. Radiology, 1962. **79**(5).
24. National Cancer Institute (National Institutes of Health, NIH). *Milestones in Cancer Research and Discovery*. [Internet] 2023 20/04/2023; Available from: <https://www.cancer.gov/research/progress/250-years-milestones>.
25. Van Dyk, J., J.J. Battista, and P.R. Almond, *A retrospective of cobalt-60 radiation therapy: "The atom bomb that saves lives"*. Med. phys. int., 2020. **History of Medical Physics 4**(Special Issue).
26. Huh, H.D. and S. Kim, *History of Radiation Therapy Technology*. Prog Med Phys, 2020. **31**(3): p. 124-134.
27. Fiorino, C., et al., *Technology-driven research for radiotherapy innovation*. Mol Oncol, 2020. **14**(7): p. 1500-1513.
28. Leksell, L., *The stereotaxic method and radiosurgery of the brain*. Acta Chir Scand, 1951. **102**(4): p. 316-9.
29. Lax, I., et al., *Stereotactic radiotherapy of malignancies in the abdomen. Methodological aspects*. Acta Oncol, 1994. **33**(6): p. 677-83.
30. Chang, J.Y., et al., *Stereotactic ablative radiotherapy versus lobectomy for operable stage I non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised trials*. Lancet Oncol, 2015. **16**(6): p. 630-7.
31. Timmerman, R., et al., *Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer*. JAMA, 2010. **303**(11): p. 1070-6.
32. Hellman, S. and R.R. Weichselbaum, *Oligometastases*. J Clin Oncol, 1995. **13**(1): p. 8-10.
33. Weichselbaum, R.R. and S. Hellman, *Oligometastases revisited*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(6): p. 378-82.
34. Lee, Y.H., et al., *Comparison of stereotactic body radiotherapy versus metastasectomy outcomes in patients with pulmonary metastases*. Thorac Cancer, 2018. **9**(12): p. 1671-1679.

35. Virbel, G., et al., *Stereotactic Body Radiotherapy for Patients with Lung Oligometastatic Disease: A Five-Year Systematic Review*. *Cancers* (Basel), 2021. **13**(14).
36. Baumann, B.C., et al., *Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) for Hepatocellular Carcinoma: High Rates of Local Control With Low Toxicity*. *Am J Clin Oncol*, 2018. **41**(11): p. 1118-1124.
37. Ramadan, S., et al., *Impact of stereotactic body radiotherapy (SBRT) in oligoprogressive metastatic disease*. *Acta Oncol*, 2022. **61**(6): p. 705-713.
38. Palma, D.A., et al., *Stereotactic ablative radiotherapy versus standard of care palliative treatment in patients with oligometastatic cancers (SABR-COMET): a randomised, phase 2, open-label trial*. *Lancet*, 2019. **393**(10185): p. 2051-2058.
39. Pan, H., et al., *A survey of stereotactic body radiotherapy use in the United States*. *Cancer*, 2011. **117**(19): p. 4566-72.
40. Cao, Y., et al., *An international pooled analysis of SBRT outcomes to oligometastatic spine and non-spine bone metastases*. *Radiother Oncol*, 2021. **164**: p. 98-103.
41. Bradley, J., *Radiographic response and clinical toxicity following SBRT for stage I lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2007. **2**(7 Suppl 3): p. S118-24.
42. Huang, K., et al., *Radiographic changes after lung stereotactic ablative radiotherapy (SABR)--can we distinguish recurrence from fibrosis? A systematic review of the literature*. *Radiother Oncol*, 2012. **102**(3): p. 335-42.
43. Mattonen, S.A., A.D. Ward, and D.A. Palma, *Pulmonary imaging after stereotactic radiotherapy--does RECIST still apply?* *Br J Radiol*, 2016. **89**(1065): p. 20160113.
44. Navin, P.J., et al., *Imaging Features in the Liver after Stereotactic Body Radiation Therapy*. *Radiographics*, 2022. **42**(7): p. 2131-2148.
45. Song, C.W., et al., *Biological Principles of Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) and Stereotactic Radiation Surgery (SRS): Indirect Cell Death*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2021. **110**(1): p. 21-34.
46. Brooks, E.D. and J.Y. Chang, *Time to abandon single-site irradiation for inducing abscopal effects*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019. **16**(2): p. 123-135.
47. Lu, Z., et al., *Deciphering the Biological Effects of Radiotherapy in Cancer Cells*. *Biomolecules*, 2022. **12**(9).
48. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature*, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
49. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. *Science*, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
50. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
51. Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project*. *Nat Genet*, 2013. **45**(10): p. 1113-20.
52. Investigators, G.P.P., et al., *100,000 Genomes Pilot on Rare-Disease Diagnosis in Health Care - Preliminary Report*. *N Engl J Med*, 2021. **385**(20): p. 1868-1880.
53. *Genomics England. Secretary of State for Health and Social Care announces ambition to sequence 5 million genomes within five years*. [Internet] 2018 02/10/2018 [cited 2023 30/03/2023]; Available from: <https://www.genomicsengland.co.uk/news/matt-hancock-announces-sequencing-ambition>.
54. *Unión Europea. Iniciativa europea 1+ Millones de Genomas*. 2023 30/05/2023 [cited 2023; Available from: <https://digital-strategy.ec.europa.eu/es/policies/1-million-genomes>.
55. Consortium, I.T.P.-C.A.o.W.G., *Pan-cancer analysis of whole genomes*. *Nature*, 2020. **578**(7793): p. 82-93.
56. Nurk, S., et al., *The complete sequence of a human genome*. *Science*, 2022. **376**(6588): p. 44-53.
57. Schneider, V.A., et al., *Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly*. *Genome Res*, 2017. **27**(5): p. 849-864.
58. *National Center for Biotechnology Information (NCBI). GRCh38.p14 - hg38 - Genome Assemble*. [Internet] 2023 29/03/2023 [cited 2023 29/03/2023]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.40.
59. Liao, W.W., et al., *A draft human pangenome reference*. *Nature*, 2023. **617**(7960): p. 312-324.
60. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. *Nature*, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
61. Heather, J.M. and B. Chain, *The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA*. *Genomics*, 2016. **107**(1): p. 1-8.
62. Slatko, B.E., A.F. Gardner, and F.M. Ausubel, *Overview of Next-Generation Sequencing Technologies*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2018. **122**(1): p. e59.
63. Athanasopoulou, K., et al., *Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics*. *Life* (Basel), 2021. **12**(1).
64. Moore, G.E., *Cramming More Components onto Integrated Circuits*. *Electronics*, 1965. **38**(8): p. 114-117.
65. *National Human Genome Research Institute - National Institutes of Health. DNA Sequencing Costs: Data*. [Internet] 2021 01/11/2021 [cited 2023 15/03/2023]; Available from: <https://www.genome.gov/sequencingcosts>.
66. Chakravarty, D., et al., *OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base*. *JCO Precis Oncol*, 2017. **2017**.
67. Shtivelman, E., et al., *Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia*. *Nature*, 1985. **315**(6020): p. 550-4.

68. Neuendorff, N.R., et al., *BCR-ABL-positive acute myeloid leukemia: a new entity? Analysis of clinical and molecular features*. *Ann Hematol*, 2016. **95**(8): p. 1211-21.
69. Li, V.D., K.H. Li, and J.T. Li, *TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019. **145**(3): p. 625-636.
70. Gryfe, R., et al., *Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(2): p. 69-77.
71. Smith, J.C. and J.M. Sheltzer, *Genome-wide identification and analysis of prognostic features in human cancers*. *Cell Rep*, 2022. **38**(13): p. 110569.
72. *Food and Drug Administration (FDA). Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling*. [Internet] 2023 10/02/2023 [cited 2023 21/03/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/table-pharmacogenomic-biomarkers-drug-labeling>.
73. Jordan, V.C., *Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy*. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(1): p. 30-8.
74. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(16): p. 1659-72.
75. Iqbal, N. and N. Iqbal, *Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer*. *Chemother Res Pract*, 2014. **2014**: p. 357027.
76. Drilon, A., et al., *Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(8): p. 731-739.
77. Doebele, R.C., et al., *Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials*. *Lancet Oncol*, 2020. **21**(2): p. 271-282.
78. Seligson, N.D., et al., *Developing Drugs for Tissue-Agnostic Indications: A Paradigm Shift in Leveraging Cancer Biology for Precision Medicine*. *Clin Pharmacol Ther*, 2021. **109**(2): p. 334-342.
79. *European Medicines Agency (EMA). Medicines*. [Internet] 2023 [cited 2023 24/03/2023]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>.
80. *Food and Drug Administration (FDA). FDA approves larotrectinib for solid tumors with NTRK gene fusions*. [Internet] 2018 14/12/2018 [cited 2023 22/03/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-larotrectinib-solid-tumors-ntrk-gene-fusions>.
81. *Food and Drug Administration (FDA). FDA grants accelerated approval to dostarlimab-gxly for dMMR advanced solid tumors*. [Internet] 2023 01/02/2022 [cited 2023 22/03/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-dostarlimab-gxly-dmmr-advanced-solid-tumors>.
82. *Food and Drug Administration (FDA). FDA grants accelerated approval to dabrafenib in combination with trametinib for unresectable or metastatic solid tumors with BRAF V600E mutation*. [Internet] 2022 06/23/2022 [cited 2023 22/03/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-dabrafenib-combination-trametinib-unresectable-or-metastatic-solid>.
83. *Food and Drug Administration (FDA). FDA approves selpercatinib for locally advanced or metastatic RET fusion-positive solid tumors*. [Internet] 2022 21/09/2022 [cited 2023 22/03/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-selpercatinib-locally-advanced-or-metastatic-ret-fusion-positive-solid-tumors>.
84. Garcia-Alfonso, P., et al., *Consensus of experts from the Spanish Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Society and the Spanish Society of Medical Oncology for the genotyping of DPYD in cancer patients who are candidates for treatment with fluoropyrimidines*. *Clin Transl Oncol*, 2022. **24**(3): p. 483-494.
85. Bakhuizen, J.J., et al., *Assessment of Cancer Predisposition Syndromes in a National Cohort of Children With a Neoplasm*. *JAMA Netw Open*, 2023. **6**(2): p. e2254157.
86. Lindor, N.M., et al., *Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition*. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2008(38): p. 1-93.
87. *Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Libro SEOM de Cáncer Hereditario*. 2021.
88. Cabanillas, R., et al., *A novel molecular diagnostics platform for somatic and germline precision oncology*. *Mol Genet Genomic Med*, 2017. **5**(4): p. 336-359.
89. Frampton, G.M., et al., *Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing*. *Nat Biotechnol*, 2013. **31**(11): p. 1023-31.
90. Tan, A.C., et al., *Utility of incorporating next-generation sequencing (NGS) in an Asian non-small cell lung cancer (NSCLC) population: Incremental yield of actionable alterations and cost-effectiveness analysis*. *Lung Cancer*, 2020. **139**: p. 207-215.
91. Singh, A.P., et al., *Impact and Diagnostic Gaps of Comprehensive Genomic Profiling in Real-World Clinical Practice*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(5).
92. Stover, D.G., et al., *Prospective Decision Analysis Study of Clinical Genomic Testing in Metastatic Breast Cancer: Impact on Outcomes and Patient Perceptions*. *JCO Precis Oncol*, 2019. **3**.
93. Hilal, T., et al., *Comprehensive genomic profiling in routine clinical practice leads to a low rate of benefit from genotype-directed therapy*. *BMC Cancer*, 2017. **17**(1): p. 602.

-
94. Zhang, Q., et al., *Molecular Profiling-Based Precision Medicine in Cancer: A Review of Current Evidence and Challenges*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 532403.
95. Zhong, Y., et al., *Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine*. *Ann Lab Med*, 2021. **41**(1): p. 25-43.
96. *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). La AEMPS informa de la publicación del Reglamento (UE) 2023/607, por el que se modifican los Reglamentos de Productos Sanitarios*. [Internet] 2023 21/03/2023 [cited 2023 24/03/2023]; Available from: <https://www.aemps.gob.es/informa/la-aemps-informa-de-la-publicacion-del-reglamento-ue-2023-607-por-el-que-se-modifican-los-reglamentos-de-productos-sanitarios/#>.
97. Lincoln, S.E., et al., *Yield and Utility of Germline Testing Following Tumor Sequencing in Patients With Cancer*. *JAMA Netw Open*, 2020. **3**(10): p. e2019452.
98. Samadder, N.J., et al., *Comparison of Universal Genetic Testing vs Guideline-Directed Targeted Testing for Patients With Hereditary Cancer Syndrome*. *JAMA Oncol*, 2021. **7**(2): p. 230-237.
99. Stadler, Z.K., et al., *Therapeutic Implications of Germline Testing in Patients With Advanced Cancers*. *J Clin Oncol*, 2021. **39**(24): p. 2698-2709.
100. Green, R.C., et al., *ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing*. *Genet Med*, 2013. **15**(7): p. 565-74.
101. Miller, D.T., et al., *ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*. *Genet Med*, 2022. **24**(7): p. 1407-1414.
102. Laes, J.F., et al., *The clinical impact of using complex molecular profiling strategies in routine oncology practice*. *Oncotarget*, 2018. **9**(29): p. 20282-20293.
103. Tsimberidou, A.M., P. Muller, and Y. Ji, *Innovative trial design in precision oncology*. *Semin Cancer Biol*, 2022. **84**: p. 284-292.
104. *Food and Drug Administration (FDA). Master Protocols: Efficient Clinical Trial Design Strategies to Expedite Development of Oncology Drugs and Biologics Guidance for Industry*. [Internet] 2022 02/03/2022 [cited 2023 11/04/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/master-protocols-efficient-clinical-trial-design-strategies-expedite-development-oncology-drugs-and-biologics>.
105. Yates, L.R., et al., *The European Society for Medical Oncology (ESMO) Precision Medicine Glossary*. *Ann Oncol*, 2018. **29**(1): p. 30-35.
106. Katsnelson, A., *Momentum grows to make 'personalized' medicine more 'precise'*. *Nat Med*, 2013. **19**(3): p. 249.
107. *US National Research Council. Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease*. [Internet] 2011 2011 [cited 2023 22/03/2023]; Available from: <https://nap.nationalacademies.org/catalog/13284/toward-precision-medicine-building-a-knowledge-network-for-biomedical-research>.
108. Jorgensen, J.T., *Twenty Years with Personalized Medicine: Past, Present, and Future of Individualized Pharmacotherapy*. *Oncologist*, 2019. **24**(7): p. e432-e440.
109. Lianidou, E.S., et al., *What's new on circulating tumor cells? A meeting report*. *Breast Cancer Res*, 2010. **12**(4): p. 307.
110. Alix-Panabieres, C. and K. Pantel, *Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer*. *Clin Chem*, 2013. **59**(1): p. 110-8.
111. Habli, Z., et al., *Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(7).
112. Alvarez Cubero, M.J., et al., *Circulating Tumor Cells: Markers and Methodologies for Enrichment and Detection*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1634**: p. 283-303.
113. Dai, J., et al., *Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy*. *Signal Transduct Target Ther*, 2020. **5**(1): p. 145.
114. Jain, S., et al., *Urine-Based Liquid Biopsy for Nonurological Cancers*. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2019. **23**(4): p. 277-283.
115. Satyal, U., A. Srivastava, and P.H. Abbosh, *Urine Biopsy-Liquid Gold for Molecular Detection and Surveillance of Bladder Cancer*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 1266.
116. Guo, Z., et al., *Malignant pleural effusion supernatant is an alternative liquid biopsy specimen for comprehensive mutational profiling*. *Thorac Cancer*, 2019. **10**(4): p. 823-831.
117. De Mattos-Arruda, L., et al., *Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 8839.
118. Mandel, P. and P. Metais, *[Nuclear Acids In Human Blood Plasma]*. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1948. **142**(3-4): p. 241-3.
119. Leon, S.A., et al., *Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy*. *Cancer Res*, 1977. **37**(3): p. 646-50.

120. Zhong, X.Y., et al., *Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol, 2001. **184**(3): p. 414-9.
121. Gielis, E.M., et al., *Cell-Free DNA: An Upcoming Biomarker in Transplantation*. Am J Transplant, 2015. **15**(10): p. 2541-51.
122. Huminska-Lisowska, K., et al., *cfDNA Changes in Maximal Exercises as a Sport Adaptation Predictor*. Genes (Basel), 2021. **12**(8).
123. de Miranda, F.S., et al., *Properties and Application of Cell-Free DNA as a Clinical Biomarker*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(17).
124. Jiang, P., et al., *Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(11): p. E1317-25.
125. Lo, Y.M.D., et al., *Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies*. Science, 2021. **372**(6538).
126. Lui, Y.Y., et al., *Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation*. Clin Chem, 2002. **48**(3): p. 421-7.
127. Stroun, M., et al., *Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients*. Oncology, 1989. **46**(5): p. 318-22.
128. Vasioukhin, V., et al., *Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia*. Br J Haematol, 1994. **86**(4): p. 774-9.
129. Chen, X.Q., et al., *Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 1033-5.
130. Schwarzenbach, H., D.S. Hoon, and K. Pantel, *Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(6): p. 426-37.
131. Diehl, F., et al., *Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics*. Nat Med, 2008. **14**(9): p. 985-90.
132. Bettegowda, C., et al., *Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies*. Sci Transl Med, 2014. **6**(224): p. 224ra24.
133. Underhill, H.R., et al., *Fragment Length of Circulating Tumor DNA*. PLoS Genet, 2016. **12**(7): p. e1006162.
134. Heitzer, E., L. Auinger, and M.R. Speicher, *Cell-Free DNA and Apoptosis: How Dead Cells Inform About the Living*. Trends Mol Med, 2020. **26**(5): p. 519-528.
135. Jahr, S., et al., *DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1659-65.
136. Hu, Z., et al., *The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion*. Crit Rev Oncol Hematol, 2021. **157**: p. 103166.
137. Grabuschnig, S., et al., *Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
138. Rostami, A., et al., *Senescence, Necrosis, and Apoptosis Govern Circulating Cell-free DNA Release Kinetics*. Cell Rep, 2020. **31**(13): p. 107830.
139. To, E.W., et al., *Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(9): p. 3254-9.
140. Gao, Q., et al., *Circulating cell-free DNA for cancer early detection*. Innovation (Camb), 2022. **3**(4): p. 100259.
141. Steensma, D.P., *Clinical Implications of Clonal Hematopoiesis*. Mayo Clin Proc, 2018. **93**(8): p. 1122-1130.
142. Chan, H.T., et al., *Clinical significance of clonal hematopoiesis in the interpretation of blood liquid biopsy*. Mol Oncol, 2020. **14**(8): p. 1719-1730.
143. Bohers, E., P.J. Viailly, and F. Jardin, *cfDNA Sequencing: Technological Approaches and Bioinformatic Issues*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(6).
144. Newman, A.M., et al., *Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(5): p. 547-555.
145. Newman, A.M., et al., *An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage*. Nat Med, 2014. **20**(5): p. 548-54.
146. McGranahan, N. and C. Swanton, *Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution*. Cancer Cell, 2015. **27**(1): p. 15-26.
147. Schrijver, W., et al., *Mutation Profiling of Key Cancer Genes in Primary Breast Cancers and Their Distant Metastases*. Cancer Res, 2018. **78**(12): p. 3112-3121.
148. Gerlinger, M., et al., *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. N Engl J Med, 2012. **366**(10): p. 883-892.
149. Marusyk, A., M. Janiszewska, and K. Polyak, *Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance*. Cancer Cell, 2020. **37**(4): p. 471-484.
150. Guo, Q., et al., *Heterogeneous mutation pattern in tumor tissue and circulating tumor DNA warrants parallel NGS panel testing*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 131.
151. Balaji, S.A., et al., *Analysis of solid tumor mutation profiles in liquid biopsy*. Cancer Med, 2018. **7**(11): p. 5439-5447.
152. Clark, T.A., et al., *Analytical Validation of a Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Genomic Profiling of Cell-Free Circulating Tumor DNA*. J Mol Diagn, 2018. **20**(5): p. 686-702.

-
153. Li, G., et al., *Genomic profiling of cell-free circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer and its fidelity to the genomics of the tumor biopsy*. *J Gastrointest Oncol*, 2019. **10**(5): p. 831-840.
154. Kagawa, Y., et al., *Combined Analysis of Concordance between Liquid and Tumor Tissue Biopsies for RAS Mutations in Colorectal Cancer with a Single Metastasis Site: The METABEAM Study*. *Clin Cancer Res*, 2021. **27**(9): p. 2515-2522.
155. Shatsky, R., et al., *Next-Generation Sequencing of Tissue and Circulating Tumor DNA: The UC San Diego Moores Center for Personalized Cancer Therapy Experience with Breast Malignancies*. *Mol Cancer Ther*, 2019. **18**(5): p. 1001-1011.
156. Kujala, J., et al., *High mutation burden of circulating cell-free DNA in early-stage breast cancer patients is associated with a poor relapse-free survival*. *Cancer Med*, 2020. **9**(16): p. 5922-5931.
157. Parikh, A.R., et al., *Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers*. *Nat Med*, 2019. **25**(9): p. 1415-1421.
158. Nakamura, Y., et al., *Clinical utility of circulating tumor DNA sequencing in advanced gastrointestinal cancer: SCRUM-Japan GI-SCREEN and GOZILA studies*. *Nat Med*, 2020. **26**(12): p. 1859-1864.
159. Johnson & Johnson. *FDA clears CellSearch™ circulating tumor cell test (Press release)*. [Internet] 2008 27/02/2008 [cited 2023 12/04/2023]; Available from: <https://johnsonandjohnson.gcs-web.com/news-releases/news-release-details/fda-clears-cellsearchtm-circulating-tumor-cell-test/>.
160. Malapelle, U., et al., *Profile of the Roche cobas(R) EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017. **17**(3): p. 209-215.
161. *Food and Drug Administration (FDA). Cobas EGFR Mutation Test v2*. [Internet] 2016 02/06/2016 [cited 2023 12/04/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/cobas-egfr-mutation-test-v2>.
162. Woodhouse, R., et al., *Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin*. *PLoS One*, 2020. **15**(9): p. e0237802.
163. *Food and Drug Administration (FDA). FDA Approves Liquid Biopsy Next-Generation Sequencing Companion Diagnostic Test*. [Internet] 2020 15/09/2020 [cited 2023 12/04/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-liquid-biopsy-next-generation-sequencing-companion-diagnostic-test>.
164. *Food and Drug Administration (FDA). Epi ProColon – P130001 (Labelling)*. [Internet] 2016 05/20/2016 [cited 2023 19/04/2023]; Available from: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma_template.cfm?id=p130001.
165. *Food and Drug Administration (FDA). FDA authorizes first next generation sequencing-based test to detect very low levels of remaining cancer cells in patients with acute lymphoblastic leukemia or multiple myeloma*. [Internet] 2018 28/09/2018 [cited 2023 19/04/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-authorizes-first-next-generation-sequencing-based-test-detect-very-low-levels-remaining-cancer>.
166. *Food and Drug Administration (FDA). Therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit – P190004 (Labelling)*. [Internet] 2019 28/05/2019 [cited 2023 19/04/2023]; Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P190004>.
167. *Food and Drug Administration (FDA). FoundationOne Liquid CDx – P190032/S001 (Labelling)*. [Internet] 2021 04/08/2021 [cited 2023 12/04/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/recently-approved-devices/foundationone-liquid-cdx-p190032s001>.
168. *Food and Drug Administration (FDA). Guardant360 CDx - P200010/S008 (Labeling)*. [Internet] 2022 11/08/2022 [cited 2023 12/04/2023]; Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/recently-approved-devices/guardant360-cdx-p200010s008>.
169. Pascual, J., et al., *ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group*. *Ann Oncol*, 2022. **33**(8): p. 750-768.
170. Guseh, S.H., *Noninvasive prenatal testing: from aneuploidy to single genes*. *Hum Genet*, 2020. **139**(9): p. 1141-1148.
171. Knight, S.R., A. Thorne, and M.L. Lo Faro, *Donor-specific Cell-free DNA as a Biomarker in Solid Organ Transplantation. A Systematic Review*. *Transplantation*, 2019. **103**(2): p. 273-283.
172. Blauwkamp, T.A., et al., *Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease*. *Nat Microbiol*, 2019. **4**(4): p. 663-674.
173. Cisneros-Villanueva, M., et al., *Cell-free DNA analysis in current cancer clinical trials: a review*. *Br J Cancer*, 2022. **126**(3): p. 391-400.
174. Frydrych, L.M., et al., *Rectal cancer sub-clones respond differentially to neoadjuvant therapy*. *Neoplasia*, 2019. **21**(10): p. 1051-1062.
175. Guo, Z., et al., *Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment*. *Carcinogenesis*, 2015. **36**(3): p. 307-17.
176. Blomain, E.S. and E.J. Moding, *Liquid Biopsies for Molecular Biology-Based Radiotherapy*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(20).

177. De Michino, S., et al., *The Utility of Liquid Biopsies in Radiation Oncology*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2020. **107**(5): p. 873-886.
178. Liang, H., et al., *The plasma Epstein-Barr virus DNA level guides precision treatment for nasopharyngeal carcinoma in the intensity-modulated radiotherapy era: a large population-based cohort study from an endemic area*. Ther Adv Med Oncol, 2018. **10**: p. 1758835918782331.
179. Steverink, J.G., et al., *Early Tissue Effects of Stereotactic Body Radiation Therapy for Spinal Metastases*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018. **100**(5): p. 1254-1258.
180. Lo, Y.M., et al., *Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Res, 2000. **60**(9): p. 2351-5.
181. Leung, S.F., et al., *Plasma Epstein-Barr viral DNA load at midpoint of radiotherapy course predicts outcome in advanced-stage nasopharyngeal carcinoma*. Ann Oncol, 2014. **25**(6): p. 1204-8.
182. Walls, G.M., et al., *Early circulating tumour DNA kinetics measured by ultra-deep next-generation sequencing during radical radiotherapy for non-small cell lung cancer: a feasibility study*. Radiat Oncol, 2020. **15**(1): p. 132.
183. Kageyama, S.I., et al., *Radiotherapy increases plasma levels of tumoral cell-free DNA in non-small cell lung cancer patients*. Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19368-19378.
184. Moding, E.J., et al., *Detecting Liquid Remnants of Solid Tumors: Circulating Tumor DNA Minimal Residual Disease*. Cancer Discov, 2021. **11**(12): p. 2968-2986.
185. *International Commission on Radiation Units & Measurements (ICRU). Reports*. [Internet] 2023 15/06/2023 [cited 2023 15/06/2023]; Available from: <https://www.icru.org/reports/>.
186. Schlachter M., R.R.G., Muren L.P., Preim B., Bühler K., *State-of-the-art report: Visual computing in radiation therapy planning*. Comput Graph Forum, 2019. **38**(3): p. 753-779.
187. Eisenhauer, E.A., et al., *New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)*. Eur J Cancer, 2009. **45**(2): p. 228-47.
188. Richards, S., et al., *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*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
189. Griffith, M., et al., *CIViC is a community knowledgebase for expert crowdsourcing the clinical interpretation of variants in cancer*. Nat Genet, 2017. **49**(2): p. 170-174.
190. Mateo, J., et al., *A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT)*. Ann Oncol, 2018. **29**(9): p. 1895-1902.
191. *National Center for Biotechnology Information (NCBI). ClinicalTrials.gov*. [Internet] 2023 [cited 2023; Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/>.
192. Raskind, W.H., et al., *Evaluation of locus heterogeneity and EXT1 mutations in 34 families with hereditary multiple exostoses*. Hum Mutat, 1998. **11**(3): p. 231-9.
193. Bukowska-Olech, E., et al., *Hereditary Multiple Exostoses-A Review of the Molecular Background, Diagnostics, and Potential Therapeutic Strategies*. Front Genet, 2021. **12**: p. 759129.
194. Weber-Lassalle, N., et al., *BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer*. Breast Cancer Res, 2018. **20**(1): p. 7.
195. Maistro, S., et al., *Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in epithelial ovarian cancer patients in Brazil*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 934.
196. Barbosa, A., et al., *Gene Panel Tumor Testing in Ovarian Cancer Patients Significantly Increases the Yield of Clinically Actionable Germline Variants beyond BRCA1/BRCA2*. Cancers (Basel), 2020. **12**(10).
197. Elsaid, A., et al., *Association of monoallelic MUTYH mutation among Egyptian patients with colorectal cancer*. Fam Cancer, 2017. **16**(1): p. 83-90.
198. Win, A.K., et al., *Cancer risks for monoallelic MUTYH mutation carriers with a family history of colorectal cancer*. Int J Cancer, 2011. **129**(9): p. 2256-62.
199. Thompson, A.B., et al., *Monoallelic MUTYH pathogenic variants ascertained via multi-gene hereditary cancer panels are not associated with colorectal, endometrial, or breast cancer*. Fam Cancer, 2022. **21**(4): p. 415-422.
200. Yurgelun, M.B., et al., *Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer*. J Clin Oncol, 2017. **35**(10): p. 1086-1095.
201. Baxter, E.J., et al., *Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders*. Lancet, 2005. **365**(9464): p. 1054-61.
202. Bench, A.J., et al., *Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations*. Br J Haematol, 2013. **160**(1): p. 25-34.
203. Steensma, D.P., et al., *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes*. Blood, 2015. **126**(1): p. 9-16.
204. Celik, F., et al., *Comparison of SUVmax Values Obtained from F-18 FDG PET/CT and Cell-free DNA Levels Measured from Plasma in Oncology Patients*. Mol Imaging Radionucl Ther, 2019. **28**(2): p. 46-52.
205. Chan, H.T., et al., *Clonal Hematopoiesis in Liquid Biopsy: From Biological Noise to Valuable Clinical Implications*. Cancers (Basel), 2020. **12**(8).

-
206. Rodon Font, N., et al., *Concordance analysis between liquid biopsy (ctDNA) and tumor DNA molecular profiles from panel-based next-generation sequencing*. Rev Esp Patol, 2022. **55**(3): p. 156-162.
207. Tran, M.C., et al., *Brief Report: Discordance Between Liquid and Tissue Biopsy-Based Next-Generation Sequencing in Lung Adenocarcinoma at Disease Progression*. Clin Lung Cancer, 2023. **24**(3): p. e117-e121.
208. Daly, M.B., et al., *Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl Compr Canc Netw, 2021. **19**(1): p. 77-102.
209. Vollbrecht, C., et al., *Validation and comparison of two NGS assays for the detection of EGFR T790M resistance mutation in liquid biopsies of NSCLC patients*. Oncotarget, 2018. **9**(26): p. 18529-18539.
210. Filges, S., et al., *Impact of Polymerase Fidelity on Background Error Rates in Next-Generation Sequencing with Unique Molecular Identifiers/Barcodes*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 3503.
211. Gale, D., et al., *Residual ctDNA after treatment predicts early relapse in patients with early-stage non-small cell lung cancer*. Ann Oncol, 2022. **33**(5): p. 500-510.
212. Cifuentes, G.A., et al., *Clinical utility of liquid biopsy and integrative genomic profiling in early-stage and oligometastatic cancer patients treated with radiotherapy*. Br J Cancer, 2023. **128**(5): p. 857-876.
213. Wang, X., et al., *Prognostic value of circulating tumour DNA during post-radiotherapy surveillance in locally advanced esophageal squamous cell carcinoma*. Clin Transl Med, 2022. **12**(11): p. e1116.
214. Jia, R., et al., *Post-radiation circulating tumor DNA as a prognostic factor in locally advanced esophageal squamous cell carcinoma*. Oncol Lett, 2021. **21**(1): p. 68.
215. Otake, S. and T. Goto, *Stereotactic Radiotherapy for Oligometastasis*. Cancers (Basel), 2019. **11**(2).
216. Reichert, Z.R., et al., *Prognostic value of plasma circulating tumor DNA fraction across four common cancer types: a real-world outcomes study*. Ann Oncol, 2023. **34**(1): p. 111-120.
217. Stover, D.G., et al., *Association of Cell-Free DNA Tumor Fraction and Somatic Copy Number Alterations With Survival in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer*. J Clin Oncol, 2018. **36**(6): p. 543-553.
218. Kohli, M., et al., *Clinical and genomic insights into circulating tumor DNA-based alterations across the spectrum of metastatic hormone-sensitive and castrate-resistant prostate cancer*. EBioMedicine, 2020. **54**: p. 102728.
219. Choudhury, A.D., et al., *Tumor fraction in cell-free DNA as a biomarker in prostate cancer*. JCI Insight, 2018. **3**(21).
220. Huang, K., et al., *Radiographic Changes After Lung Stereotactic Ablative Radiotherapy (SABR) -- Can We Distinguish Fibrosis From Recurrence? A Systematic Review of the Literature*. Pract Radiat Oncol, 2013. **3**(2 Suppl 1): p. S11-2.
221. Wang, B., et al., *Postoperative ctDNA detection predicts relapse but has limited effects in guiding adjuvant therapy in resectable stage I NSCLC*. Front Oncol, 2023. **13**: p. 1083417.
222. Fu, R., et al., *Postoperative circulating tumor DNA can refine risk stratification in resectable lung cancer: results from a multicenter study*. Mol Oncol, 2023. **17**(5): p. 825-838.
223. Hofste, L.S.M., et al., *Circulating tumor DNA detection after neoadjuvant treatment and surgery predicts recurrence in patients with early-stage and locally advanced rectal cancer*. Eur J Surg Oncol, 2023. **49**(7): p. 1283-1290.
224. Guo, K., et al., *Prognostic value of postoperative ctDNA detection in patients with early non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis*. Ther Adv Med Oncol, 2023. **15**: p. 17588359231177008.
225. Sicklick, J.K., et al., *Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I-PREDICT study*. Nat Med, 2019. **25**(5): p. 744-750.
226. Adashek, J.J., V. Subbiah, and R. Kurzrock, *From Tissue-Agnostic to N-of-One Therapies: (R)Evolution of the Precision Paradigm*. Trends Cancer, 2021. **7**(1): p. 15-28.
227. Beaubier, N., et al., *Integrated genomic profiling expands clinical options for patients with cancer*. Nat Biotechnol, 2019. **37**(11): p. 1351-1360.
228. Miljanic, M., et al., *The Evolving Interplay of SBRT and the Immune System, along with Future Directions in the Field*. Cancers (Basel), 2022. **14**(18).

APÉNDICES

Índice de APÉNDICES

APÉNDICE 1. Secuencias de los oligonucleótidos cebadores empleados para las PCRs dirigidas: PCRs específicas.

APÉNDICE 2. Secuencias de los oligonucleótidos cebadores empleados para las PCRs dirigidas: PCRs de indexado.

APÉNDICE 3. Condiciones de reacción de PCR del procedimiento de monitorización de ctDNA basado en PCR dirigida + NGS profunda.

APÉNDICE 4. Información demográfica y clínica detallada de los pacientes de la cohorte.

APÉNDICE 5. Valores de [cfDNA].

APÉNDICE 6. Variantes identificadas mediante el panel de biopsia líquida.

APÉNDICE 7. Espectro mutacional de los pacientes segregados por grupo clínico.

APÉNDICE 8. Listado de todas las variantes somáticas detectadas en la biopsia líquida y/o en la biopsia de tejido.

APÉNDICE 9. Concordancia entre la biopsia de tejido y la biopsia líquida en pacientes con cáncer de pulmón.

APÉNDICE 10. Estudio longitudinal del ctDNA a lo largo de todo estudio.

APÉNDICE 11. Artículos científicos publicados en revistas indexadas.

APÉNDICE 1. Secuencias de los oligonucleótidos cebadores empleados para las PCR dirigidas: PCR específica (1ª PCR)

Gen	c.Hgvs; p.Hgvs	Coordenadas (GRCh37)	Secuencia de los oligonucleótidos cebadores (5'→3')
ALK	c.3599C>T; p.Ala1200Val	2:29443618	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTTTCATCTGCTGGAGCTCAT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTCTCTCCGAGGAAGGACT
ARID1A	c.6298C>T; p.Gln2100*	1:27106687	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGGGAGTTTGGCCCTCAG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTCTCTGCGGGGAAAGG
ATM	c.8977C>T; p.Arg2993*	11:108235935	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTTCACCTACTCTGAATGCAG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGACCTTCTTAAAAACTGCTCACC
ATM	c.6056A>G; p.Tyr2019Cys	11:108186599	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCAGAAGTATAGGGGAGCCAGA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTACATCTTCCCTCCACCACAG
ATR	c.5528C>T; p.Ser1843Phe	3:142217469	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCCTCAAAATATATTCATATCTCGTT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGAACAAATTTACTCTTTCA
BAP1	c.400G>A; p.Ala134Thr	3:52441452	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGATGTCGTTCACTTTTACTGAGC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTTTTATGGCAGAGGCTTA
BRAF	c.1458_1472del; p.Asn486_Thr491>Lys	7:140477835	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTGAAGGCTTGTAACTGCTGA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGATGTGGCAGTGAAAATGT
BRAF	c.1661T>C; p.Ile554Thr	7:140476745	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGTGCAGTCTGTGCTGCAATA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCCATCTCCATATCATTGAGACCA
BRAF	c.1799T>A; p.Val600Glu	7:140453136	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGATGGGACCCACTCCATCG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCATGAAGACCTCAGAGTAAAAA
BRAF	c.1799T>A; p.Val600Glu	7:140453136	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGATGGGACCCACTCCATCG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCATGAAGACCTCAGAGTAAAAA
BRCA2	c.1705C>T; p.Gln569*	13:32907320	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTCCAAATTTAATTGATAATGGAAGC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTGCATTTCTCAAAGCTACACA
BRCA2	c.3006delT; p.His1003fs*40	13:32911496	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGGCAGGACTCTTAGTCCAA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCGAAGCTACCTCCAAAAGTCTG
CCND3	c.96_97delinsTT; p.Arg33Cys	6:41909291	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGGTACGTAGCGCTCCTCCAG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCGAAGGCACCCGGCAGCGCG
CDK6	c.920A>G; p.Lys307Arg	7:92244515	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGCAGGTGGGAATCCAGGT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGCCCTGTCTCACCATAC
CDKN1A	c.35delC; p.Pro12Hisfs*19	6:36651910	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTAGAACCAGGCTGGGGATGT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCCACTGGGCCGAAGAG
CSF3R	c.514G>A; p.Asp172Asn	1:36939195	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGTCTTGGGCACGCAGCTC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCAAGCCTGGACTATTGG
CTNNB1	c.94G>T; p.Asp32Tyr	3:41266097	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTAAGCGGCTGTTAGTCACTGG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTAGTGGCACCAGAAATGG
EGFR	c.1549G>T; p.Gly517Cys	7:55229242	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTAGGTCTGCCATGCCTTGT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGACATTCGGCAAGAGAC
EGFR	c.2236_2250del; p.Glu746_Ala750del	7:55242465	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTGGATCCCAGAAGGTGAGAA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGATTTCTTGTGGCTTTC
EGFR	c.2237_2255delinsT; p.Glu746_Ser752delinsVal	7:55242467	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGGATCCCAGAAGGTGAGA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGATTTCTTGTGGCTTTCG
EGFR	c.828G>T; p.Gln276His	7:55221784	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTATGCTCTACACCCCAACCAC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGGCACCACCAAGCTGATT
EGFR	c.1787C>T; p.Pro596Leu	7:55233037	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGTGTGCCACTACATTGACG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAGGGTGTGTTTCTCC
ERBB2	c.62C>G; p.Ala21Gly	17:37856553	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGCTCCTCCTCCGCTCCTT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACACCCAGACCCACT
FBXW7	c.1393C>T; p.Arg465Cys	4:153249385	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCCAACCATGACAAGATTTTCC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCACCTTATATGGGCATACTTCCA
FBXW7	c.355G>T; p.Asp119Tyr	4:153332601	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGATCAAAATCGTCACTCTCC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGGTGAACAAGATGAGG
FGFR1	c.873G>A; p.K291K	8:38282090	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTGGTCTCCCATCTCACTCGAT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCGTGGAGTTTATGTTAAGGTG
FGFR2	c.2329G>A; p.Glu777Lys	10:123239508	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCAGAATCATCTCCTGAAGAACA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGAATACTTGGACCTCAGCCAAC
FGFR2	c.1615A>G; p.Lys539Glu	10:123258066	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTGCAGGCTCCAAGAAGATTT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTATCTGGTGTGACAGATGGA
GNAS	c.765C>T; p.Phe255Phe	20:57429085	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCGCACAAAGTCGACGGCAG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGAGGGGAGGCGCGTTC
GNAS	c.200C>T; p.Ala67Val	20:57428520	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTATCCCGTCGAGAATGATG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTGAAAGTTGGGTCTGGAG
GNAS	c.1640G>A; p.Arg547His	20:57429960	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGCCGATCCGCTACTC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCTGTCTCTCGGACTTGC
IDH2	c.879G>T; p.Met293Ile	15:90630432	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTAGTCTTTCGAGGCCACAC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGCACCGGCTCATTGAT
IGF1R	c.2935G>T; p.Glu979*	15:99473513	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGGGGAAATGGAGTCTGTAT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCCGACTCTTACCATCAG
JAK1	c.3409T>C; p.Ser1137Pro	1:65300301	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTAATGAGCCACACCTCACGTT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGATTTGCTAAATCCAGAAATACACTC
JAK2	c.1849G>T; p.Val617Phe	chr9:5073770	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTAGCAAGCTTCTCACAAGCA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCTGTAGTTTACTTACTCTCGTCTC
JAK2	c.1849G>T; p.Val617Phe	9:5073770	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTAGCAAGCTTCTCACAAGCA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCTGTAGTTTACTTACTCTCGTCTC
JAK3	c.3073G>C; p.Asp1025His	19:17941335	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCGAGGGGCTGCAGCTTT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTCTCGCCAGTCAGACG

Gen	c.Hgvs; p.Hgvs	Coordenadas (GRCh37)	Secuencia de los oligonucleótidos cebadores (5'→3')
KDR	c.802C>A; p.Gln268Lys	4:55979645	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTTGGGTTTTTAGGTCTCGGTTT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTCTGTGCTTTGGAAGTTCA
KDR	c.283G>C; p.Gly95Arg	4:55984846	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCACTTGTAGGCTCCAGTGTC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCGATGGCCCTCTCTGTAA
KDR	c.1252T>C; p.Tyr418His	4:55976573	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTGGGGCAGAGAGAAAATTG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCATGTGGTCTCTCTGGT
KIT	c.2447A>T; p.Asp816Val	4:55599321	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCAAGATTTTGTGATTTTGGTCTAGC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGGTACTCACGTTTCCCTTT
KIT	c.2459A>T; p.Asp820Val	4:55599333	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCAAGATTTTGTGATTTTGGTCTAGC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGGTACTCACGTTTCCCTTT
KRAS	c.35G>T; p.Gly12Val	12:25398284	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGTATCGTCAAGGCACTCT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTACTGAAATATAAACTTGTGGTAGTTG
KRAS	c.34G>T; p.Gly12Cys	12:25398285	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGTATCGTCAAGGCACTCT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTACTGAAATATAAACTTGTGGTAGTTG
KRAS	c.38G>A; p.Gly13Asp	12:25398281	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGTATCGTCAAGGCACTCT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTACTGAAATATAAACTTGTGGTAGTTG
KRAS	c.34G>C; p.Gly12Arg	12:25398285	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGTATCGTCAAGGCACTCT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTACTGAAATATAAACTTGTGGTAGTTG
KRAS	c.35G>A; p.Gly12Asp	12:25398284	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTGTATCGTCAAGGCACTCT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTACTGAAATATAAACTTGTGGTAGTTG
KRAS	c.437C>T; p.Ala146Val	12:25378561	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTTTCAGTGTACTTACCTGTCTTGTGTC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCTCAGGACTTAGCAAGAA
KRAS	c.182A>T; p.Gln61Leu	12:25380276	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTCCCTCATTTGCACTTCTTCC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGAGAAACCTGTCTCTTGGGA
MAP2K1	c.171G>T; p.Lys57Asn	15:66727455	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTTGGGCTTCTTCTACCC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTCAAGTGTCTCACTCTTC
MAP2K2	c.181A>G; p.Lys61Glu	19:4117539	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCCAGCTCTGAGATCTCTTTCG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCTGGAAAGCCTTCTCTCAC
MET	c.3869T>C; p.Phe1290Ser	7:116435779	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGAGCCCACTTATCTCTGA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGCAGTATTCCGGTGTAG
MET	c.1392+1G>A	7:116371914	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTACATCAGAGGGTTCGCTTCA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTAACGAAAACAAATTAATTGCACA
MET	c.2610delT; p.Gly872Valfs*4	7:116409723	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGGGAAATGATATTGACCCGTGA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTCACAGCTCTTATTTCACACTTT
MTOR	c.3191G>A; p.Gly1064Glu	1:11273550	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTGGGGCAGGTAGAGCTTAA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTATTGAGCAAAATGTGGTAGC
MTOR	c.6305A>T; p.Asp2102Val	1:11187113	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGCTTTGAGATTCGTCGGAAC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGAAATGTCAAGGACCTCA
MTOR	c.5455C>A; p.His1819Asn	1:11190744	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTAGTGGTGGGCTTGGTGAT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGCGATGAGAAAGAAAC
MYC	c.266A>G; p.Tyr89Cys	8:128750729	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGGAAGAAATTCGAGCTGCTG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAGGGAGAGGGGTGTGACC
NF1	c.5782delG; p.Glu1928fs*14	17:29657484	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGAGCCCGGAGAAAGTGTCTAGC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCTCTCTCTTCTCTCTCT
NF1	c.4285G>A; p.Ala1429Thr	17:29586065	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCCCTGTTTATTGTGTAGATACTCAG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGAAGGCCGATATGTTCT
NF1	c.5147C>G; p.Ala1716Gly	17:29653149	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTACTGGCCTCAAAGGTAGCAA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGTTCTCATGCTCTATGTGC
NF1	c.3736delC; p.Leu1246Cysfs*20	17:29562655	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGATGAAGTACTGCGAGTTCTGG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTAACATGTTCCAGAGCAGTTGG
NF1	c.998_999insA; p.Tyr333fs*1	17:29527549	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTTGCCTGTGTCAAAGTGTGATAA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGACTGAACAAGTAGGAAATGA
NF1	c.784delC; p.Arg262Valfs*19	17:29509578	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGACTTGGTGGATGGTTTTCG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGATTTGTAGTGGCCAACTGC
NF1	c.1812delG; p.Ile605fs*26	17:29550551	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCTCAAAGTGGTTGCGGAAATA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTAAATATGTCATTTTGCTTACC
NOTCH1	c.2936A>G; p.His979Arg	9:139404218	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGCAGTCAGGCGTGTGTGTC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGACTGCGTGGACAGCTACAC
NOTCH1	c.3429G>T; p.Glu1143Asp	9:139402488	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGCTGGGTGAGCACTCTGTC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGCTACACAGGCACTACT
PDCD1LG2	c.497A>G; p.His166Arg	9:5549470	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCGCAGAAGTATCTTGCCAAA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGACCTGGTAGAGGCCTTCAG
PDGFRB	c.1947G>A; p.Met649Ile	5:149503889	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCAGGTTGACCACGTTTACAGT rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGCAGTGAGAAGCAAGC
PIK3CA	c.1624G>A; p.Glu542Lys	3:178936082	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGACAAAGAACAGCTCAAAGCAA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAAATCTTTCTCTCTGCTCAGTG
PIK3CA	c.328G>A; p.Glu110Lys	3:178916941	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTAAGTAATTGAACAGTAGGCAACC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGTATCATACCAATTTCTCGATTG
PIK3CA	c.1624G>A; p.Glu542Lys	3:178936082	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGACAAAGAACAGCTCAAAGCAA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAAATCTTTCTCTCTGCTCAGTG
PIK3CA	c.772G>T; p.Asp258Tyr	3:178919287	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGGCAAGTATATTTTAAAGTGTGTGG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTACTCACCTTATACTGACTCAGAGGA
PIK3CA	c.1633G>A; p.Glu545Lys	3:178936091	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTCACAGATCTCTCTCTGAAATC rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC
PIK3CA	c.1624G>A; p.Glu542Lys	3:178936082	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGACAAAGAACAGCTCAAAGCAA rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAAATCTTTCTCTCTGCTCAGTG
POLE	c.1524_1525delGGinsTT; p.Gln508_Ala509delinsHisSer	12:133249374	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGTTGGGGAAGATGATGTTGG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGGCTCTGGCACTCTGT
POLE	c.3583-2A>T	12:133226477	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGCCTCGGACTGTCTTCTGAG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCCCAGATCTCTGAGATTT
PTEN	c.425G>A; p.Arg142Gln	10:89692941	fwd: ACACGACGCTCTTCCGATCTGGAAGGGGACGAAGCTGGTG rev: GACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGGGCTCTTGTGCCTTTA

Gen	c.Hgvs; p.Hgvs	Coordenadas (GRCh37)	Secuencia de los oligonucleótidos cebadores (5'→3')
PTEN	c.494G>A; p.Gly165Glu	10:89711876	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTTTTTCAATTTGGCTTCTCTTTTT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACACATAGCGCCTCTGACTG
PTEN	c.635-1G>C	10:89717609	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGTTAAAGGCATTTCTGTG rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTTACCCTTAGCTGGCAGACC
PTEN	c.533A>G; p.Tyr178Cys	10:89711915	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGTCAGAGGCGCTATGTGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTAATCCAGATGATTCCTTAACAGGT
PTPN11	c.1282G>A; p.Val428Met	12:112924336	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGCAATACCCTTTCCGGACCT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCCTCCAGGAAGTCCAGCAC
RB1	c.380+3A>T	13:48916853	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTTGCTTCAAATCCTTCAATAAGGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTTTATGAGGAAATGCTGGGAAT
RB1	c.1332+1del; p.Gln444Hisfs*13	13:48951169	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTTGCTAAAGCTGTGGACAGG rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTAGTACCACGAATACAAATGAATTCA
RB1	c.380+1G>T	13:48916851	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGATGTGCTTCACTTTTACTGAGC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTTCTTTTATGGCAGAGGCTTA
RB1	c.2134T>C; p.Cys712Arg	13:49037894	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTTTTACTAGATTATGATGTGTCCATGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTTGCTGTATCAATGATTTTGAATTT
RET	c.1250G>T; p.Arg417Leu	10:43604665	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCTACTCCCTTCCGTGAGCA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCCCAGACAGGCAATAGGTA
STK11	c.394T>C; p.Cys132Arg	19:1219342	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCCCCAGTATATGGTATGG rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCTGTCCAGATTTCTGCAAT
TP53	c.1023_1024delCCinsAT; p.Phe341_Arg342	17:7574003	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCCTGGGCATCCTTGAGTTCC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCAGATCCGTGGGCGTGAG
TP53	c.659A>G; p.Tyr220Cys	17:7578190	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTACCTGGCATGGCTATTATGG rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTAGCAAAGGATATGCGATTGG
TP53	c.991C>T; p.Gln331*	17:7576855	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGAACTTTCCACTTGATAAGAGGTC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGAAGAAACCACTGGATGGAGA
TP53	c.742C>T; p.Arg248Trp	17:7577539	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGTCTTCCAGTGTGATGATGGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGTAACAGTTCTCTGCATGGGC
TP53	c.817C>T; p.Arg273Cys	17:7577121	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCCCAGGACAGGCACAAAC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACTGGACGGAAACAGCT
TP53	c.80delC; p.Pro27Leufs*17	17:7579715	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGCCCAACCTTGTCTTAC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCCATGGGACTGACTTTCTGCT
TP53	c.982_987delTTCACinsA; p.Phe328fs*7	17:7576859- 7576864	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTTTCCACTTGATAAGAGGTC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCCAGCAAAGAAGAAACAC
TP53	c.823T>C; p.Cys275Arg	17:7577115	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCTTGGCGAGATTTCTCTTC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGACGGAACAGCTTTGAGGTG
TP53	c.467G>C; p.Arg156Pro	17:7578463	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGCTGTGGGTTGATTTCA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGCTGTGACTGCTTGTAGATGG
TP53	c.749C>T; p.Pro250Leu	17:7577532	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGTCTTCCAGTGTGATGATGGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGTAACAGTTCTCTGCATGGGC
TP53	c.467G>C; p.Arg156Pro	chr17:7578463	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGCTGTGGGTTGATTTCA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGCTGTGACTGCTTGTAGATGG
TP53	c.646G>A; p.Val216Met	17:7578203	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGTTGCAACACAGACTCA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGGATGACAGAAACACTTTTTCG
TP53	c.560-2A>G	17:7578291	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTACAGCAAATTTCTTCCAC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCTCAGGCTCTGATTTCTCACT
TP53	c.686_687del; p.Cys229Tyrs*10	17:7577593	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGCCCATGACAGGAACTGTTA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTTGGGCTGTGTTATCTCC
TP53	c.469G>T; p.Val157Phe	17:7578461	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGTGTGGGTTGATTTCA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGCTGTGACTGCTTGTAGATGG
TP53	c.473G>T; p.Arg158Leu	17:7578457	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGCTGTGGGTTGATTTCA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGCTGTGACTGCTTGTAGATGG
TP53	c.524G>A; p.Arg175His	17:7578406	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGCTGTGCTCACCATCGTATCT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACATGACGGAGGTTGTGAGG
TP53	c.552delT; p.Asp184Glufs*63	17:7578377	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGCCCTGCTGCTCTCTCCAG rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACATGACGGAGGTTGTGAGG
TP53	c.536A>G; p.His179Arg	17:7578394	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGCTGCTCACCATCGTATCT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACATGACGGAGGTTGTGAGG
TP53	c.375+1G>T	17:7579311	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAAGTCTCATGGAAGCCAGCC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGGACAGCCAAAGTCTGTGACT
TP53	c.747G>T; p.Arg249Ser	17:7577534	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGTCTTCCAGTGTGATGATGGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGTAACAGTTCTCTGCATGGGC
TP53	c.745A>T; p.Arg249Trp	17:7577536	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGTCTTCCAGTGTGATGATGGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGTAACAGTTCTCTGCATGGGC
TP53	c.949C>T; p.Gln317*	17:7576897	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGGGTGAAATATTCTCATCCAGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCCAACAACACCAGCTCTCTCT
TP53	c.638G>A; p.Arg213Gln	17:7578211	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCATAGGGCACACCACACTA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGTGGAAGGAAATTTGCGTGT
TP53	c.880G>T; p.Glu294*	17:7577058	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTACCTCGCTTAGTGTCTCCCT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGGCGCACAGGAAAGAGAAAT
TP53	c.569C>T; p.Pro190Leu	17:7578280	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTACAGCAAATTTCTTCCAC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCTCAGGCTCTGATTTCTCACT
TP53	c.524G>A; p.Arg175His	17:7578406	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGCTGCTCACCATCGTATCT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACATGACGGAGGTTGTGAGG
TP53	c.818G>T; p.Arg273Leu	17:7577120	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCCCAGGACAGGCACAAAC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACTGGACGGAAACAGCT
TP53	c.465_466dupCC; p.Arg156Profs*15	17:7578463	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGCTGTGGGTTGATTTCA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGCTGTGACTGCTTGTAGATGG

Gen	c.Hgvs; p.Hgvs	Coordenadas (GRCh37)	Secuencia de los oligonucleótidos cebadores (5'→3')
TP53	c.385_392dup; p.Asn131Lysfs*42	17:7578537	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGGCCAGTTGGCAAACAT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGGCCAGTTTCAACTCTGT
TP53	c.746G>A; p.Arg249Lys	17:7577535	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGTCTTCCAGTGTGATGATGGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGTAACAGTTCCTGCATGGGC
TP53	c.461G>T; p.Gly154Val	17:7578469	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGCTGTGGGTTGATTTCCA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGCTGTGACTGCTGTAGATGG
TP53	c.359A>G; p.Lys120Arg	17:7579328	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGTACGGTTTCCGCTCTGG rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACTGACCGTGCAAGTACAG
TP53	c.743G>A; p.Arg248Gln	17:7577538	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGTCTTCCAGTGTGATGATGGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGTAACAGTTCCTGCATGGGC
TP53	c.694_696delATC; p.Ile232del	17:7577584	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGGAAGTGTACACATGTAGTTGT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCCTAGGTTGGCTCTGACTGT
TP53	c.943delT; p.Ser315Leufs*30	17:7576902	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGGGTGAAATATTCTCCATCCAGTG rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTTCTAGCACTGCCCAACAAC
TP53	c.574C>T; p.Gln192*	17:7578275	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTACACGCAATTTCTTCCAC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTCTCAGGCCTCTGATTCCTCACT
TP53	c.818G>C; p.Arg273Pro	17:7577120	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCCCAGGACAGGCACAAAC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACTGGGACGGAAACAGT
TP53	c.707A>C; p.Tyr236Ser	17:7577574	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGATGGGCTCCGGTTTCATG rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGGCTCTGACTGTACCACCA
TP53	c.527G>A; p.Cys176Tyr	17:7578403	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGCTGCTCACCATCGCTATCT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACATGACGGAGGTTGTGAGG
TP53	c.434T>A; p.Leu145Gln	17:7578496	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGGGGTGTGGAAATCAACC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTAGTACTCCCTGCCCTCAAC
TP53	c.541C>T; p.Arg181Cys	17:7578389	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTGCTGCTCACCATCGCTATCT rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTACATGACGGAGGTTGTGAGG
TP53	c.375+1G>A	17:7579311	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAAGTCTCATGGAAGCCAGCC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGGACAGCCAAAGTCTGTGACT
TP53	c.403T>C; p.Cys135Arg	17:7578527	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAATCAACCCACAGCTGCAC rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTAGTACTCCCTGCCCTCAAC
TSC2	c.4209C>A; p.Asp1403Glu	16:2134432	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTAGCTCCTCTCCCGAGCTG rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTGCCTTAACCTCAGGGCTCA
VEGFA	c.268C>T; p.Pro90Ser	6:43738711	fwd: ACACGACGCTCTCCGATCTCAGTTGCAAACAGACCTCA rev: GACGTGTGCTCTCCGATCTTGATGACAGAAACATTTTCG

fwd: oligonucleótido cebador directo; *rev*: oligonucleótido cebador reverso.

APÉNDICE 2. Secuencias de los oligonucleótidos cebadores empleados para las PCRs dirigidas: PCR de indexado (2ª PCR)

Nombre Oligo	Secuencia de los oligonucleótidos cebadores (5'→3')
P5indexD501	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT TATAGCCT TACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P5indexD502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ATAGAGGC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P5indexD503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CCTATCCT TACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P5indexD504	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GGCTCTGA ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P5indexD505	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC AGGGAAG ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P5indexD506	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT TAATCTTA ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P5indexD507	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CAGGACGT TACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P5indexD508	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GTA CTGAC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P5indexD509	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ACCTGATG ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P5indexD510	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT TGCACATC ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
P7indexD701	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGAGTAAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD702	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCTCCGAGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD703	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AATGAGCGGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD704	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GGAATCTC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD705	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TTCTGAAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD706	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ACGAATTC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD707	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AGCTTCAG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD708	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GCGCATTA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD709	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CATAGCCGG TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD710	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TTTCGCGGA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD711	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GCGCGAGA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
P7indexD712	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CTATCGCT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

Se colorea en azul la secuencia única del index de cada oligonucleótido.

APÉNDICE 3. Condiciones de reacción de PCR del procedimiento de monitorización de ctDNA basado en PCR dirigida + NGS profunda.

Mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
<i>5× Herculase II reaction buffer</i>	5
<i>dNTP mix (25 mM each dNTP)</i>	0,25
<i>Herculase II fusion DNA polymerase</i>	0,25
Oligonucleótido cebador directo 5 µM *	0,4
Oligonucleótido cebador reverso 5 µM *	0,4
ADN molde (1-10 ng)	variable
Agua libre de nucleasas	hasta 25
VOLUMEN TOTAL	25

* En el caso de ser una PCR multiplex (en la que se realiza amplificación de varias regiones en el mismo tubo) se añade a la mezcla de reacción el volumen indicado de cada uno.

Programa de amplificación:

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	2 min
2	16	95 °C	20 s
		65 °C	20 s
		72 °C	30 s
3	1	72 °C	3 min

APÉNDICE 4. Información demográfica y clínica detallada de los pacientes de la cohorte.

Paciente #	Sexo	Hábito tabáquico	Edad	Grupo clínico	Órgano de origen del primario	Histología del primario	Lesión irradiada (en caso de lesiones múltiples, el número)	Órgano irradiado	Tamaño de la lesión irradiada (cc)	Estadio clínico	Enfermedad maligna concurrente	Fraccionamiento	Técnica RT	Nº de fracciones	Dosis total (Gy)	Biopsia de tejido y biopsia líquida emparejadas	Test genómico sobre biopsia de tejido	Test genómico sobre biopsia líquida	Test genómico
1	Mujer	Fumador	53	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	10,83	IA3	No	HFRT	SBRT	5	55	Sí	Sí	Sí	Sí
2	Mujer	No fumador	83	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	17,7	IA3	No	HFRT	SBRT	5	60	Sí	Sí	Sí	Sí
3	Hombre	Exfumador	71	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma pobremente diferenciado)	Primario	Pulmón	4,02	I	No	HFRT	SBRT	5	60	Sí	Sí	Sí	Sí
4	Hombre	Fumador	82	OMT+	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	12,82	IV	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos	HFRT	SBRT	5	55	Sí	Sí	Sí	Sí
5	Hombre	Exfumador	51	OMT	Piel	Carcinoma pilomatrixial	Metástasis	Pulmón	3,91	IV	No	HFRT	SBRT	5	55	No	Sí	Sí	Sí
6	Mujer	No fumador	73	OMT+	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis	Hígado	2,86	IV	Metástasis hepáticas	HFRT	SBRT	5	50	No	Sí	Sí	Sí
7	Mujer	No fumador	52	OMT+	Útero	Leiomioma	Metástasis	Cuello (tejido blando)	44,64	IV	Metástasis pulmonares	HFRT	SBRT	5	30	No	Sí	Sí	Sí
8	Mujer	Exfumador	45	OMT+	Útero	Carcinoma de célula escamosa	Metástasis	Pulmón	4,32	IV	Metástasis pulmonar	HFRT	SBRT	5	60	Sí	Sí	Sí	Sí
9	Hombre	Exfumador	50	OMT+	Riñón	Carcinoma de células claras	Metástasis	Hígado	22,11	IV	Metástasis pulmonares	HFRT	SBRT	5	50	Sí	Sí	Sí	Sí
10	Mujer	Exfumador	64	OMT	Útero	Carcinosarcoma	Metástasis	Pulmón	0,97	IV	No	HFRT	SBRT	5	60	No	Sí	Sí	Sí
11	Hombre	Exfumador	71	OMT	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Metástasis	Pulmón	1,89	IV	No	HFRT	SBRT	5	50	NA	No	Sí	Sí
12	Mujer	No fumador	41	OMT	Vejiga	Adenocarcinoma	Metástasis	Pulmón	0,94	IV	No	HFRT	SBRT	5	55	No	Sí	Sí	Sí
13	Mujer	Fumador	68	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	1,99	I	No	HFRT	SBRT	5	60	Sí	Sí	Sí	Sí

Paciente #	Sexo	Hábito tabáquico	Edad	Grupo clínico	Órgano de origen del primario	Histología del primario	Lesión irradiada (en caso de lesiones múltiples, el número)	Órgano irradiado	Tamaño de la lesión irradiada (cc)	Estadio clínico	Enfermedad maligna concurrente	Fraccionamiento	Técnica RT	Nº de fracciones	Dosis total (Gy)	Biopsia de tejido y biopsia líquida emparejadas	Test genómico sobre biopsia de tejido	Test genómico sobre biopsia líquida	Test genómico germinal
14	Hombre	Exfumador	81	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	15,32	IB	No	HFRT	SBRT	5	55	Sí	Sí	Sí	
15	Mujer	Fumador	61	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	16,1	I	No	HFRT	SBRT	5	55	Sí	Sí	Sí	
16	Mujer	Fumador	55	OMT+	Pulmón	CPCP	Metástasis	Hígado	69,11	IV	Metástasis hepáticas	HFRT	SBRT	5	45	Sí	Sí	Sí	
17	Mujer	No fumador	69	OMT	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis (5)	Pulmón	0,72 / 2,8 / 2,28 / 2,22 / 1,75	IV	No	HFRT	SBRT	5	55	No	Sí	Sí	
18	Hombre	Exfumador	79	OMT	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario y metástasis	Pulmón	3,89 / 0,29	IV	No	HFRT	SBRT	5	55	Sí	Sí	Sí	
19	Hombre	Exfumador	87	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma pobremente diferenciado)	Primario	Pulmón	16,58	IA3	No	HFRT	SBRT	5	55	Sí	Sí	Sí	
20	Hombre	Fumador	61	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	82,57	IA1	No	HFRT	SBRT	5	40	Sí	Sí	Sí	
21	Hombre	Fumador	64	OMT	Páncreas	Adenocarcinoma ductal	Metástasis	Ombiligo	23,45	IV	No	HFRT	SBRT	5	30	Sí	Sí	Sí	
22	Hombre	Exfumador	79	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	7,45	IA	No	HFRT	SBRT	5	60	NA	No	Sí	
23	Hombre	Exfumador	68	ES	Pulmón	CPCP	Primario	Pulmón	9,38	I	No	HFRT	SBRT	5	50	Sí	Sí	Sí	
24	Mujer	No fumador	78	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	6,7	IA3	No	HFRT	SBRT	5	60	Sí	Sí	Sí	
25	Hombre	Exfumador	70	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	9,47	IA3	No	HFRT	SBRT	5	60	NA	No	Sí	
26	Hombre	Exfumador	66	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	6,37	I	No	HFRT	SBRT	5	50	No, pero recurrencia	Sí	Sí	Sí

Paciente #	Sexo	Hábito tabáquico	Edad	Grupo clínico	Órgano de origen del primario	Histología del primario	Lesión irradiada (en caso de lesiones múltiples, el número)	Órgano irradiado	Tamaño de la lesión irradiada (cc)	Estadio clínico	Enfermedad maligna concurrente	Fraccionamiento	Técnica RT	Nº de fracciones	Dosis total (Gy)	Biopsia de tejido y biopsia líquida emparejadas	Test genómico sobre biopsia de tejido	Test genómico sobre biopsia líquida	Test genómico
27	Hombre	Fumador	57	OMT	Vejiga	Carcinoma de célula de transición de alto grado	Metástasis (2)	Pulmón	6,62 / 0,29	IV	No	HFRT	SBRT	450	54	Sí	Sí	Sí	Sí
28	Hombre	Exfumador	66	OMT+	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis (5)	Pulmón	0,48 / 0,34 / 0,30 / 0,05 / 0,06	IV	Metástasis abdominal / Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos	HFRT	SBRT	8 / 8 / 8 / 8 / 5	60 / 60 / 60 / 60 / 60	No	Sí	Sí	Sí
29	Hombre	Exfumador	80	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma pobremente diferenciado)	Primario	Pulmón	30,08	I	No	HFRT	SBRT	8	60	Sí	Sí	Sí	Sí
30	Hombre	No fumador	83	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	8,66	IB	No	HFRT	SBRT	8	60	Sí	Sí	Sí	Sí
31	Hombre	Fumador	76	ES	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	17,25	IA2	No	HFRT	SBRT	8	60	Sí	Sí	Sí	Sí
32	Hombre	Exfumador	79	OMT+	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	27,55	IV	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos	HFRT	SBRT	8	60	Sí	Sí	Sí	Sí
33	Hombre	Exfumador	52	OMT	Faringe	Carcinoma de célula escamosa	Metástasis (2)	Pulmón	7,31 / 3,96	IV	No	HFRT	SBRT	8	60	No	Sí	Sí	Sí
34	Hombre	Exfumador	67	OMT	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis	Pulmón	8,44	IV	No	HFRT	SBRT	8	60	No	Sí	Sí	Sí
35	Hombre	Exfumador	61	OMT	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Metástasis	Cuello (tejido blando)	5,84	IV	No	HFRT	SBRT	3	27	Sí	Sí	Sí	Sí
36	Hombre	Fumador	50	ES	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Primario	Pulmón	5,76	IA3	No	HFRT	SBRT	3	54	Sí	Sí	Sí	Sí
37	Mujer	Exfumador	70	OMT	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Metástasis	Pulmón	0,71	IV	No	HFRT	SBRT	3	60	No	Sí	Sí	Sí
38	Hombre	Exfumador	82	OMT+	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis (2)	Pulmón	1,19 / 1,41	IV	Hepatocarcinoma	HFRT	SBRT	3	60	No	Sí	Sí	Sí

Paciente #	Sexo	Hábito tabáquico	Edad	Grupo clínico	Órgano de origen del primario	Histología del primario	Lesión irradiada (en caso de lesiones múltiples, el número)	Órgano irradiado	Tamaño de la lesión irradiada (cc)	Estadio clínico	Enfermedad maligna concurrente	Fraccionamiento	Técnica RT	N° de fracciones	Dosis total (Gy)	Biopsia de tejido y biopsia líquida emparejadas	Test genómico sobre biopsia de tejido	Test genómico sobre biopsia líquida	Test genómico germinal
39	Hombre	Fumador	60	OMT	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Primario	Pulmón	2,91	IV	No	HFRT	SBRT	3	54	No	Sí	Sí	Sí
40	Mujer	Exfumador	68	OMT	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis	Pulmón	2,26	IV	No	HFRT	SBRT	3	54	No	Sí	Sí	Sí
41	Hombre	Exfumador	67	OMT+	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Metástasis	SNC	7,56	IV	Primario	HFRT	SRS	3	27	No, pero sincrónica	Sí	Sí	Sí
42	Mujer	Exfumador	57	OMT	Colon	Adenocarcinoma	Metástasis (2)	SNC	0,35 / 3,75	IV	No	HFRT	RS/SRS	44986	20 / 27	No	Sí	Sí	No
43	Hombre	Exfumador	73	OMT+	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Metástasis (3)	SNC	0,37 / 0,05 / 0,03	IV	Primario	HFRT	RS	1	24	No, pero sincrónica	Sí	Sí	Sí
44	Mujer	No fumador	64	OMT	Piel	Melanoma	Metástasis	SNC	0,95	IV	No	HFRT	RS	1	15	No	Sí	Sí	Sí
45	Hombre	Fumador	48	OMT	Pulmón	CPNM (carcinoma de célula escamosa)	Metástasis (4)	SNC	3,44 / 0,09 / 0,5 / 0,04	IV	No	HFRT	SRS	45209	30 / 40	No	Sí	Sí	Sí
46	Hombre	No fumador	73	OMT	SNC	Glioblastoma de alto grado	Primario	SNC	56,07	Glioblastoma de alto grado	No	CFRT	.	30	60	Sí	Sí	Sí	Sí
47	Hombre	Exfumador	71	OMT+	Faringe	Carcinoma de célula escamosa	Primario y metástasis	Faringe	30,41 / 9,58 / 2,87	IV	Metástasis pulmonares	CFRT	.	35	70	NA	Sí	No	Sí
48	Hombre	No fumador	65	OMT+	Pulmón	CPCP	Primario y metástasis	Pulmón	26,18 / 148,23	IV	Metástasis cerebrales y pélvicas	CFRT	.	35	70	Sí	Sí	Sí	Sí
49	Hombre	Fumador	69	OMT+	Pulmón	CPNM (adenocarcinoma)	Metástasis	Cuello (tejido blando)	56,11	IV	Metástasis pulmonares y suprarrenales	CFRT	.	33	69,96	Sí	Sí	Sí	No
50	Hombre	Exfumador	63	OMT	Pulmón	CPCP	Primario	Pulmón	198,25	IIB	No	CFRT	.	30	60	Sí	Sí	Sí	Sí

Se desglosa el fraccionamiento de dosis de cada lesión en caso de lesiones múltiples con diferente esquema de tratamiento. CFRT: radioterapia de fraccionamiento convencional; CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas; CPNM: cáncer de pulmón no microcítico; HFRT: radioterapia hipofraccionada; NA: no aplica; RS: radiocirugía; SBRT: radioterapia estereotáctica corporal; SNC: sistema nervioso central; SRS: radiocirugía estereotáctica.

APÉNDICE 5. Valores de [cfDNA]

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
1	0	1	pre-sesión	NA	.	9,19	
1	0	1	post-sesión	15	.	9,15	x
1	2	2	pre-sesión	NA	.	7,83	
1	2	2	post-sesión	15	.	7,93	
1	4	3	pre-sesión	NA	.	5,85	
1	4	3	post-sesión	15	.	6,47	
1	7	4	pre-sesión	NA	.	2,49	
1	7	4	post-sesión	15	.	4,89	
1	9	5	pre-sesión	NA	.	3,68	
1	9	5	post-sesión	15	.	8,06	
1	36	sgto.	1 mes	NA	.	6,11	
1	120	sgto.	4 meses	NA	.	7,94	
2	0	1	pre-sesión	NA	.	26,39	
2	0	1	post-sesión	15	.	14,56	x
2	2	2	pre-sesión	NA	.	18,78	
2	2	2	post-sesión	15	.	27,22	
2	5	3	pre-sesión	NA	.	36,22	
2	5	3	post-sesión	15	.	28,83	
2	7	4	pre-sesión	NA	.	31,67	
2	7	4	post-sesión	30	.	28,72	
2	8	5	pre-sesión	NA	.	30,78	
2	8	5	post-sesión	15	.	28,78	
2	174	sgto.	6 meses	NA	.	47,78	
3	0	1	pre-sesión	NA	.	9,22	
3	0	1	post-sesión	30	.	9,72	
3	2	2	pre-sesión	NA	.	15,78	
3	2	2	post-sesión	30	.	19,89	
3	4	3	pre-sesión	NA	.	9,67	
3	4	3	post-sesión	30	.	18,56	
3	7	4	pre-sesión	NA	.	15,44	
3	7	4	post-sesión	15	.	10,72	
3	9	5	pre-sesión	NA	.	112,22	
3	9	5	post-sesión	15	.	123,33	x
4	0	1	pre-sesión	NA	.	5,68	
4	0	1	post-sesión	30	.	4,26	x
4	2	2	pre-sesión	NA	.	5,84	
4	2	2	post-sesión	30	.	4,72	
4	5	3	pre-sesión	NA	.	5,53	
4	5	3	post-sesión	30	.	4,80	
4	7	4	pre-sesión	NA	.	5,37	
4	7	4	post-sesión	15	.	7,26	
4	9	5	pre-sesión	NA	.	5,63	
4	9	5	post-sesión	30	.	5,79	
4	41	sgto.	1 mes	NA	.	6,53	
4	125	sgto.	4 meses	NA	.	6,68	
4	233	sgto.	7 meses	NA	.	3,82	
4	419	sgto. tto RT otro centro	mitad de tto RT: sesión 16/24	NA	.	3,03	
4	455	sgto.	.	NA	.	6,26	
5	0	1	pre-sesión	NA	.	13,20	
5	0	1	post-sesión	30	.	12,97	x
5	2	2	pre-sesión	NA	.	8,68	
5	2	2	post-sesión	30	.	10,94	
5	5	3	pre-sesión	NA	.	10,55	
5	5	3	post-sesión	30	.	15,37	
5	7	4	pre-sesión	NA	.	11,72	
5	7	4	post-sesión	30	.	6,10	
5	9	5	pre-sesión	NA	.	10,60	
5	9	5	post-sesión	30	.	5,37	
5	37	sgto.	1 mes	NA	.	8,91	
5	132	sgto.	4 meses	NA	.	3,68	
5	278	sgto.	9 meses	NA	.	12,68	
5	355	sgto.	12 meses	NA	.	9,11	
5	432	sgto.	15 meses	NA	.	7,37	
6	0	1	pre-sesión	NA	no post-sesión 1	9,47	
6	1	2	pre-sesión	NA	.	8,21	
6	1	2	post-sesión	30	.	8,16	x
6	2	3	pre-sesión	NA	.	5,03	
6	2	3	post-sesión	30	.	8,42	

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
6	3	4	pre-sesión	NA	.	8,79	
6	3	4	post-sesión	30	.	6,68	
6	4	5	pre-sesión	NA	.	6,89	
6	4	5	post-sesión	30	.	8,21	
7	0	1	pre-sesión	NA	.	8,83	
7	0	1	post-sesión	30	.	7,33	x
7	1	2	pre-sesión	NA	.	10,67	
7	1	2	post-sesión	30	.	10,00	
7	2	3	pre-sesión	NA	.	10,33	
7	2	3	post-sesión	30	.	8,67	
7	3	4	pre-sesión	NA	.	7,33	
7	3	4	post-sesión	30	.	7,39	
7	7	5	pre-sesión	NA	.	7,44	
7	7	5	post-sesión	30	.	7,78	
7	37	sgto.	1 mes	NA	.	4,74	
7	51	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	9,06	
7	72	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	10,72	
7	93	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	12,94	
7	115	sgto.	Post QT	NA	.	25,00	
7	147	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	11,44	
7	162	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	11,22	
7	182	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	4,91	
7	203	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	5,67	
7	233	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	6,33	
7	266	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	7,63	
7	295	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	7,16	
7	309	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	9,79	
7	337	sgto.	Post QT	NA	.	6,16	
7	365	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	5,53	
8	0	1	pre-sesión	NA	.	5,27	
8	0	1	post-sesión	30	.	4,03	x
8	2	2	pre-sesión	NA	.	3,94	
8	2	2	post-sesión	30	.	6,83	
8	4	3	pre-sesión	NA	.	4,83	
8	4	3	post-sesión	30	.	5,72	
8	8	4	pre-sesión	NA	.	5,48	
8	8	4	post-sesión	30	.	5,40	
8	10	5	pre-sesión	NA	.	6,78	
8	10	5	post-sesión	30	.	6,28	
8	37	sgto.	1 mes	NA	.	5,78	
8	128	sgto.	4 meses	NA	.	3,74	
8	134	sgto.	pre ciclo QT 2	NA	.	4,02	
8	154	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	3,93	
8	177	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	6,56	
9	0	1	pre-sesión	NA	.	13,06	
9	0	1	post-sesión	30	.	15,95	x
9	1	2	pre-sesión	NA	.	13,83	
9	1	2	post-sesión	30	.	23,34	
9	4	3	pre-sesión	NA	.	18,05	
9	4	3	post-sesión	30	.	12,95	
9	5	4	pre-sesión	NA	.	6,12	
9	5	4	post-sesión	30	.	7,67	
9	6	5	pre-sesión	NA	.	5,35	
9	6	5	post-sesión	30	.	13,20	
9	34	sgto.	1 mes	NA	.	13,36	
9	127	sgto.	4 meses	NA	.	9,70	
9	231	sgto.	7 meses	NA	.	7,47	
10	0	1	pre-sesión	NA	.	19,61	
10	0	1	post-sesión	30	.	27,17	x
10	2	2	post-sesión	30	no pre-sesión 2	16,89	
10	4	3	pre-sesión	NA	.	15,50	
10	4	3	post-sesión	30	.	20,17	
10	7	4	pre-sesión	NA	.	9,39	
10	7	4	post-sesión	30	.	10,72	
10	9	5	pre-sesión	NA	no post-sesión 5	10,11	
11	0	1	pre-sesión	NA	.	3,11	
11	0	1	post-sesión	30	.	2,73	x
11	1	2	pre-sesión	NA	.	4,17	
11	1	2	post-sesión	30	.	6,32	
11	4	3	pre-sesión	NA	.	5,02	
11	4	3	post-sesión	30	.	4,19	
11	5	4	pre-sesión	NA	.	5,89	
11	5	4	post-sesión	30	.	4,29	

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
11	6	5	pre-sesión	NA	.	3,67	
11	6	5	post-sesión	30	.	3,21	
11	33	sgto.	1 mes	NA	.	6,05	
11	126	sgto.	4 meses	NA	.	8,84	
11	284	sgto.	9 meses	NA	.	4,79	
11	466	sgto.	15 meses	NA	.	10,05	
12	0	1	pre-sesión	NA	.	4,46	
12	0	1	post-sesión	30	.	4,00	x
12	2	2	pre-sesión	NA	.	2,64	
12	2	2	post-sesión	30	.	2,91	
12	5	3	pre-sesión	NA	.	3,99	
12	5	3	post-sesión	30	.	1,56	
12	7	4	pre-sesión	NA	.	1,39	
12	7	4	post-sesión	30	.	3,08	
12	9	5	pre-sesión	NA	.	4,59	
12	9	5	post-sesión	30	.	4,57	
12	41	sgto.	1 mes	NA	.	2,81	
13	0	1	pre-sesión	NA	.	26,45	
13	0	1	post-sesión	30	.	17,31	x
13	2	2	pre-sesión	NA	.	31,00	
13	2	2	post-sesión	30	.	19,89	
13	5	3	pre-sesión	NA	.	20,40	
13	5	3	post-sesión	30	.	23,12	
13	7	4	pre-sesión	NA	.	20,51	
13	7	4	post-sesión	30	.	21,15	
13	9	5	pre-sesión	NA	.	18,82	
13	9	5	post-sesión	30	.	24,69	
13	37	sgto.	1 mes	NA	.	17,24	
13	128	sgto.	4 meses	NA	.	7,33	
13	261	sgto.	8 meses	NA	.	17,89	
14	0	1	pre-sesión	NA	.	20,53	
14	0	1	post-sesión	30	.	14,47	x
14	2	2	pre-sesión	NA	.	12,63	
14	2	2	post-sesión	30	.	14,53	
14	6	3	pre-sesión	NA	.	14,68	
14	6	3	post-sesión	30	.	7,11	
14	8	4	pre-sesión	NA	.	16,42	
14	8	4	post-sesión	30	.	14,00	
14	10	5	pre-sesión	NA	.	15,32	
14	10	5	post-sesión	30	.	12,84	
14	37	sgto.	1 mes	NA	.	32,79	
14	126	sgto.	4 meses	NA	.	16,37	
14	246	sgto.	8 meses	NA	.	43,47	
14	344	sgto.	11 meses	NA	.	31,89	
15	0	1	pre-sesión	NA	.	15,76	
15	0	1	post-sesión	30	.	10,43	x
15	3	2	pre-sesión	NA	.	8,74	
15	3	2	post-sesión	30	.	9,18	
15	6	3	pre-sesión	NA	.	5,77	
15	6	3	post-sesión	30	.	51,39	
15	7	4	pre-sesión	NA	.	8,57	
15	7	4	post-sesión	30	.	10,34	
15	10	5	pre-sesión	NA	.	9,29	
15	10	5	post-sesión	30	.	9,95	
15	67	sgto.	2 meses	NA	.	34,11	
15	133	sgto.	4 meses	NA	.	6,21	
16	0	2	pre-sesión	NA	.	25,28	
16	0	2	post-sesión	30	.	25,72	x
16	1	3	pre-sesión	NA	.	31,22	
16	1	3	post-sesión	30	.	28,72	
16	2	4	pre-sesión	NA	.	29,83	
16	2	4	post-sesión	30	.	41,61	
16	5	5	pre-sesión	NA	.	27,22	
16	5	5	post-sesión	30	.	34,22	
16	37	sgto.	1 mes	NA	.	5,47	
16	124	sgto.	4 meses	NA	.	8,63	
17	0	1	pre-sesión	NA	.	20,05	
17	0	1	post-sesión	30	.	14,95	x
17	2	2	pre-sesión	NA	.	24,11	
17	2	2	post-sesión	30	.	17,05	
17	6	3	pre-sesión	NA	.	12,53	
17	6	3	post-sesión	30	.	19,05	

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
17	8	4	pre-sesión	NA	.	19,05	
17	8	4	post-sesión	30	.	12,05	
17	10	5	pre-sesión	NA	.	24,37	
17	10	5	post-sesión	30	.	16,11	
17	36	sgto.	1 mes	NA	.	14,74	
17	134	sgto.	4 meses	NA	.	10,95	
17	353	sgto.	12 meses	NA	.	31,47	
18	0	1	pre-sesión	NA	.	6,89	
18	0	1	post-sesión	30	.	7,47	
18	2	2	pre-sesión	NA	.	7,63	
18	2	2	post-sesión	30	.	7,26	
18	5	3	pre-sesión	NA	.	4,19	
18	5	3	post-sesión	30	.	7,42	
18	7	4	pre-sesión	NA	.	8,30	x
18	7	4	post-sesión	30	.	7,95	
18	9	5	pre-sesión	NA	.	12,74	
18	9	5	post-sesión	30	.	8,37	
18	35	sgto.	1 mes	NA	.	7,68	
19	0	1	pre-sesión	NA	.	2,97	
19	0	1	post-sesión	30	.	6,37	x
19	3	2	pre-sesión	NA	.	4,66	
19	3	2	post-sesión	45	.	4,63	
19	5	3	pre-sesión	NA	.	4,16	
19	5	3	post-sesión	30	.	4,84	
19	7	4	pre-sesión	NA	.	3,96	
19	7	4	post-sesión	30	.	3,85	
19	10	5	pre-sesión	NA	.	3,85	
19	10	5	post-sesión	30	.	2,57	
19	45	sgto.	1 mes	NA	.	4,79	
20	0	1	pre-sesión	NA	.	3,88	
20	0	1	post-sesión	30	.	4,19	x
20	3	2	pre-sesión	NA	.	5,23	
20	3	2	post-sesión	30	.	4,08	
20	5	3	pre-sesión	NA	.	4,94	
20	5	3	post-sesión	30	.	5,29	
20	7	4	pre-sesión	NA	.	5,08	
20	7	4	post-sesión	45	.	5,37	
20	10	5	pre-sesión	NA	.	5,37	
20	10	5	post-sesión	30	.	4,63	
20	38	sgto.	1 mes	NA	.	5,32	
20	159	sgto.	5 meses	NA	.	5,05	
20	306	sgto.	10 meses	NA	.	12,74	
21	0	1	pre-sesión	NA	.	5,20	
21	0	1	post-sesión	45	.	6,15	x
21	1	2	pre-sesión	NA	.	6,96	
21	1	2	post-sesión	30	.	3,96	
21	2	3	pre-sesión	NA	.	3,39	
21	2	3	post-sesión	30	.	6,90	
21	5	4	pre-sesión	NA	.	5,59	
21	5	4	post-sesión	30	.	3,92	
21	6	5	pre-sesión	NA	.	3,24	
21	6	5	post-sesión	30	.	5,14	
21	40	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	2,63	
21	96	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	8,84	
21	103	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	12,16	
21	117	sgto.	pre ciclo QT	NA	.	11,16	
22	0	1	pre-sesión	NA	.	11,00	
22	0	1	post-sesión	60	.	10,72	x
22	2	2	pre-sesión	NA	.	11,14	
22	2	2	post-sesión	60	.	9,94	
22	4	3	pre-sesión	NA	.	5,28	
22	4	3	post-sesión	15	.	6,84	
22	4	3	post-sesión	30	.	4,37	
22	4	3	post-sesión	45	.	7,78	
22	4	3	post-sesión	60	.	3,15	
22	7	4	pre-sesión	NA	.	6,94	
22	7	4	post-sesión	60	.	6,52	
22	9	5	pre-sesión	NA	.	4,01	
22	9	5	post-sesión	15	.	6,44	
22	9	5	post-sesión	30	.	6,88	
22	9	5	post-sesión	45	.	7,82	
22	9	5	post-sesión	60	.	6,25	
22	9	5	post-sesión	75	.	4,63	

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
22	36	sgto.	1 mes	NA	.	4,67	
22	119	sgto.	4 meses	NA	.	8,56	
22	210	sgto.	7 meses	NA	.	20,56	
22	316	sgto.	10 meses	NA	.	4,04	
22	434	sgto.	14 meses	NA	.	5,32	
22	611	sgto.	20 meses	NA	.	14,21	
23	0	1	pre-sesión	NA	.	1,53	
23	0	1	post-sesión	60	.	4,71	x
23	2	2	pre-sesión	NA	.	2,46	
23	2	2	post-sesión	60	.	5,24	
23	5	3	pre-sesión	NA	.	4,50	
23	5	3	post-sesión	60	.	6,65	
23	7	4	pre-sesión	NA	.	6,13	
23	7	4	post-sesión	60	.	4,73	
23	9	5	pre-sesión	NA	.	3,83	
23	9	5	post-sesión	60	.	4,80	
23	41	sgto.	1 mes	NA	.	9,66	
23	125	sgto.	4 meses	NA	.	7,94	
23	211	sgto.	7 meses	NA	.	5,90	
23	324	sgto.	10 meses	NA	.	3,56	
23	446	sgto.	15 meses	NA	.	4,47	
23	650	sgto.	21 meses	NA	.	1,25	
24	0	1	pre-sesión	NA	.	11,74	
24	0	1	post-sesión	60	.	8,25	x
24	2	2	pre-sesión	NA	.	11,81	
24	2	2	post-sesión	60	.	6,13	
24	4	3	pre-sesión	NA	.	16,67	
24	4	3	post-sesión	60	.	13,75	
24	7	4	pre-sesión	NA	.	8,56	
24	7	4	post-sesión	60	.	6,46	
24	9	5	pre-sesión	NA	.	12,83	
24	9	5	post-sesión	60	.	5,12	
24	127	sgto.	4 meses	NA	.	13,14	
24	379	sgto.	12 meses	NA	.	11,68	
24	605	sgto.	20 meses	NA	.	12,53	
25	0	1	pre-sesión	NA	.	10,00	
25	0	1	post-sesión	60	.	8,37	x
25	3	2	pre-sesión	NA	.	5,68	
25	3	2	post-sesión	60	.	6,53	
25	5	3	pre-sesión	NA	.	5,79	
25	5	3	post-sesión	60	.	5,68	
25	7	4	pre-sesión	NA	.	6,37	
25	7	4	post-sesión	60	.	5,37	
25	10	5	pre-sesión	NA	.	2,85	
25	10	5	post-sesión	60	.	6,63	
25	38	sgto.	1 mes	NA	.	4,96	
25	132	sgto.	4 meses	NA	.	4,56	
25	221	sgto.	7 meses	NA	.	4,16	
25	308	sgto.	10 meses	NA	.	3,31	
25	411	sgto.	13 meses	NA	.	3,84	
26	0	1	pre-sesión	NA	.	5,32	
26	0	1	post-sesión	60	.	8,32	x
26	2	2	pre-sesión	NA	.	5,21	
26	2	2	post-sesión	60	.	6,26	
26	4	3	pre-sesión	NA	.	4,72	
26	4	3	post-sesión	60	.	7,53	
26	7	4	pre-sesión	NA	.	8,26	
26	7	4	post-sesión	60	.	7,11	
26	9	5	pre-sesión	NA	.	7,11	
26	9	5	post-sesión	60	.	8,42	
26	36	sgto.	1 mes	NA	.	3,82	
26	134	sgto.	4 meses	NA	.	6,68	
26	232	sgto.	7 meses	NA	.	4,63	
26	352	sgto.	11 meses	NA	.	4,92	
26	421	sgto.	14 meses	NA	.	6,95	
26	588	sgto.	19 meses	NA	.	41,21	
27	0	1	pre-sesión	NA	.	3,65	
27	0	1	post-sesión	30	.	5,23	x
27	2	2	pre-sesión	NA	.	3,33	
27	2	2	post-sesión	30	.	3,96	
27	5	3	pre-sesión	NA	.	3,75	
27	5	3	post-sesión	30	.	4,67	
27	7	4	pre-sesión	NA	.	4,56	

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
27	7	4	post-sesión	30	.	4,48	
27	9	5	pre-sesión	NA	.	4,48	
27	9	5	post-sesión	30	.	5,16	
27	12	6	pre-sesión	NA	.	2,29	
27	12	6	post-sesión	30	.	4,72	
27	14	7	pre-sesión	NA	.	4,14	
27	14	7	post-sesión	30	.	4,94	
27	16	8	pre-sesión	NA	.	4,13	
27	16	8	post-sesión	30	.	5,79	
27	43	sgto.	1 mes	NA	.	5,01	
27	133	sgto.	3 meses	NA	.	2,62	
27	287	sgto.	8 meses	NA	.	2,29	
27	390	sgto.	12 meses	NA	.	7,26	
28	0	1	pre-sesión	NA	.	26,06	
28	0	1	post-sesión	60	.	27,93	x
28	2	2	pre-sesión	NA	.	13,28	
28	2	2	post-sesión	60	.	14,56	
28	5	3	pre-sesión	NA	.	5,53	
28	5	3	post-sesión	60	.	14,00	
28	7	4	pre-sesión	NA	.	9,33	
28	7	4	post-sesión	60	.	3,98	
28	9	5	pre-sesión	NA	.	12,94	
28	9	5	post-sesión	60	.	22,28	
28	12	6	pre-sesión	NA	.	24,56	
28	12	6	post-sesión	60	.	33,44	
28	14	7	pre-sesión	NA	.	34,33	
28	14	7	post-sesión	60	.	32,50	
28	16	8	pre-sesión	NA	.	36,61	
28	16	8	post-sesión	60	.	32,22	
28	44	sgto.	1 mes	NA	.	35,89	
28	128	sgto.	4 meses	NA	.	21,00	
28	217	sgto.	7 meses	NA	.	6,33	
28	320	sgto.	10 meses	NA	.	10,11	
28	383	sgto.	12 meses	NA	.	15,47	
28	622	sgto.	20 meses	NA	.	41,95	
29	0	1	pre-sesión	NA	.	12,78	
29	0	1	post-sesión	15	.	9,44	x
29	0	1	post-sesión	30	.	7,39	
29	0	1	post-sesión	45	.	9,56	
29	0	1	post-sesión	60	.	9,33	
29	2	2	pre-sesión	NA	.	10,22	
29	2	2	post-sesión	30	.	13,94	
29	4	3	pre-sesión	NA	.	11,22	
29	4	3	post-sesión	15	.	8,94	
29	4	3	post-sesión	30	.	7,78	
29	4	3	post-sesión	45	.	6,78	
29	4	3	post-sesión	60	.	11,06	
29	7	4	pre-sesión	NA	.	8,39	
29	7	4	post-sesión	30	.	8,94	
29	8	5	pre-sesión	NA	.	11,22	
29	8	5	post-sesión	30	.	7,61	
29	10	6	pre-sesión	NA	.	9,11	
29	10	6	post-sesión	30	.	10,06	
29	14	7	pre-sesión	NA	.	9,61	
29	14	7	post-sesión	30	.	8,44	
29	16	8	pre-sesión	NA	.	8,94	
29	16	8	post-sesión	15	.	5,61	
29	16	8	post-sesión	30	.	11,00	
29	16	8	post-sesión	45	.	9,41	
29	16	8	post-sesión	60	.	2,01	
29	42	sgto.	1 mes	NA	.	21,39	
29	135	sgto.	4 meses	NA	.	3,18	
29	231	sgto.	7 meses	NA	.	3,97	
29	332	sgto.	11 meses	NA	.	4,35	
29	415	sgto.	13 meses	NA	.	5,53	
30	0	1	pre-sesión	NA	.	8,39	
30	0	1	post-sesión	15	.	5,94	
30	0	1	post-sesión	30	.	9,78	x
30	0	1	post-sesión	45	.	10,83	
30	0	1	post-sesión	60	.	10,17	
30	2	2	pre-sesión	NA	.	16,28	
30	2	2	post-sesión	30	.	14,89	
30	7	3	pre-sesión	NA	.	8,00	

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
30	7	3	post-sesión	15	.	7,89	
30	7	3	post-sesión	30	.	8,72	
30	7	3	post-sesión	45	.	6,72	
30	7	3	post-sesión	60	.	12,00	
30	10	4	pre-sesión	NA	.	13,22	
30	10	4	post-sesión	30	.	12,39	
30	11	5	pre-sesión	NA	.	10,89	
30	11	5	post-sesión	30	.	10,78	
30	14	6	pre-sesión	NA	.	20,33	
30	14	6	post-sesión	30	.	11,89	
30	16	7	pre-sesión	NA	.	17,67	
30	16	7	post-sesión	30	.	14,89	
30	18	8	pre-sesión	NA	.	17,67	
30	18	8	post-sesión	15	.	18,50	
30	18	8	post-sesión	30	.	16,61	
30	18	8	post-sesión	45	.	18,06	
30	18	8	post-sesión	60	.	15,50	
30	43	sgto.	1 mes	NA	.	13,50	
30	231	sgto.	7 meses	NA	.	6,05	
30	330	sgto.	10 meses	NA	.	19,89	
30	469	sgto.	15 meses	NA	.	15,05	
31	0	1	pre-sesión	NA	.	12,90	
31	0	1	post-sesión	30	.	11,26	x
31	3	2	pre-sesión	NA	.	14,31	
31	3	2	post-sesión	30	.	13,97	
31	5	3	pre-sesión	NA	.	23,35	
31	5	3	post-sesión	30	.	16,98	
31	10	4	pre-sesión	NA	.	10,59	
31	10	4	post-sesión	30	.	18,34	
31	10	5	pre-sesión	NA	.	17,83	
31	10	5	post-sesión	30	.	12,69	
31	12	6	pre-sesión	NA	.	23,76	
31	12	6	post-sesión	30	.	24,53	
31	14	7	pre-sesión	NA	.	18,71	
31	14	7	post-sesión	30	.	20,81	
31	17	8	pre-sesión	NA	.	24,09	
31	17	8	post-sesión	30	.	15,95	
31	46	sgto.	1 mes	NA	.	13,79	
31	136	sgto.	4 meses	NA	.	24,01	
31	297	sgto.	9 meses	NA	.	9,79	
31	419	sgto.	sgto.	NA	.	8,47	
32	0	1	pre-sesión	NA	.	8,28	
32	0	1	post-sesión	30	.	6,72	x
32	2	2	pre-sesión	NA	.	6,11	
32	2	2	post-sesión	30	.	6,33	
32	4	3	pre-sesión	NA	.	4,32	
32	7	3	post-sesión	30	.	5,61	
32	7	4	pre-sesión	NA	.	6,11	
32	7	4	post-sesión	30	.	5,00	
32	9	5	pre-sesión	NA	.	2,78	
32	9	5	post-sesión	30	.	2,94	
32	11	6	pre-sesión	NA	.	4,93	
32	11	6	post-sesión	30	.	3,04	
32	15	7	pre-sesión	NA	.	5,44	
32	15	7	post-sesión	30	.	4,04	
32	17	8	pre-sesión	NA	.	5,53	
32	17	8	post-sesión	30	.	8,61	
32	59	sgto.	1 mes	NA	.	3,19	
32	172	sgto.	5 meses	NA	.	1,71	
32	270	sgto.	8 meses	NA	.	4,75	
32	350	sgto.	11 meses	NA	.	4,74	
32	443	sgto.	14 meses	NA	.	6,58	
33	0	1	pre-sesión	NA	.	6,11	
33	0	1	post-sesión	30	.	10,63	x
33	2	2	pre-sesión	NA	.	5,79	
33	2	2	post-sesión	30	.	6,53	
33	4	3	pre-sesión	NA	.	5,32	
33	4	3	post-sesión	30	.	6,11	
33	7	4	pre-sesión	NA	.	5,42	
33	7	4	post-sesión	30	.	7,00	
33	9	5	pre-sesión	NA	.	5,58	
33	9	5	post-sesión	30	.	6,32	
33	11	6	pre-sesión	NA	.	4,48	

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
33	11	6	post-sesión	30	.	4,28	
33	14	7	pre-sesión	NA	.	3,37	
33	14	7	post-sesión	30	.	6,21	
33	16	8	pre-sesión	NA	.	5,08	
33	16	8	post-sesión	30	.	4,44	
33	43	sgto.	1 mes	NA	.	2,65	
33	133	sgto.	4 meses	NA	.	6,42	
33	296	sgto.	9 meses	NA	.	4,27	
33	378	sgto.	12 meses	NA	.	8,58	
34	0	1	pre-sesión	NA	.	9,14	
34	0	1	post-sesión	30	.	13,35	x
34	2	2	pre-sesión	NA	.	8,10	
34	2	2	post-sesión	30	.	12,01	
34	5	3	pre-sesión	NA	.	11,57	
34	5	3	post-sesión	30	.	15,33	
34	7	4	pre-sesión	NA	.	5,31	
34	7	4	post-sesión	30	.	9,72	
34	9	5	pre-sesión	NA	.	9,24	
34	9	5	post-sesión	30	.	5,37	
34	12	6	pre-sesión	NA	.	5,70	
34	12	6	post-sesión	45	.	5,93	
34	14	7	pre-sesión	NA	.	6,37	
34	14	7	post-sesión	30	.	5,08	
34	16	8	pre-sesión	NA	.	4,54	
34	16	8	post-sesión	30	.	4,27	
34	42	sgto.	1 mes	NA	.	3,89	
34	133	sgto.	4 meses	NA	.	5,13	
34	268	sgto.	9 meses	NA	.	3,35	
35	0	1	pre-sesión	NA	.	26,56	
35	0	1	post-sesión	30	.	27,83	x
35	3	2	pre-sesión	NA	.	8,00	
35	3	2	post-sesión	30	.	8,44	
35	5	3	pre-sesión	NA	.	8,56	
35	5	3	post-sesión	30	.	10,56	
35	39	sgto.	1 mes	NA	.	16,83	
36	0	1	pre-sesión	NA	.	8,28	
36	0	1	post-sesión	30	.	10,78	x
36	3	2	pre-sesión	NA	.	8,00	
36	3	2	post-sesión	30	.	9,94	
36	4	3	pre-sesión	NA	.	7,00	
36	4	3	post-sesión	30	.	8,61	
36	30	sgto.	1 mes	NA	.	8,72	
36	256	sgto.	8 meses	NA	.	8,21	
37	0	1	pre-sesión	NA	.	5,32	
37	0	1	post-sesión	30	.	6,58	x
37	3	2	pre-sesión	NA	.	7,32	
37	3	2	post-sesión	30	.	6,58	
37	6	3	pre-sesión	NA	.	7,53	
37	6	3	post-sesión	30	.	8,79	
37	33	sgto.	1 mes	NA	.	9,58	
37	116	sgto.	4 meses	NA	.	9,68	
38	0	1	pre-sesión	NA	.	8,56	
38	0	1	post-sesión	60	.	9,33	x
38	3	2	pre-sesión	NA	.	9,33	
38	3	2	post-sesión	60	.	8,38	
38	5	3	pre-sesión	NA	.	9,72	
38	5	3	post-sesión	60	.	9,56	
38	33	sgto.	1 mes	NA	.	9,83	
38	116	sgto.	4 meses	NA	.	18,44	
38	214	sgto.	7 meses	NA	.	13,67	
38	313	sgto.	10 meses	NA	.	7,67	
38	438	sgto.	14 meses	NA	.	5,32	
39	0	1	pre-sesión	NA	.	8,28	
39	0	1	post-sesión	45	.	8,89	x
39	3	2	pre-sesión	NA	.	6,11	
39	3	2	post-sesión	60	.	5,03	
39	5	3	pre-sesión	NA	.	6,39	
39	5	3	post-sesión	60	.	8,72	
39	33	sgto.	1 mes	NA	.	6,78	
39	139	sgto.	4 meses	NA	.	7,28	
39	231	sgto.	8 meses	NA	.	7,39	
39	320	sgto.	10 meses	NA	.	8,11	

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
39	420	sgto.	14 meses	NA	.	5,05	
40	0	1	pre-sesión	NA	.	4,69	
40	0	1	post-sesión	15	.	2,52	x
40	2	2	pre-sesión	NA	.	0,10	
40	2	2	post-sesión	15	.	0,46	
40	4	3	pre-sesión	NA	.	5,80	
40	4	3	post-sesión	15	.	0,42	
40	32	sgto.	1 mes	NA	.	3,76	
40	141	sgto.	5 meses	NA	.	10,00	
40	226	sgto.	7 meses	NA	.	13,85	
40	316	sgto.	10 meses	NA	.	5,13	
40	406	sgto.	13 meses	NA	.	7,53	
40	592	sgto.	20 meses	NA	.	10,42	
41	0	1	pre-sesión	NA	.	29,17	
41	0	1	post-sesión	15	.	43,18	
41	0	1	post-sesión	30	.	37,68	x
41	0	1	post-sesión	45	.	22,88	
41	0	1	post-sesión	60	.	40,76	
41	2	2	pre-sesión	NA	.	53,39	
41	2	2	post-sesión	15	.	47,01	
41	2	2	post-sesión	30	.	37,81	
41	2	2	post-sesión	45	.	27,45	
41	2	2	post-sesión	60	.	34,27	
41	5	3	pre-sesión	NA	.	36,46	
41	5	3	post-sesión	15	.	27,89	
41	5	3	post-sesión	30	.	25,99	
41	5	3	post-sesión	45	.	32,10	
41	5	3	post-sesión	60	.	21,26	
41	20	sgto.	1 mes	NA	.	21,68	
42	0	1	pre-sesión	NA	.	8,47	
42	0	1	post-sesión	30	.	6,37	
42	2	2	pre-sesión	NA	.	11,63	
42	2	2	post-sesión	30	.	10,89	x
42	6	3	pre-sesión	NA	.	8,74	
42	6	3	post-sesión	30	.	9,16	
42	34	sgto.	1 mes	NA	.	9,53	
42	97	sgto.	3 meses	NA	.	5,63	
42	185	sgto.	6 meses	NA	.	4,26	
42	400	sgto.	13 meses	NA	.	10,89	
43	0	1	pre-sesión	NA	.	4,13	
43	0	1	post-sesión	30	.	10,33	x
43	44	sgto.	pre ciclo QT 1	NA	.	4,11	
43	51	sgto.	pre ciclo QT 2	NA	.	4,97	
43	65	sgto.	pre ciclo QT 3	NA	.	9,72	
43	72	sgto.	pre ciclo QT 4	NA	.	6,39	
43	86	sgto.	pre ciclo QT 6	NA	.	8,28	
43	107	sgto.	pre ciclo QT 3	NA	.	11,11	
43	212	sgto.	sgto.	NA	.	4,78	
43	226	sgto.	sgto.	NA	.	9,94	
44	0	1	pre-sesión	NA	.	10,32	
44	0	1	post-sesión	30	.	10,47	x
44	66	sgto.	2 meses	NA	.	11,53	
44	142	sgto.	5 meses	NA	.	7,42	
44	232	sgto.	8 meses	NA	.	49,21	
44	321	sgto.	11 meses	NA	.	70,00	
44	612	sgto.	20 meses	NA	.	20,26	
45	0	1	pre-sesión	NA	.	8,53	
45	0	1	post-sesión	30	.	13,11	x
45	1	2	pre-sesión	NA	.	7,11	
45	1	2	post-sesión	30	.	10,47	
45	5	4	pre-sesión	NA	.	8,79	
45	5	4	post-sesión	30	.	12,68	
45	7	6	pre-sesión	NA	.	10,47	
45	7	6	post-sesión	30	.	23,59	
45	12	8	pre-sesión	NA	.	14,68	
45	12	8	post-sesión	30	.	16,53	
45	14	10	pre-sesión	NA	.	23,42	
45	14	10	post-sesión	30	.	25,54	
45	40	sgto.	1 mes	NA	.	7,29	
46	0	1	pre-sesión	NA	CT cycle administered this day	4,81	

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
46	0	1	post-sesión	45	.	6,37	
46	4	5	pre-sesión	NA	.	6,21	
46	4	5	post-sesión	60	.	5,01	
46	11	10	pre-sesión	NA	.	8,95	
46	11	10	post-sesión	60	.	6,26	
46	21	15	pre-sesión	NA	.	6,53	
46	21	15	post-sesión	60	.	8,16	
46	29	21	pre-sesión	NA	.	9,16	
46	29	21	post-sesión	45	.	5,79	x
46	36	25	pre-sesión	NA	.	6,63	
46	36	25	post-sesión	60	.	4,65	
46	43	30	pre-sesión	NA	.	6,58	
46	43	30	post-sesión	45	.	4,86	
46	71	sgto.	1 mes	NA	.	5,19	
46	155	sgto.	4 meses	NA	.	10,79	
47	0	1	pre-sesión	NA	QT antes de la sesión de RT	13,86	
47	0	1	post-sesión	60	.	9,66	
47	6	5	pre-sesión	NA	.	2,00	
47	6	5	post-sesión	60	.	4,33	
47	13	10	pre-sesión	NA	.	14,08	
47	13	10	post-sesión	60	.	5,07	
47	20	15	pre-sesión	NA	.	3,24	
47	20	15	post-sesión	60	.	4,06	
47	27	20	pre-sesión	NA	.	10,87	
47	27	20	post-sesión	60	.	10,43	
47	35	25	pre-sesión	NA	QT 7 días antes de la sesión de RT	10,35	
47	35	25	post-sesión	60	.	9,78	
47	42	30	pre-sesión	NA	.	3,82	
47	42	30	post-sesión	60	.	2,64	
47	44	32	pre-sesión	NA	.	6,00	
47	44	32	post-sesión	60	.	8,00	
47	48	35	pre-sesión	NA	.	3,83	
47	48	35	post-sesión	60	.	4,16	
47	76	sgto.	1 mes	NA	.	6,11	
47	174	sgto.	4 meses	NA	.	8,05	
47	274	sgto.	8 meses	NA	.	6,06	
48	0	1	pre-sesión	NA	.	4,83	
48	0	1	post-sesión	30	.	6,35	
48	6	5	pre-sesión	NA	.	6,99	
48	6	5	post-sesión	30	.	11,11	
48	14	10	pre-sesión	NA	.	13,20	
48	14	10	post-sesión	30	.	15,37	x
48	29	20	pre-sesión	NA	.	5,05	
48	29	20	post-sesión	30	.	5,13	
48	44	30	pre-sesión	NA	.	5,53	
48	44	30	post-sesión	45	.	6,58	
48	51	35	pre-sesión	NA	.	5,74	
48	51	35	post-sesión	30	.	5,68	
48	83	sgto.	1 mes	NA	.	7,42	
48	322	sgto.	9 meses	NA	.	4,42	
49	0	1	pre-sesión	NA	.	19,15	
49	0	1	post-sesión	30	.	17,10	
49	6	5	pre-sesión	NA	QT 3 días antes de la sesión de RT	13,22	
49	6	5	post-sesión	30	.	13,45	x
49	13	10	pre-sesión	NA	.	9,28	
49	13	10	post-sesión	30	.	4,30	
49	20	15	pre-sesión	NA	.	5,29	
49	20	15	post-sesión	30	.	6,15	
49	28	20	pre-sesión	NA	.	9,12	
49	28	20	post-sesión	30	.	7,67	
49	35	25	pre-sesión	NA	.	8,20	
49	35	25	post-sesión	30	.	4,20	
49	42	30	pre-sesión	NA	QT 1 día antes de la sesión de RT	13,74	
49	42	30	post-sesión	30	.	11,07	
49	45	33	pre-sesión	NA	.	13,30	
49	45	33	post-sesión	45	.	13,28	
50	0	pre-RT	.	NA	.	7,47	x

Paciente #	Tiempo desde inicio RT (días)	Sesión RT / sgto.	Momento extracción	Tiempo desde fin sesión (min)	Comentarios adicionales	[cfDNA] (ng/mL plasma)	Biopsia líquida para estudio genómico
50	27	11	pre-sesión	NA	.	5,89	
50	27	11	post-sesión	30	.	4,81	
50	41	21	pre-sesión	NA	.	5,79	
50	41	21	post-sesión	30	.	5,11	
50	55	28	pre-sesión	NA	.	17,74	
50	55	28	post-sesión	30	.	15,42	
50	58	30	pre-sesión	NA	.	10,16	
50	58	30	post-sesión	30	.	13,74	
50	125	sgto.	2 meses	NA	.	13,11	
50	229	sgto.	5 meses	NA	.	6,05	
50	279	sgto.	7 meses	NA	.	9,47	
50	344	sgto.	9 meses	NA	.	17,84	
50	469	sgto.	13 meses	NA	.	12,21	
50	594	sgto.	17 meses	NA	.	7,76	
50	600	sgto.	18 meses	NA	.	12,42	
50	776	sgto.	24 meses	NA	.	3,71	

NA: no aplica; QT: quimioterapia; RT: Radioterapia; sgto: seguimiento.

APÉNDICE 6. Variantes identificadas mediante el panel de biopsia líquida.

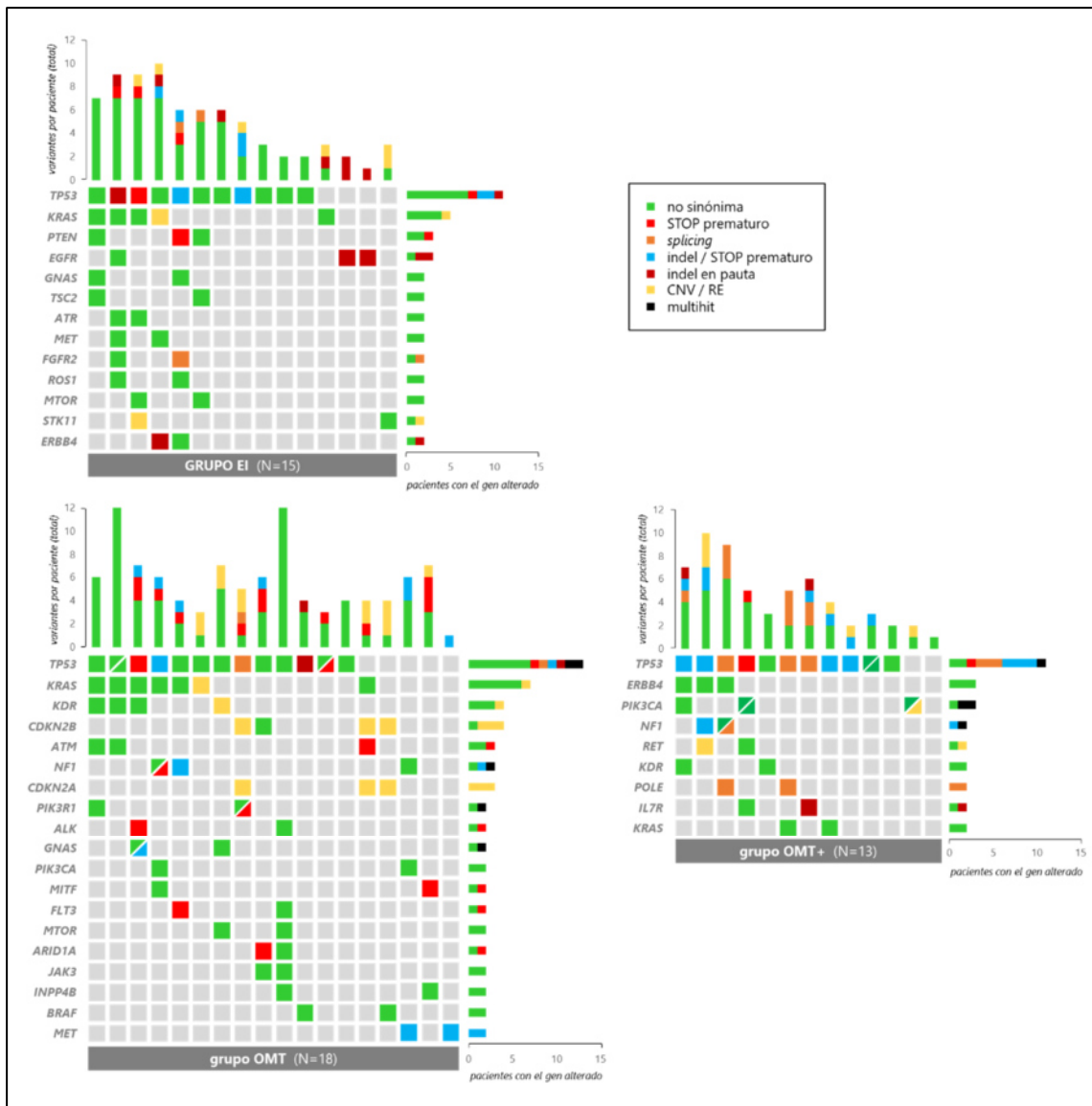
Paciente #	Variante	Tipo de alteración	coordenadas genómicas (GRCh37)	AF	Origen	Detectada en biopsia de tejido	Origen tumoral	BT y BL temporalmente emparejadas
1	RAF1 c.310G>A p.Glu104Lys	SNV	3:12653459	49,19 %	germinal	.	.	sí
1	FGFR2 c.2329G>A p.Glu777Lys	SNV	10:123239508	0,11 %	ctDNA	no	desconocido	sí
2	BRAF c.1661T>C p.Ile54Thr	SNV	7:140476745	0,25 %	CH	.	.	sí
2	BRAF c.1458_1472del p.Asn486_Thr491>Lys	indel	7:140477835	0,13 %	ctDNA	no	desconocido	sí
3	VEGFA c.268C>T p.Pro90Ser	SNV	6:43738711	0,44 %	CH	.	.	sí
3	NF1 c.5782delG p.Glu1928fs*14	indel	17:29657485	0,17 %	CH	.	.	sí
3	GNAS c.154G>A p.Glu52Lys	SNV	20:57428474	52,92 %	germinal	.	.	sí
4	PIK3CA c.1624G>A p.Glu542Lys	SNV	3:178936082	0,28 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
4	TERT c.-124C>T.	SNV	5:1295228	1,31 %	CH	.	.	sí
6	PTEN c.425G>A p.Arg142Gln	SNV	10:89692941	0,24 %	CH	.	.	no
6	PTPN11 c.1678C>T p.Leu560Phe	SNV	12:112940026	49,51 %	germinal	.	.	no
6	TP53 c.817C>T p.Arg273Cys	SNV	17:7577121	0,25 %	ctDNA	sí	confirmado	no
7	TP53 c.80delC p.Pro27Leufs*17	indel	17:7579715	0,43 %	ctDNA	sí	confirmado	no
9	JAK3 c.446G>A p.Arg149His	SNV	19:17953956	49,89 %	germinal	.	.	sí
10	BRC42 c.1705C>T p.Gln569*	SNV	13:32907320	0,28 %	CH	.	.	no
10	BRC41 c.3331_3334delCAAG p.Gln1111fs*15	indel	17:41244213	49,89 %	germinal	.	.	no
10	TP53 c.982_987TTCACC>A p.Phe328fs*7	indel	17:7576859	0,11 %	CH	.	.	no
10	GNAS c.200C>T p.Ala67Val	SNV	20:57428520	3,56 %	CH	.	.	no
12	NF1 c.1726C>A p.Gln576Lys	SNV	17:29550466	50,60 %	germinal	.	.	no
13	FGFR1 c.1368G>T p.Met456Ile	SNV	8:38275808	50,48 %	germinal	.	.	sí
13	CCND1 c.161C>G p.Pro54Arg	SNV	11:69456242	49,73 %	germinal	.	.	sí
13	TP53 c.467G>C p.Arg156Pro	SNV	17:7578463	1,04 %	CH	.	.	sí
14	JAK2 c.1849G>T p.Val617Phe	SNV	9:5073770	2,40 %	CH	.	.	sí
14	BRC42 c.929T>C p.Tyr3098His	SNV	13:32968861	49,09 %	germinal	.	.	sí
14	TP53 c.467G>C p.Arg156Pro	SNV	17:7578463	0,26 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
15	TP53 c.646G>A p.Val216Met	SNV	17:7578203	0,22 %	CH	.	.	sí
16	PTEN c.182A>G p.His61Arg	SNV	10:89685287	1,16 %	ctDNA	no	desconocido	sí
16	PTEN c.635-1G>C.	SNV	10:89717609	1,03 %	ctDNA	no	inferido	sí
16	BRC42 c.1151C>T p.Ser384Phe	SNV	13:32906766	24,09 %	germinal	.	.	sí
16	TP53 c.560-2A>G.	SNV	17:7578291	47,28 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
17	RET c.2548G>A p.Asp850Asn	SNV	10:43615134	48,40 %	germinal	.	.	no
17	FGFR2 c.1615A>G p.Lys539Glu	SNV	10:123258066	0,21 %	CH	.	.	no
18	FOX12 c.672_701del30 p.Ala225_Ala234del	indel	3:138664863	0,22 %	CH	.	.	sí
18	PTEN c.533A>G p.Tyr178Cys	SNV	10:89711915	0,19 %	CH	.	.	sí
18	NF1 c.5147C>G p.Ala1716Gly	SNV	17:29653149	0,10 %	ctDNA	no	desconocido	sí

Paciente #	Variante	Tipo de alteración	coordenadas genómicas (GRCh37)	AF	Origen	Detectada en biopsia de tejido	Origen tumoral	BT y BL temporalmente emparejadas
22	BRCA2 c.9976A>T p.K3326*	SNV	13:32972626	50,76 %	germinal	panel no realizado	.	.
23	BRCA2 c.7759C>T p.Leu2587Phe	SNV	13:32932020	50,58 %	germinal	.	.	sí
24	JAK2 c.1849G>T p.Val1617Phe	SNV	9:5073770	0,19 %	CH	.	.	sí
24	TP53 c.524G>A p.Arg175His	SNV	17:7578406	0,43 %	CH	.	.	sí
24	GNAS c.424G>A p.Gly142Arg	SNV	20:57428744	48,44 %	germinal	.	.	sí
25	MYCN c.658G>T p.A220S	SNV	2:16082844	64,92 %	germinal	panel no realizado	.	.
25	TP53 c.722C>G p.S241C	SNV	17:7577559	0,52 %	CH	panel no realizado	.	.
25	NF1 c.4341G>C p.Q1447H	SNV	17:29586058	1,29 %	CH	panel no realizado	.	.
28	PTPN11 c.1282G>A p.Val428Met	SNV	12:112924336	0,19 %	ctDNA	no	inferido	no
29	CDK6 c.920A>G p.Lys307Arg	SNV	7:92244515	0,33 %	CH	.	.	no
29	PTEN c.923G>A p.Arg308His	SNV	10:89720772	0,94 %	CH	.	.	no
29	TP53 c.359A>G p.Lys120Arg	SNV	17:7579328	0,45 %	CH	.	.	no
30	EGFR c.828G>T p.Gln276His	SNV	7:55221784	0,14 %	ctDNA	no	inferido	sincrónicas, distinta lesión
30	MET c.3869T>C p.Phe1290Ser	SNV	7:116435779	0,24 %	CH	.	.	sincrónicas, distinta lesión
30	BRCA2 c.3006delT p.His1003fs*40	indel	13:32911497	0,23 %	CH	.	.	sincrónicas, distinta lesión
30	NF1 c.3461A>G p.Asn1154Ser	SNV	17:29559864	48,97 %	germinal	.	.	sincrónicas, distinta lesión
31	ALK c.3599C>T p.Ala1200Val	SNV	2:294443618	0,19 %	CH	.	.	sí
31	MYC c.266A>G p.Tyr89Cys	SNV	8:128750729	0,25 %	CH	.	.	sí
32	PDCD1LG2 c.497A>G p.His166Arg	SNV	9:5549470	5,45 %	CH	.	.	sí
33	KRAS c.35G>T p.Gly12Val	SNV	12:25398284	0,34 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
33	MAP2K2 c.181A>G p.Lys61Glu	SNV	19:4117539	0,23 %	CH	.	.	sí
34	PDGFRB c.1947G>A p.Met649Ile	SNV	5:149503889	0,51 %	CH	.	.	sí
34	MET c.1392+1G>A.	SNV	7:116371914	0,21 %	ctDNA	no	inferido	sí
34	CCND1 c.839_841delAGG p.Glu280del	indel	11:69466000	48,81 %	germinal	.	.	sí
34	TP53 c.638G>A p.Arg213Gln	SNV	17:7578211	0,15 %	CH	.	.	sí
35	AKT1 c.138C>A p.Asp46Glu	SNV	14:105246462	51,04 %	germinal	.	.	no
36	BRCA2 c.9613_9614GC>CT p.Ala3205Leu	indel	13:32971146	49,31 %	germinal	.	.	no
37	TP53 c.818G>T p.Arg273Leu	SNV	17:7577120	0,10 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
37	GNAS c.154G>A p.Glu52Lys	SNV	20:57428474	50,47 %	germinal	.	.	sí
37	GNAS c.1267G>C p.Gly423Arg	SNV	20:57429587	53,07 %	germinal	.	.	sí
38	MYC-IGH	RE	.	.	ctDNA	no (región no cubierta)	desconocido	sí
39	BRCA2 c.9916A>G p.Tht3306Ala	SNV	13:32972566	50,03 %	germinal	.	.	no
39	NF1 c.998_999insA p.Tyr333fs*1	indel	17:29527549	0,20 %	CH	.	.	no
40	TP53 c.746G>A p.Arg249Lys	SNV	17:7577535	0,11 %	ctDNA	no	desconocido	no
43	TP53 c.943delT p.Ser315Leufs*30	indel	17:7576902	0,35 %	ctDNA	sí	confirmado	sincrónicas, pero no misma lesión
43	ERBB2 c.62C>G p.Ala21Gly	SNV	17:37856553	0,36 %	ctDNA	sí	confirmado	sincrónicas, pero no misma lesión
43	ERBB2 c.65G>A p.Ser22Asn	SNV	17:37856556	49,77 %	germinal	.	.	sincrónicas, pero no misma lesión

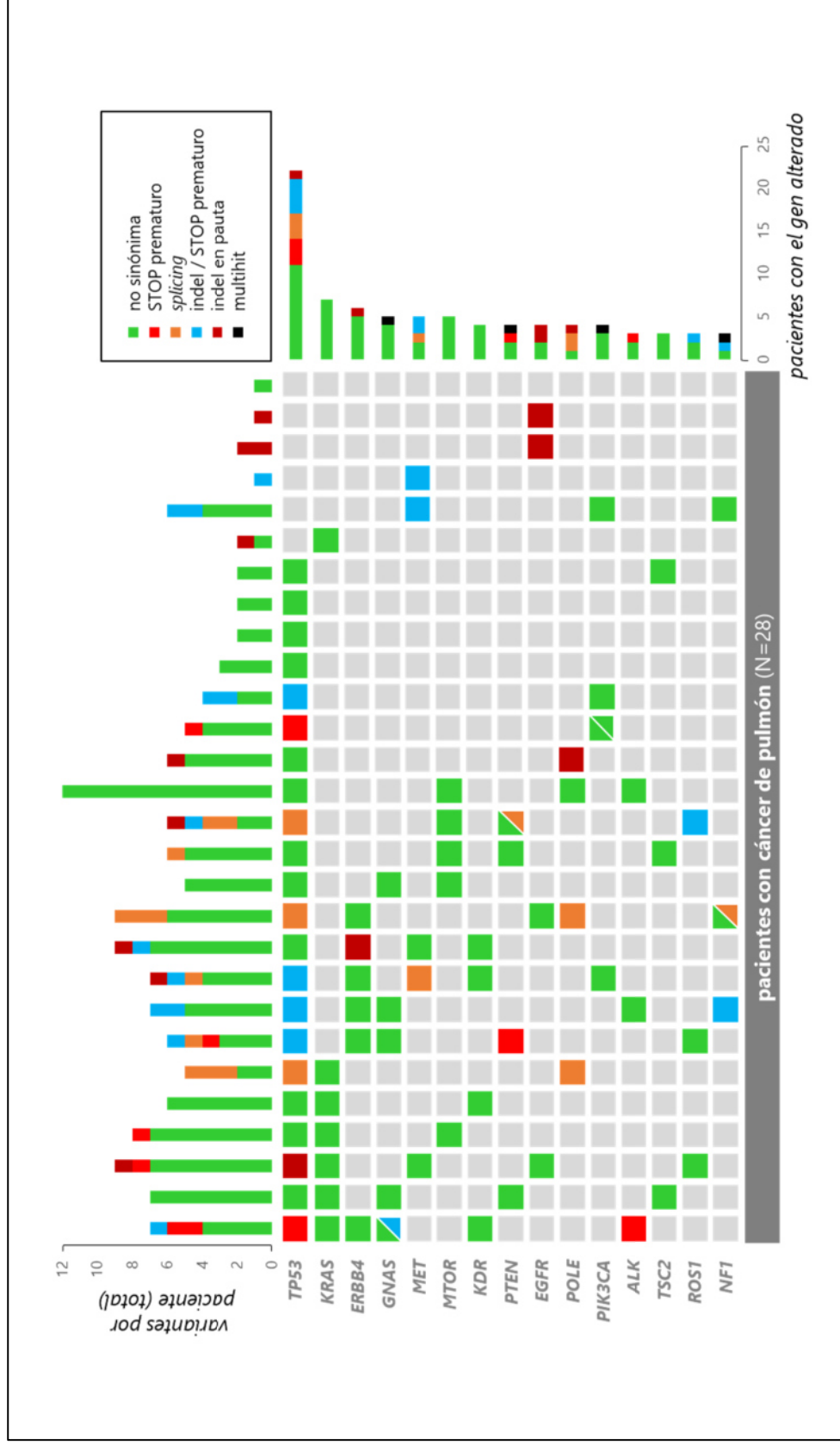
Paciente #	Variante	Tipo de alteración	coordenadas genómicas (GRCh37)	AF	Origen	Detectada en biopsia de tejido	Origen tumoral	BT y BL temporalmente emparejadas
43	RET	RE	.	.	ctDNA	sí	confirmado	sincrónicas, pero no misma lesión
46	TP53 c.818G>C p.Arg273Pro	SNV	17:7577120	0,51 %	CH	.	.	sí
46	NFI c.1812delG p.Ile605fs*26	indel	17:29550551	0,52 %	CH	.	.	sí
48	ESR1 c.899G>A p.Arg300His	SNV	6:152265446	49,86 %	germinal	.	.	sí
48	SMO c.124C>T p.Arg42Trp	SNV	7:128829116	50,62 %	germinal	.	.	sí
48	CDH1 c.46_47insTGC p.Leu15_Gln16insLeu	indel	16:68771364	48,94 %	germinal	.	.	sí
48	TP53 c.707A>C p.Tyr236Ser	SNV	17:7577574	0,28 %	CH	.	.	sí
48	TP53 c.434T>A p.Leu145Gln	SNV	17:7578496	0,24 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
48	TP53 c.527G>A p.Cys176Tyr	SNV	17:7578403	1,90 %	CH	.	.	sí
49	MYC c.1085C>T p.Ser362Phe	SNV	8:128752924	49,66 %	germinal	.	.	sí
49	KRAS c.35G>T p.Gly12Val	SNV	12:25398284	1,96 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
49	TP53 c.541C>T p.Arg181Cys	SNV	17:7578389	0,56 %	CH	.	.	sí
49	TP53 c.375+1G>A.	SNV	17:7579311	2,47 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
50	MTOR c.5455C>A p.His1819Asn	SNV	1:11190744	1,17 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
50	KIT c.2447A>T p.Asp816Val	SNV	4:55599321	3,81 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
50	KIT c.2459A>T p.Asp820Val	SNV	4:55599333	1,22 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
50	TP53 c.403T>C p.Cys135Arg	SNV	17:7578527	1,02 %	ctDNA	sí	confirmado	sí
50	GNAS c.1640G>A p.Arg547His	SNV	20:57429960	0,19 %	ctDNA	no	inferido	sí

AF: frecuencia alélica; BL: biopsia líquida; BT: biopsia de tejido; CH: hematopoyesis clonal; indel: inserción/delección; RE: reordenamiento; SNV: variante de un solo nucleótido.

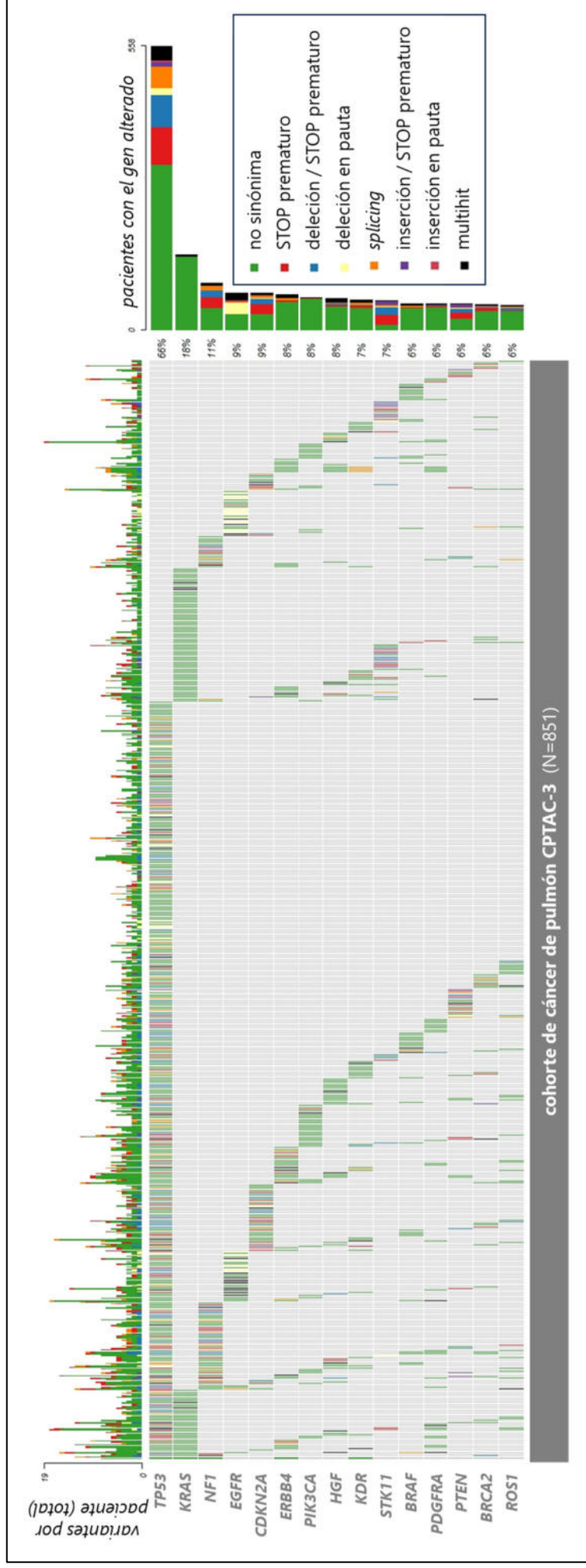
APÉNDICE 7. Espectro mutacional de los pacientes de la cohorte por grupos.



Espectro mutacional de los pacientes segregados por grupo clínico. El diagrama muestra conjuntamente las variantes somáticas identificadas en la biopsia de tejido y/o en la biopsia líquida, segregando a los pacientes por grupo clínico (EI, OMT y OMT+). Las columnas representan los individuos, y las filas los genes más frecuentemente mutados. En colores se muestran los diferentes tipos de alteración genómica. CNV: variación en el número de copias; indel: inserción-delección; RE: reordenamiento.



Espectro mutacional de los pacientes de la cohorte con cáncer de pulmón. El diagrama muestra conjuntamente las variantes somáticas identificadas en la biopsia de tejido y/o en la biopsia líquida de los 28 pacientes con cáncer de pulmón. Cada columna representa un paciente y las filas, los genes más frecuentemente mutados. En colores se muestran los diferentes tipos de alteración genómica; las casillas con dos colores representan genes con varias alteraciones de distinto tipo ("multihit"). CNV: variación en el número de copias; indel: inserción-delección; RE: reordenamiento.



Espectro mutacional de los pacientes con cáncer de pulmón del Clinical Proteomic Tumour Analysis Consortium 3 (CPTAC-3). Esta figura representa las variantes detectadas mediante la secuenciación de una biopsia de tejido de una cohorte de 916 casos de cáncer de pulmón de la base de datos pública Clinical Proteomic Tumour Analysis Consortium 3 (CPTAC-3), tras substracción germinal. Se han seleccionado solo los genes incluidos en el diseño de los paneles genómicos empleados en este trabajo y se despliega la información de los 15 genes más frecuentemente mutados. Los datos fueron descargados del repositorio del National Cancer Institute (NCI)'s Genomic Data Commons (GDC), encuadrados en el proyecto the Cancer Genome Atlas (TCGA). CNV: variante en el número de copias; RE: reordenamiento; TMB: Tumour Mutation Burden (carga mutacional del tumor).

APÉNDICE 8. Listado de todas las variantes somáticas detectadas en la biopsia líquida y/o en la biopsia de tejido.

Paciente #	Variante	AF* (BT/BL)	Coordenadas GRCh37	Región panel BT	Detectada en BT	Región panel BL	Detectada en BL
1	ATR c.1023G>T p.Leu341Phe	42,28 %	3:142281221	sí	sí	no	no
1	ROS1 c.3354G>T p.Met1118Ile	64,29 %	6:117683793	sí	sí	no	no
1	EGFR c.1549G>T p.Gly517Cys	46,30 %	7:55229242	sí	sí	sí	no
1	MET c.3664G>A p.Asp1222Asn	60,24 %	7:116423389	sí	sí	sí	no
1	FGFR2 c.2329G>A p.Glu777Lys	0,11 %	10:123239508	sí	no	sí	sí
1	IGF1R c.2935G>T p.Glu979*	67,57 %	15:99473513	sí	sí	no	no
1	KRAS c.35G>T p.Gly12Val	45,10 %	12:25398284	sí	sí	sí	no
1	TP53 c.1023_1024delCCinsAT p.Phe341_Arg342delinsLeu	67,71 %	17:7574003	sí	sí	sí	no
1	GNA11 c.733G>A p.Glu245Lys	70,31 %	19:3119049	sí	sí	sí	no
2	EGFR c.2236_2250del p.Glu746_Ala750del	NE	7:55242465	sí	sí	sí	no
2	BRAF c.1458_1472del p.Asn486_Thr491>Lys	0,13 %	7:140477835	sí	no	sí	sí
3	JAK1 c.3409T>C p.Ser1137Pro	73,32 %	1:65300301	sí	sí	no	no
3	BAP1 c.400G>A p.Ala134Thr	71,43 %	3:52441452	sí	sí	no	no
3	TP53 c.659A>G p.Tyr220Cys	72,41 %	17:7578190	sí	sí	sí	no
4	PIK3CA c.328G>A p.Glu110Lys	100%	3:178916941	sí	sí	sí	no
4	PIK3CA c.1624G>A p.Glu542Lys	72,21 % / 0,28 %	3:178936082	sí	sí	sí	sí
4	IL7R c.1184A>G p.Lys395Arg	4,41 %	5:35876392	sí	sí	no	no
4	RET c.3157C>T p.Pro1053Ser	23,99 %	10:43622140	sí	sí	no	no
4	TP53 c.991C>T p.Gln331*	68,33 %	17:7576855	sí	sí	sí	no
5	CTNNB1 c.94G>T p.Asp32Tyr	43,60 %	3:41266097	sí	sí	no	no
5	CSF1R c.1735C>T p.Arg579Trp	2,05 %	5:149441304	sí	sí	no	no
5	FGFR4 c.1817G>A p.Arg606Gln	2,02 %	5:176522720	sí	sí	no	no
5	TP53 c.742C>T p.Arg248Trp	74,04 %	17:7577539	sí	sí	sí	no
6	KDR c.802C>A p.Gln268Lys	48,54 %	4:55979645	sí	sí	no	no
6	FBXW7 c.1393C>T p.Arg465Cys	47,74 %	4:153249385	sí	sí	no	no
6	TP53 c.817C>T p.Arg273Cys	73,25 % / 0,25 %	17:7577121	sí	sí	sí	sí
7	TP53 c.80delC p.Pro27Leufs*17	42,43 % / 0,43 %	17:7579715	sí	sí	sí	sí
7	FLCN Ganancia (N=7)	NE	NE	sí	sí	no	no
8	PIK3CA c.1624G>A p.Glu542Lys	7,74 %	3:178936082	sí	sí	sí	no
8	PIK3CA Ganancia (N=6)	NE	NE	sí	sí	no	no
9	CSF3R c.514G>A p.Asp172Asn	52,68 %	1:36939195	sí	sí	no	no
10	PIK3R1 c.1073G>C p.Arg358Pro	66,30 %	5:67588982	sí	sí	no	no
10	PIK3R1 c.1735C>T p.Gln579*	8,15 %	5:67591142	sí	sí	no	no
10	TP53 c.993+1G>A	97,06 %	17:7576852	sí	sí	sí	no
10	CDKN2A Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
10	CDKN2B Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
12	TP53 c.823T>C p.Cys275Arg	100%	17:7577115	sí	sí	sí	no
12	CCND1 Ganancia (N=7)	NE	NE	sí	sí	no	no
12	KRAS Ganancia (N=9)	NE	NE	sí	sí	sí	no
13	MTOR c.5912C>T p.Ala1971Val	12,61 %	1:11188182	sí	sí	sí	no
13	PTEN c.494G>A p.Gly165Glu	50,65 %	10:89711876	sí	sí	sí	no
13	IGF2 c.119C>A p.Thr40Asn	13,80 %	11:2156635	sí	sí	no	no
13	TSC2 c.1031G>T p.Arg344Met	19,05 %	16:2110726	sí	sí	no	no
13	TP53 c.749C>T p.Pro250Leu	42,15 %	17:7577532	sí	sí	sí	no
13	JAK3 c.566+1G>T	14,52 %	19:17953835	sí	sí	sí	no
14	MAP2K1 c.171G>T p.Lys57Asn	33,56 %	15:66727455	sí	sí	sí	no
14	TP53 c.467G>C p.Arg156Pro	28,93 % / 0,26 %	17:7578463	sí	sí	sí	sí
15	CCND3 c.96_97delinsTT p.Arg33Cys	34,98 %	6:41909291	sí	sí	no	no
15	KRAS c.34G>T p.Gly12Cys	100%	12:25398285	sí	sí	sí	no
15	FGFR4 Gain (N>6)	NE	NE	sí	sí	no	no
16	MTOR c.3191G>A p.Gly1064Glu	52,08 %	1:11273550	sí	sí	no	no
16	IL7R c.643_644delGGinsTT p.Gly215Phe	77,10 %	5:35873687	sí	sí	no	no

Paciente #	Variante	AF* (BT/BL)	Coordenadas GRCh37	Región panel BT	Detectada en BT	Región panel BL	Detectada en BL
16	ROS1 c.3834_3835del p.Ser1279Cysfs*51	49,57 %	6:117678985	sí	sí	no	no
16	PTEN c.182A>G p.His61Arg	1,16 %	10:89685287	sí	no	sí	sí
16	PTEN c.635-1G>C	1,03 %	10:89717609	sí	no	sí	sí
16	TP53 c.560-2A>G	100 % / 47,28 %	17:7578291	sí	sí	sí	sí
17	MITF c.1217G>A p.Arg406Gln	4,09 %	3:70014356	sí	sí	no	no
17	PIK3CA c.1633G>A p.Glu545Lys	4,24 %	3:178936091	sí	sí	sí	no
17	KRAS c.38G>A p.Gly13Asp	40,83 %	12:25398281	sí	sí	sí	no
17	NF1 c.2356C>T p.Gln786*	35,57 %	17:29554571	sí	sí	sí	no
17	NF1 c.4285G>A p.Ala1429Thr	42,64 %	17:29586065	sí	sí	sí	no
17	TP53 c.686_687del p.Cys229Tyrfs*10	3,76 %	17:7577593	sí	sí	sí	no
18	PIK3CA c.772G>T p.Asp258Tyr	39,06 %	3:178919287	sí	sí	no	no
18	MET c.2637delT p.Asn879Lysfs*23	40,18 %	7:116409751	sí	sí	sí	no
18	GATA3 c.1052T>G.Ile351Ser	25,86 %	10:8115703	sí	sí	no	no
18	GATA3 c.1082G>A p.Gly361Asp	22,73 %	10:8115733	sí	sí	no	no
18	FRS2 c.1514delA p.Asp505Valfs*?	34,72 %	12:69968721	sí	sí	no	no
18	NF1 c.5147C>G p.Ala1716Gly	0,10 %	17:29653149	sí	no	sí	sí
19	FBXW7 c.355G>T p.Asp119Tyr	38,18 %	4:153332601	sí	sí	no	no
19	TP53 c.469G>T p.Val157Phe	38,38 %	17:7578461	sí	sí	sí	no
20	STK11 c.394T>C p.Cys132Arg	72,51 %	19:1219342	sí	sí	no	no
20	CDKN2A Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
20	CDKN2B Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
21	ATM c.8977C>T p.Arg2993*	77,63 %	11:108235935	sí	sí	no	no
21	KRAS c.34G>C p.Gly12Arg	47,39 %	12:25398285	sí	sí	sí	no
21	CDKN2A Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
21	CDKN2B Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
23	SMO c.193G>T p.Gly65Cys	47,24 %	7:128829185	sí	sí	sí	no
23	RET c.157G>C p.Val53Leu	36,32 %	10:43595990	sí	sí	no	no
23	RET c.209A>T p.Gln70Leu	34,80 %	10:43596042	sí	sí	no	no
23	RET c.1250G>T p.Arg417Leu	38,16 %	10:43604665	sí	sí	no	no
23	POLE c.1524_1525delGGinsTT p.Gln508Ala509delinsHisSer	42,56 %	12:133249374	sí	sí	no	no
23	TP53 c.473G>T p.Arg158Leu	85,03 %	17:7578457	sí	sí	sí	no
24	EGFR c.2237_2255delCinsT p.Glu746_Ser752delinsVal	NE	NE	sí	sí	sí	no
26	ERBB4 c.1112C>A p.Thr371Asn	23,42 %	2:212576787	sí	sí	no	no
26	ROS1 c.3629A>T p.His1210Leu	51,57 %	6:117680991	sí	sí	no	no
26	FGFR2 c.377-1G>A	61,08 %	10:123324094	sí	sí	sí	no
26	PTEN c.1054G>T p.Glu352*	53,76 %	10:89725071	sí	sí	sí	no
26	TP53 c.552delT p.Asp184Glufs*63	86,29 %	17:7578377	sí	sí	sí	no
26	GNAS c.64C>A p.Pro22Thr	61,86 %	20:57415225	sí	sí	sí	no
27	ARID1A c.6298C>T p.Gln2100*	98,28 %	1:27106687	sí	sí	no	no
27	CDKN1A c.35delC p.Pro12Hisfs*19	53,82 %	6:36651910	sí	sí	no	no
27	CDKN2B c.328G>A p.Asp110Asn	52,27 %	9:22006075	sí	sí	no	no
27	PALB2 c.7G>T p.Glu3*	29,23 %	16:23652472	sí	sí	no	no
27	TP53 c.536A>G p.His179Arg	99,17 %	17:7578394	sí	sí	sí	no
27	JAK3 c.2011G>A p.Asp671Asn	22,97 %	19:17945928	sí	sí	sí	no
28	KRAS c.35G>T p.Gly12Val	63,62 %	12:25398284	sí	sí	sí	no
28	PTPN11 c.1282G>A p.Val428Met	0,19 %	12:112924336	sí	no	sí	sí
28	TP53 c.874_877del p.Lys292Glyfs*52	66,67 %	17:7577060	sí	sí	sí	no
28	CCND2 Ganancia (N=15)	NE	NE	sí	sí	no	no
29	MPL c.700C>G p.Leu234Val	14,44 %	1:43805644	sí	sí	no	no
29	PTEN c.320A>T p.Asp107Val	22,34 %	10:89692836	sí	sí	sí	no
29	KRAS c.35G>A p.Gly12Asp	46,92 %	12:25398284	sí	sí	sí	no
29	PRKCH c.695A>G p.Asp232Gly	19,30 %	14:61915963	sí	sí	no	no
29	TSC2 c.1756G>T p.Val586Leu	18,69 %	16:2120496	sí	sí	no	no
29	TP53 c.747G>T p.Arg249Ser	23,97 %	17:7577534	sí	sí	sí	no
29	GNAS c.1398T>A p.Asp466Glu	47,51 %	20:57429718	sí	sí	sí	no
30	ERBB4 c.3814_3815delinsCT p.Gly1272Leu	52,06 %	2:212248452	sí	sí	no	no
30	PIK3CB c.1282A>T p.Ile428Phe	26,86 %	3:138433330	sí	sí	no	no
30	PDGFRA c.3250G>A p.Val1084Met	71,72 %	4:55161419	sí	sí	no	no

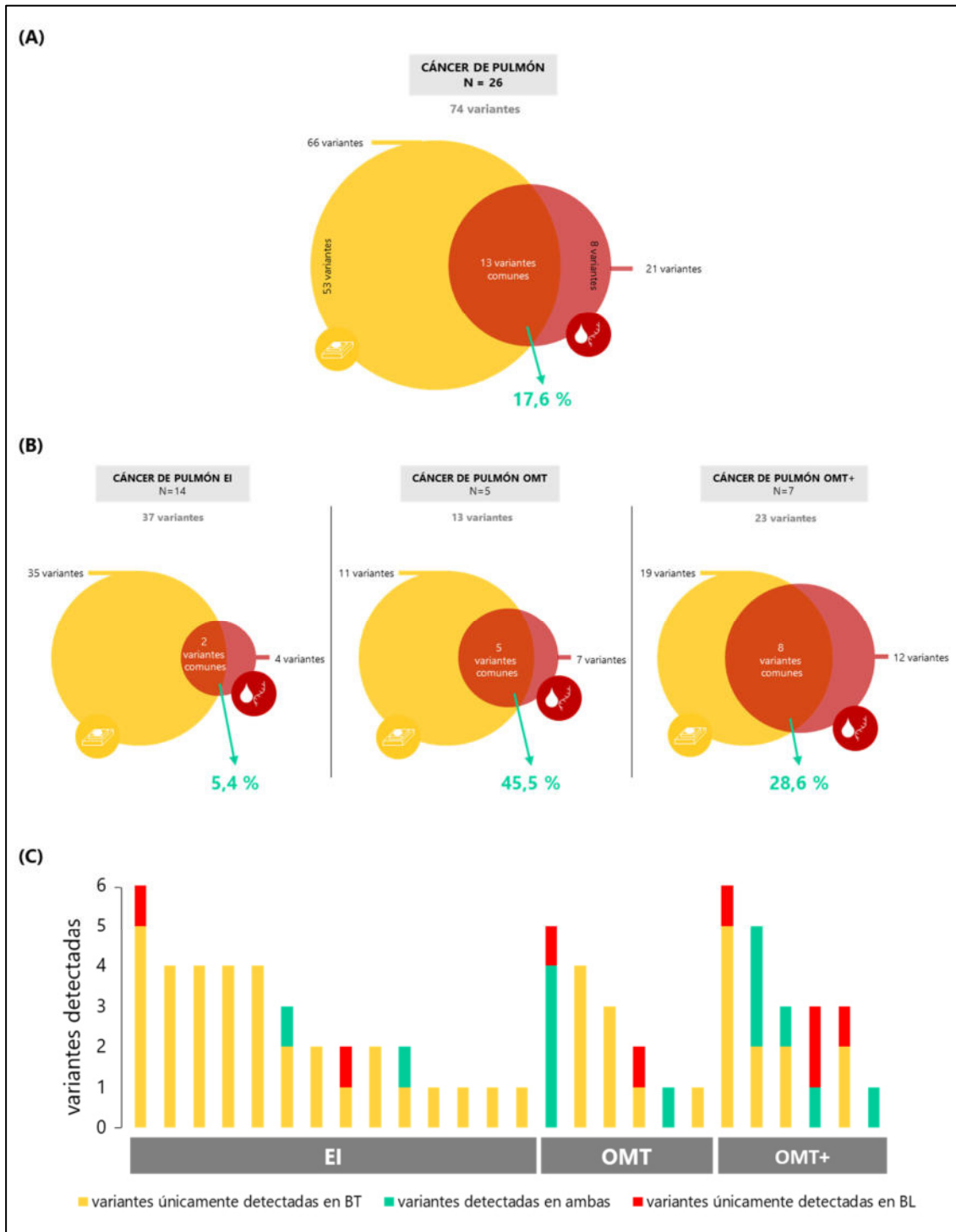
Paciente #	Variante	AF* (BT/BL)	Coordenadas GRCh37	Región panel BT	Detectada en BT	Región panel BL	Detectada en BL
30	KDR c.2172C>G p.Ile724Met	28,40 %	4:55968158	sí	sí	no	no
30	MET c.2759T>C p.Leu920Pro	19,96 %	7:116411580	sí	sí	sí	no
30	GATA3 c.933delC p.Arg312Glyfs*44	2,67 %	10:8111442	sí	sí	no	no
30	FANCA c.2251A>T p.Arg751Trp	41,76 %	16:89836639	sí	sí	no	no
30	MAP2K2 c.848T>A p.Val283Glu	44,81 %	19:4099270	sí	sí	sí	no
30	TP53 c.745A>T p.Arg249Trp	73,49 %	17:7577536	sí	sí	sí	no
30	KRAS Ganancia (N=8)	NE	NE	sí	sí	sí	no
31	MTOR c.6305A>T p.Asp2102Val	37,11 %	1:11187113	sí	sí	sí	no
31	ATR c.2918A>G p.Asn973Ser	22,26 %	3:142269032	sí	sí	no	no
31	RICTOR c.5008C>T p.Arg1670Trp	27,63 %	5:38942979	sí	sí	no	no
31	RICTOR c.4189C>T p.Pro1397Ser	17,09 %	5:38947491	sí	sí	no	no
31	PTCH1 c.1817G>T p.Arg606Met	38,19 %	9:98232125	sí	sí	no	no
31	KRAS c.35G>T p.Gly12Val	95,66 % / 0,34 %	12:25398284	sí	sí	sí	sí
31	RAD51C c.181C>G p.Leu61Val	18,06 %	17:56772327	sí	sí	no	no
31	TP53 c.949C>T p.Gln317*	36,71 %	17:7576897	sí	sí	sí	no
31	STK11 Ganancia (N=7)	NE	NE	sí	sí	no	no
32	ERBB4 c.308G>A p.Arg103His	8,20 %	2:212812268	sí	sí	no	no
32	KDR c.283G>C p.Gly95Arg	51,46 %	4:55984846	sí	sí	no	no
32	MITF c.589_594del p.Arg197_Ala198del	63,15 %	3:70000987	sí	sí	no	no
32	PIK3CA c.1633G>A p.Glu545Lys	39,29 %	3:178936091	sí	sí	sí	no
32	MET c.1392+1G>A	0,21 %	7:116371914	sí	no	sí	sí
32	PTCH1 c.3409G>T p.Val1137Leu	10,23 %	9:98215800	sí	sí	no	no
32	TP53 c.94_95del p.Leu32Valfs*10	96,62 %	17:7579700	sí	sí	sí	no
33	ATR c.5528C>T p.Ser1843Phe	9,45 %	3:142217469	sí	sí	no	no
33	TP53 c.880G>T p.Glu294*	9,69 %	17:7577058	sí	sí	sí	no
33	TP53 c.569C>T p.Pro190Leu	48,83 %	17:7578280	sí	sí	sí	no
34	KRAS c.437C>T p.Ala146Val	52,06 %	12:25378561	sí	sí	sí	no
34	FLT3 c.1012C>T p.Gln338*	8,81 %	13:28623545	sí	sí	no	no
34	NF1 c.3736delC p.Leu1246Cysfs*20	46,31 %	17:29562655	sí	sí	sí	no
34	TP53 c.524G>A p.Arg175His	51,37 %	17:7578406	sí	sí	sí	no
35	MTOR c.1720C>T p.Pro574Ser	32,57 %	1:11300426	sí	sí	no	no
35	ARID1A c.1576C>T p.Pro526Ser	28,32 %	1:27057868	sí	sí	no	no
35	JAK1 c.2784C>G p.Ile928Met	29,15 %	1:65305344	sí	sí	no	no
35	IDH1 c.929G>T p.Gly310Val	26,22 %	2:209104649	sí	sí	no	no
35	ALK c.1969G>C p.Glu657Gln	24,68 %	2:29498037	sí	sí	no	no
35	INPP4B c.436G>C p.Gly146Arg	52,21 %	4:143226678	sí	sí	no	no
35	POLE c.2083T>A p.Phe695Ile	2,60 %	12:133245032	sí	sí	no	no
35	FLT3 c.316G>T p.Val106Phe	64,07 %	13:28636056	sí	sí	no	no
35	IDH2 c.879G>T p.Met293Ile	84,42 %	15:90630432	sí	sí	no	no
35	TP53 c.818G>T p.Arg273Leu	58,79 % / 0,1 %	17:7577120	sí	sí	sí	sí
35	JAK3 c.3073G>C p.Asp1025His	68,02 %	19:17941335	sí	sí	no	no
35	NF2 c.1324G>C p.Glu442Gln	23,91 %	22:30069459	sí	sí	no	no
36	KIT c.482G>T p.Arg161Met	54,16 %	4:55564594	sí	sí	no	no
36	PIK3CA c.1624G>A p.Glu542Lys	45,08 %	3:178936082	sí	sí	sí	no
36	PALB2 c.2642delG p.Gly881Valfs*8	58,78 %	16:23637662	sí	sí	no	no
36	TP53 c.465_466dupCC p.Arg156Profs*15	56,16 %	17:7578463	sí	sí	sí	no
36	MYC-IGH reordenamiento	.	.	no	no	sí	sí
37	MET c.2610delT p.Gly872Valfs*4	14,18 %	7:116409723	sí	sí	sí	no
38	IGF1R c.1961A>T p.Asp654Val	41,99 %	15:99459325	sí	sí	no	no
38	TP53 c.746G>A p.Arg249Lys	0,11 %	17:7577535	sí	no	sí	sí
38	TP53 c.385_392dupp.Asn131Lysfs*42	93,90 %	17:7578537	sí	sí	sí	no
39	KDR c.2913C>A p.Ser971Arg	45,69 %	4:55961027	sí	sí	no	no
39	PIK3R1 c.1721G>T p.Arg574Ile	41,00 %	5:67591128	sí	sí	no	no
39	SMO c.1277T>C p.Leu426Pro	48,02 %	7:128848612	sí	sí	sí	no
39	ATM c.6056A>G p.Tyr2019Cys	97,95 %	11:108186599	sí	sí	no	no
39	KRAS c.35G>T p.Gly12Val	50,71 %	12:25398284	sí	sí	sí	no
39	TP53 c.461G>T p.Gly154Val	81,69 %	17:7578469	sí	sí	sí	no
40	KDR c.1444T>C p.Cys482Arg	7,28 %	4:55972946	sí	sí	no	no
40	CCND3 c.759G>T p.Glu253Asp	7,80 %	6:41903798	sí	sí	no	no

Paciente #	Variante	AF* (BT/BL)	Coordenadas GRCh37	Región panel BT	Detectada en BT	Región panel BL	Detectada en BL
40	ATM c.1636C>G p.Leu546Val	8,10 %	11:108122592	sí	sí	no	no
40	IGF2 c.383G>A p.Arg128Lys	14,88 %	11:2154377	sí	sí	no	no
40	KRAS c.35G>A p.Gly12Asp	46,92 %	12:25398284	sí	sí	sí	no
40	ERBB3 c.1463G>A p.Arg488Gln	5,33 %	12:56487317	sí	sí	no	no
40	MAP2K1 c.901G>A p.Gly301Arg	43,01 %	15:66779571	sí	sí	no	no
40	ERBB2 c.3647C>A p.Ala1216Asp	7,29 %	17:37884176	sí	sí	sí	no
40	TP53 c.799C>T p.Arg267Trp	18,11 %	17:7577139	sí	sí	sí	no
40	TP53 c.743G>A p.Arg248Gln	43,68 %	17:7577538	sí	sí	sí	no
40	IGF1R c.3988G>A p.Gly1330Ser	9,55 %	15:99500555	sí	sí	no	no
40	AR c.2362A>T p.Met788Leu	35,45 %	X:66941718	sí	sí	no	no
41	ERBB4 c.2180G>C p.Gly727Ala	51,28 %	2:212488669	sí	sí	no	no
41	FGFR4 c.2181C>A p.His727Gln	80,95 %	5:176524320	sí	sí	no	no
41	EGFR c.828G>T p.Gln276His	0,14 %	7:55221784	sí	no	sí	sí
41	BRAF c.1742A>T p.Asn581Ile	34,68 %	7:140453193	sí	sí	sí	no
41	POLE c.3583-2A>T	35,35 %	12:133226477	sí	sí	no	no
41	BRCA2 c.7610A>T p.His2537Leu	56,48 %	13:32930739	sí	sí	sí	no
41	TP53 c.375+1G>T	59,95 %	17:7579311	sí	sí	sí	no
41	NF1 c.6641+1G>C c.6704+1G>C	26,76 %	17:29664899	sí	sí	sí	no
41	NF1 c.3285G>T p.Leu1095Phe	34,83 %	17:29559178	sí	sí	sí	no
42	MPL c.1775G>A p.Arg592Gln	27,44 %	1:43818310	sí	sí	no	no
42	BRAF c.1799T>A p.Val600Glu	28,51 %	7:140453136	sí	sí	sí	no
42	BRCA2 c.8851G>A p.Ala2951Thr	66,00 %	13:32953550	sí	sí	sí	no
42	TP53 c.694_696delATC p.Ile232del	24,96 %	17:7577584	sí	sí	sí	no
43	ARID1A c.3406G>T p.Ala1136Ser	95,77 %	1:27097817	sí	sí	no	no
43	ERBB4 c.1641G>T p.Glu547Asp	40,88 %	2:212537964	sí	sí	no	no
43	ALK c.2815G>A p.Gly939Ser	52,25 %	2:29451750	sí	sí	no	no
43	RET delección parcial (N=1)	NE	10:43603414-43610231	sí	sí	sí	sí
43	NF1 c.784delC p.Arg262Valfs*19	74,91 %	17:29509578	sí	sí	sí	no
43	ERBB2 c.62C>G p.Ala21Gly	52,94 % / 0,36 %	17:37856553	sí	sí	sí	sí
43	TP53 c.943delT p.Ser315Leufs*30	83,85 % / 0,35 %	17:7576902	sí	sí	sí	sí
43	GNAS c.601C>T p.Arg201Cys	39,79 %	20:57484420	sí	sí	sí	no
43	CDKN2A Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
43	CDKN2B Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
44	BRAF c.1799T>A p.Val600Glu	67,48 %	7:140453136	sí	sí	sí	no
44	CDKN2A Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
44	CDKN2B Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
44	PTEN Delección (N=0)	NE	NE	sí	sí	no	no
45	ALK c.3276C>A p.Tyr1092*	30,93 %	2:29446291	sí	sí	no	no
45	ERBB4 c.1408C>G p.His470Asp	23,22 %	2:212566773	sí	sí	no	no
45	KDR c.1252T>C p.Tyr418His	53,80 %	4:55976573	sí	sí	no	no
45	KRAS c.182A>T p.Gln61Leu	100%	12:25380276	sí	sí	sí	no
45	TP53 c.574C>T p.Gln192*	58,48 %	17:7578275	sí	sí	sí	no
45	GNAS c.1593delC p.Ser532Alafs*158	35,45 %	20:57429907	sí	sí	sí	no
45	GNAS c.1642G>C p.Ala548Pro	39,54 %	20:57429962	sí	sí	sí	no
46	MITF c.37C>T p.Arg13*	1,48 %	3:69813029	sí	sí	no	no
46	INPP4B c.249T>G p.Ile83Met	40,07 %	4:143326365	sí	sí	no	no
46	EGFR c.1787C>T p.Pro596Leu	93,35 %	7:55233037	sí	sí	sí	no
46	PTCH1 c.1119C>G p.Tyr373*	21,58 %	9:98241378	sí	sí	no	no
46	TSC1 c.587C>G p.Pro196Arg	68,34 %	9:135797282	sí	sí	no	no
46	STAG2 c.1810C>T p.Arg604*	83,29 %	X:123197044	sí	sí	no	no
46	EGFR Ganancia (N>25)	NE	NE	sí	sí	sí	no
48	TSC2 c.4209C>A p.Asp1403Glu	13,49 %	16:2134432	sí	sí	no	no
48	TP53 c.434T>A p.Leu145Gln	100 % / 0,24 %	17:7578496	sí	sí	sí	sí
49	KRAS c.35G>T p.Gly12Val	42,89 % / 1,96 %	12:25398284	sí	sí	sí	sí
49	SH2B3 c.721G>A p.Asp241Asn	32,61 %	12:111856670	sí	sí	no	no
49	POLE c.1686+1G>A	24,28 %	12:133249212	sí	sí	no	no

Paciente #	Variante	AF* (BT/BL)	Coordenadas GRCh37	Región panel BT	Detectada en BT	Región panel BL	Detectada en BL
49	<i>TP53</i> c.375+1G>A	53,05 % / 2,47 %	17:7579311	sí	sí	sí	sí
49	<i>STK11</i> c.374+1A>G	58,48 %	19:1218500	sí	sí	no	no
50	<i>MTOR</i> c.5455C>A p.His1819Asn	43,47 % / 1,17 %	1:11190744	sí	sí	sí	sí
50	<i>KIT</i> c.2447A>T p.Asp816Val	61,37 % / 3,81 %	4:55599321	sí	sí	sí	sí
50	<i>KIT</i> c.2459A>T p.Asp820Val	12,35 % / 1,22 %	4:55599333	sí	sí	sí	sí
50	<i>TP53</i> c.403T>C p.Cys135Arg	99,81 % / 1,02 %	17:7578527	sí	sí	sí	sí
50	<i>GNAS</i> c.1640G>A p.Arg547His	0,19 %	20:57429960	sí	no	sí	sí
50	<i>KIT</i> Ganancia (N=7)	NE	NE	sí	sí	no	no
50	<i>KDR</i> Ganancia (N=7)	NE	NE	sí	sí	no	no

AF: Frecuencia Alélica (corregida); BT: Biopsia de Tejido; BL: Biopsia Líquida; NE: No Estimable.

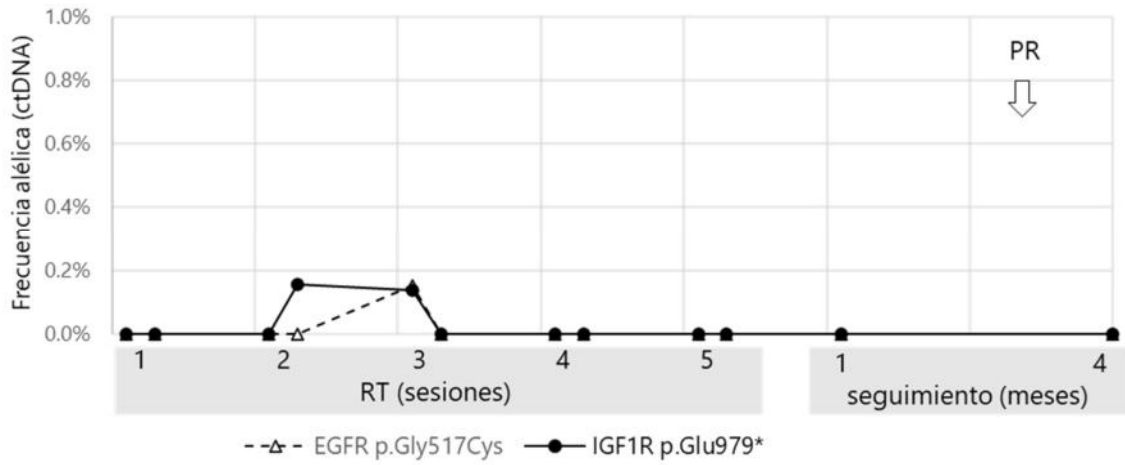
APÉNDICE 9. Concordancia entre la biopsia de tejido y la biopsia líquida en pacientes con cáncer de pulmón.



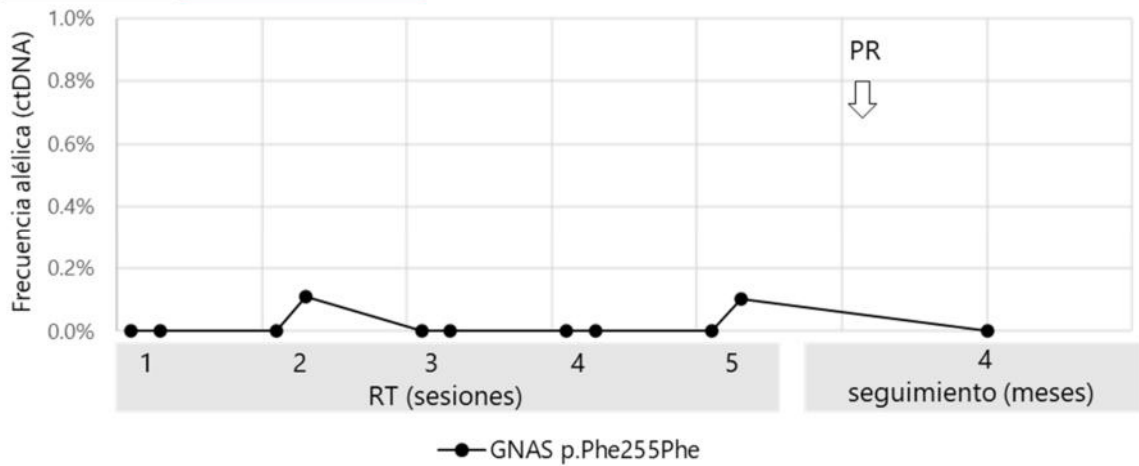
Representación del número de variantes detectadas en la biopsia de tejido (en amarillo) y en la biopsia líquida (en rojo), así como las variantes coincidentes detectadas por ambos estudios (la intersección o en verde). Únicamente se representan las variantes que afectan a regiones cubiertas por ambos paneles genómicos y se han excluido las variantes germinales y de hematopoyesis clonal. (A) Diagramas de Venn mostrando la concordancia en los 26 pacientes con cáncer de pulmón. (B) Diagramas de Venn para cada grupo clínico. (C) Gráfico de columnas apiladas para representar las concordancias entre la biopsia líquida y la biopsia de tejido para cada paciente. BT: Biopsia de Tejido; BL: Biopsia Líquida.

APÉNDICE 10. Estudio longitudinal del ctDNA a lo largo de todo estudio

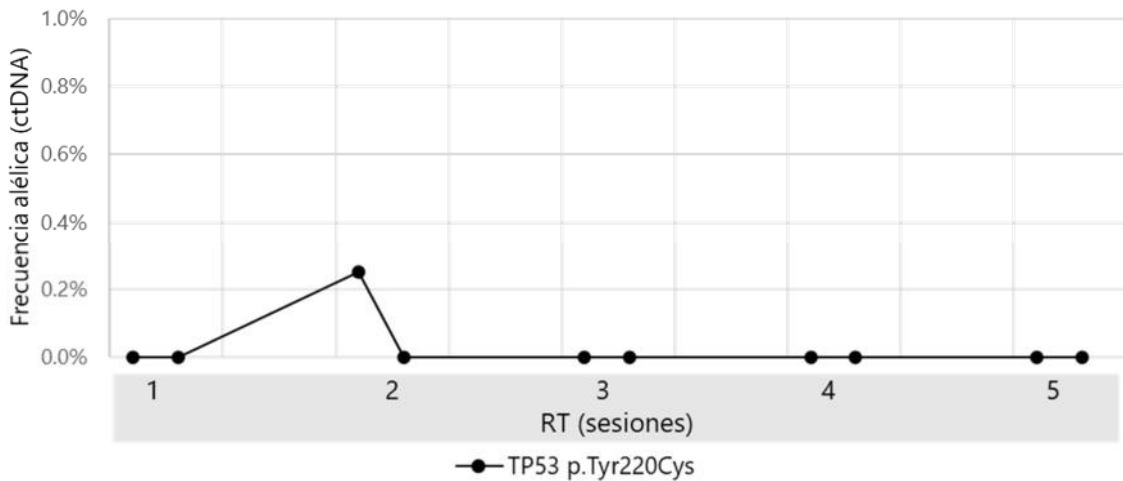
PACIENTE #1 CONCORDANCIA



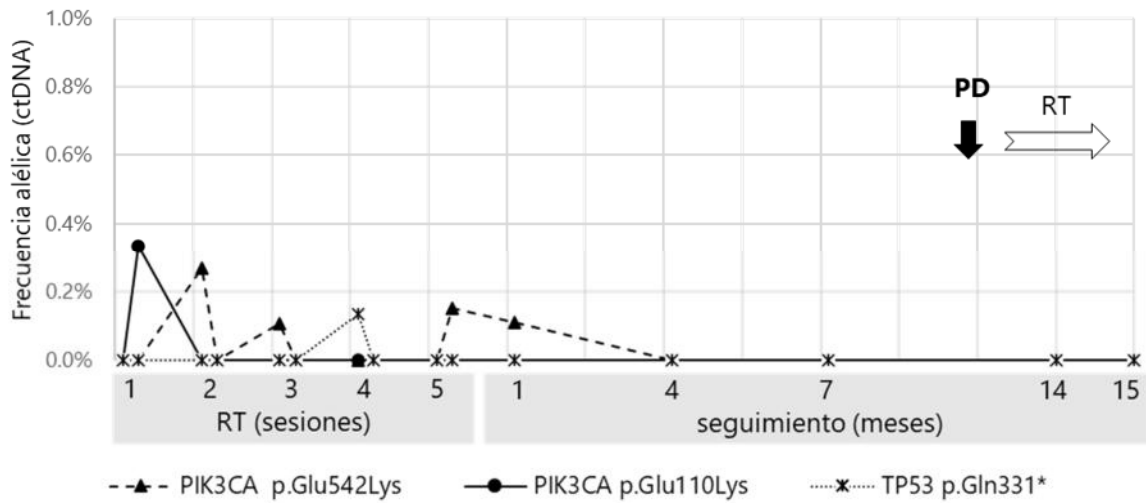
PACIENTE #2 CONCORDANCIA



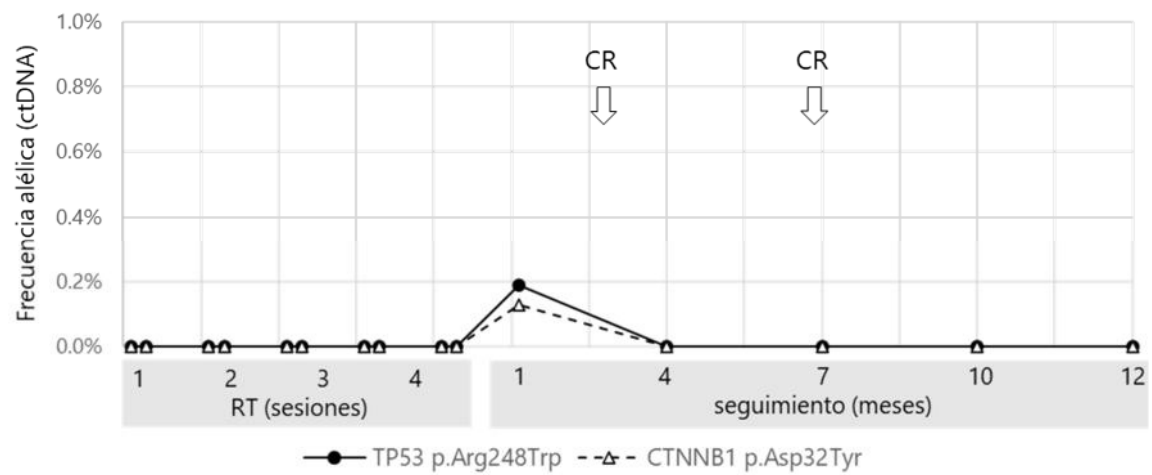
PACIENTE #3 NO SEGUIMIENTO / INFORMACIÓN CLÍNICA NO DISPONIBLE



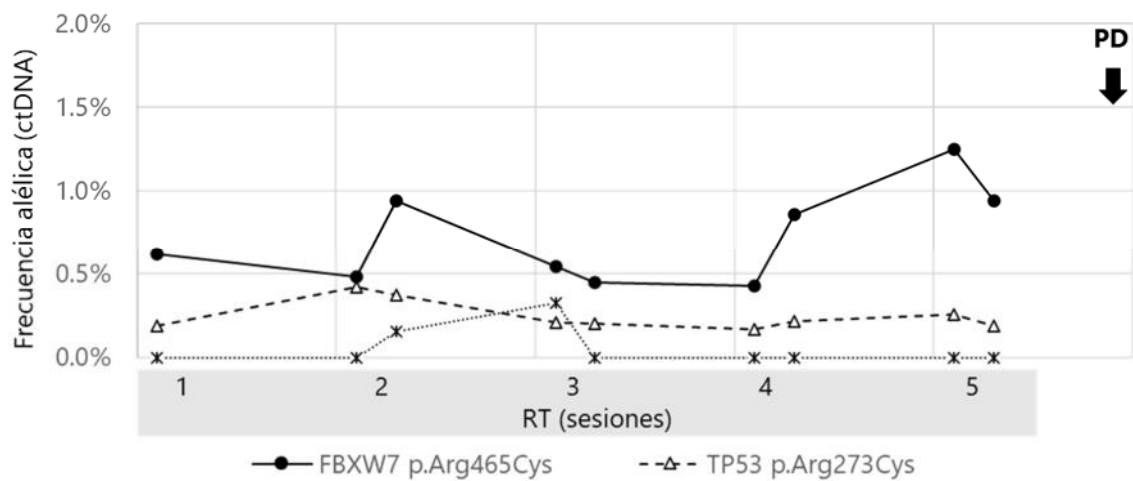
PACIENTE #4 CONCORDANCIA → DESINCRONIZACIÓN DE PRUEBAS (4 meses)



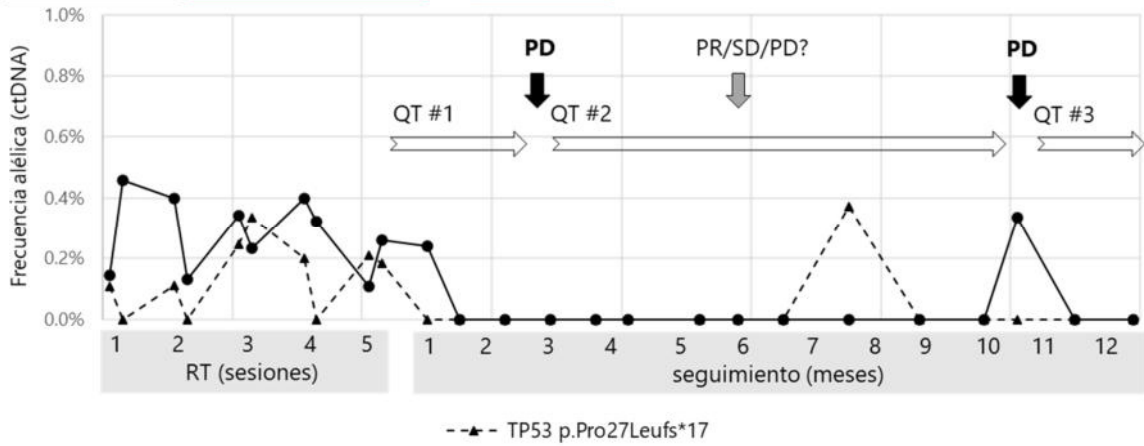
PACIENTE #5 ctDNA INDETECTABLE ANTES/DURANTE RT



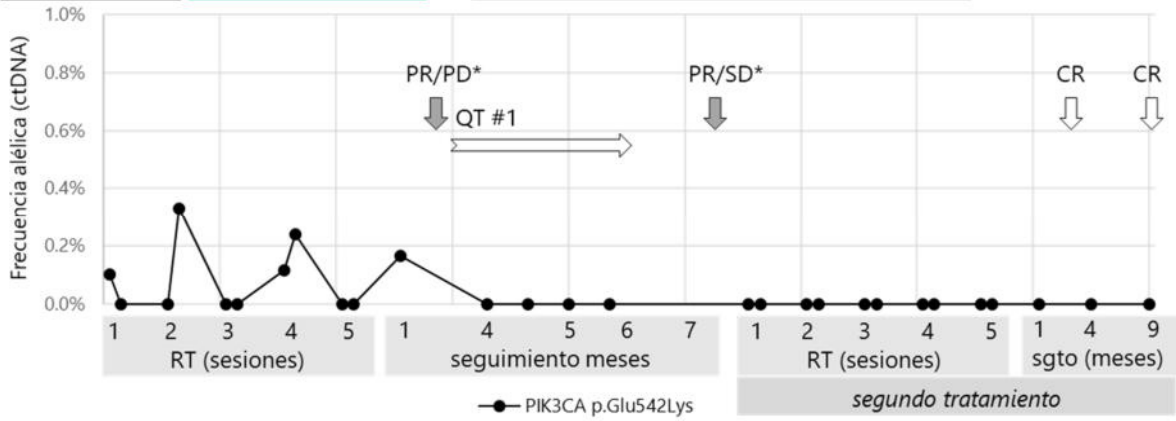
PACIENTE #6 CONCORDANCIA



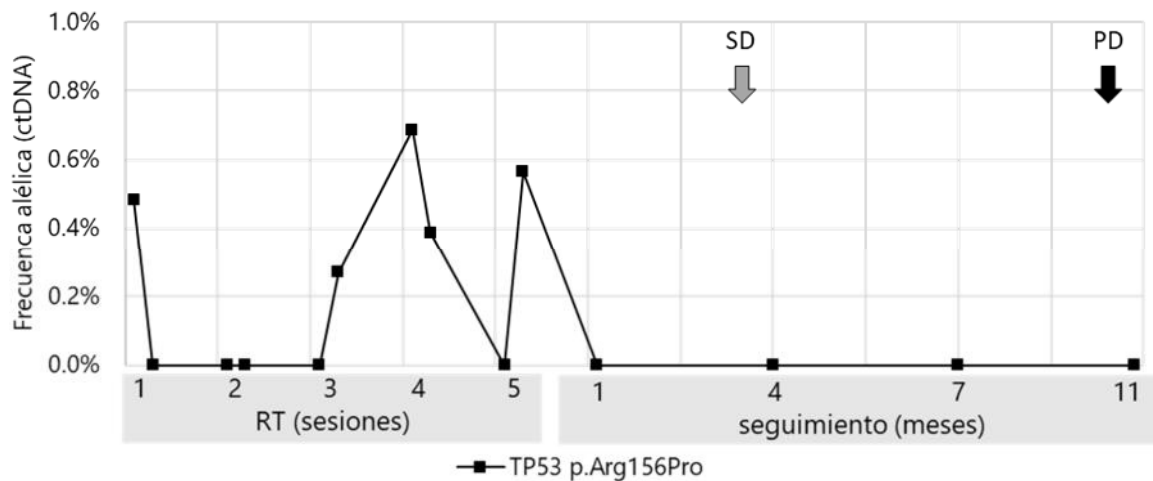
PACIENTE #7 CONCORDANCIA → INICIO QT



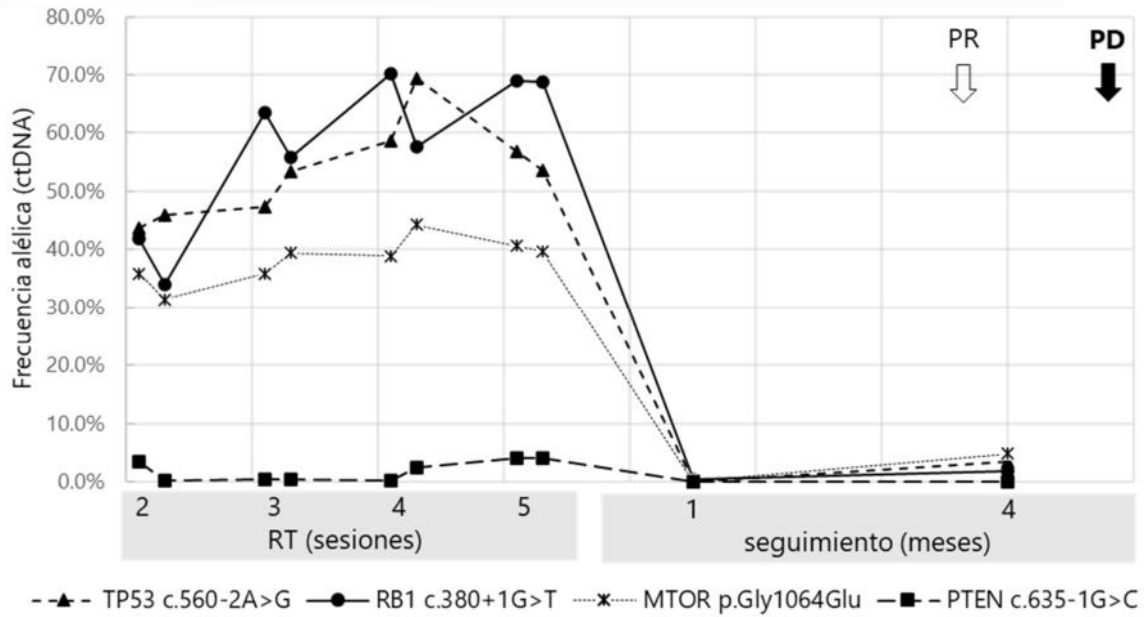
PACIENTE #8 CONCORDANCIA → NO LIBERACIÓN DE ctDNA EN 2º RT



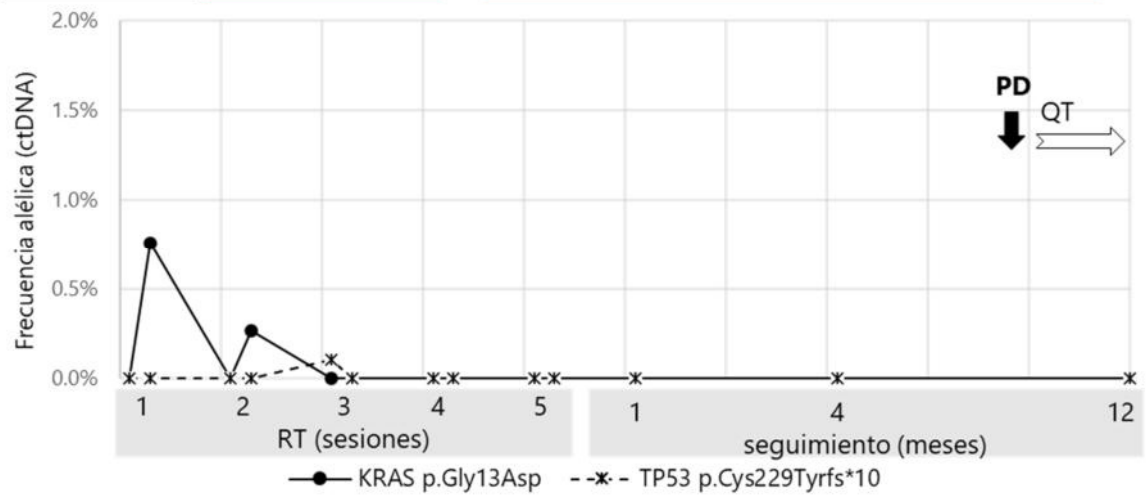
PACIENTE #14 NO CONCORDANCIA



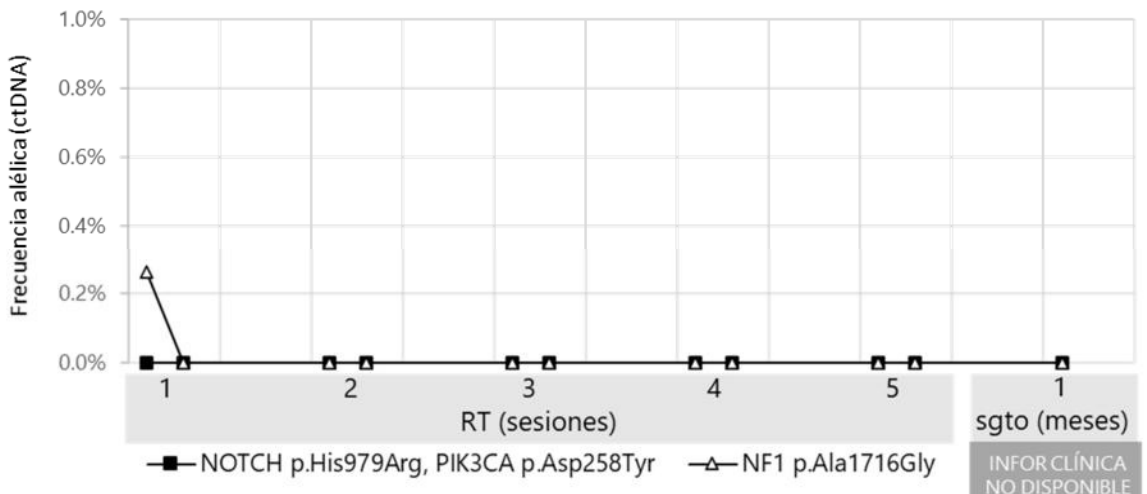
PACIENTE #16 CONCORDANCIA LA BIOPSIA LÍQUIDA SE ANTICIPA (3 meses)



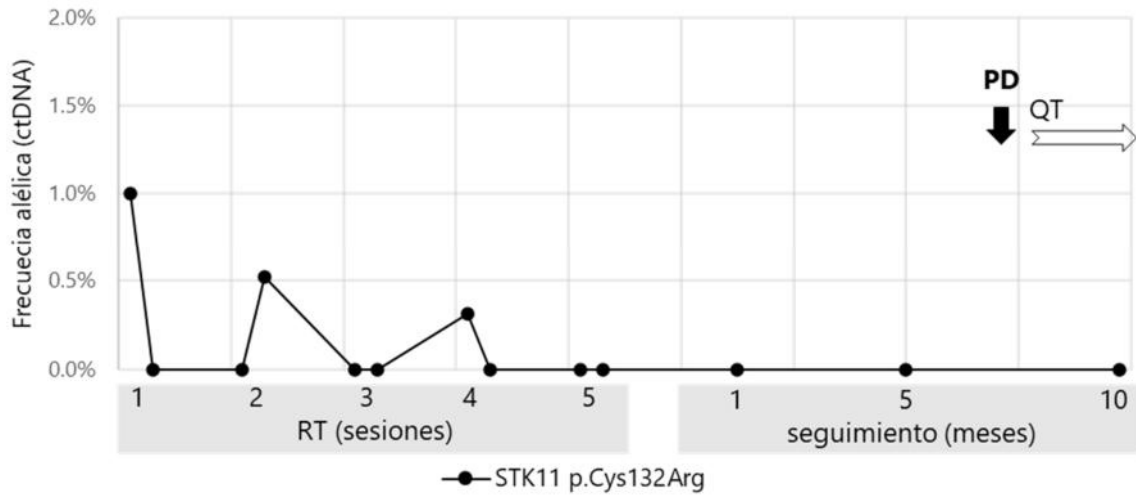
PACIENTE #17 CONCORDANCIA → DESINCRONIZACIÓN DE PRUEBAS (5 meses)



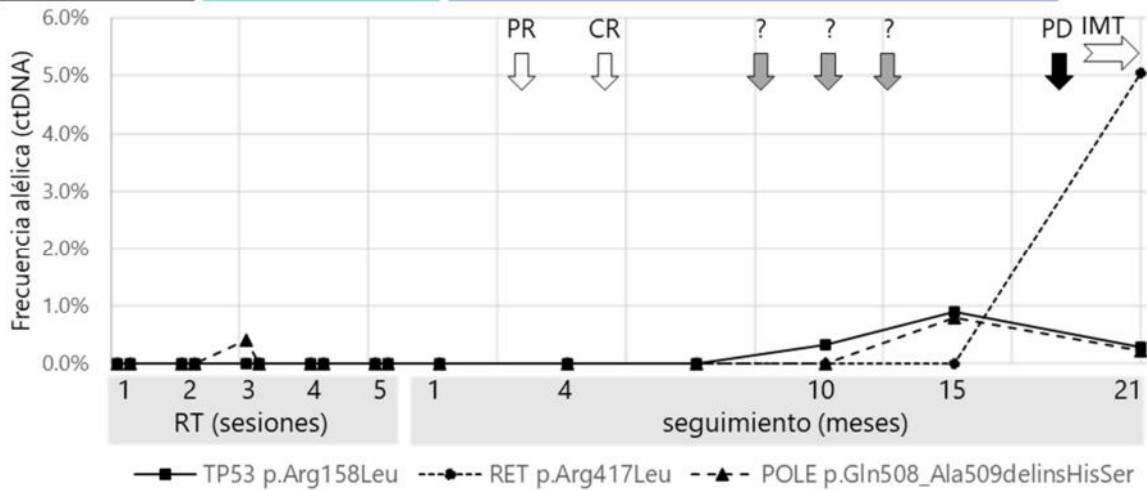
PACIENTE #18 NO SEGUIMIENTO / INFORMACIÓN CLÍNICA NO DISPONIBLE



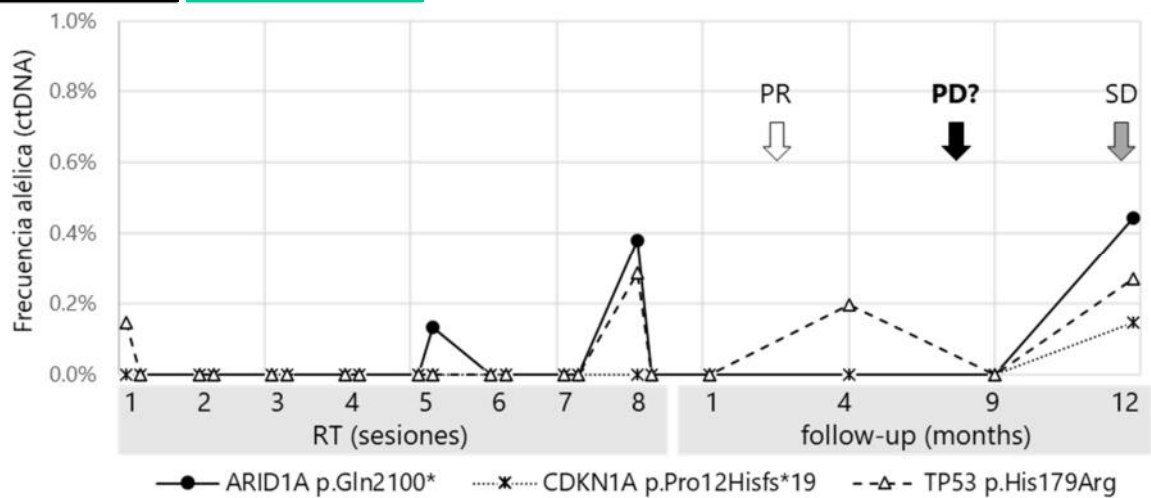
PACIENTE #20 CONCORDANCIA → DESINCRONIZACIÓN DE PRUEBAS (2 meses)



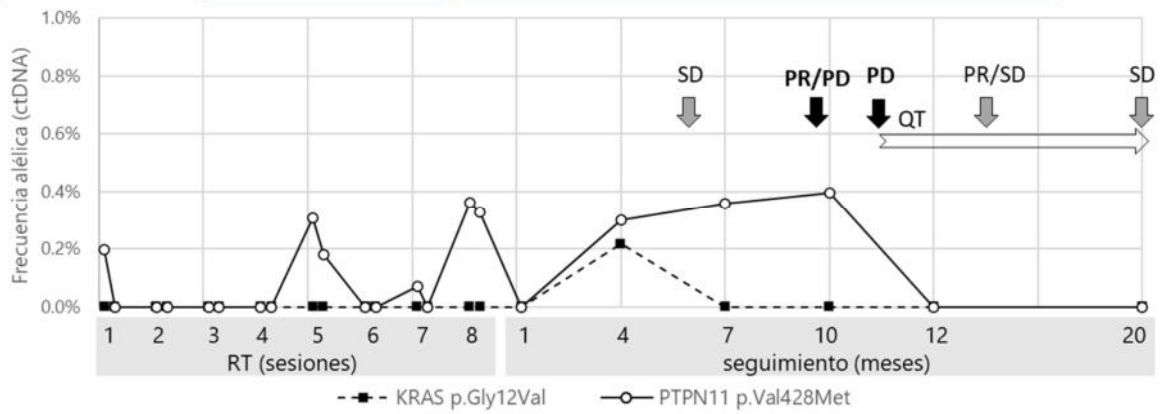
PACIENTE #23 CONCORDANCIA LA BIOPSIA LÍQUIDA SE ANTICIPA (9 meses)



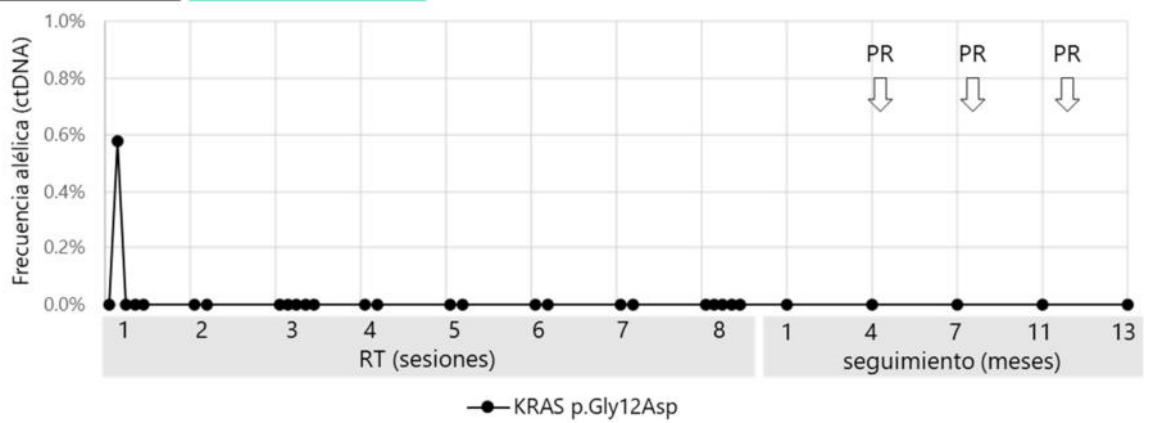
PACIENTE #27 CONCORDANCIA



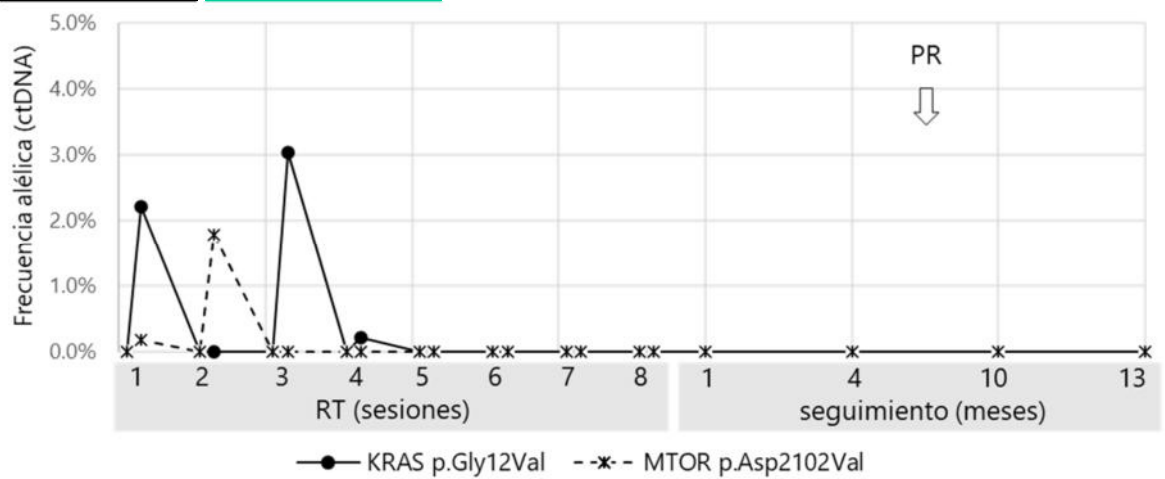
PACIENTE #28 CONCORDANCIA LA BIOPSIA LÍQUIDA SE ANTICIPA (7 meses)



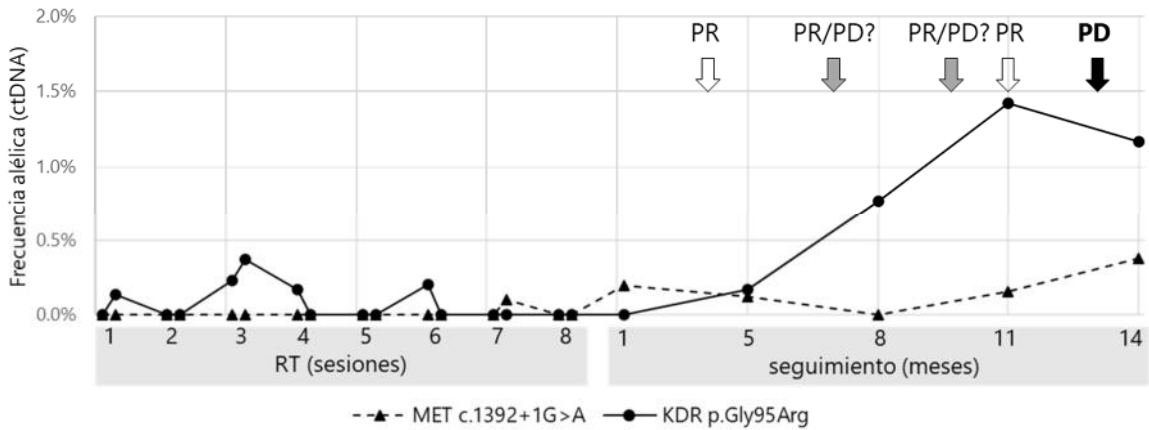
PACIENTE #29 CONCORDANCIA



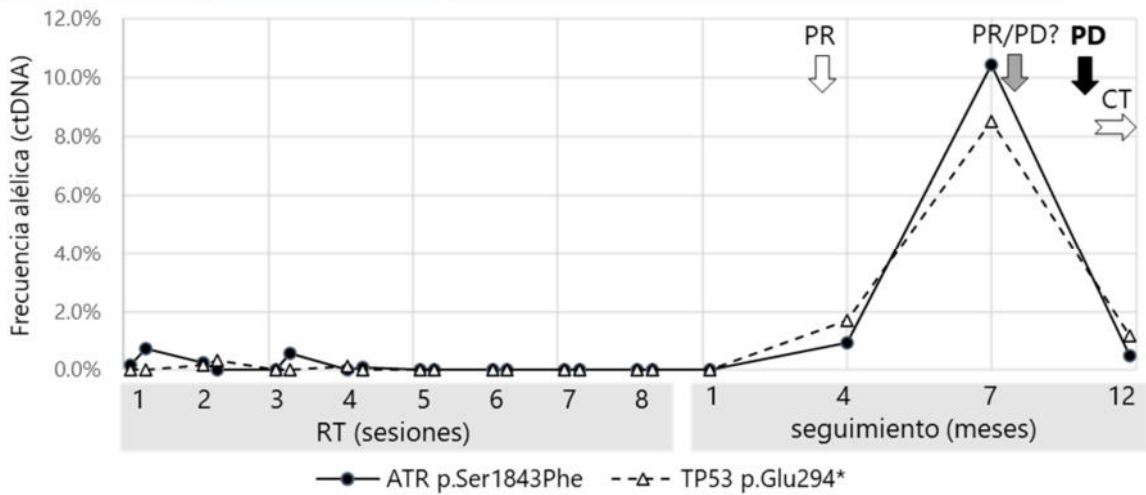
PACIENTE #31 CONCORDANCIA



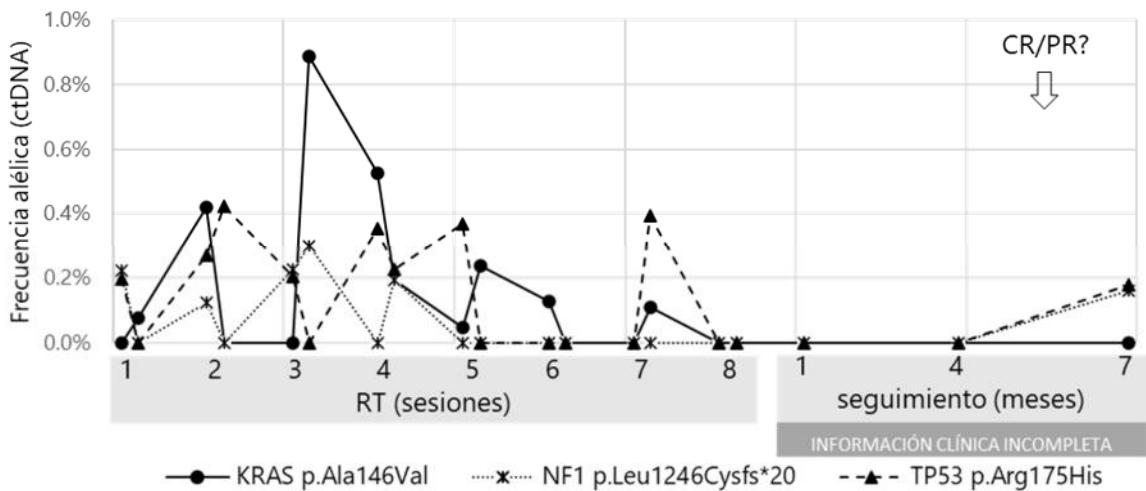
PACIENTE #32 CONCORDANCIA LA BIOPSIA LÍQUIDA SE ANTICIPA (8 meses)



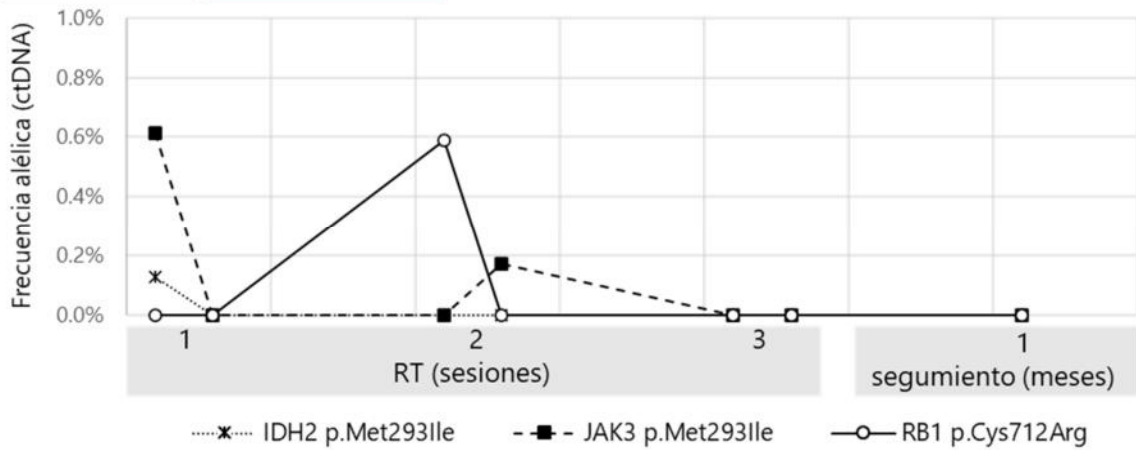
PACIENTE #33 CONCORDANCIA LA BIOPSIA LÍQUIDA SE ANTICIPA (7 meses)



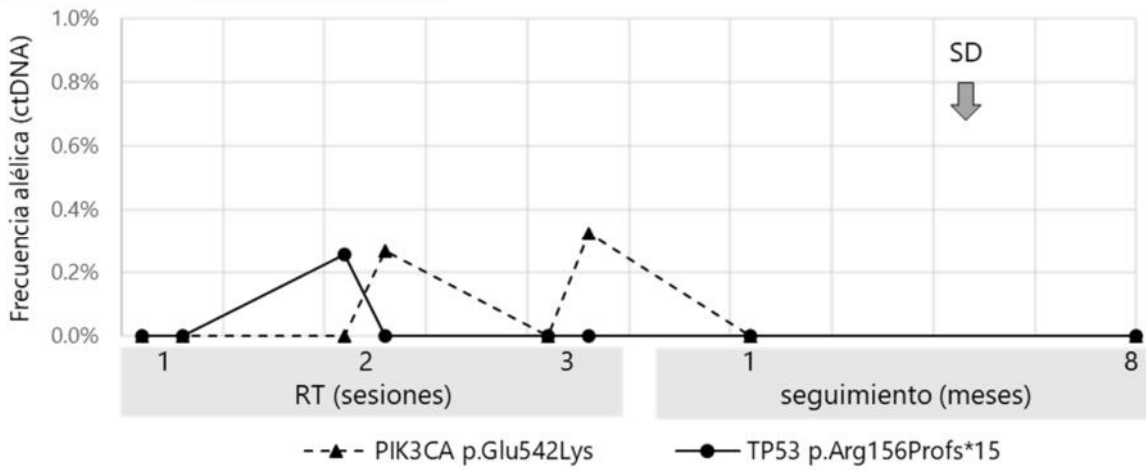
PACIENTE #34 NO SEGUIMIENTO / INFORMACIÓN CLÍNICA NO DISPONIBLE



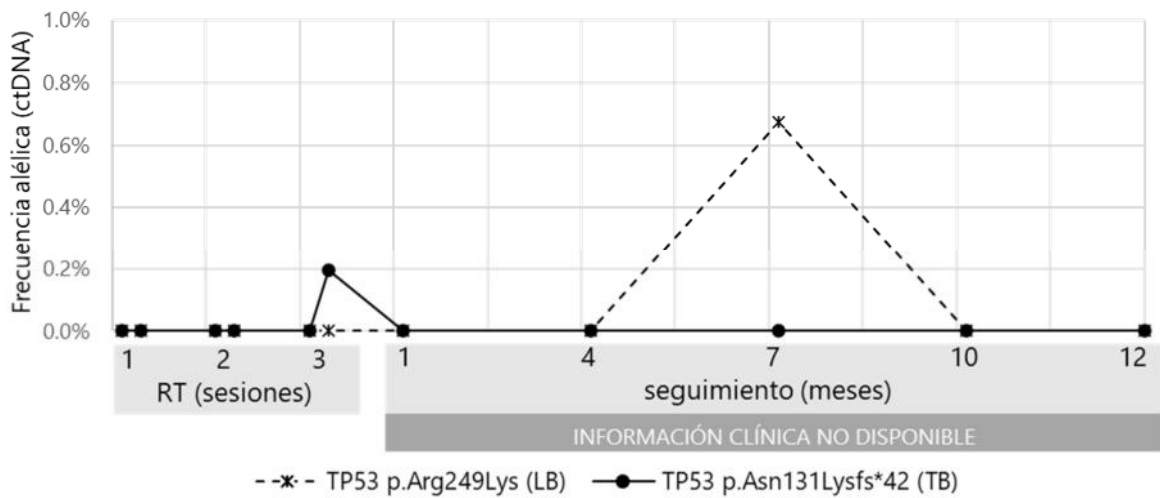
PACIENTE #35 CONCORDANCIA



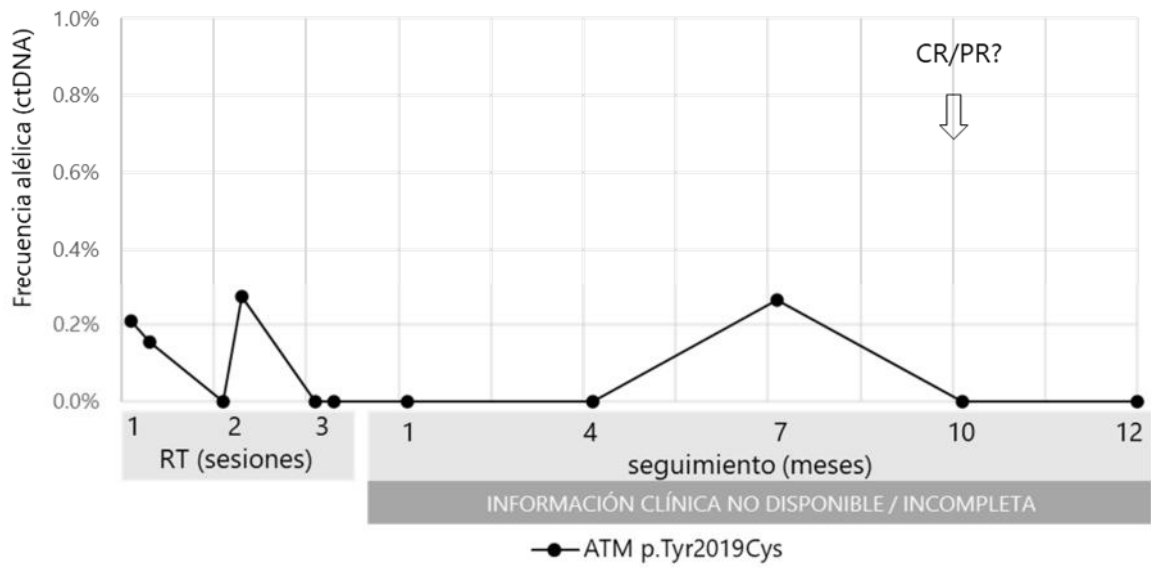
PACIENTE #36 CONCORDANCIA



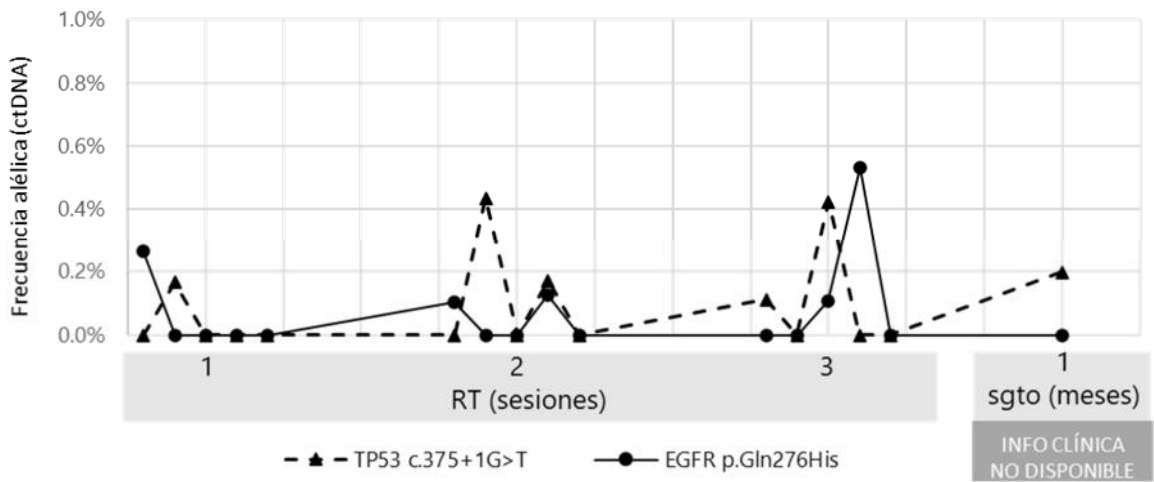
PACIENTE #38 NO SEGUIMIENTO / INFORMACIÓN CLÍNICA NO DISPONIBLE



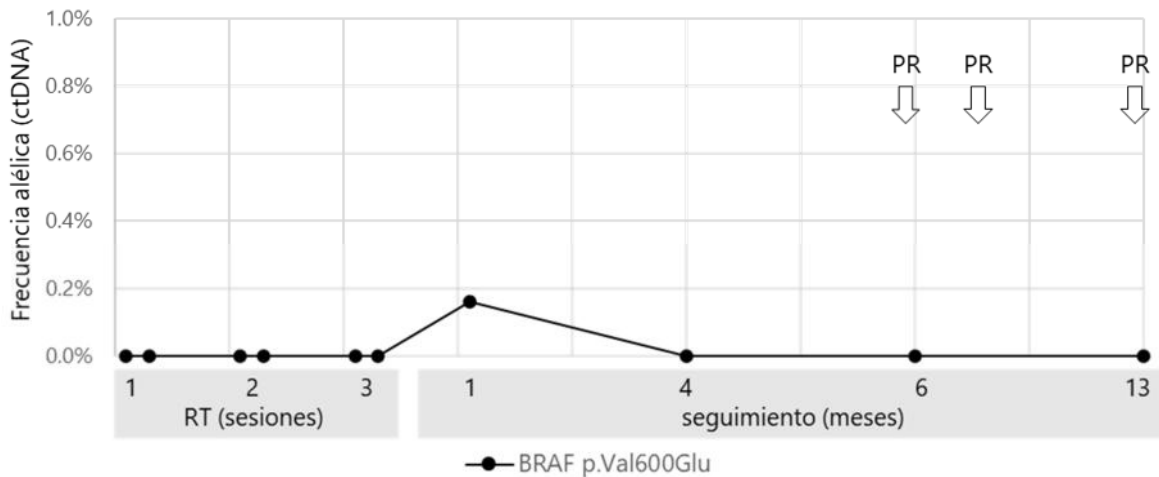
PACIENTE #39 NO SEGUIMIENTO / INFORMACIÓN CLÍNICA NO DISPONIBLE



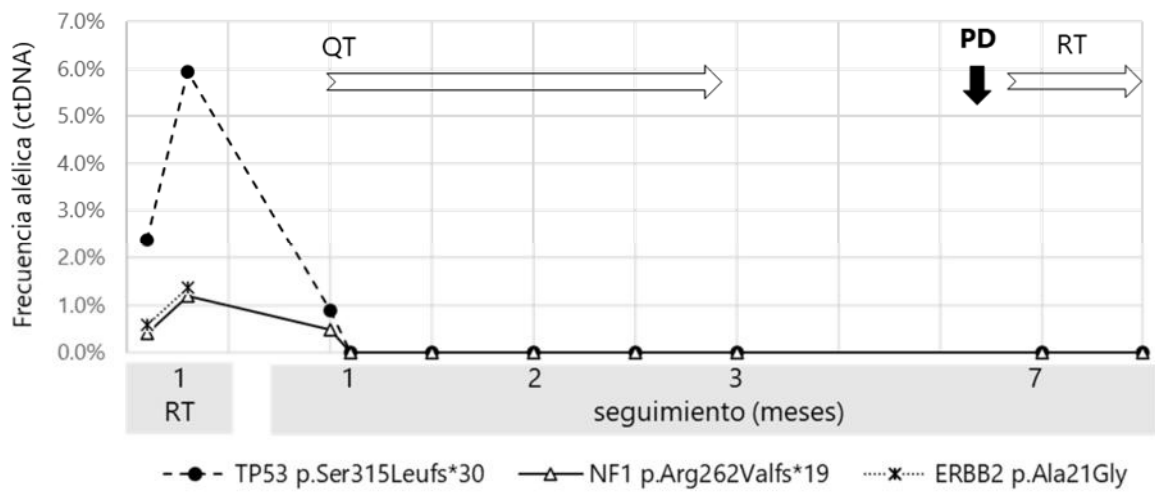
PACIENTE #41 NO SEGUIMIENTO / INFORMACIÓN CLÍNICA NO DISPONIBLE



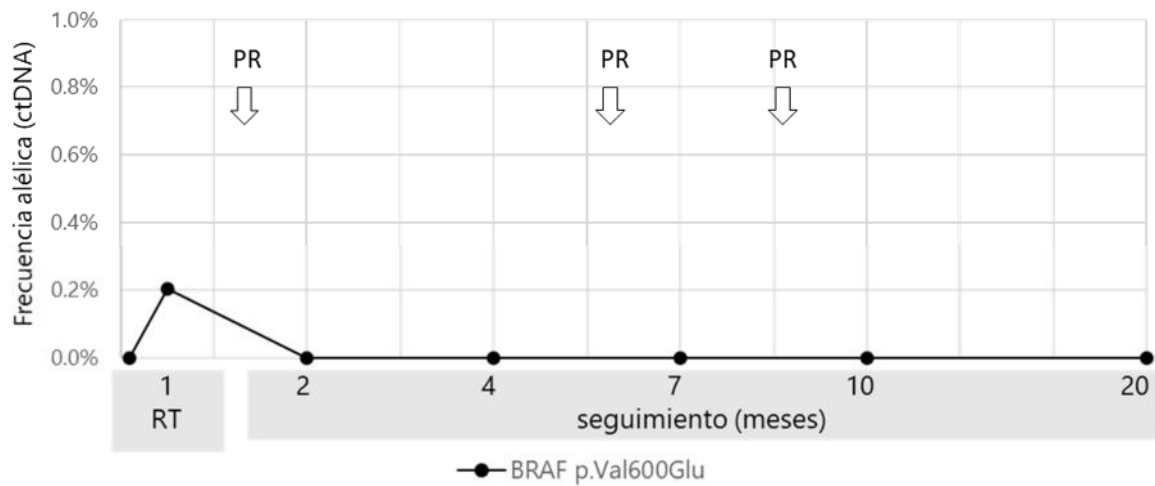
PACIENTE #42 ctDNA INDETECTABLE ANTES/DURANTE RT



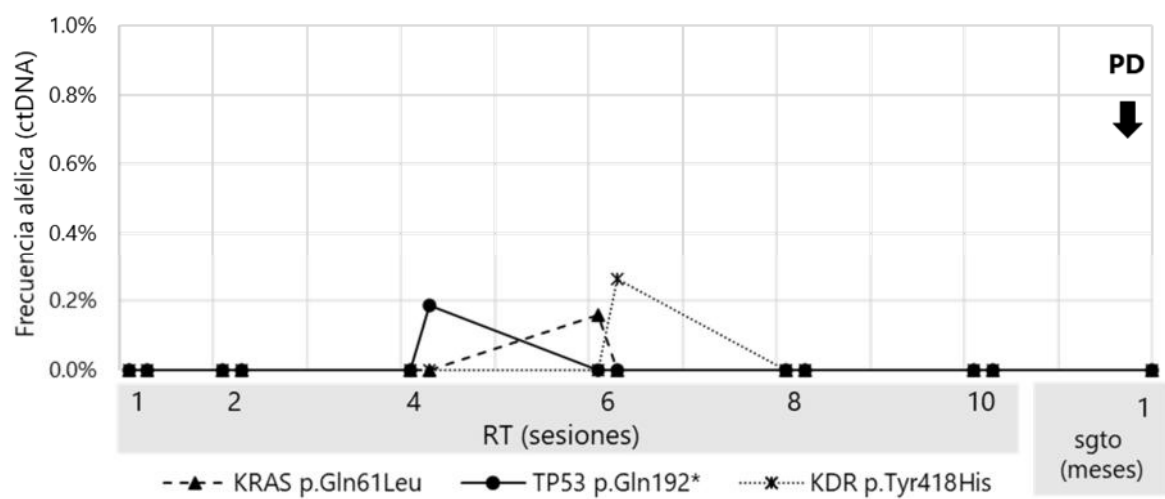
PACIENTE #43 CONCORDANCIA



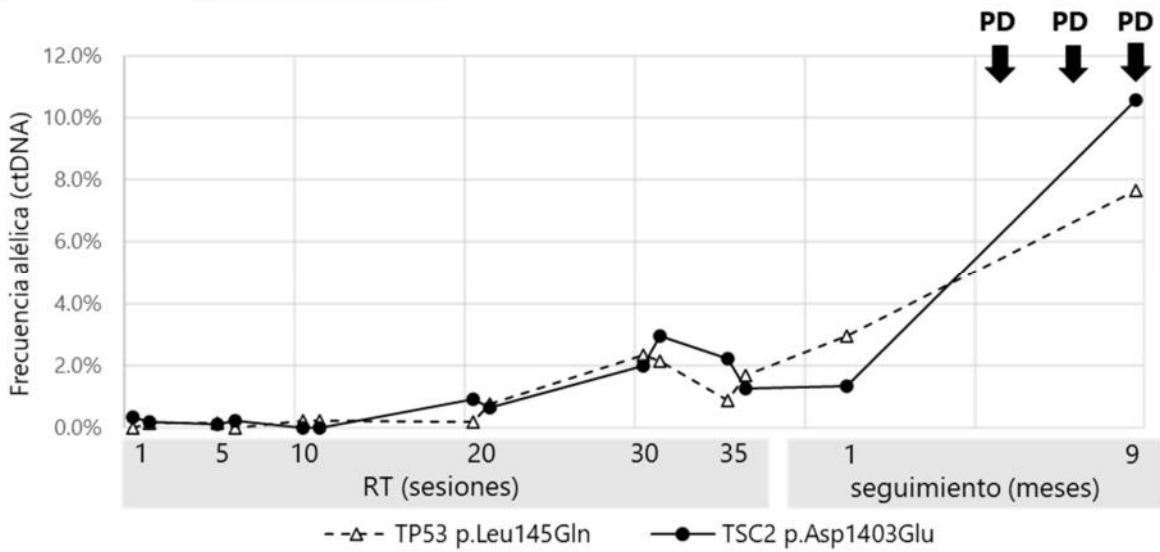
PACIENTE #44 CONCORDANCIA



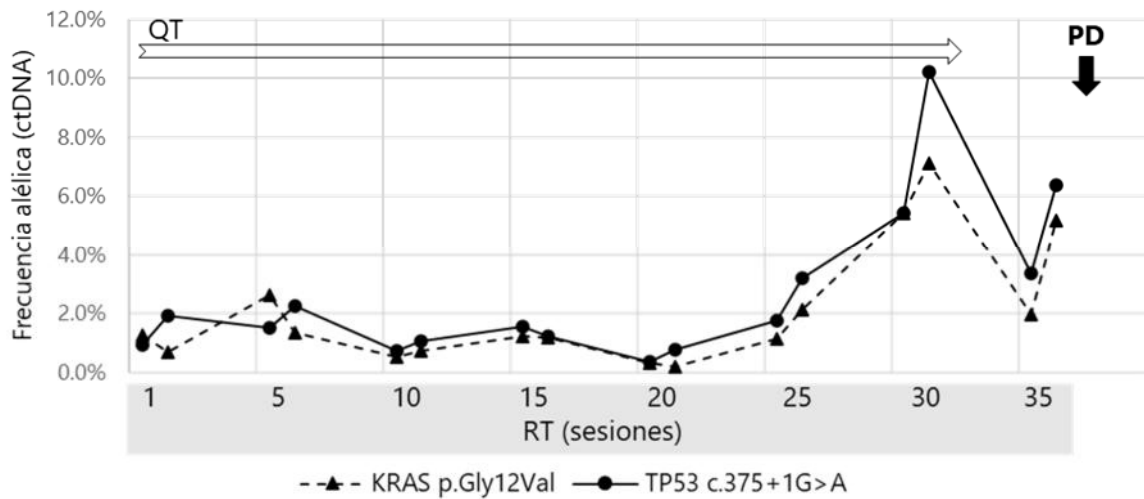
PACIENTE #45 NO CONCORDANCIA



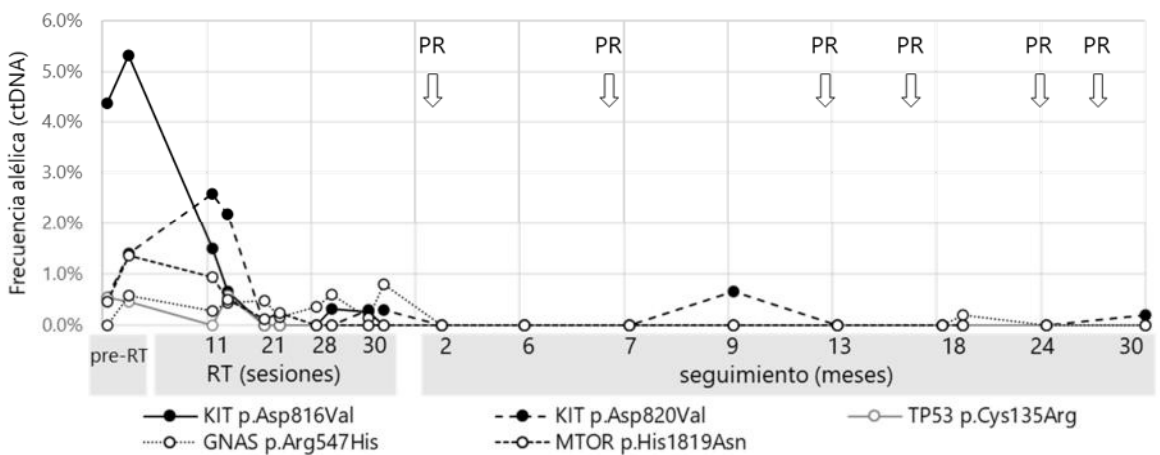
PACIENTE #48 CONCORDANCIA LA BIOPSIA LÍQUIDA SE ANTICIPA (4 meses)



PACIENTE #49 CONCORDANCIA



PACIENTE #50 CONCORDANCIA



Estudio longitudinal de ctDNA y relación con estado clínico de los pacientes monitorizados.

Se muestran las gráficas de la dinámica de la señal de las variantes genómicas monitorizadas en ctDNA de las biopsias líquidas de cada paciente a lo largo del tratamiento y del seguimiento posterior. Se indica con una flecha el estado clínico del paciente según las pruebas de imagen diagnóstica realizadas, así como nuevos tratamientos iniciados. Junto al identificador de cada paciente se incluyen unas etiquetas que categorizan los casos clínicos: "CONCORDANCIA"/"NO CONCORDANCIA", en función de si se considera que las señales de ctDNA concuerdan con los resultados de las pruebas médicas y el estado clínico del paciente; "LA BIOPSIA LÍQUIDA SE ANTICIPA (X meses)", en el caso de que la biopsia líquida haya sido capaz de detectar la recaída o progresión tumoral con anterioridad a las pruebas de rutina, indicando con cuántos meses de antelación; "NO SEGUIMIENTO/INFORMACIÓN CLÍNICA NO DISPONIBLE": en el caso de los pacientes en los que no se pudo realizar un seguimiento posterior al tratamiento con RT o los datos clínicos fueron incompletos o no estuvieron disponibles; "DESINCRONIZACIÓN DE PRUEBAS (X meses)": en el caso de que haya una considerable diferencia temporal entre las biopsias líquidas y las pruebas clínicas que pueda explicar la diferencia entre los hallazgos de ambas aproximaciones diagnósticas". IMT: inmunoterapia; PD: enfermedad en progresión; PR: respuesta parcial; QT: quimioterapia; RT: radioterapia; SD: enfermedad estable; sgto: seguimiento; ?: prueba con resultado no concluyente.

APÉNDICE 11. Artículos científicos publicados en revistas indexadas.

Artículo principal asociado a esta tesis doctoral:

- Guadalupe A Cifuentes, Adrián Santiago, Lucía Méndez Blanco, María Fueyo, Esther López Martínez, Raquel Soria, Irene Martín López, Pepa Cucarella Beltrán, Pablo Pardo-Coto, David Rodríguez-Rubi, Karla Urquilla, Noelia S Durán, Rebeca Álvarez, Claudia G Lago, Andrea Otero, Marta Diñeiro, Raquel Capín, Juan Cadiñanos, Rubén Cabanillas. *Clinical utility of liquid biopsy and integrative genomic profiling in early-stage and oligometastatic cancer patients treated with radiotherapy*. Br J Cancer (2023) 128(5):857-876.

Otras publicaciones durante el periodo predoctoral relacionadas con la línea de investigación *Aproximaciones genómicas y moleculares a la Biomedicina* del Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular:

- Marta Diñeiro, Guadalupe A Cifuentes, Raquel Capín, Adrián Santiago, Andrea Otero, David Castillo, Patricia C Pruneda, Gonzalo R Ordóñez, Rubén Cabanillas, Juan Cadiñanos. *Sequencing results from multiple individuals of different ethnicities strongly question the existence of the KCNE1B pseudogene*. Eur J Hum Genet (2020). 28(4):401-402.
- Marta Diñeiro, Raquel Capín, Guadalupe A Cifuentes, Beatriz Fernández-Vega, Eva Villota, Andrea Otero, Adrián Santiago, Patricia C Pruneda, David Castillo, Mónica Viejo-Díaz, Inés Hernando, Noelia S Durán, Rebeca Álvarez, Claudia G Lago, Gonzalo R Ordóñez, Álvaro Fernández-Vega, Rubén Cabanillas, Juan Cadiñanos. *Comprehensive genomic diagnosis of inherited retinal and optical nerve disorders reveals hidden syndromes and personalized therapeutic options*. Acta Ophthalmol (2020) 98(8):e1034-e1048.
- María Costales, Rodrigo Casanueva, Vanessa Suárez, José María Asensi, Guadalupe A Cifuentes, Marta Diñeiro, Juan Cadiñanos, Fernando López, César Álvarez-Marcos, Andrea Otero, Justo Gómez, José Luis Llorente, Rubén Cabanillas. *CANVAS: A New Genetic Entity in the Otorhinolaryngologist's Differential Diagnosis*. Otolaryngol Head Neck Surg. (2022) 166(1):74-79.