

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de biomarcadores a partir de ADN tumoral circulante en  
pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Clara Pérez Barrios**

Directora

**Atocha Romero Alfonso**

Madrid  
Ed. electrónica 2019

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID**

**ESTUDIO DE BIOMARCADORES A PARTIR  
DE ADN TUMORAL CIRCULANTE EN  
PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICO AVANZADO**

**TESIS DOCTORAL**

**Clara Pérez Barrios**

**Directora**

**Atocha Romero Alfonso**

**Madrid, 2019**

Laboratorio de Oncología Médica. Servicio de Oncología Médica.  
Hospital Universitario Puerta de Hierro



Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia.  
Universidad Complutense de Madrid

# **ESTUDIO DE BIOMARCADORES A PARTIR DE ADN TUMORAL CIRCULANTE EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO**

Memoria presentada por Clara Pérez Barrios para aspirar al  
Grado de Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y  
Biomedicina

Directora

Atocha Romero Alfonso

Madrid, 2019

***A mi madre***



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a la Dra. Atocha Romero por contagiarme de esas ganas constantes de trabajar y emprender nuevos retos profesionales, y porque gracias a ella, y a su carácter inquieto y luchador, hemos podido sacar adelante este trabajo. También agradecer al Dr. Mariano Provencio, por su incesante apoyo a la investigación en cáncer de pulmón, y por confiar en mi para formar parte de este proyecto.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a Miguel, por ser el mejor compañero y amigo que he podido tener estos años, y estar siempre conmigo, en los peores y mejores momentos, ayudándome a sacar adelante todos y cada uno de los experimentos planteados. También quiero agradecer de forma muy especial a Marta, por su alegría, su compañerismo, y sus imparable ganas de trabajar, que han sido de gran ayuda para poder llevar a cabo estos estudios.

Tampoco quiero olvidar al resto compañeros que han formado parte del grupo de investigación, y que han participado de una u otra manera en la realización de este trabajo: a Irene Nieto, que inició muchos de los experimentos que aquí se presentan, y a Estela, Nieves, Sandra y Alejandro, por ayudarme con los estudios finales de PCR digital.

Por otra parte, me gustaría dar las gracias a la gente que ha trabajado conmigo durante estos años, permitiendo que este trabajo se hiciera posible: A Begoña, por acercarme al mundo de la Biología Molecular y de la investigación, al Servicio de Oncología, que dirige y coordina estos estudios, a Elvira, por su infinita paciencia y ayuda, a Irene y a Lucia, por sus buenos consejos, a Raquel, por su ayuda con el inglés, y a todas las personas que forman parte del Instituto de Investigación Puerta de Hierro, amigos más que compañeros, por su apoyo durante esta etapa. También quiero expresar mi agradecimiento a la Fundación José Luis Castaño, por financiar parte de mi estancia en el Laboratorio de Oncología Molecular, y a Ricardo Sánchez, por su inestimable ayuda con los estudios de secuenciación masiva.

Por último, agradecer a mi familia y amigos por su apoyo incondicional, a Pi y Alfonso, por sus ánimos, a Toni por respetar mi trabajo y darme fuerzas, a mi madre, por inculcarme que hay que luchar por lo que uno quiere, y a mi abuela, que me ha acompañado en silencio muchas de las tardes en las que se ha escrito este trabajo.



## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	7
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABLAS .....	17
RESUMEN.....	21
ABSTRACT .....	23
INTRODUCCIÓN.....	25
1. Epidemiología del cáncer de pulmón.....	27
2. Diagnóstico del CPNCP .....	29
2.1. Estudio histológico del CPNCP .....	29
2.2. Estudio molecular del CPNCP .....	31
2.3. Clasificación TNM del CPNCP .....	32
3. Abordaje terapéutico actual del paciente con CPNCP .....	36
4. Estudio de biomarcadores y medicina personalizada en CPNCP avanzado ....	38
4.1. Estudio de biomarcadores en el tejido tumoral.....	38
4.2. Tratamiento con inhibidores de tirosina-kinasa en pacientes con estudio de biomarcadores positivo .....	48
4.3. Potenciales biomarcadores.....	49
5. Estudio de biomarcadores en ADN tumoral circulante.....	50
5.1. Características del ADN tumoral circulante (ctDNA) .....	50
5.2. Aplicaciones del estudio de ctDNA .....	51
5.3. Estudio del ctDNA.....	53
6. Evaluación de la respuesta al tratamiento con terapias dirigidas.....	58
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	59
1. Hipótesis .....	61
2. Objetivos .....	61

MATERIAL Y MÉTODOS .....	63
1. Tipo de estudio y diseño experimental .....	65
2. Obtención de las muestras.....	67
2.1. Características de las muestras.....	67
2.2. Extracción del ADN circulante.....	67
2.3. Cuantificación del cfDNA .....	68
2.4. Calidad de la extracción de cfDNA.....	68
3. Análisis de mutaciones en el gen <i>EGFR</i> .....	70
3.1. Condiciones de la PCR digital.....	71
3.2. Procedimiento de análisis .....	72
3.3 Visualización de los resultados .....	74
3.4. Análisis cuantitativo .....	75
4. Evaluación de un método de secuenciación masiva de cfDNA.....	77
4.1. Procedimiento.....	77
5. Recogida de datos y métodos estadísticos. ....	88
RESULTADOS .....	91
1. Establecimiento de las condiciones preanalíticas.....	93
1.1. Selección del método de extracción.....	93
1.1.2. Comparación del perfil electroforético del ADN circulante obtenido según el método de extracción.....	96
1.1.3. Influencia del método de extracción en el análisis de mutaciones somáticas mediante PCR digital.....	98
2. Establecimiento de condiciones analíticas: validación del estudio de mutaciones somáticas en el gen <i>EGFR</i> mediante PCR digital .....	101
2.1. Cálculo del límite de detección y del límite de cuantificación.....	101
2.2. Estudio de intercomparación con un laboratorio externo .....	107
2.3. Medida de la reproducibilidad.....	108
3. Implantación de un sistema de gestión de calidad para el estudio de biomarcadores en biopsia líquida mediante PCR digital.....	111
4. Validación clínica del estudio de biomarcadores a partir de cfDNA. ....	113

4.1. Utilidad clínica de la sangre.....	113
5. Utilidad clínica de los líquidos biológicos.....	118
5.1. Análisis cuantitativo .....	118
5.2. Análisis cualitativo.....	121
6. Estudio de biomarcadores en cfDNA mediante secuenciación masiva.....	123
6.1. Descripción de la cohorte.....	123
6.2. Secuenciación masiva (NGS).....	124
6.3. Concordancia entre NGS y PCR digital.....	127
6.4. Utilidad para la detección de la mutación p.T790M .....	129
DISCUSIÓN.....	131
1. Implantación del estudio de mutaciones en el gen <i>EGFR</i> a partir de ADN circulante mediante PCR digital.....	137
1.1. Establecimiento de las condiciones preanalíticas.....	137
1.2. Validación de un sistema de PCR digital.....	140
1.3. Validación clínica del estudio de mutaciones en el gen <i>EGFR</i> a partir de cfDNA.....	147
2. Evaluación del estudio de biomarcadores relacionados con cáncer de pulmón a partir de cfDNA mediante secuenciación masiva.....	152
CONCLUSIONES .....	157
BIBLIOGRAFÍA.....	161
ANEXOS.....	189
Anexo 1. Comité de ética .....	189
Anexo 2. Documentación complementaria .....	191
Anexo 3. Publicaciones .....	199



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ALK: anaplastic lymphoma kinase.

ASCO: The American Society of Clinical Oncology.

BEAM: beads, emulsions, amplification, and magnetics.

BRAF: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase.

CCGA: Circulating Cell-free Genome Atlas.

CDKN2A: Cyclin dependent kinase inhibitor 2A.

cfDNA: circulating free DNA.

CNVs: copy number variations.

CPCP: cáncer de pulmón célula pequeña.

CPNCP: cáncer de pulmón no célula pequeña.

CR: complete response.

ctDNA: circulating tumor DNA.

ddPCR: droplet Digital PCR.

DNA: deoxyribonucleic acid.

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato.

dPCR: digital polymerase chain reaction.

dsDNA: double-stranded DNA

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

EML-4: Echinoderm Microtubule Associated Protein-like 4.

FDA: Food and Drug Administration.

FDG-PET: tomografía de emisión de positrones con fluorodexosiglucosa.

HR: hazard ratio.

IC: Intervalo de confianza.

ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

## C. PÉREZ-BARRIOS

---

IVD: in vitro diagnostic.

KEAP1: Kelch like ECH associated protein 1.

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.

LOD: Limit of detection.

LOQ: Limit of quantification.

MAF: mutant allele frequency.

MET: mesenchymal-to- epithelial transition factor.

µl: microlitro

ml: mililitro.

NCI: National Cancer Institute.

NF1: Neurofibromin 1.

ng: nanogramos.

NGS: Next generation sequencing.

NLST: National Lung Screening Trial.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORR: Objective Response Rate.

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction.

pb: pares de bases

PCR: polymerase chain reaction.

PD: Progressive disease.

PET: tomografía de emisión de positrones.

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha.

PNT: Procedimiento normalizado de trabajo.

PR: partial response.

RB1: RB transcriptional corepressor 1.

REDECAN: Red Española de Registros del Cáncer.

ROS1: ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase.

SD: stable disease.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

STK11: Serine/threonine kinase 11.

TAC: tomografía axial computerizada.

TKI: tyrosine kinase inhibitor.

TNM: tumor, node, metastasis.

TP53: tumor protein p53.

TTF-1: Factor 1 de Transcripción Tiroidea.

UICC: Sistema Union for International Cancer Control.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principales subtipos histológicos de cáncer de pulmón.....	30
<b>Figura 2.</b> Mutaciones “driver” más frecuentes encontradas en el adenocarcinoma y fármacos aprobados frente a ellas.....	31
<b>Figura 3.</b> Supervivencia global del cáncer de pulmón en relación con el estadio clínico. A: Clasificación TNM-7ª edición. B: Clasificación TNM-8ª edición.....	35
<b>Figura 4.</b> Receptor de tirosina-kinasa. A: Receptor mutado con señal exacerbada. B: Efecto de los fármacos TKIs en el receptor mutado.....	37
<b>Figura 5.</b> Perspectiva molecular actual en el CPNCP.....	38
<b>Figura 6.</b> Hazard ratio de diferentes estudios y su combinación comparando la supervivencia libre de progresión de pacientes con CPNCP con mutación positiva en <i>EGFR</i> tratados con Gefitinib vs quimioterapia.....	41
<b>Figura 7.</b> Estructura química de los fármacos Gefitinib (A) y Erlotinib (B).....	42
<b>Figura 8.</b> Mutaciones de sensibilidad y resistencia a TKIs de 1ª y 2ª generación .....	44
<b>Figura 9.</b> Evolución de las principales mutaciones de resistencia en el gen <i>EGFR</i> ....	45
<b>Figura 10.</b> Algoritmo terapéutico de pacientes con CPNCP avanzado con resultado positivo en el estudio de biomarcadores ( <i>EGFR</i> o <i>ALK</i> ) .....	49
<b>Figura 11.</b> Esquema de seguimiento del tratamiento oncológico mediante estudio de cfDNA .....	52
<b>Figura 12.</b> Representación de los dos tipos de PCR digital disponibles en el mercado .....	56
<b>Figura 13.</b> Diseño del estudio.....	66
<b>Figura 14.</b> Esquema del sistema Bioanalyzer 2100 y perfil electroforético típico del cfDNA.....	68
<b>Figura 15.</b> Esquema del ensayo Taqman utilizado durante el estudio.....	70

<b>Figura 16.</b> Esquema de preparación de las muestras para PCR digital.....	72
<b>Figura 17.</b> Diagrama de dispersión para una muestra control del ensayo G719X en función de la temperatura de hibridación .....	73
<b>Figura 18.</b> Esquema general de condiciones de reacción utilizadas en el estudio.....	73
<b>Figura 19.</b> Representación gráfica de los resultados de un ensayo.....	75
<b>Figura 20.</b> Esquema de la tecnología de secuenciación masiva del kit Oncomine lung cfDNA assay .....	78
<b>Figura 21.</b> Relación entre la cantidad de cfDNA introducida en la preparación de la librería (ng) y el límite de detección alcanzado (%).....	79
<b>Figura 22.</b> Condiciones de amplificación para la preparación de las librerías con el kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay .....	80
<b>Figura 23.</b> Gráfico de amplificación representando los resultados de 8 muestras de cfDNA amplificadas con el kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay por qPCR.....	81
<b>Figura 24.</b> Datos recogidos en el Run Summary .....	83
<b>Figura 25.</b> Datos de calidad de la secuenciación para 8 muestras incluidas en el estudio. ....	84
<b>Figura 26.</b> Informe de resultados del análisis de cobertura de 8 muestras incluidas en el estudio.....	84
<b>Figura 27.</b> Informe de resultados para 8 muestras tras el análisis con el VariantCaller cfDNA.....	85
<b>Figura 28.</b> Imagen de una variante en el gen <i>TP53</i> visualizada con IGV.....	86
<b>Figura 29.</b> Esquema de trabajo en el estudio del método de extracción.....	94
<b>Figura 30.</b> Diagrama de cajas representando la distribución de las concentraciones de cfDNA obtenidas por el sistema Maxwell y por el sistema Qiagen .....	95
<b>Figura 31.</b> Diagrama de cajas representando la distribución de las concentraciones de cfDNA obtenidas por el sistema Maxwell y por el sistema Magnapure.....	96

<b>Figura 32.</b> Perfiles electroforéticos obtenidos mediante el sistema Bioanalyzer 2100. .....	97
<b>Figura 33.</b> Diagrama de barras representado la proporción de fragmentos de 180pb (P1), de dinucleosomas (P2) y de trinucleosomas (P3) obtenidos con el sistema Magnapure (MPC) y Maxwell (MR)......	98
<b>Figura 34.</b> Diagrama de dispersión de la cuantificación de mutaciones a partir de cfDNA de muestras pareadas extraídas mediante MR y MPC .....	99
<b>Figura 35.</b> Recta de regresión representando la fracción: mutación T790M/total real (eje de abscisas) y T790M/total teórica (eje de ordenadas). .....	102
<b>Figura 36.</b> Valores de la desviación estándar y de la pendiente basados en los criterios de las guías <i>ICH guidelines</i> . .....	103
<b>Figura 37.</b> Recta de regresión representando la fracción: mutación L858R/total real (eje de abscisas) y L858R/total teórica (eje de ordenadas).....	104
<b>Figura 38.</b> Recta de regresión representando la fracción: mutación del19/total real (eje de abscisas) y del19/total teórica (eje de ordenadas). .....	105
<b>Figura 39.</b> Recta de regresión representando la fracción: mutación G719S/total real (eje de abscisas) y G719S/total teórica (eje de ordenadas). .....	106
<b>Figura 40.</b> Diagramas de Levey-Jennings para el ensayo L858R.....	109
<b>Figura 41.</b> Diagramas de Levey-Jennings para el ensayo del19. ....	109
<b>Figura 42.</b> Diagrama de Levey-Jennings para el ensayo p.T790M.....	110
<b>Figura 43.</b> Número de días de diferencia entre la detección de la mutación de resistencia p.T790M y la progresión radiológica .....	115
<b>Figura 44.</b> Evolución de las mutaciones <i>sensitizing</i> y p.T790M a lo largo de los diferentes tratamientos en uno de los pacientes incluidos en el estudio .....	116
<b>Figura 45.</b> Tipos de líquidos analizados en el estudio según su localización.....	118
<b>Figura 46.</b> Diagrama de cajas representando la frecuencia de alelo mutado obtenida en las muestras de plasma y de líquido biológico. ....	119

<b>Figura 47.</b> Diagrama de dispersión del estudio de mutaciones en el gen <i>EGFR</i> en el paciente 1.....	120
<b>Figura 48.</b> Diagrama de dispersión del estudio de mutaciones en el gen <i>EGFR</i> en el paciente 2.....	120
<b>Figura 49.</b> Diagrama de cajas representando la frecuencia de alelo mutado obtenida en las muestras de plasma y de líquido biológico para la mutación p.T790M. ....	122
<b>Figura 50.</b> Mediana de las concentraciones en función del estadio tumoral .....	124
<b>Figura 51.</b> Co-mutation plot con los resultados del análisis del cfDNA por NGS de los pacientes con CPNCP. ....	125
<b>Figura 52.</b> Mutación de resistencia p.G1269A en el gen <i>ALK</i> detectada por NGS y por dPCR.....	126
<b>Figura 53.</b> Diagrama de Venn representando el total de mutaciones <i>sensitizing</i> en el gen <i>EGFR</i> detectadas en el tumor (rosa), y en sangre por secuenciación masiva (verde) y por dPCR (morado).....	126
<b>Figura 54.</b> Flujo de trabajo del estudio NGS.....	127
<b>Figura 55.</b> Gráficos de regresión Passing-Bablock y gráfico Bland-Altman para las frecuencias mutacionales obtenidas por NGS y dPCR (N=54). ....	128
<b>Figura 56.</b> Gráfica de regresión lineal representando los resultados de p.T790M obtenidos por NGS y dPCR .....	129
<b>Figura 57.</b> Imagen de la mutación p.T790M en el paciente 32VVM por ambas metodologías. ....	130
<b>Figura 58.</b> Esquema para la implantación de nuevas técnicas de diagnóstico molecular .....	141
<b>Figura 59.</b> Mediana de los valores de control para la mutación p.T790M durante los 2 años de seguimiento.....	145
<b>Figura 60.</b> Modelo de gestión de la calidad implantado en el Laboratorio basado en la norma ISO15189. ....	146

**Figura 61.** Pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con Osimertinib (p.T790M positiva) con estudio molecular en tejido vs. estudio molecular en ADN circulante. .... 149

**Figura 62.** Pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con Osimertinib (T790M+) con estudio molecular en líquido vs. estudio molecular en sangre..... 151

**Figura 63.** Deleciones del exón 19 (gen *EGFR*) detectadas en el estudio visualizadas con IGV. .... 153



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España para 2017 ..	27
<b>Tabla 2.</b> Clasificación TNM 7 <sup>a</sup> edición. ....	33
<b>Tabla 3.</b> Estadios del cáncer de pulmón según el sistema TNM 7 <sup>a</sup> y 8 <sup>a</sup> edición. ....	34
<b>Tabla 4.</b> Principales características de los EGFR-TKIs.....	45
<b>Tabla 5.</b> Criterios de respuesta según los criterios RECIST v1.1. en el CPNCP en lesiones diana.....	58
<b>Tabla 6.</b> Mutaciones activadoras o de sensibilidad a TKIs en el gen <i>EGFR</i> analizadas durante el estudio. ....	71
<b>Tabla 7.</b> Mutación de resistencia a TKIs en el gen <i>EGFR</i> analizada durante el estudio. ....	71
<b>Tabla 8.</b> Componentes de la mezcla de reacción de la PCR digital.....	71
<b>Tabla 9.</b> Condiciones específicas de cada ensayo. ....	74
<b>Tabla 10.</b> Cálculos para el ajuste de concentraciones a 100pM. ....	82
<b>Tabla 11.</b> Características esperadas de los resultados de secuenciación masiva en función del chip y del secuenciador utilizado. ....	82
<b>Tabla 12.</b> Ensayos custom diseñados para la confirmación de mutaciones detectadas por el kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay.....	87
<b>Tabla 13.</b> Características de la población de estudio.....	93
<b>Tabla 14.</b> Mediana (p50), primer cuartil (p25) y tercer cuartil (p75) de las ratios entre el cfDNA correspondiente a las fracciones de mono-, di- y trinucleosomas y la concentración de cfDNA total extraída por cada uno de los tres métodos.....	97
<b>Tabla 15.</b> Fracción alélica mutada (MAF) y su intervalo de confianza (IC) de las muestras extraídas en paralelo mediante MR y MPC. ND: No disponible. ....	100

<b>Tabla 16.</b> Fracción alélica mutada (MAF) y su intervalo de confianza (IC) de las muestras extraídas en paralelo mediante MR y QCNA. ....	100
<b>Tabla 17.</b> Resultados teóricos y reales obtenidos para la mutación p.T790M por el sistema de PCR digital.....	101
<b>Tabla 18.</b> Coeficientes y error típico de la regresión para el ensayo p.T790M. ....	102
<b>Tabla 19.</b> Estadísticas de regresión para el ensayo p.T790M.....	102
<b>Tabla 20.</b> Resultados teóricos y reales obtenidos para la mutación p. L858R por el sistema de PCR digital.....	104
<b>Tabla 21.</b> Coeficientes y error típico de la regresión para el ensayo p. L858R.....	104
<b>Tabla 22.</b> Resultados teóricos y reales obtenidos para la mutación p. E746_A750delELREA por el sistema de PCR digital. ....	105
<b>Tabla 23.</b> Coeficientes y error típico de la regresión para el ensayo p. L858R.....	105
<b>Tabla 24.</b> Resultados teóricos y reales obtenidos para la mutación p.G719S por el sistema de PCR digital.....	106
<b>Tabla 25.</b> Coeficientes y error típico de la regresión para el ensayo p. G719S.....	106
<b>Tabla 26.</b> Resultados obtenidos por los dos laboratorios en el estudio de intercomparación. ....	107
<b>Tabla 27.</b> Concordancia por muestra obtenida para ambos laboratorios. ....	108
<b>Tabla 28.</b> Concordancia por mutación obtenida para ambos laboratorios.....	108
<b>Tabla 29.</b> Procedimientos Normalizados de Trabajo.....	112
<b>Tabla 30.</b> Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio .....	114
<b>Tabla 31.</b> Concordancia entre la progresión molecular y la progresión radiológica...	117
<b>Tabla 32.</b> Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN), razón de verosimilitud positiva (P) y negativa (N) calculadas para la discriminación ante una enfermedad progresiva mediante ADN circulante. ....	117

---

<b>Tabla 33.</b> Tabla de contingencia con el resultado de las mutaciones obtenidos en el plasma y en los líquidos.....	121
<b>Tabla 34.</b> Tabla de contingencia con el resultado de las mutaciones p.T790M obtenidos en el plasma y en los líquidos biológicos. ....	122
<b>Tabla 35.</b> Características clínico-patológicas de la cohorte analizada. ....	123
<b>Tabla 36.</b> Datos obtenidos para la detección de la mutación p.T790M por NGS tomando como gold standard los resultados obtenidos por PCRd.....	130
<b>Tabla 37.</b> Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) obtenidos para cada ensayo.....	142
<b>Tabla 38.</b> Ensayos incluidos en la sonda “custom” utilizada para la validación de la mutación p.E746_A750delELREA. ....	142



## RESUMEN

### ESTUDIO DE BIOMARCADORES A PARTIR DE ADN TUMORAL CIRCULANTE EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO

El estudio de biomarcadores en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado ha adquirido un importante papel en el abordaje terapéutico de esta enfermedad, gracias al desarrollo de fármacos dirigidos basados en el perfil mutacional del tumor. Estos fármacos actúan inhibiendo el dominio tirosin-kinasa de receptores transmembrana aberrantes, por lo que reciben el nombre de inhibidores de tirosin-kinasa. Los más importantes son aquellos que actúan frente a las alteraciones localizadas en el gen del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico o Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*), y que se conocen como *EGFR*-TKIs.

La detección de biomarcadores se realiza en el tejido tumoral, si bien es cierto que su obtención presenta ciertas limitaciones, como son el complicado acceso al tumor, la mala calidad de la muestra o el impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, lo que puede dificultar su identificación. El uso de la sangre como sucedáneo del tumor para el estudio molecular del ADN tumoral circulante puede solventar estas limitaciones, ya que permite obtener información sobre el estado mutacional del tejido de forma no invasiva.

En este trabajo se han planteado dos objetivos fundamentales. El primero ha sido la implantación del estudio de biomarcadores en el gen *EGFR* a partir de ADN tumoral circulante mediante PCR digital, abordando cuestiones como la influencia de las condiciones preanalíticas, o la utilidad de la sangre y de los líquidos biológicos como fuentes de obtención de este ADN. Una vez implantada esta técnica en el laboratorio, se ha evaluado la utilidad clínica de estos estudios en una cohorte de 41 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado con mutaciones conocidas en el gen *EGFR*. El segundo objetivo de este trabajo ha sido valorar la utilidad de la secuenciación masiva (NGS) de alta sensibilidad en la detección de nuevos biomarcadores relacionados con cáncer de pulmón a partir de ADN circulante, y su concordancia con la PCR digital.

Los resultados demuestran que el ADN tumoral circulante obtenido de plasma y de líquidos biológicos es una muestra válida para el estudio de biomarcadores de forma no invasiva, aunque su análisis debe llevarse a cabo de forma muy controlada, ya que existen numerosas variables preanalíticas y analíticas que pueden afectar al proceso.

Además, la implantación de esta tecnología para la identificación de alteraciones en el gen *EGFR* a partir de sangre presenta una importante utilidad en el manejo clínico de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado, ya que la evolución de estas alteraciones a lo largo del tiempo se correlaciona con la respuesta al tratamiento. Por último, los resultados obtenidos utilizando el sistema de NGS de alta sensibilidad han demostrado que esta tecnología permite la detección y cuantificación de biomarcadores de forma mucho más amplia que la PCR digital, al abordar de forma simultánea el estudio de diferentes genes relacionados con cáncer de pulmón. Por otra parte, ambas tecnologías han demostrado una excelente concordancia entre ellas.

En conclusión, el ADN tumoral circulante es una muestra adecuada para el estudio de biomarcadores relacionados con cáncer de pulmón de forma no invasiva, pudiéndose aislar tanto de sangre como de líquidos biológicos. La PCR digital y la NGS de alta sensibilidad son técnicas adecuadas para su análisis, con características diferentes, pero que han demostrado una elevada concordancia, lo que resulta especialmente útil para su uso de forma combinada.

## ABSTRACT

### BIOMARKER TESTING USING CIRCULATING TUMOR DNA IN ADVANCED NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

Biomarker testing in advanced non-small cell lung cancer patients has assumed a major role due to the development of therapeutic agents specifically targeting tumoral molecular alterations. These drugs act by blocking the tyrosine-kinase domain against aberrant receptors and are known as Tyrosine-Kinase Inhibitors (TKIs), the most important being Epidermal Growth Factor Receptor-TKIs (*EGFR*-TKIs).

However, biomarker testing may be hindered by the basic limitations of conventional biopsy, such as difficult access to tumor tissue, poor sample quality or negative impact on patient quality of life. Some of these limitations may be sidestepped by using circulating tumor DNA (ctDNA), which provides data on the mutational status of the tumor in a non-invasive way.

This project has two main objectives. The first one is to implement *EGFR* biomarker testing from circulating tumor DNA using digital PCR, thereby providing answers to questions on the influence of pre-analytical conditions, as well as on the usefulness of blood and body fluids as sources of circulating tumor DNA. The second aim is to assess the suitability of high sensitivity NGS in non-invasive biomarker testing from ctDNA, and to evaluate the concordance between NGS and dPCR.

Results show that ctDNA obtained from plasma and body fluids is an adequate source for non-invasive molecular testing, bearing in mind that it must be carried out in a very controlled process given the numerous analytical and preanalytical variables that may affect the result. Moreover, this approach has proved to be effective in advanced lung cancer patient monitoring, since the correlation between somatic mutation quantification and tumor size enables monitoring tumor response to treatment. Finally, high sensitivity NGS results have shown this approach to be adequate for widespread biomarker testing, enabling simultaneous screening of multiple markers in multiple samples for a variety of genomic aberrations. Moreover, dPCR and NGS have shown excellent concordance in terms of mutant allele frequencies.

In conclusion, cfDNA obtained from plasma and body fluids is appropriate for non-invasive biomarker testing related to lung cancer. dPCR and high sensitivity NGS are

shown to be adequate technologies for ctDNA testing, as their results show a high rate of concordance despite their differences. This makes them an ideal combination for this purpose.



# INTRODUCCIÓN





## 1. Epidemiología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el tumor maligno que se produce en las vías respiratorias o en el parénquima pulmonar, afectando a las células epiteliales que revisten el árbol respiratorio, y las células que se encuentran en los alveolos pulmonares. Es la enfermedad oncológica más extendida en el mundo con **1,8 millones** de casos nuevos al año <sup>1</sup>. En España, su incidencia anual supera los 28.000 casos, siendo el tercer cáncer más frecuente para ambos sexos <sup>2</sup>.

**Tabla 1.** Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España para 2017<sup>209</sup>.

	HOMBRE	MUJER	AMBOS SEXOS
1º	Próstata	Mama	Colorrectal
2º	Pulmón	Colorrectal	Próstata
3º	Colorrectal	Útero	Pulmón
4º	Vejiga	Pulmón	Mama
5º	Estómago	Ovario	Vejiga

Además, es el cáncer con mayor mortalidad anual en todo el mundo causando aproximadamente **1,6 millones** de muertes al año <sup>3</sup>.

El factor de riesgo más importante del cáncer de pulmón es el tabaco <sup>4</sup>, ya que más del 80% de los pacientes que sufren esta enfermedad tienen antecedentes de consumo tabáquico <sup>5</sup>. La exposición a sustancias tóxicas como los asbestos o el radón, metales como el Arsénico y el Cadmio, radiación, o emisiones por combustión de carbón y otras sustancias, también son factores de riesgo en el desarrollo de este tumor <sup>6,7</sup>.

Los datos epidemiológicos del cáncer de pulmón han cambiado en los últimos años, lo que puede estar relacionado con el tabaco y las políticas implantadas en cada país respecto a su consumo. Actualmente, la enfermedad suele presentarse en adultos de

edad media-alta, siendo más frecuente en personas mayores de 60 años. La incidencia es mayor en hombres que en mujeres, aunque la diferencia entre sexos es cada vez menor <sup>8</sup>. El cáncer de pulmón no célula pequeña (CPNCP) representa el 85% de todos los tumores de pulmón. Dentro de este grupo, el **adenocarcinoma** se ha convertido en el subtipo histológico más importante, debido a su elevada incidencia y a las implicaciones clínicas que conllevan su caracterización molecular.

El screening del cáncer de pulmón no está implantado en Europa, ya que su utilidad es controvertida. El ensayo clínico **National Lung Screening Trial (NLST)** demostró una reducción de la mortalidad de un 20% en población de riesgo utilizando la tomografía computerizada de baja dosis <sup>9</sup>. Sin embargo, la dificultad que conlleva la biopsia de las lesiones sospechosas, que en muchos casos corresponden a falsos positivos, hace que el balance riesgo-beneficio de esta estrategia sea cuestionado.

El diagnóstico de esta enfermedad es complicado y en la mayoría de los casos se realiza en estadios avanzados, debido a varios factores:

1. La tardía aparición de los síntomas, que además suelen ser inespecíficos (disnea, tos, dolor torácico, pérdida de peso...).
2. La situación anatómica del tumor, que suele ser de difícil acceso, lo que dificulta la obtención de tejido para su estudio.
3. La gran capacidad de invadir otros tejidos y metastatizar.

Esto afecta sustancialmente a la elevada mortalidad y a la corta esperanza de vida de estos pacientes, que presentan una supervivencia global a 5 años del 15% <sup>10</sup> en población occidental.

Hasta hace unos años, el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón se basaba fundamentalmente en cirugía, quimioterapia y radioterapia. Por ello, la única opción terapéutica para los pacientes metastásicos era la quimio/radioterapia y el soporte paliativo. Esto limitaba considerablemente la calidad de vida de estos pacientes, al tratarse de terapias agresivas y de aplicación hospitalaria. Sin embargo, en la última década se han incorporado nuevos fármacos dirigidos, de administración oral, basados en el perfil mutacional del tumor, que han demostrado un incremento de la supervivencia libre de progresión en pacientes seleccionados <sup>11,12</sup> y que han revolucionado por completo el paradigma diagnóstico y terapéutico del CPNCP avanzado.

## 2. Diagnóstico del CPNCP

El término cáncer de pulmón engloba multitud de entidades malignas de localización respiratoria, pero con características clínicas y morfológicas muy diversas. Ante una sospecha de cáncer de pulmón se debe realizar una analítica para valorar la función renal y hepática, y se debe solicitar un estudio por imagen mediante tomografía computerizada (TAC) de contraste. El PET con fluorodexosiglucosa (FDG-PET) presenta gran sensibilidad y puede resultar útil en el estudio de metástasis en estadios localizados <sup>13</sup>.

Una vez identificada la lesión sospechosa debe realizarse el diagnóstico patológico del tejido tumoral. Esto se lleva a cabo en base a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2015, que permiten diferenciar entre un cáncer de pulmón microcítico o célula pequeña o un cáncer de pulmón no microcítico o no célula pequeña.

### 2.1. Estudio histológico del CPNCP

El cáncer de pulmón no microcítico (CPNCP) es el más importante, ya que llega a representar hasta el 85-90% de todos los tumores de pulmón. Surge del epitelio de la superficie bronquial o de las glándulas mucosas bronquiales. Debido a sus implicaciones clínicas, es necesario realizar una subclasificación específica de este tipo de tumor siempre que sea posible.

Existen 3 subtipos principales dentro del CPNCP:

#### Adenocarcinoma

Es el subtipo histológico más frecuente ya, que supone aproximadamente el 40% de los casos de cáncer de pulmón. El diagnóstico histológico requiere la evidencia de formación de glándulas neoplásicas, inmunohistoquímica con marcadores de expresión característicos como el TTF-1 o presencia de mucina intracitoplasmática. Su aparición suele ser a edades más tempranas que otros tipos de cáncer y es el subtipo más común en personas no fumadoras (cuyo consumo global ha sido inferior a 100 cigarrillos) <sup>14,15</sup>, pese a que sigue estando muy ligado al hábito tabáquico. Su crecimiento es algo más lento que otros subtipos histológicos por lo que puede diagnosticarse en estadios más tempranos.

#### Carcinoma de células escamosas o epidermoide

Representa el 25-30% de todos los cánceres de pulmón, siendo el segundo tipo de CPNCP más frecuente después del adenocarcinoma. Se caracteriza por la producción

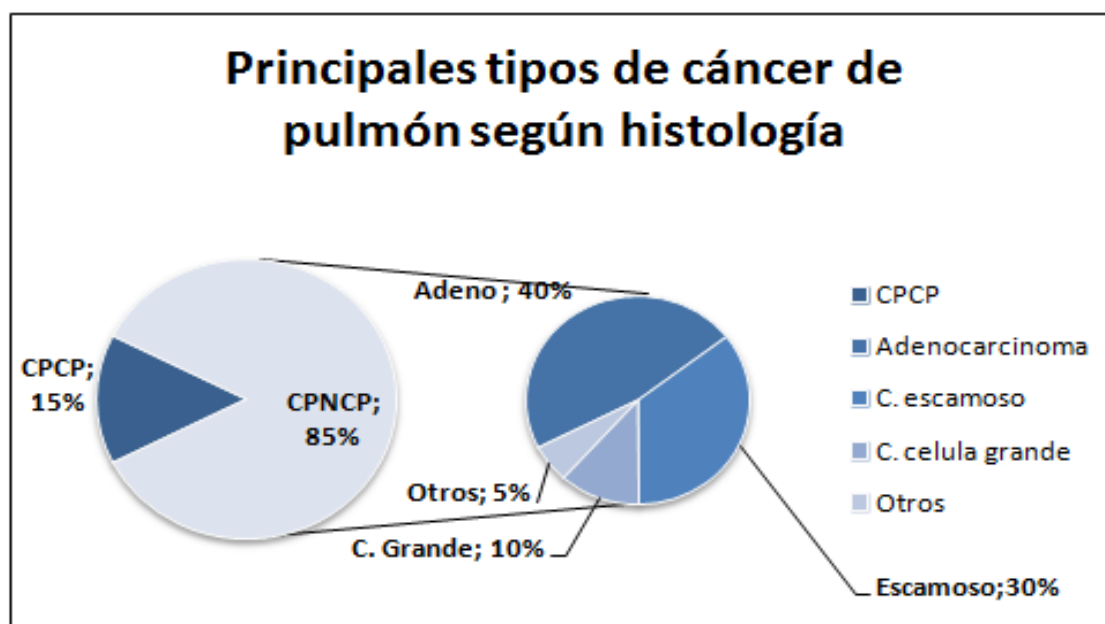
de queratina por las células tumorales y por la presencia de desmosomas, también conocidos como puentes intercelulares. La inmunohistoquímica resulta útil para su diagnóstico, siendo característica la expresión de p40 y p63. Es un cáncer estrechamente ligado al hábito tabáquico.

### Carcinoma de células grandes o indiferenciado

Representa aproximadamente del 10% al 15% de los cánceres de pulmón. Puede aparecer en cualquier zona, y tiende a crecer y a propagarse rápidamente. Es el menos estudiado de los tres debido a su menor incidencia y a la menor implicación clínica de su caracterización. Su diagnóstico suele realizarse mediante exclusión del adenocarcinoma y el carcinoma escamoso.

Existen además otros tipos de cáncer de pulmón no célula pequeña, como el carcinoma neuroendocrino o el sarcomatoide, mucho menos frecuentes y de menor relevancia clínica.

**Figura 1.** Principales subtipos histológicos de cáncer de pulmón <sup>210</sup>.



## 2.2. Estudio molecular del CPNCP

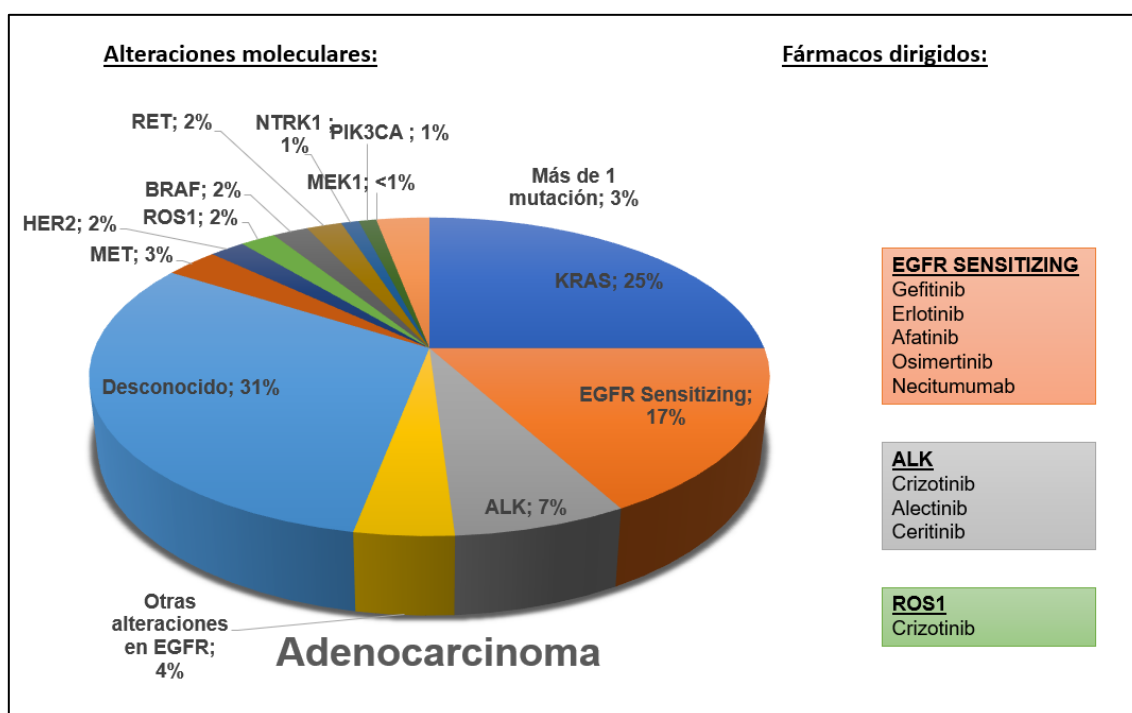
El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido identificar numerosas mutaciones presentes en el tejido tumoral de los pacientes con CPNCP. En general, podemos distinguir dos grandes grupos de mutaciones:

### Mutaciones conductoras o “driver”.

Estas mutaciones somáticas afectan a genes clave y activan de forma constitutiva diversas vías de señalización relacionadas con el cáncer por medio de proteínas anómalas. Cuando estas alteraciones aparecen en una célula, aumentan su capacidad para alterar los mecanismos de control del organismo, favoreciendo su proliferación y diferenciación, así como su capacidad para invadir tejidos vecinos y lejanos. El apelativo de “driver” se debe a que inducen el proceso de carcinogénesis en la célula. Los genes más implicados en este tipo de alteraciones en el CPNCP son **KRAS**, **EGFR**, **BRAF**, **MET**, **ROS1**, **ALK** y **PIK3CA** <sup>16–18</sup> entre otros.

La importancia de estas alteraciones moleculares se debe fundamentalmente a su potencial utilidad como biomarcadores de susceptibilidad a fármacos dirigidos, capaces de inhibir la señal exacerbada que estas alteraciones producen en la célula. Por este motivo, también se conocen como mutaciones “druggables”.

**Figura 2.** Mutaciones “driver” más frecuentes encontradas en el adenocarcinoma y fármacos aprobados frente a ellas. Adaptado de Tsao et al.<sup>211</sup>.



Este tipo de mutaciones son especialmente relevantes en el **adenocarcinoma**, debido a la disponibilidad de fármacos que actúan de forma específica frente a alteraciones propias de este subtipo histológico. Por este motivo, ante un diagnóstico de adenocarcinoma, las guías clínicas indican la importancia de preservar el tejido suficiente para realizar estudios moleculares <sup>19</sup> ya que pueden tener importantes implicaciones en la estrategia terapéutica del paciente.

### Mutaciones en genes supresores.

En los pacientes con CPNCP también es común encontrar mutaciones en genes supresores como *TP53*, *STK11*, *KEAP1*, *NF1*, *RB1* o *CDKN2A*<sup>16,20,21</sup>. Cuando uno de estos genes se encuentra alterado, su función supresora no se lleva a cabo correctamente, favoreciendo el desarrollo de tumores en el tejido afectado. Pese a la elevada frecuencia de alguna de estas alteraciones (*TP53* aparece mutado en casi el 50% de los pacientes con adenocarcinoma y en el 80% de los tumores escamosos) <sup>16,21</sup>, no existen en la actualidad fármacos que puedan revertir este efecto, lo que ha provocado que en la práctica su determinación resulte de escasa utilidad terapéutica.

### 2.3. Clasificación TNM del CPNCP

Ante un diagnóstico de CPNCP es importante valorar el estadio en el que se encuentra el tumor ya que el tratamiento y el pronóstico del paciente van a depender de este parámetro. La estadificación del cáncer de pulmón se realiza según criterios de imagen de acuerdo con el *Sistema Union for International Cancer Control (UICC) denominado TNM* (tumor, node, metastasis). La clasificación TNM 7ª edición se publicó en 2009 y agrupa la enfermedad en 5 estadios <sup>22</sup> en base a tres criterios:

1. Tumor primario (T).
2. Nódulos linfáticos regionales (N).
3. Metástasis distantes (M).

Tabla 2. Clasificación TNM 7ª edición.

Características del Tumor primario	
<b>TX</b>	Tumor que no puede ser evaluado, o se demuestra en citología de esputo o lavado bronquial con imágenes y endoscopia negativas
<b>To</b>	Sin evidencia de tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor $\leq 3$ cm en su diámetro mayor, rodeado por tejido pulmonar o pleural visceral, sin evidencia de invasión proximal al bronquio principal en la fibrobroncoscopia.
<b>T1a</b>	Tumor $\leq 2$ cm en su diámetro mayor
<b>T1b</b>	Tumor $>2$ cm, pero $\leq 3$ cm en su diámetro mayor
<b>T2</b>	Tumor $>3$ cm, pero $\leq 7$ cm con cualquiera de las siguientes características: afecta al bronquio principal, se encuentra a 2 cm o más de la carina, invade la pleura visceral, está asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hiliar pero no afecta al pulmón entero.
<b>T2a</b>	Tumor $>3$ cm, pero $\leq 5$ cm en su diámetro mayor
<b>T2b</b>	Tumor $> 5$ cm, pero $\leq 7$ cm en su diámetro mayor.
<b>T3</b>	Tumor $> 7$ cm o de cualquier tamaño que invade pared torácica, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal, o tumor que se encuentre a menos de 2 cm de la carina, pero sin invadirla, asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero o existencia de nódulos en el mismo lóbulo
<b>T4</b>	Tumor de cualquier tamaño que invade mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina, o existencia de nódulos en un lóbulo diferente del pulmón homolateral.
Metástasis a distancia	
<b>MX</b>	Metástasis a distancia no pueden evaluarse
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis a distancia
<b>M1</b>	Existencia de metástasis a distancia
<b>M1a</b>	Existencia de nódulos en un lóbulo del pulmón contralateral, tumor con nódulos pleurales, derrame pleural o pericárdico maligno.
<b>M1b</b>	Metástasis extratorácicas.
Ganglios linfáticos regionales	
<b>NX</b>	Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
<b>N0</b>	Sin ganglios linfáticos regionales comprometidos
<b>N1</b>	Metástasis ganglionares peribronquiales homolaterales y/o hiliares homolaterales, incluyendo la afectación por extensión directa de los ganglios intrapulmonares.
<b>N2</b>	Metástasis ganglionares mediastínicas homolaterales y/o subcarinales.
<b>N3</b>	Metástasis ganglionares contralaterales, hilares contralaterales, escalénicas ipsilaterales y contralaterales o supraclaviculares.

## C. PÉREZ-BARRIOS

Las características principales de cada estadio son las siguientes:

- ❖ **Estadio 0.** El cáncer no se ha diseminado más allá del revestimiento interior del pulmón; tumor in situ. (**TisN0M0**)
- ❖ **Estadio I.** El cáncer es de pequeño tamaño y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos. (**Ia: T1a/bN0M0; Ib: T2aM0N0**)
- ❖ **Estadio II.** El cáncer se ha diseminado a algunos ganglios linfáticos cerca del tumor original. (**Ila: T1a/bN1M0, T2aN1, T2bN0; Iib: T2bN1, T3N0**)
- ❖ **Estadio III.** El cáncer se ha diseminado a tejidos cercanos o se ha diseminado a ganglios linfáticos distantes. (**IIla: T1/T2N2, T3N1/N2, T4N0/N1; IIib: T4N2 o cualquier T con N3**)
- ❖ **Estadio IV.** El cáncer se ha diseminado a otros órganos del cuerpo como el pulmón no afectado, el cerebro o el hígado. (**Cualquier T y cualquier N con M1a, b**).

En 2016 se publicó la clasificación TNM-8ª edición <sup>23,24</sup>, que introduce cambios en las categorías T y M y divide el estadio en más grupos que la edición anterior para una estratificación más precisa.

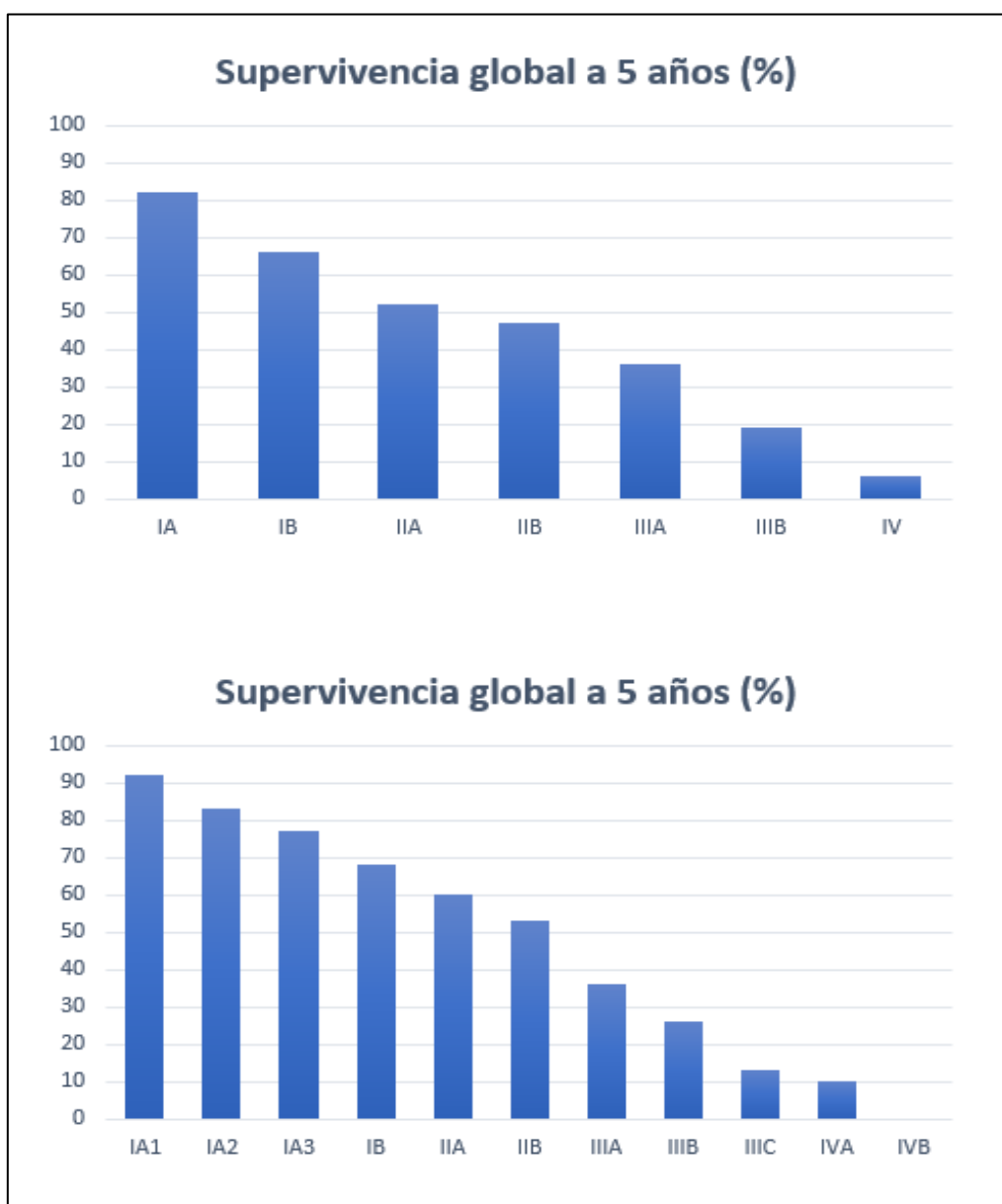
**Tabla 3.** Estadios del cáncer de pulmón según el sistema TNM 7ª y 8ª edición.

TNM 7ª edición							
	N0	N1	N2	N3	M1a	M1b	M1c
					Cualquier N	Cualquier N	Cualquier N
T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB	IV	IV	IV
T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB	IV	IV	IV
T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB	IV	IV	IV
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	IV	IV
T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IV	IV	IV
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IV	IV	IV

TNM 8ª edición							
	N0	N1	N2	N3	M1a	M1b	M1c
					Cualquier N	Cualquier N	Cualquier N
T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVA	IVB
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVA	IVB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IVA	IVA	IVB

La clasificación TNM permite valorar el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón, ya que la esperanza de vida se reduce a medida que se avanza en la escala. Por este motivo, el diagnóstico precoz es esencial para establecer de forma rápida la estrategia terapéutica más adecuada para el paciente, tratando de detener o retrasar el avance de la enfermedad.

**Figura 3.** Supervivencia global del cáncer de pulmón en relación con el estadio clínico. A: Clasificación TNM-7ª edición. B: Clasificación TNM-8ª edición. Adaptado de Goldstraw P. et al 212



### 3. Abordaje terapéutico actual del paciente con CPNCP

La estrategia terapéutica en los pacientes con CPNCP depende fundamentalmente del subtipo histológico, de los factores específicos de cada paciente (edad, comorbilidades...) y del estadio clínico en el que se encuentre la enfermedad <sup>25</sup>, teniendo en cuenta que más del 70% de los tumores de pulmón que se diagnostican en nuestro ámbito sanitario no es operable <sup>26</sup>. De forma general, podemos distinguir 3 escenarios:

#### Estadios I y II

Son los estadios más tempranos y por lo tanto de mejor pronóstico. La resección quirúrgica del tumor es el tratamiento de elección, siempre que sea posible, junto a quimio/ radioterapia.

#### Estadio III

Comprende un grupo muy heterogéneo de pacientes, por lo que cada caso debe ser valorado individualmente. Debido a la rápida evolución de la enfermedad se debe actuar lo más pronto posible para evitar que el paciente progrese a un estadio IV. La resección quirúrgica del tumor es el tratamiento de elección, junto a quimio y/o radioterapia, aunque en muchos casos esta opción no es viable. Es frecuente solicitar el estudio de biomarcadores en el tejido de estos pacientes (estadios IIIB) para valorar el uso de fármacos dirigidos en caso de progresión a estadio avanzado (IV).

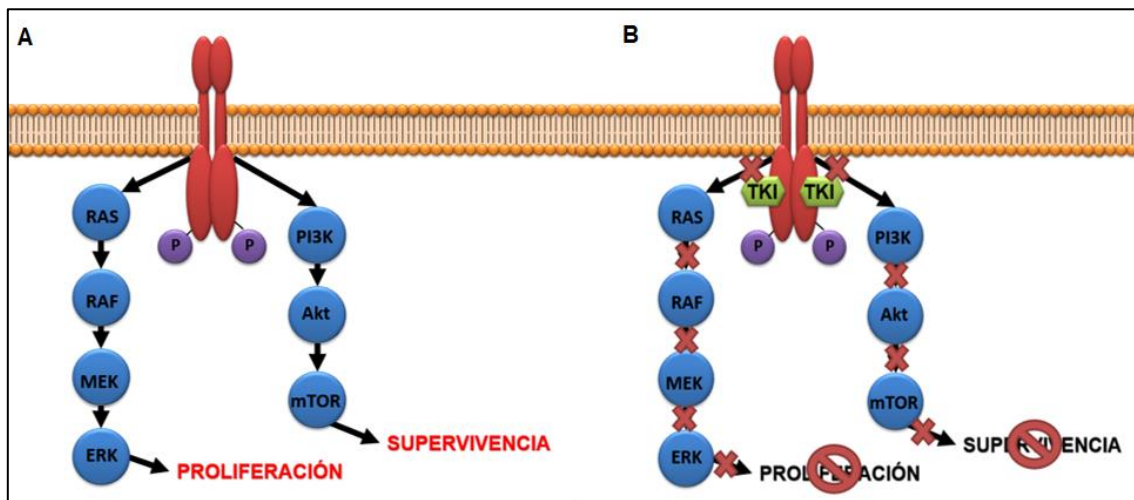
#### Estadio IV o avanzado

Es el último grupo de la clasificación y el más frecuente. Se caracteriza por presentar metástasis distantes en tejidos pulmonares o extrapulmonares.

Este estadio no es operable, y en la actualidad no existe una terapia eficaz que sea capaz de curar la enfermedad en este grupo de pacientes. El tratamiento es paliativo, encaminado a alargar la supervivencia y a mantener una aceptable calidad de vida. Como ya se ha mencionado, la quimioterapia y la radioterapia eran la única opción terapéutica para estos enfermos hasta hace unos años. Sin embargo, el desarrollo de fármacos dirigidos frente a alteraciones moleculares del tumor ha supuesto un cambio radical en el algoritmo terapéutico de estos pacientes. Estas terapias proporcionan una alternativa eficaz a la quimioterapia, y han demostrado un incremento de la supervivencia libre de progresión en estos pacientes y una mejor calidad de vida que los tratamientos convencionales <sup>12,27,28</sup>.

Los fármacos aprobados en la actualidad en la terapia personalizada del CPNCP avanzado son inhibidores del receptor de tirosina-kinasa (TKIs). Este receptor se encuentra alterado con una eleva frecuencia en este grupo de pacientes, lo que produce una señal exacerbada de proliferación y supervivencia celular, que es bloqueada por los TKIs.

**Figura 4.** Receptor de tirosina-kinasa. A: Receptor mutado con señal exacerbada. B: Efecto de los fármacos TKIs en el receptor mutado.



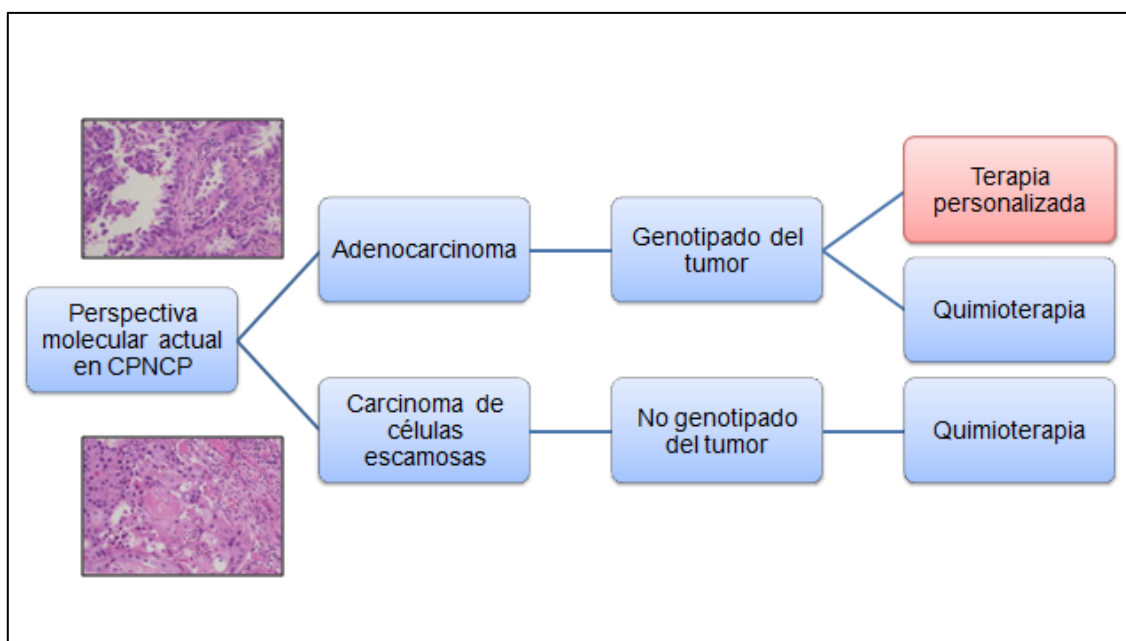
Para que un paciente pueda recibir uno de estos fármacos dirigidos es necesario haber identificado previamente en el tumor la alteración molecular frente a la que actúa, que recibe el nombre de biomarcador. En la actualidad existen en Europa tres biomarcadores que permiten el acceso a una terapia dirigida en CPNCP: Mutaciones en el gen *EGFR*, reordenamientos del gen *ALK* y reordenamientos del gen *ROS1* <sup>29</sup>.

#### 4. Estudio de biomarcadores y medicina personalizada en CPNCP avanzado

El National Cancer Institute (NCI) define la medicina personalizada como “*aquella que utiliza la información de los genes, las proteínas y el ambiente de una persona para prevenir, diagnosticar y tratar la enfermedad*”. En el CPNCP, esta medicina de precisión ha adquirido una gran relevancia gracias a la caracterización molecular de los diversos subtipos histológicos y al desarrollo de fármacos específicos frente a algunas de las alteraciones moleculares descritas en este tumor.

Los fármacos aprobados para terapia personalizada del CPNCP avanzado actúan frente a dianas moleculares propias del **adenocarcinoma** que son extremadamente infrecuentes en el carcinoma escamoso. Por ello, el primer dato fundamental para la toma de decisiones clínicas es la correcta identificación de estos dos subtipos histológicos.

**Figura 5.** Perspectiva molecular actual en el CPNCP. Adaptado de Liao R. et al. <sup>213</sup>



##### 4.1. Estudio de biomarcadores en el tejido tumoral

El estudio de biomarcadores en el tejido tumoral debe de realizarse siempre que se cumplan las siguientes condiciones <sup>29,30</sup>:

- Cáncer avanzado (estadio IV).
- Histología de adenocarcinoma.

- CPNCP con histología no escamosa
- CPNCP con cualquier histología cuando las características del paciente puedan sugerir una alta probabilidad de encontrar mutaciones somáticas de utilidad:
  - o Pacientes < de 50 años.
  - o Pacientes no fumadores o con consumo ligero de tabaco (menos de 15 paquetes al año)

Estos grupos presentan con mayor frecuencia alteraciones susceptibles de tratamiento<sup>31,32</sup> y por lo tanto son los que más se benefician con la terapia dirigida.

Los genes que deben analizarse por su utilidad como biomarcadores de fármacos dirigidos son **EGFR**, **ALK** y **ROS1**.

#### 4.1.1. Gen *EGFR* (OMIM:131550)

El gen del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico o *EGFR* (siglas del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*) se localiza en la posición 7p11.2 en el brazo corto del cromosoma 7 y está formado por 28 exones. Codifica para una glicoproteína transmembrana que pertenece a la familia de receptores de membrana tipo I de ErbB que está formada por los receptores EGFR/ERBB1, HER2/ERBB2/NEU, HER3/ERBB3 y HER4/ERBB4. Este receptor contiene tres zonas bien diferenciadas: Una región N-terminal extracelular de unión a ligando, una región transmembrana y una región C-terminal intracelular donde se localiza el dominio con actividad tirosina-kinasa.

La unión del ligando (fundamentalmente EGF o TGF-alfa) produce un cambio conformacional que facilita la dimerización del receptor<sup>33</sup>. Esto provoca la fosforilación del dominio tirosina-kinasa y la activación de numerosas vías de señalización como la vía Ras/Raf/Mek/MAPK que induce la proliferación celular y la vía PI3K/Akt/mTOR que induce supervivencia<sup>34</sup>.

##### 4.1.1.1. Mutaciones en el gen *EGFR* en CPNCP

El receptor *EGFR* es el paradigma de la medicina personalizada en CPNCP. Su utilidad como potencial diana terapéutica en el cáncer fue descrita en 1988 por Mendelson J.<sup>35</sup>. Sin embargo, no fue hasta 2004 cuando se describió la existencia de mutaciones somáticas activadoras en este gen en los pacientes con cáncer de pulmón que habían presentado mejor respuesta a un fármaco inhibidor de tirosina-kinasa de *EGFR* llamado Gefitinib<sup>36,37</sup>. Este fármaco había sido aprobado en 2003 por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de CPNCP en pacientes no seleccionados sin muy buenos resultados. Sin embargo, el descubrimiento de estas mutaciones activadoras o

*sensitizing* en el gen *EGFR* permitió diferenciar un subgrupo de pacientes que presentaban mayor sensibilidad a estos fármacos anti-tirosina kinasa. Un año más tarde, en 2005, se descubrió que los pacientes tratados con estas moléculas desarrollaban un mecanismo de resistencia mediante la adquisición de nuevas mutaciones, siendo la más frecuente la mutación p.T790M, que se encontraba presente en el 60%<sup>38,39</sup> de los pacientes previamente tratados con TKIs<sup>40,41</sup>.

### a) **Mutaciones activadoras o sensitizing**

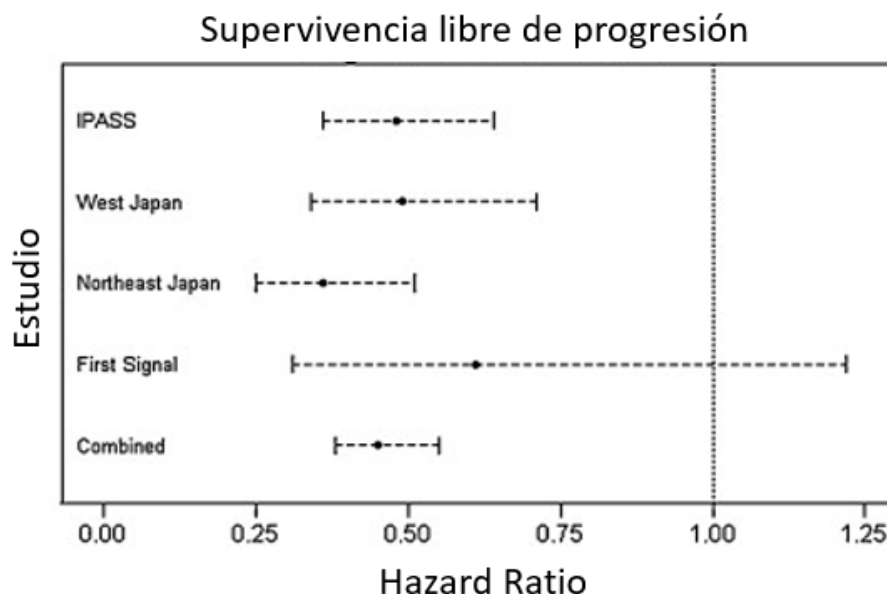
Estas mutaciones afectan aproximadamente al 15%<sup>31</sup> de los pacientes con CPNCP (en población occidental). Aparecen entre los exones 18 y 21 del gen, alrededor del bolsillo de unión a ATP<sup>40</sup>, y alteran el dominio tirosina-kinasa del receptor. Cuando se produce una de estas mutaciones, se generan una serie de cambios conformacionales en el receptor que favorecen su activación constitutiva, desencadenando una cascada de señales de proliferación y supervivencia celular implicadas en el desarrollo del CPNCP.

Estas mutaciones se producen con mayor frecuencia en mujeres y en no fumadores con histología de adenocarcinoma, aunque pueden encontrarse en menor frecuencia en otros subtipos histológicos. La presencia de alguna de estas mutaciones en el tejido tumoral predice un aumento de la susceptibilidad a fármacos inhibidores de tirosin-kinasa de *EGFR* de 1ª y 2ª generación (Gefitinib, Erlotinib y Afatinib), lo que supone un beneficio clínico en estos pacientes. Esto quedó demostrado en varios estudios de fase III, en los que se objetivó un aumento de la supervivencia libre de progresión de los pacientes con mutaciones activadoras en *EGFR* tratados con TKIs-*EGFR* frente a quimioterapia<sup>42,43</sup>, con una tasa objetiva de respuesta (ORR) que variaba entre un 55% y un 85% en función del estudio. Además, estos pacientes presentaron mejores resultados con respecto a la toxicidad y un mejor mantenimiento de la calidad de vida.

La supervivencia global no parece incrementarse con estos tratamientos, aunque esto puede deberse al diseño de los ensayos clínicos que no tienen en cuenta el cambio de terapia en 2º y 3º línea, por lo que las ramas no identifican claramente a los pacientes tratados en exclusiva con TKIs o quimioterapia. Por esta razón, se están realizando nuevos diseños que estratifiquen correctamente el tratamiento.

**Figura 6.** Hazard ratio de diferentes estudios y su combinación comparando la supervivencia libre de progresión de pacientes con CPNCP con mutación positiva en *EGFR* tratados con Gefitinib vs quimioterapia. HR=0.45 (95% CI, 0.38–0.55,  $p < 10^{-16}$ ). Fuente: Geoffrey Y. Ku et al.

43.



Aproximadamente el 90%<sup>33</sup> de las mutaciones activadoras en el CPNCP corresponden a estas dos alteraciones:

- ❖ Deleciones en el exón 19 (del19) que cambian el marco de lectura y se producen alrededor de las posiciones 746 a 750 del polipéptido. ( $\Delta E746-A750$ ).
- ❖ Sustitución puntual de una leucina (L) por una arginina (R) en el codón 858 (L858R) del exón 21.

El otro 10% están producidas por mutaciones puntuales en el codón 719 en el exón 18 (G719X) y por sustituciones en los exones 20 y 21 como por ejemplo el cambio L861Q.

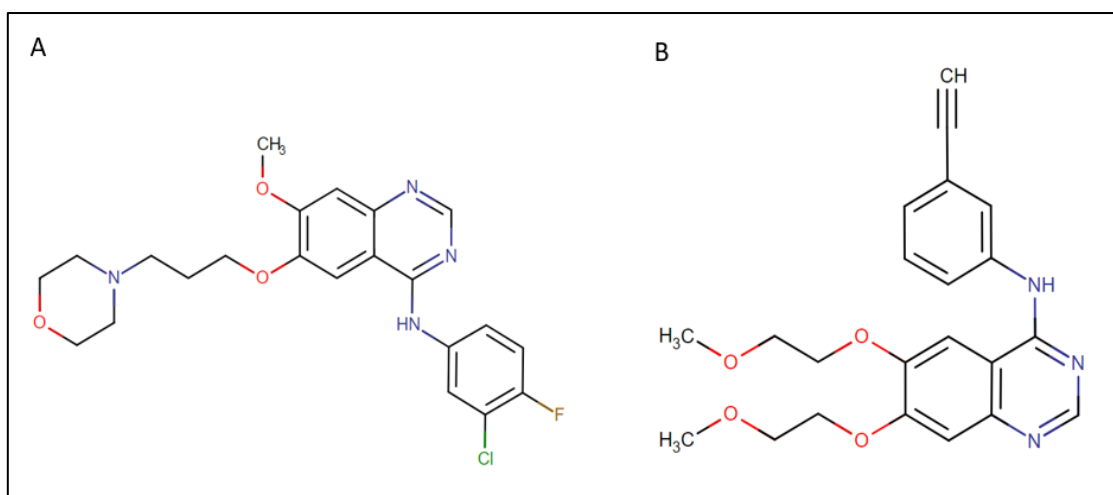
Las inserciones en el exón 20 fueron tradicionalmente consideradas como mutaciones activadoras o *sensitizing*. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que por lo general confieren resistencia a los fármacos inhibidores de tirosina-kinasa de primera y segunda generación ya que no alteran el bolsillo de unión del TKI<sup>44</sup> por lo que no producen beneficio clínico en los pacientes tratados con estos fármacos, a excepción de la mutación A763\_Y764insFQEA<sup>45</sup>. A pesar de ello, su clasificación es ambigua ya que aparecen antes del tratamiento farmacológico y por lo tanto no son consecuencia de este.

### Terapia dirigida frente a las mutaciones *sensitizing*

#### ➤ TKIs-EGFR de 1º generación (Gefitinib, Erlotinib).

Producen una inhibición reversible del receptor. Su beneficio no sólo se debe al aumento de la supervivencia libre de progresión (SLP) con respecto a la quimioterapia, consiguiendo SLP de entre 9 y 13 meses <sup>46-48</sup>, sino que además los pacientes tratados con estos fármacos presentan una mejora importante de la calidad de vida. Esto se debe, entre otras razones, a que son comprimidos de administración oral (250mg y 150 mg diarios respectivamente) y a que por lo general presentan reacciones adversas leves como diarrea, molestias intestinales o rash cutáneo, con frecuente elevación de las transaminasas. Erlotinib puede utilizarse también en terapias de mantenimiento y después de progresión a quimioterapia.

**Figura 7.** Estructura química de los fármacos Gefitinib (A) y Erlotinib (B). Fuente: [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca) <sup>214</sup>.



#### TKIs-EGFR de 2º generación (Afatinib).

Es un inhibidor irreversible del receptor de administración oral (40mg/día). Diversos ensayos clínicos como el LUX-Lung 6 demostraron el incremento de la SLP en comparación con quimioterapia con resultados de 11,0 meses frente a 5,6 meses (HR 0,24; IC del 95 %: 0,17-0,35;  $p < 0,0001$ ;  $N = 324$ ). Posteriormente, el ensayo LUX-Lung 7 demostró una supervivencia libre de progresión y una tasa objetiva de respuesta superior a Gefitinib en primera línea <sup>49, 50</sup>. Las reacciones adversas cutáneas y digestivas pueden ser algo más fuertes que con los TKIs de primera generación, pero en ciertos grupos de pacientes como en aquellos que presentan una delección en el exón 19,

parecen ser especialmente beneficiosos <sup>51</sup>. El uso de este fármaco también está aprobado tras progresión a quimioterapia de primera línea.

Pese a los buenos resultados iniciales de estos fármacos, la enfermedad acaba progresando al cabo de 9 a 13 meses aproximadamente, debido a diversos mecanismos como nuevas mutaciones en *EGFR*, la amplificación del gen *MET*, la activación de rutas alternativas de señalización o la transformación histológica del tumor, que también deben tenerse en cuenta a la hora del abordaje terapéutico.

### **b) Mutaciones de resistencia**

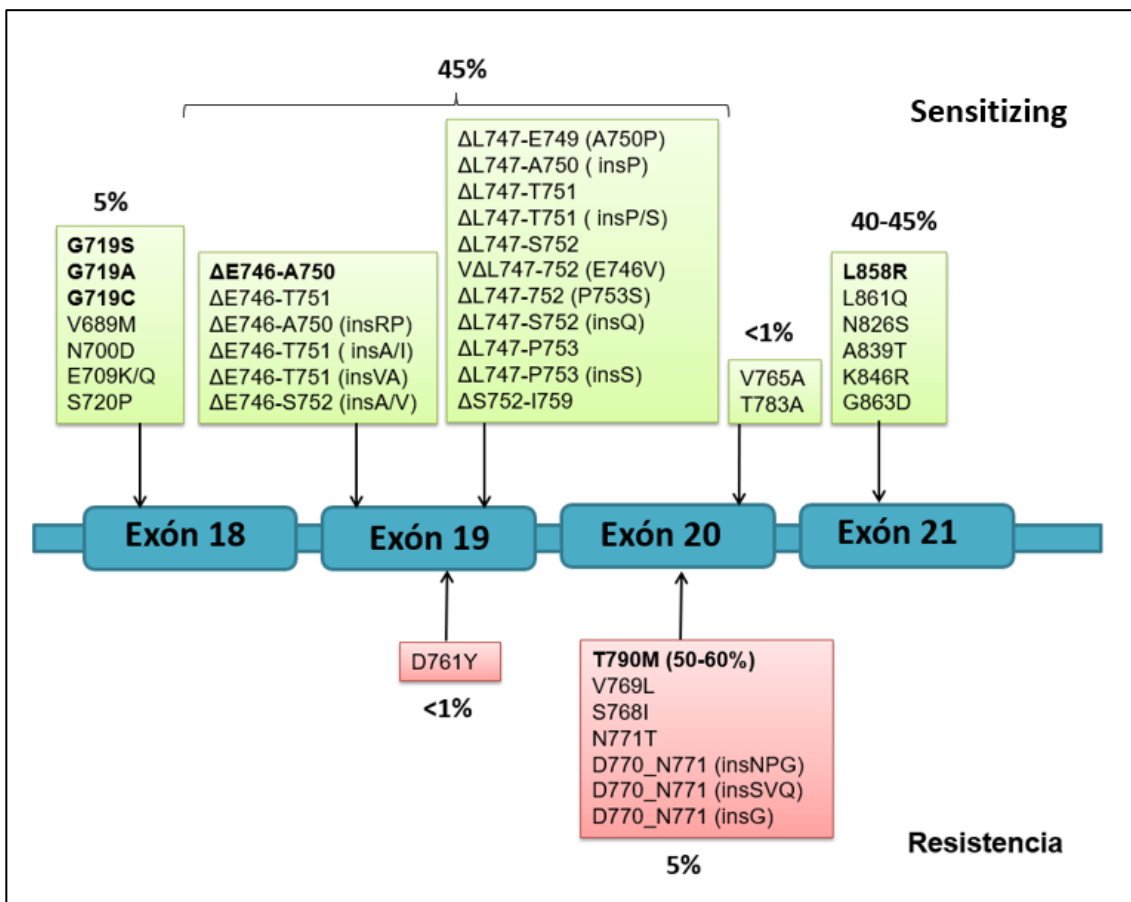
Estas mutaciones suelen aparecer como respuesta al tratamiento farmacológico de CPNCP con TKIs. Este efecto se debe probablemente a la gran heterogeneidad tumoral y a la selección de subclones celulares resistentes al aplicar el tratamiento farmacológico en la masa tumoral.

#### b.1. Mutaciones de resistencia a TKIs de primera y segunda generación

La mutación de resistencia más importante en el CPNCP es la **p.T790M**, que se localiza en el exón 20 del gen *EGFR* y que se debe a un cambio C por T en la posición 2369 (c.2369C>T) lo que produce un cambio del aminoácido treonina a metionina en el codón 790 (p.Treo790Met).

Como se ha mencionado, esta mutación suele aparecer con una frecuencia de aproximadamente un 60% en los pacientes tratados con inhibidores de tirosina-kinasa de primera y segunda generación, por lo que se considera una mutación adquirida en respuesta al tratamiento farmacológico y su aparición es un marcador de mal pronóstico para el paciente. Aunque existen casos descritos en la literatura en donde la mutación p.T790M se identifica de forma previa al tratamiento farmacológico con TKIs, esta situación es mucho menos frecuente, y afecta a menos del 5% de los pacientes <sup>52</sup>.

**Figura 8.** Mutaciones de sensibilidad y resistencia a TKIs de 1ª y 2ª generación. Adaptado de Sharma et al. <sup>33</sup>.



### Terapia dirigida frente a la mutación p.T790M

#### ➤ TKIs de 3ª generación (Osimertinib)

Osimertinib es un inhibidor irreversible frente a la mutación p.T790M. Fue aprobado tras los resultados positivos de ensayo multicéntrico AURA (fase I/II) donde se objetivó una tasa de respuesta objetiva global (ORR) del 66% y una SLP de 9,7 meses. Los resultados del AURA fase III fueron aún más prometedores con un SLP de 10,1 para Osimertinib frente a 4,4 meses con terapia convencional (HR=0,30; IC95% 0,23–0,41; p<0,001). Osimertinib demostró también un mayor beneficio en metástasis del sistema nervioso central, y una tasa de respuesta objetiva del 71% con una menor frecuencia de reacciones adversas graves que la quimioterapia (23% frente a un 47%) <sup>53</sup>.

Los resultados del ensayo FLAURA (fase III) demostraron la eficacia en primera línea del Osimertinib en pacientes con mutación *sensitizing* en *EGFR*, demostrando una mediana de supervivencia libre de progresión significativamente superior al Gefitinib y

al Erlotinib (18.9 meses frente a 10.8 meses) y una tasa de respuesta objetiva similar en ambas ramas de tratamiento (80% con Osimertinib frente a 76% con terapia convencional) <sup>54</sup>. Estos resultados propiciaron la posterior aprobación por la FDA del tratamiento con Osimertinib en primera línea en pacientes con CPNCP con delección en el exón 19 o mutación L858R a principios de 2018.

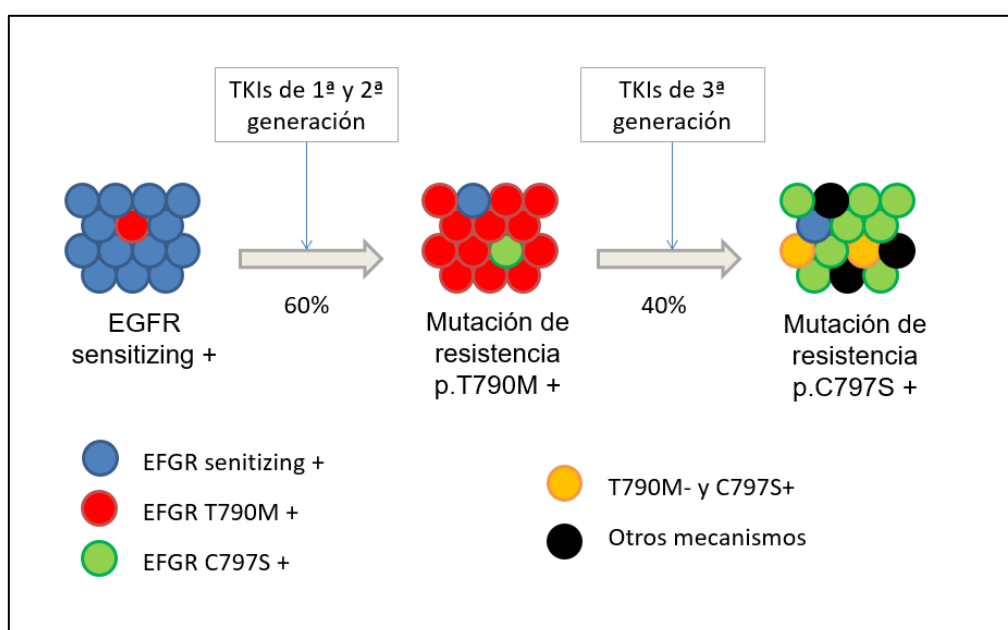
**Tabla 4.** Principales características de los EGFR-TKIs. (\*): Sólo demostrado en Osimertinib; BHC: Barrera hemato-encefálica. Adaptado de Ke E-E et al. <sup>215</sup>.

	EGFR-TKIs de primera generación	EGFR-TKIs de segunda generación	EGFR-TKIs de tercera generación
<b>Unión a EGFR</b>	Reversible	Irreversible	Irreversible
<b>EGFR WT</b>	+	+	-
<b>EGFR Del19/L858R</b>	+	++	++
<b>EGFR T790M</b>	-	+	+++
<b>Penetración a nivel de BHC</b>	+	+	+++ *

**b.2. Mutaciones en EGFR de resistencia a TKIs de tercera generación**

El 40% en pacientes tratados con Osimertinib desarrollan una mutación de resistencia en la que se produce un cambio de cisteína por serina en el codon 797 de la proteína (**p.Cys797Ser**) que interfiere a la unión covalente del fármaco con la cisteína esa posición <sup>55, 56</sup>.

**Figura 9.** Evolución de las principales mutaciones de resistencia en el gen EGFR. Adaptado de Wang S. et al. <sup>216</sup>.



El conocimiento de esta y otras mutaciones permite el desarrollo de nuevas moléculas dirigidas, como el inhibidor alostérico EAI045<sup>57</sup>, que ha demostrado eficacia frente a la mutación C797S, abriendo la puerta a una cuarta generación de fármacos anti-*EGFR* en CPNCP<sup>58</sup>.

### 4.1.1.2. Recomendaciones para el estudio de *EGFR* en el laboratorio

El **estudio del gen *EGFR*** debe incluir los exones 18 al 21, ya que es en esta región donde se han identificado mutaciones *sensitizing*. Si esto no es posible debe analizarse al menos la presencia de las mutaciones activadoras más frecuentes (**del19 y L858R**) y la mutación de resistencia p.T790M. El análisis debe realizarse mediante un método validado y debe verificarse mediante controles de calidad externos.

En los pacientes con progresión al tratamiento con TKIs de *EGFR* de primera y segunda generación es recomendable realizar el estudio de la mutación de resistencia p.T790M. Este estudio puede llevarse a cabo mediante técnicas de biopsia líquida debidamente validadas<sup>59</sup>, teniendo en cuenta que ante resultados negativos debe considerarse la re-biopsia de tejido.

### 4.1.2. Gen *ALK* (OMIM 105590)

El gen *Anaplastic lymphoma kinase* o *ALK* codifica para un receptor de la familia de la insulina con actividad tirosina kinasa. Aunque su implicación en el desarrollo de cancer fue descubierta en linfomas anaplásicos, varios tumores sólidos como el CPNCP presentan fusiones de gen *ALK* con diferentes parejas génicas, dando lugar a proteínas que mantienen activo constitutivamente el dominio tirosina-kinasa.

#### 4.1.2.1. Traslocación de *ALK* en CPNCP

La proteína de fusión más frecuente en CPNCP (3-7%)<sup>6061</sup> es la formada por la unión de *ALK* con *EML-4* (*Echinoderm Microtubule Associated Protein-like 4*), una proteína involucrada en la formación de microtúbulos. Esta fusión se produce por la inversión del brazo corto del cromosoma 2 y conlleva la unión de los exones 1–13 de *EML-4* a los exones 20–29 de *ALK*. Existen diversas variantes en función del fragmento de *EML-4* implicado en la fusión, pero todas favorecen la dimerización del receptor y la activación de diversas cascadas de señalización que activan señales de proliferación y supervivencia celular.

Los reordenamientos en *ALK* son más frecuentes en personas jóvenes, no fumadoras y con histología de adenocarcinoma, y en general son mutuamente excluyentes con las

mutaciones en *EGFR*<sup>62</sup> aunque se han descrito casos en los que se detectan ambas alteraciones de forma simultánea<sup>63,64</sup> lo que puede resultar interesante para valorar futuras terapias combinadas.

### Terapia dirigida frente a los reordenamientos de *ALK*

Los pacientes con estos reordenamientos son candidatos a recibir tratamiento con inhibidores de tirosina-kinasa de *ALK*. Estos fármacos orales inhiben la actividad del receptor de *ALK* y sus variantes oncogénicas (proteínas de fusión por combinación con otros genes como el *EML-4*), suprimiendo las señales de proliferación y supervivencia celular que se desencadenan. De igual manera que en el caso de *EGFR*, existen varias generaciones de fármacos que actúan a este nivel:

➤ ALK-TKIs de primera generación (Crizotinib).

Crizotinib es un inhibidor dual de *ALK* y *MET*. Su uso en CPNCP está aprobado para el tratamiento de pacientes *ALK* positivos y *ROS1* positivos. Su utilidad fue inicialmente testada en pacientes tratados previamente con quimioterapia. Sin embargo, un estudio fase III<sup>65</sup> demostró su eficacia en primera línea frente a quimioterapia en pacientes *ALK* positivos con una SLP 10,9 meses frente a 7 y con un ORR del 71% (HR 0,45; 95% CI, 0,35-0,60; P<0,001). Los efectos adversos de este fármaco suelen ser leves (grado 1 o 2) por lo que generalmente son bien tolerados a dosis de 500mg al día. Sin embargo, al cabo de los meses los pacientes acaban progresando debido a la aparición de resistencias, producidas por nuevas mutaciones en *ALK* o por la activación de vías alternativas.

➤ ALK-TKIs de segunda generación (Ceritinib y Alectinib)

El uso de estos fármacos por vía oral está restringido a pacientes *ALK* positivos que han progresado a Crizotinib, pero no está sujeto a la presencia de ningún biomarcador, por lo que la re-biopsia en estos pacientes no es crucial para guiar el abordaje terapéutico, como ocurre en *EGFR*. Presentan la ventaja de ser activos frente a metástasis cerebrales, ya que atraviesan barrera hematoencefálica.

#### 4.1.2.2. Recomendaciones para el estudio de reordenamientos en el gen *ALK* en el laboratorio

La técnica de referencia es la hibridación in situ fluorescente (FISH), aunque pueden utilizarse otras técnicas como la PCR a tiempo real (RT-PCR) o inmunohistoquímica.

Esta última puede utilizarse como método de screening siempre que los casos positivos se confirmen mediante otra metodología.

### 4.1.3. *ROS1* (OMIM: 165020)

El gen *ROS1* (*ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase*) codifica también para un receptor transmembrana de la familia del receptor de insulina con actividad tirosina-kinasa.

#### 4.1.3.1. Traslocación de *ROS1* en CPNCP

De forma similar a los reordenamientos de *ALK*, las alteraciones en *ROS1* en pacientes con CPNCP producen proteínas de fusión con activación constitutiva del dominio tirosin-kinasa con un aumento de las señales de proliferación y supervivencia celular. Además de estas similitudes, ambas alteraciones también comparten características epidemiológicas: afectan a población más joven que la media de CPNCP, preferentemente a no fumadores y con histología de adenocarcinoma <sup>66</sup>.

#### Terapia dirigida frente a los reordenamientos de *ROS1*

Pese a la baja frecuencia de este reordenamiento (1-2% de los CPNCP) <sup>67</sup>, su importancia recae en la reciente aprobación del Crizotinib por la FDA para el tratamiento de tumores *ROS1+* <sup>68</sup>. La susceptibilidad de estos pacientes al fármaco puede deberse en gran medida a la homología entre ambos mecanismos de acción (*ALK* y *ROS1*).

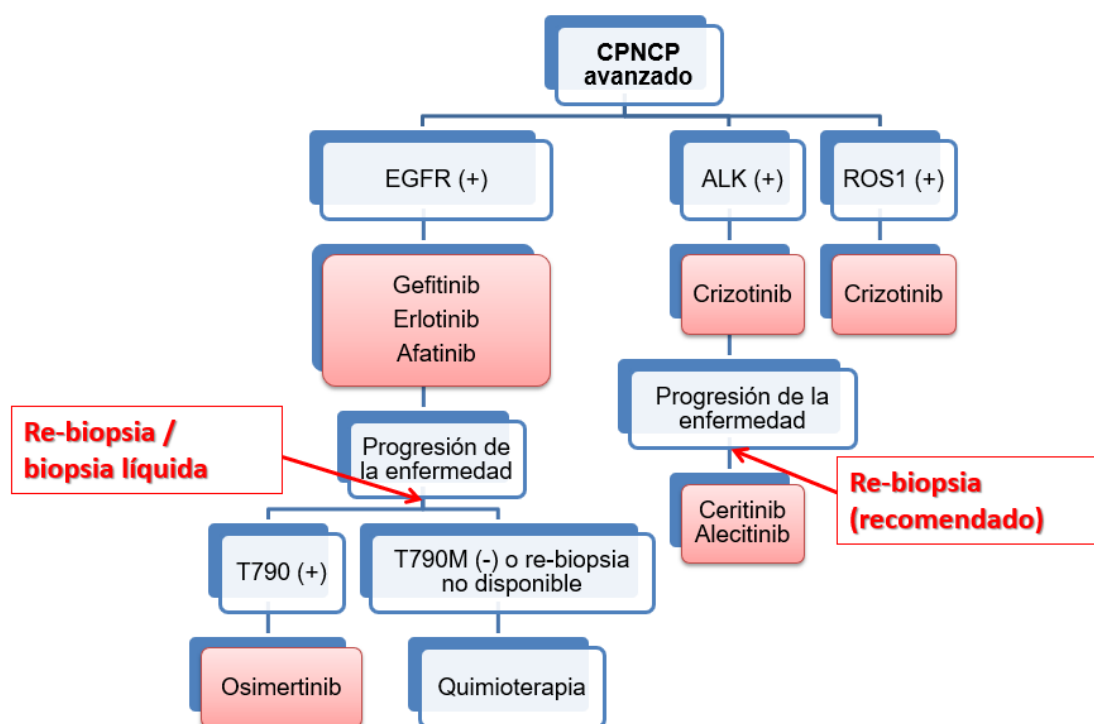
#### 4.1.3.2. Recomendaciones para el estudio de reordenamientos en el gen *ROS1* en el laboratorio

Las recomendaciones son las mismas que para los reordenamientos en *ALK* <sup>69</sup>: Se recomienda el uso de inmunohistoquímica para el screening, siempre y cuando los resultados positivos sean confirmados mediante otra técnica.

## 4.2. Tratamiento con inhibidores de tirosina-kinasa en pacientes con estudio de biomarcadores positivo

Los pacientes con CPNCP avanzado cuyo estudio de biomarcadores haya resultado positivo para *EGFR*, *ALK* o *ROS1* son candidatos que recibir terapia de primera línea con TKIs. El algoritmo terapéutico se describe en el siguiente esquema:

**Figura 10.** Algoritmo terapéutico de pacientes con CPNCP avanzado con resultado positivo en el estudio de biomarcadores (*EGFR* o *ALK*). Adaptado de Novello S et al. <sup>13</sup>



### 4.3. Potenciales biomarcadores

Existen otras alteraciones moleculares que aparecen con alta frecuencia en el CPNCP y que están siendo investigadas como biomarcadores para nuevas moléculas con actividad terapéutica, como las que afectan a los genes *MET*, *KRAS* o *RET* entre otros. Su estudio solo está recomendado en pacientes cuyo estudio de biomarcadores ha obtenido un resultado negativo, para un posible acceso a ensayos clínicos.

La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) recomienda también el estudio de la mutación V600E (gen *BRAF*) <sup>29</sup> en pacientes con CPNCP por su utilidad como biomarcador para la combinación recientemente aprobada por la FDA Dabrafenib/Trametinib. Sin embargo, esta recomendación no está implantada en Europa.

### 5. Estudio de biomarcadores en ADN tumoral circulante

**El tejido tumoral** es la muestra de referencia en el estudio de **biomarcadores** para el uso de terapias dirigidas. Sin embargo, su obtención presenta ciertas limitaciones.

En primer lugar, el pulmón es un órgano de difícil acceso, por lo que obtener una muestra representativa y suficiente para realizar un estudio molecular adecuado puede ser complicado. Si la muestra no es adecuada, debe plantearse la re-biopsia, con el consecuente riesgo para el paciente que debe volver a someterse a un procedimiento invasivo. Además, esto conlleva un retraso en el resultado que puede ser crucial para establecer el tratamiento más adecuado para la situación del paciente.

En segundo lugar, los tumores presentan una enorme heterogeneidad, de forma que cada zona del tumor puede presentar unas características genéticas propias <sup>70</sup>. Esto puede provocar que la muestra analizada no sea representativa de la totalidad de las células tumorales <sup>71</sup>, lo que puede producir resultados discordantes entre muestras de un mismo paciente.

En tercer lugar, los tumores no son estáticos, y sus características moleculares pueden ir cambiando con el desarrollo de la enfermedad. La selección de subclones resistentes debido al uso de fármacos dirigidos puede intervenir en la aparición de nuevas alteraciones genéticas, que producen diferencias moleculares entre el tumor primario y sus metástasis <sup>72</sup>. Dichas alteraciones pueden utilizarse a su vez como biomarcadores para nuevas estrategias terapéuticas, pero su caracterización resulta difícil mediante técnicas convencionales por el limitado acceso a las muestras.

Debido a los inconvenientes citados, se han desarrollado estrategias alternativas para ayudar a la toma de decisiones clínicas, como el estudio de biomarcadores a partir de **ADN tumoral circulante (ctDNA)**.

#### 5.1. Características del ADN tumoral circulante (ctDNA)

El ADN circulante es una molécula de pequeño tamaño (de aproximadamente 150-180pb) que es liberada por las células al torrente sanguíneo mediante procesos de apoptosis y necrosis fundamentalmente. En los pacientes oncológicos, este ADN libre circulante procede tanto de células cancerígenas como de células sanas, por lo que existe una mezcla de ambos en la sangre. La fracción de ADN procedente de células tumorales recibe el nombre de ADN tumoral circulante y varía desde <0,1% a >30% del ADN circulante total <sup>73</sup>, dependiendo de múltiples factores como el estadio tumoral o el recambio celular. En estos pacientes la concentración de ADN circulante suele ser

mayor que en individuos sanos <sup>74,75</sup> aunque estas diferencias no resultan siempre significativas.

Varios estudios han relacionado la concentración de ADN tumoral circulante con el estadio de la enfermedad y con el tamaño del tumor <sup>76,77</sup> de tal forma que estas concentraciones suelen estar especialmente aumentadas en pacientes metastásicos.

La principal propiedad del ctDNA es que mantiene las características moleculares del tejido tumoral del que procede <sup>78,79</sup>, incluyendo mutaciones, cambios epigenéticos y variaciones en el número de copias (CNVs). Esta propiedad hace que la sangre adquiera una potencial utilidad como subrogado del tumor, por lo que su estudio recibe el nombre de “**biopsia líquida**”. Además, el ctDNA puede detectarse también en otros fluidos biológicos diferentes a la sangre como la orina <sup>80</sup>, el líquido cefalorraquídeo <sup>81</sup> o el líquido pleural <sup>82</sup>, lo que incrementa aún más sus posibilidades diagnósticas.

### 5.2. Aplicaciones del estudio de ctDNA

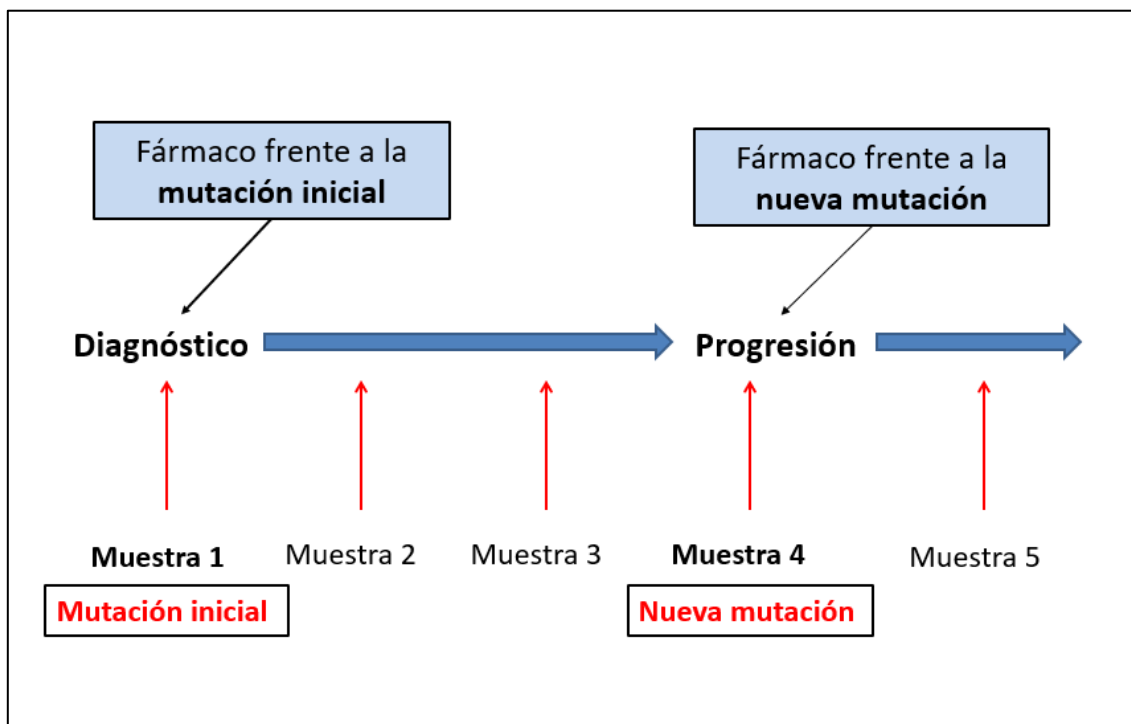
El estudio del ctDNA resulta de gran utilidad para la detección de **biomarcadores de forma no invasiva**, ya que permite el acceso a un mayor número de muestras que la biopsia convencional, lo que posibilita el estudio de **la dinámica mutacional** del tumor a lo largo de la enfermedad. Las principales aplicaciones del ctDNA pueden clasificarse en los siguientes grupos:

#### Monitorización del tratamiento con terapias dirigidas

La detección y cuantificación de las alteraciones moleculares procedentes del tumor y su evolución a lo largo del tiempo resulta de gran utilidad para valorar la **respuesta al tratamiento** <sup>77,83</sup>. Además, la corta vida media del ctDNA hace que su estudio secuencial proporcione información **a tiempo real** del estado del tumor.

De esta manera, los incrementos sucesivos de las mutaciones de sensibilidad y/o la aparición de mutaciones de resistencia pueden indicar una mala respuesta terapéutica con progresión de la enfermedad <sup>84</sup>. Por el contrario, el descenso de las mutaciones de sensibilidad unido a la ausencia de mutaciones de resistencia puede relacionarse con una buena respuesta terapéutica.

**Figura 11.** Esquema de seguimiento del tratamiento oncológico mediante estudio de ctDNA. Adaptado de Pérez-Barrios C et al. <sup>217</sup>.



En el CPNCP, el estudio secuencial de las mutaciones en el **gen EGFR** permite realizar dos tipos de estudios:

- Monitorizar la respuesta a TKIs y el curso de la enfermedad mediante la evolución de las mutaciones *sensitizing* durante el tratamiento.
- Detectar de forma temprana las resistencias al tratamiento con TKIs, identificando la mutación p.T790M <sup>85, 86, 87</sup>.

#### Selección de tratamientos dirigidos

Muchos de los nuevos agentes terapéuticos para el cáncer de pulmón avanzado requieren para su uso la presencia de biomarcadores. Ante la escasez o ausencia de tejido para la realización de estudios moleculares el estudio del ctDNA puede suponer una alternativa eficaz para la selección de pacientes que pueden beneficiarse de tratamientos específicos. Esto es lo que ocurre con los pacientes con CPNCP que progresan a TKIS de 1<sup>o</sup> y 2<sup>o</sup> generación y que pueden beneficiarse de tratamientos de 3<sup>o</sup> generación ante la presencia de la mutación p.T790M. Por otra parte, la constante disponibilidad de muestra permite la realización de estudios más completos que pueden

facilitar la identificación de alteraciones todavía desconocidas y que pueden ayudar en un futuro a la mejor estratificación y tratamiento de los pacientes.

### Marcador pronóstico

La concentración del ctDNA<sup>88-90</sup> ha demostrado cierta utilidad como predictor de supervivencia. Por otro lado, la detección del ctDNA tras la cirugía también ha demostrado su capacidad para detectar la enfermedad residual<sup>91</sup>. En el CPNCP, esta utilidad clínica es limitada, ya que el estudio de biomarcadores se realiza en pacientes avanzados y por lo tanto no operables.

### Marcador precoz de cáncer

Por último, ciertos autores reivindican la potencial utilidad de esta técnica para el diagnóstico precoz del cáncer mediante la detección de marcadores moleculares<sup>92</sup> en población asintomática. Sin embargo, esta aplicación no está implantada en la actualidad.

### 5.3. Estudio del ctDNA

El análisis del ADN tumoral circulante en el laboratorio plantea ciertos retos que deben tenerse en cuenta durante su realización.

En primer lugar, el ADN tumoral circulante es una molécula que se encuentra en muy bajas concentraciones en la sangre, por lo que requiere de métodos de alta sensibilidad tanto para su detección como para su cuantificación.

En segundo lugar, el ADN de origen tumoral se encuentra “mezclado” con el ADN circulante libre de células sanas en un porcentaje variable, pero por lo general bajo. Esto exige el uso de técnicas moleculares muy sensibles que sean capaces de detectar alteraciones en baja proporción, y muy precisas, para poder detectar pequeños cambios en la concentración de estas mutaciones.

Por último, el ctDNA es una molécula de pequeño tamaño que en muchas ocasiones se **encuentra fragmentada**. Esta fragmentación está relacionada con su mecanismo de liberación a la sangre por las células de origen. En general, existen dos procesos fundamentales por los cuales las células vierten su contenido a la sangre: apoptosis y necrosis. La apoptosis o muerte celular programada produce cuerpos apoptóticos y suele liberar partículas de ADN de unos 166 pb<sup>93</sup>, o múltiplos de estas, en forma de oligonucleosomas. La necrosis por su parte es un proceso de muerte celular que se produce como resultado de un factor externo perjudicial para la célula, como un agente

## C. PÉREZ-BARRIOS

---

infeccioso, un trauma o una inflamación. En este proceso la célula se fragmenta y se produce la liberación de ADN de gran tamaño (>10.000 pb) <sup>94</sup>.

En los pacientes oncológicos es frecuente encontrar ADN circulante de diversa longitud <sup>95</sup>, incluyendo fragmentos de gran tamaño (de más de 10.000 pb), además de un marcado perfil oligonucleosomal. La implicación clínica de esta fragmentación en el estudio de biomarcadores todavía no se conoce, ya que los estudios en este campo son limitados.

### Condiciones preanalíticas del estudio del ctDNA

La principal limitación de esta técnica es la falta de consenso en cuanto las a consideraciones preanalíticas óptimas para su estudio:

- El uso de suero parece producir un aumento de la fracción de ADN no tumoral debido a su liberación por parte de células sanas durante el proceso de coagulación <sup>96</sup>. Por este motivo, en el estudio de biomarcadores es recomendable el uso de plasma ya que permite obtener una mayor proporción de ADN tumoral frente al ADN total durante la extracción.
- Ciertas condiciones preanalíticas como el tiempo máximo de espera entre la extracción de sangre y el análisis, los tiempos de centrifugación o la temperatura de almacenamiento tampoco están estandarizadas, aunque a existen estudios que aportan recomendaciones para preservar la estabilidad de la muestra <sup>97, 98</sup>.
- El método de extracción del ctDNA también es un punto crítico del proceso, existiendo en el mercado numerosos kits comerciales manuales y automatizados <sup>99</sup> que pueden interferir en el resultado final del análisis.
- El método de cuantificación debe ser de alta sensibilidad, lo que limita el uso de métodos espectrofotométricos.
- Por último, deben establecerse unas condiciones rigurosas de trabajo, incluyendo áreas claramente diferenciadas de pre y post PCR, ya que la cantidad de ADN circulante suele ser escasa, por lo que el laboratorio debe optimizar los procesos de obtención, conservación y procesamiento de las muestras.

### Condiciones analíticas

Las consideraciones analíticas de estos estudios tampoco están perfectamente definidas, existiendo en el mercado diferentes tecnologías que permiten realizar el estudio de biomarcadores a partir de ctDNA.

### Tecnologías convencionales

Es importante destacar que la principal utilidad clínica del estudio del ctDNA es la detección de biomarcadores de interés, que por lo general se presentan en una frecuencia alélica baja. La PCR cuantitativa permite realizar este tipo de estudios, pero presenta el inconveniente de que su precisión baja considerablemente a Cts<sup>1</sup> muy elevados, donde se localizan las mutaciones con frecuencias menores del 1%. Esta circunstancia hace que la cuantificación de este ADN de origen tumoral no sea muy precisa y pueda variar de una medición otra, lo que resulta un gran inconveniente para la realización de estos estudios.

### Tecnologías digitales

En los últimos años, se han desarrollado diferentes tecnologías que permiten la detección de mutaciones a muy baja frecuencia, como son los sistemas de PCR digital, que consiguen una sensibilidad de hasta un 0.01%<sup>100</sup>. La principal ventaja que aporta esta técnica es la alta reproducibilidad de los análisis, gracias a la elevada sensibilidad, especificidad y precisión que se consigue al dividir la muestra en múltiples fracciones que se amplifican de manera individual. De este modo, no se requiere de una curva estándar de calibración o de la selección de genes de referencia para su normalización, pues la cuantificación no está basada en valores de Ct. Además, el hecho que cada molécula del ADN molde se amplifique de manera individual, hace que esta técnica sea idónea para la cuantificación de mutaciones a muy bajo nivel, pues no se amplifican preferentemente unas moléculas sobre otras.

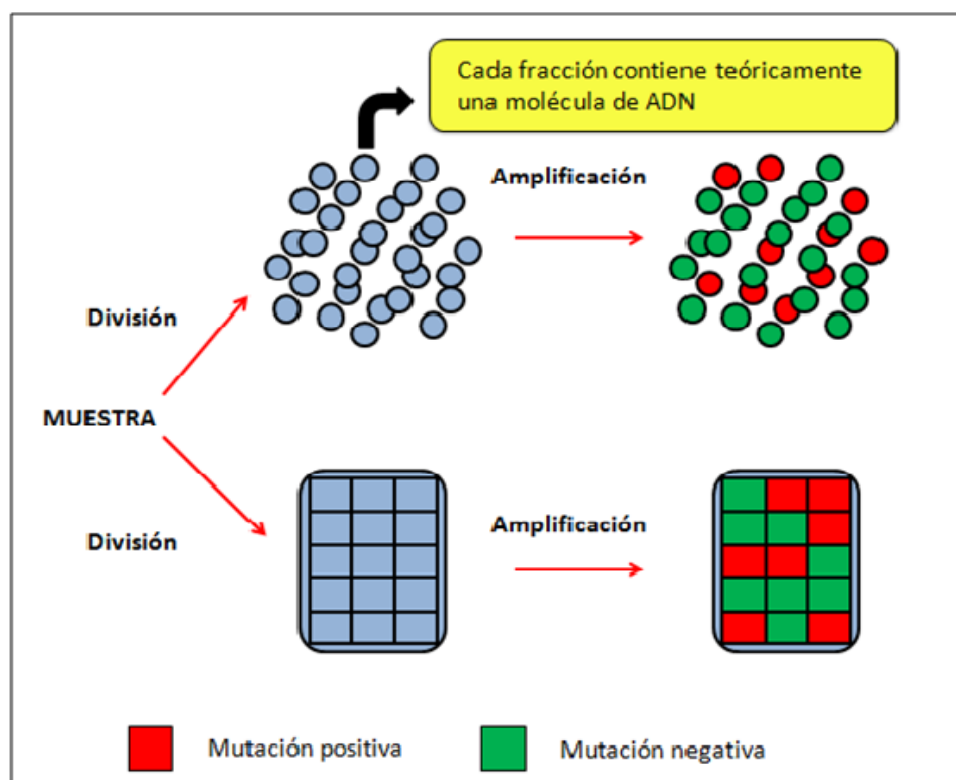
Existen en el mercado dos tipos de PCR digital: “**Droplet digital PCR (ddPCR)**” y “**array-based PCR**”. La diferencia principal entre los dos modelos se debe a la estrategia diseñada para la división de la muestra: Mediante la formación de gotas tipo emulsión, o mediante el uso de chips compuestos por micropocillos.

Ambas estrategias están diseñadas para que en cada fracción de muestra contenga teóricamente de 0 a 2 moléculas de ADN, siguiendo una distribución de Poisson<sup>101</sup>. La amplificación mediante sondas marcadas con diferentes fluorocromos permite contabilizar el número de fracciones positivas y negativas a una mutación y estimar su concentración inicial.

---

<sup>1</sup> *Cycle threshold o ciclo umbral* hace referencia al número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente supere la señal de fondo.

Figura 12. Representación de los dos tipos de PCR digital disponibles en el mercado <sup>217</sup>.



La principal desventaja que presenta esta tecnología es la falta de estandarización para establecer la presencia y la cantidad de mutaciones detectadas <sup>102</sup>. Otra posible limitación es que para trabajar con PCR digital suele ser necesario conocer previamente la mutación por el uso de ensayos específicos. Aun así, este sistema resulta útil en el CPNCP porque permite la monitorización de la mutación identificada en el tumor al inicio del diagnóstico y la aparición de la mutación de resistencia p.T790M.

Dentro de este grupo, existe una tecnología llamada **BEAMing** (beads, emulsion, amplification and magnetics) que combina la PCR en emulsión con perlas magnéticas y citometría de flujo <sup>103</sup>. La elevada sensibilidad de esta técnica se consigue fraccionando la muestra al unir cada amplicón de forma específica a una bola magnética dentro de una microgota de aceite en emulsión. Cada gota se amplifica de forma individual aumentando la señal del amplicón inicial y tras su separación magnética se marca de forma diferencial para la mutación de interés utilizando sondas fluorescentes mediante hibridación. La señal se detecta y cuantifica mediante citometría. Pese a los buenos resultados de esta tecnología, su elevado coste y los exigentes requerimientos en cuanto a instalaciones y personal dificultan su implantación en la rutina clínica diaria.

### Tecnologías con marcado IVD

Existen en el mercado diferentes kits con certificado IVD de producto sanitario para el estudio de biomarcadores en CPNCP. El kit cobas® *EGFR* Mutation Test v2 (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA, USA) y el kit *therascreen EGFR* RGQ PCR (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) permiten la detección de 41 y 21 mutaciones respectivamente en el gen *EGFR*, incluyendo deleciones, inserciones y cambios puntuales entre los exones 18 y 21 del gen. Kenneth S. Thress et al.<sup>104</sup> publicaron un estudio comparando estas dos plataformas con los métodos digitales ddPCR (ddPCR™; Bio-Rad/MolecularMD, Hercules, CA, USA) y BEAMing dPCR (Sysmex Inostics, Inc., Mundelein, IL, USA) demostrando una mayor capacidad de detección de la mutación p.T790M por estas plataformas digitales, con concordancias del 74% y el 70% con el tejido respectivamente. Además, los autores resaltan la capacidad de los métodos digitales en la cuantificación de las mutaciones, lo que aporta información extra a las plataformas no digitales. Sin embargo, este mismo estudio demuestra también la utilidad de los sistemas cobas® *EGFR* Mutation Test v2 la y BEAMing dPCR en la detección de esta mutación de resistencia con una elevada sensibilidad (73–81%) y adecuada especificidad (58–67%).

### Tecnologías NGS

Existen otras tecnologías aplicadas a biopsia que permiten un estudio más completo del ctDNA. Este es el caso de la secuenciación masiva, que presenta la ventaja de que permite identificar multitud de variaciones simultáneamente de forma no invasiva. El límite de detección de esta técnica es del 2%<sup>105</sup> lo que no resulta adecuado para este tipo de estudios. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado variantes de esta técnica de alta sensibilidad como la tecnología Digital Sequencing™ que permite reducir el límite de detección hasta valores de 0,1% (con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 99.6%)<sup>106</sup>.

El correcto manejo de estas técnicas de análisis de ctDNA y su implantación en los laboratorios clínicos puede suponer un cambio radical en el manejo de los pacientes con CPNCP, al permitir un seguimiento estrecho de la respuesta al tratamiento, la identificación temprana de resistencias y toxicidades o incluso de nuevos mecanismos implicados en el desarrollo del cáncer. Sin embargo, la falta de consenso en su análisis es todavía un problema importante.

## 6. Evaluación de la respuesta al tratamiento con terapias dirigidas

La evaluación de la respuesta al tratamiento se lleva a cabo valorando los cambios en el tamaño de las lesiones tumorales. Tanto la medida inicial de las lesiones como las sucesivas deben realizarse de acuerdo a los criterios RECIST v1.1 <sup>107</sup> que establecen 4 niveles de respuesta para las lesiones diana (aquellas que pueden medirse con una sensibilidad suficiente como para valorar los cambios en su tamaño). El resto de las lesiones deben ser valoradas según su presencia o ausencia siguiendo una clasificación similar.

**Tabla 5.** Criterios de respuesta según los criterios RECIST v1.1. en el CPNCP en lesiones diana. Adaptado de Eisenhauer et al <sup>107</sup>.

Criterios de respuesta para las lesiones diana	
<b>Respuesta completa (CR)</b>	Desaparición de todas las lesiones diana. Cualquier ganglio linfático patológico debe tener una reducción en el eje corto a <10 mm.
<b>Respuesta parcial (PR)</b>	Al menos un 30% de disminución en la suma de diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia los diámetros de la suma basal.
<b>Enfermedad estable (SD)</b>	Ni suficiente retracción para calificar para PR ni aumento suficiente para calificar para PD, tomando como referencia los diámetros más pequeños de la suma durante el estudio.
<b>Enfermedad progresiva (PD)</b>	Aumento de al menos un 20% en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia la suma más pequeña del estudio.
	También debe demostrar un aumento absoluto de al menos 5 mm.
	La aparición de una o más lesiones nuevas también se considera progresión.

El tamaño de las lesiones debe evaluarse en periodos de 6 a 9 semanas (2 o 3 ciclos en el caso de quimioterapia) utilizando la misma técnica con la que se identificaron las lesiones iniciales. El PET no suele recomendarse en estudios rutinarios debido a su elevada sensibilidad y su baja especificidad.

Además, la detección de mutaciones de resistencia a fármacos como la mutación p.T790M puede proporcionar información complementaria a la imagen sobre la progresión de la enfermedad y la necesidad de un cambio en la línea de tratamiento.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





### 1. Hipótesis

La detección y cuantificación de mutaciones somáticas en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante puede resultar de utilidad para monitorizar la respuesta al tratamiento con TKIs en pacientes con cáncer de pulmón no célula pequeña.

Las condiciones preanalíticas, así como la metodología seleccionada para llevar a cabo su análisis son factores fundamentales que pueden afectar a los resultados obtenidos y que deben valorarse con precaución antes de comenzar el estudio.

### 2. Objetivos

1. Establecer las condiciones preanalíticas y analíticas adecuadas para el estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado.
2. Realizar la validación clínica del estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante para la monitorización del tratamiento de pacientes con CPNCP avanzado.
3. Valorar la utilidad de los líquidos biológicos para el estudio de mutaciones somáticas en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante libre.
4. Evaluar la utilidad de un método de secuenciación masiva para el análisis de mutaciones somáticas en ADN tumoral circulante en pacientes con CPNCP y su correlación con la PCR digital.





# MATERIAL Y MÉTODOS





## 1. Tipo de estudio y diseño experimental

Este estudio forma parte del Proyecto de Investigación: “**Personalized Medicine in Oncology: researching a model capable of improving and predicting the result treatment based in molecular mechanisms, tumor biology, images, IT, and murine model**”. PIE14/00064. Es un estudio observacional, de carácter prospectivo basado en el análisis en sangre de mutaciones somáticas específicas de tumor (gen *EGFR*) de una cohorte de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico avanzado (estadio IV) en tratamiento con TKIs. La implantación de las condiciones preanalíticas, analíticas, así como de los sistemas de calidad, forman parte de este trabajo.

Adicionalmente, se llevó a cabo el estudio de validación de un método de secuenciación masiva para el análisis de mutaciones en ADN tumoral circulante en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

### 1.1. Características de los pacientes

Los pacientes fueron seleccionados de forma previa en la consulta de Oncología Médica del Hospital Puerta de Hierro (Majadahonda), según los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

#### **Criterios de inclusión.**

- Pacientes con CPNCP histológicamente confirmado en tratamiento con inhibidores de tirosina kinasa. (1<sup>o</sup> y 2<sup>o</sup> generación).
- Estudio mutacional del gen *EGFR* en el tumor.
- Estadio IV.
- Edad > 18 años
- Estado funcional de 0-1.
- Adecuada función respiratoria, hepática, cardíaca y renal.
- Consentimiento informado por escrito de acuerdo con la normativa vigente.

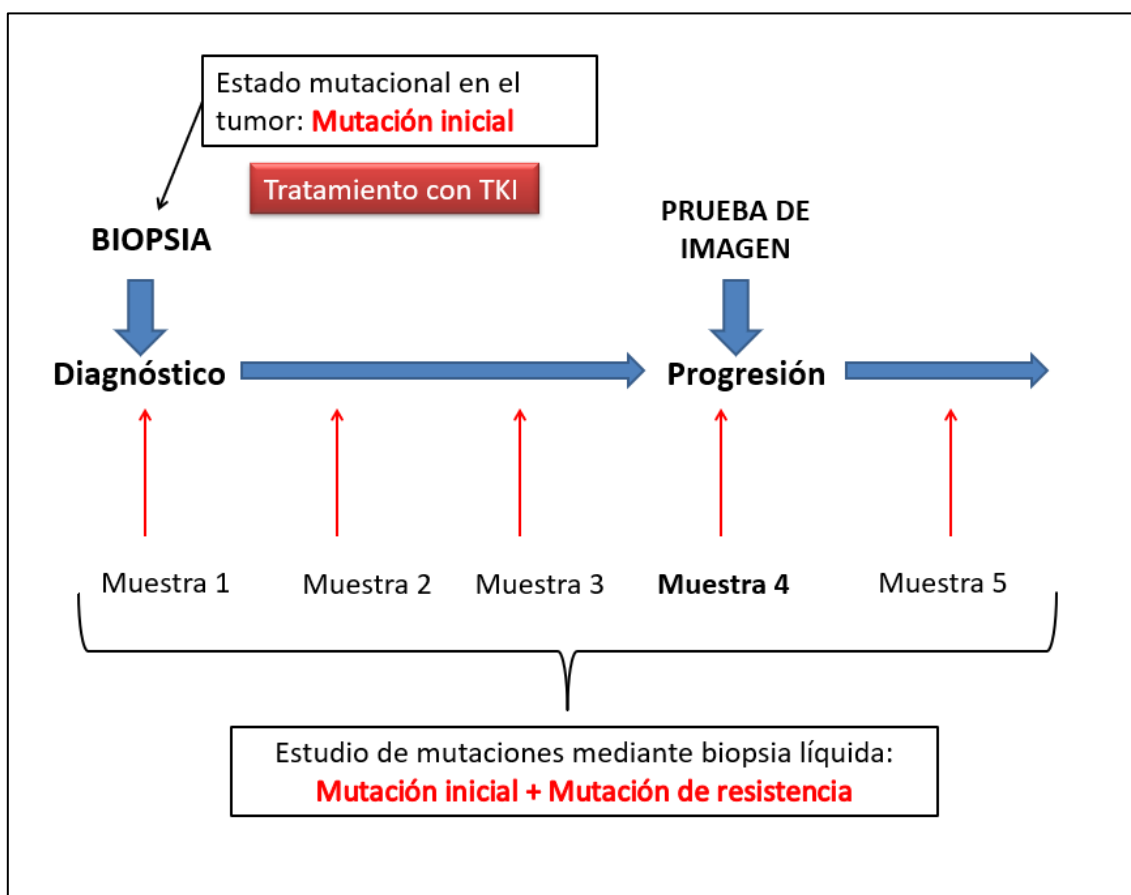
#### **Criterios de exclusión.**

- No disponer de consentimiento informado.
- No disponer de informe de anatomía patológica donde se refleje el estudio mutacional del gen *EGFR*.
- Imposibilidad de venopunción.

Las muestras de sangre fueron extraídas en la consulta de Oncología Médica y enviadas al laboratorio de Biopsia Líquida del Hospital Puerta de Hierro en las siguientes condiciones:

- En el momento del diagnóstico.
- En las consultas de revisión y reevaluación.
- En los casos en los que el Oncólogo consideró necesario evaluar la situación clínica del paciente o eventos relacionados con la toxicidad al fármaco, realizar pruebas adicionales de imagen o reducir la dosis del TKI.

Figura 13. Diseño del estudio



Los datos demográficos, clínico-patológicos, el estado mutacional del tumor, así como el estado funcional de los pacientes fueron obtenidos de los informes médicos. El ajuste de dosis y el cambio de medicación fueron documentados a lo largo del estudio.

El estudio fue aprobado por el Comité de ética del Hospital Universitario Puerta de Hierro (códigos internos PI: 144/14 y PI: 68/16) y fue llevado a cabo según lo establecido en la Declaración de Helsinki.

## 2. Obtención de las muestras

### 2.1. Características de las muestras

Las muestras utilizadas en el estudio fueron muestras de sangre extraídas en tubos con anticoagulante (EDTA) y con gel separador **PTT EDTA K2** (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) para evitar la liberación de ADN células sanguíneas durante el proceso de coagulación <sup>98</sup>.

La extracción de sangre se realizó en la consulta de enfermería del Hospital Puerta de Hierro. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biopsia Líquida y centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos en un tiempo no superior a 4 horas tras la extracción para minimizar la degradación celular. El plasma extraído y separado se conservó a -20°C hasta el día de la extracción del cfDNA. Los plasmas hemolizados fueron descartados del estudio.

En los casos que fue posible se extrajo de forma adicional a la sangre una muestra del líquido biológico de interés (pleural, pericárdico o cefalorraquídeo), en función de la clínica del paciente. Estos líquidos fueron procesados de forma similar a la sangre.

### 2.2. Extracción del ADN circulante

El día de la extracción del ADN circulante, las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 5000 rpm durante 20 minutos para eliminar los restos celulares y elementos en suspensión. El volumen de plasma resultante se anotó en una base de datos para valorar el número de extracciones posibles por muestra.

#### 2.2.1. Selección del método de extracción

Para seleccionar el método de extracción de cfDNA más adecuado a las necesidades del laboratorio se realizó una comparación entre 3 métodos de extracción diferentes: un kit manual ampliamente utilizado **QIAamp Circulating Nucleid Acid** (QIAGEN, Valencia, CA, USA) y los kits automatizados **MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation** (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) y **Maxwell® RSC ccfDNA Plasma** (Promega Corporation, Madison, WI, USA) según se especifica en sus respectivos manuales de instrucciones. En los tres métodos se utilizó un volumen de muestra de 1ml y un volumen final de elución de 50 µl.

#### 2.2.2. Extracción mediante el sistema Maxwell® RSC ccfDNA Plasma

Finalmente, para la extracción del cfDNA se utilizó kit **Maxwell® RSC ccfDNA Plasma** en el sistema automatizado Maxwell® RSC Instrument de Promega (Promega

Corporation, Madison, WI, USA) mediante el programa “1ml cell free DNA custom” según se especifica en el manual de instrucciones.

En las muestras cuyo volumen de plasma era superior a 2 ml se realizó una extracción múltiple con el fin de concentrar el ADN circulante. Por cada nueva extracción se añadió al tubo de elución 25  $\mu$ l extra de buffer de elución para compensar la pérdida de volumen por evaporación.

Una vez extraído el cfDNA de cada muestra, este se cuantificó para comprobar el rendimiento de la extracción.

### 2.3. Cuantificación del cfDNA

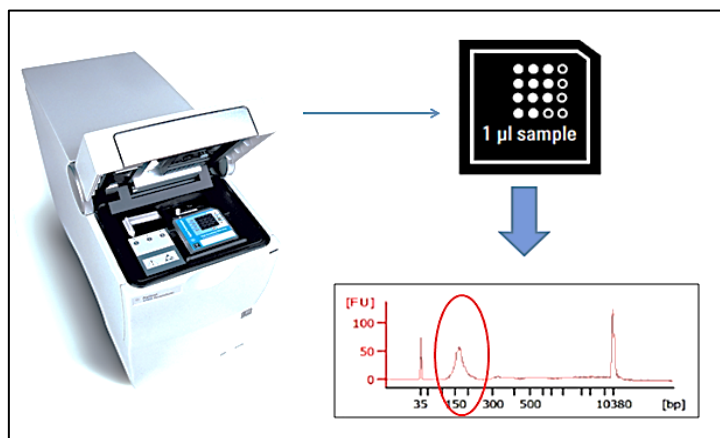
La cuantificación se llevó a cabo mediante el sistema **Quantus™ Fluorometer, Promega** (Promega Corporation, Madison, WI, USA) utilizando el kit de alta sensibilidad QuantiFluor® dsDNA System, que permite un rango de medida del ADN de 0,01 a 200 ng/ $\mu$ l. Este sistema calcula la concentración de cada muestra comparando la fluorescencia obtenida a 504nm/531nm con la de una curva patrón a dos puntos. Para ello, el kit incorpora un ADN de concentración conocida (Lambda DNA Standard).

La cuantificación del cfDNA se realizó en tandas de 2 a 8 muestras utilizando en cada tanda un control positivo de concentración conocida. Para cada muestra (1 $\mu$ L) se añadieron 99 $\mu$ L de tampón TE 1x y 100  $\mu$ L de Working Solution.

Todas las mediciones se realizaron en el programa dsDNA para 1 $\mu$ l de muestra.

### 2.4. Calidad de la extracción de cfDNA

**Figura 14.** Esquema del sistema Bioanalyzer 2100 y perfil electroforético típico del cfDNA.



Adicionalmente, se comprobó la calidad de los tres métodos de extracción comparados mediante el sistema de electroforesis en microfluído **Agilent 2100 Bioanalyzer** (Agilenttechnologies Inc., Palo Alto, CA, USA) y los Chips High Sensitivity DNA, que se utilizaron según las especificaciones del manual de usuario.

Este kit de alta sensibilidad permite visualizar el perfil de los fragmentos de ADN comprendidos entre 50-7000 pb, lo que resulta idóneo para comprobar la presencia de cfDNA, ya que presenta una fracción mayoritaria entre 150-180 pb. Además, el software incorporado permite realizar la integración de los picos de interés de forma manual, lo que hace posible comparar los resultados obtenidos en cada extracción.

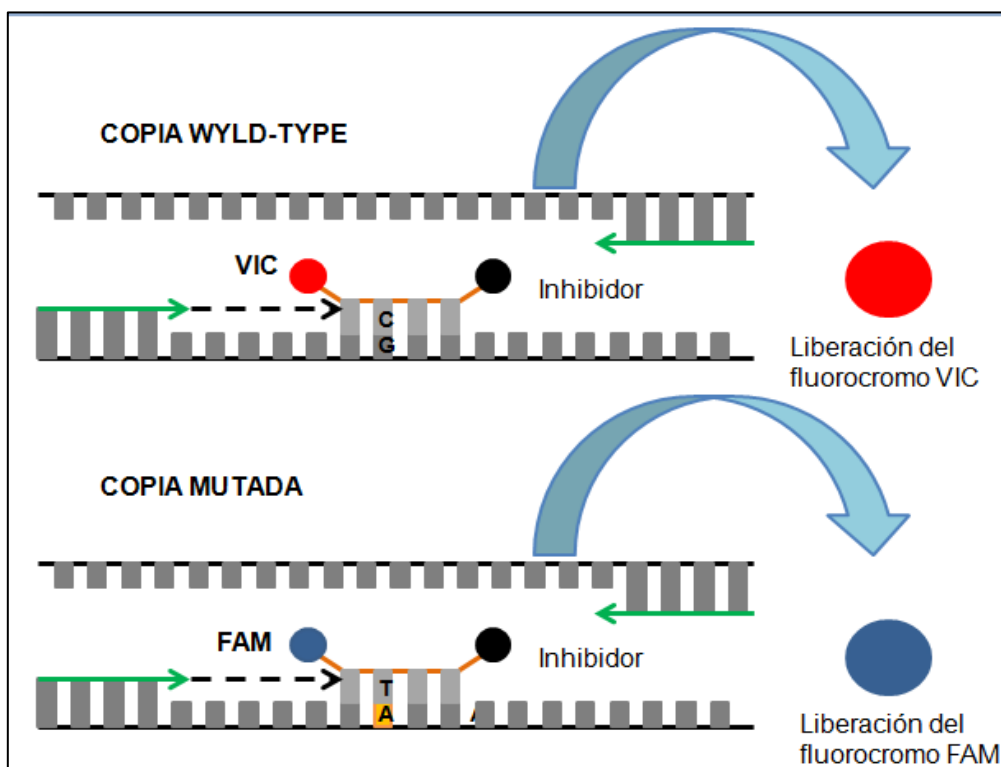
### 3. Análisis de mutaciones en el gen *EGFR*

Las muestras de ADN circulante libre fueron analizadas mediante el **Ensayo Rare Mutation de Quant Studio 3D Digital PCR System** (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).

En cada muestra se analizaron dos mutaciones en el gen *EGFR*: la mutación de sensibilidad a TKIs, identificada previamente en el bloque tumoral de parafina, y la mutación de resistencia p.T790M.

Todas las mutaciones se analizaron mediante ensayos Taqman comerciales para PCR digital. Estos ensayos incluyen primers específicos, que permiten amplificar la región de interés, y una sonda marcada específica de la secuencia objetivo. De esta forma, la liberación de la sonda fluorescente indica amplificación y la señal fluorescente identifica la hebra amplificada. En todos los ensayos, la sonda complementaria al cfDNA mutado se marcó con el fluorocromo FAM y la complementaria al cfDNA wyld-type se marcó con el fluorocromo VIC.

**Figura 15.** Esquema del ensayo Taqman utilizado durante el estudio.



Los ensayos utilizados para la detección de mutaciones de sensibilidad y resistencia en *EGFR* utilizados en el estudio se detallan a continuación (**tablas 6 y 7**).

**Tabla 6.** Mutaciones activadoras o de sensibilidad a TKIs en el gen *EGFR* analizadas durante el estudio.

Exón EGFR	Nombre del ensayo	Cambio de aminoácido	Cambio de nucleótido
18	AHABH29	p.G719A	c.2156G>C
	AH0JEWK	p.G719C	c.2155G>T
	AHZAGP4	p.G719S	c.2155G>A
19	AHFA92K	p.L747_T751>P	c.2239_2251>C
	AHS1PY0	p.L747_A750>P	c.2238_2248>GC
	AHHS6E0	p.E746_T751>A	c.2237_2251del15
	AHLJ0XO	p.E746_A750delELREA	c.2235_2249del15
	AHCTDP3	p.L747_T751delLREAT	c.2239_2253del15
	AHGJ78R	p.L747_S752delLREATS	c.2239_2256del1
20	AH5I7PA	p.H773_V774insH	c.2319_2320insCAC
	AH7031Q	p.H770_V771insG	c.2310_2311insGGT
21	AHRSRSV	p.L858R	c.2573T>G

**Tabla 7.** Mutación de resistencia a TKIs en el gen *EGFR* analizada durante el estudio.

Exón EGFR	Nombre del ensayo	Cambio de aminoácido	Cambio de nucleótido
20	AHRSROS	p.T790M	c.2369C>T

### 3.1. Condiciones de la PCR digital

Las cantidades de cada componente de la mezcla de reacción se ajustaron para obtener un volumen final de 18 µL y una concentración final de ensayo Taqman 1x.

**Tabla 8.** Componentes de la mezcla de reacción de la PCR digital.

Condiciones de reacción para ensayos 40X. Vf= 18 µL	
Assay solution 40X	0.45 µL
QuantStudio® 3D Digital PCR Master Mix	9 µL
Muestra (cfDNA)	8,55 µL

La mezcla de reacción incluía el ensayo Taqman marcado en VIC y FAM y una máster mix que contenía todos los reactivos necesarios para la amplificación: dNTPs, buffer, enzima polimerasa y marcador ROX, que se utiliza como señal de referencia en los ensayos Taqman.

La cantidad de ADN de partida suele ser un parámetro importante en el uso de PCR digital, ya que es una técnica que se fundamenta en la partición de la muestra en

fracciones individuales de 1 molécula. Cuando se utiliza ADN germinal, es necesario calcular la cantidad de muestra que se debe incorporar para que estas condiciones se cumplan. Sin embargo, en biopsia líquida, la cantidad de cfDNA es tan escasa que las condiciones se cumplen sin necesidad de diluir la muestra, por lo que no se realizaron cálculos adicionales.

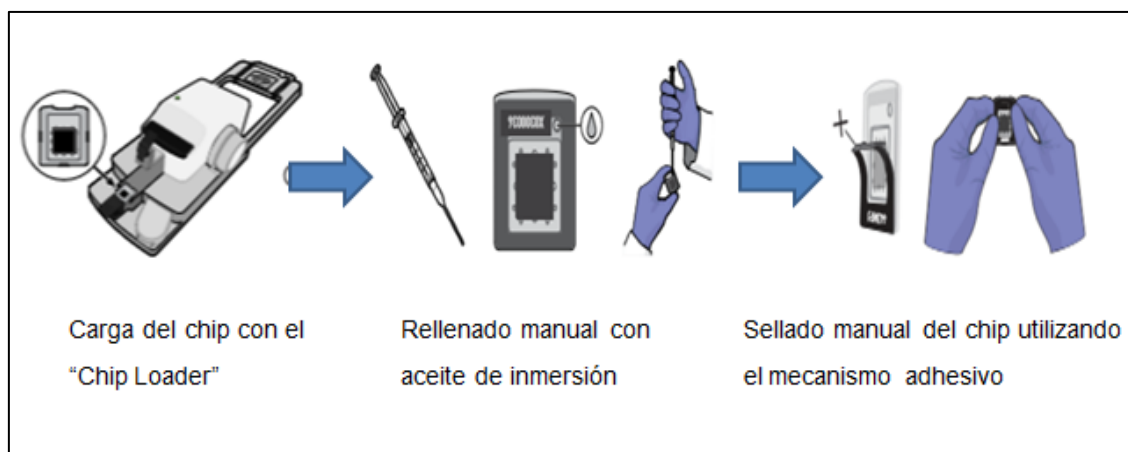
### 3.2. Procedimiento de análisis

El equipo de PCR digital de Thermo Fisher (**Quant Studio 3D Digital PCR System**) es un sistema “array-based PCR”, en el que la muestra se divide mediante el uso de chips compuestos por micropocillos. El modelo de los chips utilizados en el estudio fue **QuantStudio 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2**, compuesto por 20.000 micropocillos en los que se produce la amplificación de cada molécula de cfDNA de forma independiente. Esta tecnología permite detectar moléculas mutadas en una proporción cercana al 0,1%.

Después de realizar la mezcla de la reacción, los chips se cargaron con 14,5  $\mu\text{L}$  utilizando el equipo **QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader**, que distribuye la muestra de forma homogénea a lo largo del chip. De esta forma se consigue que en cada pocillo de reacción se introduzcan teóricamente 1 o ninguna molécula de cfDNA.

Una vez cargados, los chips fueron rellenados manualmente con aceite de inmersión y sellados para evitar la pérdida de muestra por evaporación y su contaminación.

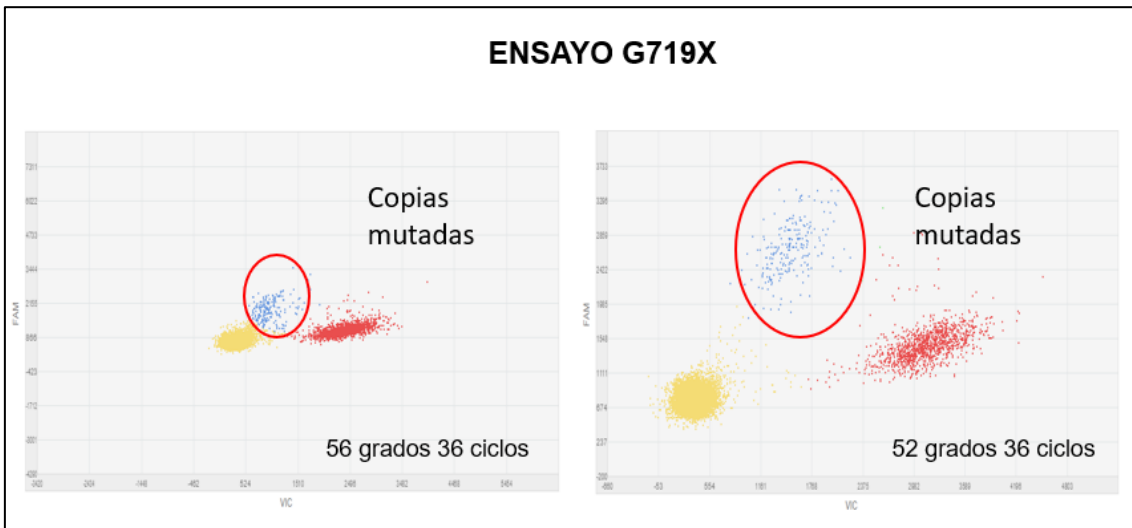
**Figura 16.** Esquema de preparación de las muestras para PCR digital. Fuente: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)



La reacción de amplificación de todas las muestras se llevó a cabo en el equipo **ProFlex™ PCR system** de la misma casa comercial que el resto de los componentes.

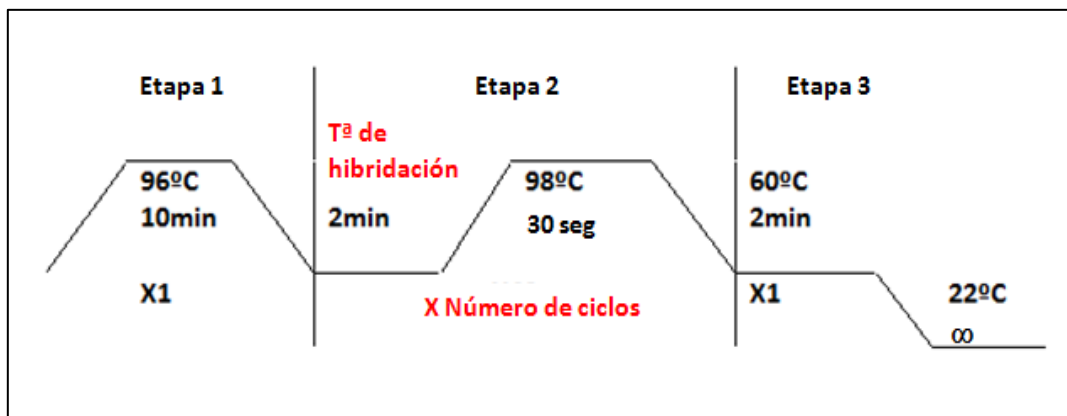
Las condiciones de temperatura de hibridación y número de ciclos se ajustaron para cada ensayo de forma que la separación de los clusters fuera óptima para su correcta identificación.

**Figura 17.** Diagrama de dispersión para una muestra control del ensayo G719X en función de la temperatura de hibridación.



El resto de los parámetros de la PCR se mantuvieron constantes para todos los ensayos según el siguiente diagrama:

**Figura 18.** Esquema general de condiciones de reacción utilizadas en el estudio.



Las condiciones específicas de cada ensayo se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 9.** Condiciones específicas de cada ensayo.

Nombre del ensayo	Cambio de aminoácido	Cambio de nucleótido	Tª de hibridación	Nº de ciclos
AHABH29	p.G719A	c.2156G>C	56	40
AH0JEWK	p.G719C	c.2155G>T	56	40
AHZAGP4	p.G719S	c.2155G>A	56	40
AHFA92K	p.L747_T751>P	c.2239_2251>C	56	40
AHS1PY0	p.L747_A750>P	c.2238_2248>GC	56	40
AHHS6E0	p.E746_T751>A	c.2237_2251del15	56	40
AHLJ0XO	p.E746_A750delELREA	c.2235_2249del15	56	40
AHCTDP3	p.L747_T751delLREAT	c.2239_2253del15	56	40
AHGJ78R	p.L747_S752delLREATS	c.2239_2256del1	56	40
AH5I7PA	p.H773_V774insH	c.2319_2320insCAC	56	40
AH7031Q	p.H770_V771insG	c.2310_2311insGGT	58	40
AHRSRSV	p.L858R	c.2573T>G	56	36
AHRSROS	p.T790M	c.2369C>T	56	40

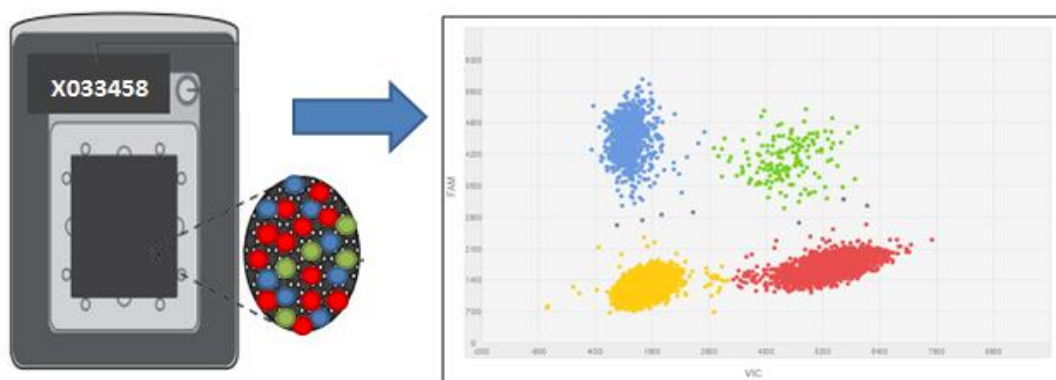
Para verificar la reacción y detectar posibles contaminaciones se introdujeron controles positivos y negativos para cada ensayo a lo largo del estudio.

Una vez finalizado el programa de amplificación específico, cada chip se introdujo por duplicado en el lector de fluorescencia **QuantStudio® 3D Digital PCR Instrument**, que es capaz de discriminar en cada pocillo de muestra la fluorescencia de VIC y FAM. Esta lectura proporciona el dato bruto de la muestra que se fue almacenado en forma de archivos.eds.

### 3.3 Visualización de los resultados

Los archivos fueron subidos a la plataforma **QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software**. Esta herramienta permite visualizar los datos de fluorescencia obtenidos, que son representados en un diagrama de dispersión. En el eje de abscisas se representa la fluorescencia en VIC (copias wild-type) y el eje de ordenadas la fluorescencia en FAM (copias mutadas). Además, el software permite el ajuste manual de los clusters y su asignación a los siguientes grupos: grupo VIC (color rojo), grupo FAM (color azul), grupo VIC+FAM (color verde), grupo de pocillos sin amplificación (*color amarillo*).

**Figura 19.** Representación gráfica de los resultados de un ensayo. Los puntos azules corresponden a los pocillos en los que se ha amplificado una molécula con la mutación específica del ensayo, los verdes a aquellos en los que se han amplificado simultáneamente copias mutadas y una *wyld-type* y los puntos rojos corresponden a los pocillos con moléculas *wyld-type*. En amarillo se representan los pocillos en los que no se detecta fluorescencia, y por lo tanto no se ha producido la amplificación.



En todas las muestras se revisaron criterios de calidad, así como el porcentaje de puntos que presentaban una lectura aceptable o la calidad de la lectura que se simboliza en el software con una bandera. Aquellas muestras de tandas en las que el control positivo o negativo no cumplió los criterios de calidad establecidos fueron repetidas.

Una vez verificada la calidad de la lectura, el resultado de los chips se revisó y ajustó manualmente y se realizaron dos tipos de análisis:

1. Un *análisis cualitativo* para establecer la presencia o ausencia de las mutaciones.
2. *Análisis cuantitativo* en todas las mutaciones para detectar la evolución a lo largo del tiempo.

### 3.4. Análisis cuantitativo

#### 3.4.1. Concentración relativa de mutación:

El resultado de todas las mutaciones se expresó como porcentaje de copias de ADN mutado en copias totales (mutadas y no mutadas) o “mutant allele frequency” (MAF).

Para realizar este cálculo, el software **QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud** transforma los datos de fluorescencia de VIC y en FAM en copias de ADN por microlitro y realiza un ajuste matemático asumiendo una distribución de Poisson. Esto permite corregir el error de cálculo producido por aquellos pocillos con más de una molécula.

## C. PÉREZ-BARRIOS

---

Todos los chips se leyeron por duplicado, para obtener la media, la precisión y el intervalo de confianza para cada sonda. Las lecturas de mala calidad fueron omitidas.

El MAF se calculó de con la siguiente fórmula:

$$\text{MAF} = \frac{\text{Copias}/\mu\text{L FAM}}{(\text{Copias} /\mu\text{L VIC}+ \text{Copias}/ \mu\text{L FAM})} \times 100$$

Se consideró un resultado positivo en los casos en los que el MAF superaba el LOD del ensayo (0.1%).

### 3.4.2. Concentración absoluta de mutación

El resultado de cada mutación también se expresó como **copias de ADN mutado por ml plasma extraído**. Esto se realizó mediante la fórmula:

Copias mutadas/ml =

$$\left[ \frac{\left( \frac{\text{Copias}_{\text{FAM}}}{\mu\text{l}} \times \text{Volumen de reacción } (\mu\text{l}) \right)}{\text{Volumen de muestra introducido } (\mu\text{l})} \times \text{volumen de elución de la muestra } (\mu\text{l}) \right] \times 1 \text{ ml} \\ \text{Volumen de plasma extraído (ml)}$$

Siendo:

- Volumen de muestra introducido o volumen inicial (Vi)= 8,55  $\mu\text{L}$
- Volumen de reacción o volumen final (Vf) = 14,5  $\mu\text{L}$
- Volumen de elución= 50  $\mu\text{L}$  en extracciones simples y 25  $\mu\text{L}$  adicionales por cada nueva extracción en extracciones múltiples.
- Volumen de plasma extraído= Variable en función del volumen de plasma.

## 4. Evaluación de un método de secuenciación masiva de ctDNA

Adicionalmente al estudio de mutaciones en el gen *EGFR* por PCR digital, se llevó a cabo un estudio para valorar la utilidad del kit de secuenciación masiva **Oncomine™ Lung cfDNA Assay** (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).

### 4.1. Procedimiento

#### 4.1.1. Selección de las muestras

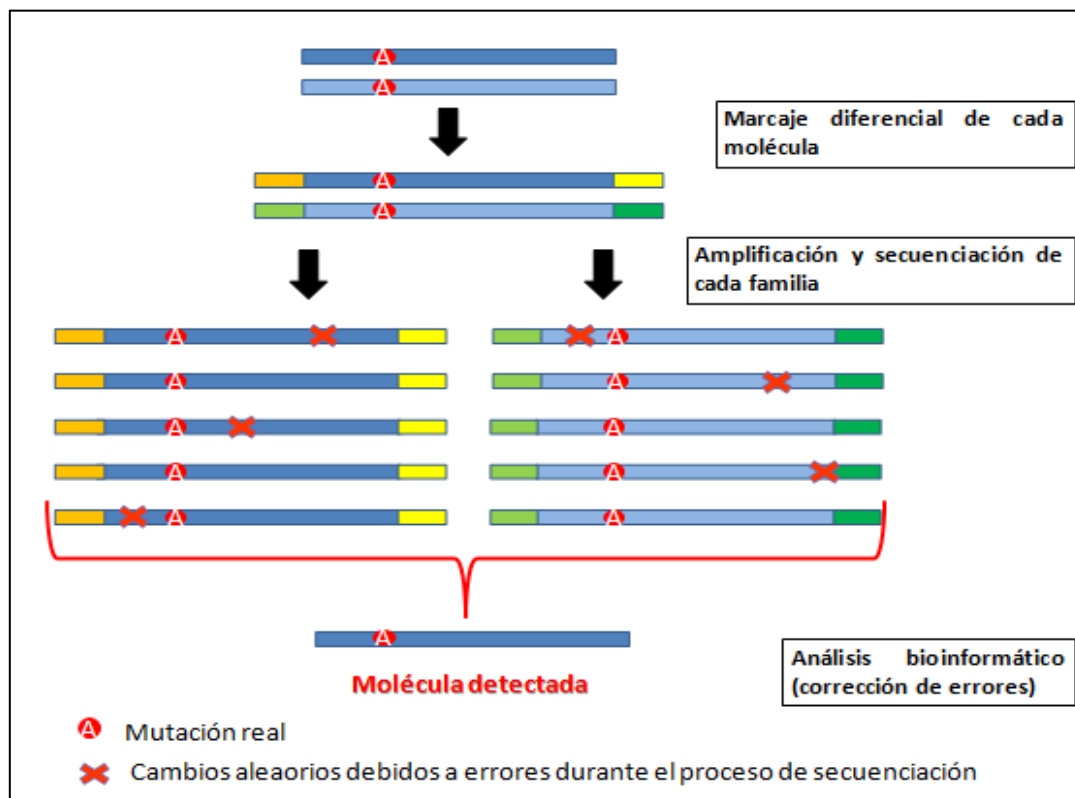
Para realizar el estudio, se seleccionaron 52 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico: 16 con estadio III y 36 con estadio IV o metastásico. De forma adicional, se seleccionaron 2 controles sanos como control negativo.

#### 4.1.2. Tecnología de secuenciación masiva

El kit de secuenciación masiva **Oncomine™ Lung cfDNA Assay** permite detectar más de 150 hotspots (Anexo x) en 11 genes relacionados con cáncer de pulmón (*ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *ROS1* y *TP53*) a partir de muestras de plasma.

Este sistema es capaz de amplificar diferentes regiones de interés mediante PCR multiplex, que posteriormente pueden ser secuenciadas en un secuenciador masivo **Ion S5 System** (Thermo Fisher Scientific). La principal ventaja de este kit es que permite eliminar el error acumulado durante la amplificación y la secuenciación, proporcionando a la técnica una sensibilidad del 0,1% (MAF). Esto se debe a su tecnología, basada en el marcaje diferencial de los amplicones procedentes de una misma molécula de ADN, creando familias de moléculas (molecular barcoding). De esta forma, el análisis bioinformático es capaz de identificar las variaciones reales en muy baja frecuencia alélica, que serán aquellas que aparecen en varias familias de moléculas. Por el contrario, las variaciones que procedan de una misma familia serán consideradas como falsos positivos.

**Figura 20.** Esquema de la tecnología de secuenciación masiva del kit Oncomine lung cfDNA assay. Adaptado de [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).



La tecnología de secuenciación de **Ion Torrent™** utiliza partículas recubiertas por fragmentos de ADN que se secuencian en un chip formado por pocillos individuales. Cada partícula presenta en su superficie las copias de un mismo fragmento, lo que permite amplificar la señal. Los pocillos son impregnados con una solución que presenta uno de los 4 nucleótidos que forman el ADN. A medida que se incorpora el nucleótido correspondiente a la secuencia del ADN unido a la partícula, se libera un protón, que modifica el PH de la solución que envuelve a la partícula, convirtiendo la señal en voltaje. Este cambio de voltaje es registrado y transformado en el nucleótido correspondiente.

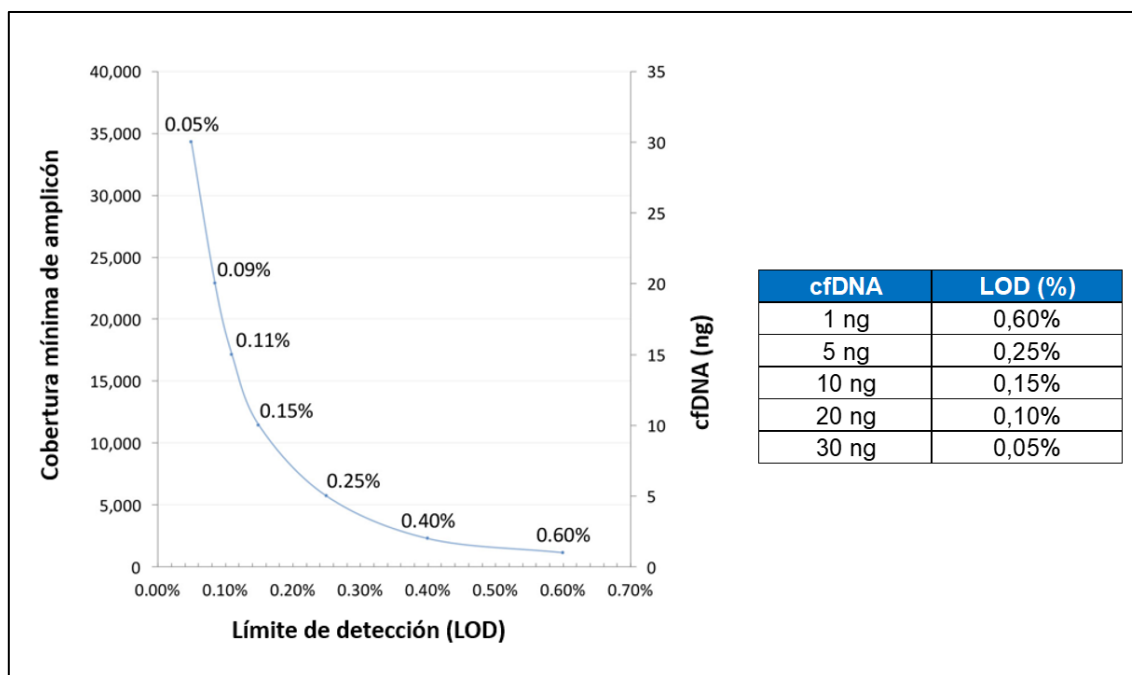
#### 4.1.3. Extracción, cuantificación y preparación de las muestras

La extracción del cfDNA se llevó a cabo mediante el kit **Maxwell® RSC ccfDNA Plasma**, tal y como se describe en el manual de instrucciones. La concentración de cada muestra se cuantificó utilizando el kit **QuantiFluor® dsDNA System** en un sistema **Quantus Fluorimeter** (Promega) de forma similar a la descrita con anterioridad.

Para la preparación de las librerías de secuenciación masiva se calculó el volumen necesario de cada muestra (máximo 13 µL) para alcanzar 20 ng, que se considera la

cantidad óptima de cfDNA de partida. En muestras con baja concentración se añadió el volumen máximo disponible (hasta 13 µL) y se anotó la cantidad real introducida.

**Figura 21.** Relación entre la cantidad de cfDNA introducida en la preparación de la librería (ng) y el límite de detección alcanzado (%). Adaptado de [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).



#### 4.1.4. Preparación de las librerías

Una vez seleccionadas y preparadas las muestras de cfDNA, se llevó a cabo la preparación de las librerías **Oncomine™ Lung cfDNA Assay** según se especifica en el manual de instrucciones.

El proceso para la preparación de las librerías consta de los siguientes pasos:

1. Amplificación de las regiones diana del cfDNA (target amplification).
2. Purificación de los amplicones.
3. Amplificación de las librerías previamente obtenidas para la unión de marcadores o “barcodes” específicos para cada paciente.
4. Purificación de las librerías marcadas.
5. Selección por tamaño de las librerías.

Las condiciones para cada una de las dos amplificaciones se detallan a continuación:

**Figura 22.** Condiciones de amplificación para la preparación de las librerías con el kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay.

<u>Primera amplificación (paso 1):</u>	
Temperatura	Tiempo
98°C	2 minutos
98°C	30 segundos
64°C	2 minutos
62°C	2 minutos
60°C	4 minutos
58°C	2 minutos
72°C	30 segundos
72°C	2 minutos
4°C	Infinito

} 2 ciclos

<u>Segunda amplificación (paso 3):</u>	
Temperatura	Tiempo
98°C	2 minutos
98°C	15 segundos
64°C	15 segundos
72°C	15 segundos
72°C	5 minutos
4°C	Infinito

} 18 ciclos

Para la purificación y la selección de tamaños se utilizó un sistema de bolas magnéticas **Agencourt™ AMPure™ XP**. El volumen de reactivo se ajustó para cada muestra según el manual de instrucciones.

Una vez purificada las librerías fueron resuspendidas en 28µL de agua tipo I.

#### 4.1.2. Cuantificación de las librerías y preparación del pool final

La calidad de las librerías obtenidas se verificó utilizando el sistema de PCR cuantitativa qPCR **StepOnePlus™** (Applied Biosystems), con el kit **Ion Library TaqMan® Quantitation** (Thermo Fisher Scientific). Este kit permite calcular la concentración de ADN introducido mediante la medición de la fluorescencia emitida (FAM) por el producto de la amplificación a tiempo real. Esta fluorescencia (expresada matemáticamente como CT o ciclo umbral) se compara con la fluorescencia de una curva patrón obtenida a partir de 5 puntos de concentración de ADN conocida.

Solución 1=6.8pM

Solución 2=0.68pM

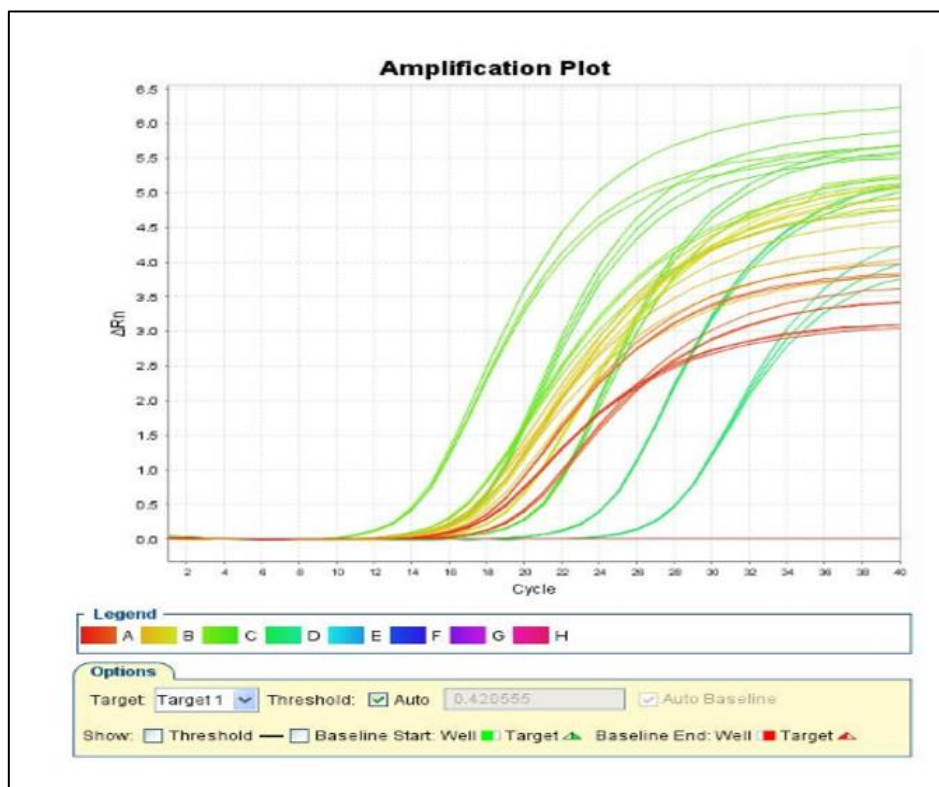
Solución 3=0.068pM

Solución 4=0.0068pM

Solución 5=0.00068pM

Blanco= Agua tipo I

**Figura 23.** Gráfico de amplificación representando los resultados de 8 muestras de cfDNA (identificadas con colores rojo y amarillo) amplificadas con el kit **Oncomine™ Lung cfDNA Assay** por qPCR. Los cálculos de concentración se calculan a partir de los resultados de la curva patrón de concentración conocida (color verde). El blanco corresponde a la imagen color rosa localizada en la base de la gráfica.



De esta forma, los CTs obtenidos para cada muestra (diluida 1/1000) fueron transformados en concentración de ADN (pM) por el software de la qPCR, en función de los CTs obtenidos para los puntos de la recta patrón.

## C. PÉREZ-BARRIOS

El día de la secuenciación se preparó un pool por cada grupo de 8 muestras ajustando la concentración final a 50pM. Para ello, cada librería fue ajustada a 100pM (**tabla 10**).

**Tabla 10.** Cálculos para el ajuste de concentraciones a 100pM.

Muestra	CqPCR 1/1000 (pM)	Ci real (pM)	Cf (pM)	Vf librería (µL)	Vi libería (µL)	H2O (µL)
1	0,28	276,22	100	15	5,43	9,57
2	0,11	110,29	100	15	13,60	1,40
3	0,35	351,71	100	15	4,26	10,74
4	0,77	767,75	100	15	1,95	13,05
5	0,52	523,17	100	15	2,87	12,13
6	0,59	594,36	100	15	2,52	12,48
7	0,21	205,55	100	15	7,30	7,70
8	1,09	1089,90	100	15	1,38	13,62

Una vez ajustadas las concentraciones, se añadió el mismo volumen de cada muestra a un eppendorf (ej:10µL), obteniéndose así un pool de 80 µL a 100pM. Posteriormente se añadió la misma cantidad de agua tipo I para obtener 160 µL de pool a 50pM.

Cada pool de 8 muestras (25µL) a 50pM se cargó en un chip **Ion 530™** utilizando el **Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef** en un sistema de preparación automatizada de librerías **Ion Chef™ System**. Los chips cargados fueron introducidos en un secuenciador **Ion S5™ Sequencer** para su secuenciación.

### 4.1.5. Análisis de los datos

El análisis de los datos se llevó a cabo en dos partes:

1. Un análisis primario de la calidad de la carrera, que se llevó a cabo en el software Torrent Server v.5.6.
2. Un análisis secundario o final de las variantes, que se llevó a cabo en el software Ion Reporter v.5.6.

#### 1. Análisis primario

Las características óptimas de esta secuenciación se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla 11.** Características esperadas de los resultados de secuenciación masiva en función del chip y del secuenciador utilizado.

Secuenciador	Chip	Longitud de lecturas	Nº de lecturas	Datos generados
S5	Ion 530	200-400pb	15-20 millones	3-8 Gb

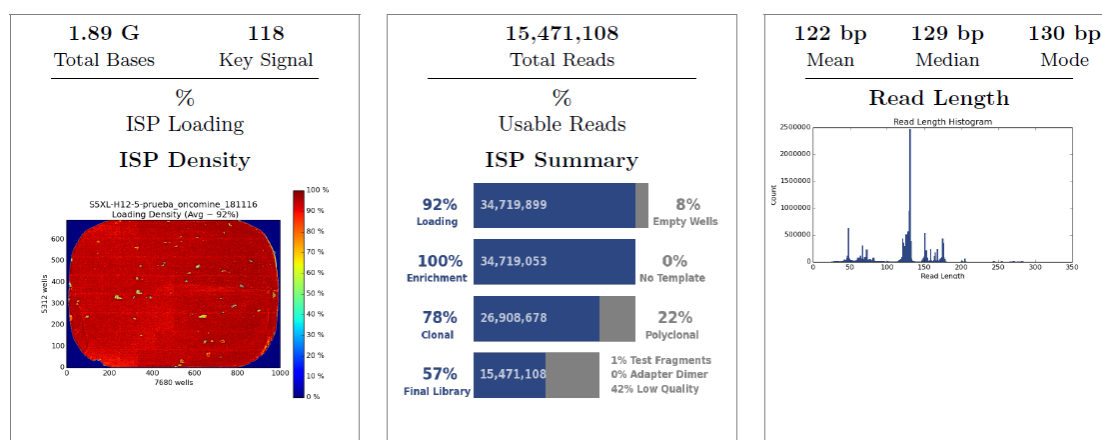
Tras cada carrera, se generó un archivo “Run Report” que permitió verificar la calidad de la secuenciación. Esta información puede valorarse a partir de 3 datos:

- ISP Density: Densidad de carga del chip y número de bases.
- Total Reads: Número total de lecturas.
- Read Length: Longitud de las lecturas.

Estos datos se obtuvieron para cada uno de los 7 chips utilizados durante el estudio.

Figura 24. Datos recogidos en el Run Summary.

### Run Summary



Además, por cada muestra secuenciada, el sistema emitió un informe con los siguientes parámetros:

- Bases: Numero de pares de bases incorporadas durante la secuenciación.
- ≥Q20: Número de pares de bases que superan o igualan el filtro de calidad “Predicted Quality”, definido como  $-10\log_{10}$  (probabilidad de error).
- Reads: Número de lecturas.
- Mean read Length: Longitud media de las lecturas.

Por último, el sistema realiza un análisis del alineamiento. Para ello, las lecturas obtenidas durante la secuenciación fueron alineadas con la secuencia del genoma de referencia hg19. Los datos de calidad del alineamiento se especificaron como “Aligement Quality Length”, que hace referencia a la mayor longitud de lecturas cuya tasa de error en el alineamiento es 1% o inferior (AQ20). Este parámetro nos permite detectar errores durante esta fase del proceso.

**Figura 25.** Datos de calidad de la secuenciación para 8 muestras incluidas en el estudio.

Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	29,425,351	18,847,472	313,641	93 bp
IonCode_0101	MLCG20150706	183,912,798	162,035,786	1,424,468	129 bp
IonCode_0102	CREF20150220	406,389,179	357,088,361	3,397,701	119 bp
IonCode_0103	LICV20160222	215,049,442	190,346,411	1,763,138	121 bp
IonCode_0104	MAGL20160129	218,246,794	193,846,715	1,884,777	115 bp
IonCode_0105	AB20160104	165,240,452	145,555,769	1,353,929	122 bp
IonCode_0106	MAPE20160412	106,657,344	94,183,946	827,040	128 bp
IonCode_0107	PMO20140410	452,302,458	400,053,845	3,611,450	125 bp
IonCode_0108	BAA20161102	110,677,647	97,721,533	894,960	123 bp

De forma adicional, cada tanda fue analizada con un plug-in CoverageAnalysis (v. 5.6.0.1). Con este análisis se obtuvieron los siguientes datos.

- Mapped reads: Número de lecturas alineadas.
- On Target (%): Porcentaje de lecturas que se localizan en las regiones de interés.
- Mean Depth: Profundidad media de las lecturas.
- Uniformity: Uniformidad de las regiones amplificadas.

**Figura 26.** Informe de resultados del análisis de cobertura de 8 muestras incluidas en el estudio.

#### coverageAnalysis

Library type: Generic Sequencing  
 Target regions: Oncomine\_Lung\_cfDNA.03212016.Designed  
 Read filters: Non-duplicate

Barcode Name	Sample	Mapped Reads	On Target	Mean Depth	Uniformity
<a href="#">IonCode_0101</a>	MLCG20150706	1,239,762	96.87%	36,385	100.00%
<a href="#">IonCode_0102</a>	CREF20150220	2,589,069	95.00%	73,623	100.00%
<a href="#">IonCode_0103</a>	LICV20160222	1,389,948	95.11%	39,159	100.00%
<a href="#">IonCode_0104</a>	MAGL20160129	1,330,148	94.20%	38,082	100.00%
<a href="#">IonCode_0105</a>	AB20160104	1,059,195	94.95%	30,185	100.00%
<a href="#">IonCode_0106</a>	MAPE20160412	681,894	94.38%	20,054	100.00%
<a href="#">IonCode_0107</a>	PMO20140410	2,924,948	95.27%	85,407	100.00%
<a href="#">IonCode_0108</a>	BAA20161102	714,850	95.80%	20,647	100.00%

5 items per page 1 - 8 of 8 items

## 2. Análisis secundario o análisis de las variantes

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el variant Caller-cfDNA plug-in específico para este panel en el software **Ion Reporter™** con el Workflow de análisis: OncoPrint TagSeq Pan-Cancer Liquid Biopsy v2.1 (v. 5.10). Este software analiza los datos a partir los archivos .BAM obtenidos tras el alineamiento con el genoma de referencia. Gracias a la tecnología de marcaje diferencial de amplicones procedentes de una misma molécula, el sistema es capaz de corregir los errores debidos a fallos durante el proceso de incorporación de nucleótidos. De esta forma, solo se consideran validos aquellos cambios detectados en varias familias de moléculas diferentes ( $\geq 2$  familias).

Para cada una de las muestras se obtuvieron los siguientes datos:

- Median read coverage: Mediana de la cobertura de las lecturas.
- Median molecular coverage: Mediana de la cobertura de las familias moleculares
- Targets  $>0.8$  Median Molecular Coverage (Target  $>0.8MM$ ): Porcentaje de targets con una cobertura molecular dentro del 80% de la mediana de la cobertura. Es un parámetro de uniformidad.

**Figura 27.** Informe de resultados para 8 muestras tras el análisis con el VariantCaller cfDNA.

variantCaller<sub>cfDNA</sub>

Output Directory: variantCaller\_cfDNA\_out.72

Download all barcodes:

Please note: Variant calling was carried out for all barcodes with reference genome as specified above

Barcode Name	Sample Name	Median Read Cov	Median Mol Cov	Targets $>0.8MM$ Cov	Variants	Hotspot Variants	Download Links
IonCode_0101	MLCG20150706	32197	2957	94.29%	8	4	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
IonCode_0102	CREF20150220	68350	3114	85.71%	6	2	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
IonCode_0103	LICV20160222	37810	3746	100%	5	1	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
IonCode_0104	MAGL20160129	35621	5112	85.71%	2	1	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
IonCode_0105	AB20160104	27088	3423	94.29%	4	2	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
IonCode_0106	MAPE20160412	16805	2508	74.29%	5	3	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
IonCode_0107	PMO20140410	74977	5787	94.29%	7	3	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>
IonCode_0108	BAA20161102	19304	2918	82.86%	3	2	<input type="button" value="VCF.GZ"/> <input type="button" value="VCF.GZ.TBI"/> <input type="button" value="XLS"/>

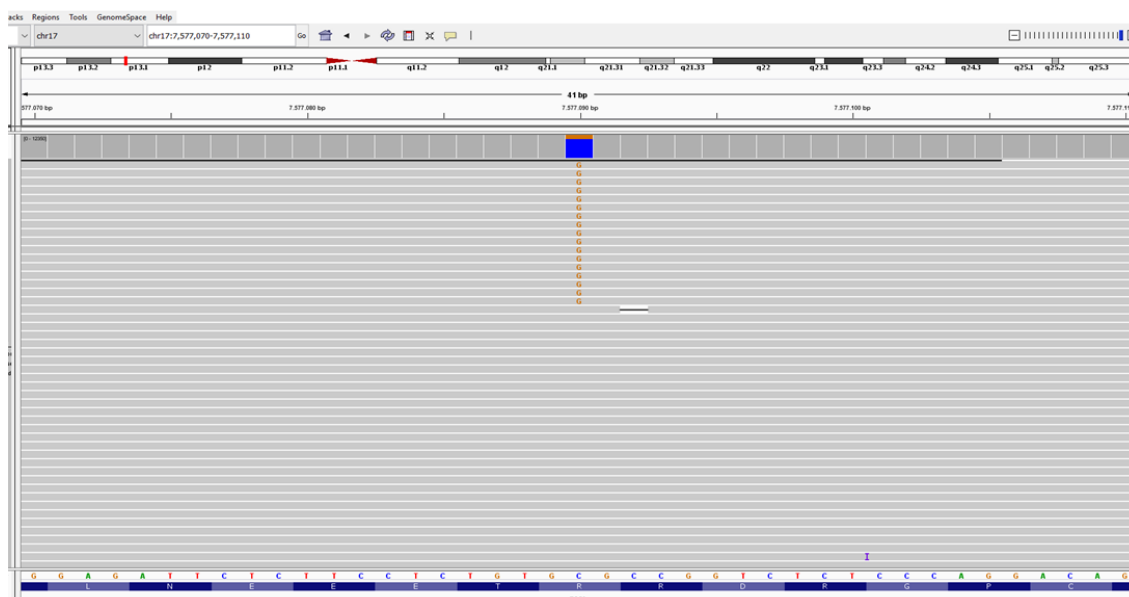
Para garantizar una sensibilidad por debajo de 0,1%, estos parámetros deben tener los siguientes valores: Median Read Coverage  $>25.000$ , Median Molecular Coverage  $>2.500$ , y Targets  $>0.8$  Median Molecular Coverage  $>60\%$ .

Además, el software de análisis permite obtener para cada una de las variantes la localización (locus), el gen, y la frecuencia alélica de la variante. Este valor se obtiene a partir de los parámetros:

- Molecular Depth: Número de moléculas de ADN interrogadas que contienen el target.
- Molecular Counts: número de moléculas de ADN detectadas que contienen el alelo variante.

Para verificar los resultados obtenidos, las variantes detectadas con una frecuencia igual o superior a 0.1% fueron visualizadas utilizando el programa informático Integrative Genomics Viewer (IGV V.2.3.40, Broad Institute, Cambridge, MA).

**Figura 28.** Imagen de una variante en el gen TP53 visualizada con IGV.



Los datos fueron recogidos en una Base de Datos creada para el estudio.

### 4.1.6. Confirmación de los resultados obtenidos por PCR digital.

Para valorar los resultados obtenidos mediante NGS, se realizó la confirmación de las mutaciones anotadas por el sistema Ion Reporter mediante PCR digital (Thermo Fisher Scientific). La verificación se llevó a cabo en dos fases:

#### ❖ Mutaciones con ensayo comercial

En primer lugar, se analizaron aquellas mutaciones con ensayo Taqman comercial disponible para PCR digital utilizando las condiciones anteriormente descritas. La temperatura de hibridación y el número de ciclos fue 56°C y 40 ciclos respectivamente.

❖ **Mutaciones sin ensayo comercial**

Posteriormente, de aquellas mutaciones en las que no se disponía de ensayo comercial, se seleccionaron las 12 con mayor MAF. Una vez identificadas, se llevó a cabo el diseño del ensayo Taqman correspondiente siguiendo las indicaciones de ThermoFisher dentro de la línea comercial “Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays”. Las sondas diseñadas se probaron utilizando las mismas condiciones de las sondas comerciales.

**Tabla 12.** Ensayos custom diseñados para la confirmación de mutaciones detectadas por el kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay.

Gen	Cambio nucleótido	Cambio proteína	rs/COSMIC ID	Assay ID
ALK	c.3806G>C	p.Gly1269Ala	rs1057519781	ANZTHH6
BRAF	c.1397G>T	p.Gly466Val	rs121913351	C_172767599_10
EGFR	c.2303G>T	p.Ser768Ile	rs121913465	C_172767650_10
EGFR	c.2297_2305dupTGGCCAGCG	p.Val769_Asp770insAlaSerVal	rs730880339	ANNKU42
MET	c.3029C>T	p.Thr1010Ile	rs56391007	C_88877997_10
TP53	c.817C>A	p.Arg273Ser	rs121913343	ANMFZF3
TP53	c.469G>T	p.Val157Phe	rs121912654	C_164425825_10
TP53	c.844C>G	p.Arg282Gly	rs28934574	ANRWG6V
TP53	c.848G>C	p.Arg283Pro	COSM10743	ANXGUGJ
TP53	c.476C>T	p.Ala159Val	COSM11148	ANWCYWM
TP53	c.524G>A	p.Arg175His	rs28934578	ANU66CP
TP53	c.817C>G	p.Arg273Gly	COSM43843	AN324U

En todos los casos se utilizó un control negativo de forma simultánea a la muestra a confirmar, y cuando posible un control positivo.

### 5. Recogida de datos y métodos estadísticos.

Los datos recogidos fueron introducidos en una base de datos creada para este proyecto. Las variables cualitativas se expresaron por su distribución de frecuencia y las variables cuantitativas, por su media y desviación estándar o mediana y rango intercuartílico.

La comparación no paramétrica del rendimiento de concentración de cfDNA con diferentes alícuotas de la misma muestra de plasma, utilizando diferentes metodologías, se evaluó mediante la prueba de rango de signos de Wilcoxon para datos pareados. La comparación no paramétrica del rendimiento de la concentración de cfDNA por diferentes situaciones clínicas, tales como origen tumoral (cáncer de pulmón frente a cáncer colorrectal) o estadificación tumoral (estadio IV frente a otro) se realizó usando una prueba U de Mann-Whitney. La asociación entre variables categóricas fue probada por el test de McNemar.

La cuantificación relativa de fragmentos de ADN unidos a nucleosoma libres circulantes se expresó como la relación entre la concentración de un fragmento particular y la concentración total de cfDNA en la muestra correspondiente. La comparación entre las proporciones de fragmentos de ADN unidos a nucleosomas libres circulantes obtenidos en muestras apareadas utilizando diferentes metodologías se evaluó mediante la prueba de rango con signo de Wilcoxon para datos apareados. Para este análisis, el nivel de significación se ajustó a 0,0083 de acuerdo con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

El cálculo de los límites de detección y de cuantificación de los ensayos p.L858R (AHRSRSV), p.E746\_A750deIELREA (AHLJ0XO), p. G719S (AH0JEWG) y p.T790M (AHRSR0S) mediante PCR digital se realizó utilizando los criterios de las guías *ICH guidelines* basados en el cálculo de la desviación standard y la pendiente de la curva. La correlación entre los MAF teóricos y reales para cada ensayo se llevó a cabo mediante análisis de regresión lineal simple.

El estudio de intercomparación para valorar el estado de diferentes mutaciones en el gen *EGFR* por dos laboratorios independientes se realizó mediante el coeficiente Kappa de Cohen y los intervalos de confianza correspondientes del 95% (IC 95%).

Para valorar la utilidad del estudio consecutivo de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de sangre se utilizaron los siguientes test estadísticos: La asociación entre variables categóricas fue testado por la prueba exacta de Fisher. SLP se definió como el tiempo entre la fecha en que el paciente se inscribió en el estudio y la fecha en que se

diagnosticó la progresión del tumor o la muerte de cualquier causa. El análisis de supervivencia se realizó ajustando modelo de regresión de Cox para cada una de las variables: fracción de alelo p.T790M, fracción de alelo *sensitizing*, número de copias T790M/ml y número de copias *sensitizing*/ml. Para el HR el número de copias/ml de cada mutación se transformó en log2. Los predictores fueron utilizados como covariables continuas dependientes del tiempo, utilizando herramientas para crear covariables dependientes del tiempo en R.

Para evaluar el rendimiento de los líquidos biológicos frente a la sangre en la detección de mutaciones en *EGFR* a partir de ADN circulante se utilizó la prueba de rango de signos de Wilcoxon para datos apareados. La asociación entre variables categóricas fue probada por el test de McNemar.

Por último, para evaluar la utilidad de la secuenciación masiva y su correlación con la PCR digital se utilizaron las siguientes aproximaciones estadísticas: La comparación no paramétrica de la concentración de cfDNA según el estadio tumoral UICC (estadio III frente a IV) se evaluó usando una prueba U de Mann-Whitney. La correlación entre la frecuencia del alelo mutante (MAF) medida por dPCR y NGS se evaluó mediante análisis de regresión lineal simple, utilizando el coeficiente de correlación de concordancia ( $\rho$ ) y el coeficiente de Pearson ( $r$ ). Además, se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablok para evaluar el acuerdo y el posible sesgo sistemático entre NGS y dPCR. La validez del modelo lineal se realizó utilizando la prueba de Cusum para la linealidad. De forma similar, las mediciones de MAF por las dos metodologías empleadas se mostraron gráficamente en la gráfica de Bland-Altman. Finalmente, se evaluó el acuerdo entre NGS y dPCR para la evaluación del estado p.T790M (detectado frente a no detectado) utilizando los valores del coeficiente kappa y los intervalos de confianza correspondientes del 95% (IC 95%).

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante los programas SPSS v.20.0. y R v.3.4.4. Las pruebas con un valor de  $p < 0,05$  fueron consideradas estadísticamente significativas.





# RESULTADOS





## 1. Establecimiento de las condiciones preanalíticas

Existen diversos factores preanalíticos que pueden afectar a los resultados obtenidos durante el estudio como son el espécimen (suero/plasma) y tubo de extracción utilizado, el tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre y la centrifugación de la muestra, las condiciones de centrifugación, las condiciones de almacenaje de la muestra y el método de extracción del ADN circulante.

Este último factor resulta especialmente relevante ya que existen en el mercado numerosos kits manuales y automatizados que permiten la extracción de ADN circulante, y diversos estudios han demostrado que la elección entre uno u otro puede afectar de forma significativa al rendimiento de la extracción y al contenido de cfDNA obtenido.

### 1.1. Selección del método de extracción

Se analizaron 57 muestras de plasma (40 hombres y 17 mujeres) correspondientes a 10 pacientes con cáncer de colon (17,5%) y 47 pacientes con cáncer de pulmón (82,5%) en estadios III (26,3%) y IV (73,7%) utilizando 3 métodos de extracción diferentes: Los métodos automatizados MagNA Pure Compact (MPC) Nucleic Acid Isolation y Maxwell® RSC (MR) ccfDNA Plasma y el método manual QIAamp Circulating Nucleid Acid (QCNA).

**Tabla 13.** Características de la población de estudio.

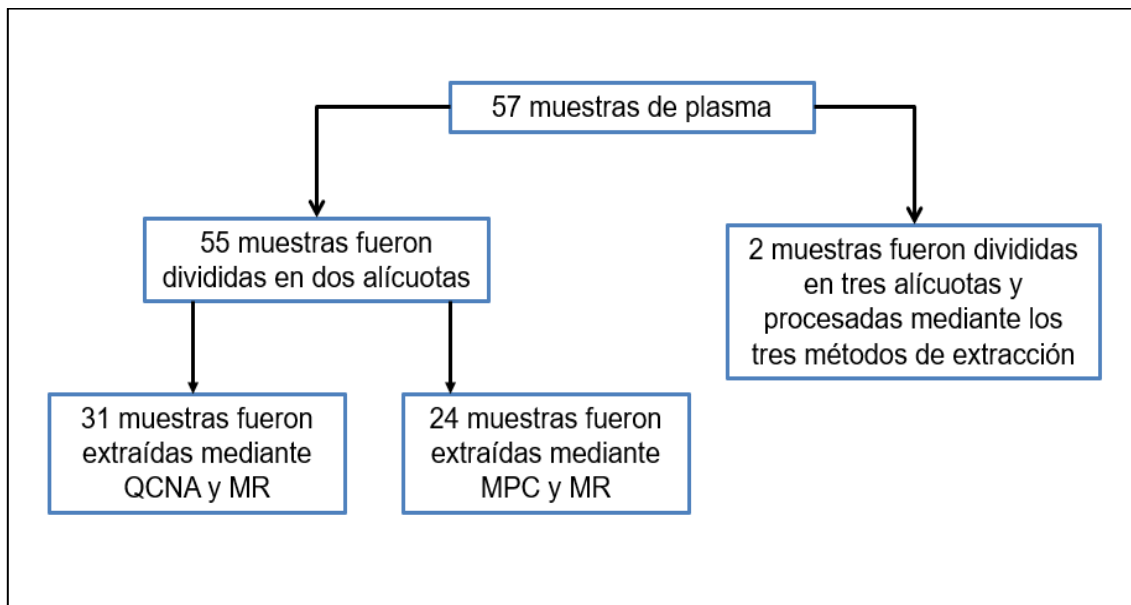
Característica	N
Género	
Hombre	40
Mujer	17
Origen tumoral	
Pulmón	47
Colon	10
Estadío tumoral	
IV	42
III	15

La edad media de los pacientes fue de 62,5 años (41-82).

1.1.1. Rendimiento de la extracción según el método:

Se obtuvieron 116 alícuotas de cfDNA de acuerdo con el siguiente esquema de trabajo:

**Figura 29.** Esquema de trabajo en el estudio del método de extracción.



El rango de concentraciones de cfDNA obtenido por los 3 métodos fue muy amplio (0,2-24ng/ $\mu$ L).

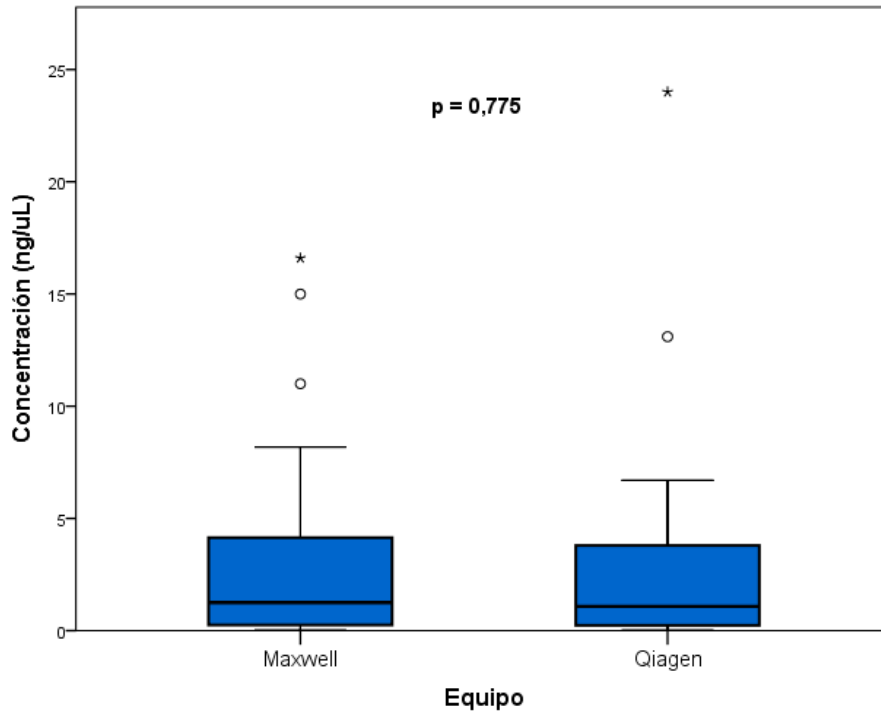
**a) MR y QCNA**

Con las 33 muestras extraídas mediante MR y QCNA (32 muestras de pulmón y 1 muestra de colon) se obtuvieron los siguientes resultados:

- Mediana de las concentraciones de cfDNA extraídas por MR: **1,25 ng/  $\mu$ L** (Q1= 0,25; Q3= 4,27).
- Mediana de las concentraciones de CfDNA extraídas por QCNA: **1,08 ng/ $\mu$ L** (Q1=0,2375; Q3= 3,9750)

Esta diferencia no resultó significativa ( $p=0,775$ ).

**Figura 30.** Diagrama de cajas representando la distribución de las concentraciones de cfDNA obtenidas por el sistema Maxwell y por el sistema Qiagen. Los puntos rojos representan los valores outliers.



En ambos métodos, la cantidad de cfDNA obtenido fue significativamente superior en pacientes metastásicos que en no metastásicos ( $p < 0,05$ ).

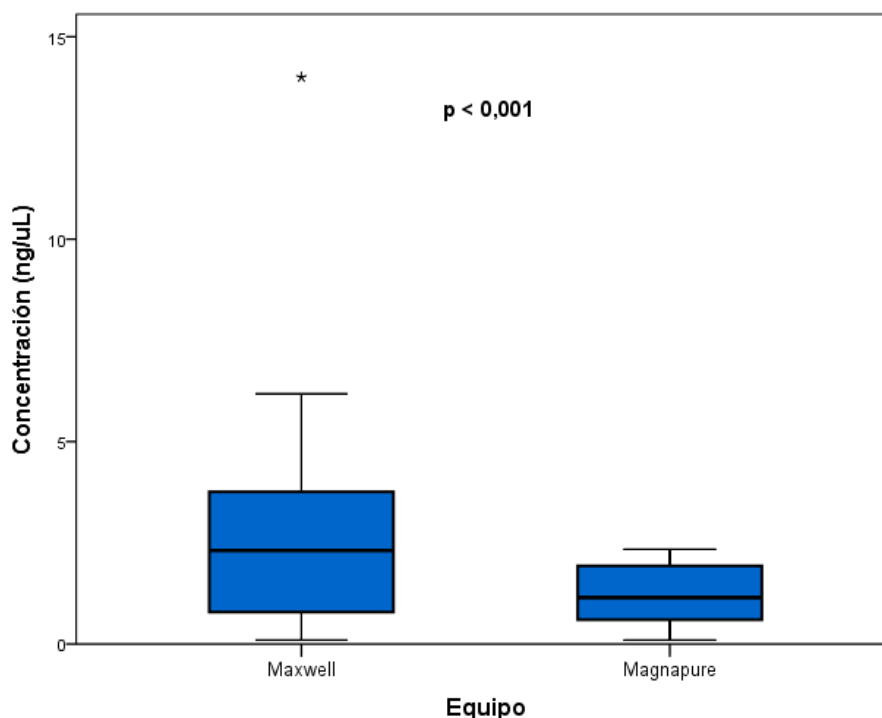
**b) MR y MPC**

Se analizaron 26 muestras extraídas por ambas metodologías (9 procedentes de pacientes con cáncer de colon y 17 de pulmón). En este caso, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Mediana de las concentraciones de cfDNA extraídas por MR: **2,31 ng/μL**. (Q1= 0,79; Q3=3,76).
- Mediana de las concentraciones de cfDNA extraídas por MPC: **1,15 ng/μL**. (Q1=0,60; Q3=1,93).

En este caso la diferencia entre la cantidad de cfDNA extraída por ambos métodos fue significativa ( $p < 0,001$ ).

**Figura 31.** Diagrama de cajas representando la distribución de las concentraciones de cfDNA obtenidas por el sistema Maxwell y por el sistema Magnapure.



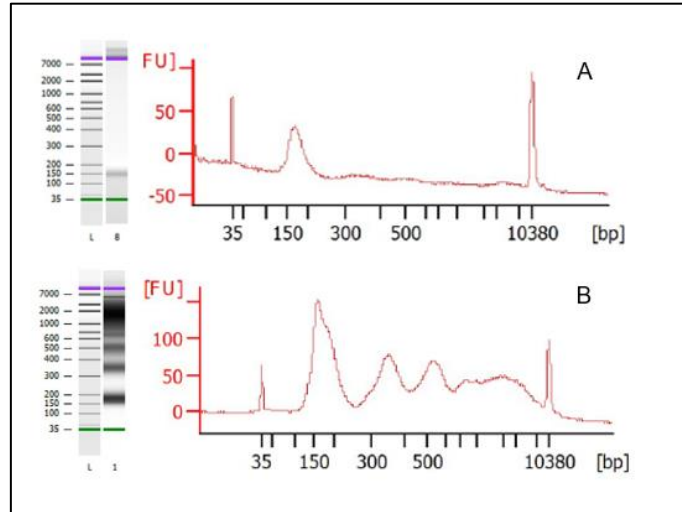
La diferente localización tumoral no produjo diferencias significativas en ninguno de los dos métodos ( $p= 0,4834$ ; MR y  $p=0,9355$ ; MPC).

### 1.1.2. Comparación del perfil electroforético del ADN circulante obtenido según el método de extracción

Se analizó el perfil electroforético de 44 muestras de cfDNA obtenidas de 22 plasmas extraídos mediante MR y QCNA y 34 muestras de cfDNA obtenidas de 17 plasmas extraídos mediante MR y MPC.

En las 78 muestras (100%) se detectó un pico en el electroferograma correspondiente al cfDNA (media: 182 pb, rango: 151-205 pb). Además, en 69 de las 78 muestras (88,5%) apareció también un perfil oligonucleosomal, correspondiente a la presencia de mono-, di- y trinucleosomas, lo que se ha asociado a una muerte por apoptosis <sup>108</sup>. También se detectó un pico correspondiente a fragmentos de alto peso molecular (>10.000pb) en 54 muestras (69,2%), lo que puede deberse a una muerte celular vía necrosis <sup>98</sup>.

**Figura 32.** Perfiles electroforéticos obtenidos mediante el sistema Bioanalyzer 2100. Imagen A: Pico de 180 pb correspondiente al cfDNA; Imagen B: Picos correspondientes a mono-, di- y trinucleosomas y fragmentos de gran tamaño adicionales al pico de cfDNA (170 pb).



Además, la proporción de fragmentos oligonucleosomales varió dependiendo del método de extracción como puede observarse en la siguiente tabla:

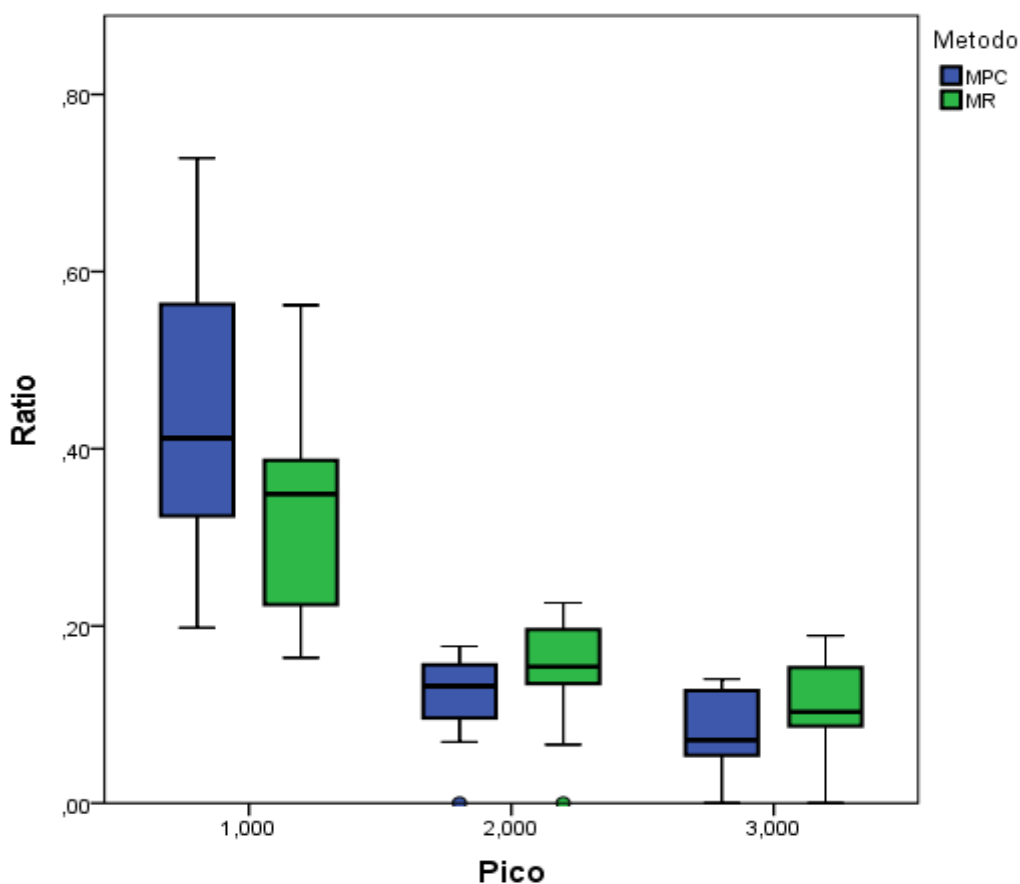
**Tabla 14.** Mediana (p50), primer cuartil (p25) y tercer cuartil (p75) de las ratios entre el cfDNA correspondiente a las fracciones de mono-, di- y trinucleosomas y la concentración de cfDNA total extraída por cada uno de los tres métodos.

	MR			QCNA			MPC		
	mono-	di-	tri-	mono-	di-	tri-	mono-	di-	tri-
N	39	39	39	23	23	23	18	18	18
p50	0,255	0,145	0,097	0,259	0,087	0,081	0,413	0,125	0,068
p25	0,176	0,088	0,048	0,146	0,032	0,026	0,324	0,090	0,046
p75	0,368	0,177	0,140	0,404	0,140	0,119	0,564	0,156	0,127
min	0,101	0,000	0,000	0,075	0,000	0,000	0,198	0,000	0,000
max	0,785	0,226	0,189	0,783	0,190	0,164	0,728	0,177	0,140

Por último, al comparar los resultados entre el sistema de Maxwell y el sistema de MagnaPure, se encontraron además dos diferencias importantes:

1. La proporción de cfDNA (150-200pb) obtenida por el método de MagnaPure fue significativamente superior ( $p=0,0005$ ) a la extraída por el sistema Maxwell.
2. Los fragmentos de di- y tri- nucleosomas fueron significativamente más bajos por el sistema de MagnaPure que por el sistema Maxwell ( $p=0,0024$  y  $p=0,0038$ ).

**Figura 33.** Diagrama de barras representado la proporción de fragmentos de 180 pb (P1), de dinucleosomas (P2) y de trinucleosomas (P3) obtenidos con el sistema Magnapure (MPC) y Maxwell (MR).



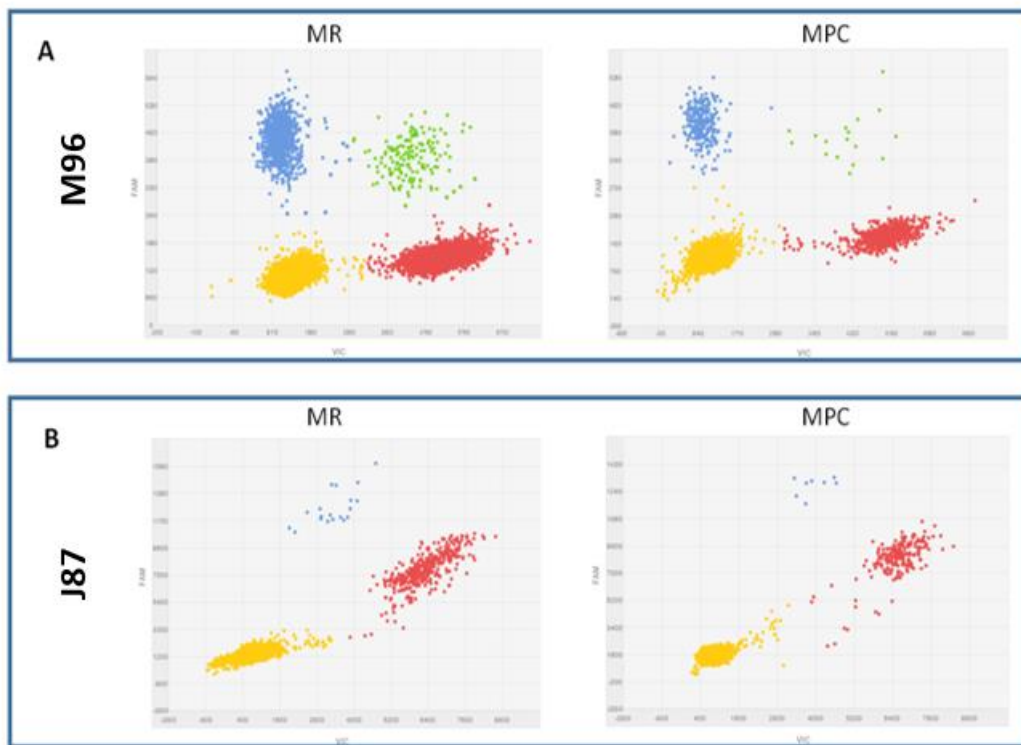
Estas diferencias no fueron significativas para los sistemas Maxwell (MR) y Qiagen (QCNA). (P1:  $p=0,303$ ; P2,  $p=0,935$ ; P3,  $p=0,0602$ ).

### 1.1.3. Influencia del método de extracción en el análisis de mutaciones somáticas mediante PCR digital

De acuerdo con los estudios de Anatomía Patológica, 26 pacientes portaban mutaciones somáticas detectables mediante PCR digital: 17 pacientes con cáncer de pulmón presentaban mutaciones activadoras en el gen *EGFR*, y 9 pacientes con cáncer de colon presentaban mutaciones en el gen *KRAS*.

De estos 26 pacientes, se detectaron mutaciones mediante PCR digital en 38 muestras pareadas procedentes de 19 muestras de plasma (73,1%). Según la Historia Clínica, los 7 pacientes que resultaron negativos para el estudio mediante PCR digital presentaban una respuesta parcial o completa al tratamiento según los criterios RECIST v1.1.

**Figura 34.** Diagrama de dispersión de la cuantificación de mutaciones a partir de cfDNA de muestras pareadas extraídas mediante MR y MPC. Las copias de cfDNA mutado se representan en azul (FAM), las copias wild-type se representan en amarillo (VIC), y la mezcla de ambas copias se representa en verde (FAM+VIC). Los puntos amarillos representan los pocillos donde no se ha producido amplificación. (A) Paciente M96: Mutación testada en el gen *EGFR*: p.746\_750delELREA; (B) Paciente J87: Mutación testada en el gen *EGFR*: p.T790M.



De las 38 muestras positivas por PCR digital, 30 fueron extraídas mediante MR y MPC. La fracción alélica (MAF) y su intervalo de confianza se representan en la **tabla 16**. La media de la fracción alélica obtenida por ambas metodologías no mostró diferencias significativas ( $p=0,865$ ). Estos datos sugieren un bajo impacto del método de extracción en el resultado del análisis de mutaciones.

**Tabla 15.** Fracción alélica mutada (MAF) y su intervalo de confianza (IC) de las muestras extraídas en paralelo mediante MR y MPC. ND: No disponible.

Muestra	Gen	Mutación	MR		MPC	
			MAF (%)	IC (%)	MAF (%)	IC (%)
M52	EGFR	del 19	0,22	0,11 - 0,49	0,31	0,12 - 0,81
M96	EGFR	del 19	22,09	20,46 - 23,84	24,40	21,80 - 27,29
J86	EGFR	G719X	7,20	4,65 - 11,15	6,78	4,50 - 6,13
C36	EGFR	L858R	39,01	36,55 - 41,53	38,97	36,49 - 41,59
M97	EGFR	T790M	1,03	0,77 - 1,37	1,02	0,63 - 1,63
J87	EGFR	T790M	4,52	2,38 - 8,57	3,66	1,40 - 9,56
A13	KRAS	G12D	0,11	0,06 - 0,21	0,73	0,20 - 2,66
J14	KRAS	G12D	0,10	0,04 - 0,23	0,04	0,01 - 0,21
J05	KRAS	G12D	0,62	0,38 - 0,99	0,38	0,15 - 0,97
P11	KRAS	G12D	0,03	0,00 - 0,26	0,08	0,01 - 0,43
G17	KRAS	G12V	0,07	0,02 - 0,22	0,10	0,03 - 0,36
R12	KRAS	G12V	0,00	ND	0,46	0,14 - 1,49
J06	KRAS	G12V	1,31	1,30 - 1,36	1,12	0,81 - 1,54
F04	KRAS	G13D	0,10	0,05 - 0,19	0,13	0,06 - 0,28
F08	KRAS	G13D	0,77	0,48 - 1,25	0,17	0,05 - 0,63

Las 8 muestras restantes fueron extraídas de forma pareada mediante los métodos MR y QCNA y sus mutaciones fueron también analizadas mediante PCR digital (**tabla 16**). De forma similar al caso anterior, la fracción alélica encontrada en cada par de muestras no presentó grandes diferencias.

**Tabla 16.** Fracción alélica mutada (MAF) y su intervalo de confianza (IC) de las muestras extraídas en paralelo mediante MR y QCNA.

Muestra	Gen	Mutación	MR		QCNA	
			MAF (%)	IC (%)	MAF (%)	IC (%)
J32	EGFR	G719X	11,12	9,40-3,22	9,40	7,73-11,40
M31	EGFR	T790M	0,05	0,02-0,16	0,07	0,02-0,29
J86	EGFR	T790M	2,12	1,35-3,31	3,69	2,45-5,55
J23	EGFR	T790M	5,33	2,84-9,98	2,18	0,95-4,96

## 2. Establecimiento de condiciones analíticas: validación del estudio de mutaciones somáticas en el gen *EGFR* mediante PCR digital

### 2.1. Cálculo del límite de detección y del límite de cuantificación

Para considerar la presencia o ausencia de cada mutación se establecieron los límites de detección de cada ensayo según las guías de calidad *ICH guidelines*. El criterio utilizado para el cálculo del límite de cuantificación (LOQ) y de detección (LOD) de cada técnica fue el cálculo basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración <sup>109</sup>.

Las fórmulas para calcular el LOQ y el LOD fueron las siguientes:

$$\text{LOQ}=10\sigma/S$$

$$\text{LOD}=3.3\sigma/S$$

Donde “ $\sigma$ ” es la desviación estándar de la respuesta y “S” es la pendiente.

#### 2.1.1. Mutación de resistencia p.T790M

Se utilizó el criterio de la *ICH guidelines* basado en la curva de calibración.

Para ello se elaboró una curva de calibración que contenía la mutación a estudiar en concentraciones cercanas a su límite de detección.

Se utilizó como patrón una línea celular pura de mutación p.T790M conocida y se prepararon a partir de ella 4 muestras con el siguiente porcentaje de copias mutadas/copias totales: 1%, 0,5%, 0,1% y 0,05%.

Estas muestras se analizaron por PCR digital, obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 17.** Resultados teóricos y reales obtenidos para la mutación p.T790M por el sistema de PCR digital.

Ensayo	Target/Total teórico (Y)	Target/Total Real (X)	IC Target/Total	Copias/ $\mu\text{L}$ (VIC)	IC Copias/ $\mu\text{L}$ (VIC)	Copias/ $\mu\text{L}$ (FAM)	IC Copias/ $\mu\text{L}$ (FAM)
p.T790M	1%	0,92%	0,65% - 1,308%	277,17	273,22 - 281,18	2,61	2,268 - 3,005
p.T790M	0,10%	0,10%	3,56E-2% - 0,261%	302,02	297,82 - 306,29	0,32	0,211 - 0,486
p.T790M	0,50%	0,52%	0,329% - 0,826%	282,09	278,05 - 286,18	1,56	1,294 - 1,877
p.T790M	0,05%	0,06%	1,68E-2% - 0,208%	312,78	308,32 - 317,30	0,21	0,122 - 0,361

Con estos resultados se obtuvieron los siguientes datos de regresión:

**Tabla 18.** Coeficientes y error típico de la regresión para el ensayo p.T790M.

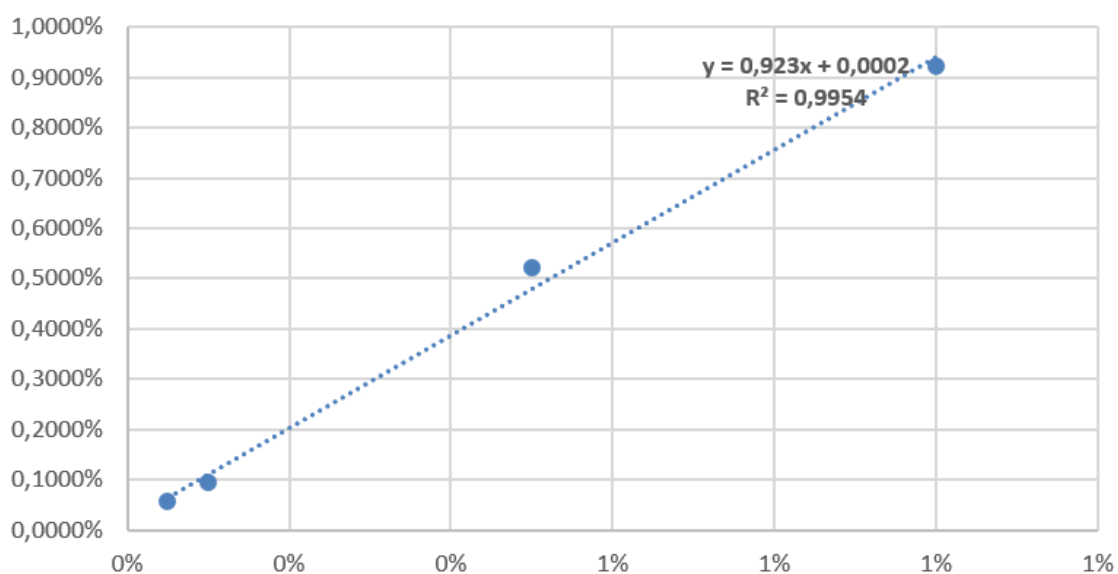
	Coeficientes	Error típico
<b>Intercepción</b>	-0,0002	0,0003
<b>Variable X 1</b>	1,0784	0,0520

**Tabla 19.** Estadísticas de regresión para el ensayo p.T790M.

Estadísticas de la regresión	
<b>Coeficiente de correlación múltiple</b>	0,9977
<b>Coeficiente de determinación R<sup>2</sup></b>	0,9954
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,9931
<b>Error típico</b>	0,0004
<b>Observaciones</b>	4

La recta de regresión obtenida fue la siguiente:

**Figura 35.** Recta de regresión representando la fracción: mutación T790M/total real (eje de abscisas) y T790M/total teórica (eje de ordenadas).



Posteriormente se llevó a cabo el cálculo de la desviación estándar. La guía establece que puede utilizarse la desviación estándar de la intercepción-y de la línea de regresión como desviación estándar de la respuesta.

**Figura 36.** Valores de la desviación estándar y de la pendiente basados en los criterios de las guías *ICH guidelines*.

	Coeficientes	Error típico
Intercepción	-0,0002	0,0003
Variable X 1	1,0784	0,0520

Desviación estándar ( $\sigma$ )  
 ↑  
 Pendiente (S)  
 ↓

Esto se obtuvo de los datos de regresión anteriormente calculados:

Donde el error típico de la intercepción corresponde a la desviación estándar ( $\sigma$ ) y el coeficiente de la variable X1 es la pendiente (S).

Por lo tanto, volviendo a las fórmulas iniciales para el cálculo de LOD y LOQ se obtuvieron los siguientes valores:

$$LOQ=10\sigma/S$$

$$LOQ \text{ p.T790M}=10 \times 0,0002/1,078= \mathbf{0,26\%}$$

$$LOD=3,3\sigma/S$$

$$LOD \text{ p.T790M}=3,3 \times 0,0003/1,078= \mathbf{0,08\%}$$

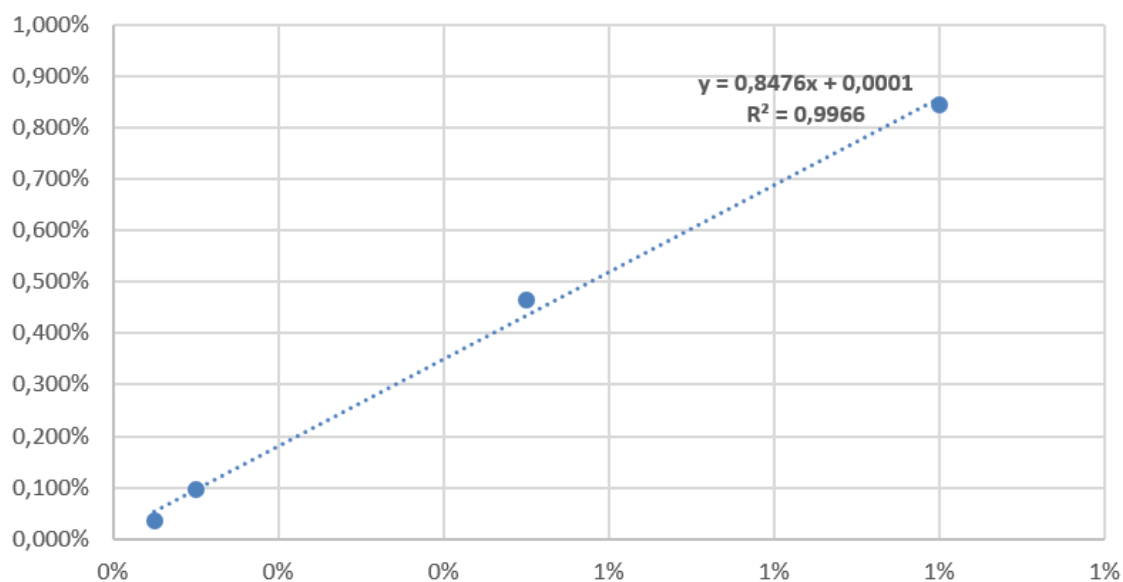
Estos resultados coincidieron con el límite de detección proporcionado por el fabricante (0,1%) por lo que se estableció el valor de 0,1% como punto de corte a partir de cual se consideró positiva la mutación p.T790M.

#### 2.1.2. Mutaciones de sensibilidad: L858R, del 19 y G719S

Se realizó la misma operación con los ensayos para las mutaciones de sensibilidad p. L858R, p. E746\_A750delELREA y p. G719S obteniéndose los siguientes resultados:

❖ **p. L858R**

**Figura 37.** Recta de regresión representando la fracción: mutación L858R/total real (eje de abscisas) y L858R/total teórica (eje de ordenadas).



**Tabla 20.** Resultados teóricos y reales obtenidos para la mutación p. L858R por el sistema de PCR digital.

Ensayo	Target/ total teórico(Y)	Target/Total real(X)
L858R	1%	0,84%
L858R	0,10%	0,10%
L858R	0,50%	0,47%
L858R	0,05%	0,04%

**Tabla 21.** Coeficientes y error típico de la regresión para el ensayo p. L858R.

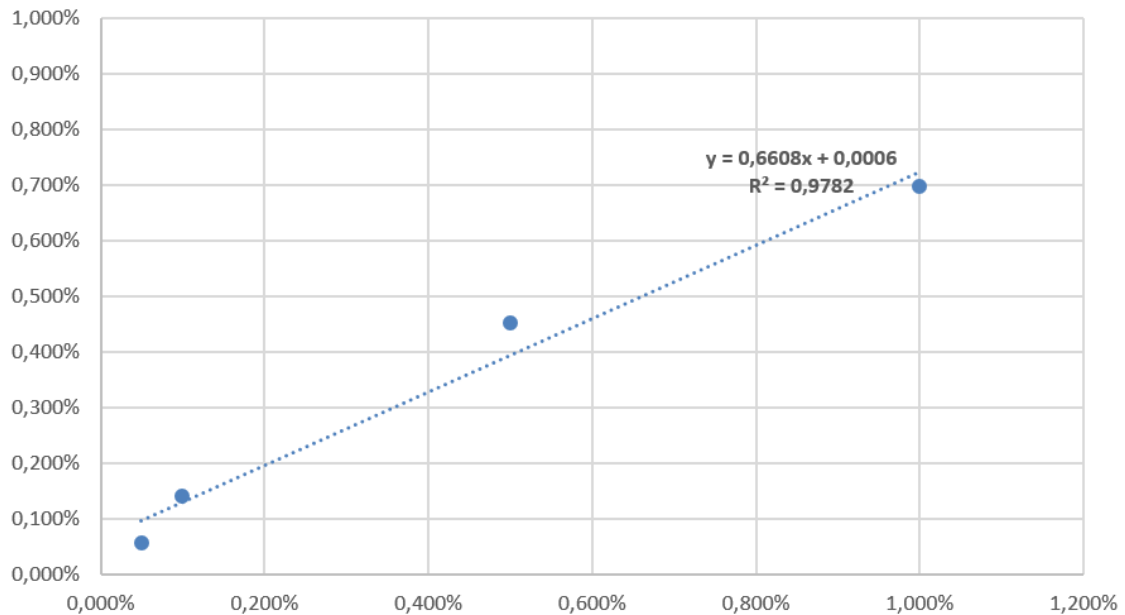
	Coeficientes	Error típico
Intercepción	-0,0001	0,0002
Variable X 1	1,1757	0,0487

**LOQ L858R = 0,20%**

**LOD L858R = 0,07%**

❖ p. E746\_A750delELREA

**Figura 38.** Recta de regresión representando la fracción: mutación del19/total real (eje de abscisas) y del19/total teórica (eje de ordenadas).



**Tabla 22.** Resultados teóricos y reales obtenidos para la mutación p. E746\_A750delELREA por el sistema de PCR digital.

Ensayo	Target/ total teórico(Y)	Target/Total real(X)
del 19	1%	0,70%
del 19	0,10%	0,14%
del 19	0,50%	0,45%
del 19	0,05%	0,06%

**Tabla 23.** Coeficientes y error típico de la regresión para el ensayo p. L858R.

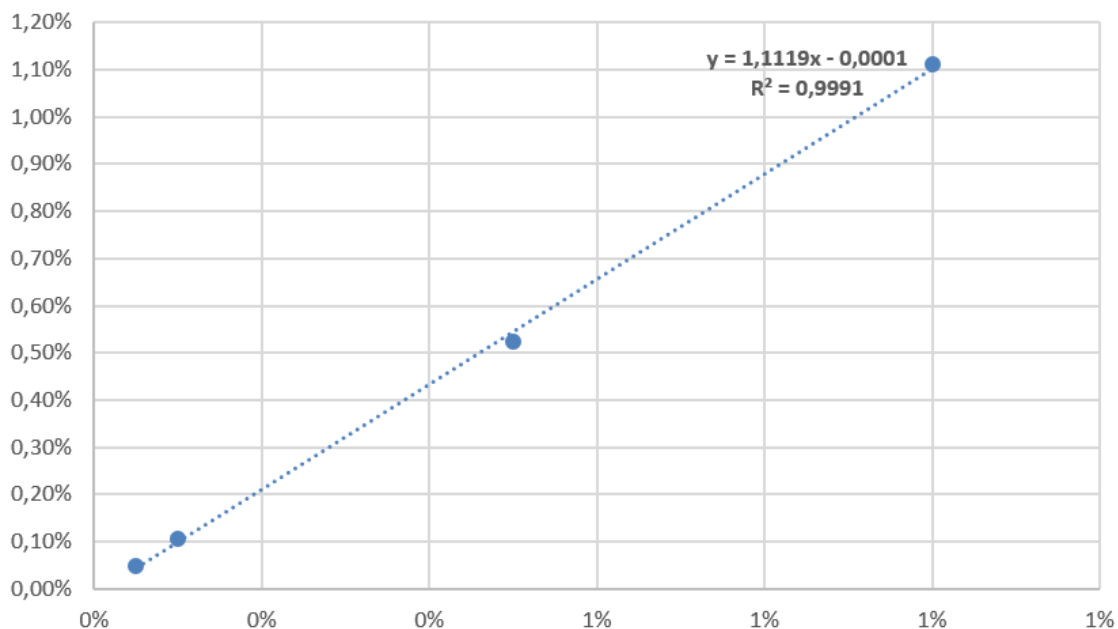
	Coeficientes	Error típico
<b>Intercept</b>	-0,0009	0,0007
<b>X Variable 1</b>	1,4803	0,1564

LOQ del19 = **0,45%**

L0D del19 = **0,15%**

❖ **p. G719S**

**Figura 39.** Recta de regresión representando la fracción: mutación G719S/total real (eje de abscisas) y G719S/total teórica (eje de ordenadas).



**Tabla 24.** Resultados teóricos y reales obtenidos para la mutación p.G719S por el sistema de PCR digital.

Ensayo	Target/ total teórico(Y)	Target/Total real(X)
<b>G719S</b>	1%	1,11%
<b>G719S</b>	0,10%	0,11%
<b>G719S</b>	0,50%	0,52%
<b>G719S</b>	0,05%	0,05%

**Tabla 25.** Coeficientes y error típico de la regresión para el ensayo p. G719S.

	Coeficientes	Error típico
<b>Intercepción</b>	0,0001	0,0001
<b>Variable X 1</b>	0,8986	0,0186

**LOQ G719S = 0,13%**

**LOD G719S = 0,04%**

## 2.2. Estudio de intercomparación con un laboratorio externo

Para evaluar la veracidad de los resultados obtenidos mediante PCR digital se llevó a cabo el estudio de 15 muestras de ADN circulante previamente extraído (13 de pacientes y 2 de líneas celulares puras) procedentes de un Laboratorio externo (Laboratorio 1) para la detección de mutaciones en los exones 19 y 21 del gen *EGFR*. Se estableció un valor de 0.1% como punto de corte para considerar un resultado positivo.

**Tabla 26.** Resultados obtenidos por los dos laboratorios en el estudio de intercomparación.

Paciente	Genotipo Lab. 1	Genotipo Lab. 2
PAC 1S	L858R	L858R
PAC 1P	L858R	L858R
PAC 2S	L858R	L858R
PAC 2P	L858R	L858R
PAC 3S	DEL 15 pb(p.E746-A750)	del 19
PAC 3P	DEL 15 pb(p.E746-A750)	del 19
PAC 4S	DEL 18 pb(p.L747-P753>S) + T790M	del 19 +T790M
PAC 4P	DEL 18 pb(p.L747-P753>S) + T790M	del 19+T790M
PAC 5S	DEL 15 pb(p.E746-A750) + T790M	del 19+T790M
PAC 5P	DEL 15 pb(p.E746-A750) + T790M	del 19+T790M
PAC 6S	WT	L858R
PAC 7S	WT	WT
PAC 7P	WT	WT
LC PC9	DEL 15 pb(p.E746-A750)	del 19
LC H1975	L858R + T790M	L858R+T790M

De las 15 muestras analizadas se obtuvieron resultados concordantes en 14 de ellas (93,33%). Además, el sistema de PCR digital implantado fue capaz de detectar las 17 mutaciones presentes en las 15 muestras analizadas (100%).

El único resultado discordante de las 15 muestras (6,6%) fue un control sano que resultó un falso positivo para la mutación p.L858R.

La concordancia entre ambos laboratorios se estableció mediante el Coeficiente Kappa de Cohen.

Concordancia para las muestras:

**Tabla 27.** Concordancia por muestra obtenida para ambos laboratorios.

	Laboratorio 1		
	Positivos	Negativos	
Laboratorio 2	Positivos	12	1
	Negativos	0	2

**Kappa= 0,762 (IC95%0,27-1,25)**

Concordancia para las mutaciones:

**Tabla 28.** Concordancia por mutación obtenida para ambos laboratorios.

	Laboratorio 1		
	Positivos	Negativos	
Laboratorio 2	Positivos	17	1
	Negativos	0	2

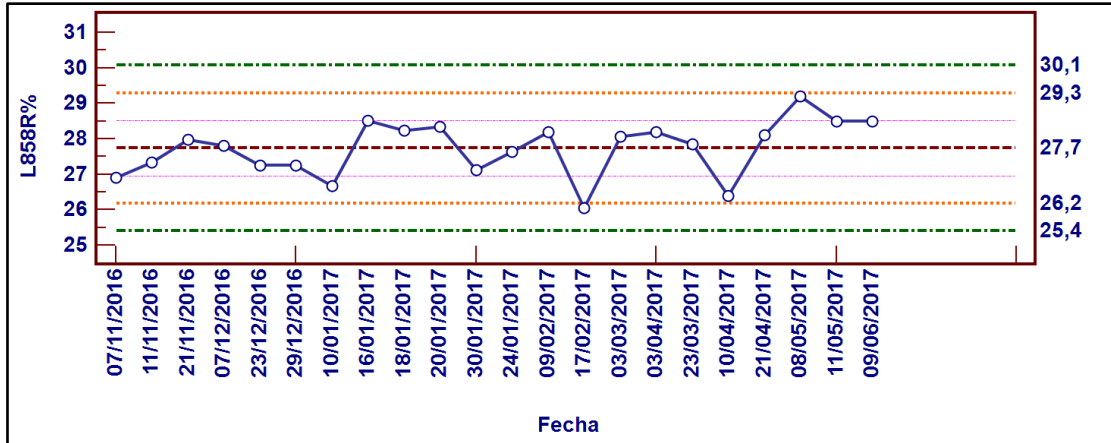
**Kappa= 0,773 (IC95%0,35-1,33)**

### 2.3. Medida de la reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad de la técnica se realizaron 10 medidas consecutivas con cada control positivo y se estableció una media y un límite superior e inferior de confianza (media +/- 2 DS). Las muestras fueron alicuotadas en viales de 50µL y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

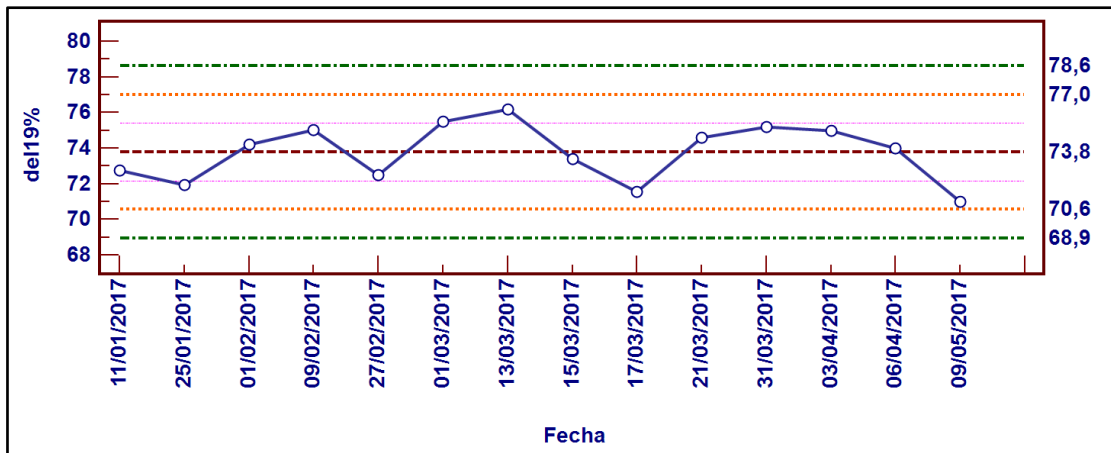
❖ **p. L858R**

Figura 40. Diagramas de Levey-Jennings para el ensayo L858R.



❖ **p. E746 A750delELREA**

Figura 41. Diagramas de Levey-Jennings para el ensayo del19.

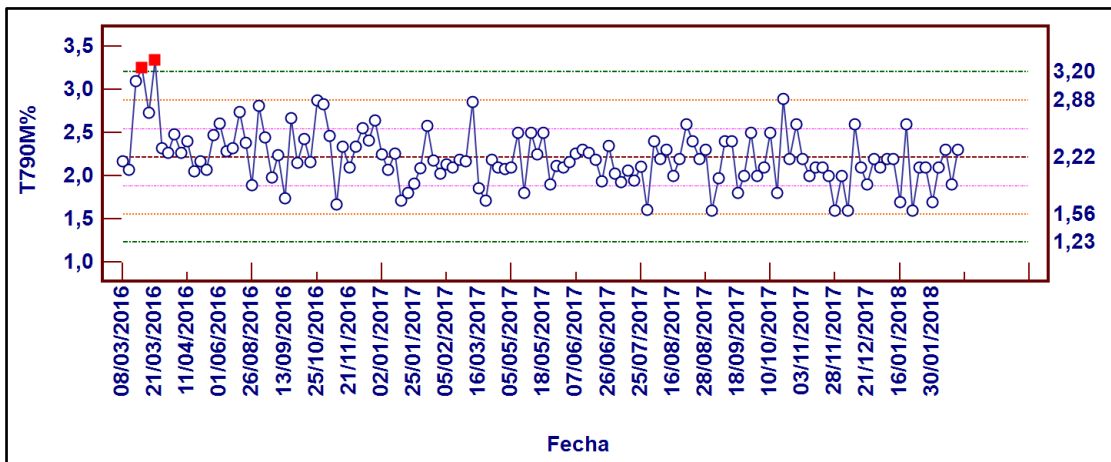


Ambos ensayos se mantuvieron estables a lo largo del tiempo, permaneciendo dentro de los límites de aceptación para controles de calidad (+/-2 desviaciones estándar).

❖ **p.T790M**

En el caso del ensayo para la mutación p.T790M, se utilizó como material de referencia un líquido pleural procedente de un derrame, lo que facilitó la obtención de una gran cantidad de volumen. Esto permitió valorar la reproducibilidad del ensayo durante 3 años consecutivos, con un total de 130 mediciones.

**Figura 42.** Diagrama de Levey-Jennings para el ensayo p.T790M. Las marcas color rojo indican los valores de la serie que no cumplen los requisitos del control de calidad.



En este caso, solo dos puntos del total de 130 mediciones realizadas no cumplieron con los límites de aceptación de los controles de calidad. Sin embargo, ambos resultados correspondían a una misma alícuota que fue desechada, no volviéndose a producir ninguna otra desviación.

Una vez establecidos los rangos de control, se comprobó la reproducibilidad de la técnica para cada ensayo utilizando la muestra de referencia como control positivo tantas veces como permitió el volumen extraído.

### 3. Implantación de un sistema de gestión de calidad para el estudio de biomarcadores en biopsia líquida mediante PCR digital

Para acreditar el correcto desarrollo del estudio de biomarcadores a partir de ADN circulante, se llevó a cabo la implantación de un sistema de gestión de calidad según la norma **UNE-EN ISO 15189**.

Como parte de este modelo de gestión, se elaboraron 21 procedimientos técnicos de trabajo (PNT), donde se describían todos los procesos preanalíticos, analíticos y posanalíticos implicados en el estudio de biomarcadores en biopsia líquida (**tabla 29**). Estos procedimientos recogen de forma detallada todas las actividades, equipamiento y material necesario para poder llevar a cabo cada uno de los procesos que intervienen en el estudio de mutaciones en el gen *EGFR*. Esta documentación permite evaluar si el proceso analítico se realiza de forma correcta, cumpliendo con los requisitos de calidad establecidos para este tipo de pruebas y con la trazabilidad suficiente para identificar el origen de cualquier problema que pudiera surgir durante el proceso.

Además, también se establecieron los requerimientos de personal, equipamiento e instalaciones necesarios para garantizar una correcta realización de dichas pruebas.

El día 6 de abril de 2018, el laboratorio de Oncología Médica obtuvo la acreditación de la ENAC para el “estudio de biomarcadores (*EGFR*) en biopsia líquida” (**Código de acreditación 1296/LE2432**), lo que verifica la correcta ejecución de estos estudios por parte del laboratorio conforme a lo establecido en la norma **UNE-EN ISO 15189**.

Tabla 29. Procedimientos Normalizados de Trabajo.

PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO	
<b>GRUPO 1</b>	<b>PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS CON EL PERSONAL</b>
1	PNT-G1-01 Procedimientos relacionados con el personal del Laboratorio
<b>GRUPO 2</b>	<b>PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS CON LAS INSTALACIONES Y CONDICIONES AMBIENTALES</b>
2	PNT-G2-01 Organización de las instalaciones del Laboratorio
<b>GRUPO 3</b>	<b>PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS CON EL EQUIPAMIENTO</b>
3	PNT-G3-01 Procedimientos relacionados con el equipamiento del laboratorio
4	PNT-G3-02 Gestión de material y reactivos
5	PNT-G3-03 Mantenimiento y calibración de los equipos
<b>GRUPO 4</b>	<b>PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS CON LOS PROCESOS DE LABORATORIO</b>
<b>PROCEDIMIENTOS PREANALÍTICOS</b>	
6	PNT-G4-09 Procedimiento para la generación de la petición de análisis de biomarcadores en biopsia líquida
7	PNT-G4-10 Procedimiento para establecer la toma y el flujo de la muestra.
8	PNT-G4-11 Gestión de muestras externas para el estudio de biomarcadores en biopsia líquida
9	PNT-G4-01 Registro y procesamiento de las muestras de suero para extracción de DNA libre circulante
10	PNT-G4-15 Procedimiento para el registro de pacientes en el estudio OPH1
11	PNT-G4-16 Procedimiento para la extracción, el envío y transporte de muestras de cáncer hereditario
<b>PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS</b>	
12	PNT-G4-02 Extracción de ADN circulante en plasma (biopsia líquida) y almacenamiento de las muestras
13	PNT-G4-03 Cuantificación del DNA circulante extraído en suero y su registro
14	PNT-G4-04 Procedimiento para la identificación de mutaciones del gen EGFR en biopsias líquidas por PCR digital
15	PNT-G4-05 Procedimiento para el control de la calidad de la PCR digital
16	PNT-G4-06 Registro y actualización de los datos obtenidos de los controles positivos de PCR digital
17	PNT-G4-07 Procedimiento para la lectura de PCR digital
<b>PROCEDIMIENTOS POSANALÍTICOS</b>	
18	PNT-G4-08 Procedimiento para la subida de datos de PCR digital al software de análisis e interpretación
19	PNT-G4-12 Emisión del informe de resultados
20	PNT-G4-14 Almacenamiento, retención y desecho de muestras clínicas
21	PNT-G4-13 Aseguramiento de la calidad de los procedimientos preanalíticos, analíticos y posanalíticos

---

## 4. Validación clínica del estudio de biomarcadores a partir de cfDNA

### 4.1. Utilidad clínica de la sangre

Como parte del Proyecto PIE14/00064: **“Personalized Medicine in Oncology: researching a model capable of improving and predicting the result treatment based in molecular mechanisms, tumor biology, images, IT, and murine model”** se realizó el estudio prospectivo de 41 pacientes con cáncer de pulmón portadores de mutaciones activadoras en el gen *EGFR*. Los pacientes fueron reclutados entre los meses de febrero y diciembre de 2015. La mediana de la edad fue de 61 años (30-83). La mediana del tiempo de seguimiento fue de 10 meses.

Se realizaron un total de 251 muestras de ADN circulante mediante el sistema de PCR digital, con una media de muestras por paciente de 6,1. En todas las muestras se analizó de forma conjunta la mutación de inicio (tejido) en el gen *EGFR* y la mutación de resistencia p.T790M. La mutación *sensitizing* detectada en el tumor de los pacientes incluidos en el estudio se describe en la tabla 32. La mutación p.T790M no se detectó en ninguna de las muestras basales. Las mutaciones y su evolución a lo largo del tiempo fueron correlacionadas con la respuesta tumoral radiológica en función de los criterios RECIST v1.1.

Durante el estudio, 26 pacientes (63%) desarrollaron enfermedad progresiva (PD) según los criterios RECIST, y se contabilizaron 15 fallecimientos (37%). La re-biopsia de tejido únicamente se realizó en 7 casos (27%) del total de progresiones. La mutación p.T790M se detectó en 3 tumores (12%).

La mediana de la supervivencia libre de progresión (SLP) para el tratamiento de primera línea con TKIs fue de 14,2 meses (IC95% 8,0-23,9). Los pacientes portadores de una delección en el exón 19 mostraron la mayor SLP (mediana: 23,9 meses; IC:95% 8,7-58).

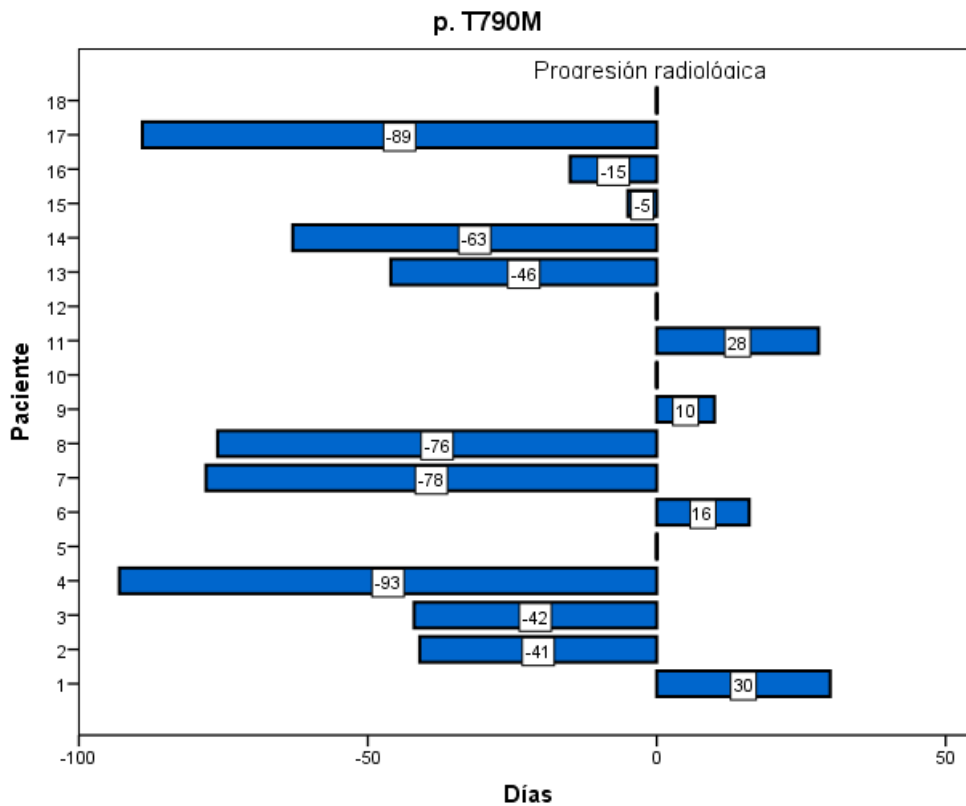
**Tabla 30.** Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio

Datos clinicopatológicos	Categoría	N	(%)
Sexo	Mujer	23	56,1%
	Hombre	18	43,9%
Hábito tabáquico	Fumador/exfumador	19	46,3%
	No fumador	22	53,7%
Histología	Adenocarcinoma	39	95,1%
	Carcinoma Escamoso	2	4,9%
Estadío IJCC	III	4	9,8%
	IV	37	90,2%
Mutación EGFR	deleción exón 19	24	58,5%
	inserción exón 20	3	7,3%
	G719X	4	9,8%
	L858R	10	24,4%
Tratamiento	1ª línea TKI	37	90,2%
	Gefitinib	12	29,3%
	Erlotinib	20	48,8%
	Afatinib	5	12,2%
	2ª línea TKI	4	9,8%
	Osimertinib	1	2,4%
	Afatinib+Cetuximab	1	2,4%
	Erlotinib+Pemetrexed	1	2,4%
Gefitinib+Pemetrexed	1	2,4%	

Según nuestros datos, el hallazgo de la mutación p.T790M junto con el incremento de la mutación *sensitizing* de inicio en muestras seriadas de plasma se asoció con el estado de enfermedad progresiva ( $p < 0,001$ ). En nuestra cohorte de pacientes, de los 26 que progresaron durante el seguimiento, se evidenció un aumento de la mutación *sensitizing* en 24 de ellos (92%). Además, en 18 de estos casos (69%) se detectó la mutación p.T790M de forma concomitante.

Los resultados de este estudio concluyeron también que los pacientes cuya mutación p.T790M permaneció indetectable por PCR digital presentaron 12 veces más probabilidad de mantener la respuesta o la enfermedad estable que aquellos pacientes que presentaron un resultado positivo para p.T790M en alguna de las muestras. De forma similar, aquellos pacientes en los que no se evidenció una elevación de la mutación de sensibilidad durante el estudio presentaron 4,8 veces menos probabilidad de tener una enfermedad progresiva que aquellos pacientes en los que existía un aumento de esta mutación.

**Figura 43.** Número de días de diferencia entre la detección de la mutación de resistencia p.T790M y la progresión radiológica.



De los 18 pacientes con progresión y resultado de p.T790M positivo, 10 (56%) presentaron la mutación antes de evidenciarse la progresión radiológica, con una media de 55 días de antelación (desde 93 a 5 días). Además, 4 pacientes (22%) presentaron la mutación de resistencia el mismo día de la progresión radiológica, y otros 4 pacientes (22%) durante el primer mes tras la progresión radiológica. Por otro lado, en 8 pacientes (39%) se objetivó un aumento de la mutación *sensitizing* de forma previa a la mutación de resistencia p.T790M.

También se evaluó el valor pronóstico de la cuantificación del ADN circulante mediante el modelo de regresión de Cox. Tanto el incremento la mutación *sensitizing* de inicio como el aumento de la mutación p.T790M se asociaron a una menor SLP ( $p < 0,05$ ) durante el tratamiento de primera línea con TKIs.

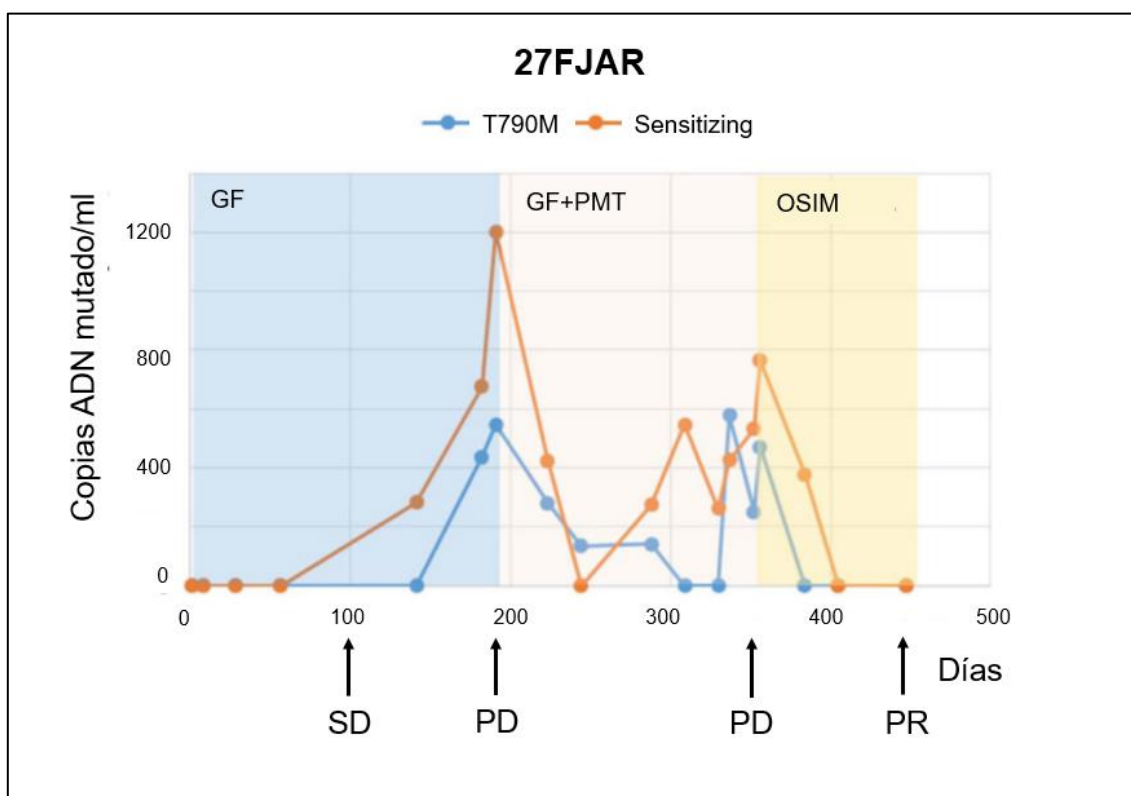
HR *sensitizing* (SLP)=1,083 (IC95%1,01-1,11)

HR p.T790M (SLP)=2,705 (IC95%1,18-3,92)

Además, los incrementos de la mutación p.T790M también se relacionaron con una menor supervivencia total ( $p < 0,05$ ).

HR p.T790M (OS)= 2,676 (IC95%=1,384-5,176).

**Figura 44.** Evolución de las mutaciones *sensitizing* y p.T790M a lo largo de los diferentes tratamientos en uno de los pacientes incluidos en el estudio.



Por último, se evaluó la sensibilidad y la especificidad, el valor predictivo positivo y negativo y la razón de verosimilitud positiva y negativa del ADN circulante para discriminar entre pacientes con enfermedad progresiva y sin enfermedad progresiva según los criterios RECIST v1.1. Para ello se escogieron 27 de los 41 pacientes, que cumplieran los siguientes requisitos:

- Mínimo de 3 muestras en el estudio
- En pacientes con enfermedad progresiva, resultados previos al estudio radiológico con menos de 1 mes de diferencia entre la última muestra y el estudio.
- En pacientes sin enfermedad progresiva, resultados hasta fin del estudio.

Se consideró progresión molecular al incremento de mutación *sensitizing* durante al menos dos muestras consecutivas y/o la aparición de la mutación p.T790M.

Los resultados obtenidos se describen a continuación:

**Tabla 31.** Concordancia entre la progresión molecular y la progresión radiológica.

Progresión molecular	Progresión radiológica	
	Positivos	Negativos
Positivos	14	3
Negativos	3	7

**Tabla 32.** Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN), razón de verosimilitud positiva (P) y negativa (N) calculadas para la discriminación ante una enfermedad progresiva mediante ADN circulante.

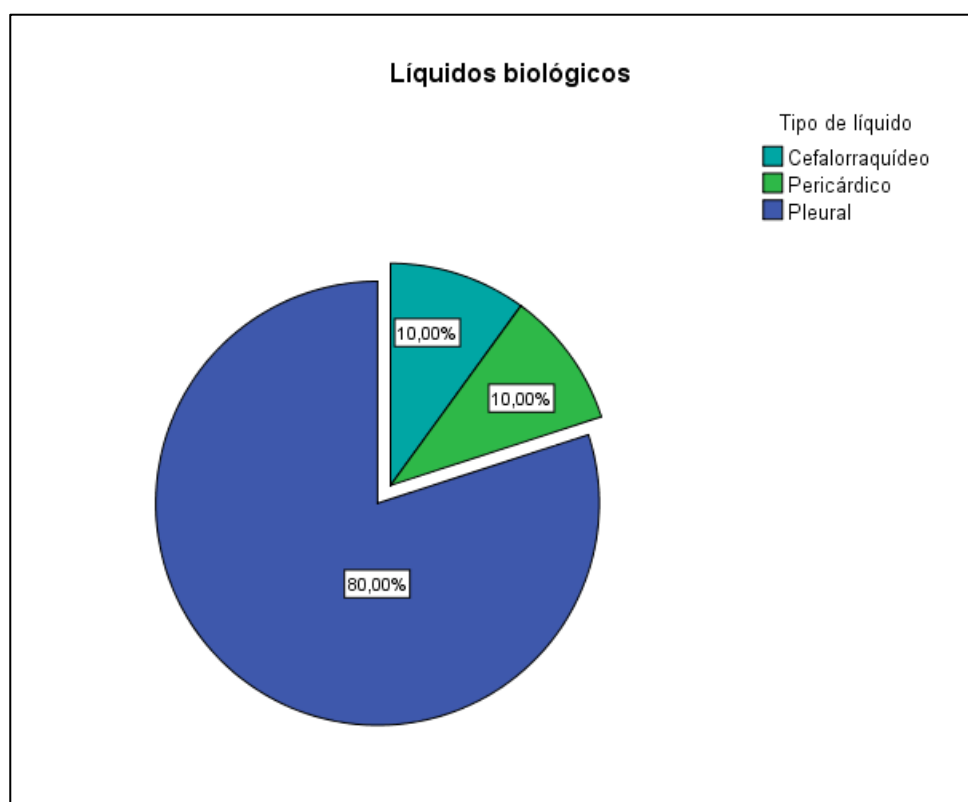
Parámetro	Valor
S	82,4%
E	70,0%
VPP	82,4%
VPN	70,0%
P	2,7
N	0,3

## 5. Utilidad clínica de los líquidos biológicos

El estudio de mutaciones en el gen *EGFR* se realizó de forma simultánea a la sangre en 10 líquidos biológicos (8 líquidos pleurales, 1 líquido cefalorraquídeo y 1 líquido peritoneal). Las mutaciones de inicio detectadas en el tumor fueron:

- p. L858R en 6 pacientes
- delección en el exón 19 en 4 pacientes.

**Figura 45.** Tipos de líquidos analizados en el estudio según su localización.



En cada muestra se realizaron 2 mediciones, la mutación *sensitizing* identificada en el tumor, y la mutación de resistencia p.T790M.

Los resultados obtenidos tras el análisis se detallan a continuación.

### 5.1. Análisis cuantitativo

#### 1. Plasma

- La mediana de la fracción de alelo mutado (MAF) obtenida fue **0,209%** (Q1= 0,00; Q3= 0,591).

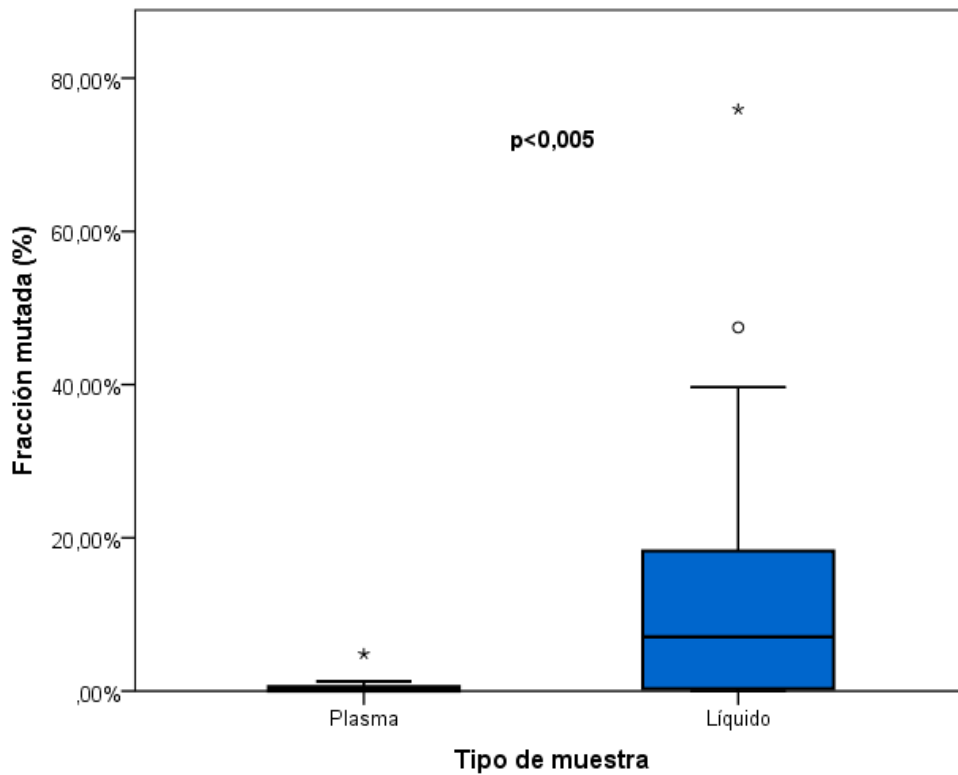
- La mediana de las copias mutadas por ml de plasma obtenida fue **309,03 copias/ml.** (Q1= 0,00; Q3= 785,77).

2. Líquidos biológicos

- La mediana de la fracción de alelo mutado (MAF) obtenida en los líquidos fue **7,07%** (Q1=0,305; Q3= 18,27).

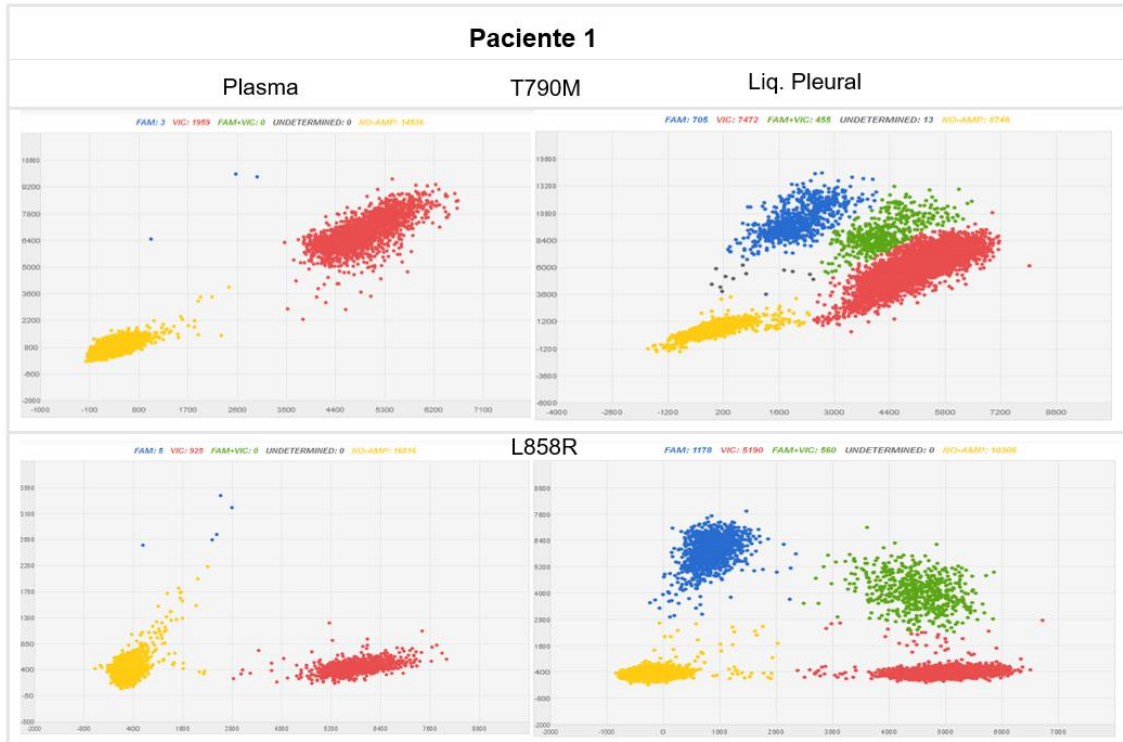
- La mediana de las copias mutadas por ml de líquido obtenida fue **10797,84 copias/ml.** (Q1= 187,26; Q3= 689290,57).

**Figura 46.** Diagrama de cajas representando la frecuencia de alelo mutado obtenida en las muestras de plasma y de líquido biológico.

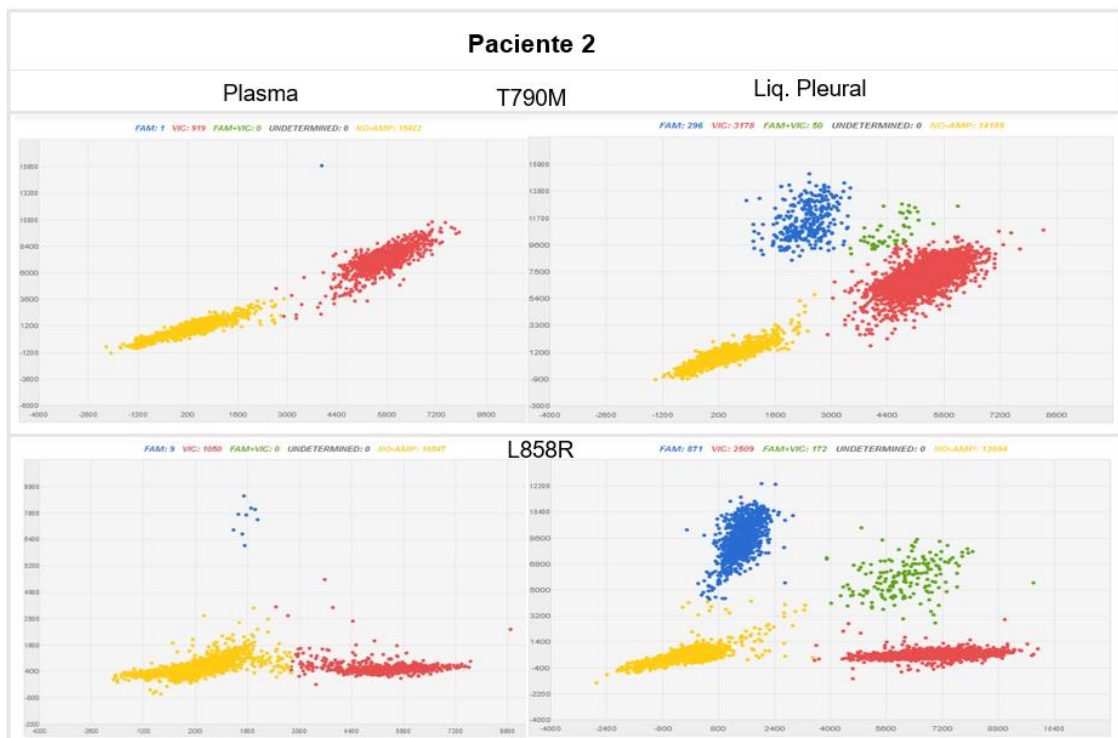


Tanto la fracción alélica mutada como el número de copias por mililitro obtenidas fueron significativamente superiores en los líquidos biológicos ( $p < 0,005$  para ambos casos).

**Figura 47.** Diagrama de dispersión del estudio de mutaciones en el gen *EGFR* en el paciente 1. Cada color corresponde a una sonda diferente: azul corresponde a la sonda FAM que identifica el ADN mutado, rojo corresponde a la sonda VIC que identifica el ADN wild-type y verde corresponde a la mezcla de ambas sondas cuando convergen en un mismo pocillo ADN mutado y ADN wild-type. El color amarillo corresponde a los pocillos no amplificados.



**Figura 48.** Diagrama de dispersión del estudio de mutaciones en el gen *EGFR* en el paciente 2.



**5.2. Análisis cualitativo**

Adicionalmente se evaluó la utilidad de los líquidos biológicos y del plasma para detectar las mutaciones en el gen *EGFR*.

De las 20 mutaciones analizadas (2 por cada muestra), se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 33.** Tabla de contingencia con el resultado de las mutaciones obtenidos en el plasma y en los líquidos.

Líquido	Plasma	
	Negativo	Positivo
Negativo	3	1
Positivo	3	13

En los líquidos se contabilizaron 16 resultados positivos de los 20 analizados (80%), tres de los cuales resultaron negativos en plasma.

En el plasma se contabilizaron 14 resultados positivos (70%), siendo uno de ellos negativo en el líquido.

Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas ( $p=0,625$ ).

**Utilidad de los líquidos biológicos para la detección de la mutación p.T790M**

Se realizaron los mismos estudios analizando exclusivamente los resultados de la mutación p.T790M debido a las implicaciones clínicas de esta mutación.

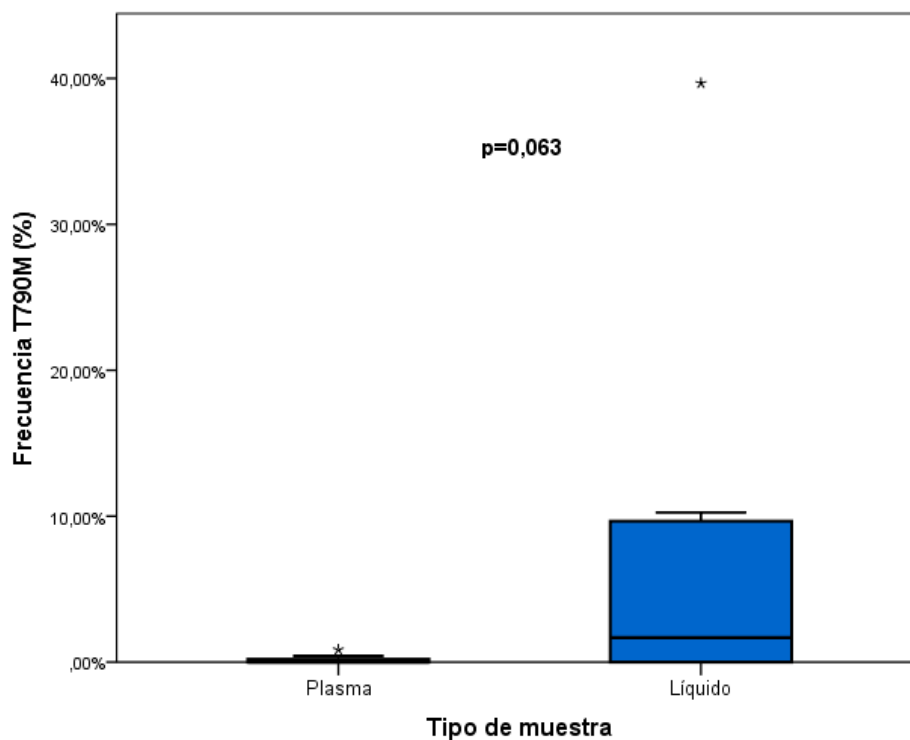
- La mediana de la fracción de alelo mutado (MAF) obtenida en los líquidos biológicos fue **1,67%** (Q1= 0,00%; Q3= 9,66%).
- La mediana de la fracción de alelo mutado (MAF) obtenida en plasma fue **0,00%** (Q1= 0,00%; Q3= 0.20%).

En este caso, las diferencias tampoco fueron significativas ( $p=0,063$ ).

Para el estudio cuantitativo se estableció un punto de corte de 0.1%. El estudio en los líquidos biológicos detectó la mutación de resistencia p.T790M en 6 de los 10 pacientes (60%) mientras que el estudio en sangre detectó la misma mutación en 4 de los 10

pacientes (40%). Todas las mutaciones detectadas en plasma fueron también detectadas en líquido.

**Figura 49.** Diagrama de cajas representando la frecuencia de alelo mutado obtenida en las muestras de plasma y de líquido biológico para la mutación p.T790M.



**Tabla 34.** Tabla de contingencia con el resultado de las mutaciones p.T790M obtenidos en el plasma y en los líquidos biológicos.

	Plasma		
	Negativo	Positivo	
Líquido	Negativo	4	0
	Positivo	2	4

En ambos casos, las diferencias observadas no fueron significativas ( $p=0,063$ ;  $p=0,500$ ).

6. Estudio de biomarcadores en cfDNA mediante secuenciación masiva

6.1. Descripción de la cohorte

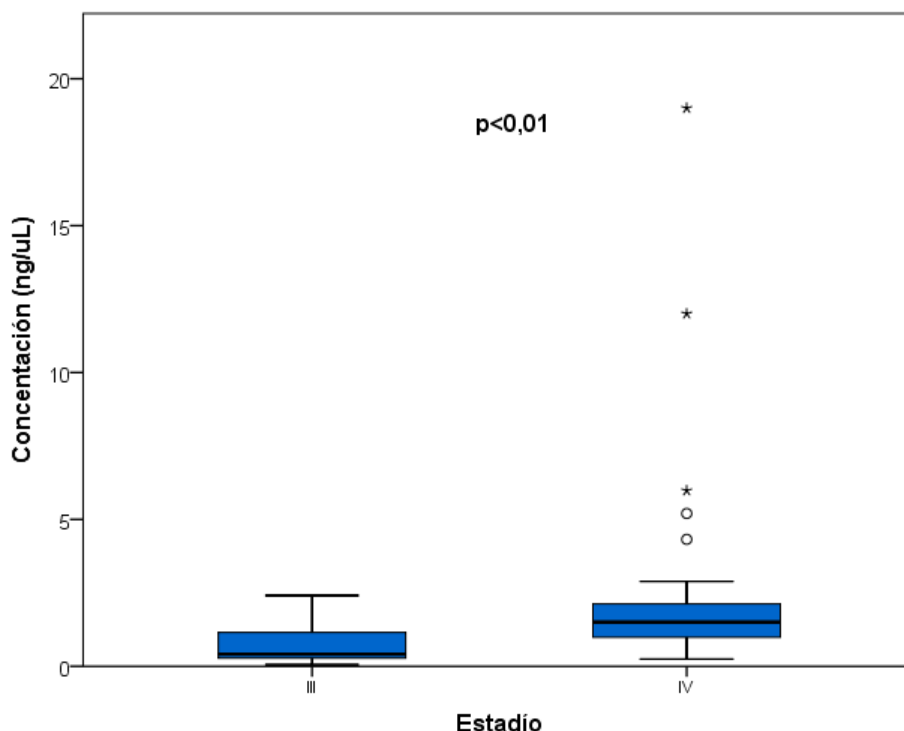
Se analizaron 52 pacientes con CPNCP, la mayoría de ellos diagnosticados como Adenocarcinoma (N=40) avanzado o estadio IV (N=36) (tabla 35). Además, se incluyeron 2 donantes sanos como controles negativos.

Tabla 35. Características clínico-patológicas de la cohorte analizada.

Característica	Grupo	N	%
Edad (años)	Mediana	65	
	Rango	41-85	
Sexo	Hombres	29	55,77%
	Mujeres	23	44,23%
Fumador	Fumadores/Exfumadores	32	61,54%
	No fumadores	20	38,46%
Histología	Adenocarcinoma	40	76,92%
	Carcinoma escamoso	10	19,23%
	Otros	2	3,85%
Estadío	III	16	30,77%
	IV	36	69,23%
Clasificación molecular	Mutado EGFR	31	59,62%
	Traslocado ALK	4	7,69%

Las 54 muestras secuenciadas obtuvieron una mediana de concentraciones de cfDNA de 1,13 ng/  $\mu$ L (Q1=0,48; Q3=1,83). Según nuestros datos, la concentración de cfDNA está estrechamente relacionada con el estadio tumoral, mostrando valores significativamente más bajos en pacientes con estadio III que con estadio IV (0,4 ng/ $\mu$ L vs 1.5 ng/ $\mu$ L; p<0,01). Además, la media de mutaciones para los pacientes metastásicos fue superior que para los pacientes no metastásicos, aunque estas diferencias no fueron significativas. El número de mutaciones encontradas no fue dependiente de la concentración de cfDNA.

**Figura 50.** Mediana de las concentraciones en función del estadio tumoral. Las barras de error indican los percentiles 25 y 75.



## 6.2. Secuenciación masiva (NGS)

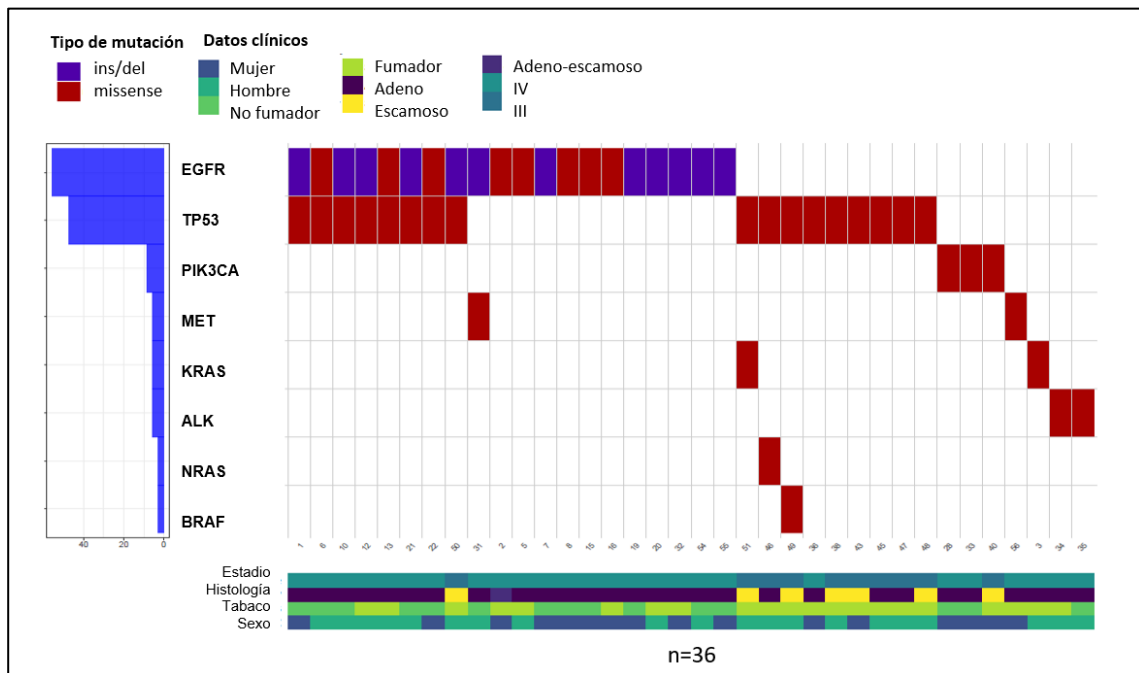
La mediana de la cantidad de cfDNA secuenciada por muestra fue 14,7 ng (Q1:4,3 ng; Q3:20,0 ng). En 34 de las muestras de pacientes con cáncer de pulmón (65,4%), la concentración de cfDNA inicial fue inferior a 1,55 ng/ $\mu$ l, por lo que la cantidad añadida en la secuenciación fue inferior a 20 ng (cantidad recomendada por el fabricante). Sin embargo, se detectaron mutaciones somáticas en 24 (70,6%) de estos pacientes.

La densidad media por chip secuenciado fue de 93,7%, con una media de lecturas por carrera de 13,1 millones. La media de lecturas por muestra fue 1,4 millones, con una mediana de profundidad de 28090 lecturas. Las medianas de la cobertura total y molecular fueron 27327 y 2519 respectivamente. Con estas condiciones, nuestro estudio fue capaz de detectar al menos una mutación somática en 36 de los 52 pacientes analizados (69,2%). No se detectó ninguna mutación en los dos controles sanos.

En la población enferma se detectaron un total de 61 mutaciones, con una media de 1,2 mutaciones por paciente y una mediana de MAF de 0,64%. La mayoría de las

mutaciones detectadas fueron cambios de nucleótido único (SNP) (N=49). También se contabilizaron 11 deleciones y una inserción.

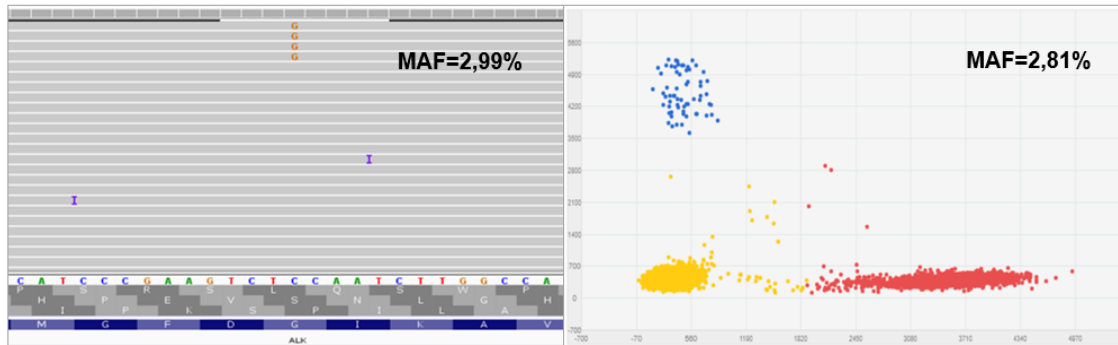
**Figura 51.** Co-mutation plot con los resultados del análisis del cfDNA por NGS de los pacientes con CPNCP. Cada columna representa un paciente que se encuentra identificado mediante un número. Las alteraciones tipo indels aparecen en color azul, mientras que las missense lo hacen en color rojo. Las características de los pacientes se recogen en las barras localizadas en la parte inferior del gráfico.



Del total de las muestras que no presentaron mutaciones durante el estudio (N=16), 6 correspondieron a pacientes con estadio III y 10 a pacientes con estadio IV. Las concentraciones de estas muestras no demostraron diferencias significativas con las concentraciones de muestras positivas para la secuenciación ( $p=0,949$ ). Además, tampoco se encontraron diferencias significativas en el número ni en la frecuencia de las mutaciones entre los pacientes con estadio III y IV ( $p=0,23$  y  $p=0,65$ ).

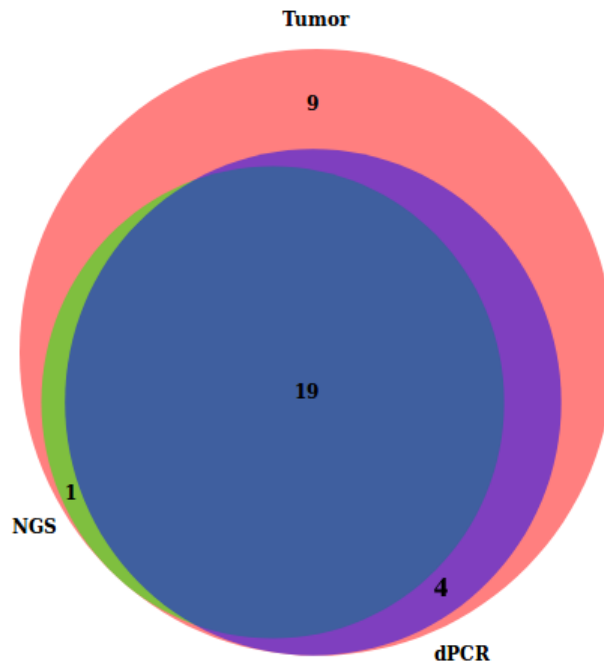
Utilizando este panel, se detectaron mutaciones en 8 de los 11 genes (72.7%) que pueden analizarse con el kit **Oncomine™ Lung cfDNA**, siendo *EGFR* y *TP53* los genes mutados con mayor frecuencia. De esta forma, el 38,5% de los pacientes (N=20) presentaron mutaciones en el gen *EGFR* y el 32,7% (N=17) presentaron mutaciones en *TP53*. Sorprendentemente, la mutación de resistencia a inhibidores de *ALK* p.G1269A fue encontrada en dos pacientes con translocación de *ALK* tratados con Crizotinib.

**Figura 52.** Mutación de resistencia p.G1269A en el gen *ALK* detectada por NGS y por dPCR.



De forma adicional, se obtuvo el estado mutacional en *EGFR* en la biopsia de tejido a partir de la historia clínica de los pacientes metastásicos. De los 31 pacientes con mutación *EGFR*, se contabilizaron un total de 33 mutaciones en la muestra de tejido (2 pacientes presentaban 2 mutaciones *sensitizing* de forma simultánea). Todas las mutaciones *sensitizing* encontradas por NGS (N=20), estaban descritas en la muestra de tejido. Sin embargo, la secuenciación masiva no fue capaz de detectar 13 mutaciones *sensitizing* que habían sido detectadas en la biopsia de tejido. De estas 13 mutaciones, 4 pudieron detectarse en sangre por dPCR.

**Figura 53.** Diagrama de Venn representando el total de mutaciones *sensitizing* en el gen *EGFR* detectadas en el tumor (rosa), en sangre por secuenciación masiva (verde) y por dPCR (morado). Las mutaciones detectadas por las tres metodologías se representan en color azul.

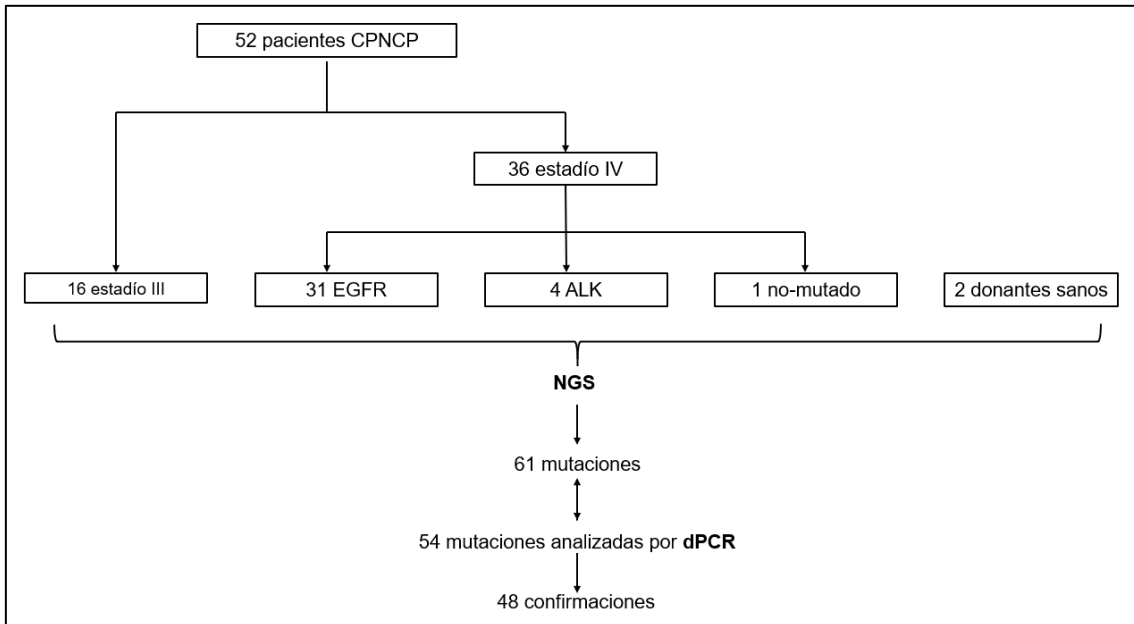


6.3. Concordancia entre NGS y PCR digital

De las 61 mutaciones detectadas por secuenciación masiva, 54 (88,5%) fueron analizadas de forma adicional por el sistema de PCR digital QuantStudio 3D, utilizando ensayos Taqman comerciales y diseñados. Para el análisis por dPCR, la mediana de cfDNA utilizado fue 9,8 ng.

De los 36 pacientes que presentaron mutaciones alguna mutación durante la secuenciación, 34 fueron evaluados en el estudio de comparación entre NGS y dPCR. Esta cohorte de pacientes presentó un total de 54 mutaciones por NGS. De estas, 48 fueron confirmadas por dPCR (88,9%).

Figura 54. Flujo de trabajo del estudio NGS.

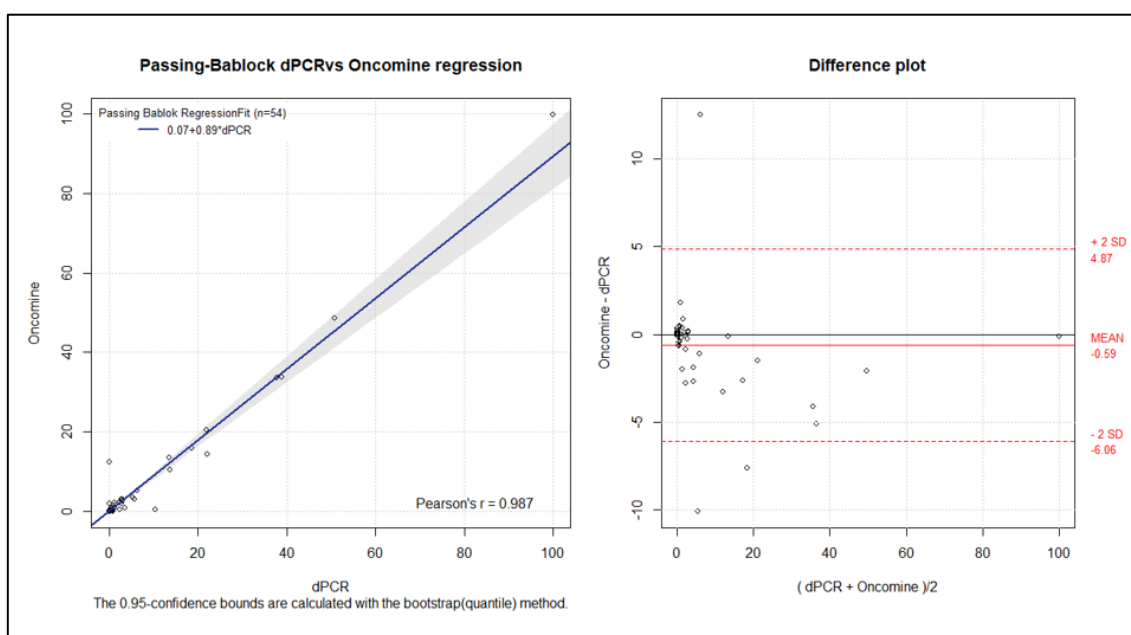


Las 6 mutaciones que no fueron confirmadas por dPCR estaban cercanas al límite de detección de ambas técnicas (0,1%), excepto la inserción de 9pb p.M766\_A767insASV en el gen *EGFR*, que fue detectada por NGS con una frecuencia de 12,5%. Para su confirmación por dPCR, se diseñó un ensayo custom que no detectó la mutación. Sin embargo, la tecnología de dPCR está optimizada para inserciones más cortas, lo que puede explicar esta discrepancia. La posterior secuenciación masiva del tejido tumoral demostró la presencia de esta mutación en el tumor.

Tanto el coeficiente de correlación de concordancia de Lin como el coeficiente de correlación de Pearson entre las frecuencias mutacionales (MAF) obtenidas por NGS y dPCR revelaron una relación positiva y lineal entre dos conjuntos de datos ( $p_c = 0,986$ , IC 95% = 0,975 a 0,991 y  $r = 0,987$ ;  $p < 0,0001$  respectivamente).

El análisis de regresión Passing-Bablok de ambos métodos dio como resultado una ecuación de regresión  $y = 0,067$  (IC 95% = -0,017 a 0,152) + 0,893 (IC 95% = 0,810 a 0,973) x, mostrando una excelente concordancia entre ambas metodologías. La prueba de Cusum para la linealidad no indicó una desviación significativa de la linealidad ( $p > 0,10$ ). El gráfico de Bland-Altman del mismo conjunto de datos mostró un pequeño sesgo entre los dos métodos (sesgo = -0,59, IC 95% -6,06 a 4,87) con solo tres mediciones (cercanas al LOD) fuera del intervalo de confianza.

**Figura 55.** Gráficos de regresión Passing-Bablok y gráfico Bland-Altman para las frecuencias mutacionales obtenidas por NGS y dPCR (N=54).

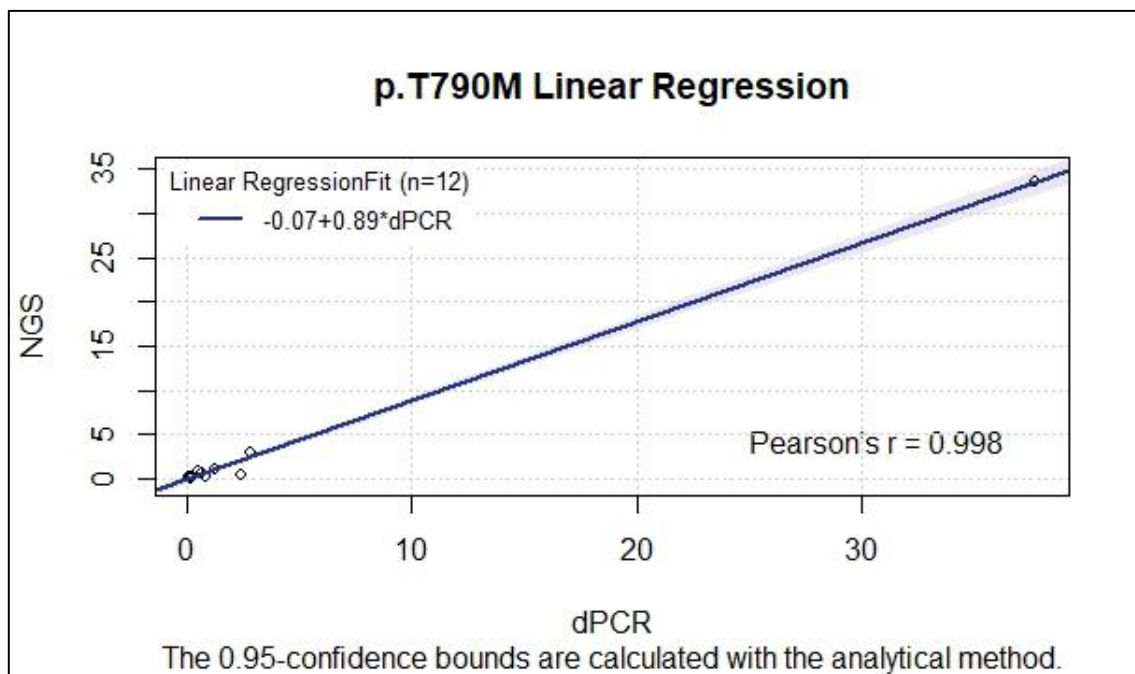


De forma similar, se restringió el análisis a muestras con una cantidad de cfDNA mayor o igual a 10 ng ( $n = 35$ ). El coeficiente de correlación de concordancia de Lin ( $\rho_c = 0,995$ , IC 95% = 0,990 a 0,997) y el coeficiente de correlación de Pearson ( $r = 0,996$ ;  $p < 0,0001$ ) mostraron una concordancia casi perfecta entre los MAF obtenidos por ambas tecnologías. Del mismo modo, en estas condiciones, la ecuación de regresión Passing-Bablok fue  $y = 0,079$  (-0,023 a 0,173) + 0.883 (0,758 a 1,012) x. La gráfica de Bland-Altman mostró el mismo sesgo entre los dos métodos que la situación anterior (sesgo = -0,59) con límites de acuerdo del 95% más estrictos (-3,98 a 2,80). Solo dos mediciones estuvieron fuera del intervalo de confianza. Estos resultados corroboraron un acuerdo casi perfecto entre ambas metodologías cuando la cantidad de cfDNA utilizada fue de al menos 10 ng.

#### 6.4. Utilidad para la detección de la mutación p.T790M

Debido a sus importantes implicaciones clínicas, la mutación p.T790M se analizó en los 52 pacientes con cáncer de pulmón por ambas metodologías. La proporción de concordancia observada entre NGS y dPCR fue del 92,3% con un Kappa = 0,81 (IC del 95% = 0,62 a 0,99), lo que indica una concordancia casi perfecta entre ambos métodos. Sorprendentemente, todos los casos en los que la mutación de resistencia p.T790M fue identificada por NGS fueron confirmados por dPCR con una excelente correlación en términos de MAF ( $\rho_c = 0,991$ , IC 95% = 0,981 a 0,992 y r de Pearson = 0,998;  $p < 0,0001$ ).

**Figura 56.** Gráfica de regresión lineal representando los resultados de p.T790M obtenidos por NGS y dPCR.



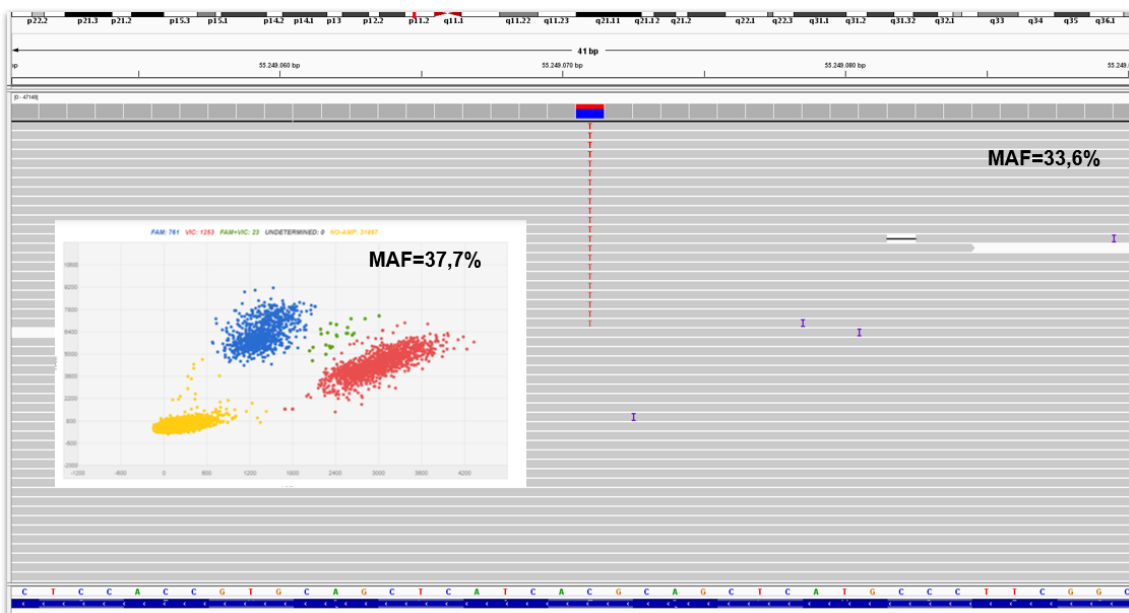
Finalmente, para valorar la capacidad diagnóstica del test en comparación con la PCR digital (que fue considerada el método gold standard<sup>2</sup>), se calculó la sensibilidad, la especificidad, valor predictivo positivo, negativo y razón de verosimilitud positiva y negativa.

<sup>2</sup> Técnica de referencia, mejor alternativa diagnóstica existente para estudiar una determinada enfermedad o evento.

**Tabla 36.** Datos obtenidos para la detección de la mutación p.T790M por NGS tomando como gold standard los resultados obtenidos por dPCR.

	Resultado	IC 95%
Sensibilidad	75,00%	47,62% - 92,73%
Especificidad	100,00%	90,26% - 100,00%
Likelihood Ratio Positivo		
Likelihood Ratio Negativo	0,25	0,11 - 0,58
Prevalencia	30,77%	18,72% - 45,10%
Valor Predictivo Positivo	100,00%	73,54% - 100,00%
Valor Predictivo Negativo	90,00%	76,34% - 97,21%

**Figura 57.** Imagen de la mutación p.T790M en el paciente 32VVM por ambas metodologías.





# DISCUSIÓN





En la última década, el algoritmo terapéutico de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado ha experimentado importantes cambios con el desarrollo de fármacos dirigidos a dianas moleculares, en lo que se conoce como “medicina personalizada”. Esta forma de seleccionar el tratamiento en función de las características moleculares de los tumores ha permitido una orientación diagnóstica y terapéutica mucho más individualizada, y en el caso del cáncer de pulmón, una importante mejora en la calidad de vida de los pacientes por la administración oral de los fármacos que la componen. En este sentido, el descubrimiento de alteraciones moleculares susceptibles al tratamiento con terapias dirigidas en el tejido tumoral ha supuesto una revolución en el abordaje terapéutico de los pacientes con cáncer de pulmón, debido a su utilidad como factores predictivos de respuesta a estos fármacos.

Se define un factor predictivo como aquel parámetro medible que es capaz de identificar a aquellos pacientes que van a beneficiarse de un tratamiento específico <sup>110</sup>. En el caso del cáncer de pulmón no microcítico avanzado, los principales biomarcadores predictivos son alteraciones que confieren sensibilidad a los fármacos inhibidores de tirosina kinasa, como las mutaciones en el gen *EGFR* o los reordenamientos en *ALK* y *ROS1*. Su estudio se realiza de forma rutinaria durante el diagnóstico en el propio tejido tumoral del paciente <sup>111</sup>. La re-biopsia está recomendada siempre que sea de utilidad para guiar el tratamiento con fármacos dirigidos, como por ejemplo, en la detección de la mutación p.T790M. Esta mutación aparece en aproximadamente el 60% <sup>39,112–114</sup> de las re-biopsias de pacientes mutados en *EGFR* que han progresado al tratamiento con TKIs de 1ª y 2ª generación, permitiendo el acceso a una nueva línea de tratamiento. Sin embargo, la obtención de una muestra representativa del tumor supone en muchas ocasiones un reto para el clínico, debido al difícil acceso al tejido tumoral y al riesgo asociado de la intervención, por lo que la re-biopsia no es una práctica que se realice de forma rutinaria <sup>115</sup>. Por este motivo, los estudios en ADN circulante han adquirido un papel fundamental para la detección de estos **biomarcadores predictivos** de forma no invasiva.

En este ámbito, el uso más extendido del cfDNA lo encontramos con las mutaciones en el gen *EGFR*, y en especial, con la mutación de resistencia p.T790M. Diversos autores han analizado la utilidad del cfDNA para la detección de esta mutación de forma paralela al tejido <sup>116–118</sup>. Sin embargo, la evaluación de los resultados obtenidos en estos estudios no es sencilla, ya que ante una discordancia resulta difícil valorar si se debe a factores biológicos <sup>76,105,119</sup>, como el estadio o la heterogeneidad tumoral, o a factores analíticos. La concordancia entre ambos métodos suele variar entre un 70% a un 90% dependiendo de la tecnología utilizada <sup>120</sup>. De hecho, la especificidad analítica de estos ensayos es

por lo general muy elevada, llegando a superar el 95%<sup>119</sup>. Esto hace posible que, ante un paciente en progresión a TKIs-*EGFR* de 1ª y 2ª generación, se recomiende el estudio de esta mutación a partir de cfDNA cuando la obtención de tejido presente alguna dificultad. Sin embargo, la principal limitación del cfDNA es que posee una sensibilidad limitada con respecto al tejido tumoral<sup>104,121</sup>, lo que reduce el valor predictivo negativo de la prueba. Por esta razón, las guías clínicas<sup>111,122</sup> recomiendan la rebiopsia ante resultados negativos en biopsia líquida.

Otra aplicación importante del cfDNA es su utilidad como **biomarcador pronóstico**. Un biomarcador pronóstico es aquel que se utiliza para identificar la probabilidad de un evento clínico, la recurrencia de la enfermedad o la progresión en pacientes que tienen la enfermedad o condición médica de interés<sup>123</sup>. En este aspecto, el cfDNA en pacientes con cáncer de pulmón avanzado puede proporcionar información relevante mediante diferentes estudios. Así, por ejemplo, la aparición de mutaciones de resistencia durante el tratamiento con fármacos dirigidos, como la mutación p.T790M en pacientes tratados con TKIs de 1ª y 2ª generación, puede ser un marcador pronóstico de progresión al tratamiento<sup>124</sup>. Además, esta mutación de resistencia puede detectarse de forma previa a la progresión radiológica<sup>125,126</sup>, lo que abre un nuevo debate sobre el momento óptimo para iniciar el cambio de tratamiento. A pesar de que se han descrito diversas mutaciones de resistencia como p.C797S y p. L718Q<sup>127</sup> en el gen *EGFR* en pacientes tratados con Osimertib o p. G1269A<sup>128</sup> en el gen *ALK* en pacientes tratados con Crizotinib, su estudio no está recomendado en la práctica clínica de estos pacientes, pese a que, de forma similar a lo que ocurre con la mutación p.T790M, su aparición puede ser un factor pronóstico de recaída al fármaco. Por otra parte, las concentraciones basales de ADN tumoral circulante también se han relacionado con cierto valor pronóstico. Así, por ejemplo, Alegre E. et al.<sup>129</sup> encontraron en un grupo de 36 pacientes con cáncer de pulmón avanzado que aquellos que iniciaban el tratamiento con una concentración de mutación activadora en *EGFR* superior a la mediana (94 copias/mL) presentaban menor supervivencia global (317 vs. 805 días;  $p < 0,05$ ) y menor supervivencia libre de progresión (195 vs. 724 días;  $p < 0,05$ ).

Otra de las aplicaciones más extendidas del cfDNA en pacientes con CPNCP avanzado es la **monitorización de la enfermedad**, que se lleva a cabo analizando la evolución de la fracción tumoral a lo largo del tiempo. Numerosos autores han demostrado que las variaciones de esta fracción se correlacionan con el tamaño del tumor y, por lo tanto, con la respuesta al tratamiento<sup>87,130,131</sup>. Así, los incrementos sucesivos en el ADN

tumoral circulante a lo largo del tiempo se han relacionado con progresión de la enfermedad, mientras que los descensos consecutivos o su desaparición en sangre pueden relacionarse con una buena respuesta al tratamiento. Esta utilidad se ha visto potenciada por la fácil y poco invasiva obtención de las muestras, que permite analizar la fracción tumoral de forma continua, actuando de forma similar a un marcador tumoral clásico.

A pesar de estas importantes implicaciones clínicas, la implantación de estas técnicas en los laboratorios todavía no está muy extendida, debido en gran medida a la falta de protocolos estandarizados para su determinación, lo que afecta considerablemente a su variabilidad analítica <sup>132,133</sup>. Sin embargo, el creciente interés que existe por estos estudios hace necesario conocer los factores preanalíticos y analíticos que afectan a su implantación.

En el aspecto analítico, existen en el mercado diferentes sistemas para analizar el cfDNA, aunque pueden clasificarse en dos categorías: sistemas que utilizan ensayos específicos y permiten la detección de mutaciones conocidas, y sistemas que permiten un estudio más amplio, basadas en tecnología de NGS <sup>134</sup>. Los primeros resultan idóneos para la monitorización de la enfermedad a lo largo de un tratamiento, ya que su manejo e interpretación resulta más sencillo, y suelen ser más económicos. Los segundos, por el contrario, permiten obtener una información más completa del tumor gracias a su capacidad para realizar el estudio mutacional en varios genes de forma simultánea. Esta característica resulta de especial utilidad para analizar ciertas alteraciones, que, a pesar de que no se estudian de forma rutinaria, presentan una potencial utilidad pronóstica o predictiva <sup>135,136</sup>. Así, por ejemplo, las mutaciones en *KRAS* se han relacionado con peor respuesta a TKIs de *EGFR* e incluso a quimioterapia en pacientes avanzados <sup>137</sup>, y las de *PIK3CA* parecen responder a ciertos inhibidores en desarrollo preclínico <sup>138</sup>. Además, esta visión tan amplia del contexto tumoral que proporcional la NGS supone una herramienta fundamental para entender los mecanismos moleculares que acontecen en los pacientes con cáncer de pulmón y como se modifican a lo largo de la enfermedad y de la exposición a diferentes tratamientos. La identificación de nuevas mutaciones hasta ahora poco conocidas y su aparición en respuesta a ciertos fármacos puede ser de gran ayuda para la individualización del tratamiento, favoreciendo la mejor estratificación de los pacientes. Además, esto también puede tener interés en el diseño de ensayos clínicos, permitiendo la selección de los grupos en función de sus características moleculares.

Este trabajo ha permitido abordar la puesta a punto de diferentes estrategias para el estudio de biomarcadores relacionados con el cáncer de pulmón de forma no invasiva a partir de ADN circulante.

En primer lugar, se ha llevado a cabo el proceso de implantación, acreditación y validación clínica del estudio de mutaciones en el gen *EGFR* mediante PCR digital a partir de ADN circulante en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado dentro del proyecto: **“Personalized Medicine in Oncology: researching a model capable of improving and predicting the result treatment based in molecular mechanisms, tumor biology, images, IT, and murine model”**.

Y, en segundo lugar, se ha evaluado la utilidad de la secuenciación masiva en la detección de mutaciones somáticas relacionadas con cáncer de pulmón a partir de ADN circulante a través del kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay. Además, se ha estudiado la concordancia entre los resultados obtenidos por NGS y por PCR digital, para valorar la futura combinación de ambas estrategias.

## 1. Implantación del estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante mediante PCR digital.

### 1.1. Establecimiento de las condiciones preanalíticas

La influencia de las condiciones preanalíticas en la realización de estos estudios ha sido ampliamente demostrada (99,100,115). A pesar de la falta de protocolos, existe un cierto consenso en cuanto a las condiciones preanalíticas más adecuadas para el estudio de biomarcadores a partir de ADN circulante<sup>94,140,141</sup>. Estas recomendaciones incluyen el tubo de extracción, la obtención del plasma y la cuantificación y almacenamiento del ADN circulante. Recientemente, se ha publicado una revisión de la Sociedad Americana de Patología Molecular<sup>120</sup> en la que se recoge la información de 77 artículos sobre condiciones preanalíticas y analíticas para el estudio del cfDNA. Esta exhaustiva revisión ha permitido evaluar muchas de las decisiones tomadas en este estudio. Sin embargo, continua sin existir un consenso claro sobre muchos aspectos del proceso como, por ejemplo, el método de extracción más adecuado. En este aspecto, cada laboratorio debe valorar las opciones y elegir la más adecuada según sus necesidades concretas.

#### 1.1.1. Adecuación del estudio a las recomendaciones preanalíticas

Como ya se ha comentado, es recomendable el uso de plasma frente al suero, ya que evita la liberación de ADN leucocitario durante el proceso de coagulación. Entre los anticoagulantes disponibles en el mercado, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) resulta de elección para estos estudios<sup>142</sup>. Los tubos de EDTA requieren una rápida centrifugación y separación del plasma durante las primeras 2-4 horas tras la extracción de la sangre<sup>94,143,144</sup> para evitar el efecto de la lisis celular en la dilución del ADN tumoral circulante. Para la realización de este estudio se escogieron los tubos PPT™ (BD Vacutainer® PPT™ Plasma Preparation Tube, Becton Dickinson) que además de anticoagulante incorporan un gel separador, lo que facilita la obtención del plasma. Existen en el mercado tubos de EDTA con conservante entre los que destacan los tubos Cell-free DNA BCT (Streck) y PAXgene Blood DNA Tube (Qiagen). Estos tubos reducen el efecto de la lisis celular<sup>145,146</sup> y conservan la sangre durante varios días a temperatura ambiente sin necesidad de centrifugación. Sin embargo, su uso fue descartado para este estudio por el incremento de coste que suponía y se restringió a muestras procedentes de centros externos, donde la conservación de la sangre puede ser un factor crítico.

La obtención del plasma se realizó mediante dos centrifugaciones consecutivas. Siguiendo las recomendaciones <sup>147,148</sup>, la segunda centrifugación se realizó a alta velocidad (5000rpm) para garantizar la eliminación de restos celulares e impurezas.

Tanto el plasma como el ADN circulante extraído se almacenaron a -20°C evitando ciclos de congelación y descongelación, ya que se ha visto que esto puede afectar a la estabilidad de la muestra. <sup>94,149</sup>.

Para la cuantificación del cfDNA se utilizó un método fluorimétrico ya que los sistemas espectrofotométricos (NanoDrop™) no están indicados para este tipo de estudios por su baja sensibilidad <sup>150</sup>. Además, estos sistemas suelen producir una sobreestimación de los resultados al detectar también otras moléculas como el ADN degradado, de cadena simple o nucleótidos libres <sup>151</sup>. La PCR cuantitativa de un gen diana también resulta útil para la medida del cfDNA amplificable <sup>152</sup>, pero el elevado consumo de tiempo y recursos que supone esta metodología limita considerablemente su utilidad en los ensayos de rutina, por lo que fue descartada para nuestro estudio.

### 1.1.2. Selección del método de extracción

El cfDNA presenta unas características especiales, como su baja concentración y su elevada fragmentación, que hacen necesario utilizar métodos de extracción específicos para su aislamiento, existiendo en el mercado una amplia variedad de kits tanto manuales como automatizados.

Numerosos estudios han demostrado que el rendimiento de la extracción de cfDNA varía en función del método de extracción utilizado <sup>153-155</sup>. Uno de los que mejor evidenció esta variabilidad fue el estudio SPIDIA-DNAplas EQA (Standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in vitro diagnostics), publicado en 2015 por Malentacchi et al., y en el que participaron 56 laboratorios europeos. En este estudio, la extracción de la misma muestra de plasma mediante métodos diferentes produjo un rango de concentraciones finales de cfDNA que osciló entre 2,87 y 224,02 µg/L plasma. La integridad del cfDNA también varió considerablemente en función del método utilizado <sup>133</sup>.

En nuestro estudio se ha evaluado el rendimiento de la extracción de cfDNA de dos métodos automatizados: MagNA Pure Compact (MPC) Nucleic Acid Isolation y Maxwell® RSC (MR) ccfDNA Plasma, y del método manual QIAamp Circulating Nucleic Acid (QCNA), que es uno de los más extendidos para el aislamiento de cfDNA <sup>146,156,157</sup>. De forma similar a lo descrito en la literatura, los métodos MPC y QCNA mostraron un rendimiento significativamente diferente en extracción del cfDNA ( $p < 0,001$ ) y una baja

correlación entre ellos ( $ICC < 0,4$ ). Sin embargo, el método MR no mostró diferencias significativas ( $P = 0,075$ ), y presentó la ventaja de ser un método más sencillo y rápido que el sistema manual. De forma similar a otros estudios<sup>76,158</sup> las concentraciones de cfDNA detectadas en pacientes metastásicos fueron superiores que en pacientes no metastásicos.

Nuestro estudio también evidenció una recuperación variable de los fragmentos cortos y largos de cfDNA en función del método de extracción, lo que ha sido descrito por otros autores<sup>133,159</sup>. Kloten et al. relacionaron esta recuperación de fragmentos de diversa longitud con el mecanismo del sistema de extracción, encontrando una mayor relación de fragmentos de pequeño tamaño en los métodos basados en la unión del cfDNA a partículas magnéticas que en los basados en unión a membrana de sílice<sup>160</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio también se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los fragmentos obtenidos entre los dos métodos que utilizan el sistema de unión a partículas magnéticas (MR y MPC). También, cabe destacar el elevado porcentaje de muestras que mostraron un perfil oligonucleosomal en el electroferograma (88.5%), lo que coincide con el artículo publicado en 2001 por Holderieder et al.<sup>161</sup>, en el que se describe una mayor cantidad de mono y oligonucleosomas en pacientes con cáncer que en población sana.

Por último, nuestro trabajo no demostró diferencias significativas en el análisis de biomarcadores en las muestras de cfDNA obtenidas por diferentes métodos. Sin embargo, la obtención de fragmentos largos y cortos en función del método utilizado podría afectar a la cuantificación de las mutaciones de origen tumoral. Por ejemplo, la muestra **R12** obtuvo un resultado positivo para la mutación tumoral de interés en la muestra obtenida mediante el sistema MagnaPure, y sin embargo esta mutación no se detectó en la muestra obtenida por el sistema Maxwell. Algunos estudios han sugerido que las fracciones de cfDNA de bajo peso molecular esta enriquecidas en ADN tumoral<sup>162,163</sup>, probablemente por el mecanismo de apoptosis que se produce en las células neoplásicas. De acuerdo con nuestros resultados, la obtención de fragmentos de cfDNA de pequeño tamaño (150-200pb) fue significativamente superior en las muestras extraídas mediante el sistema MPC que por las extraídas por el sistema MR ( $p = 0,0005$ ), aunque la concentración total de cfDNA fue significativamente menor ( $p < 0,0001$ ). Esto podría explicar en cierta manera la discrepancia encontrada con la muestra **R12**.

En conclusión, el método Maxwell ha demostrado en este estudio ser un sistema válido para la extracción de cfDNA, con un rendimiento similar al sistema más utilizado (Qiagen), como también demostraron posteriormente Sorber et al.<sup>164</sup>. Al tratarse de un

sistema automatizado, el sistema Maxwell presenta la ventaja de ser un método más preciso y fácil de manejar, con un tiempo medio por muestra inferior al sistema Qiagen (aproximadamente 1 hora y media frente a 2 horas y media), y que precisa de menor manipulación por parte del personal de laboratorio. Esta última característica resulta esencial para evitar contaminaciones cruzadas, lo que es especialmente relevante en estos estudios debido al uso de técnicas de alta sensibilidad.

### 1.2. Validación de un sistema de PCR digital

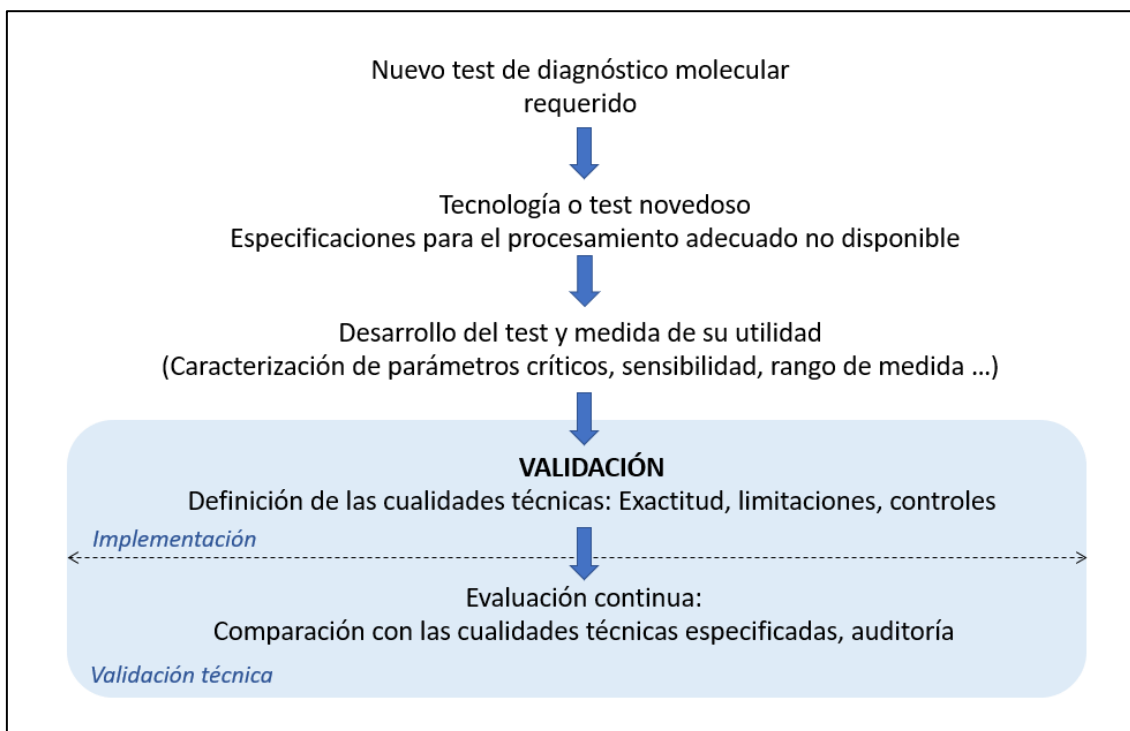
Para la implantación de técnicas de biología molecular de aplicación clínica en los laboratorios es necesario realizar una validación o una verificación previa.

Según la norma ISO9001:2015 <sup>165</sup> la **verificación** es la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados; esta práctica se realiza en aquellas técnicas ya existentes y validadas como aquellas que disponen de marcado IVD.

La **validación**, sin embargo, es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista y se realiza en técnicas novedosas y no reconocidas para su uso diagnóstico.

Ambos procesos son necesarios para la acreditación de laboratorios conforme a la norma de calidad ISO15189:2012.

En nuestro caso, para realizar el estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante era necesaria la implantación de los ensayos Taqman® Rare Mutation para la PCR digital. Esta técnica no está validada para su uso diagnóstico (sólo para investigación), por lo que para su implantación fue necesario realizar una validación que se realizó según los criterios de la *ICH guidelines* <sup>109</sup>.

**Figura 58.** Esquema para la implantación de nuevas técnicas de diagnóstico molecular.Adaptado de Mattocks et al.<sup>173</sup>.

### 1.2.1. Cálculo del límite de detección y de cuantificación

Para la validación se realizó una recta de regresión para los ensayos: p.T790M (AHRSR0S), p.L858R (AHRSR5V), p.E746\_A750delELREA (AHLJ0XO) y p. G719S (AH0JEW0) a partir de líneas celulares puras. La correlación obtenida entre los valores teóricos y los valores reales para cada ensayo fue prácticamente 1 para todos los ensayos: **p.T790M,  $R^2=0,995$ ; p.L858R,  $R^2=0,996$ ; p.E746\_A750delELREA,  $R^2=0,978$  y p.G719S,  $R^2=0,999$** . Esto permitió el cálculo del límite de detección y de cuantificación basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración de las guías ICH.

El límite de detección obtenido fue similar para los 4 ensayos, con valores desde 0,04% para la mutación p.G719S, hasta 0,15% para la mutación p.E746\_A750delELREA. Estos resultados verificaron el límite de detección indicado por el fabricante (0,1%), por lo que se estableció este valor para todos los ensayos. Esta sensibilidad analítica se evaluó con muestras que presentaban una media de 300copias/ $\mu$ L de ADN WT.

## C. PÉREZ-BARRIOS

El límite de cuantificación obtenido fue diferente para cada ensayo, obteniendo valores desde 0,13% para la mutación p.G719S hasta 0,45% para la mutación p.E746\_A750delELREA, por lo que se estableció un punto de corte específico en cada uno de ellos.

**Tabla 37.** Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) obtenidos para cada ensayo.

	p.E746_A750delELREA	p.G719S	p.L858R	p.T790M
LOQ	0,45%	0,13%	0,20%	0,26%
LOD	0,15%	0,04%	0,07%	0,08%

Los resultados obtenidos se adecúan a los requerimientos que exigen este tipo de estudios. La sensibilidad analítica (LOD) demostrada para todos los ensayos permite la detección de 1 molécula mutada en 999 moléculas WT, lo que se ajusta a las condiciones reales en las que encontramos el ADN tumoral circulante. A pesar de que ciertos autores establecen una sensibilidad inferior (<0,01%) para este tipo de técnicas<sup>93,166</sup>, consideramos adecuado establecer un valor de 0,1% para no incrementar el número de falsos positivos, y mantener así el valor predictivo positivo de la prueba.

El ensayo que presentó un límite de detección más elevado (0,15%) fue el de la delección del exón 19. Esta ligera pérdida de sensibilidad puede explicarse por el uso de un ensayo “custom” compuesto por la mezcla de 6 sondas específicas para diferentes delecciones en el exón 19 de *EGFR*.

**Tabla 38.** Ensayos incluidos en la sonda “custom” utilizada para la validación de la mutación p.E746\_A750delELREA.

Ensayo	Mutaciones	COSMIC ID
EGFR Multiplex del19	p.L747_T751>P	12383
	p.L747_T750>P	12422
	p.E746_T751>A	12678
	p.E746_A750delELREA	6223
	p.L747_T751delLREAT	6254
	p.L747_S752delLREATS	6255

Debido a la amplia variedad de delecciones en el exón 19, se optó por utilizar un ensayo “multiplex” para la puesta a punto de la técnica. Posteriormente, se adquirieron las sondas comerciales por separado como se indica en el apartado material y métodos, ya que proporcionaban mejores resultados y permitían discriminar la mutación concreta de cada paciente.

Por último, hay que tener en cuenta que estas condiciones se calcularon a partir de muestras que presentaban una media de 300 copias/ $\mu$ L de ADN WT. En condiciones reales, existen diversos factores como el estadio de la enfermedad, el tamaño del tumor, la conservación de la sangre y el ADN circulante, o el proceso de extracción, que pueden afectar al número total de copias amplificadas y, por lo tanto, a la fracción de alelo mutada que será un porcentaje del total. Por ejemplo, si la calidad de la muestra no es óptima y solo obtenemos 20 copias/ $\mu$ L de WT, no se podrá alcanzar el límite de detección de 0,1%.

### 1.2.2. Estudio de intercomparación entre laboratorios

Debido a la falta de programas de control de calidad externos se realizó un estudio de intercomparación con un laboratorio mediante el análisis de 15 muestras de ADN libre circulante previamente extraído (13 pacientes y 2 líneas celulares puras). El objetivo del estudio era evaluar la capacidad de la técnica para detectar las mutaciones más frecuentes en el gen *EGFR* estableciendo el punto de corte en 0,1%.

El estudio obtuvo buenos resultados, con un Kappa de 0,76, lo que indica una buena concordancia (0,61-0,80) entre ambos laboratorios <sup>167,168</sup>. Esto permitió comprobar que el límite de 0,1% es adecuado para esta técnica. Por otra parte, en este estudio sólo se contabilizó un resultado discordante, a causa de un falso positivo en una muestra cuyo resultado fue cercano al límite de detección. Para evitar este problema durante el estudio se incluyeron controles negativos en cada tanda de muestras como referencia para establecer las copias WT de cada paciente.

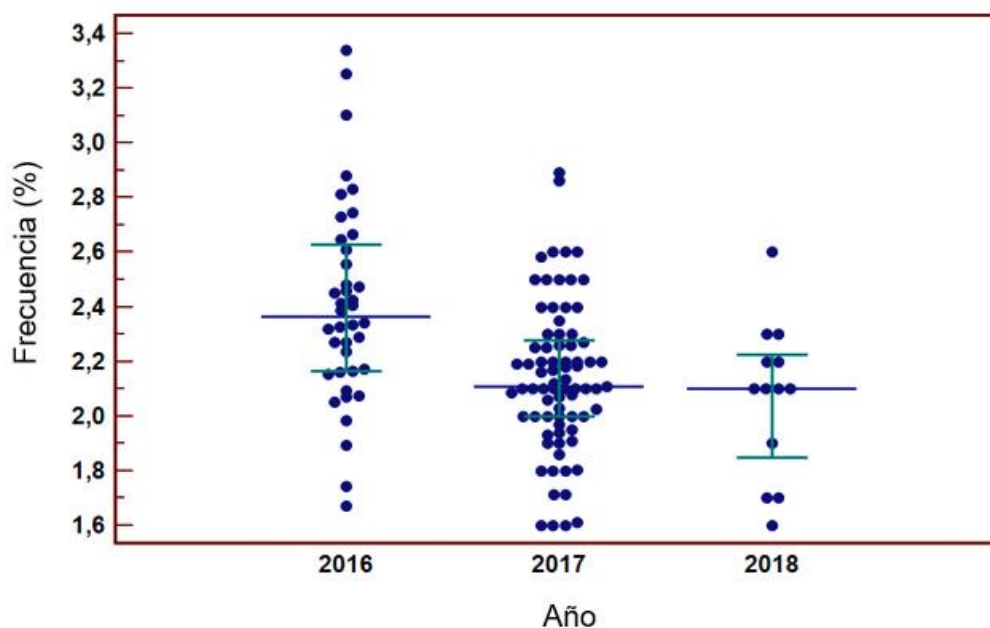
Cabe destacar que, en los últimos años, existe un evidente esfuerzo por parte de diferentes organizaciones para implantar controles de calidad externos que permitan evaluar los resultados obtenidos por diferentes laboratorios en este tipo de análisis. Los resultados del primer programa externo piloto europeo (EQA) para el estudio de mutaciones en *EGFR*, *KRAS* y *NRAS* a partir de cfDNA <sup>169</sup> han sido publicados recientemente. En este estudio, se contabilizó un ratio de error de 20,1% con un total de 15 falsos positivos o negativos (25,9%) entre los 32 laboratorios participantes. Esto evidencia la falta de estandarización entre los diferentes laboratorios y la influencia de las condiciones preanalíticas y analíticas en los resultados obtenidos para un mismo estudio, por lo que los programas de calidad externos parecen imprescindibles para unificar criterios y detectar errores que pueden afectar al abordaje terapéutico de los pacientes.

### 1.2.3. Medida de la reproducibilidad

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica se realizó un diagrama de Levey-Jennings con las frecuencias mutacionales de muestras control para las mutaciones p.T790M, p.L858R y p.E746\_A750deELREA. En los 3 casos, los valores de las frecuencias permanecieron dentro de los intervalos de calidad durante meses, demostrando que las muestras de ADN circulante mantienen sus condiciones para el estudio de mutaciones cuando se almacenan a -20°C durante largos periodos de tiempo. Estos resultados coinciden con lo publicado en 2013 por El Messaoudi et al.<sup>98</sup>, donde indicaban que el ADN circulante permanece estable hasta 9 meses almacenado a -20°C para la realización de estudios moleculares. Sin embargo, en nuestro estudio hemos podido comprobar que esta estabilidad se mantiene durante mucho más tiempo, lo que resulta especialmente evidente en la gráfica de control de la mutación p.T790M. La disponibilidad de una gran cantidad de volumen de líquido pleural positivo para esta mutación permitió obtener numerosas alícuotas de cfDNA y hacer un seguimiento de la reproducibilidad de los resultados durante casi 2 años (desde marzo de 2016 hasta febrero de 2018). Esta larga estabilidad había sido descrita por Kopreski et al.<sup>149</sup>, quienes realizaron estudios en ADN circulante procedente de muestras de plasma almacenadas durante más de 6 años. Según nuestros datos, esta estabilidad también se mantiene durante años cuando la muestra almacenada es el propio ADN circulante.

Por otra parte, los ciclos de congelación y descongelación del ADN circulante no afectaron de forma evidente al resultado de nuestros análisis, si bien es cierto que las muestras fueron congeladas en forma de alícuotas de pequeño volumen, lo que restringió el número de ciclos de congelación y descongelación. Estos resultados coinciden con lo descrito por Chan et al.<sup>170</sup>, quienes publicaron que los ciclos de congelación y descongelación (hasta 3) no producen cambios significativos en la estabilidad del ADN circulante, aunque sí del plasma. Sin embargo, al analizar los resultados obtenidos con el control de la mutación p.T790M observamos un descenso paulatino del resultado de la frecuencia mutada.

**Figura 59.** Mediana de los valores de control para la mutación p.T790M durante los 2 años de seguimiento. Las barras de error representan los percentiles 25 y 75.



Este descenso paulatino no produce grandes desviaciones en los resultados de fracción de alelo mutado, como se observa en el gráfico de Levey-Jennings (**figura 42**), y puede deberse a cierta degradación del ADN circulante a lo largo de los dos años del estudio.

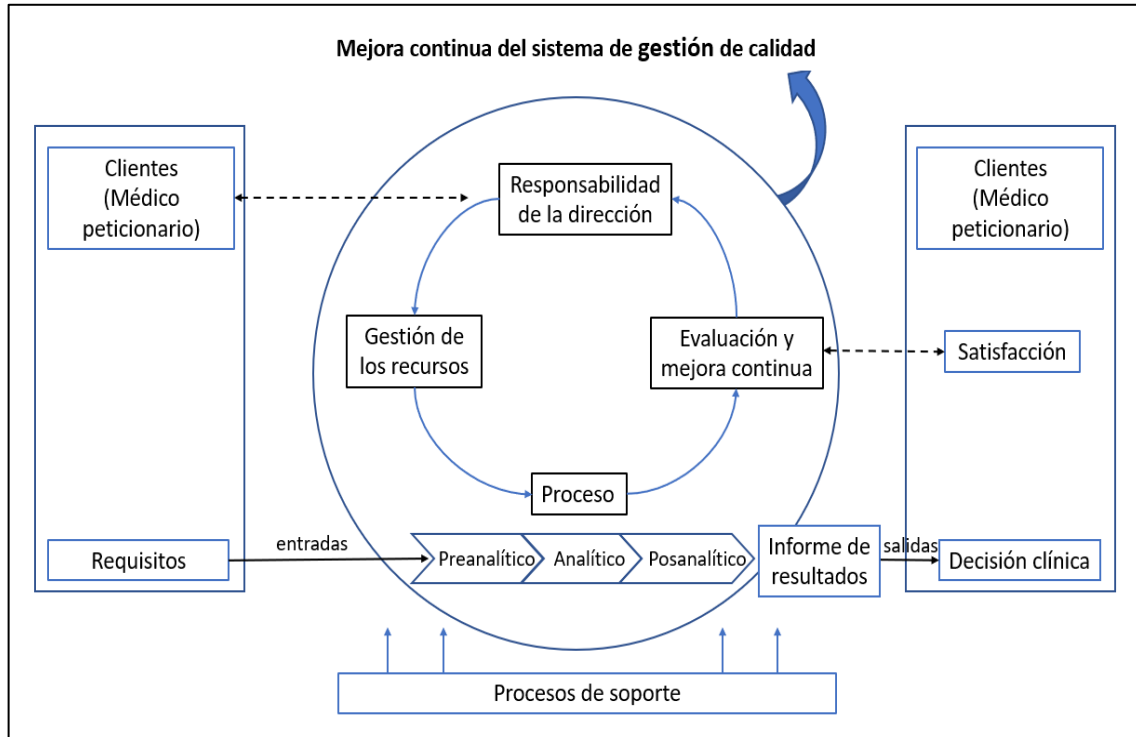
#### 1.2.4. Implantación del sistema de Gestión ISO15189

Diversos autores y guías clínicas recomiendan la aplicación de la norma ISO15189 <sup>171-173</sup> en los estudios de ADN circulante como mecanismo para el aseguramiento de la calidad. Por este motivo, el laboratorio decidió aplicar este modelo de gestión de calidad para garantizar la correcta implantación de un sistema novedoso como el estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante mediante PCR digital.

El día 6 de abril de 2018 el Laboratorio obtuvo la acreditación por la ENAC para el “estudio de biomarcadores (*EGFR*) en biopsia líquida” (**Código de acreditación 1296/LE2432**). Al embarcarse en este modelo de gestión, el laboratorio no solo acredita su competencia para la realización de estas pruebas, sino que adquiere un compromiso de mejora continua. De esta forma, el proceso será re-evaluado por la ENAC conforme a este modelo de gestión (ISO15189) con periodicidad anual.

Además, es necesario destacar que se trata del primer Laboratorio dentro de un Hospital público en obtener esta acreditación para estudios en biopsia líquida en España.

**Figura 60.** Modelo de gestión de la calidad implantado en el Laboratorio basado en la norma ISO15189.



### 1.3. Validación clínica del estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de cfDNA

#### 1.3.1. Utilidad clínica de la sangre

Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo hemos podido comprobar las aplicaciones clínicas del estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante obtenido de sangre en pacientes con CPNCP avanzado.

En primer lugar, cabe mencionar que la monitorización de las mutaciones *sensitizing* y p.T790M en el gen *EGFR* y su utilidad para la evaluación de la respuesta al tratamiento ya había sido descrita en estudios previos<sup>124,174,175</sup>. Sin embargo, nuestro trabajo ha permitido evaluar esta utilidad de forma prospectiva dentro de la práctica clínica diaria de un servicio de Oncología Médica. En los ensayos clínicos los pacientes están seleccionados y suelen presentar unas características homogéneas que no representan la realidad diaria de un servicio hospitalario. Esto puede provocar que una prueba que a priori resultaría de gran utilidad no llegue a serlo, debido a que no es capaz de ajustarse a la diversidad de factores que presenta una población de pacientes reales y que habían sido sesgados por el diseño del estudio (edad, medicación concomitante, aceptación por parte del paciente...). No obstante, con este trabajo hemos podido demostrar que el estudio de mutaciones en el gen *EGFR* presenta una utilidad real, ya que tanto la solicitud de muestras como la periodicidad de las consultas se realizaba de acuerdo con el criterio del Oncólogo, durante el seguimiento rutinario del paciente.

Bajo estas condiciones, el número de muestras por paciente ha llegado en algunos casos hasta 15 (media: 6 muestras/paciente), lo que evidencia el estrecho seguimiento del estado mutacional que permite esta técnica a lo largo de diversos tratamientos. El hecho de poder disponer de muestras de forma continua permite obtener información del tumor a tiempo real, lo que sería imposible por medio de re-biopsias.

De forma similar a lo descrito por otros autores<sup>126,175-177</sup>, nuestro estudio demostró que el aumento simultáneo de la mutación de resistencia p.T790M, junto con la mutación *sensitizing* detectada al diagnóstico se asoció de forma significativa con progresión por imagen ( $p < 0,005$ ). Además, el 39% de los pacientes experimentaron un incremento en la mutación *sensitizing* de forma previa a la aparición de la mutación p.T790M.

Por otra parte, de los 18 pacientes con progresión y resultado de p.T790M positivo, el 56% presentaron la mutación antes de evidenciarse la progresión radiológica, con una media de 55 días de antelación (desde 93 a 5 días). Este hecho también había sido documentado por otros autores. Así por ejemplo, Oxnard G. et al.<sup>130</sup> detectaron la

mutación de resistencia 16 semanas antes de la progresión radiológica, y Sorensen BS et al.<sup>126</sup> lo hicieron con 344 días de antelación. Sin embargo, pese a que la progresión molecular suele evidenciarse de forma previa a la imagen, la duración del tratamiento con TKIs todavía se establece en función del criterio del Oncólogo, que debe enfrentarse a la cuestión de cuando es el momento óptimo para el cambio de línea de tratamiento.

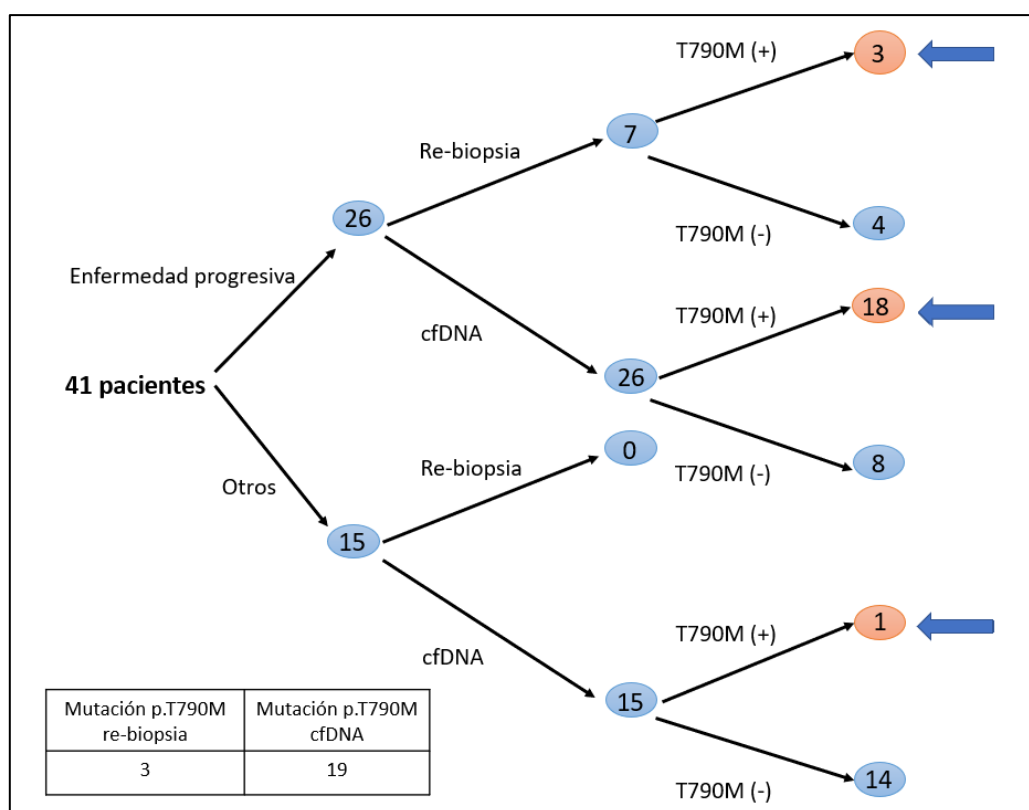
Por otro lado, este estudio también demostró el valor pronóstico de los niveles de mutaciones en sangre, ya que tanto el aumento de la mutación *sensitizing* como la aparición de la mutación p.T790M se relacionaron con una menor supervivencia libre de progresión ( $p < 0,005$ ). Además, el aumento de una unidad en porcentaje en la mutación p.T790M demostró un incremento en el riesgo de progresión o muerte de casi tres veces (2,7). De forma adicional, los pacientes que mantuvieron unos niveles de p.T790M indetectables a lo largo del estudio presentaron 12 veces más probabilidad de mantener una respuesta al tratamiento o una enfermedad estable que aquellos pacientes que presentaron positiva la mutación p.T790M en al menos una determinación. Estos resultados demuestran la utilidad del estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de sangre para guiar el tratamiento con TKIs y evaluar el riesgo de recaídas. Estos resultados resultan similares a los obtenidos por Mao et al.<sup>178</sup> en un metaanálisis de 25 artículos. En esta revisión, donde se incluían un total de 2605 pacientes, ya se evidenció que el estudio de mutaciones en *EGFR* a partir de sangre estaba significativamente asociado con la respuesta objetiva al tratamiento (RR: 4,08; IC95% 2,48–6,70) y con la SLP (HR: 0,72; IC95% 0,64–0,80). Estos hallazgos hacen plantearse la potencial utilidad de estos estudios, no solo en la toma de decisiones clínicas como apoyo a la imagen, sino como parámetro molecular pronóstico que podría ser evaluado por medio de ensayos clínicos para establecer el beneficio real de la selección de pacientes en base a los resultados de la biopsia líquida.

Por último, cabe destacar la utilidad del cfDNA en los casos en los que no es posible realizar el estudio molecular en el tejido. Esto resulta especialmente relevante para la detección de mutaciones de resistencia en los pacientes en tratamiento con TKIs a la progresión. En nuestro estudio se detectó la mutación p.T790M en 19 de los 41 pacientes incluidos utilizando ADN circulante (46,3%), frente a los 3 que fueron detectados mediante tejido (7,3%). Esta importante diferencia puede deberse a que solo se pudo llevar a cabo la re-biopsia en 7 de los 26 pacientes que progresaron al tratamiento. Este limitado acceso al tumor queda patente en diversos trabajos en los que se realiza el estudio molecular a partir de re-biopsia. Así, por ejemplo, en el estudio de Yu et al.<sup>113</sup> se obtuvieron 155 muestras de tejido representativas en un total de 175

pacientes y en el publicado por Arcila et al. <sup>179</sup>, solo 104 muestras de tejido fueron adecuadas en 144 pacientes.

Como se puede observar, la dificultad que presenta la obtención de tejido a lo largo del tratamiento en estos pacientes es una limitación importante que puede afectar al estudio de biomarcadores de nueva aparición, lo que repercute negativamente al acceso a nuevos fármacos dirigidos.

**Figura 61.** Pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con Osimertinib (p.T790M positiva) con estudio molecular en tejido vs. estudio molecular en ADN circulante.



Por último, cabe destacar que el análisis del cfDNA también reveló la presencia de la mutación de resistencia p.T790M en un paciente que no mostró progresión radiológica durante el estudio. Sin embargo, este paciente fue monitorizado hasta su muerte, casi 2 años y medio después del inicio de su reclutamiento. Durante este periodo de tiempo, la mutación p.T790M continuó detectable a lo largo de toda la enfermedad, y le permitió beneficiarse del tratamiento con Osimertinib 595 días después del inicio del estudio.

### 1.3.2. Utilidad clínica de los líquidos biológicos

La utilidad de los líquidos biológicos en la detección de marcadores tumorales clásicos ha sido ampliamente evaluada <sup>180-182</sup>. Por otra parte, Husain et al <sup>183</sup> demostraron la

utilidad de los derrames pleurales en la detección de alteraciones moleculares y cambios en el número de copias con potencial utilidad terapéutica. En este trabajo hemos querido analizar su utilidad en la determinación de mutaciones en el gen *EGFR*.

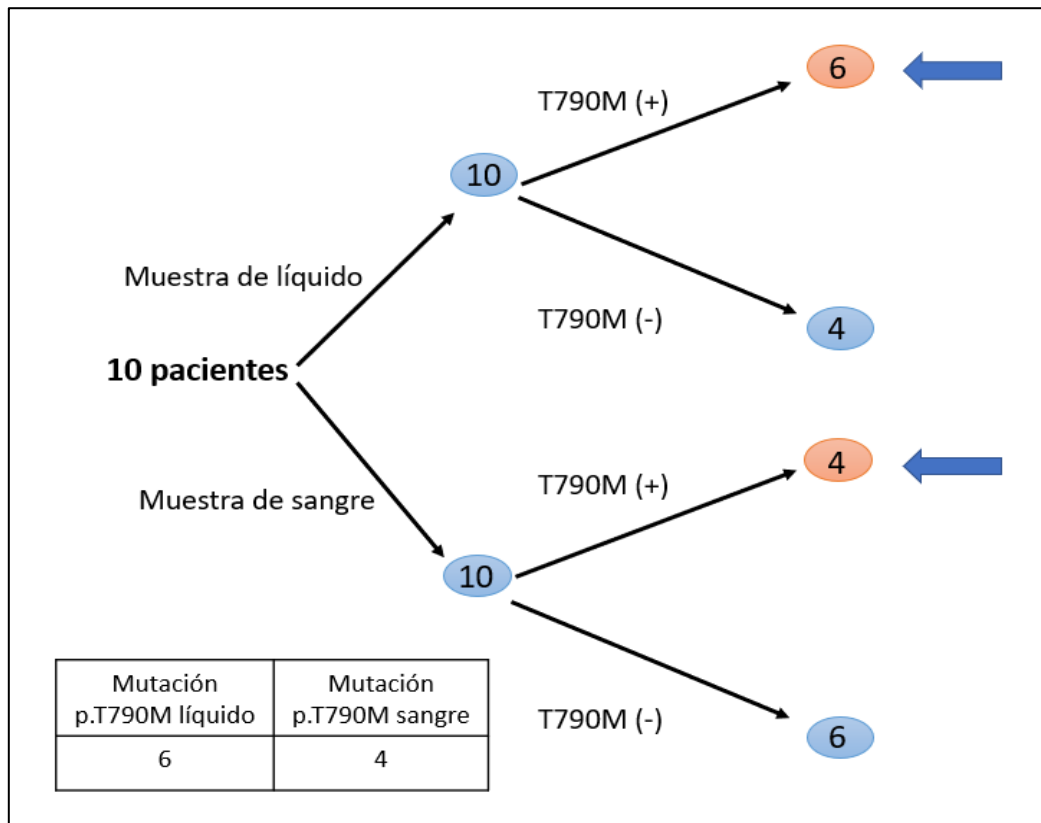
Los resultados obtenidos indican que los líquidos biológicos son una muestra adecuada para la detección de biomarcadores a partir de ADN circulante. Pese a que esta muestra no se obtiene de forma rutinaria, existen ocasiones en las que el laboratorio puede disponer de ella, como cuando se producen derrames pleurales, lo que ocurre con relativa frecuencia en los pacientes con cáncer de pulmón <sup>184</sup>.

Atendiendo al análisis cuantitativo, los líquidos biológicos demostraron un rendimiento superior que la sangre en la detección de mutaciones en el gen *EGFR*. Tanto la fracción alélica mutada como el número de copias por mililitro obtenidas fueron significativamente superiores en los líquidos biológicos ( $p < 0,005$  para ambos casos). Esto puede justificarse debido a que, en muchas ocasiones, la localización anatómica del tumor suele ser cercana a la zona donde se produce el derrame. Por este motivo, las células tumorales vierten directamente su contenido a la cavidad donde se acumula el líquido, aumentando así su concentración. En nuestro estudio, 8 de los 10 líquidos analizados procedían de derrames pleurales, lo que puede explicar este gran rendimiento. Los otros dos líquidos analizados correspondían a un líquido pericárdico, cuya localización anatómica es cercana al pulmón, y un líquido cefalorraquídeo. En este último caso, la presencia de ADN tumoral circulante se debió a una metástasis cerebral.

En cuanto al estudio cualitativo, los líquidos detectaron mayor número de mutaciones que la sangre (16/20 vs 14/20), obteniendo resultados positivos para 3 mutaciones no detectables en este fluido. Sin embargo, una de las mutaciones positivas en sangre resultó negativa en el líquido. Por este motivo, el estudio de ambas muestras de forma simultánea puede ser recomendable para incrementar la sensibilidad del estudio.

En el caso de la mutación p.T790M, la disponibilidad de líquidos biológicos permitió detectar 2 mutaciones que habían resultado negativas en sangre, lo que supone que los pacientes no podrían beneficiarse de TKIs de 3ª generación.

**Figura 62.** Pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con Osimertinib (T790M+) con estudio molecular en líquido vs. estudio molecular en sangre.



Por lo tanto, los líquidos biológicos no solo son una muestra adecuada para la realización de estos estudios, sino que además pueden ayudar a esclarecer casos negativos o dudosos en sangre.

### 2. Evaluación del estudio de biomarcadores relacionados con cáncer de pulmón a partir de cfDNA mediante secuenciación masiva

El estudio molecular del tumor ha adquirido una gran importancia en pacientes con CPNCP avanzado, debido a la disponibilidad de fármacos dirigidos frente a dianas moleculares. El desarrollo de técnicas de secuenciación masiva de alta sensibilidad o “High sensitivity NGS” ha permitido el análisis simultáneo de diferentes alteraciones moleculares presentes en el ADN tumoral circulante, a muy baja frecuencia (inferior al 0,5%), de forma no invasiva. Esto resulta idóneo para entender la evolución del tumor durante el desarrollo de la enfermedad y durante la exposición a distintos tratamientos. Además, se sabe que los mecanismos de resistencia a fármacos dirigidos son múltiples, y en muchas ocasiones afectan a genes diferentes al que se encontraba mutado de forma inicial, por lo que este abordaje permite evaluar nuevas estrategias terapéuticas de forma mucho más amplia que las técnicas de ensayo único como la PCR digital. Sin embargo, los estudios de NGS presentan unos requisitos en la cantidad inicial de ADN libre circulante relativamente estrictos, lo que puede suponer una limitación en las condiciones reales de uso. Además, en el cáncer de pulmón, la muestra de tejido tumoral no está siempre disponible, lo que puede dificultar la confirmación de los resultados obtenidos por NGS.

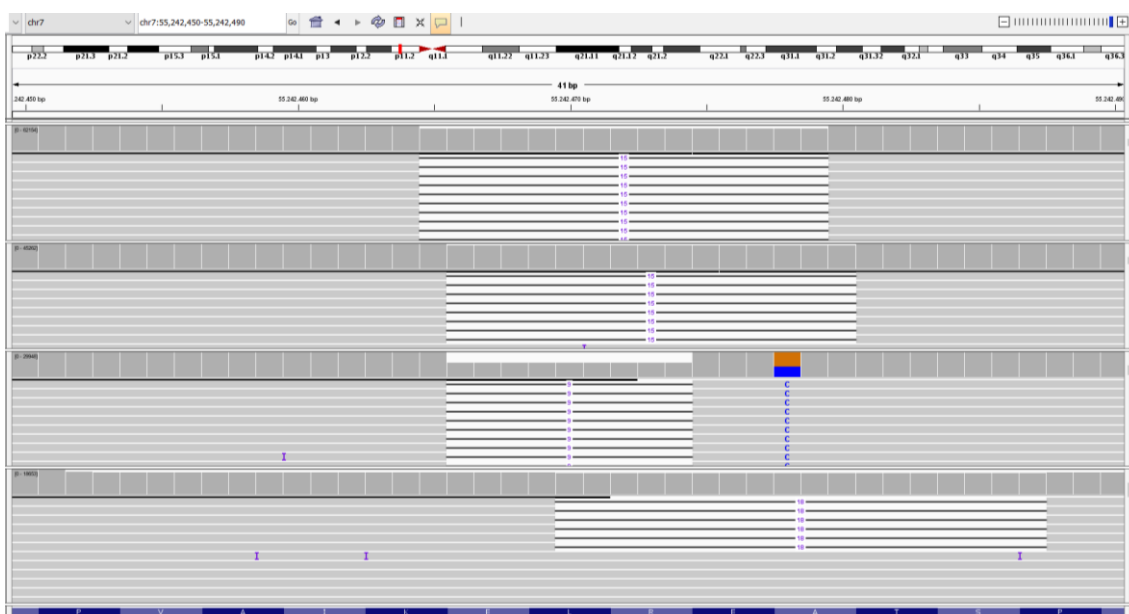
En este estudio, se evaluó la utilidad del kit de secuenciación masiva OncoPrint™ Lung cfDNA Assay utilizando muestras no seleccionadas para valorar su utilidad en la práctica clínica diaria de un Servicio de Oncología Médica. Adicionalmente, se evaluó la concordancia de los resultados obtenidos por NGS con el sistema alternativo como es la PCR digital.

En la población analizada (N=52) se detectaron 61 mutaciones, con una media de 1,2 mutaciones por paciente, lo que coincide con lo descrito por Iwama et al.<sup>185</sup>. La mediana de la fracción alélica mutada fue 0,64%. Estos resultados también fueron similares a lo publicado por otros autores para pacientes con CPNCP<sup>186</sup>.

En concordancia con trabajos previos<sup>187-189</sup>, los genes mutados con más frecuencia fueron *EGFR* (38,7%) y *TP53* (32,7%), si bien es cierto que 31 de los 52 pacientes incluidos en el estudio era pacientes con enfermedad avanzada que presentaban de forma previa mutaciones en el gen *EGFR* en el tejido tumoral. Una de las ventajas de la NGS para la detección de las mutaciones localizadas en este gen la encontramos en el análisis de las deleciones del exón 19. Esta técnica no solo permite identificar la

presencia de esta alteración, como suele ocurrir en los estudios rutinarios de tejido, sino que además proporciona información sobre la pérdida concreta de nucleótidos (**figura 63**), lo que podría tener implicaciones clínicas. El gen *TP53*, por su parte, se encuentra mutado con frecuencia en pacientes con cáncer de pulmón. En un estudio reciente, en el que se secuenciaron 592 tumores de cáncer de pulmón no célula pequeña, este gen apareció mutado en 215 de los mismos, lo que supone una frecuencia mutacional del 36%. Además, 22 tumores presentaron mutaciones de forma simultánea en *EGFR* y *TP53*<sup>190</sup>, de forma similar a lo que ocurre en 8 de nuestros pacientes.

**Figura 63.** Deleciones del exón 19 (gen *EGFR*) detectadas en el estudio visualizadas con IGV.



Por otra parte, en nuestro estudio no encontramos relación entre la presencia de mutaciones y la concentración del cfDNA, siendo capaces de detectar mutaciones en muestras con una cantidad de cfDNA de partida inferior a 5 ng (N=9). Este hecho resulta especialmente interesante en la detección temprana de biomarcadores de cáncer, ya que, de forma similar a lo descrito por Chaudhuri et al.<sup>186</sup>, la concentración de las muestras de cfDNA utilizadas en nuestro trabajo se correlaciona con el estadio tumoral. Además, tampoco encontramos diferencias significativas en el número ni en la frecuencia de las mutaciones entre los pacientes con estadio III y IV ( $p=0,23$  y  $p=0,65$ ). Estos resultados coinciden con el estudio publicado por Yang et al. en pacientes con cáncer de pulmón, en el que tampoco se encontraron diferencias en los patrones moleculares observados en relación al estadio tumoral<sup>191</sup>, lo que apoya la utilidad de la NGS en estadios tempranos.

Otro importante hallazgo de este estudio es la excelente concordancia que existe entre los resultados obtenidos por el sistema de NGS y por PCR digital ( $\rho = 0,986$ , IC 95% = 0,975 a 0,991 y  $r = 0,987$ ;  $p < 0,0001$ ), que también había sido descrita para otros kits en estudios previos <sup>192-194</sup>. Además, nuestros datos demuestran que esta elevada concordancia se mantiene incluso cuando la cantidad de ADN circulante de partida es baja (menor a 20 ng). Estos resultados sugieren que es posible alcanzar el límite de detección (0,1%) utilizando muestras con al menos 10 ng de cfDNA de partida, lo que coincide con lo descrito por otros autores <sup>195</sup>. Además, este hecho facilita su aplicación en muestras reales, donde las concentraciones de cfDNA no son homogéneas.

Hay que destacar que, a diferencia de la biopsia tumoral, la biopsia líquida puede proporcionar información sobre la carga tumoral en pacientes con cáncer, ya que permite analizar la frecuencia mutacional de las alteraciones procedentes del tumor, lo que puede ser útil para controlar la enfermedad <sup>185,196-199</sup>. En este aspecto, la excelente concordancia encontrada entre ambas tecnologías resulta idónea para la monitorización de estos pacientes, ya que nos va a permitir combinar ambas estrategias. Así, la NGS de ADN circulante resulta una técnica adecuada para la identificación de alteraciones moleculares poco frecuentes o de nueva aparición, que podrán ser testadas de forma periódica mediante PCR digital. Además, esta técnica también va a ser de utilidad para la confirmación de los resultados obtenidos mediante NGS, lo que resulta especialmente importante en los pacientes con cáncer de pulmón por el limitado acceso al tumor.

No obstante, la aplicación más importante de la NGS de ADN circulante en estos pacientes es la detección de mutaciones de resistencia a fármacos dirigidos. En este contexto, cabe recordar que menos de la mitad de los pacientes que progresan al tratamiento con TKIs son rebiopsiados <sup>200</sup>.

En nuestro estudio, se encontró una alta concordancia entre la NGS y la dPCR para la detección de la mutación de resistencia p.T790M en términos de MAF (Kappa=0,81; IC95%= 0,65-0,99). Considerando la dPCR como la técnica *gold standart*, el sistema de NGS obtuvo unos excelentes resultados de especificidad (100%) para la detección de esta mutación. La sensibilidad obtenida, sin embargo, aunque aceptable (75%) pudo estar condicionada por la calidad de las muestras (no seleccionadas). Los resultados obtenidos sugieren que el ADN circulante puede considerarse una muestra adecuada para el estudio de la mutación p.T790M cuando la biopsia de tejido no está disponible o no tiene éxito. Además, es muy probable que un resultado positivo sea cierto, lo que podría evitar las nuevas biopsias destinadas al estudio de biomarcadores.

Por otra parte, se detectó la mutación p.G1269A, en el dominio kinasa del gen *ALK*, en 2 de los 4 pacientes con traslocación en este gen, y que estaban en tratamiento con Crizotinib. Esta mutación ha sido descrita como una mutación de resistencia a este tratamiento<sup>201</sup>, aunque no parece producir este efecto en otros inhibidores de segunda generación como el Ceritinib<sup>202</sup>. En la actualidad, la prescripción en segunda línea de inhibidores de *ALK* se realiza de forma empírica, sin conocer el perfil molecular del tumor a la progresión. En este estudio hemos podido comprobar como el perfil de NGS de muestras derivadas de sangre a la progresión de la enfermedad puede obtenerse de forma sencilla, siendo útil para guiar los tratamientos posteriores de estos pacientes. Además, cabe destacar que los resultados de NGS pueden obtenerse en un plazo corto, permitiendo tiempos de respuesta adecuados para el entorno clínico.

Por último, es importante recordar que una de las limitaciones de la secuenciación masiva del cfDNA es la aparición de falsos positivos debido a la hematopoyesis clonal. Las mutaciones somáticas en cfDNA pueden ser derivadas del tumor, pero también pueden representar mutaciones de células sanguíneas periféricas adquiridas durante el envejecimiento humano. Estas alteraciones reciben el nombre de CHIPs por sus siglas en inglés "*Clonal Hematopoyesis of indeterminate potencial*" y son precursoras de neoplasias hematológicas, aunque por lo general son benignas y no terminan progresando<sup>203</sup>. De hecho, se estima que entre el 5% y el 10% de las personas de más de 70 años presentan estas alteraciones<sup>204,205</sup>, cifra que aumenta de forma paralela a la edad. Esto plantea nuevos retos a la hora de interpretar los resultados obtenidos mediante NGS de cfDNA. Se ha publicado que en pacientes con CPNCP avanzado hasta el 3% de las mutaciones en *KRAS* pueden ser atribuibles a la hematopoyesis clonal<sup>206</sup>. Sin embargo, la frecuencia de estas mutaciones en células sanguíneas depende del gen y de la alteración. Así, por ejemplo, la mutación p.T790M no parece ser común en estas células, lo que sugiere que sería excepcional detectar un falso positivo debido a esta circunstancia<sup>207</sup>.

En base a estos hallazgos, los estudios que secuencian el ADN circulante procedente del plasma y el ADN de células sanguíneas de forma simultánea pueden ser de interés para estimar el impacto de la hematopoyesis clonal en el estudio de biomarcadores mediante biopsia líquida. En esta línea, se ha puesto en marcha una iniciativa para caracterizar la heterogeneidad de la población sana y con cáncer, con el fin de crear perfiles que permitan distinguir ambas poblaciones para el diagnóstico temprano del cáncer de forma no invasiva. El estudio, llamado "The Circulating Cell-free Genome Atlas Study (CCGA)", está caracterizando mediante secuenciación masiva de alta

sensibilidad las muestras de 15.000 individuos a partir de cfDNA, células sanguíneas y tumor. Los resultados preliminares de este estudio, en 1412 individuos (pacientes y controles sanos), muestran la elevada prevalencia de estas alteraciones de origen hematopoyético: el 7% de los individuos presentaron CHIP con frecuencias alélicas >10%, el 39% con >1%, y el 92% con >0,1% <sup>208</sup>. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia la NGS en el diagnóstico temprano del cáncer y las implicaciones de la hematopoyesis clonal en la interpretación de sus resultados.

En conclusión, con este estudio hemos podido comprobar la utilidad de la secuenciación masiva para la detección y cuantificación de biomarcadores a partir de ADN circulante en muestras reales de pacientes con CPNCP. Entre las aplicaciones más importantes de esta técnica cabe destacar la detección de mutaciones de resistencia a tratamiento y su potencial utilidad en la detección temprana de biomarcadores. Además, su uso en combinación con la PCR digital puede ser una herramienta fundamental para la monitorización de estos pacientes de forma no invasiva, si bien existen ciertas causas de falsos positivos como la hematopoyesis clonal que deberán tenerse en cuenta en la práctica clínica diaria.



# CONCLUSIONES





1. Las condiciones preanalíticas del estudio del ADN circulante influyen de forma esencial en el proceso analítico, por lo que su implantación y control debe realizarse de forma rigurosa por parte del laboratorio.
2. La metodología desarrollada por el laboratorio, basada en PCR digital permite la detección de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante en pacientes con CPNCP con un límite de detección de 0,1% para las mutaciones p. T790M, p. L858R, p. E746\_A750delELREA y p. G719S
3. El estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante obtenido de plasma en pacientes con CPNCP resulta de gran utilidad para la monitorización de la respuesta al tratamiento con TKIs de forma complementaria a la imagen y ha demostrado tener valor pronóstico en estos pacientes.
4. El estudio de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de ADN circulante obtenido de líquidos biológicos en pacientes con CPNCP presenta un rendimiento superior a los estudios en sangre y resulta de utilidad para valorar resultados negativos o dudosos.
5. La secuenciación masiva de alta sensibilidad es una tecnología útil para el estudio de biomarcadores a partir de ADN circulante. Esta técnica presenta una excelente concordancia en términos de genotipado con la PCR digital. Del mismo modo, la correlación entre ambas metodologías para la determinación de frecuencias alélicas es muy elevada.



---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Stewart BW, Wild CP. World cancer report 2014. n.d.
2. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, Alemán A, Torrella A, Chico M, Vicente M, Díaz JM, Larrañaga N, Marcos-Gragera R, Sánchez MJ, Perucha J, Franch P, Navarro C, Ardanaz E, Bigorra J, Rodrigo P, Bonet RP, Mateos A, Almar E, Quirós JR, Argüelles M V., Rojas D, Alemán A, Torrella A, Sabater C, Botella P, Chico M, Ripoll M, Díaz C, Vicente M, Fuster N, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*, 2017, 19:799–825
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015, 136:E359–86
4. Lee PN, Forey BA, Coombs KJ. Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence in the 1900s relating smoking to lung cancer. *BMC Cancer*, 2012, 12:385
5. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 2003, 123:21S–49S
6. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19:1893–907
7. Spyrtos D, Zarogoulidis P, Porpodis K, Tsakiridis K, Machairiotis N, Katsikogiannis N, Kougioumtzi I, Dryllis G, Kallianos A, Rapti A, Li C, Zarogoulidis K. Occupational exposure and lung cancer. *J Thorac Dis*, 2013, 5 Suppl 4:S440-5
8. Wong MCS, Lao XQ, Ho K-F, Goggins WB, Tse SLA. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Sci Rep*, 2017, 7:14300
9. Team TNLSTR. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med*, 2011, 365:395–409
10. Yang P. Epidemiology of Lung Cancer Prognosis: Quantity and Quality of Life. *Methods Mol. Biol.*, vol. 471, 2009, pp. 469–86

11. Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced *ALK* -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2015, 373:1582–1582
12. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isoabe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T, North-East Japan Study Group. Gefitinib or Chemotherapy for Non–Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N Engl J Med*, 2010, 362:2380–8
13. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, Kerr K, Popat S, Reck M, Senan S, Simo G V., Vansteenkiste J, Peters S, on behalf of the ESMO Guidelines Committee. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2016, 27:V1–27
14. Toh C-K, Gao F, Lim W-T, Leong S-S, Fong K-W, Yap S-P, Hsu AAL, Eng P, Koong H-N, Thirugnanam A, Tan E-H. Never-Smokers With Lung Cancer: Epidemiologic Evidence of a Distinct Disease Entity. *J Clin Oncol*, 2006, 24:2245–51
15. Subramanian J, Velcheti V, Gao F, Govindan R. Presentation and Stage-Specific Outcomes of Lifelong Never-smokers with Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). *J Thorac Oncol*, 2007, 2:827–30
16. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, Beer DG, Cope L, Creighton CJ, Danilova L, Ding L, Getz G, Hammerman PS, Neil Hayes D, Hernandez B, Herman JG, Heymach J V., Jurisica I, Kucherlapati R, Kwiatkowski D, Ladanyi M, Robertson G, Schultz N, Shen R, Sinha R, Sougnez C, Tsao M-S, Travis WD, Weinstein JN, Wigle DA, Wilkerson MD, Chu A, Cherniack AD, Hadjipanayis A, Rosenberg M, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 2014, 511:543–50
17. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, Berry LD, Dias-Santagata D, Wistuba II, Chen H, Fujimoto J, Kugler K, Franklin WA, Iafrate AJ, Ladanyi M, Kris MG, Johnson BE, Bunn PA, Minna JD, Kwiatkowski DJ. Multi-institutional oncogenic driver mutation analysis in lung adenocarcinoma: The lung cancer mutation consortium experience. *J Thorac Oncol*, 2015, 10:768–77

18. Cheng L, Alexander RE, MacLennan GT, Cummings OW, Montironi R, Lopez-Beltran A, Cramer HM, Davidson DD, Zhang S. Molecular pathology of lung cancer: Key to personalized medicine. *Mod Pathol*, 2012, 25:347–69
19. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol*, 2015, 10:1243–60
20. Kim HS, Mitsudomi T, Soo RA, Cho BC. Personalized therapy on the horizon for squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 2013, 80:249–55
21. Hammerman PS, Lawrence MS, Voet D, Jing R, Cibulskis K, Sivachenko A, Stojanov P, McKenna A, Lander ES, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Imielinski M, Helman E, Hernandez B, Pho NH, Meyerson M, Chu A, Chun H-JE, Mungall AJ, Pleasance E, Gordon Robertson A, Sipahimalani P, Stoll D, Balasundaram M, Birol I, Butterfield YSN, Chuah E, Coope RJN, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 2012, 489:519–25
22. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. *J Thorac Oncol*, 2007, 2:706–14
23. Detterbeck FC, Chansky K, Groome P, Bolejack V, Crowley J, Shemanski L, Kennedy C, Krasnik M, Peake M, Rami-Porta R, Goldstraw P, Rami-Porta R, Asamura H, Ball D, Beer DG, Beyruti R, Bolejack V, Chansky K, Crowley J, Detterbeck F, Eberhardt WEE, Edwards J, Galateau-Sallé F, Giroux D, Gleeson F, Groome P, Huang J, Kennedy C, Kim J, Kim YT, Kingsbury L, Kondo H, Krasnik M, Kubota K, Lerut A, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Methodology and Validation Used in the Development of Proposals for Revision of the Stage Classification of NSCLC in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 2016, 11:1433–46
24. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*, 2017, 151:193–203

25. García-Campelo R, Bernabé R, Cobo M, Corral J, Coves J, Dómine M, Nadal E, Rodríguez-Abreu D, Viñolas N, Massuti B. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) 2015. *Clin Transl Oncol*, 2015, 17:1020–9
26. Sánchez De Cos Escuín J. El cáncer de pulmón en España. Epidemiología, supervivencia y tratamiento actuales. *Arch Bronconeumol*, 2009, 45:341–8
27. Sim EH, Yang IA, Wood-Baker R, Bowman R V, Fong KM. Gefitinib for advanced non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 1:CD006847
28. Zhou J, Zheng J, Zhang X, Zhao J, Zhu Y, Shen Q, Wang Y, Sun K, Zhang Z, Pan Z, Shen Y, Zhou J. Crizotinib in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive advanced non-small cell lung cancer versus chemotherapy as a first-line treatment. *BMC Cancer*, 2018, 18:10
29. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, Lew M, Pantelas J, Ramalingam SS, Reck M, Saqi A, Simoff M, Singh N, Sundaram B. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the . *J Clin Oncol*, 2018:JCO2017767293
30. Felip E, Concha, de Castro J, Gómez-Román J, Garrido P, Ramírez J, Isla D, Sanz J, Paz-Ares L, López-Ríos F. Biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*, 2014, 17:103–12
31. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba JL, Paz-Ares L, Bover I, Garcia-Campelo R, Moreno MA, Catot S, Rolfo C, Reguart N, Palmero R, Sánchez JM, Bastus R, Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina MA, Sanchez JJ, Taron M. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2009, 361:958–67
32. Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou S-HI, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim W-H, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist L V., Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M,

- Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2010, 363:1693–703
33. Sharma S V., Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7:169–81
34. Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer—is it becoming a reality? *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7:401–14
35. Mendelsohn J. Growth factor receptors as targets for antitumor therapy with monoclonal antibodies. *Prog Allergy*, 1988, 45:147–60
36. Lynch T, Bell D, Sordella R. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small- Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med*, 2004, 350:2129–39
37. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science (80- )*, 2004, 304:1497–500
38. Sequist L V, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, Bergethon K, Shaw AT, Gettinger S, Cosper AK, Akhavanfard S, Heist RS, Temel J, Christensen JG, Wain JC, Lynch TJ, Vernovsky K, Mark EJ, Lanuti M, Iafrate AJ, Mino-Kenudson M, Engelman JA. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*, 2011, 3:75ra26
39. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, Kris MG, Pao W, Miller VA, Ladanyi M. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res*, 2011, 17:1169–80
40. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B. *EGFR* Mutation and Resistance of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med*, 2005, 352:786–92
41. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Med*,

2005, 2:e73

42. Lee CK, Brown C, Gralla RJ, Hirsh V, Thongprasert S, Tsai CM, Tan EH, Ho JCM, Chu DT, Zaatar A, Osorio Sanchez JA, Vu V Van, Au JSK, Inoue A, Lee SM, GebSKI V, Yang JCH. Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: A meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105:595–605
43. Ku GY, Haaland BA, de Lima Lopes G. Gefitinib vs. chemotherapy as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer: Meta-analysis of phase III trials. *Lung Cancer*, 2011, 74:469–73
44. Sheikine Y, Rangachari D, McDonald DC, Huberman MS, Folch ES, VanderLaan PA, Costa DB. EGFR Testing in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer, A Mini-Review. *Clin Lung Cancer*, 2016, 17:483–92
45. Yasuda H, Park E, Yun C-H, Sng NJ, Lucena-Araujo AR, Yeo W-L, Huberman MS, Cohen DW, Nakayama S, Ishioka K, Yamaguchi N, Hanna M, Oxnard GR, Lathan CS, Moran T, Sequist L V, Chaft JE, Riely GJ, Arcila ME, Soo RA, Meyerson M, Eck MJ, Kobayashi SS, Costa DB. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med*, 2013, 5:216ra177
46. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, Longo F, Moran T, Insa A, De Marinis F, Corre R, Bover I, Illiano A, Dansin E, de Castro J, Milella M, Reguart N, Altavilla G, Jimenez U, Provencio M, Moreno MA, Terrasa J, Muñoz-Langa J, Valdivia J, Isla D, Domine M, Molinier O, Mazieres J, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2012, 13:239–46
47. Zhou C, Wu Y-L, Chen G, Feng J, Liu X-Q, Wang C, Zhang S, Wang J, Zhou S, Ren S, Lu S, Zhang L, Hu C, Hu C, Luo Y, Chen L, Ye M, Huang J, Zhi X, Zhang Y, Xiu Q, Ma J, Zhang L, You C. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 2011, 12:735–42

48. Wu Y-L, Zhou C, Liam C-K, Wu G, Liu X, Zhong Z, Lu S, Cheng Y, Han B, Chen L, Huang C, Qin S, Zhu Y, Pan H, Liang H, Li E, Jiang G, How SH, Fernando MCL, Zhang Y, Xia F, Zuo Y. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced *EGFR* mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol*, 2015, 26:1883–9
49. Park K, Tan E-H, O'Byrne K, Zhang L, Boyer M, Mok T, Hirsh V, Yang JC-H, Lee KH, Lu S, Shi Y, Kim S-W, Laskin J, Kim D-W, Arvis CD, Kölbeck K, Laurie SA, Tsai C-M, Shahidi M, Kim M, Massey D, Zazulina V, Paz-Ares L. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with *EGFR* mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 2016, 17:577–89
50. Park K, Tan E-H, O'Byrne K, Zhang L, Boyer M, Mok T, Hirsh V, Yang JC-H, Lee KH, Lu S, Shi Y, Kim S-W, Laskin J, Kim D-W, Arvis CD, Kölbeck K, Laurie SA, Tsai C-M, Shahidi M, Kim M, Massey D, Zazulina V, Paz-Ares L. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with *EGFR* mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 2016, 17:577–89
51. Park K, Tan E-H, O'Byrne K, Zhang L, Boyer M, Mok T, Hirsh V, Yang JC-H, Lee KH, Lu S, Shi Y, Kim S-W, Laskin J, Kim D-W, Arvis CD, Kölbeck K, Laurie SA, Tsai C-M, Shahidi M, Kim M, Massey D, Zazulina V, Paz-Ares L. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with *EGFR* mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 2016, 17:577–89
52. Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, Suehisa H, Ouchida M, Aoe K, Aoe M, Kiura K, Shimizu N, Date H. Presence of *Epidermal Growth Factor Receptor* Gene T790M Mutation as a Minor Clone in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*, 2006, 66:7854–8
53. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, Shepherd FA, He Y, Akamatsu H, Theelen WSME, Lee CK, Sebastian M, Templeton A, Mann H, Marotti M, Ghiorghiu S, Papadimitrakopoulou VA. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in *EGFR* T790M–Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2017, 376:629–40

54. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, Dechaphunkul A, Imamura F, Nogami N, Kurata T, Okamoto I, Zhou C, Cho BC, Cheng Y, Cho EK, Voon PJ, Planchard D, Su W-C, Gray JE, Lee S-M, Hodge R, Marotti M, Rukazenkov Y, Ramalingam SS. Osimertinib in Untreated *EGFR* - Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2018, 378:113–25
55. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, Lai Z, Markovets A, Vivancos A, Kuang Y, Ercan D, Matthews SE, Cantarini M, Barrett JC, Jänne PA, Oxnard GR. Acquired *EGFR* C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring *EGFR* T790M. *Nat Med*, 2015, 21:560–2
56. Yu HA, Tian SK, Drilon AE, Borsu L, Riely GJ, Arcila ME, Ladanyi M. Acquired Resistance of *EGFR*- Mutant Lung Cancer to a T790M-Specific *EGFR* Inhibitor. *JAMA Oncol*, 2015, 1:982
57. Jia Y, Yun C-H, Park E, Ercan D, Manuia M, Juarez J, Xu C, Rhee K, Chen T, Zhang H, Palakurthi S, Jang J, Lelais G, DiDonato M, Bursulaya B, Michellys P-Y, Epple R, Marsilje TH, McNeill M, Lu W, Harris J, Bender S, Wong K-K, Jänne PA, Eck MJ. Overcoming *EGFR*(T790M) and *EGFR*(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature*, 2016, 534:129–32
58. Wang S, Song Y, Liu D. EAI045: The fourth-generation *EGFR* inhibitor overcoming T790M and C797S resistance. *Cancer Lett*, 2017, 385:51–4
59. Wood DE, Chair V, Aisner DL, Akerley W, Bauman J, Chang JY, Chirieac LR, D TA, DeCamp MM, Lurie RH, Dilling TJ, Dobelbower M, Govindan R, Gubens MA, Helen Diller Family U, Hennon M, Horn L, Lackner RP, Lanuti M, Leal TA, Leisch LJ, Lin J, Loo BW, Martins R, Otterson GA, Reckamp K, Riely GJ, Schild SE, Shapiro TA, Stevenson J, Swanson SJ, Tauer K, Jude S, Yang SC, Hughes M. NCCN Guidelines Version 3.2018 Panel Members Non-Small Cell Lung Cancer. 2018
60. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara SI, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007, 448:561–6

61. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Niki T, Mano H, Ishikawa Y. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol*, 2008, 3:13–7
62. Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, Yoshizawa A, Menju T, Nakayama E, Mino N, Iwakiri S, Sato K, Miyahara R, Okubo K, Manabe T, Date H. Clinicopathologic Features of Non-Small-Cell Lung Cancer with EML4–ALK Fusion Gene. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17:889–97
63. Cai W, Lin D, Wu C, Li X, Zhao C, Zheng L, Chuai S, Fei K, Zhou C, Hirsch FR. Intratumoral Heterogeneity of ALK-Rearranged and ALK/EGFR Coaltered Lung Adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 2015, 33:3701–9
64. Birkbak NJ, Hiley CT, Swanton C, Cancer L, Crick TF. Evolutionary Precision Medicine : A Role for Repeat Epidermal Growth Factor Receptor Analysis in ALK -Rearranged Lung Adenocarcinoma ? *J Clin Oncol*, 2015, 33:3681–4
65. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J, Usari T, Iyer S, Reisman A, Wilner KD, Tursi J, Blackhall F. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2014, 371:2167–77
66. Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*, 2012, 30:863–70
67. Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist*, 2013, 18:865–75
68. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, Tan W, Stephenson P, Shreeve SM, Tye LM, Christensen JG, Wilner KD, Clark JW, Iafrate AJ. Crizotinib in ROS1 -Rearranged Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2014, 371:1963–71
69. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, Marchetti A, Mok T, Novello S, O’Byrne K, Stahel R, Peters S, Felip E, Besse B, Vansteenkiste J, Eberhardt W, Baas P, Reck

- M, Syrigos K, Paz-Ares L, Smit EF, Meldgaard P, Adjei A, Nicolson M, Crinò L, Schil P Van, Senan S, Faivre-Finn C, Rocco G, Veronesi G, Douillard JY, Lim E, Doms C, Weder W, de Ruyscher D, Le Pechoux C, de Leyn P, Westeel V. Second ESMO consensus conference on lung cancer: Pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 2014, 25:1681–90
70. Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, Swanton C. Translational Implications of Tumor Heterogeneity. *Clin Cancer Res*, 2015, 21:1258–66
71. Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, Wedge DC, Song X, Zhang J, Seth S, Chow C-W, Cao Y, Gumbs C, Gold KA, Kalhor N, Little L, Mahadeshwar H, Moran C, Protopopov A, Sun H, Tang J, Wu X, Ye Y, William WN, Lee JJ, Heymach J V., Hong WK, Swisher S, Wistuba II, Futreal PA. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* (80- ), 2014, 346:256–9
72. Kleppe M, Levine RL. Tumor Heterogeneity Confounds and Illuminates: Assessing the implications. *Nat Med*, 2014, 20:342–4
73. Pérez-Callejo D, Romero A, Provencio M, Torrente M. Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5:455–65
74. Paci M, Maramotti S, Bellesia E, Formisano D, Albertazzi L, Ricchetti T, Ferrari G, Annessi V, Lasagni D, Carbonelli C, De Franco S, Brini M, Sgarbi G, Lodi R. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2009, 64:92–7
75. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, 1977, 37:646–50
76. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong S-M, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SKN, Netto GJ, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med*, 2014, 6:224ra24-224ra24
77. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, Dunning MJ,

- Gale D, ForsheW T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*, 2013, 368:1199–209
78. Aung KL, Board RE, Ellison G, Donald E, Ward T, Clack G, Ranson M, Hughes A, Newman W, Dive C. Current status and future potential of somatic mutation testing from circulating free DNA in patients with solid tumours. *Hugo J*, 2010, 4:11–21
79. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 1989, 46:318–22
80. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, Sequist L V., Camidge DR, Wakelee H, Perol M, Oxnard GR, Kosco K, Croucher P, Samuelsz E, Vibat CR, Guerrero S, Geis J, Berz D, Mann E, Matheny S, Rolfe L, Raponi M, Erlander MG, Gadgeel S. A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *J Thorac Oncol*, 2016, 11:1690–700
81. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martínez-Ricarte F, Torrejon D, Oliveira M, Arias A, Raventos C, Tang J, Guerini-Rocco E, Martínez-Sáez E, Lois S, Marín O, de la Cruz X, Piscuoglio S, Towers R, Vivancos A, Peg V, Cajal SR y, Carles J, Rodon J, González-Cao M, Tabernero J, Felip E, Sahuquillo J, Berger MF, Cortes J, Reis-Filho JS, Seoane J. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun*, 2015, 6:8839
82. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib. *Br J Cancer*, 2006, 95:1390–5
83. He C, Liu M, Zhou C, Zhang J, Ouyang M, Zhong N, Xu J. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by mutant-enriched PCR assay for prediction of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*, 2009, 125:2393–9
84. Siravegna G, Bardelli A. Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance. *Genome Biol*, 2014, 15:449
85. Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, Wang L, Makrigiorgos M, Vetrand K, Thiede S,

- Distel RJ, Janne PA. Noninvasive Detection of EGFR T790M in Gefitinib or Erlotinib Resistant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:2630–6
86. Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M, Yokota S, Aoe K, Iwanaga K, Otsuka K, Morita S, Kimura S, Negoro S, Hanshin-Saga Collaborative Cancer Study Group. Monitoring *EGFR* T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *Cancer Sci*, 2016, 107:162–7
87. Wang Z, Chen R, Wang S, Zhong J, Wu M, Zhao J, Duan J, Zhuo M, An T, Wang Y, Bai H, Wang J. Quantification and Dynamic Monitoring of EGFR T790M in Plasma Cell-Free DNA by Digital PCR for Prognosis of EGFR-TKI Treatment in Advanced NSCLC. *PLoS One*, 2014, 9:e110780
88. Kim MK, Woo SM, Park B, Yoon K-A, Kim Y-H, Joo J, Lee WJ, Han S-S, Park S-J, Kong S-Y. Prognostic Implications of Multiplex Detection of *KRAS* Mutations in Cell-Free DNA from Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Chem*, 2018:clinchem.2017.283721
89. Tan G, Chu C, Gui X, Li J, Chen Q. The prognostic value of circulating cell-free DNA in breast cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97:e0197
90. Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, Sueda T, Hiyama E. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 2016, 115:59–65
91. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, Silliman N, Tacey M, Wong H-L, Christie M, Kosmider S, Skinner I, Wong R, Steel M, Tran B, Desai J, Jones I, Haydon A, Hayes T, Price TJ, Strausberg RL, Diaz LA, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Gibbs P. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*, 2016, 8:346ra92-346ra92
92. Heitzer E, Perakis S, Geigl JB, Speicher MR. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. *Npj Precis Oncol*, 2017, 1:36
93. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17:223–38

94. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*, 2013, 424:222–30
95. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 2001, 61:1659–65
96. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*, 2015, 61:112–23
97. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta*, 2015, 450:243–53
98. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*, 2013, 424:222–30
99. Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, Jiménez-Sánchez C, Calvo V, Gutierrez-Sanz L, Palka M, Donoso-Navarro E, Provencio M, Romero A. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5:665–72
100. von Bubnoff N. Liquid Biopsy: Approaches to Dynamic Genotyping in Cancer. *Oncol Res Treat*, 2017, 40:409–16
101. Pérez-Callejo D, Romero A, Provencio M, Torrente M. Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5:455–65
102. Bordi P, Del Re M, Danesi R, Tiseo M. Circulating DNA in diagnosis and monitoring EGFR gene mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4:584–97
103. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100:8817–22
104. Thress KS, Brant R, Carr TH, Dearden S, Jenkins S, Brown H, Hammett T, Cantarini M, Barrett JC. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the

- clinical development of AZD9291. *Lung Cancer*, 2015, 90:509–15
105. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol*, 2014, 32:579–86
106. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, Sebisano D, Lopez R, Blau S, Collisson EA, Divers SG, Hoon DSB, Kopetz ES, Lee J, Nikolinakos PG, Baca AM, Kermani BG, Eltoukhy H, Talasaz A. Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *PLoS One*, 2015, 10:e0140712
107. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 2009, 45:228–47
108. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17:223–38
109. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology developed to complement the Parent Guideline, 2005
110. Paesmans M. Prognostic and predictive factors for lung cancer. *Breathe*, 2012, 9:112–21
111. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, Colasacco C, Dacic S, Hirsch FR, Kerr K, Kwiatkowski DJ, Ladanyi M, Nowak JA, Sholl L, Temple-Smolkin R, Solomon B, Souter LH, Thunnissen E, Tsao MS, Ventura CB, Wynes MW, Yatabe Y. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Mol Diagnostics*, 2018, 20:129–59
112. Kuiper JL, Heideman DAM, Thunnissen E, Paul MA, van Wijk AW, Postmus PE, Smit EF. Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients. *Lung Cancer*, 2014, 85:19–24
113. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, Kris MG, Miller

- VA, Ladanyi M, Riely GJ. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res*, 2013, 19:2240–7
114. Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ, Chmielecki J, Kris MG, Pao W, Ladanyi M, Miller VA. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant lung cancer: Distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res*, 2011, 17:1616–22
115. Jekunen AP. Role of rebiopsy in relapsed non-small cell lung cancer for directing oncology treatments. *J Oncol*, 2015, 2015:809835
116. Jenkins S, Yang JC-H, Ramalingam SS, Yu K, Patel S, Weston S, Hodge R, Cantarini M, Jänne PA, Mitsudomi T, Goss GD. Plasma ctDNA Analysis for Detection of the EGFR T790M Mutation in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 2017, 12:1061–70
117. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrence R, Paweletz CP, Cantarini M, Yang JC-H, Barrett JC, Jänne PA. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 2016, 34:3375–82
118. Sundaresan TK, Sequist L V., Heymach J V., Riely GJ, Jänne PA, Koch WH, Sullivan JP, Fox DB, Maher R, Muzikansky A, Webb A, Tran HT, Giri U, Fleisher M, Yu HA, Wei W, Johnson BE, Barber TA, Walsh JR, Engelman JA, Stott SL, Kapur R, Maheswaran S, Toner M, Haber DA. Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses. *Clin Cancer Res*, 2016, 22:1103–10
119. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14:531–48
120. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, Lindeman N, Lockwood CM, Rai AJ, Schilsky RL, Tsimberidou AM, Vasalos P, Billman BL, Oliver TK, Bruinooge SS, Hayes DF, Turner NC. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol*, 2018, 36:1631–41
121. Xu T, Kang X, You X, Dai L, Tian D, Yan W, Yang Y, Xiong H, Liang Z, Zhao GQ, Lin S, Chen K-N, Xu G. Cross-Platform Comparison of Four Leading Technologies

- for Detecting *EGFR* Mutations in Circulating Tumor DNA from Non-Small Cell Lung Carcinoma Patient Plasma. *Theranostics*, 2017, 7:1437–46
122. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, Kerr K, Popat S, Reck M, Senan S, Simo G V., Vansteenkiste J, Peters S. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*, 2016, 27:v1–27
123. Understanding Prognostic versus Predictive Biomarkers. n.d.
124. Zheng D, Ye X, Zhang MZ, Sun Y, Wang JY, Ni J, Zhang HP, Zhang L, Luo J, Zhang J, Tang L, Su B, Chen G, Zhu G, Gu Y, Xu JF. Plasma *EGFR* T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired *EGFR*-TKI resistance. *Sci Rep*, 2016, 6:20913
125. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, Esfahani MS, Newman AM, Haringsma HJ, Kurtz DM, Stehr H, Scherer F, Karlovich CA, Harding TC, Durkin KA, Otterson GA, Purcell WT, Camidge DR, Goldman JW, Sequist L V., Piotrowska Z, Wakelee HA, Neal JW, Alizadeh AA, Diehn M. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of *EGFR* inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun*, 2016, 7:11815
126. Sorensen BS, Wu L, Wei W, Tsai J, Weber B, Nexø E, Meldgaard P. Monitoring of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor-Sensitizing and Resistance Mutations in the Plasma DNA of Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer During Treatment With Erlotinib, n.d. <https://doi.org/10.1002/cncr.28964>
127. Ricordel C, Friboulet L, Facchinetti F, Soria J-C. Molecular mechanisms of acquired resistance to third-generation *EGFR*-TKIs in *EGFR* T790M-mutant lung cancer. *Ann Oncol*, 2018, 29:i28–37
128. Muller IB, De Langen AJ, Honeywell RJ, Giovannetti E, Peters GJ. Overcoming crizotinib resistance in *ALK*-rearranged NSCLC with the second-generation *ALK*-inhibitor ceritinib. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2016, 16:147–57
129. Alegre E, Fusco JP, Restituto P, Salas-Benito D, Rodríguez-Ruiz ME, Andueza MP, Pajares MJ, Patiño-García A, Pio R, Lozano MD, Gúrpide A, Lopez-Picazo JM, Gil-Bazo I, Perez-Gracia JL, Gonzalez A. Total and mutated *EGFR* quantification in cell-free DNA from non-small cell lung cancer patients detects

- tumor heterogeneity and presents prognostic value. *Tumor Biol*, 2016, 37:13687–94
130. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, Luke JJ, Butaney M, Kirschmeier P, Jackman DM, Janne PA. Noninvasive Detection of Response and Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer Using Quantitative Next-Generation Genotyping of Cell-Free Plasma DNA. *Clin Cancer Res*, 2014, 20:1698–705
  131. Wei Z, Shah N, Deng C, Xiao X, Zhong T, Li X. Circulating DNA addresses cancer monitoring in non small cell lung cancer patients for detection and capturing the dynamic changes of the disease. Springerplus, 2016, 5:531
  132. Haselmann V, Ahmad-Nejad P, Geilenkeuser WJ, Duda A, Gabor M, Eichner R, Patton S, Neumaier M. Results of the first external quality assessment scheme (EQA) for isolation and analysis of circulating tumour DNA (ctDNA). *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56:220–8
  133. Malentacchi F, Pizzamiglio S, Verderio P, Pazzagli M, Orlando C, Ciniselli CM, Günther K, Gelmini S. Influence of storage conditions and extraction methods on the quantity and quality of circulating cell-free DNA (ccfDNA): the SPIDIA-DNAplas External Quality Assessment experience. *Clin Chem Lab Med*, 2015, 53:1935–42
  134. Oxnard GR, Paweletz CP, Sholl LM. Genomic Analysis of Plasma Cell-Free DNA in Patients With Cancer. *JAMA Oncol*, 2017, 3:740
  135. Bennett CW, Berchem G, Kim YJ, El-Khoury V. Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer. *Oncotarget*, 2016, 7:71013–35
  136. Zhang Y-C, Zhou Q, Wu Y-L. The emerging roles of NGS-based liquid biopsy in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*, 2017, 10:167
  137. Pan W, Yang Y, Zhu H, Zhang Y, Zhou R, Sun X. KRAS mutation is a weak, but valid predictor for poor prognosis and treatment outcomes in NSCLC: A meta-analysis of 41 studies. *Oncotarget*, 2016, 7:8373–88
  138. Mohammed AA, El-Tanni H, Alsakkaf MA, Mirza AA, Atiah TA-M, Atiah AA-M. Genomic aberrations in non- small cell lung cancer and their impact on treatment

- outcome. *J Cancer Res Ther*, 2017, 13:9–15
139. Garcia J, Dusserre E, Cheynet V, Bringuier PP, Brengle-Pesce K, Wozny A-S, Rodriguez-Lafrasse C, Freyer G, Brevet M, Payen L, Couraud S. Evaluation of pre-analytical conditions and comparison of the performance of several digital PCR assays for the detection of major EGFR mutations in circulating DNA from non-small cell lung cancers: the CIRCAN\_0 study. *Oncotarget*, 2017, 8:87980–96
140. Lu J-L, Liang Z-Y. Circulating free DNA in the era of precision oncology: Pre- and post-analytical concerns. *Chronic Dis Transl Med*, 2016, 2:223–30
141. Kumar M, Choudhury Y, Ghosh SK, Mondal R. Application and optimization of minimally invasive cell-free DNA techniques in oncogenomics. *Tumor Biol*, 2018, 40:101042831876034
142. Lam NYL, Rainer TH, Chiu RWK, Lo YMD. EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. *Clin Chem*, 2004, 50:256–7
143. Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta*, 2009, 404:100–4
144. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10:472–84
145. Toro PV, Erlanger B, Beaver JA, Cochran RL, VanDenBerg DA, Yakim E, Cravero K, Chu D, Zabransky DJ, Wong HY, Croessmann S, Parsons H, Hurley PJ, Lauring J, Park BH. Comparison of cell stabilizing blood collection tubes for circulating plasma tumor DNA. *Clin Biochem*, 2015, 48:993–8
146. Warton K, Yuwono NL, Cowley MJ, McCabe MJ, So A, Ford CE. Evaluation of Streck BCT and PAXgene Stabilised Blood Collection Tubes for Cell-Free Circulating DNA Studies in Plasma. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21:563–70
147. Swinkels DW, Wiegerinck E, Steegers EAP, de Kok JB. Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. *Clin Chem*, 2003, 49:525–6
148. Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM. Effects of blood-

- processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem*, 2001, 47:1607–13
149. Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, Gocke CD. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*, 1997, 76:1293–9
150. Zonta E, Nizard P, Taly V. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. *Adv Clin Chem*, 2015, 70:197–246
151. Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS One*, 2016, 11:e0150528
152. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M, Gori T, Ehlert T, Beiter T, Simon P. Direct Quantification of Cell-Free, Circulating DNA from Unpurified Plasma. *PLoS One*, 2014, 9:e87838
153. Fong SL, Zhang JT, Lim CK, Eu KW, Liu Y. Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clin Chem*, 2009, 55:587–9
154. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DMI, Leszinski GS, Siegele B, Stötzer OJ, Nagel D, Holdenrieder S. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta*, 2011, 412:2085–8
155. Holmberg RC, Gindlesperger A, Stokes T, Lopez D, Hyman L, Freed M, Belgrader P, Harvey J, Li Z. Akonni TruTip® and Qiagen® Methods for Extraction of Fetal Circulating DNA - Evaluation by Real-Time and Digital PCR. *PLoS One*, 2013, 8:e73068
156. Page K, Hava N, Ward B, Brown J, Guttery DS, Ruangpratheep C, Blighe K, Sharma A, Walker RA, Coombes RC, Shaw JA. Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Br J Cancer*, 2011, 104:1342–8
157. Zill OA, Greene C, Sebisano D, Siew LM, Leng J, Vu M, Hendifar AE, Wang Z, Atreya CE, Kelley RK, Van Loon K, Ko AH, Tempero MA, Bivona TG, Munster PN, Talasz A, Collisson EA. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov*, 2015, 5:1040–8

158. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res*, 1977, 37:646–50
159. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, Huggett JF. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: Controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406:6499–512
160. Klotten V, Rüchel N, Bröchle NO, Gasthaus J, Freudenmacher N, Steib F, Mijnes J, Eschenbruch J, Binnebösel M, Knüchel R, Dahl E, Klotten V, Rüchel N, Ortiz Bröchle N, Gasthaus J, Freudenmacher N, Steib F, Mijnes J, Eschenbruch J, Binnebösel M, Knüchel R, Dahl E. Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of *KRAS* mutations using Intplex allele-specific PCR. *Oncotarget*, 2017, 8:86253–63
161. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Fertig G, Fürst H, Schalhorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D. Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int J Cancer*, 2001, 95:114–20
162. Kuhlmann JD, Schwarzenbach H, Wimberger P, Poetsch M, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. LOH at 6q and 10q in fractionated circulating DNA of ovarian cancer patients is predictive for tumor cell spread and overall survival. *BMC Cancer*, 2012, 12:325
163. Holdenrieder S, Stieber P, Förg T, Kühl M, Schulz L, Busch M, Schalhorn A, Seidel D. Apoptosis in serum of patients with solid tumours. *Anticancer Res*, n.d., 19:2721–4
164. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, Pauwels P. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits. *J Mol Diagnostics*, 2017, 19:162–8
165. ISO 9001:2015(en), Quality management systems — Requirements, n.d. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9001:ed-5:v1:en>. (accessed March 25, 2018)
166. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the

- management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14:531–48
167. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas*, 1960, 20:37–46
168. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977, 33:159–74
169. Keppens C, Dequeker EMC, Patton SJ, Normanno N, Fenizia F, Butler R, Cheetham M, Fairley JA, Williams H, Hall JA, Schuurin E, Deans ZC. International pilot external quality assessment scheme for analysis and reporting of circulating tumour DNA. *BMC Cancer*, 2018, 18:804
170. Chan KCA, Yeung S-W, Lui W-B, Rainer TH, Lo YMD. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem*, 2005, 51:781–4
171. Bernabé R, Hickson N, Wallace A, Blackhall FH. What do we need to make circulating tumour DNA (ctDNA) a routine diagnostic test in lung cancer? *Eur J Cancer*, 2017, 81:66–73
172. Lu J-L, Liang Z-Y. Circulating free DNA in the era of precision oncology: Pre- and post-analytical concerns. *Chronic Dis Transl Med*, 2016, 2:223–30
173. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, Müller CR, Pratt V, Wallace A, EuroGentest Validation Group. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18:1276–88
174. Imamura F, Uchida J, Kukita Y, Kumagai T, Nishino K, Inoue T, Kimura M, Oba S, Kato K. Monitoring of treatment responses and clonal evolution of tumor cells by circulating tumor DNA of heterogeneous mutant EGFR genes in lung cancer. *Lung Cancer*, 2016, 94:68–73
175. Mok T, Wu Y-L, Lee JS, Yu C-J, Sriuranpong V, Sandoval-Tan J, Ladrera G, Thongprasert S, Srimuninnimit V, Liao M, Zhu Y, Zhou C, Fuerte F, Margono B, Wen W, Tsai J, Truman M, Klughammer B, Shames DS, Wu L. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2015, 21:3196–203

176. Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, Lee HY, Sun J-M, Lee S-H, Ahn JS, Cho EK, Kim D-W, Kim HR, Min YJ, Jung S-H, Park K, Mao M, Ahn M-J, Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, Lee HY, Sun J-M, Lee S-H, Ahn JS, Cho EK, Kim D-W, Kim HR, Min YJ, Jung S-H, Park K, Mao M, et al. Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02). *Oncotarget*, 2016, 7:6984–93
177. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O'Connell A, Feeney N, Mach SL, Jänne PA, Oxnard GR. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of *EGFR* and *KRAS* Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol*, 2016, 2:1014
178. Mao C, Yuan J-Q, Yang Z-Y, Fu X-H, Wu X-Y, Tang J-L. Blood as a Substitute for Tumor Tissue in Detecting EGFR Mutations for Guiding EGFR TKIs Treatment of Nonsmall Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94:e775
179. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, Kris MG, Pao W, Miller VA, Ladanyi M. Rebiopsy of Lung Cancer Patients with Acquired Resistance to EGFR Inhibitors and Enhanced Detection of the T790M Mutation Using a Locked Nucleic Acid-Based Assay. *Clin Cancer Res*, 2011, 17:1169–80
180. Kaleta EJ, Tolan N V., Ness KA, O'Kane D, Algeciras-Schimmich A. CEA, AFP and CA 19-9 analysis in peritoneal fluid to differentiate causes of ascites formation. *Clin Biochem*, 2013, 46:814–8
181. Liu F, Kong X, Dou Q, Ye J, Xu D, Shang H, Xu K, Song Y. Evaluation of tumor markers for the differential diagnosis of benign and malignant ascites. *Ann Hepatol*, n.d., 13:357–63
182. Topolcan O, Holubec L, Polivkova V, Svobodova S, Pesek M, Treska V, Safranek J, Hajek T, Bartunek L, Rousarova M, Finek J. Tumor markers in pleural effusions. *Anticancer Res*, n.d., 27:1921–4
183. Husain H, Nykin D, Bui N, Quan D, Gomez G, Woodward B, Venkatapathy S, Duttagupta R, Fung E, Lippman SM, Kurzrock R. Cell-Free DNA from Ascites and Pleural Effusions: Molecular Insights into Genomic Aberrations and Disease Biology. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16:948–55

184. Heffner JE, Klein JS. Recent Advances in the Diagnosis and Management of Malignant Pleural Effusions. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83:235–50
185. Iwama E, Sakai K, Azuma K, Harada T, Harada D, Nosaki K, Hotta K, Ohyanagi F, Kurata T, Fukuhara T, Akamatsu H, Goto K, Shimose T, Kishimoto J, Nakanishi Y, Nishio K, Okamoto I. Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for *EGFR* activating mutations. *Ann Oncol*, 2016, 28:mdw531
186. Chaudhuri AA, Chabon JJ, Lovejoy AF, Newman AM, Stehr H, Azad TD, Khodadoust MS, Esfahani MS, Liu CL, Zhou L, Scherer F, Kurtz DM, Say C, Carter JN, Merriott DJ, Dudley JC, Binkley MS, Modlin L, Padda SK, Gensheimer MF, West RB, Shrager JB, Neal JW, Wakelee HA, Loo BW, Alizadeh AA, Diehn M. Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer Discov*, 2017, 7:1394–403
187. Villaflor V, Won B, Nagy R, Banks K, Lanman RB, Talasz A, Salgia R. Biopsy-free circulating tumor DNA assay identifies actionable mutations in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2016, 7:1–12
188. Schwaederle M, Husain H, Fanta PT, Piccioni DE, Kesari S, Schwab RB, Banks KC, Lanman RB, Talasz A, Parker BA, Kurzrock R, Schwaederle M, Husain H, Fanta PT, Piccioni DE, Kesari S, Schwab RB, Banks KC, Lanman RB, Talasz A, Parker BA, Kurzrock R. Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay. *Oncotarget*, 2016, 7:9707–17
189. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, Savitch SL, Fan R, Balli D, Lieberman DB, Morrisette JD, Evans TL, Bauml J, Aggarwal C, Kosteva JA, Alley E, Ciunci C, Cohen RB, Bagley S, Stonehouse-Lee S, Sherry VE, Gilbert E, Langer C, Vachani A, Carpenter EL. Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res*, 2016, 22:5772–82
190. Shajani-Yi Z, de Abreu FB, Peterson JD, Tsongalis GJ. Frequency of Somatic TP53 Mutations in Combination with Known Pathogenic Mutations in Colon Adenocarcinoma, Non-Small Cell Lung Carcinoma, and Gliomas as Identified by Next-Generation Sequencing. *Neoplasia*, 2018, 20:256–62

191. Yang M, Topaloglu U, Petty WJ, Pagni M, Foley KL, Grant SC, Robinson M, Bitting RL, Thomas A, Alistar AT, Desnoyers RJ, Goodman M, Albright C, Porosnicu M, Vatca M, Qasem SA, DeYoung B, Kytola V, Nykter M, Chen K, Levine EA, Staren ED, D'Agostino RB, Petro RM, Blackstock W, Powell BL, Abraham E, Pasche B, Zhang W, Zhang W. Circulating mutational portrait of cancer: manifestation of aggressive clonal events in both early and late stages. *J Hematol Oncol*, 2017, 10:100
192. Plagnol V, Woodhouse S, Howarth K, Lensing S, Smith M, Epstein M, Madi M, Smalley S, Leroy C, Hinton J, de Kievit F, Musgrave-Brown E, Herd C, Baker-Neblett K, Brennan W, Dimitrov P, Campbell N, Morris C, Rosenfeld N, Clark J, Gale D, Platt J, Calaway J, Jones G, Forshew T. Analytical validation of a next generation sequencing liquid biopsy assay for high sensitivity broad molecular profiling. *PLoS One*, 2018, 13:e0193802
193. Beije N, Helmijr JC, Weerts MJA, Beaufort CM, Wiggins M, Marziali A, Verhoef C, Sleijfer S, Jansen MPH, Martens JWM. Somatic mutation detection using various targeted detection assays in paired samples of circulating tumor DNA, primary tumor and metastases from patients undergoing resection of colorectal liver metastases. *Mol Oncol*, 2016, 10:1575–84
194. Demuth C, Spindler K-LG, Johansen JS, Pallisgaard N, Nielsen D, Hogdall E, Vittrup B, Sorensen BS. Measuring KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Droplet Digital PCR and Next-Generation Sequencing. *Transl Oncol*, 2018, 11:1220–4
195. Garcia J, Dusserre E, Cheynet V, Bringuier PP, Brengle-Pesce K, Wozny A-S, Rodriguez-Lafrasse C, Freyer G, Brevet M, Payen L, Couraud S. Evaluation of pre-analytical conditions and comparison of the performance of several digital PCR assays for the detection of major <i>EGFR</i> mutations in circulating DNA from non-small cell lung cancers: the CIRCAN\_0 study. *Oncotarget*, 2017, 8:87980–96
196. Provencio M, Torrente M, Calvo V, Gutiérrez L, Pérez-Callejo D, Pérez-Barríos C, Barquín M, Royuela A, Rodríguez-Alfonso B, Sotelo M, Cruz-Bermúdez JL, Mendez M, Cruz-Bermúdez A, Romero A. Dynamic circulating tumor DNA quantification for the individualization of non-small-cell lung cancer patients treatment. *Oncotarget*, 2017, 8:60291–8

197. Provencio M, Torrente M, Calvo V, Pérez-Callejo D, Gutiérrez L, Franco F, Pérez-Barrios C, Barquín M, Royuela A, García-García F, Bueno C, Garcia-Grande A, Camps C, Massuti B, Sotomayor E, Romero A. Prognostic value of quantitative ctDNA levels in non small cell lung cancer patients. *Oncotarget*, 2018, 9:488–94
198. García-Saenz JA, Ayllón P, Laig M, Acosta-Eyzaguirre D, García-Esquinas M, Montes M, Sanz J, Barquín M, Moreno F, Garcia-Barberan V, Díaz-Rubio E, Caldes T, Romero A. Tumor burden monitoring using cell-free tumor DNA could be limited by tumor heterogeneity in advanced breast cancer and should be evaluated together with radiographic imaging, n.d. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3185-9>
199. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, Cheang M, Osin P, Nerurkar A, Kozarewa I, Garrido JA, Dowsett M, Reis-Filho JS, Smith IE, Turner NC. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med*, 2015, 7:302ra133-302ra133
200. Kim T-O, Oh I-J, Kho BG, Park HY, Chang JS, Park C-K, Shin H-J, Lim J-H, Kwon Y-S, Kim Y-I, Lim S-C, Kim Y-C, Choi Y-D. Feasibility of re-biopsy and EGFR mutation analysis in patients with non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*, 2018, 9:856–64
201. Katayama R, Lovly CM, Shaw AT. Therapeutic Targeting of Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer: A Paradigm for Precision Cancer Medicine. *Clin Cancer Res*, 2015, 21:2227–35
202. Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, Michellys P-Y, Awad MM, Yanagitani N, Kim S, Pferdekamper AC, Li J, Kasibhatla S, Sun F, Sun X, Hua S, McNamara P, Mahmood S, Lockerman EL, Fujita N, Nishio M, Harris JL, Shaw AT, Engelman JA. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*, 2014, 4:662–73
203. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2015, 126:9–16
204. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Dpersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. Age-

- related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*, 2014, 20:1472–8
205. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman P V., Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*, 2014, 371:2488–98
206. Hu Y, Ulrich B, Supplee J, Kuang Y, Lizotte PH, Feeney N, Guibert N, Awad MM, Wong K-K, Janne PA, Paweletz CP, Oxnard GR. False positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis. *Clin Cancer Res*, 2018:clincanres.0143.2018
207. Hu Y, Alden RS, Odegaard JI, Fairclough SR, Chen R, Heng J, Feeney N, Nagy RJ, Shah J, Ulrich B, Gutierrez M, Lanman RB, Garber JE, Paweletz CP, Oxnard GR. Discrimination of Germline *EGFR* T790M Mutations in Plasma Cell-Free DNA Allows Study of Prevalence Across 31,414 Cancer Patients. *Clin Cancer Res*, 2017, 23:7351–9
208. Swanton C, Venn O, Aravanis A, Hubbell E, Maddala T, Beausang JF, Filippova D, Gross S, Jamshidi A, Shen L, Valouev A, Zhang N, Bolton KL, Yeatman TJ, Seiden M, Oxnard GR, Liu MC, Williams RT, Hartman A-R, Baselga J. Prevalence of clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) measured by an ultra-sensitive sequencing assay: Exploratory analysis of the Circulating Cancer Genome Atlas (CCGA) study. *J Clin Oncol*, 2018, 36:12003–12003
209. SEOM. La cifras del cáncer en España. *Seom*, 2017:28
210. Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. Pulmón, Pared Torácica, Pleura y Mediastino. *Tratado de Cirugía*, 2014, pp. 1564–695
211. Tsao AS, Scagliotti G V., Bunn PA, Carbone DP, Warren GW, Bai C, De Koning HJ, Uraujh Yousaf-Khan A, McWilliams A, Tsao MS, Adusumilli PS, Rami-Porta R, Asamura H, Van Schil PE, Darling GE, Ramalingam SS, Gomez DR, Rosenzweig KE, Zimmermann S, Peters S, Ou SHI, Reungwetwattana T, Jänne PA, Mok TS, Wakelee HA, Pirker R, Mazières J, Brahmer JR, Zhou Y, Herbst RS,

- 
- Papadimitrakopoulou VA, Redman MW, Wynes MW, Gandara DR, Kelly RJ, et al. Scientific advances in lung cancer 2015. *J Thorac Oncol*, 2016, 11:613–38
212. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, Nicholson AG, Groome P, Mitchell A, Bolejack V. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *JTHO*, 2015, 11:39–51
213. Liao RG, Watanabe H, Meyerson M, Hammerman PS. Targeted therapy for squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Manag*, 2012, 1:293–300
214. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46:D1074–82
215. Ke EE, Wu YL. EGFR as a Pharmacological Target in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: Where Do We Stand Now? *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37:887–903
216. Wang S, Tsui ST, Liu C, Song Y, Liu D. EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol*, 2016, 9:59
217. Pérez Barrios C, Barquín del Romo M. Aplicaciones clínicas de las técnicas actuales de biología molecular. *Cont. Lab. Clin.* 2017, 37:52 – 58



## ANEXOS

## Anexo 1. Comité de ética



**D<sup>a</sup>. CRISTINA AVENDAÑO SOLÁ, PRESIDENTA DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID**

**CERTIFICA**

Que revisada la propuesta de proyecto de investigación titulado: *Utilidad de la biopsia líquida para el estudio de mutaciones tumorales en el gen EGFR en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado*, Código H.U.P.H.: P.I.: 68/16, del que es investigador principal en nuestro centro Dña. Clara Pérez Barrios del Servicio de Bioquímica Clínica, comprueba que el estudio ha sido ya revisado y aprobado por un CEIm acreditado en España y considera que no requiere revisiones adicionales por parte de este CEIm. Este proyecto de cáncer de pulmón que se lleva a cabo en el servicio de Oncología Médica, en el área de Biopsia Líquida, bajo la coordinación de Atocha Romero forma parte del PIE 14/00064 del que es el Investigador Principal el Dr. Mariano Provencio.

Asimismo se revisan los aspectos locales referentes al equipo investigador en el Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y se consideran correctos desde el punto vista ético y legal, correspondiendo a la dirección del centro valorar los aspectos económicos del contrato y la capacidad del investigador y el centro para realizar este estudio.

Lo que se hace constar a los efectos oportunos.

En Majadahonda, a 11 de abril de 2016

Hospital Universitario  
Puerta de Hierro  
Majadahonda  
SaludMadrid  
Comunidad de Madrid  
Comité Ético de Investigación  
Clínica

Fdo.: Dra. Avendaño Solá  
Presidenta del CEIm



## Anexo 2. Documentación complementaria

**Tabla anexa 1.** Hotspots incluidos en el kit OncoPrint™ Lung cfDNA Assay (Página 1)

Mutación	Cromosoma	Posición	Gen	COSMIC ID
p.Q61L	chr1	115256529	NRAS	COSM583
p.Q61K	chr1	115256530	NRAS	NA
p.A59T	chr1	115256536	NRAS	NA
p.G13V	chr1	115258744	NRAS	COSM572
p.G13D	chr1	115258744	NRAS	COSM573
p.G13V	chr1	115258744	NRAS	COSM574
p.G13A	chr1	115258744	NRAS	COSM575
p.G13N	chr1	115258745	NRAS	COSM24668
p.G13Y	chr1	115258745	NRAS	COSM568
p.G13C	chr1	115258745	NRAS	COSM570
p.G13R	chr1	115258745	NRAS	COSM569
p.G13S	chr1	115258745	NRAS	COSM571
p.G12E	chr1	115258747	NRAS	COSM144577
p.G12V	chr1	115258747	NRAS	COSM566
p.G12A	chr1	115258747	NRAS	COSM565
SYS_ERR	chr1	115258747	NRAS	SYS_ERR
p.G12D	chr1	115258747	NRAS	COSM564
p.G12P	chr1	115258748	NRAS	COSM559
p.G12Y	chr1	115258748	NRAS	COSM560
p.G12N	chr1	115258748	NRAS	COSM12723
p.G12S	chr1	115258748	NRAS	COSM563
p.G12C	chr1	115258748	NRAS	COSM562
p.G12R	chr1	115258748	NRAS	COSM561
p.R1275L	chr2	29432664	ALK	COSM28060
p.R1275Q	chr2	29432664	ALK	COSM28056
p.G1269A	chr2	29432682	ALK	COSM1169707
p.F1245L	chr2	29436858	ALK	COSM28062
p.F1245L	chr2	29436858	ALK	COSM28493
p.F1245C	chr2	29436859	ALK	COSM28500
p.F1245I	chr2	29436860	ALK	COSM28492
p.F1245V	chr2	29436860	ALK	COSM28499
p.S1206Y	chr2	29443600	ALK	COSM144251
p.S1206C	chr2	29443600	ALK	NA
p.D1203N	chr2	29443610	ALK	NA
p.G1202del	chr2	29443614	ALK	NA
p.G1202R	chr2	29443613	ALK	COSM144250
p.L1196Q	chr2	29443630	ALK	COSM1169447
p.L1196M	chr2	29443631	ALK	COSM99137
p.V1180L	chr2	29443679	ALK	COSM4381101
p.F1174L	chr2	29443695	ALK	COSM28055
p.F1174L	chr2	29443695	ALK	COSM28061
p.F1174C	chr2	29443696	ALK	COSM28059
p.F1174S	chr2	29443696	ALK	COSM53063

Tabla anexa 1. Hotspots incluidos en el kit Oncomine™ Lung cfDNA Assay (Página 2)

Mutación	Cromosoma	Posición	Gen	COSMIC ID
p.F1174I	chr2	29443697	ALK	COSM28491
p.F1174V	chr2	29443697	ALK	COSM28054
p.F1174L	chr2	29443697	ALK	COSM28057
p.I1171N	chr2	29445213	ALK	COSM1169448
p.I1171N	chr2	29445213	ALK	COSM28498
p.I1171T	chr2	29445213	ALK	COSM4381100
p.I1171S	chr2	29445213	ALK	COSM4440758
p.C1156Y	chr2	29445258	ALK	COSM99136
p.L1152P	chr2	29445270	ALK	COSM1407659
p.L1152R	chr2	29445270	ALK	COSM97185
p.T1151_L1152insT	chr2	29445271	ALK	COSM144252
p.G1128A	chr2	29445450	ALK	COSM98475
p.E542K	chr3	178936082	PIK3CA	COSM760
p.E545K	chr3	178936091	PIK3CA	COSM763
p.H1047R	chr3	178952085	PIK3CA	COSM775
p.L1951M	chr6	117641120	ROS1	COSM1072521
p.E709K	chr7	55241677	EGFR	COSM12988
p.E709H	chr7	55241679	EGFR	COSM12428
p.E709V	chr7	55241678	EGFR	COSM12371
p.E709G	chr7	55241678	EGFR	COSM13009
p.E709A	chr7	55241678	EGFR	COSM13427
p.E709_T710>A	chr7	55241680	EGFR	COSM85796
p.E709_T710>G	chr7	55241681	EGFR	COSM48981
p.E709_T710>D	chr7	55241681	EGFR	COSM51525
p.G719S	chr7	55241707	EGFR	COSM6252
p.G719C	chr7	55241707	EGFR	COSM6253
p.G719D	chr7	55241708	EGFR	COSM18425
p.G719A	chr7	55241708	EGFR	COSM6239
p.E746_A750delELREA	chr7	55242479	EGFR	COSM6223
p.K745_E746insIPVAIK	chr7	55242464	EGFR	COSM51504
p.E746_A750delELREA	chr7	55242480	EGFR	COSM6225
p.E746_T751A	chr7	55242481	EGFR	COSM12678
p.E746_S752V	chr7	55242485	EGFR	COSM12384
p.L747_E749delLRE	chr7	55242477	EGFR	COSM6218
p.L747_A750P	chr7	55242478	EGFR	COSM12382
p.L747_T751P	chr7	55242481	EGFR	COSM12383
p.L747_S752delLREATS	chr7	55242486	EGFR	COSM6255
p.L747_T751delLREAT	chr7	55242484	EGFR	COSM12369
p.L747_P753S	chr7	55242487	EGFR	COSM12370
p.A763_Y764insFQEA	chr7	55248992	EGFR	COSM26720
p.S768I	chr7	55249005	EGFR	COSM6241
SYS_ERR	chr7	55249005	EGFR	SYS_ERR
p.V769_D770insASV	chr7	55249009	EGFR	COSM12376

**Tabla anexa 1.** Hotspots incluidos en el kit OncoPrint™ Lung cfDNA Assay (Página 3)

Mutación	Cromosoma	Posición	Gen	COSMIC ID
p.D770_N771insSVD	chr7	55249013	EGFR	COSM13428
p.H773_V774insH	chr7	55249021	EGFR	COSM12377
p.H773_V774insNPH	chr7	55249021	EGFR	COSM12381
p.T790M	chr7	55249071	EGFR	COSM6240
p.C797S	chr7	55249092	EGFR	COSM2741500
p.H835L	chr7	55259446	EGFR	COSM6227
SYS_ERR	chr7	55259447	EGFR	SYS_ERR
SYS_ERR	chr7	55259485	EGFR	SYS_ERR
SYS_ERR	chr7	55259485	EGFR	SYS_ERR
SYS_ERR	chr7	55259485	EGFR	SYS_ERR
p.P848L	chr7	55259485	EGFR	COSM22943
p.L858R	chr7	55259515	EGFR	COSM6224
p.L861Q	chr7	55259524	EGFR	COSM6213
p.T1010I	chr7	116411990	MET	COSM707
p.Y1021N	chr7	116412022	MET	COSM48564
p.Y1021F	chr7	116412023	MET	COSM339515
NA	chr7	116412044	MET	COSM24687
NA	chr7	116412044	MET	COSM29633
SYS_ERR	chr7	116412045	MET	SYS_ERR
NA	chr7	116412045	MET	COSM35468
p.H1112Y	chr7	116417463	MET	COSM696
p.H1112R	chr7	116417464	MET	COSM703
p.H1112L	chr7	116417464	MET	COSM698
p.Y1248H	chr7	116423413	MET	COSM690
p.Y1248C	chr7	116423414	MET	COSM699
p.Y1253H	chr7	116423428	MET	COSM598581
p.Y1253N	chr7	116423428	MET	COSM1447477
p.Y1253D	chr7	116423428	MET	COSM700
p.M1268V	chr7	116423473	MET	COSM1568673
p.M1268T	chr7	116423474	MET	COSM691
p.M1268I	chr7	116423475	MET	COSM694
p.V600E	chr7	140453136	BRAF	COSM476
p.L597V	chr7	140453146	BRAF	COSM470
p.Y472C	chr7	140481393	BRAF	COSM1133046
p.G469V	chr7	140481402	BRAF	COSM459
p.G469A	chr7	140481402	BRAF	COSM460
p.Gly469Leu	chr7	140481403	BRAF	COSM1548505
p.G466V	chr7	140481411	BRAF	COSM451
p.Q61H	chr12	25380275	KRAS	COSM554
p.Q61R	chr12	25380276	KRAS	COSM552
p.Q61L	chr12	25380276	KRAS	COSM553
p.G13D	chr12	25398281	KRAS	COSM532
p.G13C	chr12	25398282	KRAS	COSM527

**Tabla anexa 1.** Hotspots incluidos en el kit OncoPrint™ Lung cfDNA Assay (Página 4)

Mutación	Cromosoma	Posición	Gen	COSMIC ID
p.G12V	chr12	25398284	KRAS	COSM520
p.G12D	chr12	25398284	KRAS	COSM521
p.G12A	chr12	25398284	KRAS	COSM522
p.G12F	chr12	25398285	KRAS	COSM512
p.G12C	chr12	25398285	KRAS	COSM516
p.G12S	chr12	25398285	KRAS	COSM517
p.G12R	chr12	25398285	KRAS	COSM518
p.F53I	chr15	66727441	MAP2K1	COSM3503329
p.F53L	chr15	66727441	MAP2K1	COSM555604
p.F53L	chr15	66727442	MAP2K1	COSM1562837
p.F53L	chr15	66727443	MAP2K1	COSM1725008
p.Q56P	chr15	66727451	MAP2K1	COSM1235481
p.K57Q	chr15	66727453	MAP2K1	OM3155
p.K57T	chr15	66727454	MAP2K1	COSM4756761
p.Lys57Asn	chr15	66727455	MAP2K1	COSM1235478
p.P124S	chr15	66729162	MAP2K1	COSM235614
p.P124Q	chr15	66729163	MAP2K1	COSM1167912
p.P124L	chr15	66729163	MAP2K1	COSM1315861
p.E203K	chr15	66774131	MAP2K1	COSM232755
p.E203V	chr15	66774132	MAP2K1	COSM3386991
p.R337L	chr17	7574017	TP53	COSM11411
p.R283P	chr17	7577090	TP53	COSM10743
p.R282W	chr17	7577094	TP53	COSM10704
p.R280I	chr17	7577099	TP53	COSM11287
p.C277F	chr17	7577108	TP53	COSM10749
p.R273L	chr17	7577120	TP53	COSM10779
p.R273P	chr17	7577120	TP53	COSM43896
p.R273H	chr17	7577120	TP53	COSM10660
p.R273C	chr17	7577121	TP53	COSM10659
p.R249S	chr17	7577534	TP53	COSM10785
p.R249S	chr17	7577534	TP53	COSM10817
p.R249M	chr17	7577535	TP53	COSM43871
p.R248Q	chr17	7577538	TP53	COSM10662
p.R248L	chr17	7577538	TP53	COSM6549
p.R248W	chr17	7577539	TP53	COSM10656
p.G245V	chr17	7577547	TP53	COSM11196
p.G245C	chr17	7577548	TP53	COSM11081
p.C242F	chr17	7577556	TP53	COSM10810
p.M237I	chr17	7577570	TP53	COSM10834
p.Y234C	chr17	7577580	TP53	COSM10725
p.Y220C	chr17	7578190	TP53	COSM10758
p.H214R	chr17	7578208	TP53	COSM43687
p.Y205C	chr17	7578235	TP53	COSM43947

**Tabla anexa 1.** Hotspots incluidos en el kit OncoPrint™ Lung cfDNA Assay (Página 5)

Mutación	Cromosoma	Posición	Gen	COSMIC ID
p.H179R	chr17	7578394	TP53	COSM10889
p.C176F	chr17	7578403	TP53	COSM10645
p.C176Y	chr17	7578403	TP53	COSM10687
p.R175H	chr17	7578406	TP53	COSM10648
p.V173L	chr17	7578413	TP53	COSM43559
p.Y163C	chr17	7578442	TP53	COSM10808
p.A159V	chr17	7578454	TP53	COSM11148
p.R158L	chr17	7578457	TP53	COSM10714
p.V157F	chr17	7578461	TP53	COSM10670
p.G154V	chr17	7578469	TP53	COSM6815
p.T125T	chr17	7579312	TP53	COSM45940
p.A775_G776insYVMA	chr17	37880995	ERBB2	COSM20959

**Tabla anexa 2.** Características de la cohorte de pacientes analizados para la validación clínica del estudio de biomarcadores a partir de cfDNA

Paciente	Edad diagnóstico	Sexo	Histología	Mutación	Fumador	Tto	Progresión TKI	Aparición p. T790M	Días T790M-progresión
1	55	M	Adeno	G719X	si	Afatnib	Si	Si	-5
2	63	F	Adeno	del 19	no	Afatnib	Si	No	
3	70	M	Adeno	del 19	no	Afatnib+cetuximab	no	Si	
4	73	F	Adeno	L858R	no	Erlotinib+Pemetrexed	Si	Si	-89
5	63	M	Adeno	del 19	no	Erlotinib	Si	Si	30
6	30	F	Adeno	del 19	si	Erlotinib	no	No	
7	40	M	Adeno	L858R	si	Erlotinib	Si	Si	-41
8	80	F	Adeno	G719X	no	Erlotinib	Si	No	
9	83	F	Adeno	L858R	no	Erlotinib	Si	Si	-63
10	77	M	Adeno	del 19	no	Erlotinib	no	No	
11	47	F	Adeno	del 19	si	Erlotinib	no	No	
12	66	M	Adeno	L858R	no	Erlotinib	Si	Si	-42
13	66	F	Adeno	del 19	no	Gefitinib	Si	Si	-15
14	66	F	Adeno	del 19	no	Gefitinib+Pemetrexed	Si	Si	-93
15	75	F	Adeno	del 19	no	Gefitinib	Si	Si	0
16	59	M	Adeno	del 19	si	Osimeritinib	Si	No	
17	59	F	Adeno	del 19	si	Gefitinib	Si	Si	16
18	55	M	Adeno	del 19	si	Erlotinib	Si	Si	-78
19	55	F	Adeno	del 19	si	Afatnib	Si	Si	-76
20	47	M	Adeno	del 19	no	Erlotinib	Si	Si	10
21	68	F	Adeno	L858R	si	Gefitinib	Si	No	
22	68	M	Adeno	G719X	si	Gefitinib	Si	No	
23	41	M	Adeno	del 19	si	Erlotinib	Si	Si	0
24	50	M	Adeno	del 19	no	Afatnib	Si	Si	28
25	63	M	Adeno	ins 20	si	Erlotinib	Si	No	
26	55	F	Adeno	del 19	si	Erlotinib	no	No	
27	70	M	Adeno	L858R	si	Gefitinib	Si	Si	0
28	65	F	Adeno	L858R	no	Gefitinib	no	No	
29	57	F	Adeno	del 19	no	Erlotinib	no	No	
30	55	M	Adeno	del 19	si	Erlotinib	no	No	
31	72	F	Adeno	del 19	no	Erlotinib	no	No	
32	61	M	Adeno	ins 20	si	Erlotinib	Si	Si	-46
33	51	M	Adeno	ins 20	no	Gefitinib	no	No	
34	79	F	Adeno	del 19	no	Gefitinib	no	No	
35	50	F	Adeno	L858R	no	Erlotinib	Si	Si	0
36	63	M	Esc	G719X	si	Erlotinib	no	No	
37	62	F	Esc	L858R	no	Gefitinib	no	No	
38	60	F	Adeno	del 19	si	Erlotinib	Si	No	
39	50	F	Adeno	del 19	si	Afatnib	no	No	
40	70	F	Adeno	L858R	no	Gefitinib	Si	No	
41	64	F	Adeno	del 19	no	Gefitinib	no	No	

Tabla anexa 3. Resultados líquidos-plasma

Paciente	Tipo de muestra	Mutación	MAF T790M (%)	Copias/ $\mu$ L T790M	Copias/ml T790M	MAF sensitizing (%)	Copias/ $\mu$ L sensitizing	Copias/ml sensitizing
1	líquido pleural	L858R	10,25	92,24	52120,86	20,74	140,72	79549,32
1	plasma	L858R	0,00	0,00	0,00	0,52	0,37	527,14
2	LCR	del19	0,00	0,00	0,00	6,43	0,35	493,23
2	plasma	del19	0,00	0,00	0,00	0,22	0,40	340,03
3	líquido pleural	del19	3,18	3,24	2747,37	9,66	12,73	10797,84
3	plasma	del19	0,00	0,00	0,00	0,43	0,23	239,55
4	líquido pleural	del19	0,17	0,12	172,42	0,44	0,16	231,77
4	plasma	del19	0,42	0,79	672,43	0,66	0,30	255,23
5	líquido pleural	L858R	0,00	0,00	0,00	1,08	1,03	915,79
5	plasma	L858R	0,00	0,26	726,41	0,00	0,29	805,56
6	líquido pericárdico	L858R	9,66	29,17	2892561,81	26,88	82,37	8169508,57
6	plasma	L858R	0,11	0,08	38,16	0,80	0,66	309,03
7	líquido pleural	L858R	7,71	12,95	1098099,42	15,80	29,66	2514859,65
7	plasma	L858R	0,85	0,80	1132,02	4,84	19,16	27077,97
8	líquido pleural	del19	39,67	585,91	828040,45	75,94	1441,40	2037066,28
8	plasma	del19	0,20	0,66	934,16	1,26	4,53	6400,63
9	líquido pleural	L858R	0,00	0,00	0,00	0,94	0,97	273040,94
9	plasma	L858R	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	líquido pleural	L858R	0,00	0,00	0,00	47,47	139,27	22710,47
10	plasma	L858R	0,00	0,00	0,00	0,29	0,07	29,99

Tabla anexa 4. Resultados NGS-dPCR

Paciente	Cantidad de ADN (ng)	Gen	Proteína	cDNA	Familias	MAF Oncomine (%)	MAF dPCR (%)
1	17	EGFR	p.Glu746_Ala750del	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	10	0,31	0,16
1	17	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	3	0,13	0,21
1	17	TP53	p.Arg273Cys	c.817C>T	3	0,12	
2	20	EGFR	p.Leu858Arg	c.2573T>G	1663	33,88	38,95
3	20	KRAS	p.Gly13Asp	c.38G>A	7	0,19	0,13
5	19,4	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	3	0,10	0,14
5	19,4	EGFR	p.Leu858Arg	c.2573T>G	98	2,32	2,39
6	20	EGFR	p.Leu858Arg	c.2573T>G	12	0,27	0,36
6	20	TP53	p.Tyr205Cys	c.614A>G	5	0,22	
7	20	EGFR	p.Glu746_Ala750del	c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC	137	2,20	2,25
7	20	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	43	0,99	0,50
8	20	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	9	0,40	2,40
8	20	EGFR	p.Leu858Arg	c.2573T>G	36	0,91	3,66
10	15,1	EGFR	p.Glu746_Ala750del	c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC	1387	14,50	22,09
10	15,1	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	70	1,01	1,22
10	15,1	TP53	p.Gly245Ser	c.733G>A	12	0,14	0,14
12	20,8	EGFR	p.Glu746_Ala750del	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	616	10,37	13,65
12	20,8	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	143	2,98	2,85
12	20,8	TP53	p.Arg273His	c.818G>A	7	0,13	0,05
13	20,1	EGFR	p.Gly719Cys	c.2155G>T	113	2,22	2,12
13	20,1	EGFR	p.Ser768Ile	c.2303G>T	68	2,17	1,28
13	20,1	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	35	0,92	0,48
13	20,1	TP53	p.Tyr220Cys	c.659A>G	4	0,11	
15	20,3	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	5	0,13	0,13
15	20,3	EGFR	p.Leu858Arg	c.2573T>G	5	0,10	0,09
16	20	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	11	0,67	0,65
16	20	EGFR	p.Leu858Arg	c.2573T>G	29	1,62	1,22
19	13,7	EGFR	p.Glu746_Ala750del	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	4	0,22	0,66
20	3,6	EGFR	p.Glu746_Ala750del	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	3	0,41	10,50
21	3,2	EGFR	p.Leu747_Pro753delinsSer	c.2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC	290	15,98	18,60
21	3,2	TP53	p.Arg282Trp	c.844C>T	218	13,42	13,54
22	7,3	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	4	0,29	0,11
22	7,3	EGFR	p.Leu858Arg	c.2573T>G	2	0,13	0,80
22	7,3	TP53	p.Cys277Phe	c.830G>T	4	0,22	
28	7,241	PIK3CA	p.His1047Arg	c.3140A>G	2	0,11	0,08
31	13,65	EGFR	p.Leu747_Thr751del	c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT	18	0,49	0,90
31	13,65	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	6	0,19	0,80
31	13,65	MET	p.Thr1010Ile	c.3029C>T	2915	99,83	99,95
32	6,279	EGFR	p.Leu747_Ala750delinsPro	c.2239_2248delTTAAGAGAAGinsC	1013	48,68	50,76
32	6,279	EGFR	p.Thr790Met	c.2369C>T	545	33,60	37,70
33	3,757	PIK3CA	p.Glu545Lys	c.1633G>A	3	0,54	0,90
34	19,76	ALK	p.Gly1269Ala	c.3806G>C	41	0,87	0,42
35	14,69	ALK	p.Gly1269Ala	c.3806G>C	128	2,99	2,81
36	24,31	TP53	p.Arg273Gly	c.817C>G	30	0,55	0,17
38	16,38	TP53	p.Arg273Ser	c.817C>A	59	3,08	2,96
40	14,56	PIK3CA	p.Glu545Lys	c.1633G>A	13	1,96	2,81
43	4,173	TP53	p.Val157Phe	c.469G>T	14	3,50	5,39
45	6,409	TP53	p.Val157Phe	c.469G>T	2	0,16	0,00
46	3,419	NRAS	p.Gly13Asp	c.38G>A	3	0,32	0,00
46	3,419	TP53	p.Arg282Gly	c.844C>G	15	2,75	2,99
47	10,088	TP53	p.Met237Ile	c.711G>T	2	0,11	
48	4,29	TP53	p.Arg175His	c.524G>A	3	0,64	
49	20,54	BRAF	p.Val600Glu	c.1799T>A	9	0,25	0,17
49	20,54	TP53	p.Tyr234Cys	c.701A>G	5	0,14	
50	3,679	EGFR	p.Met766_Ala767insAlaSerVal	c.2308_2309insCCAGCGTGG	107	12,54	0,00
50	3,679	TP53	p.Arg283Pro	c.848G>C	120	20,41	21,88
51	3,679	KRAS	p.Gly13Val	c.38G>T	2	0,31	0,28
51	3,679	TP53	p.Ala159Val	c.476C>T	8	1,94	0,14
54	20,37	EGFR	p.Glu746_Ala750del	c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC	228	5,31	6,39
55	3,38	EGFR	p.Leu747_Pro753delinsSer	c.2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC	16	3,02	5,70
56	6,851	MET	p.Thr1010Asn	c.3029C>A	2	0,17	0,25

---

### Anexo 3. Publicaciones

1. Provencio M\*, **Pérez-Barrios C\***, Barquin M, Calvo V, Franco F, Sánchez E, Sánchez R, Sánchez JC, Martin P, Laza-Briviesca R, Cruz-Bermúdez A, Romero A. Comparison between Next Generation Sequencing and Digital PCR for somatic mutation quantification in liquid biopsies from NSCLC patients. International Journal of Oncology. Spandidos publications. (En revision)
2. **Pérez-Barrios C**, Nieto-Alcolado I, Torrente M, Jiménez-Sánchez C, Calvo V, Gutierrez-Sanz L, Palka M, Donoso-Navarro E, Provencio M, Romero A. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5:665–72
3. Provencio M, Torrente M, Calvo V, Gutiérrez L, Pérez-Callejo D, **Pérez-Barrios C**, Barquín M, Royuela A, Rodríguez-Alfonso B, Sotelo M, Cruz-Bermúdez JL, Mendez M, Cruz-Bermúdez A, Romero A. Dynamic circulating tumor DNA quantification for the individualization of non-small-cell lung cancer patients treatment. Oncotarget, 2017, 8:60291–8
4. Provencio M, Torrente M, Calvo V, Pérez-Callejo D, Gutiérrez L, Franco F, **Pérez-Barrios C**, Barquín M, Royuela A, García-García F, Bueno C, Garcia-Grande A, Camps C, Massuti B, Sotomayor E, Romero A. Prognostic value of quantitative ctDNA levels in non small cell lung cancer patients. Oncotarget, 2018, 9:488–94
5. De Comisión D, Grupo /, Trabajo DE, González Á, **Pérez-Barrios C**, Macher H, Sánchez-Carbayo M, Barco Sánchez A, Fernández Suárez A, Peinado AM, Ortiz Muñoz B, Pujol JT, Diego J, Camacho S, María J, Fradera A, Jesús M, Blázquez G, Carbonell Muñoz R, Filella Pla X. Recomendaciones preanalíticas para la obtención y análisis de ADN circulante a partir de sangre periférica. Recomendación (2018). Rev Del Lab Clínico, 2019 (pendiente de publicación).
6. **Pérez-Barrios C**, Barquín del Romo M. ADN tumoral circulante en la monitorización de la respuesta al tratamiento del paciente oncológico. Aplicaciones clínicas de las técnicas actuales de biología molecular. Cont. Lab. Clin. 2017, 37:52 – 58.



# Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing

Clara Pérez-Barrios<sup>1\*</sup>, Irene Nieto-Alcolado<sup>2\*</sup>, María Torrente<sup>3</sup>, Carolina Jiménez-Sánchez<sup>2</sup>, Virginia Calvo<sup>3</sup>, Lourdes Gutierrez-Sanz<sup>3</sup>, Magda Palka<sup>3</sup>, Encarnación Donoso-Navarro<sup>1</sup>, Mariano Provencio<sup>3</sup>, Atocha Romero<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory Medicine Department, <sup>2</sup>Traslational Oncology Laboratory, <sup>3</sup>Medical Oncology Department, Puerta de Hierro Hospital, Madrid, Spain

*Contributions:* (I) Conception and design: C Pérez-Barrios, V Calvo, L Gutierrez-Sanz, M Palka, M Provencio, A Romero; (II) Administrative support: M Torrente, M Provencio, E Donoso-Navarro; (III) Provision of study materials or patients: E Donoso-Navarro, C Jiménez-Sánchez, V Calvo, L Gutierrez-Sanz, M Palka, M Provencio, A Romero; (IV) Collection and assembly of data: C Pérez-Barrios, I Nieto-Alcolado, C Jiménez-Sánchez, A Romero; (V) Data analysis and interpretation: C Pérez-Barrios, I Nieto-Alcolado, C Jiménez-Sánchez, A Romero; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

\*These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to:* Atocha Romero, PharmD, PhD. Medical Oncology Department, Puerta de Hierro Hospital, Madrid, Spain.

Email: atocha10@hotmail.com.

**Background:** The implementation of liquid biopsy for biomarker testing and response to treatment monitoring in cancer patients would presumably increase laboratory throughput, requiring the development of automated methods for circulating free DNA (cfDNA) isolation.

**Methods:** The present study compares the MagNA Pure Compact (MPC) Nucleic Acid Isolation Kit I and Maxwell<sup>®</sup> RSC (MR) ccfDNA Plasma Kit and the later with QIAamp Circulating Nucleic Acid (QCNA) Kit using 57 plasma samples from cancer patients. cfDNA concentration was measured using the Qubit fluorometer. DNA fragments length were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer. Circulating tumor DNA (ctDNA) was quantified by digital PCR (dPCR).

**Results:** Firstly, we observed that MPC method significantly extracted less cfDNA than MR ( $P < 0.0001$ ). However, there were no significant differences in extraction yields of QCNA and MR kits. cfDNA isolation yield was also associated with tumor stage but not with tumor location. Secondly, an oligonucleosomal DNA ladder pattern was observed in 88% of the samples and significant differences in the recovery of mono-, di- and tri-nucleosomes DNA fragments were observed between MPC and MR methodologies. Finally, tumor mutation quantification on cfDNA was performed on 38 paired samples using digital PCR. Mutant allele fractions (MAFs) between paired samples were not significantly different.

**Conclusions:** Methods for isolation of cfDNA can affect DNA yield and molecular weight fractions recovery. These observations should be taken into account for cfDNA analysis in routine clinical practice.

**Keywords:** Cancer; circulating free DNA (cfDNA); epidermal growth factor receptor (EGFR); KRAS

Submitted Sep 01, 2016. Accepted for publication Sep 03, 2016.

doi: 10.21037/tlcr.2016.12.03

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/tlcr.2016.12.03>

## Introduction

Cancer is among the leading causes of morbidity and mortality worldwide. The incidence of cancer has increased over the years and this trend is expected to rise in the near

future (1-3). Recent breakthroughs in the understanding of the biological processes underlying cancer development have led to more effective treatment strategies and targeted therapies have irrevocably changed the treatment of

cancer patients. Yet, the use of such therapies requires the biomarker testing in tumor biopsy and obtaining sufficient amount of tumor material for the analysis of somatic mutations in targetable genes is somehow challenging.

Circulating free DNA (cfDNA) released by tumor cells preserves the characteristics of the tissue of origin. As a result, its study permits the genetic characterization of the tumor by a non-invasive procedure and solves the difficulties of conventional biopsy (4-6). Moreover, unlike solid biopsies, in the liquid biopsy circulating tumor DNA (ctDNA) can be quantified over the course of treatment, which can potentially serve to measure tumor response to treatments (7,8). In such scenario, the number of samples to test is expected to increase substantially being the development of high-throughput technologies for cfDNA isolation an important challenge to address. In this way, the emergence of automated systems could improve the reproducibility and robustness of the process and facilitate the implementation of liquid biopsy in the clinical setting.

The aim of this study is to compare the performance two automated systems for cfDNA isolation namely; MagNA Pure Compact (MPC) Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) and Maxwell® RSC (MR) ccfDNA Plasma Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and the later with the QIAamp Circulating Nucleic Acid (QCNA) Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) manual extraction kit, which is one of the most widespread method for cfDNA isolation. Specifically, we compare the cfDNA extraction yield and fragment size of nucleic acids obtained. Finally, we investigate whether the identification of tumor specific mutations could be affected by cfDNA isolation methodologies, by comparing mutant allele fraction (MAF) measurements by digital PCR (dPCR) in 38 cfDNA samples from cancer patients with tumors harboring driver mutations.

## Methods

### Study population

A total of 57 samples were obtained from cancer patients that were prospectively enrolled in the study between February and June 2015 after signing the appropriate informed consent. The study was approved by the Hospital Puerta de Hierro Ethics Committee. The cohort consisted of adult men and women diagnosed with lung cancer or colon cancer, with clinical stage III–IV (Table S1).

Information regarding demographics, clinicopathological features, and tumor mutation status was obtained from the clinical and pathology reports.

### Laboratory procedures

Fifty-seven peripheral whole blood samples were collected in a 4 mL PPT™ tube (Becton Dickinson) containing a gel barrier to separate the plasma after centrifugation. All samples were processed at room temperature within 2 h from the time of blood extraction. Plasma was separated from the cellular fraction by centrifugation at 1,500 g for 10 min at 4 °C. After centrifugation, 55 plasma samples were each divided into two aliquots of 1 mL and two plasma samples were each divided into three aliquots of 1 mL (Figure S1). Aliquots were stored immediately at –80 °C until cfDNA extraction. Hemolyzed samples were discarded for further analysis.

At the time when the cfDNA extraction was performed, samples were thawed in the refrigerator at 4 °C. Once thawed, a new centrifugation was performed at 5,000 g for 20 minutes to ensure removal of impurities in the supernatant.

For cfDNA isolation methodologies comparison purposes, 31 samples were processed by both MR and QCNA, 24 samples were processed by MPC and MR and two plasma samples were aliquoted into three and processed by all three methods (Figure S1).

cfDNA was isolated with a MR instrument (Promega), using the MR ccfDNA Plasma Kit, as specified by the manufacturer and following the “1 mL cell free DNA custom” program, using QCNA Kit (QIAGEN), according to manufacturer’s instructions (except when proteinase K incubation was performed overnight) and using the MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I on a MPC instrument (Roche Diagnostics).

In all cases, cfDNA was extracted using as starting volume 1 mL of plasma and eluted in 50 µL of the supplied elution buffer.

cfDNA concentration was measured using the Qubit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA) on a Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA) according to manufacturer’s instructions.

Microfluidic electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyzer and High Sensitivity DNA Chips (Agilent technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) was performed to assess DNA fragment length for a size range between

50 and 7,000 base pairs (bp) based on manufacturer's recommended protocol.

cfDNA samples were analyzed by dPCR, using rare mutation assays for the following mutations in EGFR p.T790M (AHR5ROS), p.L858R (AHR5RSV) and p.E746\_A750delELREA (AHLJ0XO); and mutations p.G12V (AHX1IHY), p.G12D (AH6R5PI) and p.G13D (AHD2BW0) in KRAS, on QuantStudio® 3D Digital PCR System (Applied Biosystems, South San Francisco, CA, USA). For the dPCR, 8 µL of template cfDNA was mixed with 0.5 µL of the above mentioned 40× TaqMan assays and 10 µL of 2× QuantStudio 3D Master Mix, in a 20 µL reaction volume. Subsequently, 15 µL were loaded into QuantStudio 3D Digital PCR 20K chips. The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 96 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 56 °C for 2 min, and 98 °C for 30 s, a step of 72 °C for 10 min and finally samples were maintained at 22 °C for at least 30 min. Chip fluorescence was read twice. Results were analyzed with QuantStudio® 3D Analysis Suite™ Cloud Software. The automatic call assignments for each data cluster were manually adjusted when needed. The result of the assay is reported as the ratio of mutant DNA molecules relative to the sum of mutant and wild-type (wt) DNA molecules. A wt control DNA was included in every run.

### Statistical analysis

Qualitative variables were summarized by their frequency distribution and quantitative variables by their mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range. The nonparametric comparison of cfDNA concentration yield by different aliquots of the same plasma sample, using different methodologies, was evaluated using the Wilcoxon signed-rank test for paired data. The nonparametric comparison of cfDNA concentration yield by different clinical situations such as tumor origin (lung cancer *vs.* colorectal cancer) or tumor staging (stage IV *vs.* other) was performed using a Mann-Whitney U-test. The association between categorical variables was tested by McNemar's Test. Null hypothesis was rejected by a type I error minor than 0.05.

Relative quantification of circulating free nucleosome bound DNA fragments was expressed as the ratio between the concentration of a particular fragment and the total concentration of cfDNA in the corresponding sample. Comparison between circulating free nucleosome bound DNA fragments ratios obtained in paired samples using

different methodologies was assessed by Wilcoxon signed-rank test for paired data. For this analysis, the level of significance was adjusted to 0.0083 according to the Bonferroni correction for multiple comparisons. The statistical analysis was performed using STATA 9.0 SE.

## Results

### Comparison of cfDNA yield extracted according to the methodology

The population included in the study was primarily Caucasian (95%) and ranged in age from 41 to 82 years. Among the 57 plasma samples collected, 47 samples corresponded to lung cancer patients and ten samples corresponded to colorectal cancer.

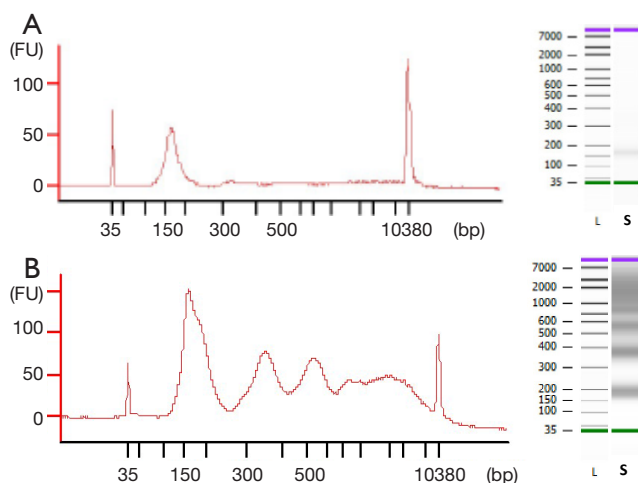
Altogether, we measured the concentration of cfDNA in a total of 116 samples obtained from 57 plasma samples. Overall, the results of quantitation revealed a wide range of cfDNA concentrations in the plasma of cancer patients, ranging between 0.2 and 24 ng/µL.

For comparison purposes, cfDNA was extracted from 33 plasma samples by MR and QCNA. This subset samples were obtained from lung cancer patients, clinical stage III–IV, except for one sample that corresponded to one patient diagnosed with colorectal cancer. According to our results, the median concentration yielded was 1.25 ng/µL for samples extracted by MR methodology and 1.08 ng/µL for samples extracted by QCNA methodology, with no significant differences in yield extraction between methodologies ( $P=0.775$ ). Interestingly, we observed that the amount of cfDNA obtained from stage IV cancer patients was significantly higher compared to non-metastatic patients. This was true for cfDNA samples isolated using MR and QCNA methodologies ( $P=0.045$  and  $P=0.0173$ ). Regarding the comparison between MR and MPC methodologies, 26 plasma samples were processed using both methodologies. These plasma samples were obtained from stage IV colorectal cancer patients and lung cancer patients with metastatic disease except for one patient that was IIIA stage. Interestingly, our data showed that MPC extracted significantly less cfDNA than MR (1.154 *vs.* 2.31;  $P<0.0001$ ). We also investigate whether tumor location (lung or colon) could influence the cfDNA isolation yield. Our data indicates that there was no significant difference in cfDNA yield according to tumor localization in samples processed by MPC or MR methodology ( $P=0.9355$  and 0.4834 respectively).

### Comparison of circulating free nucleosome-bound DNA fragment distribution according to the methodology

Analysis of 44 cfDNA samples obtained from 22 plasma samples extracted with MR and QCNA, and 34 cfDNA samples obtained from 17 plasma samples extracted by MR and MPC methodologies on the Bioanalyzer 2100 was performed in a blinded fashion.

The observed size of the cfDNA fragments was approximately 180 bp (mean 182 bp, range 151–205 bp). In 69 out of 78 cfDNA samples, we also observed a oligonucleosomal DNA ladder pattern as the presence of peaks corresponding to mono-, di- and tri-nucleosomes



**Figure 1** Electropherogram and gel-like image of cfDNA samples. (A) 180 bp peak corresponding to low fragment cfDNA and (B) peaks corresponding to mono-, di- tri-nucleosomes and long fragment cfDNA. FU, fluorescence units; L, leader; S, sample; cfDNA, circulating free DNA.

were clearly visualized in the electrophoretic assay (*Figure 1*), suggesting an apoptotic cell death. We also detected high-molecular-weight (>10,000 bp) DNA fragments in 54 out of 78 cfDNA samples which could be originate from cells dying via necrosis.

Moreover, the proportion of oligonucleosomal fragments varied depending on the extraction method (*Table 1*). Remarkably, the proportion of cfDNA fragments ranging in size from 150 to 200 bp extracted by MPC method was significantly higher than by MR method ( $P=0.0005$ ), whereas the proportion of cfDNA bound to di- and tri-nucleosomes extracted by MPC was significantly lower than by MR ( $P=0.0024$  and  $P=0.0038$ ).

### Influence of the extraction method on tumor mutation analysis

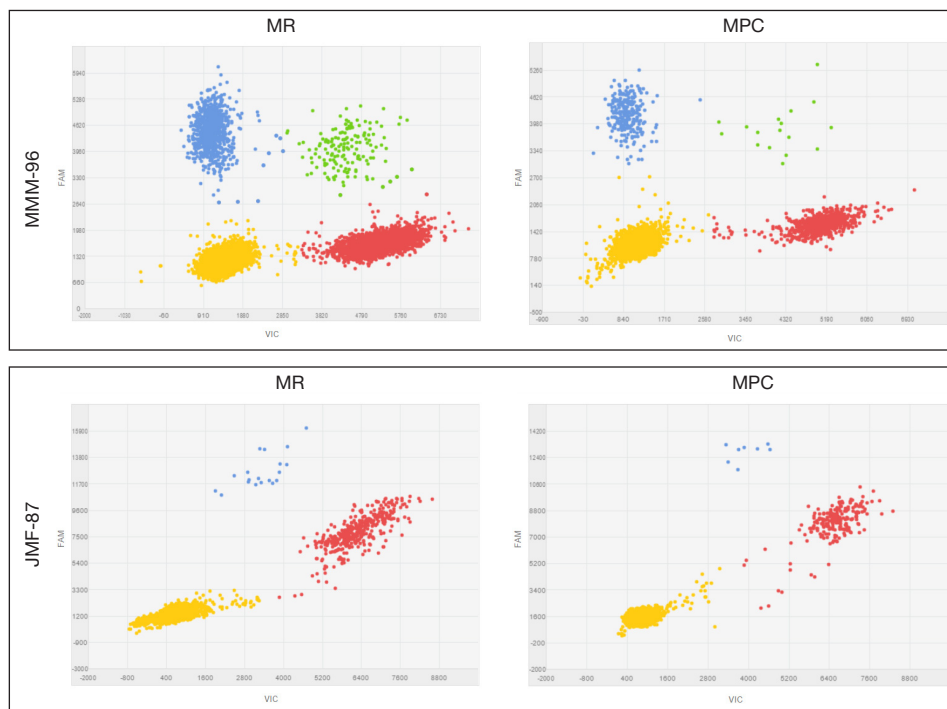
According to pathology reports, among the 57 cases included, a druggable alteration was found in the corresponding FFPE sample in 26 cases. Of these, 17 cases corresponded to EGFR mutations found in lung cancer tumors and 9 cases corresponded to KRAS mutations found in the colorectal tumors.

Among the 26 patients in which a druggable mutation was found in the corresponding FFPE sample, we were able to detect the identified alteration in 38 paired cfDNA samples isolated from 19 plasma samples, using dPCR. Representative plots for tumor mutation quantification on paired cfDNA samples are displayed in *Figure 2*. In the remaining cases in which tumor alteration was not detected on the cfDNA, blood samples were extracted during treatment and patients were diagnosed as having a partial response or complete response according to RECIST v1.1 criteria.

**Table 1** Median (p50), lower quartile (p25) and upper quartile (p75) of the ratios between the cfDNA concentration of mono-, di- and tri-nucleosomes fragments and total concentration respectively cfDNA samples extracted by MR, CNAQ and MPC

Method	MR <sup>†</sup>			CNAQ <sup>‡</sup>			MPC <sup>§</sup>		
	mono- (N=39)	di- (N=39)	tri- (N=39)	mono- (N=23)	di- (N=23)	tri- (N=23)	mono- (N=18)	di- (N=18)	tri- (N=18)
p50	0.255117	0.145478	0.096697	0.259479	0.087311	0.081432	0.41343	0.124819	0.06786
p25	0.175924	0.088054	0.04805	0.145719	0.032288	0.025774	0.323628	0.090273	0.04598
p75	0.368267	0.17691	0.140245	0.403649	0.14027	0.118834	0.563839	0.155981	0.126613
Min	0.101059	0	0	0.074739	0	0	0.197728	0	0
Max	0.785281	0.226199	0.189153	0.78305	0.189723	0.16447	0.728455	0.177333	0.14007

<sup>†</sup>, Maxwell<sup>®</sup> RSC; <sup>‡</sup>, MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation; <sup>§</sup>, QIAamp Circulating Nucleic Acid. cfDNA, circulating free DNA.



**Figure 2** Representative scatter plots for tumor mutation quantification on paired cfDNA samples extracted by MPC and MR methods. (A) Patient MMM-96, the p.E746\_A750delELREA mutation is labeled with FAM (blue data points) whereas wild-type cfDNA is labeled with VIC (red data points); (B) patient JMF-87, p.T790M mutation is labeled with FAM and wild-type cfDNA is labeled with VIC. cfDNA, circulating free DNA; MPC, MagNA Pure Compact; MR, Maxwell<sup>®</sup> RSC.

Of the aforementioned 38 cfDNA samples, 30 corresponded to paired cfDNA samples extracted from 15 plasma samples by MR and MPC in parallel. MAF, defined as the proportion of mutant DNA copies relative to the sum of mutant and wt DNA copies, and its confidence interval of all analyzed samples is presented in *Table 2*. As shown, MAF, on average, was similar between paired cfDNA extracted with MR and MPC, with no significant differences in tumor mutation quantification on cfDNA according to methodology ( $P=0.8647$ ), suggesting a low impact of extraction method on cfDNA mutation analysis.

Finally, eight cfDNA paired samples isolated from four plasma samples by MR and QCNA were analyzed for tumor mutation search and quantification (*Table 3*). As previously observed MAF was similar between paired cfDNA samples.

## Discussion

There is a growing evidence supporting that tumor mutation can be effectively detected in blood derived samples such as cfDNA (9-11). Moreover, the relative ease

of access and the minimally invasive nature of the sampling make cfDNA an attractive clinical analyte for longitudinal monitoring of cancer disease and response to treatments (7,8). Consequently, it is expected that the number of “liquid” samples that clinical laboratories will manage would be significantly higher compared to FFPE samples. In such scenario, the development of automated systems for cfDNA isolation is an important need to be resolved. Nevertheless, the extraction stage is critical in ensuring reliable results. Remarkably, cfDNA has some peculiarities that should be taken into account as they can profoundly affect the extraction yield and thus downstream applications. Namely, cfDNA concentration is usually very low and cfDNA is highly fragmented with short peak fragment of around 180 bp and its multiples which appeared to correspond to nucleosomal DNA (12,13).

Several studies have compared different extraction methods for the isolation of cfDNA from serum/plasma samples and have indeed demonstrated that the extraction method can considerably affect cfDNA yield (14-17). Similarly, we have observed that MPC and MR extraction

**Table 2** Mutant allele fraction (MAF) and its confidence interval (CI) of all analyzed paired samples extracted by MR and MPC

Sample ID	Gene	Mutation	MR <sup>†</sup>		MPC <sup>§</sup>	
			MAF (%)	CI (%)	MAF (%)	CI (%)
MAC-52	<i>EGFR</i>	del 19	0.22	0.106–0.486	0.313	0.121–0.807
MMM-96	<i>EGFR</i>	del 19	22.093	20.456–23.836	24.404	21.803–27.286
JMF-86	<i>EGFR</i>	G719X	7.201	4.649–11.151	6.777	4.497–6.129
CRE-36	<i>EGFR</i>	L858R	39.005	36.547–41.527	38.974	36.493–41.585
MMM-97	<i>EGFR</i>	T790M	1.031	0.773–1.37	1.016	0.63–1.634
JMF-87	<i>EGFR</i>	T790M	4.516	2.378–8.566	3.659	1.397–9.564
AS-13	<i>KRAS</i>	G12D	0.112	0.0579–0.213	0.727	0.198–2.663
JLB-14	<i>KRAS</i>	G12D	0.099	0.0438–0.226	0.0375	0.00649–0.212
JIA-05	<i>KRAS</i>	G12D	0.619	0.384–0.996	0.376	0.145–0.970
PGA-11	<i>KRAS</i>	G12D	0.0259	0.00444–0.259	0.0763	0.0133–0.433
GM-17	<i>KRAS</i>	G12V	0.074	0.0248–0.218	0.0989	0.0268–0.361
RTS-12	<i>KRAS</i>	G12V	0	NA <sup>†</sup>	0.459	0.142–1.494
JML-06	<i>KRAS</i>	G12V	1.311	1.302–1.361	1.119	0.812–1.537
FPJ-04	<i>KRAS</i>	G13D	0.0954	0.0487–0.186	0.128	0.0579–0.28
FTC-08	<i>KRAS</i>	G13D	0.772	0.483–1.246	0.172	0.0467–0.629

<sup>†</sup>, not available; <sup>‡</sup>, Maxwell<sup>®</sup> RSC; <sup>§</sup>, MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation.

**Table 3** Mutant allele fraction (MAF) and its confidence interval (CI) of all analyzed paired samples extracted by MR and QCNA

Sample ID	Gene	Mutation	MR <sup>†</sup>		QCNA <sup>‡</sup>	
			MAF (%)	CI (%)	MAF (%)	CI (%)
JMF-32	<i>EGFR</i>	G719X	11.115	9.399–3.218	9.398	7.736–11.402
MTO-31	<i>EGFR</i>	T790M	0.0549	0.0184–0.162	0.065	0.0153–0.289
JM-86	<i>EGFR</i>	T790M	2.116	1.352–3.307	3.69	2.448–5.553
JM-23	<i>EGFR</i>	T790M	5.331	2.838–9.979	2.178	0.955–4.96

<sup>†</sup>, Maxwell<sup>®</sup> RSC; <sup>‡</sup>, QIAamp Circulating Nucleid Acid.

methods showed significant differences in the recovery of cfDNA from plasma samples ( $P < 0.0001$ ). In comparing the QCNA kit and the MR, we found that the latter was not superior to the former in terms of cfDNA yield, but it was simpler and more rapid as it is an automated method. To our knowledge, the aforementioned methods comparison has not been reported previously in the literature. In addition, our results illustrate that the kits tested showed significantly different recovery of mono-, di- tri-nucleosomes DNA

fragments (*Table 1*). This observation should be validated in more sized cohort as it has been suggested that low molecular weight cfDNA fractions often harbor genetic aberrations indicative of tumor-derived DNA (17,18).

As previously reported (5), we have found significantly higher cfDNA levels in the plasma of patients with metastatic disease compared to non-metastatic patients. Additionally, we have observed that cfDNA concentration increases with the course of disease being particularly high

in dying patients (data not shown). Parallely, it has been described that circulating nucleosomes are in much higher concentration in cancer patients compared to healthy individuals (19-21). Interestingly, it has been reported that among various tumor types, lung cancer is associated with the highest values of circulating nucleosomes (19,20). Similarly, we have observed an oligonucleosomal DNA ladder pattern in most analyzed samples (88%).

The mechanism by which nucleosomes are released into circulation is considered to be apoptotic cell death which is induced by targeted therapies such as tyrosine kinase inhibitors (22,23). This information should be taken into account when tracking mutations on cfDNA for targeted therapies monitoring. If isolation of cfDNA by different procedures can affect the recovery of shorter and longer cfDNA fragments, it is plausible that tumor mutation quantification could be affected by the extraction method. However, we didn't find significant differences in MAF according to cfDNA extraction methodology. This could in part be due to the small number of samples analyzed and more sized cohort would be of particular interest in order to clarify this issue. Of note, in one sample (RTS-12, *Table 2*) we could not detect de druggable alteration in the cfDNA isolated by MR but it was detected in the cfDNA extracted by MPC. As mentioned, it has been suggested that low molecular-weight fraction of the cfDNA is enriched in tumor DNA (18,19). According to our results, the recovery of cfDNA fragments ranging in size from 150 to 200 bp by MPC method was significantly higher than by MR method ( $P=0.0005$ ) although the overall cfDNA extraction yield was significantly lower ( $P<0.0001$ ). This could explain at least partially the discrepancy observed.

## Conclusions

In this paper we demonstrate that there are significant differences in cfDNA extraction yields and high and low molecular-weight cfDNA fractions recovery according to the methodologies evaluated. Larger studies are needed in order to evaluate the impact of such differences on downstream applications such as biomarker testing or tumor mutation tracking for targeted therapies monitoring.

## Acknowledgements

The authors wish to thank all the patients that participated in this study.

*Funding:* This study was supported by Carlos III Institute

of Health, Spanish Ministry of Science and Innovation, and European Regional Development Fund (grant number: PI13/01806 and PIE14/00064), A Romero is supported by Joan Rodés fellowship (grant number: JR14/00017) and CP pre-doctoral studies are supported by Jose Luís Castaño Foundation.

## Footnote

*Conflicts of Interest:* The authors have no conflicts of interest to declare.

*Ethical Statement:* The study was approved by the Hospital Puerta de Hierro Ethics Committee (approval number: internal code PI/144-14). Written informed consent was obtained from the patients.

## References

1. International Agency for Research on Cancer, Cutado MP, Edwards B, et al. Cancer Incidence in Five Continents: Volume IX. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9-29.
3. American Society of Clinical Oncology. The state of cancer care in America, 2014: a report by the American Society of Clinical Oncology. *J Oncol Pract* 2014;10:119-42.
4. Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett* 2007;581:795-9.
5. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646-50.
6. Aung KL, Board RE, Ellison G, et al. Current status and future potential of somatic mutation testing from circulating free DNA in patients with solid tumours. *Hugo J* 2010;4:11-21.
7. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:472-84.
8. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013;368:1199-209.
9. He C, Liu M, Zhou C, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by mutant-enriched PCR assay for prediction of the response to

- gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2009;125:2393-9.
10. Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, et al. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:2630-6.
  11. Romero A, Acosta-Eyzaguirre D, Sanz J, et al. Identification of E545k mutation in plasma from a PIK3CA wild-type metastatic breast cancer patient by array-based digital polymerase chain reaction: Circulating-free DNA a powerful tool for biomarker testing in advance disease. *Transl Res* 2015;166:783-7.
  12. Jahr S, Hentze H, Englisch 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;61:1659-65.
  13. Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, et al. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta* 2008;387:55-8.
  14. Repiská G, Sedláčková T, Szemes T, et al. Selection of the optimal manual method of cell free fetal DNA isolation from maternal plasma. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1185-9.
  15. Fong SL, Zhang JT, Lim CK, et al. Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 2009;55:587-9.
  16. Holmberg RC, Gindlesperger A, Stokes T, et al. Akonni TruTip® and Qiagen® methods for extraction of fetal circulating DNA--evaluation by real-time and digital PCR. *PLoS One* 2013;8:e73068.
  17. Kuhlmann JD, Schwarzenbach H, Wimberger P, et al. LOH at 6q and 10q in fractionated circulating DNA of ovarian cancer patients is predictive for tumor cell spread and overall survival. *BMC Cancer* 2012;12:325.
  18. Schwarzenbach H, Eichelser C, Kropidlowski J, et al. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2012;18:5719-30.
  19. Holdenrieder S, Stieber P, Förg T, et al. Apoptosis in serum of patients with solid tumours. *Anticancer Res* 1999;19:2721-4.
  20. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, et al. Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int J Cancer* 2001;95:114-20.
  21. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, et al. Circulating nucleosomes in serum. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:93-102.
  22. Costa DB, Halmos B, Kumar A, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med* 2007;4:1669-79; discussion 1680.
  23. Faber AC, Li D, Song Y, et al. Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19503-8.

**Cite this article as:** Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, Jiménez-Sánchez C, Calvo V, Gutierrez-Sanz L, Palka M, Donoso-Navarro E, Provencio M, Romero A. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl Lung Cancer Res* 2016;5(6):665-672. doi: 10.21037/tlcr.2016.12.03

## Dynamic circulating tumor DNA quantification for the individualization of non-small-cell lung cancer patients treatment

Mariano Provencio<sup>1</sup>, María Torrente<sup>1</sup>, Virginia Calvo<sup>1</sup>, Lourdes Gutiérrez<sup>1</sup>, David Pérez-Callejo<sup>1</sup>, Clara Pérez-Barrios<sup>2</sup>, Miguel Barquín<sup>2</sup>, Ana Royuela<sup>3</sup>, Begoña Rodríguez-Alfonso<sup>4</sup>, Miguel Sotelo<sup>5</sup>, Juan Luis Cruz-Bermúdez<sup>6</sup>, Miriam Mendez<sup>1</sup>, Alberto Cruz-Bermúdez<sup>1</sup> and Atocha Romero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medical Oncology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Majadahonda, Spain

<sup>2</sup>Molecular Oncology Laboratory, Biomedical Sciences Research Institute, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Majadahonda, Spain

<sup>3</sup>Biostatistics Department, Biomedical Sciences Research Institute, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Majadahonda, Spain

<sup>4</sup>Nuclear Medicine Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Majadahonda, Spain

<sup>5</sup>Medical Oncology Department, Hospital Infanta Cristina, Parla, Spain

<sup>6</sup>Information Technologies Department, Hospital Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain

**Correspondence to:** Mariano Provencio, **email:** mariano.provencio@salud.madrid.org  
Atocha Romero, **email:** atocha10@hotmail.com

**Keywords:** cfDNA, TKI, personalized medicine, lung cancer, liquid biopsy

**Received:** June 06, 2017

**Accepted:** July 25, 2017

**Published:** August 07, 2017

Copyright: Provencio et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

**Background:** Liquid biopsy has evolved from being a promising line to becoming a validated approach for biomarker testing. However, its utility for individualization of therapy has been scarcely reported. In this study, we show how monitoring levels of EGFR mutation in plasma can be useful for the individualization of treatment.

**Results:** Longitudinal EGFR mutation levels in plasma always correlated with tumor response ascertained by RECIST criteria. Moreover, decreasing EGFR mutation levels were detected in all patients benefiting from locoregional radiotherapy, whereas the opposite occurred when a patient progressed soon after radiotherapy treatment. Similarly, increasing EGFR mutation levels anticipated disease progression after TKI dose reduction, discontinuation of treatment, or reduced bioavailability due to drug interactions. In addition, EGFR mutation levels were useful to monitor treatment outcome of new therapies and constituted a decisive factor when the clinical situation of the patient did not correlate with responses ascertained by radiologist. Finally, our results indicate that cancer associated body fluids (pleural, pericardial or cerebrospinal fluid) are certainly a suitable source for biomarker testing that can extend EGFR mutation detection to biofluids other than blood.

**Materials and Methods:** A total of 180 serial plasma samples from 18 non-small-cell lung cancer patients who carried an activating EGFR mutation were investigated by digital PCR.

**Conclusions:** Monitoring levels of EGFR mutation in plasma allows resolving doubts that frequently arise in daily clinical practice and constitutes a major step towards achieving personalized medicine.

### INTRODUCTION

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) have

substantially improved the quality of life and survival of advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients [1–5]. However, in daily clinical practice, many questions concerning the management of patients undergoing TKI

therapies remain unanswered. For example, conventional monitoring of TKI-treated patients relies on morphologic tumor changes, which are generally assessed by computed tomography (CT) scans and response evaluation criteria in solid tumors (RECIST). However, several studies have indicated that RECIST assessment may have some limitations when measuring tumor response to TKIs [6–8]. Oncologists usually continue to treat NSCLC patients harbouring sensitizing EGFR mutation with TKIs for extended periods after RECIST progression [9–11] although this may be continuing ineffective treatments. Indeed, it has been reported that the p.T790M resistance mutation can be effectively detected in plasma of advanced lung cancer patients several months prior to clinical progression [12, 13]. In the same way, dose readjustment due to toxicity is performed empirically and whether drug efficacy is compromised by dose reduction is difficult to measure in daily clinical practice.

This study assessed dynamic changes in EGFR mutation quantification using digital PCR (dPCR) methodology in longitudinally collected plasma samples from NSCLC patients with activating EGFR mutations. We evaluated the clinical information that EGFR mutation levels in plasma samples can provide in the context of daily clinical practice, not only in terms of tumor response, but also with respect to pharmacokinetics and drug interactions and individualization of treatment.

## RESULTS

### Study cohort

This study reports daily clinical practice data obtained from 18 NSCLC patients. Routine follow-up examinations were performed by a medical oncologist every 3 weeks for the first 3 months, and every 12 weeks thereafter or as required according to the oncologist's criteria. The pathological characteristics of the study population are summarized in Table 1.

An average of 10 cfDNA samples were analysed per patient. cfDNA from all blood samples was analysed for the amount of sensitizing EGFR mutation. The p.T790M mutation was concomitantly analysed in all cfDNA samples. ctDNA fluctuations measured as mutated copies/ml or as the ratio mutant allele fraction showed similar patterns. According to our data, in positive case samples the ratio of mutant DNA molecules vs total DNA molecules ranged from 0.10% to 18.5% and the number of mutated copies in positive samples ranged from 144 to 328570 copies/ml.

### EGFR mutation levels to monitor non-standard therapies

Overall, changes in EGFR mutation levels correlated with treatment responses observed in radiology

assessments. Our results consistently showed that the detection of the p.T790M resistant mutation in blood, as well as an increment in the quantification of the original sensitizing EGFR mutation in serial plasma samples correlated with the assessment of progressive disease (PD) whereas the opposite occurred in responding patients (Supplementary Figure 1). Importantly, a substantial decrease of p.T790M and the sensitizing mutation levels were noticed in a patient (03LSM) treated with cetuximab plus afatinib, who maintained in stable disease (according to radiological assessments) 493 days after the initiation of treatment, suggesting that EGFR mutation levels in plasma might be useful to monitor non-standardized treatments (Supplementary Figure 1). Of note, a total of 19 samples were obtained and analysed from patient 03LSM, which implied obtaining an average of one sample every 26 days during the 493 days of follow up of this patient. This close disease monitoring would be unthinkable if performing exclusively imaging tests.

### EGFR mutation levels tracking as a tool to monitor dose reduction and drug interactions

Dose adjustments were required in 5 patients (04BAA, 07AB, 18MACC, 13CGG and 39YYPG). In four of them (04BAA, 07AB, 07MACC and 13CGG), increased EGFR mutation levels were detected after TKI dose readjustment (Figures 1 and 2), and correlated with a subsequent diagnosis of PD. In contrast, no sensitizing mutation increase was observed in the remaining patient (39YYPG) after TKI dose reduction and the patient remained in partial response (PR) (Figure 1). In addition, in three cases (04BAA, 07AB and 07MACC) a drop in EGFR mutation levels were observed following the reintroduction of TKI at full dose.

Finally, one case (12MAPE) corresponded to a patient receiving erlotinib who was concomitantly taking omeprazole without medical indication, and increasing levels of EGFR mutation were detected during co-administration of both drugs. As shown in Figure 1, a reduction to undetectable levels in EGFR mutation levels were demonstrated immediately after omeprazole withdrawal although these levels increased again soon after.

### EGFR mutation levels for monitoring oligometastatic disease treatment

During the study, eight patients (02RGB, 07AB, 17VVM, 05JBP, 18MACC, 19MLCG, 30MMP and 32LICV) received loco-regional radiotherapy (RT). As shown in Supplementary Figure 1, changes in EGFR mutation levels were observed during RT, which correlated with responses ascertained by the radiologist. Importantly, EGFR mutation levels in plasma dropped after RT in all patients (Table 2) except for one case (18MACC) who progressed after 64 days. The short time

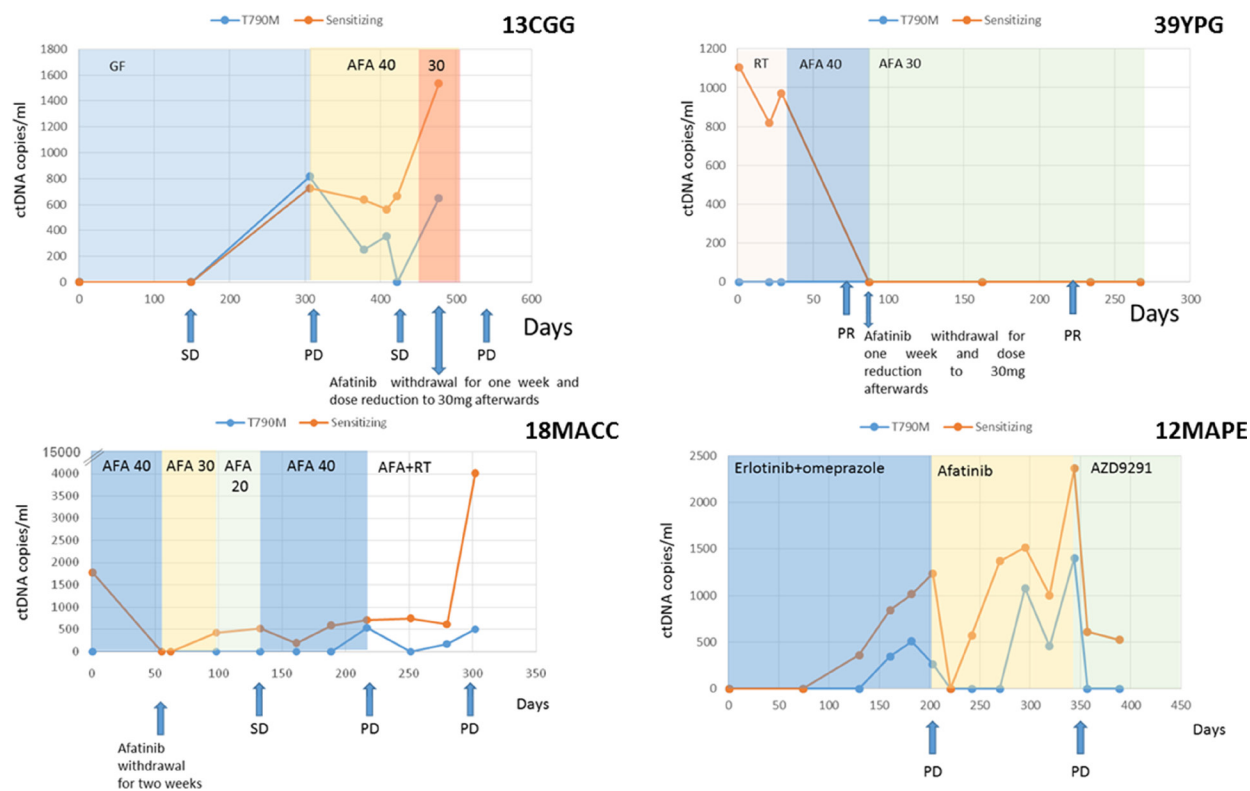
**Table 1: Clinico-pathological characteristics of the study population**

Median age at diagnosis	59 years (40–73)	N	%
Sex	Women	8	44%
	Men	10	55%
Smoking status	Former/quit	10	55%
	Never	8	44%
Histology	Adenocarcinoma	18	100%
UICC Stage	III	1	5%
	IV	17	94%
EGFR mutation	exon 19 deletion	12	67%
	exon 20 insertion	1	5%
	L858R	5	28%
Number of treatment lines monitored throughout the study	1 line	3	17%
	2 lines	10	55%
	3 lines	5	28%

to progression in the latter case suggests a systemic rather than oligometastatic disease. This could potentially be suspected from the increasing EGFR mutation levels in plasma after RT. Note that in patient 07AB, RT was given with palliative intent, due to the patient’s diagnosis of leptomeningeal carcinomatosis.

**EGFR mutation levels in patients with doubtful diagnoses**

Discrepancies with the imaging studies helped to resolve a doubtful diagnosis in patient 07AB, in which an 18FDG-PET/CT scan failed to detect tumor



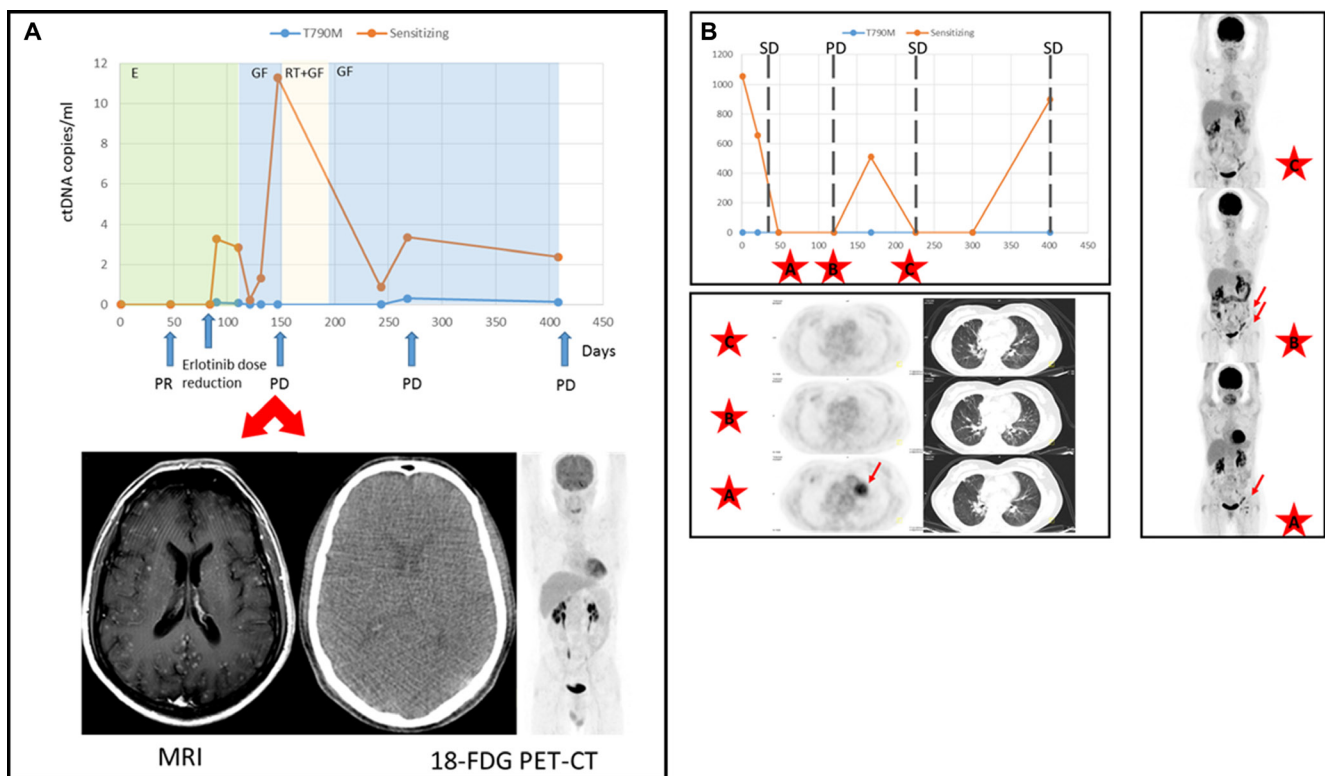
**Figure 1: ctDNA levels (copies/ml) of patients 13CGG, 29YPG, 18MACC and 12MAPE.** Therapies are denoted by different colored shading. Disease status as ascertained on a CT-scan at different time points is marked with arrows. In cases 13CGG and 18MACC an increase in ctDNA is observed after TKI dose reduction correlating with subsequent tumor progression. Increasing levels on ctDNA in case 12MAPE suggest a possible interaction between erlotinib and omeprazole. (Abbreviations: SD = stable disease, PR = partial response, PD = progressive disease, GF = gefitinib, AFA = afatinib, PMT = Pemetrexed, E = erlotinib, RT = radiotherapy).

**Table 2: ctDNA fluctuations in patients undergoing radiotherapy (RT) and time to progression after RT (days)**

Patient	Progression after RT	Time to progression (days)	ctDNA fluctuation
02RGB	no	-	↓
07AB	yes	98	↓
17VVM	no	-	↓
05JBP	yes	223	↓
18MACC	yes	64	↑
19MLCG	no	-	↓
30MMP	no	-	↓
32LICV	no	-	↓

progression in the brain after second-line treatment with full-dose gefitinib. However, a head MRI confirmed multiple brain metastases which correlated with increased plasma levels of EGFR mutation levels within the same time frame (Figure 2A). Similarly, in patient 11MCMS, 18FDG-PET/CT assessments showed a decrease in size and metabolic activity of the pulmonary nodule that coincided with EGFR mutation

quantification. Nevertheless, axillary, inguinal and retroperitoneal lymphadenopathies increased in size and number, and progressive disease was diagnosed after radiological imaging (Figure 2B). Remarkably, pathological evaluation of the inguinal adenopathy revealed an absence of malignancy. Notably, this patient was diagnosed with Sjogren's syndrome and essential mixed cryoglobulinemia.



**Figure 2: Discrepancies in the assessment of tumor response between ctDNA and TAC.** (A) ctDNA levels (copies/ml) of patient 07AB. Therapies are denoted by different colored shading. Disease status as ascertained on a CT-scan at different time points is marked with arrows. As shown, the 18-FDG PET-CT scan at day 150 failed to detect brain metastases that were however diagnosed by MRI. (Abbreviations: PR = partial response, PD = progressive disease, GF = gefitinib, RT = radiotherapy). (B) Mutation tracking profile of case 11MCMS and treatment outcome assessed according to RECIST criteria v.1.1. SD = stable disease, PD = progressive disease. 18-FDG PET-CT scans at time points are marked with a discontinuous line. Images from data points A, B and C are presented. Lung tumor and adenopathies are denoted by arrows.

**Table 3: ctDNA mutant allele fraction (%) and ctDNA copies/ml in paired samples from plasma and body fluids**

Patient	ctDNA Source	p.T790M mutant allele fraction (%)	p.T790M copies/ml	Sensitizing mutant allele fraction (%)	Sensitizing copies/ml
<b>16JLPG</b>	Plasma	ND	ND	0.345	1804.5
	CSF	ND	ND	6.431	785.25
<b>27FJAR</b>	Plasma	0.144	436.812	0.524	676.062
	PE	10.253	334355.500	20.74	510110
<b>24 MAG</b>	Plasma	ND	ND	0.427	409.625
	PE	3.18	62225.17	9.66	23080.38
<b>35MJSS</b>	Plasma	0.11	155.56	0.80	1259.87
	PCE	9.66	3360850.33	26.88	9607335.10

Abbreviations: ND = not detected, CSF = cerebrospinal fluid, PE = pleural effusion, PEC pericardial fluid).

### Body fluids to improve diagnostic yield of ctDNA

In four cases, paired samples were collected from body fluid and plasma. Specifically the cytological evaluation of the pleural and pericardial effusions reveal the presence of lung adenocarcinoma cells in all three cases. Similarly, according to pathologist report the presence of lung adenocarcinoma metastasis in cerebrospinal fluid was confirmed. As shown in Table 3, EGFR mutation levels was always higher in the body fluids compared to plasma. In one case (24MAG) (Supplementary Figure 1) p.T790M mutation was not detected in re-biopsy FFPE or in the corresponding plasma sample. However, p.T790M mutation was detected in the ctDNA isolated from malignant pleural effusion at progression and sensitizing levels dramatically went down after treatment initiation with osimertinib.

## DISCUSSION

The majority of previous liquid biopsy studies in patients with EGFR mutations have primarily reported the feasibility of detecting resistance and sensitizing EGFR mutations and how much earlier tumor progression can be predicted using liquid biopsy than CT-scans [12–16]. However, the usefulness of EGFR mutation detection in plasma may not be limited to the early detection of progression, as it could also assist clinicians in daily clinical practice in terms of dose readjustments and drug interactions, among other aspects. For example, where there are no differences in the clinical effectiveness of different TKIs, in most cases the choice relies either on the oncologist’s experience and personal decision, or the expected toxicity. In this respect, we know that although the frequency of all-cause severe adverse effects is somewhat similar among TKIs, they may have differing toxicity profiles [17, 18]. Until now, whether

dose reductions after adverse events could influence patient survival was unknown, since these events are relatively rare (less than 6%). From our data, it can be speculated that EGFR mutation level quantification can, at least partially, assist clinicians to lower treatment dose minimizing undesired outcomes. As presented, increasing EGFR mutation levels anticipated disease progression after TKI dose reduction whereas EGFR mutation levels dropped when patient maintained response despite dose reduction. Similarly, we report the clinical utility of EGFR mutation levels in plasma to detect drug-drug interactions that we know might occur even with some common, commercially available, soft drinks [19, 20]. As shown in Figure 1, increasing plasma levels of EGFR mutation were found in a patient (12MAPE) who was concomitantly taking erlotinib and omeprazole, suggesting that omeprazole may reduce effectivity of erlotinib upon co-administration.

We similarly consider that EGFR mutation levels in plasma could help to better redefine the use of determined treatment combinations, as occurred with patient 03LSM, who was treated with afatinib plus cetuximab after progression to afatinib. The rationale of this combination is based on solid preclinical data indicating that concomitant administration of the two drugs can eventually overcome p.T790M-mediated resistance [21]. However, in a phase Ib trial, dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab was modestly active among patients with acquired resistance with an objective response rate of 29% and median progression free survival of 4.7 months (95% confidence interval, 4.3–6.4) [22]. Consequently, this combination has not been extended to routine clinical practice. Patient 03LSM exemplifies how tumor monitoring through liquid biopsy can open up new perspectives for the use of new therapies, anti-EGFR re-challenge, or even N-of-1 trials [23]. On one hand, liquid biopsy reduces the time for treatment outcome monitoring (from 4 weeks when based in imaging tests

results to 5 days when based in liquid biopsy tests results, in our institution). On the other, changes in EGFR mutation levels in plasma can be observed within days (data not shown). This enables a closer real time follow up, getting ahead of the radiological response, and therefore improving decision-making regarding treatment selection, modification or continuation.

Finally, our results indicate that cancer associated body fluids are certainly a suitable source for biomarker testing that can extend EGFR mutation detection to bio-fluids other than blood (Table 3). As proved with patient 24MAG, who presented a p.T790M negative biopsy both in the solid tumor and blood, but was positive in the malignant pleural effusion. Malignant pleural effusions are frequently observed in advanced lung adenocarcinomas [24] and thoracentesis may be necessary for diagnosis and treatment. However, pleural fluid is usually discarded after the removal of cell component for cytological examination despite being helpful for EGFR mutation detection.

In conclusion, sensitizing and resistance mutation quantification in plasma throughout the course of a NSCLC cancer allows us to resolve doubts that frequently arise in daily clinical practice and reduce time for decision, which constitutes a major step towards personalized medicine.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study population and data management**

A total of 18 cases from NSCLC patients were included in the study. Written informed consent was obtained from every patient. Eligible patients were both male and female patients with a pathologically confirmed diagnosis of stage IIIB-IV NSCLC tumor with an EGFR mutation in primary tumor tissue. A complete staging workup was performed prior to recruitment into the study. Blood samples were collected as follows: at diagnosis, when patients returned for re-evaluation and when appointed by a medical oncologist due to uncertainties about a patient's clinical status, radiological assessments, toxicity events or TKI dose reduction. Demographic characteristics, clinico-pathological features, tumor mutation status, vital status, disease status, drug dose adjustments or discontinuation of medication were collected.

The study was approved by the Hospital Puerta de Hierro Ethics Committee (internal code PI/144-14) and was conducted in accordance with the precepts of the Code of Ethics of The World Medical Association (Declaration of Helsinki).

### **Laboratory procedures**

For EGFR mutation levels quantification, peripheral whole blood was collected from each subject in a 5 ml EDTA tube containing a gel barrier (PPT™, BECTON DICKINSON) to separate the plasma from blood cells after centrifugation.

All samples were processed as previously described [14, 25]. cfDNA was extracted using a starting volume of 1 ml of plasma with a Maxwell® RSC instrument (Promega), using the Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit, as specified by the manufacturer and was eluted in 50 µl of the supplied buffer. In addition, biological fluids with malignant abnormal cytology, including malignant pleural ( $N = 2$ ) and pericardial ( $N = 1$ ) effusions and cerebrospinal fluid ( $N = 1$ ) were also analysed for EGFR mutation levels. Biological fluids were centrifuged and the supernatant was used for cfDNA isolation using the same protocol. Germline DNA was obtained from blood leukocytes with a MagNA Pure LC total nucleic acid extraction kit in a MagNA Pure LC instrument (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). cfDNA samples were then analysed by dPCR using Rare Mutation Assays for p.T790M (AHRSR0S), p.L858R (AHRRSRV), p.G719A (AHABH29), p.G719C (AH0JEW), p.G719S (AHZAGP4), p.H773\_V774insH (AH5I7PA), p.D770\_N771insG (AH7031Q), p.L747\_T751 > P (AHFA92K), p.L747\_A750 > P (AHS1PY0), p.E746\_T751 > A (AHHS6E0), p.E746\_A750delELREA (AHLJ0XO), p.L747\_T751delLREAT (AHCTDP3) and p.L747\_S752delLREATS (AHGJ78R) on a QuantStudio®3D Digital PCR System (Applied Biosystems, South San Francisco, CA), as previously described [14]. A wt control DNA was included in every run.

### **Tumor response evaluation**

Computed tomography (CT) measurements and magnetic resonance imaging (MRI) were obtained as clinically indicated. The clinical response was evaluated according to RECIST criteria v1.1 combined with a blinded medical judgment of benefits from the treatment. Additionally, whole body 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose-positron emission tomography (18FDG-PET)- CT scans were performed as clinically indicated using a Siemens Biograph 6 True Point PET-CT (Siemens). A 350-450MBq 18F-FDG dose was administered 55-65 min prior to image acquisition. Reconstruction was performed using an iterative method and attenuation/scatter correction.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank Martin Hadley-Adams for assisting with the English language and preparation of the manuscript.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors have declare no conflicts of interest.

## **FUNDING**

This study was supported by Carlos III Institute of Health, Spanish Ministry of Science and Innovation, and

European Regional Development Fund (grant number: PI16/01818 and PIE14/00064), A Romero is supported by Joan Rodés fellowship (grant number: JR14/00017) and CP pre-doctoral studies are supported by Jose Luís Castaño Foundation.

## REFERENCES

1. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ Jr, Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small-cell lung cancer. *JAMA*. 2003; 290:2149–58.
2. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, Zhang S, Wang J, Zhou S, Ren S, Lu S, Zhang L, Hu C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011; 12:735–42.
3. Taron M, Ichinose Y, Rosell R, Mok T, Massuti B, Zamora L, Mate JL, Manegold C, Ono M, Queralt C, Jahan T, Sanchez JJ, Sanchez-Ronco M, et al. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:5878–85.
4. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:13306–13311.
5. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004; 350:2129–2139.
6. Shim SS, Lee KS, Kim BT, Chung MJ, Lee EJ, Han J, Choi JY, Kwon OJ, Shim YM, Kim S. Non-small cell lung cancer: prospective comparison of integrated FDG PET/CT and CT alone for preoperative staging. *Radiology*. 2005; 236:1011–9.
7. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, Maio M, Binder M, Bohnsack O, Nichol G, Humphrey R, Hodi FS. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:7412–7420.
8. Nishino M, Jagannathan JP, Krajewski KM, O'Regan K, Hatabu H, Shapiro G, Ramaiya NH. Personalized Tumor Response Assessment in the Era of Molecular Medicine: Cancer-specific and Therapy-specific Response Criteria to Complement Pitfalls of RECIST. *AJR Am J Roentgenol*. 2012; 198:737–745.
9. Riely GJ, Kris MG, Zhao B, Akhurst T, Milton DT, Moore E, Tyson L, Pao W, Rizvi NA, Schwartz LH, Miller VA. Prospective assessment of discontinuation and reinitiation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of everolimus. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:5150–5155.
10. Jackman D, Pao W, Riely GJ, Engelman JA, Kris MG, Jänne PA, Lynch T, Johnson BE, Miller VA. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28:357–360.
11. Mok TS. Living with imperfection. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 191–19.
12. Sorensen BS, Wu L, Wei W, Tsai J, Weber B, Nexø E, Meldgaard P. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib. *Cancer*. 2014; 120: 3896–901.
13. Zheng D, Ye X, Zhang MZ, Sun Y, Wang JY, Ni J, Zhang HP, Zhang L, Luo J, Zhang J, Tang L, Su B, Chen G, et al. Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Sci Rep*. 2016; 6:20913.
14. García-Sáenz JA, Ayllon P, Laig M, Acosta-Eyzaguirre D, García-Esquinas M, Montes M, Sanz J, Barquin M, Moreno F, Garcia-Barberan V, Díaz-Rubio E, Caldés T, Romero A. Tumor burden monitoring using cell-free tumor DNA could be limited by tumor heterogeneity in advanced breast cancer and should be evaluated together with radiographic imaging. *BMC Cancer*. 2017; 17:210.
15. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O'Connell A, Feeney N, Mach SL, Jänne PA, Oxnard GR. Prospective of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. *JAMA Oncol*. 2016; 2:1014–22.
16. Yanagita M, Redig AJ, Paweletz CP, Dahlberg SE, O'Connell A, Feeney N, Taibi M, Boucher D, Oxnard GR, Johnson BE, Costa DB, Jackman DM, Jänne PA. A prospective evaluation of circulating tumor cells and cell-free DNA in EGFR mutant non-small cell lung cancer patients treated with erlotinib on a phase II trial. *Clin Cancer Res*. 2016; 22:6010–6020.
17. Park K, Tan EH, O'Byrne K, Zhang L, Boyer M, Mok T, Hirsh V, Yang JC, Lee KH, Lu S, Shi Y, Kim SW, Laskin J, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17:577–89.
18. Hirsh V, Blais N, Burkes R, Verma S, Croitoru K. Management of diarrhea induced by epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Curr Oncol*. 2014; 21:329–36.

19. van Leeuwen RW, Peric R, Husaarts KG, Kienhuis E, IJzerman NS, de Bruijn P, van der Leest C, Codrington H, Kloover JS, van der Holt B, Aerts JG, van Gelder T, Mathijssen RH. Influence of the acidic beverage cola on the absorption of erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2016; 34:1309–1314.
20. Duong S, Leung M. Should the concomitant use of erlotinib and acid-reducing agents be avoided? The drug interaction between erlotinib and acid-reducing agents. *J Oncol Pharm Pract*. 2011; 17:448–52.
21. Regales L, Gong Y, Shen R, de Stanchina E, Vivanco I, Goel A, Koutcher JA, Spassova M, Ouerfelli O, Mellinghoff IK, Zakowski MF, Politi KA, Pao W. Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer. *J Clin Invest*. 2009; 119:3000–10.
22. Janjigian YY, Smit EF, Groen HJ, Horn L, Gettinger S, Camidge DR, Riely GJ, Wang B, Fu Y, Chand VK, Miller VA, Pao W. inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov* 2014; 4:1036–45.
23. Schork NJ. Personalized medicine: time for one-person trials. *Nature*. 2015; 520:609–611.
24. Heffner JE, Klein JS. Recent advances in the diagnosis and management of malignant pleural effusions. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83:235–50.
25. Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, Jiménez-Sánchez C, Calvo V, Gutierrez-Sanz L, Palka M, Donoso-Navarro E, Provencio M, Romero A. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl Lung Cancer Res*. 2016; 5:665–672.

## Prognostic value of quantitative ctDNA levels in non small cell lung cancer patients

Mariano Provencio<sup>1</sup>, María Torrente<sup>1</sup>, Virginia Calvo<sup>1</sup>, David Pérez-Callejo<sup>1</sup>, Lourdes Gutiérrez<sup>1</sup>, Fernando Franco<sup>1</sup>, Clara Pérez-Barrios<sup>2</sup>, Miguel Barquín<sup>2</sup>, Ana Royuela<sup>3</sup>, Francisco García-García<sup>4</sup>, Coralía Bueno<sup>5</sup>, Aranzazu Garcia-Grande<sup>6</sup>, Carlos Camps<sup>7</sup>, Bartomeu Massuti<sup>8</sup>, Eduardo Sotomayor<sup>9</sup> and Atocha Romero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medical Oncology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Majadahonda, Spain

<sup>2</sup>Liquid Biopsy Laboratory, Biomedical Sciences Research Institute Puerta de Hierro-Majadahonda University Hospital, Majadahonda, Spain

<sup>3</sup>Biostatistics Department, Biomedical Sciences Research Institute Puerta de Hierro-Majadahonda University Hospital, Majadahonda, Spain

<sup>4</sup>Computational Genomics, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain

<sup>5</sup>Medical Oncology Department, Hospital Infanta Cristina, Parla, Spain

<sup>6</sup>Cytometry Unit, Biomedical Sciences Research Institute Puerta de Hierro-Majadahonda, Spain

<sup>7</sup>Medical Oncology Department, Hospital General de Valencia, CIBERONC Network, Valencia, Spain

<sup>8</sup>Medical Oncology Department, Hospital Universitario de Alicante, Alicante, Spain

<sup>9</sup>George Washington Cancer Center, Washington D.C., United States of America

**Correspondence to:** Mariano Provencio, **email:** mariano.provencio@salud.madrid.org  
Atocha Romero, **email:** atocha10@hotmail.com

**Keywords:** ctDNA, non-small cell lung cancer, tyrosine kinase inhibitor, EGFR

**Received:** June 15, 2017

**Accepted:** September 30, 2017

**Published:** November 16, 2017

**Copyright:** Provencio et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

**Background:** Circulating tumor DNA (ctDNA) levels correlate well with tumor bulk. In this paper we aim to estimate the prognostic value of the dynamic quantification of ctDNA levels.

**Materials and Methods:** A total of 251 serial plasma samples from 41 non-small-cell lung cancer patients who carried an activating EGFR mutation were analysed by digital PCR. For survival analysis, ctDNA levels were computed as a time-dependent covariate.

**Results:** Dynamic ctDNA measurements had prognostic significance (hazard ratio for overall survival and progression free survival according to p.T790M mutant allele frequency; 2.676 and 2.71 respectively;  $P < 0.05$ ). In the same way, patients with p.T790M-negative or unchanging or decreasing plasma levels of sensitizing EGFR mutation were 12 and 4.8 times more likely to maintain response or stable disease, respectively, than patients in which the opposite occurred ( $P < 0.05$ ). On average, the p.T790M mutation was detected in plasma 51 days before the assessment of progression disease by CT-scan. Finally, ctDNA outperformed CTCs for assessing tumor progression ( $P = 0.021$ ).

**Conclusions:** The appearance or increase in a unit of the p.T790M allele frequency almost triples the risk of death and progression. This information can be used to design clinical trials aiming to estimate whether T790M positive patients should start second line treatment based on molecular data rather than imaging data.

### INTRODUCTION

Molecular profiling of solid tumours via blood samples is an expanding field that has attracted important attention among medical oncologists. This approach

enables clinicians to repeatedly interrogate the dynamic evolution of tumors due to the non-invasive nature of the procedure. Importantly, circulating tumor DNA (ctDNA) has proven to be an adequate source for biomarker testing and tumour bulk monitoring, suggesting its utility for

treatment outcome monitoring. [1–5]. Specifically, in *EGFR* positive lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors (TKI) ctDNA has shown reliable correlations with tumor load and changes in response to treatment [3, 6–9], indicating a potential utility of this approach in the clinical management of NSCLC.

Importantly, it has been demonstrated that p.T790M can be effectively detected in plasma samples several months before disease progression is ascertained by radiologist [6]. It is not yet clear when should second line TKI treatments be started. At present, disease progression in T790M positive patients can be defined based on molecular data, imaging data and the clinical situation of the patient. Whether different patient's management may impact on survival has not been explore yet.

In this prospective study, we assess the dynamic changes in *EGFR* mutation in plasma using an array-based digital PCR (dPCR) methodology. Plasma samples from NSCLC patients harboring activating *EGFR* mutations and treated with *EGFR* TKIs were longitudinally collected in order to evaluate the prognostic value of the dynamic quantification of ctDNA levels and its potential utility in daily clinical practice.

## RESULTS

### Study cohort

This study reports daily clinical practice data obtained from 41 lung cancer patients that were prospectively enrolled between February and December 2015, from whom 251 serial plasma samples were obtained and analyzed during a median follow-up of 10 months. Routine follow-up examinations were performed by a medical oncologist every 3 weeks for the first 3 months, and every 12 weeks thereafter or as required according to the oncologist's criteria. The pathological characteristics of the study population are summarized in Supplementary Table 1.

An average of 6.1 cfDNA samples were analysed per patient. cfDNA from all blood samples was analysed for the amount of the original sensitizing *EGFR* mutation as well as the p.T790M mutation. Overall fluctuations in ctDNA plasma levels correlated with tumor response ascertained by radiologist (Supplementary Figure 1).

### Sensitizing and p.T790m *EGFR* mutations tracking to monitor treatment outcome

dPCR was performed in all collected plasma samples ( $N = 251$ ). ctDNA was detected in 36 (88%) patients. Among patients in whom ctDNA was not detected, three cases corresponded to patients in complete response (CR). As expected, the *EGFR* sensitizing mutation identified originally in the tumor sample was also detected in all the baseline plasma samples (treatment naïve patients).

The p.T790M resistance mutation was never detected at baseline.

During the study follow up, 15 deaths were recorded and progressive disease (PD) was observed in 26 patients (63%), of whom 22 were undergoing first-line treatment while four of them second-line. In all cases, a plasma sample was obtained upon PD. A re-biopsy of the tumour lesion was only performed in seven cases (28% of the patients that had progressed). Of these, the p.T790M mutation was detected in three tumor samples. In these three cases, p.T790M was also detected in the matched plasma sample.

The median progression free survival (PFS) to first-line TKI treatment was 14.2 months (95% CI 8.0–23.9). Median PFS in patients with tumors carrying an exon 19 deletion was 23.9 months. These patients showed significantly increased PFS (HR = 0.29; 95% CI = 0.13–0.69;  $P = 0.005$ ). In contrast, patients with tumors carrying an insertion in exon 20 exhibited worse outcomes (median PFS = 2.4 months) (Supplementary Table 2). No significant differences were observed with respect to treatment.

Our results consistently showed that the detection of the p.T790M resistance mutation as well as an increment in the quantification of the original sensitizing *EGFR* mutation in serial plasma samples was associated with the assessment of PD ( $P < 0.001$ ). The appearance of the p.T790M mutation always occurred together with an increase in the amount of sensitizing *EGFR* mutation. Specifically, an increase of the original sensitizing *EGFR* mutation was displayed in 24 (92%) out of 26 patients in which PD was observed during the study follow up. In addition, in 18 of these cases (69%) the p.T790M mutation was concomitantly detected (Table 1). According to our data, patients with p.T790M-negative plasma over the course of treatment were twelve times more likely to maintain response or stable disease than those patients in which p.T790M mutation was detected in at least one plasma sample. Similarly, when sensitizing *EGFR* plasma levels did not increase, patients were almost five (4.8) times less likely to have a PD than patients in which sensitizing *EGFR* plasma levels increased.

On average, the p.T790M mutation was detected in plasma 51 days before the assessment of PD by CT-scan. Specifically, in 50% of these patients the p.T790M mutation was identified in blood within the same two weeks in which PD was detected. In 44% of these patients, p.T790M was detected in blood between 41 and 93 days before PD was evident according to RECIST criteria (Figure 1) and in one case, p.T790M was identified in blood after PD was assessed (Figure 1). An increase of the sensitizing mutation occurred before the detection of p.T790M in blood samples in 39% of the patients, as shown in Figure 1.

We similarly detected a substantial decrease of p.T790M and the sensitizing mutation as a surrogate biomarker for tumor response in all patients treated with osimertinib ( $N = 6$ )

Finally, we evaluated the prognostic value of ctDNA quantification using a Cox proportional hazards model. As presented in Table 2, increasing levels in sensitizing and p.T790M mutation were associated with inferior PFS during first-line TKI treatment ( $P < 0.05$ ), indicating that ctDNA quantification is informative in terms of prognosis. As shown, one percentage point increase in p.T790M mutant allele frequency (MAF) approximately triples (2.7 times) the risk of PD or death.

### Comparison of circulating tumor DNA and circulating tumor cells (CTCs) as prognostic biomarkers

In order to evaluate the accuracy of each methodology (ctDNA and CTCs) to discriminate between progressed and non-progressed patients, according to RECIST v1.1 criteria, sensitivity, specificity, positive likelihood ratio and negative likelihood ratio were calculated. For CTCs analyses, CTCs counts were available across 70 serial time points for 29 patients. The same subset of patients was used to evaluate ctDNA. CTCs cut-offs of  $< 5$  vs  $\geq 5$  were established. With respect to ctDNA quantification, molecular progression was defined as an elevation in sensitizing *EGFR* mutation quantification or appearance of the T790M mutation in two or more consecutive samples with the last sample being obtained at the time of progression. As shown in Table 3, ctDNA showed improved sensitivity, specificity, positive likelihood ratio and negative likelihood ratio than CTCs for assessing tumor progression ( $P = 0.021$ ).

### Quantitative performance of EGFR assays

ctDNA fluctuations measured as mutated copies/ml or as the ratio mutant allele fraction showed similar patterns. According to our data, in positive samples the ratio of mutant DNA molecules vs total DNA molecules ranged from 0.10% to 38.25% and the number of mutated copies in positive samples ranged from 144 to 727562.5 copies/ml.

For sensitivity assays, cell lines carrying exon p.E746\_A750delELREA (c.2236\_2250del15), p.G719S (c.2155G > A), p.T790M (c.2369C > T) and p.L858R (c.2573T > G) mutations were mixed at different allele concentrations with *wild type* (wt) DNA extracted from peripheral blood cells obtained from healthy donors. MAF correlated with their expected frequencies in all assays (Pearson's correlation coefficient, 0.9782, 0.9991, 0.9954 and 0.9966 respectively; Supplementary Table 3). Limit of detection (LOD) for p.E746\_A750delELREA (c.2236\_2250del15), p.G719S (c.2155G > A), p.T790M (c.2369C > T) and p.L858R (c.2573T > G) assays were 0.15%, 0.04%, 0.08% and 0.07%, respectively. LODs were estimated for samples with an average of 300 copies/ml of wt DNA. Additionally, 10 wt cfDNA from healthy

donors were used to evaluate the false positive signals. The Limit of quantitation (LOQ) was 0.01% for p.E746\_A750delELREA assay, 0.00% for p.G719S assay, 0.01% for p.T790M and 0.00% for p.L858R assay. LOBs were estimated for samples with an average of 3000 copies/ $\mu$ l.

## DISCUSSION

Several previous studies have reported the feasibility of detecting resistance and sensitizing *EGFR* mutations in plasma samples and the early prediction of tumor progression compared to CT-scans using liquid biopsy [1, 3, 6–9]. However, there is a lack of studies reporting the clinical utility of liquid biopsies in the real world and while the usefulness of liquid biopsy has been evaluated in several clinical studies the real-world setting remains scarcely explored. In the real world, liquid biopsies may be collected differently than in clinical trials. Patients included in clinical studies may be significantly different from the general patient population. Moreover, it is well known that monitoring procedures in clinical studies can differ substantially from the routine clinical practice. Our study was aimed at clinical validation, integrating dPCR technology in current oncology. For this purpose, the extraction of samples was performed as indicated by the medical oncologist during the routine follow up of the patients. Our data present a high number of extractions per patient (up to 19 samples/patient), with an average of 6 samples/patient making a total of 251 samples being prospectively collected.

As previously reported [6–9], this study shows that the detection of the T790M resistance mutation in blood, together with an increase of the original sensitizing *EGFR* mutation in serial plasma samples, was associated with the diagnosis of PD ( $P < 0.005$ ). Remarkably, in 39% of patients an increase of the sensitizing mutation occurred prior to the detection of T790M in blood samples.

The appearance in the p.T790M mutation occurred at a mean of 51 days before progression was radiologically assessed, and it was accompanied by an increase of the sensitizing mutation. At present, the duration of TKI therapy still relies on the oncologist's expertise and frequently patients continue therapy beyond progression. Molecular progression might occur even before radiological disease progression [1, 6, 10]; raising the recurrent question of what is the optimal duration for TKI first line treatment.

Cox proportional hazard models showed that increasing levels of sensitizing and p.T790M mutation were associated with shorter PFS ( $P < 0.005$  in all cases), indicating that ctDNA quantification is informative in terms of prognosis. In addition, one percentage point increase in p.T790M MAF approximately triples (2.7 times) the risk of disease progression to first line treatment or death. It is important to point out that unlike other series [11] HR were estimated considering ctDNA levels as a time dependent co-variate in our study.

**Table 1: Number of patients showing an increase of the sensitizing mutation or the appearance of p.T790M mutation according to tumor response (Progressive disease vs others)**

Patient outcome	N	Positive plasma T790M (N)	P	Increase in EGFR sensitizing mutation	P
Progressive disease	26	18	< 0.001	24	< 0.001
Other	15	1		5	

As shown, T790M was detected in the tumor of one patient who had progressed after first-line treatment. However, this patient responded to a second-line TKI and did not progress during the study follow-up period.

However, other researchers [12] failed to demonstrate any significant differences in PFS with respect to baseline ctDNA measurements. A single determination at a specific time might not yield sufficient information, and therefore the dynamic quantification of ctDNA should be emphasized. As a matter of fact, ctDNA should be regarded as a time dependent variable.

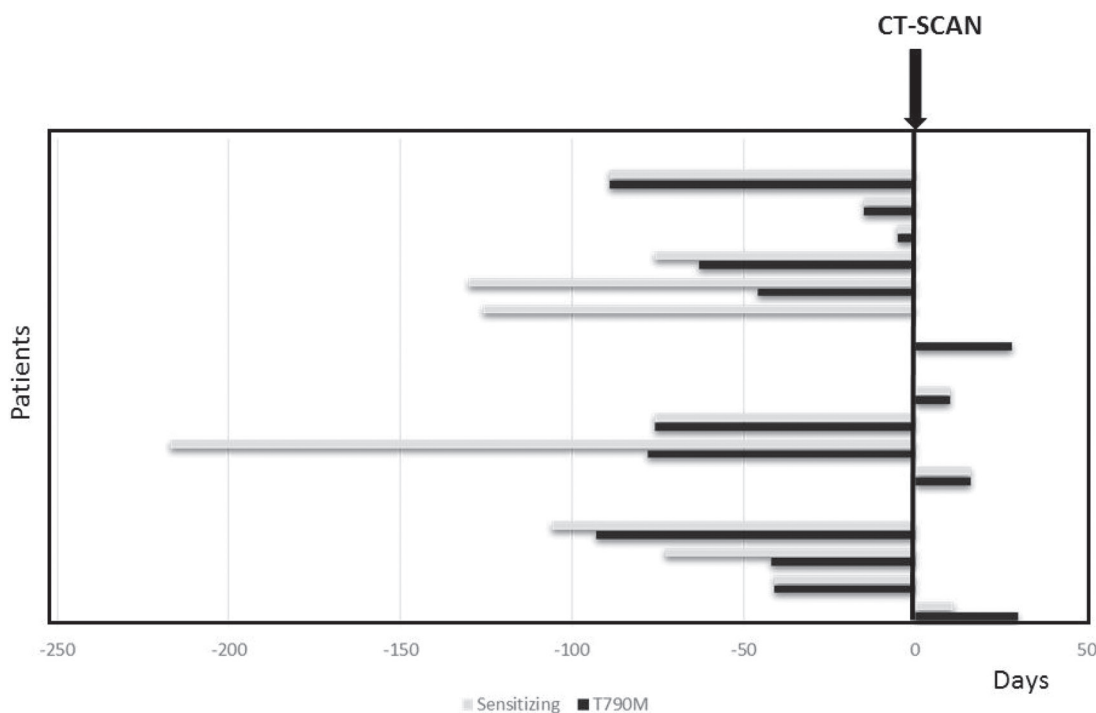
When sensitizing *EGFR* plasma levels did not increase, patients were approximately five (4.8) times less likely to have PD than those patients in which sensitizing *EGFR* plasma levels increased. Remarkably, patients with p.T790M-negative plasma over time were twelve times more likely to maintain response or SD than those patients in which a p.T790M mutation was detected in at least one plasma sample. Decision-making in asymptomatic clinical or radiological progressions that present little threat to a patient's life is still a challenge. Until now, evidence of the clinical management of these patients derives from

clinical studies that did not include or analyse prognostic molecular parameters [13, 14], unlike the results presented in this work that could be used to plan clinical trials to validate the real clinical benefit of selection of treatment based on liquid biopsy molecular data.

## MATERIALS AND METHODS

### Study population and data management

A total of 251 serial plasma samples were collected from 41 NSCLC patients who were prospectively enrolled between February and December 2015. The median follow-up was 19 months. Written informed consent was obtained from every patient. Eligible patients were male and female patients with a pathologically confirmed diagnosis of stage IIIB-IV NSCLC tumor with an *EGFR* mutation in primary tumor tissue. A complete staging



**Figure 1: Number of days since the earliest identification of the T790M mutation (black bars) and earliest identification of an increment of sensitizing mutation (grey bars) in the blood and assessment of disease progression by CT-scan. The figure shows how many days earlier or later ctDNA could be detected before or after tumour progression was ascertained by imaging.**

**Table 2: Multivariate Cox proportional hazards analyses and 95% confidence interval of the four explanatory variables**

Variable	OS			PFS		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
T790M allele fraction	2.676	1.384–5.176	0.003	2.705	1.18–3.92	0.001
Sensitizing allele fraction	1.047	0.931-1.104	0.088	1.083	1.01-1.11	< 0.001

**Table 3: Sensitivity, specificity, positive likelihood ratio and negative likelihood ratio of ctDNA and CTCs for assessing tumor progression (N = 70)**

	ctDNA		CTCs	
		95 CI		95 CI
Sensitivity	94.4	73–100	44.4	21–69
Specificity	72.7	39–94	63.6	31–89
Positive	3.5	1.31–9.15	1.2	0.48–3.12
Negative	0.1	0.01–0.53	0.9	0.48–1.6

workup was performed prior to recruitment. Blood samples were collected as follows: at diagnosis, during follow up evaluations and when appointed by the medical oncologist if further determination of clinical status, radiological assessments, toxicity events or even TKI dose reduction may be needed. Demographic characteristics, clinicopathological features, tumor mutational status, vital status, disease status, drug dose adjustments or discontinuation of medication were collected in the study electronic database.

The protocol was approved by the Hospital Puerta de Hierro Ethics Committee (internal code PI/144–14) and was conducted in accordance with the precepts of the Code of Ethics of The World Medical Association (Declaration of Helsinki).

### Laboratory procedures

For ctDNA analysis, peripheral whole blood was collected from each subject in a 5 ml EDTA tube containing a gel barrier (PPT™, BECTON DICKINSON) to separate the plasma from blood cells after centrifugation. All samples were processed as previously described [5, 15]. cfDNA was extracted using a starting volume of 1 ml of plasma with a Maxwell® RSC instrument (Promega), using the Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit, as specified by the manufacturer and was eluted in 50 µl of the supplied buffer. Germline DNA was obtained from blood leukocytes with a MagNA Pure LC total nucleic acid extraction kit in a MagNA Pure LC instrument (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). cfDNA samples were then analysed by dPCR using Rare Mutation Assays for p.T790M (AHRROS), p.L858R (AHRRSV), p.G719A (AHABH29), p.G719C (AH0JEW), p.G719S (AHZAGP4), p.H773\_V774insH

(AH5I7PA), p.D770\_N771insG (AH7031Q), p.L747\_T751 > P (AHFA92K), p.L747\_A750 > P (AHS1PY0), p.E746\_T751 > A (AHHS6E0), p.E746\_A750delELREA (AHLJ0XO), p.L747\_T751delLREAT (AHCTDP3) and p.L747\_S752delLREATS (AHGJ78R) on a QuantStudio® 3D Digital PCR System (Applied Biosystems, South San Francisco, CA), as previously described [5]. Samples were considered positive when the mutant allele fraction (MAF) was greater than the limit of detection assessed for individual assays (Supplementary Table 3). A wt control DNA was included in every run.

For CTC analysis, blood was collected in CellSave Preservative Tubes (Veridex). Pre-enrichment of CTCs was performed by density gradient centrifugation. A double gradient was formed by layering 5 ml of HISTOPAQUE-1077 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) over an equal volume of HISTOPAQUE-1119 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). Blood samples were carefully layered onto the upper HISTOPAQUE-1077 medium. The tubes were then centrifuged at 700g for 30 min. The granulocyte cell fraction was found at the 1077/1119 interphase, whereas the mononuclear cell fraction was found at the plasma/1077 interphase. Both cell fractions were mixed and washed with 10 ml of PBS and centrifuged at 300g for 10 minutes.

Circulating tumor cells (CTCs) enrichment was performed using selective positive immunomagnetic cell separation, with EpCAM microbeads (Miltenyi-Biotec, Germany). The magnetically labeled cell suspension was then purified and enriched in a magnetic field using an AutoMACS (Miltenyi Biotec) magnetic separator. After capture and immunomagnetic enrichment, fluorescent reagents were added for intracellular and extracellular phenotypic identification of CTCs by flow cytometry. Cells were fluorescently labeled with anti-human CD45-

APC (Clone: 5B1), anti-human CD326-Epcam PE (Clone: HEA-125), a nuclear dye and anti-Cytokeratin-FITC (CK3–6H5) (Miltenyi Biotec) antibodies. Samples were analyzed by flow cytometry on a MACSQuant Analyzer (Miltenyi-Biotec) equipped with three solid-state air-cooled lasers which allow simultaneous detection of 10 parameters. The Flow cytometry dot-plots were generated by logarithmic amplification of fluorescence emitted by single viable cells. The three channels of fluorescence were acquired sequentially with the following excitation and emission parameters: (488 nm, 500–540 nm) for cytokeratin signal, (546 nm, 557–572 nm) for EpCAM, and (633 nm, 645–750 nm) for CD45. Data analyses were performed using sensitive MACSQuantify™ Software (Miltenyi Biotec).

### Tumor response evaluation

Computed tomography (CT) measurements and magnetic resonance imaging (MRI) were obtained as clinically indicated. The clinical response was evaluated according to RECIST criteria v1.1 combined with a blinded medical judgment of benefits from the treatment. Additionally, whole body 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose-positron emission tomography (18FDG-PET) CT scans were performed as clinically indicated using a Siemens Biograph 6 True Point PET-CT (Siemens). A 350–450MBq 18F-FDG dose was administered 55–65 min before image acquisition. Reconstruction was performed using an iterative method and attenuation/scatter correction.

### Statistical analysis

The association between categorical variables was tested by Fisher's exact test. PFS was defined as the time between the date the patient was enrolled in the study and the date when tumor progression was diagnosed or death from any cause.

Survival analysis was performed by fitting a different Cox regression model for each of the variables: p.T790M allele fraction, sensitizing allele fraction, number of p.T790M copies/ml and number of sensitizing mutation copies/ml. In order to facilitate interpretation of HR, p.T790M copies/ml and number of sensitizing mutation copies/ml were transformed to log2. Predictors were modelled as continuous time-dependent covariates using tools for creating time-dependent covariates in R (<https://cran.r-project.org/web/packages/survival/vignettes/timedep.pdf>) [16]. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Stata 14.1 and R 3.1.2 software.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Martin Hadley-Adams for assisting with the English language and preparation of the manuscript.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors have declare no conflicts of interest.

### FUNDING

This study was supported by Carlos III Institute of Health, Spanish Ministry of Science and Innovation, and European Regional Development Fund (grant number: PI16/01818 and PIE14/00064), A Romero is supported by Joan Rodés fellowship (grant number: JR14/00017) and CP pre-doctoral studies are supported by Jose Luis Castaño Foundation.

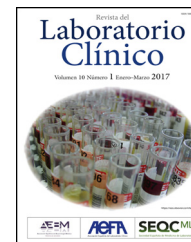
### REFERENCES

1. Zheng D, Ye X, Zhang MZ, Sun Y, Wang JY, Ni J, Zhang HP, Zhang L, Luo J, Zhang J, Tang L, Su B, Chen G, et al. Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Sci Rep.* 2016; 6:20913. <https://doi.org/10.1038/srep20913>.
2. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013; 368:1199–209. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213261>.
3. Imamura F, Uchida J, Kukita Y, Kumagai T, Nishino K, Inoue T, Kimura M, Oba S, Kato K. Monitoring of treatment responses and clonal evolution of tumor cells by circulating tumor DNA of heterogeneous mutant EGFR genes in lung cancer. *Lung Cancer.* 2016; 94:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.01.023>.
4. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba JL, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med.* 2009; 361:958–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904554>.
5. García-Saenz JA, Ayllón P, Laig M, Acosta-Eyzaguirre D, García-Esquinas M, Montes M, Sanz J, Barquín M, Moreno F, Garcia-Barberan V, Díaz-Rubio E, Caldes T, Romero A. Tumor burden monitoring using cell-free tumor DNA could be limited by tumor heterogeneity in advanced breast cancer and should be evaluated together with radiographic imaging. *BMC Cancer.* 2017; 17:210. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3185-9>.
6. Sorensen BS, Wu L, Wei W, Tsai J, Weber B, Nexø E, Meldgaard P. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib. *Cancer.* 2014; 120:3896–901. <https://doi.org/10.1002/cncr.28964>.
7. Mok T, Wu YL, Lee JS, Yu CJ, Sriuranpong V, Sandoval-Tan J, Ladrera G, Thongprasert S, Srimuninnimit V,

- Liao M, Zhu Y, Zhou C, Fuerte F, et al. Detection and dynamic changes of EGFR mutations from circulating tumor DNA as a predictor of survival outcomes in NSCLC Patients treated with first-line intercalated erlotinib and chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2015; 21:3196–203. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2594>.
8. Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, Lee HY, Sun JM, Lee SH, Ahn JS, Cho EK, Kim DW, Kim HR, et al. Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02). *Oncotarget.* 2016; 7:6984–93. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6874>.
  9. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O’Connell A, Feeney N, Mach SL, Jänne PA, Oxnard GR. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2016; 2:1014–22. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0173>.
  10. Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M, Yokota S, Aoe K, Iwanaga K, Otsuka K, Morita S, Kimura S, Negoro S. Monitoring EGFR T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *Cancer Sci.* 2016; 107:162–7. <https://doi.org/10.1111/cas.12847>.
  11. Yang X, Zhuo M, Ye X, Bai H, Wang Z, Sun Y, Zhao J, An T, Duan J, Wu M, Wang J. Quantification of mutant alleles in circulating tumor DNA can predict survival in lung cancer. *Oncotarget.* 2016; 7:20810–24. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8021>.
  12. Yanagita M, Redig AJ, Paweletz CP, Dahlberg SE, O’Connell A, Feeney N, Taibi M, Boucher D, Oxnard GR, Johnson BE, Costa DB, Jackman DM, Jänne PA. A Prospective Evaluation of Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Erlotinib on a Phase II Trial. *Clin Cancer Res.* 2016; 22:6010–20. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0909>.
  13. Park K, Yu CJ, Kim SW, Lin MC, Sriuranpong V, Tsai CM, Lee JS, Kang JH, Chan KC, Perez-Moreno P, Button P, Ahn MJ, Mok T. First-Line Erlotinib Therapy Until and Beyond Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Progression in Asian Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: The ASPIRATION Study. *JAMA Oncol.* 2016; 2:305–12. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.4921>.
  14. Soria JC, Wu YL, Nakagawa K, Kim SW, Yang JJ, Ahn MJ, Wang J, Yang JC, Lu Y, Atagi S, Ponce S, Lee DH, Liu Y, et al. Gefitinib plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer after progression on first-line gefitinib (IMPRESS): a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2015; 16:990–8. <https://doi.org/10.1016/S1470-204500121-7>.
  15. Perez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, Jimenez-Sanchez C, Calvo V, Gutierrez-Sanz L, Palka M, Donoso-Navarro E, Provencio M, Romero A. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl lung cancer Res.* 2016; 5:665–72. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.12.03>.
  16. Thomas L, Reyes E. Tutorial: Survival Estimation for Cox Regression Models with Time-Varying Coefficients Using SAS and R. *J Stat Softw.* 2014; 61:1–23. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18637/jss.v061.c01>.

# Revista del Laboratorio Clínico

[www.elsevier.es/LabClin](http://www.elsevier.es/LabClin)



DOCUMENTO DE COMISIÓN/GRUPO DE TRABAJO

## Recomendaciones preanalíticas para la obtención y análisis de ADN circulante a partir de sangre periférica. Recomendación (2018)<sup>☆</sup>

Álvaro González<sup>a,\*</sup>, Clara Pérez Barrios<sup>a</sup>, Hada Macher<sup>b</sup>,  
Marta Sánchez-Carbayo<sup>a</sup>, Antonio Barco Sánchez<sup>a</sup>, Antonio Fernández Suárez<sup>a</sup>,  
Antonio Martínez Peinado<sup>a</sup>, Blanca Ortiz Muñoz<sup>a</sup>, Jaume Trapé Pujol<sup>a</sup>,  
José Diego Santotoribio Camacho<sup>a</sup>, Josep Maria Augé Fradera<sup>a</sup>,  
María Jesús Gaspar Blázquez<sup>a</sup>, Rosa Carbonell Muñoz<sup>a</sup>, Xavier Filella Pla<sup>a</sup>  
y Comité Científico de la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC<sup>ML</sup>)

<sup>a</sup> Comisión de Marcadores Biológicos del Cáncer

<sup>b</sup> Comisión de Genética

Recibido el 8 de octubre de 2018; aceptado el 4 de noviembre de 2018

### PALABRAS CLAVE

ADN circulante;  
Sangre;  
Plasma;  
Condiciones  
preanalíticas;  
Extracción;  
Recomendaciones

**Resumen** El análisis de ADN circulante a partir de sangre periférica ha demostrado ser de utilidad en campos clínicos tan diferentes como la oncología, los trasplantes y el cribado prenatal. Para su incorporación al laboratorio clínico es necesario asegurar protocolos preanalíticos adecuados, reproducibles y estandarizados. En este documento se pretenden dar unas recomendaciones preanalíticas para la obtención de ADN circulante a partir de sangre periférica. Incluyen el tipo de espécimen, el tipo de tubo de extracción, el modo de centrifugación de la muestra, la extracción del ADN circulante y cuantificación, así como su conservación.

© 2018 AEEM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

<sup>☆</sup> Este documento tiene la conformidad de las tres Sociedades como Recomendación profesional en el ámbito del Laboratorio Clínico.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [agonzaleh@unav.es](mailto:agonzaleh@unav.es) (Á. González).

<https://doi.org/10.1016/j.labcli.2018.11.002>

1888-4008/© 2018 AEEM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: González Á, et al. Recomendaciones preanalíticas para la obtención y análisis de ADN circulante a partir de sangre periférica. Recomendación (2018). Rev Lab Clin. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2018.11.002>

## KEYWORDS

Cell-free DNA;  
Blood;  
Plasma;  
Pre-analytical  
conditions;  
Extraction;  
Recommendations

## Preanalytical recommendations for circulating DNA extraction and analysis from peripheral blood. Recommendation (2018)

**Abstract** Cell-free DNA analysis in peripheral blood has been shown to be useful in oncology, organ transplantation, and prenatal screening. For its introduction into the clinical laboratory, it is necessary to ensure appropriate, reproducible and standardised pre-analytical protocols are in place. The aim of this document is to provide pre-analytical recommendations for obtaining of cell free DNA from peripheral blood. These recommendations include the type of sample and extraction tube, the method of centrifugation, the method for cell free DNA extraction, and measurement and storage conditions.

© 2018 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

Se considera ADN circulante (ADNc) al que ha sido liberado en los fluidos biológicos y, por tanto, se encuentra fuera de las células. La presencia de ADN extracelular en sangre ya fue descrita por Mandel y Metais en 1948<sup>1</sup>. Las células pueden liberar el ADNc a la circulación por diversos mecanismos, destacando entre ellos la apoptosis<sup>2</sup>. Por ello, este ADNc está formado por fragmentos de pequeño tamaño, de aproximadamente 145-200 pares de bases (pb), que corresponde al tamaño de ADNc incluido en los nucleosomas liberados en la apoptosis<sup>3</sup>. En ocasiones se encuentran también fragmentos de ADNc que provienen de la necrosis celular, los cuales en general tienen tamaños mucho mayores, incluso superiores a 10.000 pb.

El ADNc no está libre en los fluidos, sino que se encuentra asociado a lípidos, proteínas e incluso a microvesículas. Es importante conocer esto, ya que estas uniones podrían interferir en la extracción y análisis posterior del ADNc<sup>4</sup>. En la literatura científica en inglés el ADNc se denomina frecuentemente *cell-free DNA*, o ADN libre celular, refiriéndose a que no está incluido dentro de las células. Sin embargo, esta denominación puede ser equívoca teniendo en cuenta lo anteriormente indicado.

El ADNc se encuentra habitualmente en concentraciones muy bajas, habitualmente entre 1 y 100 µg/l, que varían ampliamente de unos individuos a otros. Los niveles del ADNc dependen de diversos factores, como la velocidad de liberación al medio, la degradación y el aclaramiento. El ADNc en sangre tiene una vida media corta, entre 4 y 30 min, y se elimina fundamentalmente en el riñón, bazo y en el hígado<sup>5,6</sup>. La concentración de ADNc puede aumentar especialmente en algunas situaciones patológicas, como procesos inflamatorios o cáncer, en donde se produce una mayor apoptosis o necrosis celular.

Desde el descubrimiento del ADNc, numerosos trabajos han puesto de manifiesto la utilidad de su medición en campos tan diferentes como la oncología, los trasplantes y el cribado prenatal (revisado en<sup>2</sup>). Así, se ha demostrado que la detección y cuantificación del ADNc tumoral en pacientes con cáncer de pulmón es útil en la elección de terapias dirigidas y la monitorización del tratamiento<sup>2</sup>. También la

detección del ADNc procedente del donante en el plasma de pacientes trasplantados de riñón, hígado o corazón permite una detección temprana del rechazo<sup>2</sup>. Finalmente, en el campo de la obstetricia, el análisis del ADN fetal en sangre materna permite detectar la trisomía 21, 18 y 13 con mayor eficiencia que las pruebas bioquímicas clásicas<sup>7</sup>.

La existencia de protocolos estandarizados es fundamental para la incorporación de las tecnologías basadas en el análisis del ADNc en el laboratorio clínico, así como para la obtención de resultados comparables entre diferentes laboratorios. En este contexto, la estandarización de la fase preanalítica, si bien es muy importante en el análisis de las magnitudes bioquímicas en general, aquí cobra una importancia crucial<sup>8</sup>. Es importante definir el espécimen más adecuado y las condiciones para su obtención, así como la metodología de extracción del ADNc y su almacenamiento previo al análisis.

Además de la baja concentración del ADNc, la fracción de interés analítico puede tener una abundancia relativa muy baja respecto a ADNc total. Así por ejemplo, la fracción de ADNc fetal en sangre materna es de aproximadamente el 10% en el primer trimestre<sup>9</sup>; sin embargo, la fracción de ADNc tumoral puede ser mucho menor, incluso inferior al 0,1%<sup>2</sup>. Todo ello hace que los requerimientos de sensibilidad y especificidad analítica sean muy exigentes<sup>10</sup>. Frecuentemente incluso se realiza la analogía entre el análisis de estas fracciones de ADNc y la búsqueda de una aguja en un pajar. En algunas ocasiones, sin embargo, la fracción de interés analítico es mayoritaria respecto al ADNc y puede llegar, incluso, al 90% del total.

## Objeto y campo de aplicación

En este documento se pretenden dar una serie de recomendaciones preanalíticas para la obtención de ADNc a partir de sangre periférica. Incluyen el tipo de espécimen, el tipo de tubo de extracción, el modo de centrifugación de la muestra, la extracción del ADNc y cuantificación, así como su conservación. Si bien estas recomendaciones se podrían aplicar asimismo a otros fluidos biológicos, los aspectos más concretos de estos quedan fuera del ámbito de la presente guía.

## Tipos de espécimen para el análisis de ADN circulante

En relación con el espécimen de sangre, la extracción del ADNc puede realizarse a partir de suero o de plasma<sup>11</sup>. En ambos casos es necesaria una adecuada separación de la fracción celular para evitar al máximo la contaminación con ADN celular. Normalmente es preferible el plasma al suero, ya que el proceso de coagulación causa una liberación de ADN genómico por parte de los leucocitos<sup>4</sup>. Así pues, el suero tiene una mayor concentración de ADNc respecto del plasma, debido sobre todo al ADN genómico liberado en la coagulación<sup>12</sup>. Ello resulta en que, a igualdad de copias mutantes, la fracción alélica será menor en suero que en plasma. Por ejemplo, la presencia de tres copias mutadas frente a 300 copias del alelo silvestre resulta en una frecuencia alélica del 1%. Si la muestra está enriquecida en ADN genómico, esas mismas tres copias pueden estar acompañadas de, por ejemplo, 3.000 copias *del alelo silvestre*, por lo que la frecuencia alélica sería de solamente el 0,1%. De ello también se deduce que una mayor riqueza de ADNc no implica necesariamente una mayor capacidad de identificar copias mutadas<sup>2</sup>. Esto es especialmente importante cuando se trabaja con muestras que tienen concentraciones de ADNc de interés bajas, como suele suceder en el ámbito de la oncología. Así pues, el uso de plasma proporciona mejores resultados que el suero para el estudio de alteraciones moleculares o secuencias que están en muy baja proporción<sup>13</sup>.

Otra desventaja del suero respecto al plasma se refiere al hecho de que en el proceso de coagulación se pueden retirar porciones del ADNc asociado a las partículas (como virtosomas, HDL, argonauta 2 o exosomas) que se pueden unir a la fibrina y o el fibrinógeno<sup>14</sup>.

Además de la sangre, que es el espécimen más usado, el ADNc se puede analizar a partir de otros líquidos biológicos. Estos pueden ser más interesantes, por ejemplo, cuando las barreras semipermeables causen un incremento local del ADNc, impidiendo que se difunda a circulación general. Así, por ejemplo, el líquido cefalorraquídeo puede ser el espécimen de elección para el análisis del ADN liberado por un tumor cerebral. También el ADNc fetal estará más concentrado en el líquido amniótico que en la circulación materna, aunque en este caso la concentración en sangre es suficiente para realizar la mayoría de los estudios genéticos fetales. Ya que el ADNc se puede filtrar en el riñón, también la orina puede ser un espécimen adecuado para analizarlo, pero este se encuentra en fragmentos más pequeños debido a la acción de las ADNasas<sup>15</sup>.

## Elección del tubo de extracción del espécimen

Como ya se ha mencionado anteriormente, el plasma es la muestra más adecuada para analizar el ADNc, y la elección del tipo de tubo en el que se va a extraer la sangre es también una cuestión preanalítica relevante. Existen dos tipos de tubos en el mercado que pueden utilizarse para el estudio del ADNc:

*Tubos sin conservante:* requieren una rápida centrifugación y separación del plasma durante las primeras 2-4 h tras la extracción de la sangre para evitar la lisis celular con la

consiguiente dilución del ADNc<sup>11,13,16</sup>. Esto limita su aplicación únicamente a las muestras que se extraen en lugares muy próximos al laboratorio en donde se va a realizar el análisis y, además, requiere de un mayor control por parte del personal para llevar a cabo su procesamiento rápidamente. Dentro de los tubos de plasma, aquellos que contienen etilendiaminotetraacetato potásico (K<sub>2</sub>EDTA) como anticoagulante resultan de elección para la realización de estos estudios<sup>17</sup>, habiendo demostrado ampliamente su utilidad. Existen algunos modelos que incorporan un gel separador que facilita la obtención del plasma. Se desaconseja el empleo de heparina ya que inhibe la polimerasa, lo que restringe bastante el uso posterior del ADNc. Pese a que algunos autores han observado una mayor estabilidad del ADNc en tubos con citrato sódico al 3,2%<sup>18</sup>, el uso de este anticoagulante está mucho menos extendido. En el caso de usar este tipo de tubos hay que tener en cuenta el efecto de dilución debido al propio anticoagulante.

*Tubos con conservante:* reducen el efecto de la lisis celular<sup>19,20</sup> y conservan el ADNc en la sangre durante varias h, e incluso días, a temperatura ambiente sin necesidad de centrifugación<sup>21</sup>. Por ello resultan idóneos para el envío de especímenes sin procesar a centros externos. En este grupo destacan los tubos Cell-free DNA BCT (Streck) y PAXgene Blood DNA Tube (Qiagen), ambos disponibles con marcado CE. Existen otros modelos que se usan habitualmente para el aislamiento de células tumorales circulantes, como los tubos Cell-free DNA Collection Tube (Roche Diagnostics) o los CellSave Preservative Tube (Janssen Diagnostics), pero que también estabilizan y conservan el ADNc<sup>22,23</sup> (tabla 1). Una alternativa más económica a estos tubos es la adición de formaldehído a los tubos con EDTA<sup>26</sup>.

Pese a la gran cantidad de tubos disponibles en el mercado, existen todavía pocos estudios que determinen de forma robusta la capacidad de conservación del ADNc de cada uno de ellos. Por este motivo, cada laboratorio debe implantar sus propios protocolos de extracción según sus necesidades, tratando de estandarizar al máximo el proceso. Sin embargo, la muestra que más rendimiento está obteniendo en la detección de porcentajes de ADN mutado entre 1-0,01% (dependiendo del método de amplificación) es la sangre obtenida en tubos con K<sub>2</sub> EDTA<sup>13</sup>.

## Obtención del plasma

La concentración de ADNc en la muestra aumenta a medida que transcurre el tiempo entre la venopunción y su procesamiento. Si no se usan tubos con estabilizantes de la integridad celular, se recomienda procesar cuanto antes las muestras de sangre con anticoagulante, siendo preferible realizarlo en las 2-4 h tras su obtención<sup>24</sup>. Otro factor a evitar es la hemólisis ya que se puede liberar ADN genómico que puede interferir en la extracción y disminuir la proporción de ADNc. Es necesario tener en cuenta el transporte de la muestra para que no suponga un riesgo de lisis celular. En relación a ello, no se han encontrado diferencias en la concentración de ADNc cuando se emplea tubo neumático en el transporte<sup>25</sup>. También es conveniente evitar temperaturas elevadas.

Se han evaluado distintas velocidades de centrifugación, obteniéndose más contaminación de ADN genómico a

**Tabla 1** Características de los tubos comerciales con conservante para el estudio de ADNc

Fabricante	Tubo	Anticoagulante	Material	Almacenamiento	Estabilidad (fabricante)
Streck	Cell-free DNA BCT	K <sub>3</sub> EDTA	Vidrio/plástico	6-37° C	14 días
Quiagen	PAXgene Blood cfDNA Tube	K <sub>2</sub> EDTA	Plástico	2-30 °C	7 días
Roche	Cell-free DNA Collection Tube	K <sub>3</sub> EDTA	Plástico	18-25 °C	7 días
CellSearch	CellSave preservative tube	Na <sub>2</sub> EDTA	Vidrio	15-30 °C	4 días

velocidades inferiores a 800 g, ya que el sobrenadante obtenido puede no estar completamente libre de células. Un problema similar puede suceder si se centrifuga a una velocidad excesivamente alta, por la posible rotura de células y la liberación de ADN genómico. Se ha comprobado que una primera centrifugación del plasma a 1.200 o 1.600 g es suficiente para obtener plasma libre de células evitando el daño celular<sup>14</sup>.

Se concluye como protocolo óptimo realizar un primer paso de centrifugación durante 10 min a 1.600 g, luego proceder a la separación del plasma y, posteriormente, centrifugar este a 16.000 g durante 5 min. En relación a la utilización de plasmas congelados, no influye en el rendimiento si la segunda centrifugación del plasma se hace antes o después de congelarse<sup>13</sup>.

## Extracción del ADN circulante

Los métodos de extracción de ADNc han de estar adaptados a las características especiales relacionadas con su baja concentración en los fluidos biológicos y al hecho de que se encuentre como pequeños fragmentos. Por tanto, la elección de un método adecuado de extracción de ADNc es esencial para conseguir cuatro aspectos importantes:

- Una buena recuperación de ADNc.
- Capacidad de obtener fragmentos cortos de ADNc.
- Que sea reproducible.
- Que se pueda utilizar en análisis posteriores.

El ADNc se puede extraer empleando métodos convencionales manuales, como el de fenol-cloroformo o de precipitación con alcohol, que han demostrado ser eficientes y con capacidad de extraer fragmentos pequeños de ADN<sup>26</sup>. Sin embargo, estos procedimientos son complejos, requieren un personal especializado, son difíciles de estandarizar y no son adecuados para un número elevado de muestras<sup>26</sup>. Debido a esto, es más recomendable usar kits específicos, ya que son más sencillos de usar y se pueden emplear con un número de muestras elevado (tabla 2). Con el fin de garantizar la integridad y recuperación del ADNc, y la reproducibilidad de la extracción, el subproyecto de SPIDIA (*Standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in vitro diagnostics*) SPIDIA-DNAplasma EQA recomienda el uso de procedimientos de extracción específicamente desarrollados para ADNc<sup>27</sup>.

Existen numerosos kits de extracción de ADNc que se basan fundamentalmente en la unión del ADN a membranas de sílice en presencia de agentes caotrópicos o a bolitas magnéticas recubiertas de sílice, presentando estas últimas la ventaja de evitar los pasos de centrifugación<sup>26</sup> (tabla 2).

Además, algunos protocolos de extracción de los kits incluyen, o recomiendan, una etapa previa de incubación con proteinasa K, lo que permite incrementar la recuperación de ADNc<sup>11,26</sup>. Hay que considerar que incluso empleando kits comerciales específicos para ADNc, la eficiencia de la extracción de ADNc a partir de una misma muestra puede diferir en varios órdenes de magnitud<sup>28</sup>. Numerosos autores han comparado métodos de extracción de ADNc (revisado en<sup>26</sup>). En un estudio del SPIDIA-DNAplasma EQA, 56 laboratorios europeos recibieron muestras de plasma y extrajeron el ADNc, que posteriormente enviaron para analizar a un centro y se comprobó que la concentración de ADNc variaba entre 2,87 y 224,02 µg/l plasma<sup>27</sup>. Además, el aislamiento de ADNc se puede realizar empleando kits de extracción manuales o automáticos. Un estudio reciente de comparación entre laboratorios observó que, si bien los kits automáticos eran más precisos, los manuales eran más eficientes, extrayendo una mayor cantidad de ADNc por mL<sup>29</sup>.

Aparte de la diferencia en la cantidad de ADNc extraído, los kits presentan una recuperación variable de los fragmentos cortos y largos de ADNc<sup>30</sup>. Así por ejemplo, se ha observado analizando mutaciones de *KRAS* en pacientes con cáncer de colon que los métodos basados en membrana de sílice favorecen la extracción de fragmentos largos de ADNc, mientras que los sistemas basados en bolas magnéticas son más eficientes recuperando fragmentos cortos de ADNc<sup>31</sup>. Esta diferente capacidad de extracción podría causar un enriquecimiento de unas copias respecto a otras, causando variaciones en la fracción alélica.

Finalmente, hay que tener en cuenta que los kits de extracción concentran el ADNc en pequeños volúmenes a partir de largos volúmenes iniciales, por lo que en el proceso puede haber un arrastre de posibles compuestos interferentes en los análisis posteriores, como puede ser la PCR cuantitativa<sup>28</sup>. Por ello es necesario asegurarse que el kit empleado en la extracción de ADNc es óptimo para los procesos de análisis posteriores.

## Análisis del ADN circulante

Es recomendable realizar un análisis de la calidad del ADNc tras la extracción y como paso previo a su procesamiento analítico. En primer lugar, es necesario determinar la concentración del ADNc y, en segundo lugar, comprobar que este corresponde al ADN fragmentado y que está libre de ADN genómico.

## Concentración del ADN circulante

Para la medida de la concentración del ADN circulante se pueden emplear métodos espectrofotométricos,

**Tabla 2** Ejemplos de kits comerciales para aislamiento de ADNc

Método	Fabricante	Kit	Volumen de plasma requerido (mL)
Columna	Qiagen	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	1-5
	Analytik Jena	Polymer Mediated Enrichment (PME) free-circulating DNA Kit-IPC16	1-5
	Epigentek	FitAmp Circulating DNA Kit	0,3
	Macherey-Nagel	Nucleospin Plasma XS Kit	0,25
	Norgen Biotek	Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA kit	0,2-0,5
Partículas magnéticas	Roche Molecular Systems	cobas® DNA Sample Preparation kit	2
	Zymo Research	Quick-cfDNA Serum & Plasma Kit	0,2-10
	Promega	The Maxwell RSC cADNc Plasma Kit	0,2-1
	Qiagen	QIAamp MinElute ccfDNA	4-10
	Perkin Elmer	Chemagic cfNA 5 k Kit	2-5
	Thermo Fisher	MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit	0,5-10

fluorimétricos o de PCR cuantitativa<sup>32</sup>. De estos, el más habitual y recomendable es el método fluorimétrico, que utiliza compuestos fluorescentes que se intercalan entre las hebras de ADN emitiendo fluorescencia de forma proporcional a la concentración de esta molécula<sup>5</sup>. Los ensayos «*double-stranded DNA*» son idóneos para la medida del ADNc, ya que, dependiendo del ensayo, pueden detectar específicamente el ADN intacto de doble cadena y con una sensibilidad inferior a 0,1 ng/ $\mu$ L<sup>33-35</sup>. El principal inconveniente de esta técnica es que realiza una cuantificación relativa en función de una recta de calibrado con patrones de concentración conocida, lo que requiere de un mantenimiento periódico por parte del personal. Existen equipos comerciales que se basan en estos métodos fluorimétricos, como el Qubit® fluorometer (Thermo Fisher Scientific), que es ampliamente utilizado, y Quantus® fluorometer (Promega corporation).

Los otros dos sistemas que se han empleado para cuantificar ADNc son los métodos espectrofotométricos y los basados en PCR cuantitativa. Los sistemas de medida por espectrofotometría UV miden la absorbancia de la muestra a 260 nm. El equipo más utilizado es el NanoDrop® (Thermo Scientific). Aunque es un método barato y que requiere solamente unos pocos segundos de análisis, su sensibilidad es limitada, lo que supone el principal problema para la cuantificación del ADNc. Además, estos sistemas suelen producir una sobreestimación de los resultados al detectar también otras moléculas como el ADN degradado, de cadena simple o nucleótidos libres<sup>34</sup>. Sin embargo, el equipo NanoDrop® proporciona información de la presencia de contaminantes, como RNA o proteínas<sup>32</sup>. La relación de la densidad óptica a 260 nm y 280 nm da información de la pureza del ADN, considerándose una ratio superior a 1,8 como un indicador de pureza. La absorbancia a 230 nm puede ser útil para determinar contaminaciones por solutos durante el proceso de extracción. De hecho, Nakayama et al. sugieren un análisis inicial con NanoDrop™ para averiguar la posible presencia de contaminantes, seguida de una cuantificación más específica mediante Qubit®<sup>34</sup>. Por último, la PCR cuantitativa de un gen diana resulta útil para la medida del ADNc

amplificable<sup>36</sup>, pero el elevado consumo de tiempo y recursos que supone esta metodología limita considerablemente su utilidad en la rutina clínica. Se han empleado diversos genes dianas, como el del *precursor del beta amiloide*<sup>32</sup> o el de la *gliceroldehido-3-fosfato deshidrogenasa*<sup>34</sup>.

### Distribución de tamaños moleculares del ADNc

Es importante asegurarse de que con el método de extracción del ADNc utilizado se obtienen fragmentos pequeños y que se encuentra libre de ADN genómico. Esta comprobación se puede realizar usando técnicas de electroforesis, que permiten ver la distribución de tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos. Mediante este método se puede distinguir entre el ADN genómico, que aparece como una banda de elevado peso molecular, y el ADNc, que aparece como bandas del tamaño aproximado de múltiplos de nucleosomas, esto es, en el rango de 100-300 pb. Este análisis de fragmentación del ADN se realiza, sobre todo, mediante electroforesis capilar o en microfluído, que además proporciona una estimación de su concentración<sup>5</sup>. Si bien la electroforesis capilar permite un análisis continuo, la electroforesis en microfluído tiene la ventaja de ser más exacta en la determinación del tamaño de ADNc y más sensible. Existen proveedores que disponen de sistemas automatizados de sistemas de microfluído con una sensibilidad inferior a 0,1 ng/ $\mu$ L, que los hacen muy adecuados para el ADNc.

### Almacenamiento de la muestra que no se va a usar

El plasma puede almacenarse a -20 °C si se va a proceder a extraer el ADNc durante los 30 días siguientes. Si la extracción se va a realizar más tarde, es recomendable el almacenamiento a -80 °C<sup>13</sup>. Es aconsejable alicuotar el plasma para evitar los ciclos de congelación y descongelación de la muestra, ya que pueden interferir en su estabilidad<sup>37</sup>. Si se almacena de forma adecuada, las

alteraciones moleculares presentes en el ADNc pueden detectarse en muestras de plasma congeladas durante años<sup>38</sup>. No obstante, después de unos 7 años puede observarse una reducción del 35-40% ADNc, lo cual es importante para muestras almacenadas en biobanco<sup>18</sup>.

El ADNc también puede almacenarse una vez extraído a  $-20^{\circ}\text{C}$ <sup>13</sup>. Como en el caso anterior, la conservación durante 7 años produce un deterioro del 20-25% del ADNc<sup>18</sup>. El deterioro es mayor cuando la frecuencia alélica es baja. Es recomendable no superar 3 ciclos de congelación y descongelación para evitar problemas de estabilidad en la muestra.

## Recomendaciones

La determinación de alteraciones en el ADNc es un proceso muy exigente que requiere unas condiciones preanalíticas muy estrictas para proporcionar unos resultados correctos y comparables. Por ello, es necesario establecer recomendaciones para la obtención y aislamiento del ADNc a partir de sangre periférica:

- a) Se recomienda utilizar plasma obtenido con EDTA para la extracción de ADNc a partir de sangre. Se recomienda emplear tubos especiales de recogida que eviten la lisis celular si la muestra no se va a procesar en las 2-4 h siguientes.
- b) Se recomienda obtener el plasma mediante una doble centrifugación, consistente en una primera a 1.200-1.600 g durante 10 min y, tras la separación del plasma, una segunda a 16.000 g durante 5 min.
- c) Se recomienda usar kits comerciales de extracción ADNc que hayan sido diseñados específicamente para ese propósito.
- d) Se recomienda realizar la cuantificación del ADNc extraído mediante métodos fluorimétricos o PCR cuantitativa. Asimismo, es recomendable evaluar la contaminación del ADNc extraído con ADN genómico usando métodos electroforéticos.
- e) Se recomienda conservar tanto el plasma a  $-80^{\circ}\text{C}$  como el ADNc ya extraído a  $-20^{\circ}\text{C}$ , evitando repetir ciclos de congelación y descongelación.

## Bibliografía

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;1423-4:241-3.
2. Macias M, Alegre E, Diaz-Lagares A, Patino A, Perez-Gracia JL, Sanmamed M, et al. Liquid Biopsy: From basic research to clinical practice. *Adv Clin Chem.* 2018;83:73-119.
3. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem.* 2015;611:112-23.
4. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017;174:223-38.
5. Zonta E, Nizard P, Taly V. Assessment of DNA Integrity Applications for Cancer Research. *Adv Clin Chem.* 2015;70:197-246.
6. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999;641:218-24.
7. Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2015;1263:e31-7.
8. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017.
9. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaidis KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;411:26-32.
10. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;326:579-86.
11. Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta.* 2009;4042:4-100.
12. Gonzalez-Cao M, Mayo-de-Las-Casas C, Molina-Vila MA, de Mattos-Arruda L, Munoz-Couselo E, Manzano JL, et al. BRAF mutation analysis in circulating free tumor DNA of melanoma patients treated with BRAF inhibitors. *Melanoma Res.* 2015;256:486-95.
13. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta.* 2013;424:222-30.
14. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta.* 2015;450:243-53.
15. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;353:347-76.
16. Crowley E, di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;108:472-84.
17. Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, Lo YM. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clin Chem.* 2004;501:256-7.
18. Sato A, Nakashima C, Abe T, Kato J, Hirai M, Nakamura T, et al. Investigation of appropriate pre-analytical procedure for circulating free DNA from liquid biopsy. *Oncotarget.* 2018;961:31904-14.
19. Warton K, Yuwono NL, Cowley MJ, McCabe MJ, So A, Ford CE. Evaluation of Streck BCT and PAXgene Stabilised Blood Collection Tubes for Cell-Free Circulating DNA Studies in Plasma. *Mol Diagn Ther.* 2017;215:563-70.
20. Toro PV, Erlanger B, Beaver JA, Cochran RL, VanDenBerg DA, Yakim E, et al. Comparison of cell stabilizing blood collection tubes for circulating plasma tumor DNA. *Clin Biochem.* 2015;4815:993-8.
21. Alidousty C, Brandes D, Heydt C, Wagener S, Wittersheim M, Schafer SC, et al. Comparison of blood collection tubes from three different manufacturers for the collection of cell-free DNA for liquid biopsy mutation testing. *J Mol Diagn.* 2017;195:801-4.
22. Kang Q, Henry NL, Paoletti C, Jiang H, Vats P, Chinnaiyan AM, et al. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem.* 2016;4918:1354-60.
23. Van Dessel LF, Beije N, Helmijsr JC, Vitale SR, Kraan J, Look MP, et al. Application of circulating tumor DNA in prospective clinical oncology trials - standardization of preanalytical conditions. *Mol Oncol.* 2017;113:295-304.
24. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Methodological variables in the analysis of cell-free DNA. *Adv Exp Med Biol.* 2016;924:157-63.
25. Kriegshausen G, Wagner C, Mangge H, Halwachs-Baumann G, Enko D. Impact of pneumatic tube system transport of whole blood samples on free DNA concentration in human plasma. *Clin Chem.* 2016;6212:1672-3.
26. Perakis S, Auer M, Belic J, Heitzer E. Advances in circulating tumor DNA analysis. *Adv Clin Chem.* 2017;80:73-153.
27. Malentacchi F, Pizzamiglio S, Verderio P, Pazzagli M, Orlando C, Ciniselli CM, et al. Influence of storage conditions and extraction methods on the quantity and quality of circulating cell-free

- DNA (ccfDNA): the SPIDIA-DNAplac External Quality Assessment experience. *Clin Chem Lab Med*. 2015;5312:1935–42.
28. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem*. 2014;40626:6499–512.
  29. Haselmann V, Ahmad-Nejad P, Geilenkeuser WJ, Duda A, Gabor M, Eichner R, et al. Results of the first external quality assessment scheme (EQA) for isolation and analysis of circulating tumour DNA (ctDNA). *Clin Chem Lab Med*. 2018;562:220–8.
  30. Page K, Guttery DS, Zahra N, Primrose L, Elshaw SR, Pringle JH, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS One*. 2013;810:e77963.
  31. Kloten V, Ruchel N, Bruchle NO, Gasthaus J, Freudenmacher N, Steib F, et al. Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of KRAS mutations using Intplex allele-specific PCR. *Oncotarget*. 2017;849:86253–63.
  32. Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, Kaleci S, Mandrioli M, Pellacani G, et al. The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. *Clin Chim Acta*. 2018;479:14–9.
  33. Regueiro BJ, Varela-Ledo E, Martinez-Lamas L, Rodriguez-Calviño J, Aguilera A, Santos A, et al. Automated extraction improves multiplex molecular detection of infection in septic patients. *PLoS One*. 2010;510:e13387.
  34. Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS One*. 2016;113:e0150528.
  35. Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal Biochem*. 1997;2492:228–38.
  36. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M, et al. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS One*. 2014;93:e87838.
  37. Chan KC, Yeung SW, Lui WB, Rainer TH, Lo YM. Effects of pre-analytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem*. 2005;514:781–4.
  38. Kopeski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, et al. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1997;7610:1293–9.



Fundación JL Castaño  
**SEQC**

**SEQC<sup>ML</sup>**

Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2017-2018

## APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TÉCNICAS ACTUALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Ed. Cont. Lab. Clin 37: 52 - 58

---

### **PCR DIGITAL EN LA MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DEL PACIENTE ONCOLÓGICO.**

**Clara Pérez Barrios.**

*Laboratorio de Biopsia Líquida. Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Majadahonda (Madrid).*

**Miguel Barquín del Romo.**

*Laboratorio de Biopsia Líquida. Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Majadahonda (Madrid).*

#### **1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA**

En los últimos años la caracterización molecular de los tumores ha permitido el desarrollo de fármacos dirigidos frente a dianas moleculares. En muchos casos, para que un paciente pueda recibir uno de estos fármacos es necesario haber identificado previamente en el tumor la alteración molecular frente a la que actúa, que recibe el nombre de **biomarcador**. La biopsia de tejido es la muestra de referencia para realizar estos estudios moleculares, sin embargo, no está exenta de limitaciones:

- El acceso al tejido puede ser dificultoso, lo que influye en la calidad de la muestra.
- La cantidad de la muestra es en ocasiones escasa, y resulta un factor limitante para la realización de estudios complementarios.
- La gran heterogeneidad tumoral puede hacer que las muestras no sean representativas de la totalidad de las células tumorales.
- Es un procedimiento invasivo para el paciente, lo que puede conllevar un riesgo añadido e influir negativamente en su calidad de vida.

Este último punto es especialmente relevante, ya que impide la obtención de muestras seriadas a lo largo del tratamiento para estudiar la evolución molecular del tumor y la aparición de resistencias.

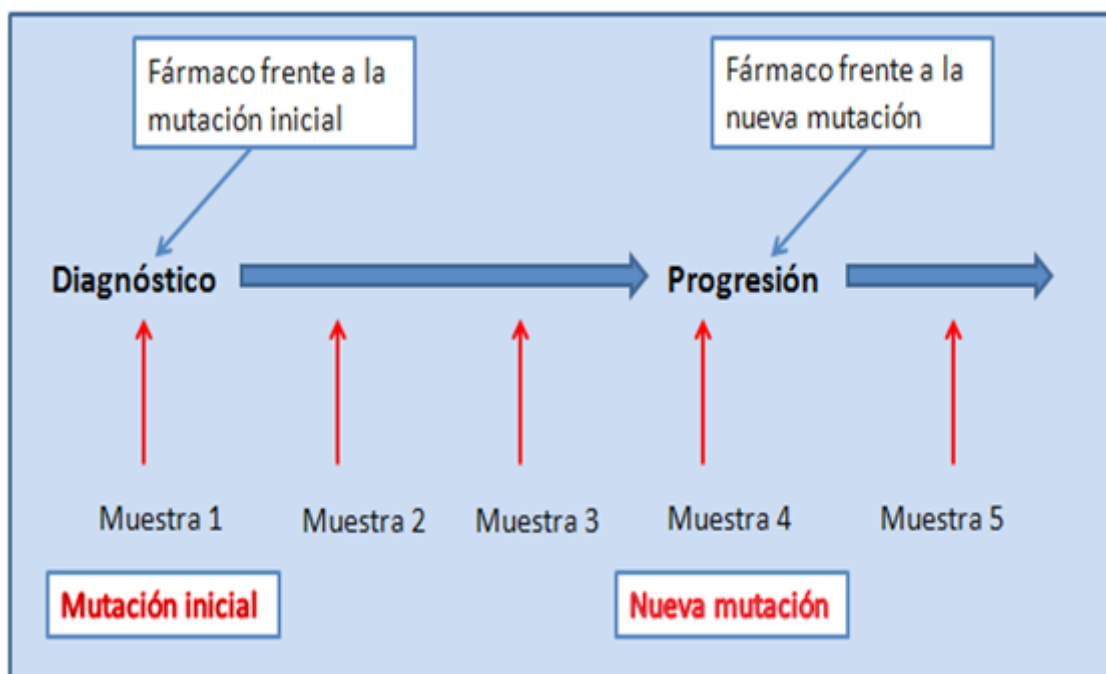
Debido a estas limitaciones, se han desarrollado estrategias alternativas que ayuden a la toma de decisiones clínicas, teniendo especial interés el estudio del **ADN tumoral circulante en sangre (ADNtc)**.

---

El término ADN tumoral circulante hace referencia a las moléculas de ADN que viajan de forma libre a través de la sangre y otros líquidos biológicos y que han sido liberadas por las células tumorales mediante procesos de necrosis y apoptosis fundamentalmente.

La principal utilidad de esta molécula en el ámbito oncológico se debe a que mantiene el perfil molecular del tejido del que procede, por lo que su análisis proporciona información sobre el tumor sin necesidad de realizar procedimientos invasivos.

Por otra parte, la muestra de elección para su estudio suele ser el plasma (en tubos de EDTA), lo que permite determinar y cuantificar de forma continua las mutaciones de interés a lo largo del tratamiento farmacológico gracias a su fácil obtención (figura 1). Esto resulta de gran utilidad en la monitorización del tratamiento y proporciona información de interés para la toma de decisiones clínicas.



**Figura 1:** Esquema de seguimiento del tratamiento oncológico mediante estudio de ADNtc.

### Consideraciones analíticas:

Para el estudio del ADNtc es necesario identificar la mutación somática de interés que se presenta en una frecuencia alélica baja, ya que el ADN tumoral se encuentra mezclado con el ADN liberado por los tejidos sanos. Esto requiere técnicas muy sensibles y específicas para su determinación.

En la fase preanalítica existen varios factores a tener en cuenta que pueden afectar a los resultados. En primer lugar, la muestra de elección es el plasma, ya que reduce el ruido de fondo que se produce por la liberación de ADN de células sanas durante el proceso de coagulación. Para evitar el efecto de la lisis celular es importante centrifugar y separar el

plasma lo más pronto posible tras la extracción de sangre. En segundo lugar, existen diversos métodos de extracción para ADN circulante, tanto manuales como automatizados. La elección entre un sistema de extracción u otro deberá valorarse de forma exhaustiva en función de la carga de trabajo del laboratorio y de los requisitos establecidos para el análisis, ya que es un proceso que influye de manera sustancial en el proceso analítico. De manera general, los métodos automáticos proporcionan mayor reproducibilidad y evitan en gran medida el riesgo de contaminación entre las muestras. Por último, deben establecerse unas condiciones rigurosas de trabajo, incluyendo áreas claramente diferenciadas de pre y post PCR, ya que la cantidad de ADN circulante suele ser escasa, por lo que el laboratorio debe optimizar los procesos de obtención, conservación y procesamiento de las muestras.

### **PCR digital para el estudio del ADN tumoral circulante**

Para el estudio del ADNtc se requiere de técnicas muy sensibles como la PCR digital, que permiten el estudio de mutaciones en muy baja frecuencia (por debajo del 0.1 %). Este tipo de PCR obtiene una sensibilidad mucho mayor a la PCR convencional al dividir la muestra en múltiples particiones que se amplifican de manera individual. Gracias a esto se consigue además una gran precisión en la cuantificación de mutaciones que se encuentran en muy baja proporción, lo que resulta esencial en el escenario de las mutaciones de origen tumoral. Por otra parte, esta división de la muestra evita que se amplifiquen preferentemente unas moléculas sobre otras y no requiere la utilización de curvas patrón como ocurre en el caso de la PCR a tiempo real.

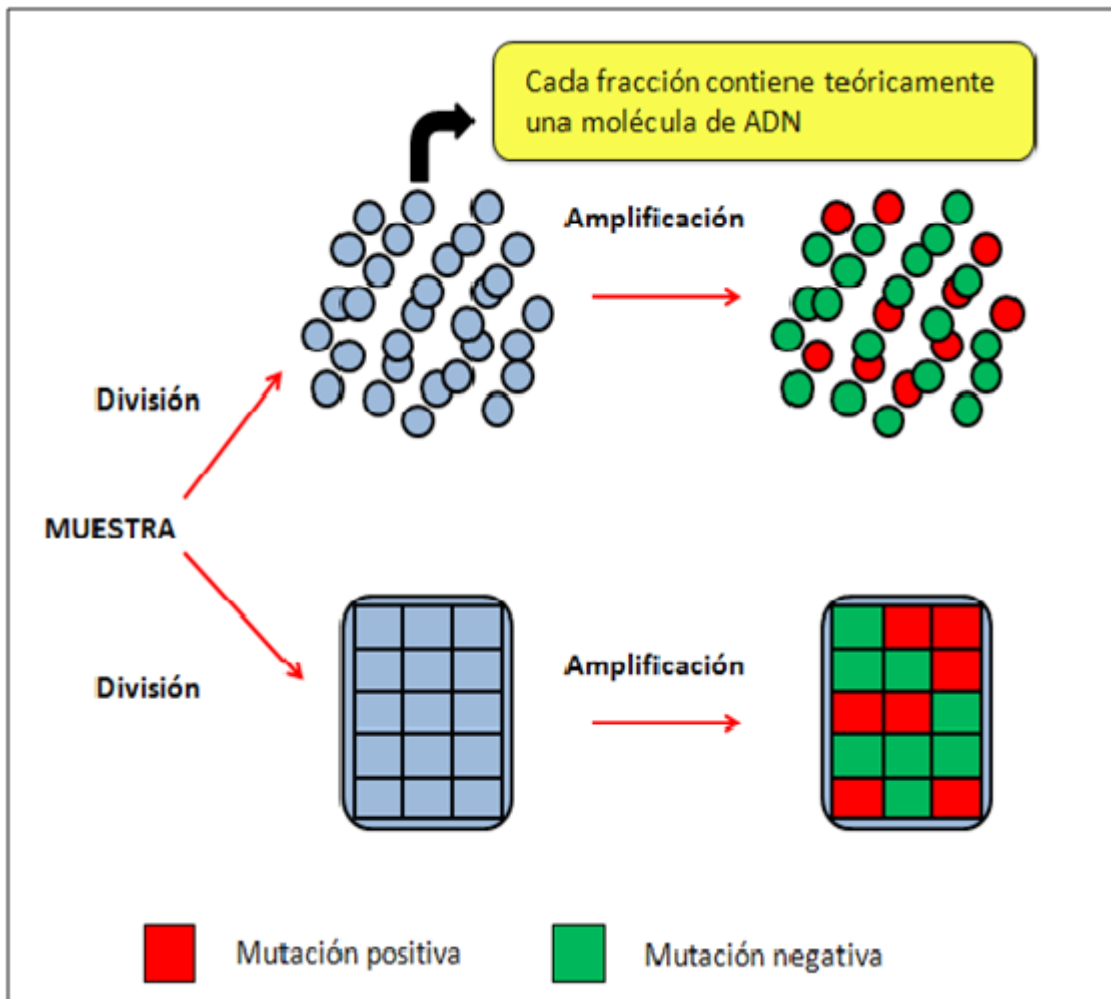
Existen en el mercado dos tipos de PCR digital: “**Drople digital PCR (ddPCR)**” y “**array-based PCR**” (figura 2). La diferencia principal entre los dos modelos se debe a la estrategia diseñada para la división de la muestra: Mediante la formación de gotas tipo emulsión, o mediante el uso de chips compuestos por microporos.

Ambas estrategias están diseñadas para que en cada fracción de muestra contenga teóricamente de 0 a 2 moléculas de ADN, siguiendo una distribución de Poisson. La amplificación mediante sondas marcadas con diferentes fluorocromos permite contar el número de fracciones positivas y negativas a una mutación y estimar su concentración inicial.

## **2. ÁMBITO DE APLICACIÓN**

La principal aplicación del estudio de ADNtc es el estudio de **biomarcadores** de forma no invasiva para el uso de fármacos dirigidos. Estos biomarcadores pueden ser de dos tipos:

- De sensibilidad o predictores de respuesta a un fármaco.
- De resistencia o predictores de pérdida de respuesta a un fármaco.



**Figura 2:** Representación de los dos tipos de PCR digital.

Es importante destacar que esta metodología no solo permite identificar estos biomarcadores, sino que además hace posible su cuantificación, permitiendo valorar la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo. Diversos estudios han demostrado que la cantidad de ADNtc se correlaciona con la progresión tumoral, de forma que los incrementos sucesivos de ADNtc sugieren un empeoramiento de la enfermedad, así como descensos sucesivos sugieren una mejoría clínica.

En Oncología, la evaluación de la respuesta al tratamiento se lleva a cabo analizando los cambios en el tamaño de las lesiones tumorales mediante pruebas de imagen. Para ello se utilizan los criterios RECIST v1.1, que establecen 4 niveles de respuesta: respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable y enfermedad progresiva. Para considerar el cambio de línea de tratamiento debe haberse detectado un aumento de al menos un 20 % en el tamaño de las lesiones, o lo que es lo mismo, enfermedad progresiva. Sin embargo, en muchas ocasiones es difícil objetivar la respuesta al tratamiento en base a estos criterios. El análisis secuencial de biomarcadores en el ADNtc proporciona información complementaria a las pruebas de imagen sobre el estado del paciente y su respuesta al fármaco admi-

nistrado lo que resulta de gran utilidad clínica. Por un lado, los incrementos sucesivos de las mutaciones de sensibilidad y/o la aparición de mutaciones de resistencia pueden indicar mala respuesta terapéutica con progresión de la enfermedad. Así mismo, el descenso de las mutaciones de sensibilidad unido a la ausencia de mutaciones de resistencia puede relacionarse con una buena respuesta terapéutica.

Por lo tanto, podemos identificar **dos** aplicaciones principales del estudio consecutivo del ADNtc en Oncología:

1- Monitorización de la respuesta a un fármaco y de la evolución de la enfermedad mediante la evolución de las mutaciones durante el tratamiento.

2- Detección temprana de resistencias, identificando la aparición de nuevas mutaciones asociadas a este fenómeno, que además pueden utilizarse como biomarcadores de nuevos fármacos en líneas de tratamiento sucesivas.

Situación actual del estudio del ADNtc en el tratamiento oncológico:

Existen diversos tumores en los que resulta especialmente interesante el estudio de biomarcadores, como por ejemplo el cáncer de colon, el cáncer de pulmón no microcítico o el melanoma entre otros. En los últimos años, diversas empresas han desarrollado ensayos en ADNtc para el estudio de biomarcadores de forma no invasiva, aunque solo un bajo porcentaje de ellos presentan acreditación IVD de producto sanitario, por lo que en su mayoría se utilizan únicamente para investigación.

En el tratamiento del cáncer de colon con anticuerpos monoclonales anti-EGFR, como el Cetuximab, es necesario realizar el estudio previo de los genes NRAS y KRAS. Esto es debido a que ciertas mutaciones en estos genes se asocian a baja respuesta al tratamiento. La empresa Sysmex Inostics ha comercializado recientemente el kit "**OncoBEAM® RAS CRC (CE-IVD)**" que permite el estudio de 34 mutaciones en KRAS y NRAS de forma no invasiva.

En el caso del cáncer de pulmón no microcítico avanzado, la empresa Roche ha lanzado al mercado el kit "**cobas® EGFR Mutation Test v2 (CE-IVD)**", para el estudio de mutaciones puntuales, inserciones y deleciones en el gen EGFR a partir de muestras de plasma, ya que estas mutaciones predicen respuesta a fármacos anti-EGFR como el Gefitinib.

Por último, en el caso del melanoma, las mutaciones en BRAF en la posición V600 predicen buena respuesta a tratamientos dirigidos como el Vemurafenib. El kit automatizado "**Idylla™ ctBRAF Mutation Assay**" de Biocartis permite la detección de forma no invasiva de las variantes V600E, E2, D, K R y M, aunque de momento no tiene marcado CE-IVD.

### **3. LIMITACIONES DE LA TÉCNICA**

Uno de los principales problemas que presenta esta técnica es la falta de criterios estandarizados en los procesos preanalítico y analítico, y la falta de controles externos normalizados. No existen en la actualidad programas de inter-comparación lo que puede comprometer

ter la calidad de los resultados en algunas ocasiones.

Otra limitación importante se debe a la falta de estandarización para establecer la presencia y la cantidad de mutaciones. Es necesario que cada laboratorio establezca sus propios límites de detección y de cuantificación para poder asignar un punto de corte a partir del cual se pueda afirmar con suficiente fiabilidad la presencia o ausencia de la mutación de interés. Además, no existen estudios que permitan establecer los puntos de corte para la toma de decisiones clínicas por lo que la información que aporta esta técnica es orientativa y complementaria a otras pruebas. Además, los resultados deben valorarse teniendo en cuenta varias medidas consecutivas y su tendencia (ascendente, estable o descendente) a lo largo del tratamiento.

Por último, la PCR digital presenta la desventaja de que utiliza sondas específicas frente a mutaciones concretas. Esto no supone un problema cuando se conoce la mutación que se quiere analizar. Sin embargo, el uso de ensayos individuales puede dificultar mucho el trabajo si se quiere hacer un cribado de varias mutaciones o cuando no se conoce la mutación del paciente.

Estas limitaciones hacen que la experiencia del personal de laboratorio sea un factor fundamental para garantizar la fiabilidad de los resultados.

## 4. BIBLIOGRAFÍA

**Aung K, Board R, Ellison G, Donald E, Ward T, Clack G, Ranson M, Hughes A, Newman W and Dive C.** Current status and future potential of somatic mutation testing from circulating free ADN in patients with solid tumours. *HUGO J.* 2010; 4: 11-21.

**Bordi P, Del Re M, Danesi R, Tiseo M.** Circulating ADN in diagnosis and monitoring EGFR gene mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research.* 2015;4(5):584-597.

**Heitzer E, Ulz P, Geigl JB.** Circulating tumor ADN as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem.* 2015; 61(1):112-23.

**Karachaliou N, Mayo-de-las-Casas C, Molina-Vila MA, Rosell R.** Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Annals of Translational Medicine.* 2015;3(3):36.

**Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, et al.** Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:2630-6.

**Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ.** Free ADN in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646-50.

**Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, et al.** Comparison of methods for circulating cell-free ADN isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Translational Lung Cancer Research.* 2016;5(6):665-672

**Pérez-Callejo D, Romero A, Provencio M, Torrente M.** Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring. *Translational Lung Cancer Research.* 2016;5(5):455-465.

**Wang Z, Chen R, Wang S et al.** Quantification and Dynamic Monitoring of EGFR T790M in Plasma Cell-Free ADN by Digital PCR for Prognosis of EGFR-TKI Treatment in Advanced NSCLC. *PLoS ONE.* 2014;9(11):e110780.

---

### COMISIÓN DE GENÉTICA

**Presidenta:** Pilar Carrasco Salas.

**Miembros:** Concepción Alonso Cerezo, Ana Cuesta Peredo, Orland Diez Gibert, Begoña Ezquieta Zubicaray, Hada Macher Manzano, Jesús Molano Mateos, Josep Oriola Ambròs, Raquel Rodríguez López, Atocha Romero Alfonso, Ana M<sup>a</sup> Sánchez de Abajo, María Santamaría González (*coordinadora*), Cristina Torreira Banzas.

### ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi, R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, A. Merino, A. Moreno, A. Peña, N. Rico, M. Rodríguez (*Presidente*), MC. Villà.

ISBN 978-84-697-4013-2 – Abril 2018 (recibido para publicación Junio 2017).