



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Implementación del análisis del ADN libre circulante en plasma en el diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas

José Manuel González de Aledo Castillo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari

Implementación del análisis del ADN libre circulante en plasma en el diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas

Memòria de tesi doctoral presentada per José Manuel González de Aledo
Castillo per optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona

Dirigida per: Dr. Joan Anton Puig Butillé

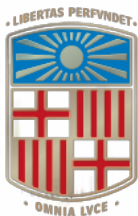
Core de Biologia Molecular. Hospital Clínic de Barcelona
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)
Unitat Funcional de Tumors Toràcics. Hospital Clínic de Barcelona

Tutor: Dr. Wladimiro Jiménez Povedano

Departament de Biomedicina. Universitat de Barcelona
Servei de Bioquímica i Genètica Molecular. Hospital Clínic de Barcelona
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat de Barcelona

Barcelona, Setembre 2021



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Dr. Joan Anton Puig Butillé

Dr. Wladimiro Jiménez Povedano

HACEN CONSTAR

Que tras la revisión de la memoria: ***Implementación del análisis del ADN libre circulante en plasma en el diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas***, presentada por el doctorando José Manuel González de Aledo Castillo, para aspirar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona, la encontramos conforme para ser presentada, defendida en acto público y juzgada por el Tribunal que al efecto se designe.

Barcelona, 21 de Septiembre de 2021

Fdo. Joan Anton Puig Butillé

Fdo. Wladimiro Jiménez Povedano

Al Dr. Rafael Molina, por darme la oportunidad de empezar esta tesis doctoral.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Joan Anton Puig la dirección de esta tesis doctoral. Gracias infinitas por hacerte cargo cuando las circunstancias lo requirieron, por la paciencia, por las ideas y por enseñarme que siempre hay una versión mejor.

Gracias también al Dr. Wladimiro Jiménez, por aceptar ser el tutor de esta tesis y por haber creído en mí durante estos años.

Gracias a James, que ha vivido esta aventura conmigo desde el principio. Gracias por animarme a continuar cuando las cosas no salían. Por confiar en mí incondicionalmente. Por las revisiones, correcciones y ediciones. Por haber sacado lo mejor de mí durante estos años. Por todo.

A mis padres, gracias por apoyarme siempre en todos los proyectos en los que me he embarcado. Por tener siempre una palabra de ánimo. Por alegrarse genuinamente por mis pequeños triunfos y por sacar siempre algo positivo de las pequeñas derrotas. Esta tesis tiene mucho de ustedes dos y de los valores que me han transmitido: trabajo en equipo, esfuerzo y perseverancia.

No puedo olvidarme de mi extensa familia. Gracias a mis hermanos, Nacho y Álvaro, a mis primas María, Tanchi, Elvira, Mercedes, Cayetana y Doblas, a mis primos Kiko, Cucho y Fico, a mis tías Chiqui, Constanza y Viry, a mi tío José Manuel y Berto, a Juan, Fifa y Cris....a todos y todas gracias por estar siempre ahí.

A Blai, Alba, Laura, Marina y Estefi, por los cafés, comidas, horas de voluntariado y apoyo en los primeros años.

A todos los profesionales del Laboratori Clínic de Bellvitge con los que tuve la inmensa suerte de trabajar y formarme. Especialmente a Ariadna, Cris, Clau, Bárbara y Javi por aquellos maravillosos años de residencia.

A mis amigas de otras especialidades Alejandra, Laura, Sara, Ari, Sabelita, Paulina y María, por todo lo que hemos descubierto juntos.

A las compañeras de otros hospitales con las que he vivido muchas aventuras laborales y de ocio a lo largo de estos años. Gracias Ali, Elvira, Paloma, Laura, Martita, Marina y Rodrigo.

A mi familia laboral actual, los compañeros y compañeras del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular del Hospital Clínic. A Josep María por el apoyo moral. A Xavier, Gregori y Olga por las conversaciones de despacho. A las chicas de la Unidad de la Calidad, especialmente a Anna, por acogerme en el equipo como uno más.

A todos mis compañeros del IBC y del Programa de Cribado Neonatal. Gracias especialmente a José Luis Marín, por el recibimiento, por hacerme sentir uno más desde el principio, por la confianza, las charlas, las risas, las enseñanzas y el legado que has dejado en el grupo y en mí. A Rosa, Ana y Sonia por la generosidad infinita que han tenido conmigo. A Toni y a Judit por darme la oportunidad de formar parte de un trabajo tan bonito. A todo el resto de compañeros y compañeras del IBC, porque gracias a ustedes voy cada día con una sonrisa a trabajar.

A Albert Camp y Robert Vera, por acogerme mis primeros días en Barcelona, y por tantos divendres junts.

A Javi, Edu, Pablo y Garo porque, a pesar de la distancia, siento que siempre puedo contar con ustedes.

A los chaskaos de Gilber, Nacho, Kike, Cooper, Nico, Raymon, Fillo, Rober y Charlie. Con ustedes empezó todo en La Laguna, y la caña que me han dado ha sido decisiva para acabar esta tesis.

ÍNDICE

Agradecimientos	5
Acrónimos	9
Enumeración de los artículos que componen la tesis	11
Resumen	13
1. Introducción	15
1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón	17
1.2. Clasificación del cáncer de pulmón	19
1.2.1. Clasificación Histológica	19
1.2.2. Clasificación Molecular	20
1.2.3. Dianas terapéuticas moleculares en cáncer de pulmón de células no pequeñas	26
1.2.4. Gen Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	27
1.3. Estrategias diagnósticas en cáncer de pulmón	32
1.3.1. Diagnóstico histológico del cáncer de pulmón	32
1.3.2. Marcadores tumorales	34
1.3.3. Diagnóstico por imagen del cáncer de pulmón	36
1.3.4. Diagnóstico molecular del cáncer de pulmón en tejido	38
1.4. ADN libre circulante (cfDNA)	42
1.4.1. Origen del cfDNA	42
1.4.2. Concentración y patrón de fragmentos del cfDNA	42
1.5. ADN tumoral circulante (ctDNA)	44
1.6. Tecnologías utilizadas en la detección de ctDNA	46
1.6.1. Métodos basados en RT-PCR	47
1.6.2. Plataformas de PCR Digital	48
1.6.3. Next Generation Sequencing	48
1.7. Análisis de mutaciones del gen EGFR en ctDNA	51
1.7.1. Índice semicuantitativo (SQI) obtenido en el Cobas Test	52
1.8. Aplicaciones del análisis del cfDNA/ctDNA	53
2. Hipótesis y Objetivos	59
3. Material y Métodos y Resultados	63
3.1. Publicación 1: Molecular characterization of advanced non-small cell lung cancer patients by cfDNA analysis: experience from routine laboratory practice	65
3.2. Publicación 2: Cell-free DNA concentration and fragment size fraction correlate with FDG PET/CT-derived parameters in NSCLC patients	81

3.3. Publicación 3: Technical Evaluation of the COBAS EGFR Semiquantitative Index (SQI) for Plasma cfDNA Testing in NSCLC Patients with EGFR Exon 19 Deletions	95
4. Discusión	109
4.1. Implementación del estudio molecular del gen EGFR mediante el análisis de cfDNA en plasma en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas	111
4.2. Características y utilidad clínica del índice semicuantitativo (SQI) de la alteración EGFR en plasma	115
4.3. Valor de la concentración de cfDNA como biomarcador en el diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña	119
4.4. Valor del patrón de fragmentos de cfDNA como biomarcador en el manejo de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña	121
5. Conclusiones	125
6. Bibliografía	129

ACRÓNIMOS

AMP	Association for Molecular Pathology
ASCO	American Society of Clinical Oncology
AS-PCR	del inglés "Allele-Specific PCR"
BEAMing	del inglés "Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics"
CAP	College of American Pathologists
CAPP-Seq	del inglés "CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing"
CEA	del inglés "Carcinoembryonic Antigen"
cfDNA	del inglés "Circulating-free DNA"
COLD-PCR	del inglés "Co-amplification at Lower Denaturation temperature PCR"
CPCNP	Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas
ctDNA	del inglés "Circulating tumor DNA"
ddPCR	del inglés "Droplet digital PCR"
EEUU	Estados Unidos
EGFR	del inglés "Epidermal Growth Factor Receptor"
EMQN	European Molecular Quality Network
EMR	Enfermedad Mínima Residual
ESMO	European Society for Molecular Oncology
FAST-SeqS	del inglés "Fast Aneuploidy Screening Test-Sequencing System"
FDA	Food and Drug Administration
FDG	¹⁸ F-Fluorodeoxiglucosa
FISH	del inglés "Fluorescent In Situ Hybridization"
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
KRAS	del inglés "Kirsten Rat Sarcoma"
MTV	del inglés "Metabolic Tumor Volume"
NGS	del inglés "Next Generation Sequencing"
NSCN	National Comprehensive Cancer Network
NSE	del inglés "Neuron-Specific Enolase"
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	del inglés "Polymerase Chain Reaction"
PD-L1	del inglés "Programmed-death ligand 1"
PET	del inglés "Positron Emission Tomography"
PNA-LNA PCR clamp	del inglés "Peptide Nuclei Acid-Locked NucleicAcid PCR clamp"
Pro-GRP	del inglés "Pro-Gastrin-Releasing Peptide"
Q-PCR	del inglés "Quantitative PCR"
RECIST	del inglés "Response Evaluation Criteria in Solid Tumours"
RM	Resonancia Magnética
RMD	Resonancia Magnética de Difusión
RT-PCR	del inglés "Real-Time PCR"
Safe-SeqS	del inglés "Safe-Sequencing System"
SCC	del inglés "Squamous Cell Carcinoma antigen"
SEQC	Sociedad Española de Medicina de Laboratorio
SNC	Sistema Nervioso Central
SQI	del inglés "Semiquantitative Index"
SUVmax	del inglés "Maximum Standardized Uptake"
SUVmean	del inglés "Mean Standardized Uptake"
TAm-Seq	del inglés "Tagged-Amplicon Deep sequencing"

TC	Tomografía Computarizada
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TKI	del inglés "Tyrosine Kinase Inhibitor"
TLG	del inglés "Total Lesion Glycolysis"
TTF-1	del inglés "Thyroid transcription factor-1"
VAF	del inglés "Variant allele fraction"
WES	del inglés "Whole Exome Sequencing"
WGS	del inglés "Whole Genome Sequencing"

PRESENTACIÓN

Esta tesis en formato compendio de artículos, presentada para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universitat de Barcelona, consta de tres artículos y cinco objetivos relacionados. Los estudios son el fruto del trabajo realizado en el Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, el Core de Biología Molecular, el Servicio de Oncología Médica y la Unidad Funcional de Tumores Torácicos del Hospital Clínic de Barcelona. Dichos artículos y objetivos están desarrollados en los apartados correspondientes. A continuación, se enumeran los artículos que componen esta tesis:

Artículo 1

González de Aledo-Castillo, J. M., Arcocha, A., Victoria, I., Martínez-Puchol, A. I., Sánchez, C., Jares, P., Rodríguez, G. F., Viñolas, N., Reyes, R., Reguart, N., Puig-Butillé, J. A. Molecular characterization of advanced non-small cell lung cancer patients by cfDNA analysis: experience from routine laboratory practice. *Journal of thoracic disease*. 2021;13(3): 1658–1670. <https://doi.org/10.21037/jtd-20-3142>

Factor de Impacto: 2.895. Q2 en medicina pulmonar y respiratoria.

Artículo 2

González de Aledo-Castillo, J. M., Casanueva-Eliceiry, S., Soler-Perromat, A., Fuster, D., Pastor, V., Reguart, N., Viñolas, N., Reyes, R., Vollmer, I., Paredes, P., Puig-Butillé, J. A. Cell-free DNA concentration and fragment size fraction correlate with FDG PET/CT-derived parameters in NSCLC patients. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2021; 10.1007/s00259-021-05306-2. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05306-2>

Factor de Impacto: 9.236. Q1 en radiología, medicina nuclear e imagen médica.

Artículo 3

González de Aledo-Castillo JM, Serhir-Sgheiri S, Calbet-Llopart N, Arcocha A, Jares P, Reguart N, Puig-Butillé JA. Technical Evaluation of the COBAS EGFR Semiquantitative Index (SQI) for Plasma cfDNA Testing in NSCLC Patients with EGFR Exon 19 Deletions. *Diagnostics*. 2021; 11(8):1319. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081319>

Factor de Impacto: 3.706. Q2 en medicina, general e interna.

Además, los resultados preliminares de esta tesis doctoral se han presentado en congresos nacionales e internacionales:

1. **González de Aledo-Castillo, Jose Manuel;** Casanueva-Eliceiry, Sebastián; Soler-Perromat, Alexandre; Fuster, David; Pastor, Víctor; Reguart, Noemí; Viñolas, Nuria; Reyes, Roxana; Vollmer, Iván; Paredes, Pilar; Puig-Butillé, Joan Anton. Correlació dels paràmetres derivats de l'FDG PET/TC amb la concentració i fragmentació de l'ADN lliure circulant en pacients amb CPCNP avançat. XIV Congrés Català de Ciències de Laboratori Clínic. 2021 (Premio Segunda Mejor Comunicación Oral)
2. Vollmer, Iván; **González de Aledo-Castillo, Jose Manuel;** Soler-Perromat, Alexandre; Casanueva-Eliceiry, Sebastián; Paredes, Pilar; Puig-Butillé, Joan Anton. TC y PET/TC como biomarcadores de la integridad del ADN en la biopsia líquida en pacientes con cáncer de pulmón. 35 Congreso Nacional SERAM. 2021 (Premio Mejor Comunicación Oral).
3. **González de Aledo Castillo, José Manuel;** Casanueva Eliceiry, Sebastián; Soler, Alexandre; Reguart, Noemí; Vollmer, Iván; Paredes, Pilar; Puig Butillé, Joan Anton. Correlation of cell-free DNA concentration and fragment size fraction with FDG PET/CT derived parameters in advanced NSCLC patients. Liquid biopsies (online). 2020. European Association for Cancer Research
4. **González de Aledo Castillo, José Manuel;** Victoria, Iván; Arcocha, Ainara; Reguart, Noemí; Molina Porto, Rafael; Puig Butillé, Joan Anton. Evaluation of EGFR mutation testing in plasma from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Euromedlab. Barcelona 2019.
5. **González de Aledo Castillo, José Manuel;** Victoria, Iván; Reguart, Noemí; Puig Butillé, Joan Anton; Arcocha, Ainara; Molina, Rafael. Evaluación de mutaciones en el gen de EGFR en plasma y sensibilidad de la técnica. XI Congreso Nacional de Laboratorio Clínico. 2017
6. Vilariño, Noelia; Puig-Butillé, Joan Anton; Reyes, Roxana; Victoria, Iván; Jares, Pedro; Viñolas, Nuria; **González De Aledo-Castillo, José Manuel;** Molina, Rafael; Teixido, Cristina; Prat, Aleix; Reguart, Noemí. Correlation of EGFR Mutation Detection in CtDNA by Two Different Platforms in Advanced NSCLC Patients from a Single Institution. IASLC 18th World Conference on Lung Cancer. 2017

RESUMEN

Implementación del análisis del ADN libre circulante en plasma en el diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas

INTRODUCCIÓN: Las mutaciones en el gen *EGFR* son alteraciones comunes en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Los fármacos inhibidores de la tirosina quinasa son el tratamiento de elección en este grupo de pacientes, ya que han demostrado una mejora clara en la supervivencia frente a tratamientos convencionales. Las guías clínicas internacionales recomiendan el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* en pacientes con un diagnóstico de adenocarcinoma avanzado. La biopsia de tejido continúa siendo el *gold-standard* para la caracterización molecular en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña. Sin embargo, en un alto porcentaje de pacientes no se dispone de muestra de tejido, o esta no presenta la calidad suficiente para realizar análisis moleculares. El ADN libre circulante (cfDNA) en plasma es una fuente alternativa para el análisis molecular indirecto del tumor, especialmente útil en aquellos pacientes de los que no se dispone de muestra de tejido. Junto con las características cualitativas del cfDNA, la información cuantitativa, como la concentración, y estructural, como el tamaño de sus fragmentos, está ganando interés en la práctica clínica.

HIPÓTESIS: la caracterización molecular del gen *EGFR* en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas mediante el análisis de cfDNA en plasma representa una alternativa adecuada al análisis en biopsia de tejido. Además, parámetros derivados de este análisis como la concentración y tamaño de los fragmentos de cfDNA o el índice semicuantitativo (SQI) podrían proporcionar información complementaria en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas.

OBJETIVOS: los objetivos de esta tesis son, en primer lugar, evaluar el impacto de la introducción en un entorno clínico real de un test tipo RT-PCR para el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* en cfDNA en plasma. Además, determinar la utilidad clínica de la concentración del cfDNA y su fracción de fragmentos cortos como biomarcadores de estadificación de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzado o metastásico. Por otro lado, evaluar las características del índice semicuantitativo (SQI) obtenido en los pacientes con alteraciones en el gen *EGFR* y estudiar la asociación de la concentración del cfDNA y su patrón de fragmentos con parámetros derivados del FDG PET/TC.

MÉTODOS: se ha realizado un análisis prospectivo en una cohorte clínica de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzado o

metastásico. En todos los pacientes se realizó el estudio de alteraciones en el gen *EGFR* mediante el Cobas EGFR Mutation Test v2 en cfDNA en plasma y se determinó la concentración de cfDNA mediante fluorimetría, y el patrón de fragmentos de cfDNA mediante electroforesis capilar. Se recogieron datos demográficos, clínicos, histopatológicos y el resultado molecular en tejido, siempre que estuviera disponible, de todos los pacientes. Se analizó la eficacia diagnóstica del estudio de mutaciones en plasma, el impacto de la introducción de esta metodología en la práctica clínica y la utilidad de la concentración de cfDNA y el tamaño de sus fragmentos como biomarcadores. En los pacientes en los que se disponía de análisis de imagen mediante FDG PET/TC y TC toracoabdominal se estudió su asociación con la concentración de cfDNA y el tamaño de sus fragmentos. En un subgrupo de pacientes con deleciones en el exón 19 del gen *EGFR* se realizó el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* mediante una metodología alternativa (ddPCR) que proporcionó la fracción de alelo variante (VAF) para la mutación encontrada y se realizó un estudio de correlación de la misma con el SQI.

PRINCIPALES RESULTADOS: el análisis de alteraciones en el gen *EGFR* en cfDNA en plasma mostró una alta eficacia diagnóstica comparado con el tejido. La concentración de cfDNA fue significativamente más alta en pacientes con estadios avanzados, y estos presentaron una fracción mayor de fragmentos cortos de cfDNA. Tanto la concentración de cfDNA como la fracción de fragmentos cortos presentaron una correlación positiva con los parámetros volumétricos y metabólicos derivados del FDG PET/TC de la enfermedad metastásica. El SQI presentó una buena correlación con la VAF, tanto en pacientes al inicio del tratamiento, como durante el seguimiento longitudinal de los mismos.

CONCLUSIONES: i) el análisis del cfDNA en plasma para la determinación de mutaciones en el gen *EGFR* es un método preciso y rápido para la caracterización molecular inicial de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña en la práctica clínica. ii) La introducción del Cobas EGFR mutation test v2 en la práctica clínica ha permitido el acceso a terapias dirigidas a los pacientes en los que no se dispone de muestra de tejido. iii) La concentración de cfDNA correlaciona con el estadio tumoral y con parámetros de imagen del tumor derivados de las lesiones metastásicas, por lo que tiene potencial como biomarcador en la estadificación de la neoplasia. iv) la fracción de fragmentos cortos de cfDNA correlaciona con parámetros volumétricos y metabólicos de las lesiones metastásicas obtenidos a partir del FDG PET/TC. v) El SQI es un parámetro cuantitativo robusto que refleja indirectamente la VAF y el número de copias mutadas/mL en pacientes con mutaciones en el exón 19 del gen *EGFR*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón

El cáncer es la causa de muerte prematura más frecuente en los países con mayor índice de desarrollo humano. Según los datos del Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) del año 2020, el cáncer de pulmón es el cáncer más común a nivel mundial, con 2.2 millones de nuevos casos, así como el que mayor mortalidad presenta, con 1.8 millones muertes(1). Existen diferencias en la incidencia del cáncer de pulmón según el sexo y el origen geográfico (Figura 1). El cáncer de pulmón es el cáncer más común en hombres y su incidencia es prácticamente el doble con respecto a las mujeres (1.44 millones de casos vs. 771.000 en 2020), en las que el cáncer de pulmón es el tercer cáncer más común. Las regiones con una mayor incidencia de cáncer de pulmón en hombres son Micronesia, Polinesia, Europa Central y del Este y Asia Oriental. En cambio, las regiones con una mayor incidencia de cáncer de pulmón en mujeres son Norteamérica y Europa del Norte y Occidental. Esta diferencia se atribuye principalmente a las diferencias existentes en cuanto al consumo de tabaco(2).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la enfermedad que genera mayor carga en los años de vida ajustados por discapacidad, tanto en hombres como en mujeres. El riesgo de morir de cáncer entre 0-74 años es del 10.6%, siendo el más probable el cáncer de pulmón, con un 3.2%(3). La incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón ha ido en descenso en aquellos países con un mayor índice de desarrollo y que cuentan con políticas activas de deshabituación tabáquica. Sin embargo, los países en vías de desarrollo donde el consumo de tabaco es aún elevado presentan una menor incidencia de cáncer de pulmón, pero una elevada tasa de mortalidad. Esto se debe a diversos factores como son una elevada contaminación ambiental, la existencia de barreras socioculturales y un desigual acceso al sistema de salud lo que provoca un retraso en el diagnóstico y tratamiento del cáncer(4).

El cáncer de pulmón está intrínsecamente relacionado con la exposición a factores ambientales. El tabaco es el factor ambiental más importante y la causa más determinante en cuanto a la incidencia y mortalidad en este cáncer. Se estima que el tabaco es responsable del 80-85% de los casos de cáncer de pulmón a nivel mundial(5). El tabaco contiene más de 7000 sustancias químicas y 69 carcinógenos, y su consumo está relacionado con algunos subtipos histológicos de cáncer de pulmón. Principalmente se ha relacionado el consumo de tabaco con el carcinoma escamoso de pulmón y el cáncer de pulmón de células pequeñas, y en menor medida con el adenocarcinoma. Además del tabaco, otros 29 agentes se han relacionado con la aparición del cáncer de pulmón, como por ejemplo los asbestos, la sílice, varios metales pesados y el radón, así como la combustión de combustibles fósiles en hogares mal ventilados y la polución ambiental(6). Además de los carcinógenos mencionados, enfermedades pulmonares como la

enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el enfisema y la neumonía también se han asociado con el desarrollo del cáncer de pulmón(7,8).

La susceptibilidad genética al cáncer de pulmón es un factor importante en su desarrollo, habiéndose estimado en un 18% la heredabilidad del mismo(9). Además, el riesgo de padecerlo en familiares de primer grado de pacientes de cáncer de pulmón es aproximadamente 1.5 veces más alto que en individuos sin historia familiar de esta neoplasia, actuando como un factor independiente del consumo de tabaco(10).

Las estrategias actuales para prevenir el del cáncer de pulmón se centran en campañas de deshabituación tabáquica. Además, se han desarrollado programas piloto de screening en cáncer de pulmón basados en técnicas de imagen con resultados prometedores. El National Lung Screening Trial de Estados Unidos (EEUU) halló un 20% menos de mortalidad en un grupo de pacientes de alto riesgo de padecer cáncer de pulmón cuando fueron cribados mediante tomografía computarizada de baja dosis (TC de baja dosis) frente a otro grupo de pacientes con iguales características clínicas cribado mediante radiografía de tórax(11). En Europa se han encontrado resultados similares en cribados basados en imagen en Alemania(12) y Dinamarca(13). Estos resultados han propiciado que la Unión Europea haya hecho pública su posición a favor al cribado de cáncer de pulmón mediante TC de baja dosis a través de la publicación de un documento donde se exponen recomendaciones para la implementación exitosa de estos programas de cribado(14).

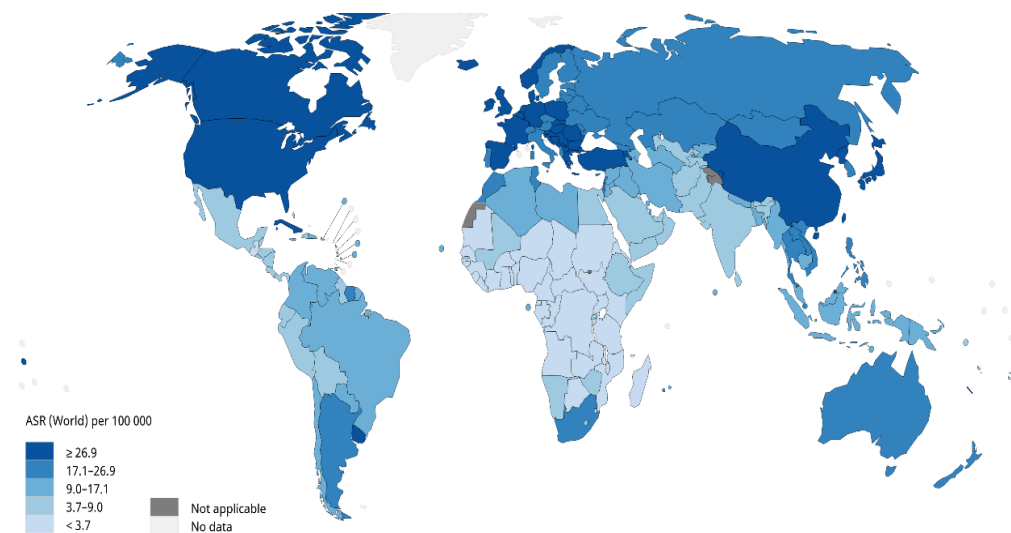


Figura 1. Estimación de la incidencia de cáncer de pulmón estandarizada por edad en 2020, para ambos sexos. Adaptado de Sung et al. (1)

1.2. Clasificación del cáncer de pulmón

1.2.1. Clasificación Histológica

El cáncer de pulmón constituye un grupo heterogéneo de neoplasias con características histológicas diferenciadas. Tradicionalmente, el cáncer de pulmón se ha dividido en dos grandes grupos: el cáncer de pulmón de células pequeñas, que corresponde al 15% del total de cánceres de pulmón, y el cáncer de pulmón de células no pequeñas, que representa el 85% restante y engloba a los subtipos adenocarcinoma, carcinoma escamoso de pulmón y carcinoma de pulmón de células grandes (15). Sin embargo, los avances en el conocimiento de los factores genéticos implicados en el desarrollo del cáncer de pulmón han hecho que en los últimos años se hayan producido cambios importantes en su clasificación histológica.

En la última década ha surgido el concepto de medicina personalizada o medicina de precisión, cuya definición más aceptada es la dada por el US National Institutes of Health (NIH), que la define como un enfoque emergente para el tratamiento y la prevención de enfermedades que tiene en cuenta la variabilidad individual en los genes, el entorno y el estilo de vida de cada persona(16). El desarrollo de la medicina de precisión ha permitido que un porcentaje de pacientes con cáncer puedan recibir tratamientos dirigidos a inhibir el efecto de las alteraciones moleculares *driver* implicadas en el desarrollo del tumor. Dichos tratamientos dirigidos tienen una mayor especificidad y por tanto una mayor eficacia y menor toxicidad comparados con los tratamientos convencionales(17). El cáncer de pulmón de células no pequeñas se ha convertido en un claro ejemplo en donde aplicar la medicina de precisión en tumores sólidos, por lo que en este tipo de pacientes es preciso caracterizar molecularmente el tumor, además de histológicamente(18).

La OMS publica periódicamente una clasificación histológica de los tumores torácicos, incluyendo a los tumores de pulmón, la cual se actualiza en base a los avances genéticos y terapéuticos que se obtienen en dicha neoplasia. La clasificación histológica de la OMS del año 2015 introdujo nuevas recomendaciones para la clasificación del cáncer de pulmón como son: (i) la inclusión del uso de la inmunohistoquímica cuando sea posible para biopsias pequeñas y citologías, y también para piezas de resección en algunos tumores como el adenocarcinoma, el carcinoma escamoso de pulmón no queratinizante, los tumores neuroendocrinos y los tumores sarcomatoides(19); (ii) la integración de los estudios moleculares para facilitar tratamientos personalizados en pacientes con cáncer de pulmón avanzado; (iii) recomendaciones para el diagnóstico y manejo de biopsias pequeñas y muestras citológicas; (iv) cambios mayores respecto al enfoque del adenocarcinoma en muestras de resección; (v) la restricción del diagnóstico del cáncer de pulmón de células grandes a tumores reseccionados que no presenten

ninguna clara diferenciación histológica, inmunohistoquímica o mucina; (vi) nuevos subtipos de carcinoma escamoso de pulmón; (vii) la agrupación de los tumores neuroendocrinos(20).

Por tanto, la clasificación del año 2015 de la OMS de tumores de pulmón se actualizó respecto a la anterior de 2004 basada en los nuevos perfiles moleculares y alteraciones genéticas diana identificados durante ese período. Esta clasificación contempla como tipos histológicos principales los tumores epiteliales, tumores mesenquimales, tumores linfohistiocíticos, tumores de origen ectópico y tumores metastásicos. Dentro de los tumores epiteliales, destacan el grupo de adenocarcinomas, constituido por 16 entidades diferentes, los carcinomas escamosos de pulmón, que engloba 5 subtipos diferentes, los tumores neuroendocrinos, donde destaca el carcinoma de pulmón de célula pequeña, además de otros 6 subtipos. En el grupo de tumores epiteliales se incluye además el carcinoma de pulmón de célula grande, el carcinoma adenoescamoso, los carcinomas sarcomatoides, los tumores tipo glándula salival, y distintos tipos de adenomas y papilomas. En total, los tumores epiteliales están constituidos por 51 entidades diferentes(21).

Existen diferencias en la frecuencia de los diferentes subtipos histológicos de cáncer de pulmón. En el programa Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) de EEUU, con datos entre 2013 y 2017, los adenocarcinomas representaron el 50.4% de los tumores de pulmón, seguidos del carcinoma escamoso de pulmón (22.6%), el cáncer de pulmón de células pequeñas (12.5%), otros carcinomas específicos (5.5%), carcinomas de célula no pequeña (4.6%), carcinomas no específicos (2.9%), carcinoma de pulmón de célula grande (1.3%) y otros (0.2%)(22). Los datos del registro español entre muestran datos similares pero en una cohorte mucho menor: adenocarcinomas (55.6%), carcinoma escamoso de pulmón (24.1%), cáncer de pulmón de células pequeñas (12.9%), carcinoma de pulmón de célula grande (2.7%), otros carcinomas específicos (2.1%), carcinomas no específicos (2.1%) y otros (0.5%)(23,24).

1.2.2. Clasificación Molecular

La identificación de alteraciones genéticas clave durante el inicio y las primeras etapas de la evolución del cáncer de pulmón ha cambiado el paradigma del tratamiento de esta neoplasia. En los últimos años se han realizado importantes esfuerzos para llevar a cabo una caracterización molecular exhaustiva de diferentes tipos de neoplasias entre las que se encuentra el cáncer de pulmón. Una de estas iniciativas es el The Cancer Genome Atlas (TCGA), un programa que desde 2006 ha caracterizado molecularmente más de 20.000 tumores de 33 tipos diferentes, y el mismo número de muestras normales emparejadas(25). Este tipo de

iniciativas ha permitido identificar relaciones entre las características moleculares del tumor y los hábitos tabáquicos o características clínicas de los pacientes con cáncer de pulmón.

Los cánceres de pulmón de células no pequeñas, en particular los tumores desarrollados en individuos fumadores presentan una alta carga de mutaciones tumorales somáticas, definida como el número de mutaciones codificantes no sinónimas por megabase. Estos datos ponen de manifiesto el panel carcinogénico del tabaco, el cual influye en el espectro de mutaciones. Los tumores de pacientes fumadores presentan una mayor frecuencia de mutaciones, predominantemente transversiones de nucleótidos (citocinas por adeninas (C>A)) y mutaciones en los genes *Kirsten Rat Sarcoma (KRAS)* y *TP53*. Por el contrario, los pacientes no fumadores presentan predominantemente transiciones de citocina a timina (C>T) y mayor prevalencia de alteraciones accionables incluyendo mutaciones en el gen *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)*, y traslocaciones en los genes *ROS1* y *ALK*(26).

Por otro lado, un estudio en el que se secuenciaron más de 500 tumores sólidos metastásicos de diferente origen incluyendo el cáncer de pulmón, observaron que el número de mutaciones es mayor en las metástasis en comparación con los tumores primarios, poniendo de manifiesto la heterogeneidad molecular del cáncer metastásico y que el éxito del tratamiento del cáncer avanzado dependerá de la capacidad de entender las implicaciones terapéuticas de esta heterogeneidad(27).

Las principales mutaciones encontradas en el cáncer de pulmón de células no pequeñas se localizan en los genes *KRAS* y el gen *EGFR*. Dichas alteraciones son claves para el desarrollo del tumor y representan dianas terapéuticas muy atractivas. Las mutaciones en los genes *KRAS* y *EGFR* son claves en el inicio del tumor y normalmente son mutuamente excluyentes. En aquellos tumores en los que coexisten alteraciones en ambos genes, las mutaciones en el gen *KRAS* confieren resistencia a los inhibidores de *EGFR*. Se ha observado una relación entre las diferentes alteraciones *driver* y las características moleculares del tumor. Los tumores que presentan mutaciones en el gen *EGFR*, o reordenamientos en los genes *ALK* o *ROS1* tienen una carga mutacional más baja que la media de tumores. Aunque se desconocen las causas, ello puede ser debido a que estas mutaciones son más comunes en tumores de pacientes no fumadores o poco fumadores. Por otro lado, las mutaciones en el oncogén *TP53* suelen observarse de forma recurrente en tumores avanzados, lo que sugiere que esta alteración tiene un papel relevante en la progresión tumoral.

1.2.2.1. Adenocarcinoma de pulmón

En 2014 se publicaba el perfil molecular de 230 adenocarcinomas de pulmón dentro del proyecto TCGA. Se analizó tanto el ADN somático como el ADN germinal de los pacientes mediante Whole Exome Sequencing (WES) y se identificaron 18 genes con alteraciones recurrentes en este subtipo de cáncer de pulmón. Los genes frecuentemente alterados en el tumor eran el gen *TP53* (46% de los casos), el gen *KRAS* (33% de casos), los genes *STK11* y *KEAP1* (17% de los casos), el gen *EGFR* (14% de casos), el gen *NF1* (11% de los casos), el gen *BRAF* (10% de casos), el gen *SETD2* (9% de los casos), los genes *MGA* y *RBM10* (8% de los casos), los genes *PIK3CA*, *MET* y *ARID1A* (7% de los casos), el gen *SMARCA4* (6% de los casos), los genes *RB1* y *CDKN2A* (4% de los casos), el gen *U2AF1* (3% de los casos) y el gen *RIT1* (2% de los casos)(Figura 2)(28).

El 75% de los adenocarcinomas presentaban mutaciones que promueven la señalización de la vía receptor de tirosina quinasa (RTK)/RAS/RAF, localizándose las alteraciones más frecuentes en los oncogenes *KRAS*, *EGFR* y *BRAF* (62% de los casos), y en menor frecuencia mutaciones en los genes *ERBB2*, *MAP2K1*, *NRAS* y *HRAS*, además de los genes de fusión *ROS1*, *ALK* y *RET*. En aquellos casos en los que no se encontraron estas mutaciones, el análisis del número de copias de ADN reveló la amplificación de los oncogenes *ERBB2* y *MET*. También se identificaron nuevas alteraciones en el gen *NF1* y *RIT1*, ambos implicados también en la vía RTK/RAS/RAF(15,29).

Otros estudios han caracterizado molecularmente diferentes cohortes además de la del TCGA. Una revisión que sumaba los datos moleculares de las principales cohortes analizadas hasta la fecha evaluó las frecuencias de mutaciones en diferentes genes según el estadio de la enfermedad. El estudio evidenció la diferencia en la prevalencia de mutaciones en determinados genes en los adenocarcinomas de pulmón según el estadio de la neoplasia. Por ejemplo, las mutaciones en el gen *EGFR* están presentes en la mitad de adenocarcinomas de pulmón en estadios tempranos respecto a los estadios metastásicos (14.2% vs. 30.3%) o por el contrario, truncamientos en el gen *NF1* son más prevalente en estadios tempranos que avanzados (6.3% vs. 1.9%)(30).

Además de la caracterización genética, estos análisis han permitido subclasificar a los adenocarcinomas de pulmón en diferente subtipos según sus perfiles transcripcionales de ARNm y perfiles de metilación y de expresión proteica(15,28,29).

Los genes de fusión son genes híbridos generados por la yuxtaposición de dos genes independientes, generando reordenamientos estructurales como deleciones, inversiones, traslocaciones o duplicaciones dentro del mismo cromosoma o entre cromosomas diferentes.

Las fusiones de genes, mutaciones en sitios de *splicing* o mutaciones en genes que codifican para factores de *splicing* promueven o sustentan fenotipos malignos generando transcritos de ARNm aberrantes(28). Algunas proteínas de fusión cuentan con tratamientos oncoespecíficos. En concreto, las generadas por reordenamientos de genes como *ALK*, *ROS1*, *RET* y *NTRK*(31). Se estima que los reordenamientos en el gen *ALK* están presentes entre un 4-6% de adenocarcinomas de pulmón y en los genes *ROS1* y *RET* en un 1.2%(32). La fusión más frecuentemente encontrada es una pequeña inversión dentro del brazo corto del cromosoma 2, que fusiona el dominio N-terminal del gen *EML4* y el dominio C-terminal quinasa de *ALK*, lo que conlleva a una proteína quinasa constitucionalmente activa. El gen *ROS1* es capaz de fusionarse con diferentes genes, provocando la activación de su dominio quinasa. Por su parte, el gen *RET* codifica para un receptor tirosina quinasa, que transduce señales para el crecimiento y la diferenciación celular. La presencia de estos reordenamientos es mutuamente excluyente con mutaciones en los genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* y *ERBB2*(33). La secuenciación del ARN en las muestras del TCGA reveló fusiones involucrando a *ALK* en el 1.3% de los casos (*EML4-ALK*), a *ROS1* en el 1.7% de los casos y a *RET* en el 0.9% de casos. El análisis de ARN también reveló la presencia de la activación de *MET* en un 4.3% de muestras(28).

1.2.2.2. Carcinoma escamoso de pulmón

En el año 2012, el proyecto TCGA publicó los resultados del análisis molecular de 178 carcinomas escamosos de pulmón(34). Este análisis reveló la presencia media por cada carcinoma escamoso de pulmón de 360 mutaciones exónicas, 165 reordenamientos genéticos y 323 segmentos de alteración de número de copia. Este perfil tan complejo se cree que está relacionado con el hábito de fumar, el cual se asocia con este subtipo histológico. Se encontraron mutaciones en el gen *TP53* en el 90% de los tumores. Otros hallazgos significativos fueron mutaciones en los genes *CDKN2A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KEAP1*, *MLL2*, *HLA-A*, *NFE2L2*, *NOTCH1* y *RB1*. También se detectaron otros genes mutados en menor proporción, como el gen *EGFR*, pero tanto el tipo de mutaciones como su frecuencia (<9%) difieren respecto a las encontradas en adenocarcinomas de pulmón. En el 34% de los casos se hallaron mutaciones en las vías relacionadas con estrés oxidativo y en la respuesta celular a la quimioterapia y la radioterapia, en concreto en los genes *KEAP1* y *NFE2L2*, así como mutaciones en genes relacionados en la diferenciación celular a célula escamosa, en concreto en los genes *SOX2* y *TP63* en el 44% de los casos, y en genes relacionados con las vías PI3K/RTK/RAS en el 69% de los casos. El gen supresor de tumores *CDKN2A* se encontró inactivado en el 72% de los casos (Figura 2).

El perfil de ARNm permitió establecer una relación entre el perfil de expresión génica y las diferentes alteraciones adquiridas. Además, se pudo clasificar a los carcinomas escamosos de pulmón en 4 subgrupos según su perfil de metilación y expresión de miARN (15,29,34).

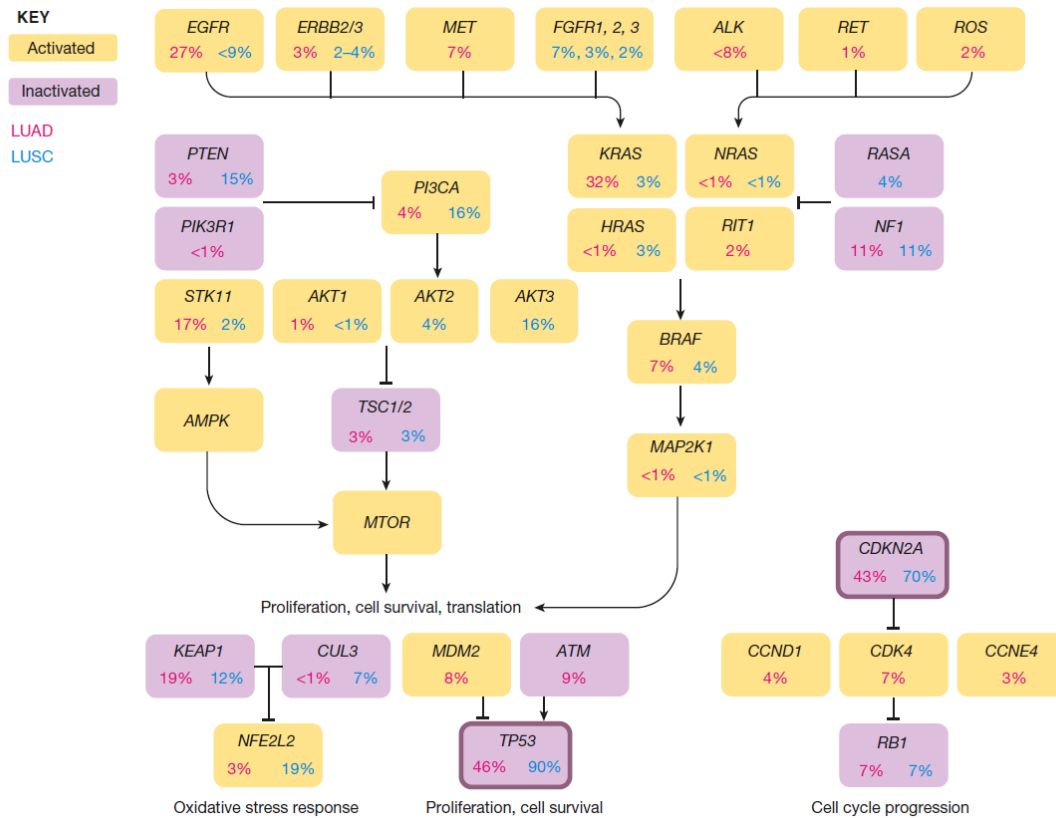


Figura 2. Alteraciones en vías oncogénicas diana en adenocarcinoma de pulmón carcinoma escamoso de pulmón. Los cuadros amarillos representan los genes activados y los cuadros violetas los genes inactivados. El porcentaje (%) en color rosa corresponde a la frecuencia en adenocarcinomas de pulmón, y en color azul a la frecuencia en carcinoma escamoso de pulmón. Adaptado de Herbst et al. (26)

1.2.2.3. Tumores neuroendocrinos de pulmón

En este grupo se incluyen los tumores neuroendocrinos de alto grado, como el cáncer de pulmón de células pequeñas y el carcinoma neuroendocrino de células grandes, y los tumores neuroendocrinos de bajo grado, como el carcinoide típico y el carcinoide atípico. En los tumores neuroendocrinos de bajo grado predominan mutaciones no activadoras en los genes *EGFR*, *ERBB2*, *RET*, *MET*, *KIT*, *KRAS*, *KDR*, *FGFR1*, *BRAF*, *SMAD4* y *PIK3CA*, pero en un porcentaje menor que en otros cánceres de pulmón de célula no pequeña(35,36).

En lo que respecta a los tumores neuroendocrinos de alto grado, el proyecto TCGA secuenció 110 cánceres de pulmón de célula pequeña y encontró una frecuencia extremadamente alta de inactivaciones bialélicas en los genes *TP53* y *RB1* en el 98% y el 91% de los casos, respectivamente. Los genes de la familia NOTCH se encontraron inactivados en el 25% de los

casos. Además, se descubrieron reordenamientos en el gen *TP73* en el 13% de los casos. Otras alteraciones incluyeron la sobreexpresión del gen *CCND1*, en el 2% de los casos y mutaciones en los genes *CREBBP* (15%), *EP300* (13%), *MYCL1* (9%), *PTEN* (9%), *MYC* (6%), *KIT* (6%), *FGFR1* (6%), *MYCN* (4%) y *PIK3CA* (3%)(37) (Figura 3).

Otros autores han dividido los carcinomas neuroendocrinos en tres grupos; dos grandes y uno pequeño: el tipo cáncer de pulmón de células pequeñas, caracterizado por comutaciones en los genes *TP53* + *RB1* y amplificación del gen *MYCL*; el tipo cáncer de pulmón de células no pequeñas, que no presenta estas comutaciones y presenta alteraciones universales de los cánceres de pulmón de célula no pequeña, como en los genes *STK11*, *KRAS* y *KEAP1*, y el tipo carcinoide, que presenta mutaciones en el gen *MEN1* y baja carga mutacional(38). Además, en se encontraron alteraciones la vía *PIK3CA/AKT/mTOR* en el 15% de los casos(39).

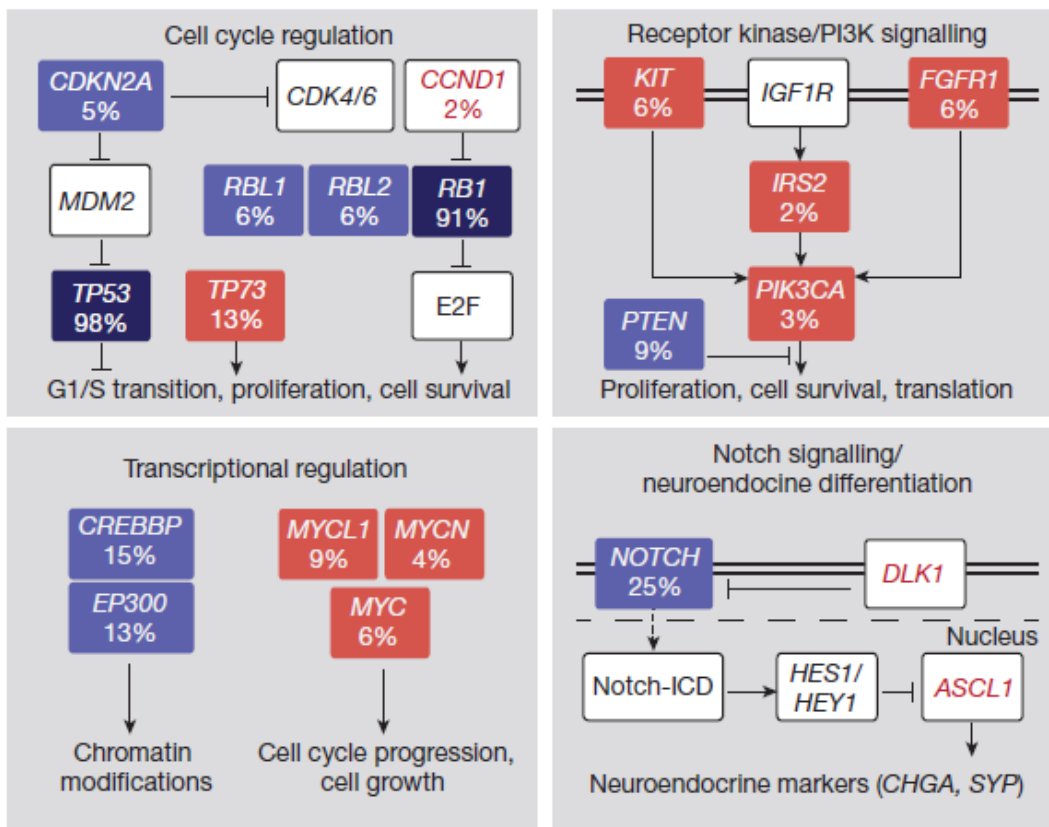


Figura 3. Vías de señalización frecuentemente afectadas en el cáncer de pulmón de células pequeñas. Adaptado de George et al. (37)

1.2.2.4. Otros tumores de pulmón

Un estudio con 75 muestras en cáncer de pulmón de célula grande identificó mutaciones somáticas en el gen *TP53* en el 92% de los casos, seguidos de mutaciones inactivadoras somáticas en el gen *RB1* (42%) y alteraciones bialélicas en ambos genes en el 40% de las

muestras. También se encontraron alteraciones somáticas, normalmente deletéreas, en dominios funcionales relevantes en los genes *STK11* (30%) y en *KEAP1* (22%). Alteraciones bialélicas de estos dos genes se encontraron en el 37% de los casos(40).

En el carcinoma adenoescamoso, que contiene componentes de adenocarcinoma y de carcinoma escamoso, la mayoría de las mutaciones eran comunes en ambas histologías, salvo algunas como las alteraciones en los genes *KRAS*, *HER2* y *EGFR*, que solo se encontraban en el componente adenocarcinoma(29).

En el carcinoma sarcomatoide, un estudio en 81 pacientes mostró mutaciones en los genes *KRAS* (27%), *EGFR* (22%), *TP53* (22%), *SKT11* (7.4%), *NOTCH1* (4.9%), *NRAS* (4.9%) y *PI3KCA* (4.9%). Cabe destacar que las mutaciones encontradas en el gen *EGFR* son mutaciones poco comunes y que difieren de las alteraciones detectadas en el subtipo adenocarcinoma(41).

En los tumores de tipo glándula salivar, entre el 50-100% del subtipo carcinoma mucoepidermoide presentan traslocaciones en el gen *MAML2*. En este subtipo también se han encontrado mutaciones en los genes *HER2*, *EGFR* y *KRAS*. En los tumores tipo linfopitelioma, se han encontrado mutaciones en el gen *EGFR* en un 18% de los casos. En los carcinomas tipo NUT, el reordenamiento más común encontrado es la fusión entre los genes *NUT* y *BRD3*(29).

1.2.3. Dianas terapéuticas moleculares en cáncer de pulmón de células no pequeñas

En los últimos 20 años, el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas ha evolucionado desde el tratamiento empírico con agentes citotóxicos a tratamientos dirigidos a dianas moleculares terapéuticas específicas en los adenocarcinomas, y a terapias en desarrollo en carcinoma escamoso de pulmón (Figura 4). El tratamiento básico en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado ha sido la combinación de terapias basadas en platino combinadas con otros agentes citotóxicos. La introducción de algunos anticuerpos monoclonales como bevacizumab (anti-VEGF) o necitumumab (anti-EGFR) supuso una mejora en la supervivencia de los pacientes con carcinoma escamoso de pulmón y cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado. El docetaxel, combinado o no con ramucirumab, ha sido el tratamiento estándar en cáncer de pulmón de células no pequeñas en segunda línea(26).

Estos regímenes citotóxicos han mostrado eficacia principalmente en estadios tempranos de la enfermedad. La resección quirúrgica se considera el tratamiento más efectivo para los estadios I y II y algunos casos de estadio IIIA(42), con una supervivencia a 5 años del 92% en estadio IA1 a 36% en estadio IIIA(43). El tratamiento para tumores localmente avanzados se basa en la combinación de quimioterapia y radioterapia. La alta mortalidad del cáncer de pulmón viene

determinada por su capacidad para producir metástasis, y por el hecho que la mayoría de los pacientes se detectan en estadios avanzados. La única manera de mejorar la supervivencia en estos pacientes es la introducción de tratamientos sistémicos más efectivos(44).

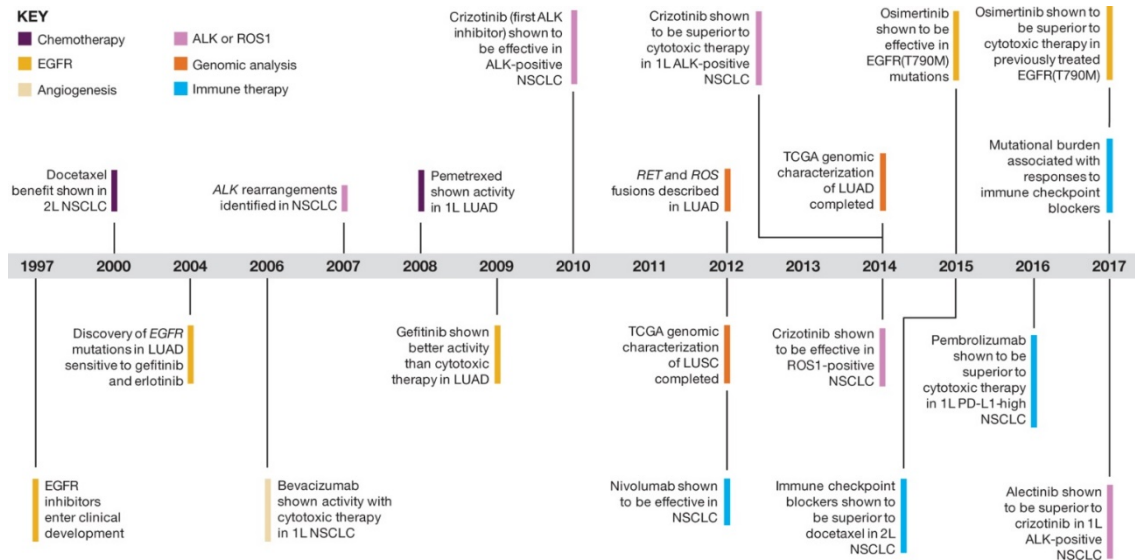


Figura 4. Cronología de los avances en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Adaptado de Herbst et al. (26)

1.2.4. Gen Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

1.2.4.1. Biología del gen EGFR

Uno de los genes más frecuentemente mutados en cáncer de pulmón de células no pequeñas, especialmente en adenocarcinomas, es el gen *EGFR*. La familia de receptores de tirosina quinasa tipo EGFR comprende cuatro receptores diferentes: EGFR (ErbB1/HER1), HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (Erb-4). Estos receptores están formados por cuatro dominios extracelulares, un dominio hidrofóbico transmembrana, un dominio citoplasmático tipo tirosina quinasa y una cola carboxilada. El EGFR, el cual es el primer prototipo descubierto de receptores tipo tirosina quinasa, se activa por la unión de varios factores de crecimiento extracelulares, como son el Epidermal Growth Factor (EGF) y el Transforming Growth Factor (TGF α). La unión de estos ligandos provoca la dimerización y transfosforilación de los residuos de tirosina en la cola carboxilada, lo que provoca la activación de diferentes vías moleculares relacionadas con la proliferación celular, la supervivencia, la invasión y la angiogénesis. Las vías de señalización del EGFR incluyen la vía del PI3K/AKT, la vía de las MAPquinasas, la vía de JAK/STAT y la vía de la fosfolipasa C-proteína quinasa C (PLC-PKC) (Figura 5). Mutaciones alrededor de la zona de unión dependiente de ATP del dominio tirosina quinasa pueden llevar a la activación constitutiva de la proteína EGFR independientemente de la unión a su ligando(26,45).

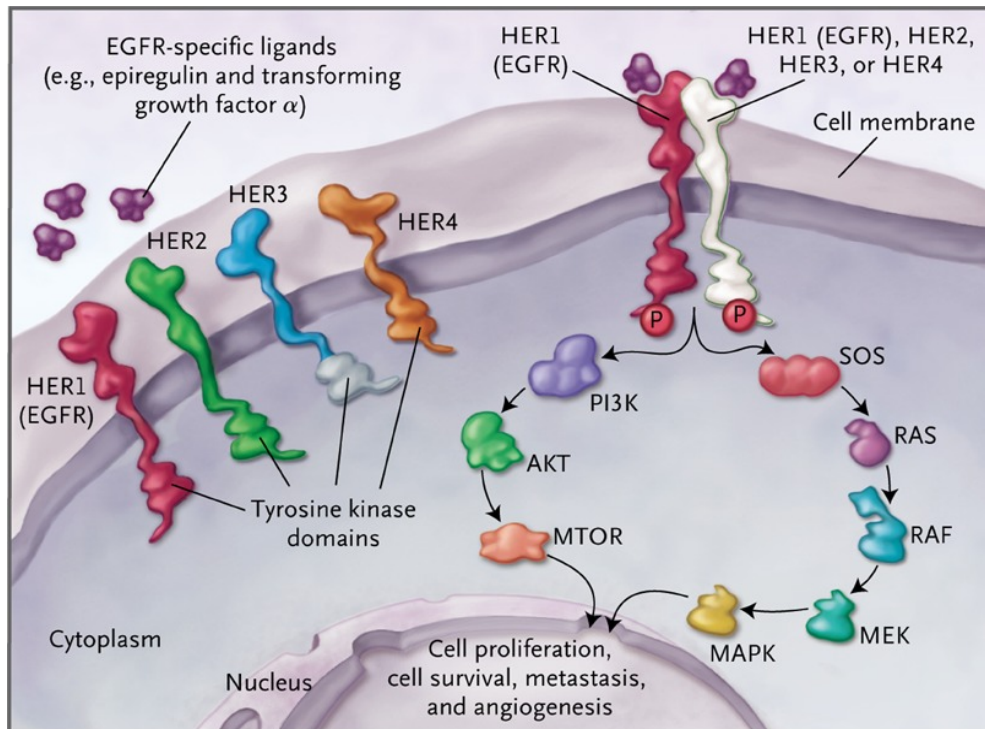


Figura 5. Vías de señalización del gen *EGFR*. Adaptado de Cataldo et al. (46)

1.2.4.2. Alteraciones moleculares en el gen *EGFR* implicadas en el desarrollo del cáncer de pulmón de células no pequeñas

Las mutaciones en el gen *EGFR* son consideradas como mecanismos promotores de tumores. Estas mutaciones rodean el sitio de unión de la quinasa al ATP y provocan un estado activado de la proteína causado por la autofosforilación. Dicha activación promueve la transformación maligna de las células mediante la activación selectiva de las vías de señalización AKT, STAT y de las MAP quinasa. Existen diferentes tipos de mutaciones en el gen *EGFR* que incluyen tanto deleciones como alteraciones puntuales. Las alteraciones más recurrentes son las deleciones en el exón 19, mutaciones puntuales en el exón 21 (p.Leu858Arg y p.Leu861Gln) o en el exón 18 (p.Gly719Ser) e inserciones y/o duplicaciones en el exón 20. Se han descrito otras mutaciones menos comunes localizadas entre los exones 18 y el exón 21(47) (Figura 6).

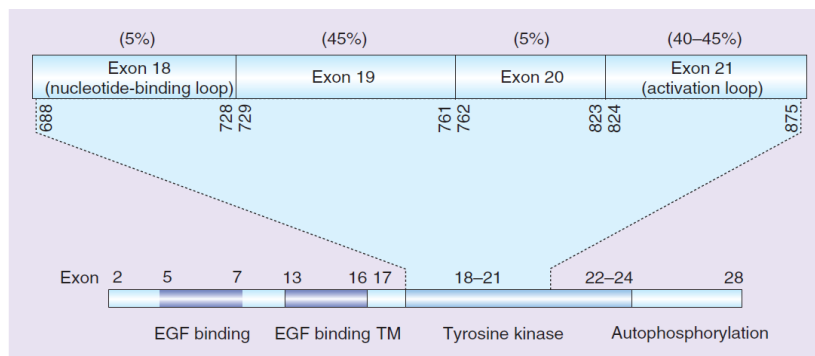


Figura 6. Distribución de las mutaciones en el gen *EGFR* en el dominio tirosina quinasa en cáncer de pulmón de células no pequeñas. Adaptado de Reguart et al. (47)

1.2.4.3. Estructura del receptor de EGFR

El dominio quinasa tiene dos lóbulos, el C y el N, separados por una hendidura de unión de ATP. El lóbulo N está formado principalmente por cadenas β y por la hélice reguladora αC , mientras que el lóbulo C, de mayor tamaño, es de tipo α -hélice y contiene el bucle de activación. El estado inactivo del EGFR se caracteriza por una rotación hacia afuera de la αC -hélice que se estabiliza por un giro helicoidal dentro de la porción N-terminal del bucle de activación. Esta conformación evita la interacción tipo puente salino entre los aminoácidos K745 y E762. Estos aminoácidos se encuentran en el lóbulo N, con E762 posicionado en la hélice αC . Juntos se unen y orientan el ATP formando interacciones con el fosfato α y β del ATP respectivamente. El lóbulo N también contiene el bucle de unión tipo fosfato rico en glicina (*loop P*) mientras que el lóbulo C comprende el motivo DFG, el bucle y la base catalíticos.

Los estudios estructurales han demostrado que la mutación p.L858R y las deleciones del exón 19 desestabilizan la conformación inactiva del receptor, lo que lleva al aumento de la dimerización y actividad del receptor en comparación con el receptor en su estado no mutado. El aminoácido L858 se encuentra dentro del giro helicoidal del bucle de activación y forma interacciones hidrofóbicas cruciales con residuos en el lóbulo N cuando el receptor está en la conformación inactiva. Debido a que la arginina tiene una cadena lateral más grande en comparación con la leucina, la sustitución p.L858R es incompatible con la conformación inactiva y por lo tanto bloquea el dominio quinasa en una conformación constitutivamente activa. En la conformación activa, el p.L858R cargado positivamente está rodeado por un grupo de residuos cargados negativamente que estabilizan aún más esta configuración. También se cree que las mutaciones en el exón 19 desestabilizan la conformación inactiva mediante el acortamiento del bucle $\beta 3$ - αC que evita la rotación de la hélice αC (48) (Figura 7).

El exón 19 del *EGFR* codifica para 5 aminoácidos (E746 al A750), que están situados dentro del dominio quinasa del receptor(49). Un estudio realizado mediante simulación molecular dinámica investigó los efectos estructurales de una de las deleciones más comunes en el exón 19, la deleción de los aminoácidos E746 a A750 (eliminación de los aminoácidos Glutámico-Leucina-Arginina-Glutámico-Alanina, (Δ^{746} ELREA⁷⁵⁰), que lleva a incrementos de la actividad quinasa. Las simulaciones revelaron que esta deleción estabiliza la hélice αC del dominio quinasa, que se encuentra adyacente a la deleción, aumentando la rigidez del loop $\beta 3$ - αC , que acomoda la secuencia ELREA. Como consecuencia, la hélice αC es estabilizada en una conformación que prolongará el tiempo en que el receptor se encuentra en su estado activado. Además, las simulaciones revelaron que el puente salino clave para la actividad EGFR se

encontraba estabilizado y que la interacción entre el EGFR y el ATP estaba favorecida en el EGFR mutado respecto al *wild-type*(50).

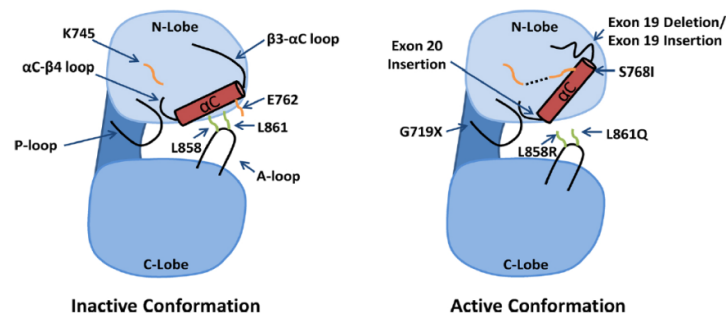


Figura 7. Estructura del dominio quinasa del EGFR en sus conformaciones activas e inactivas. Adaptado de Harrison et al. (48)

1.2.4.4. Relación entre las alteraciones en el gen *EGFR* y características clínico-histopatológicas de los pacientes con cáncer de pulmón

Múltiples estudios han analizado la presencia de alteraciones genéticas en el gen *EGFR* en cohortes de pacientes con cáncer de pulmón. Dichos estudios han puesto de manifiesto la existencia de diferencias en la frecuencia de mutaciones en el gen *EGFR* según el origen geográfico del paciente, el hábito tabáquico, el sexo y el subtipo histológico del cáncer de pulmón. En un metaanálisis que abarcó 456 estudios que incluían 115.815 pacientes se determinó la prevalencia de mutaciones en el gen *EGFR* en función de estas variables. Los pacientes de países asiáticos presentaban una mayor prevalencia de mutaciones en el gen *EGFR* (38.4%), seguida de pacientes de Norte-América y Sudamérica (24.4%) y pacientes de países europeos (14.1%). Los resultados en función de la etnia fueron similares, con un 38.8% de mutaciones en población asiática, un 17.4% en caucásicos, un 17.2% en afroamericanos y un 27.0% en poblaciones mixtas. El estudio demostró que la prevalencia es más alta en mujeres respecto a hombres (43.7% vs. 24.0%) y en no fumadores en comparación a fumadores y exfumadores (49.3% vs. 21.5%). En cuanto a las características histológicas del tumor, la prevalencia de alteraciones en el gen *EGFR* fue más alta en pacientes con adenocarcinomas de pulmón con respecto a los no-adenocarcinomas (38.0% vs. 11.7%). De forma interesante, la prevalencia no fue diferente según el estadio tumoral o el tratamiento quimioterápico(51).

En otro estudio realizado en población europea y población japonesa, se encontraron resultados similares. La prevalencia de alteraciones era mayor en pacientes japoneses en comparación con pacientes europeos (31% vs 12%). En el estudio, las deleciones en el exón 19 (51%) y la mutación p.L858R (38%) fueron las más prevalentes (52). Finalmente, en un estudio realizado en 89 pacientes españoles, la prevalencia de mutaciones en el gen *EGFR* fue del 18.6%(53).

1.2.4.5. Fármacos inhibidores de la tirosina quinasa

A finales de los años 90 se desarrolló la primera generación de inhibidores de la tirosina quinasa representada por los fármacos erlotinib y gefitinib. Se trata de pequeñas moléculas altamente específicas que bloquean de manera competitiva y reversible la unión de ATP en el dominio tirosina quinasa del EGFR, inhibiendo la autofosforilación y bloqueando la cascada de transmisión de señal(46). Ambos compuestos demostraron una mejor respuesta y una mayor progresión libre de enfermedad respecto a la terapia citotóxica convencional en pacientes con mutaciones en el gen *EGFR* no tratados previamente. Tanto erlotinib como gefitinib son compuestos aprobados como tratamiento en primera línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Sin embargo, la mayoría de los pacientes que reciben estos tratamientos desarrollan resistencia, lo que conduce a la progresión de la enfermedad. Se han descrito tres formas principales de resistencia: la aparición de una nueva mutación en el gen *EGFR*, como por ejemplo la mutación p.Thr790Met (p.T790M) en el exón 20; la aparición de nuevas alteraciones que promueven la activación de otras vías de señalización que eviten la inhibición del EGFR o cambios histológicos como la transición a características histológicas de cáncer de pulmón de células pequeñas(54).

La segunda generación de inhibidores de la tirosina quinasa, afatinib y dacomitinib, se desarrollaron como inhibidores irreversibles que además tienen efecto sobre HER2 y HER4 bloqueando la transfosforilación de los residuos de tirosina en la región C-terminal. Afatinib se une covalentemente a la cisteína en la posición 797 del EGFR, mientras que dacomitinib lo hace a la cisteína en el residuo 773, logrando una capacidad de unión mayor a la zona de unión del ATP que los inhibidores de la tirosina quinasa de primera generación. Afatinib ha sido aprobado para el tratamiento no sólo de cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones comunes en el gen *EGFR* sino también para mutaciones poco comunes y para carcinoma escamoso de pulmón en segunda línea después de la quimioterapia. Dacomitinib, sin embargo, sólo cuenta con la aprobación para cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico que contenga una delección en el exón 19 o la mutación p.L858R. Ambos mostraron una mayor supervivencia libre de enfermedad con respecto a gefitinib. Afatinib también mostró una mayor supervivencia global con respecto a terapias basadas en platino, pero solo en pacientes con delecciones en el exón 19 y no en aquellos con la mutación p.L858R. Esto se puede deber a cambios conformacionales en la zona de unión dependiente de ATP y patrones de autofosforilación propios de cada mutación. El mecanismo de resistencia más común a esta segunda generación es la mutación p.T790M, aunque la frecuencia es menor que en los inhibidores de la tirosina quinasa de primera generación(26,54–56).

La mutación de resistencia p.T790M se encuentra presente hasta en el 60% de los cánceres de pulmón de célula no pequeña postratamiento con estos inhibidores de la tirosina quinasa(57). Sin embargo, raramente se encuentra en pacientes no tratados previamente con inhibidores de la tirosina quinasa, y en aquellos casos en los que se detecta la alteración, ésta se encuentra asociada a otra mutación en el gen *EGFR* como la mutación p.L858R o deleciones en el exón 19. El mecanismo de acción de esta mutación de resistencia está relacionado con una mayor afinidad del dominio quinasa por el ATP, en lugar de provocar un obstáculo estérico que impida la unión de inhibidores de la tirosina quinasa de primera y segunda generación, como se creía en un principio(58). Otras mutaciones de resistencia a inhibidores de la tirosina quinasa de primera y segunda generación son amplificaciones en *HER2* o mutaciones en los genes *MET*, *BRAF*, *PIK3CA*, o transformación en cáncer de pulmón de células pequeñas(59).

Los inhibidores de la tirosina quinasa de tercera generación como osimertinib son inhibidores selectivos tanto de la mutación original de sensibilidad como de la de resistencia, uniéndose covalentemente a la cisteína en el codón 797, superando la mayor afinidad del ATP conferida por la mutación de resistencia. Osimertinib demostró la misma capacidad de inhibir la autofosforilación que los inhibidores de la tirosina quinasa de primera generación contra las mutaciones de sensibilidad, pero mayor potencia contra la mutación de resistencia p.T790M. En la práctica clínica, osimertinib ha demostrado una superioridad a la quimioterapia en pacientes con resistencia adquirida a inhibidores de la tirosina quinasa de primera y segunda generación, con una progresión libre de enfermedad mediana de 10.1 meses y una alta actividad contra las metástasis del sistema nervioso central(60).

También se han descrito mecanismos de resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa de tercera generación. Entre el 10-26% de los casos presenta la mutación p.Cys797Ser (p.C797S). La substitución de la cisteína en el codón 797 dentro del sitio de unión del ATP por una serina provoca la pérdida del enlace covalente entre osimertinib y el EGFR mutado. Sin embargo, esta mutación no causa resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa de primera y segunda generación. En el caso poco probable de que las mutaciones p.T790M y C797S se encontraran en trans, se podrían combinar inhibidores de la tirosina quinasa de primera o segunda generación con uno de tercera generación como diana de cada uno de los alelos. La presencia de las tres mutaciones juntas en cis (sensibilidad + p.T790M + p.C797S) causa resistencia a las tres generaciones de inhibidores de la tirosina quinasa, tanto juntos como combinados. No existen actualmente tratamientos para pacientes triples mutados(61–63).

1.3. Estrategias diagnósticas en cáncer de pulmón

1.3.1. Diagnóstico histológico del cáncer de pulmón

El diagnóstico del cáncer de pulmón comienza de forma habitual con una biopsia mediante aguja gruesa o con una muestra citológica obtenida mediante aspiración por aguja fina. La mayoría de los pacientes presentan enfermedad avanzada o metastásica en el momento del diagnóstico, por lo que la resección quirúrgica del tumor para el diagnóstico morfológico no es una opción. Surgen entonces otras opciones para obtener muestra tumoral, por ejemplo, mediante técnicas endoscópicas, como son la aspiración transbronquial con aguja fina, guiada o no mediante ultrasonido, o técnicas transtorácicas guiadas por TC o ultrasonido. La muestra obtenida es teñida con una tinción de hematoxilina-eosina y evaluada al microscopio para tratar de identificar cambios morfológicos que orienten al diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas, y tratar de subclasificarla en alguno de los subtipos mayores como adenocarcinoma, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de pulmón de células grandes o alguno de los subtipos especiales. Aunque la mayoría de los tumores pueden clasificarse mediante la tinción con hematoxilina-eosina, en tumores con un grado de diferenciación pobre o en piezas con abundantes zonas de necrosis o con escasas células tumorales se hace necesario el estudio del tumor mediante inmunohistoquímica para una correcta clasificación del mismo(64,65).

Los marcadores inmunohistoquímicos más utilizados en la práctica clínica para la clasificación del cáncer de pulmón de células no pequeñas son el Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1), Napsin A, CK5/6, P63 y P40. TTF-1 y Napsin A son diagnósticos de adenocarcinoma, mientras que CK5/6, P63 y P40 lo son de carcinoma escamoso de pulmón. Diferentes combinaciones de estos marcadores mejoran la eficacia diagnóstica de los mismos en solitario, con valores de sensibilidad del 86% y del 100%, y de especificidad del 100% y 97.1% para adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón respectivamente(65) (Figura 8).

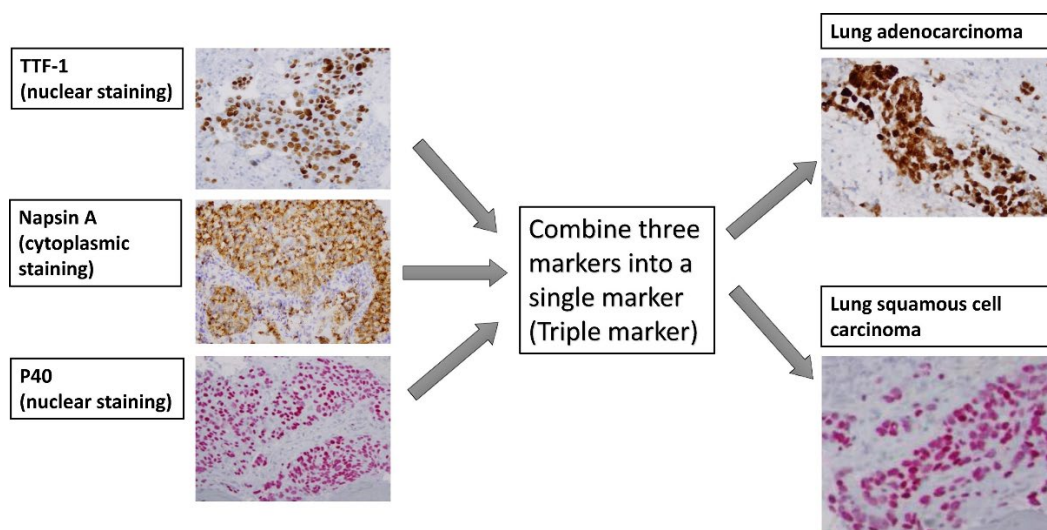


Figura 8. Combinación de diferentes marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Adaptado de Osmani et al. (65)

El diagnóstico inmunohistoquímico de mutaciones en el gen *EGFR* es posible, ya que se han desarrollado anticuerpos específicos contra la mutación p.L858R y para algunas deleciones del exón 19, como la E746_A750. Estos anticuerpos presentan buenos valores de sensibilidad y especificidad para estas mutaciones. Sin embargo, presentan una baja sensibilidad para otras deleciones del exón 19, no detectan otras mutaciones menos comunes como las del codón 719, y presentan un elevado número de falsos positivos en inserciones del exón 20. Debido a este rendimiento subóptimo, las guías clínicas no recomiendan el uso de la inmunohistoquímica para la detección de mutaciones en el gen *EGFR*(66).

Recientemente, la Food and Drug Administration (FDA) de los EEUU aprobó un test inmunohistoquímico para detectar reordenamientos de *ALK* en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, utilizando el anticuerpo clonal de DF53. Este método presenta mejor sensibilidad y especificidad que la técnica convencional de hibridación fluorescente in situ (fluorescent in situ hybridization, FISH). También existe un método inmunohistoquímico coste-eficiente para el cribado de reordenamientos de *ROS1* basado el anticuerpo monoclonal específico de ratón D4D6. Los casos positivos por este método deben ser confirmados por FISH(67).

La expresión del ligando 1 de muerte programada (programmed-death ligand 1, PD-L1) dentro del tumor inactiva a las células T que reconocen antígenos específicos del tumor, permitiendo al mismo progresar y metastatizar(68). La aprobación de un anticuerpo monoclonal, pembrolizumab, como tratamiento de primera línea en pacientes con expresión de PD-L1 ha convertido al test de expresión de PD-L1 mediante inmunohistoquímica en un test obligatorio al diagnóstico en todos los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado para determinar su acceso a un tratamiento de inmunoterapia(69).

1.3.2. Marcadores tumorales

Actualmente, el uso de marcadores tumorales en el manejo clínico de pacientes con cáncer de pulmón no está recomendado por las guías internacionales (69,70), aunque su uso ha ido ganando influencia en las decisiones diagnósticas, de inicio de tratamiento y seguimiento debido a que se trata de test no invasivos, con buena repetibilidad, sencillez y rapidez(71). El método analítico para la detección de estos marcadores tumorales es la quimioluminiscencia. Existen numerosos ensayos comerciales automatizados en el mercado, que han sido validados analíticamente y que permiten su determinación de manera rápida y fiable.

Los principales marcadores tumorales utilizados en cáncer de pulmón son(72):

- El CEA (antígeno carcinoembrionario), una glicoproteína de elevado peso molecular y función desconocida que puede detectarse en numerosos tumores epiteliales.
- El CYFRA 21-1, constituido por dos anticuerpos monoclonales frente a la citoqueratina 19.
- El SCC (antígeno asociado a los carcinomas escamosos), una glicoproteína de la familia de las serinproteasas que puede detectarse en neoplasias escamosas de diverso origen.
- El CA 15.3, un antígeno mucínico no específico de neoplasia de pulmón.
- El antígeno carbohidrato CA 125, una glicoproteína de elevado peso molecular presente en diversas neoplasias y causa de numerosos falsos positivos.
- La NSE (enolasa neuroespecífica), una enzima glicolítica principalmente sintetizada en neuronas y tejido neuroendocrino.
- El Pro-GRP (propéptido asociado a la gastrina), asociado a tumores neuroendocrinos

La utilidad individual de estos marcadores tumorales para el diagnóstico histológico de cáncer de pulmón ha sido demostrada. Diferentes marcadores tumorales están relacionados con diferentes subtipos histológicos. Por ejemplo, el CEA y el CA 125 se encuentran significativamente más elevados en adenocarcinomas, mientras que el CYFRA 21.1 y el SCC en carcinoma escamoso de pulmón y el Pro-GRP y la NSE en cáncer de pulmón de células pequeñas. La combinación de algunos de estos marcadores permite la discriminación entre cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas con una alta sensibilidad y especificidad(71,73).

El grupo del Dr. Molina (Hospital Clínic de Barcelona) determinó la utilidad de la combinación de diferentes marcadores tumorales (CEA, CA 15.3, CYFRA 21.1, SCC, Pro-GRP y NSE) en el diagnóstico del cáncer de pulmón en un estudio con 3.144 pacientes. El estudio demostró que la combinación de dos o más marcadores tumorales por encima del valor de referencia, presentaba mejor sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo que cada marcador de manera individual. Además, la combinación de los marcadores tumorales con datos clínicos mejoraba la capacidad diagnóstica de los datos clínicos y de los marcadores tumorales ambos por separado. En este trabajo también se observó que la concentración de los marcadores tumorales aumenta en proporción al estadio tumoral tanto en cáncer de pulmón de células no pequeñas como en cáncer de pulmón de células pequeñas, y que los marcadores Pro-GRP y NSE son los más adecuados para discriminar entre cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas(74). Este mismo grupo,

en un trabajo no publicado, validó la combinación de estos 6 marcadores en una cohorte similar y añadió tres marcadores al panel (CA72.4, CA 19.9 y CA125), que mejoraban ligeramente la sensibilidad a costa de perder especificidad.

1.3.3. Diagnóstico por la imagen del cáncer de pulmón

La radiografía de tórax (Figura 9a) es la prueba de imagen más ampliamente utilizada para el diagnóstico de enfermedades pulmonares. Es una técnica simple y de bajo coste, que proporciona gran cantidad de información y tiene una amplia disponibilidad. En cáncer de pulmón, esta técnica puede utilizarse para caracterizar determinadas lesiones como benignas o malignas a partir de calcular la velocidad de crecimiento de dichas lesiones. Para determinar el estadio tumoral, la radiografía de tórax puede determinar el tamaño de la lesión, la presencia de derrame pleural o de diseminación extrapulmonar. Sin embargo, no puede detectar la invasión de la caja torácica, el diafragma o el mediastino ni la afectación ganglionar(75). La radiografía de tórax también es útil en seguimiento postoperatorio, como una base para comparar con posteriores radiografías(76).

La TC (Figura 9b) se basa en un procedimiento computarizado de imágenes en el que se proyecta un haz estrecho de rayos X que gira rápidamente alrededor del cuerpo del paciente, produciendo señales que son procesadas y que permiten crear una imagen tridimensional de las estructuras a las que se dirige. La TC es la mejor técnica para evaluar el tamaño del tumor, el cual es uno de los factores pronósticos más importantes en el cáncer de pulmón(76). Todos los pacientes con sospecha clínica y radiológica de cáncer de pulmón deben realizarse una TC con contraste del pecho y del abdomen superior que incluya el hígado, riñones y glándulas suprarrenales. La TC permitirá delinear la forma y el tamaño de la lesión, su localización y su relación con estructuras vecinas, como los vasos sanguíneos, el corazón, la caja torácica y el esófago. La TC también es capaz de detectar las metástasis y nódulos pleurales, además de ser capaz de evaluar el mediastino, crucial para un correcto estadiaje(76,77).

La resonancia magnética (RM) juega un rol secundario en el diagnóstico y estadiaje del cáncer de pulmón. Esta técnica presenta mejores resultados en la evaluación de la invasión de la pared parietal y de la caja torácica que la TC, y su principal utilidad es la búsqueda de metástasis en el sistema nervioso central (SNC), ya que la RM con gadolinio presenta una mayor sensibilidad que la TC con contraste yodado y es capaz de detectar más lesiones y más pequeñas(69,77). Una variante de la RM, la resonancia magnética de difusión (RMD), puede proporcionar información de la celularidad tumoral y de la integridad de las membranas celulares, ya que es una técnica sensible a la movilidad de las moléculas de agua, que está restringida en tejidos con alta

densidad celular y numerosas membranas intactas(75). La RMD tiene potencial para diferenciar nódulos linfáticos benignos de malignos, aunque su utilidad no está del todo clara al no presentar mejores características diagnósticas respecto a otros métodos(76).

En la práctica clínica, la evaluación de la respuesta al tratamiento se lleva a cabo mediante la medida de lesiones las lesiones diana obtenidas por TC o RM siguiendo el criterio del Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST) v1.1(78).

La tomografía de emisión de positrones (PET) (Figura 9c) es una técnica de imagen sensible y específica que permite la reproducción *in vivo* de vías metabólicas en tejido humano. Para ello, se utilizan radioisótopos como el ¹⁸F-Fluorodeoxiglucosa (FDG), un análogo de la glucosa en el que un grupo hidroxilo en la posición C2 de la glucosa es reemplazado por un isótopo del flúor emisor de positrones (¹⁸F). El FDG es metabolizado de la misma manera que la glucosa, pero una vez es fosforilado, queda atrapado en el interior de la célula. La distribución de los emisores de positrones en la célula se mide mediante una cámara PET(75).

La combinación de la TC y del FDG-PET (FDG-PET/TC) resulta en una técnica que proporciona la información anatómica de la TC y metabólica del PET y que permite una mejor caracterización de las lesiones que ambas técnicas por separado, por ejemplo, la evaluación de nódulos solitarios en el pulmón, la afectación linfática intratorácica o las metástasis extratorácicas, lo que contribuye a un mejor estadiaje de la neoplasia de pulmón. Se considera al FDG-PET/CT como la mejor técnica para el estadiaje inicial del cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, comparado con el resto de técnicas disponibles, excepto para la búsqueda de metástasis cerebrales(69,76).

El FDG-PET/TC proporciona parámetros relativos a la actividad metabólica y al volumen tumoral. El Maximum Standardized Uptake (SUVmax) representa el grado de captación de glucosa. La Total Lesion Glycolysis (TLG) incorpora tanto la actividad metabólica medida como el nivel medio de captación de glucosa (SUVmean) y datos volumétricos como el Metabolic Tumor Volume (MTV). Tanto el TLG como el MTV han ganado importancia en los últimos años como marcadores pronósticos de supervivencia en muchos tumores. Estos parámetros volumétricos representan mejor la carga tumoral que la TC, ya que tienen en cuenta la actividad metabólica de la enfermedad(79). El seguimiento de la respuesta al tratamiento mediante PET no está recomendada debido a su alta sensibilidad pero baja especificidad(69).

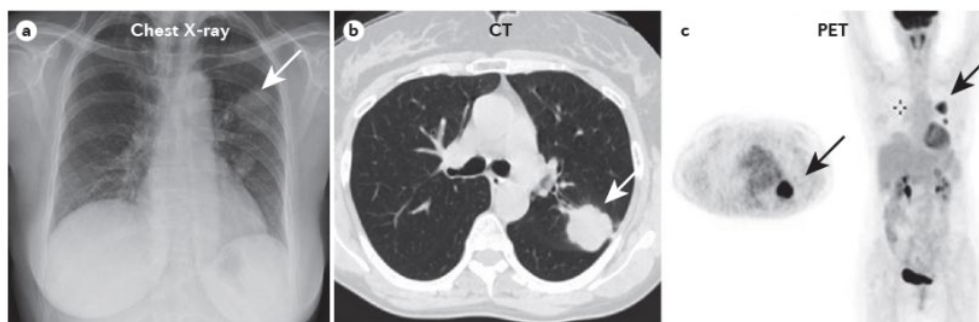


Figura 9. Diferentes técnicas de imagen en el diagnóstico de cáncer de pulmón. a) Radiografía de tórax; b) TC; c) PET. Adaptado de Gridelli et al. (77)

1.3.4. Diagnóstico molecular del cáncer de pulmón en tejido

A lo largo de los últimos años se han identificado alteraciones genéticas adquiridas en el cáncer de pulmón que son biomarcadores predictivos y excelentes dianas terapéuticas. Los ejemplos más representativos son las mutaciones en los genes *KRAS* y *EGFR*. Estas mutaciones son más comunes en pacientes que nunca han fumado o en aquellos que han fumado muy poco (<100 cigarrillos en la vida), o en exfumadores de más de diez años o fumadores con un consumo bajo de tabaco (<15 paquetes/año). La gran mayoría de cánceres de pulmón dependientes de oncogén son clasificados histopatológicamente como adenocarcinomas de pulmón. Las guías clínicas internacionales recomiendan que en todos los pacientes con un diagnóstico posible, probable o definitivo de adenocarcinoma avanzado se analice la presencia de alteraciones oncogénicas. El diagnóstico molecular no está recomendado en pacientes con carcinoma escamoso de pulmón, excepto en casos excepcionales como por ejemplo cuando el carcinoma escamoso es diagnosticado en pacientes no fumadores, exfumadores de largo período o fumadores con un bajo consumo de tabaco(66,69,80,81).

Existe un alto consenso internacional con respecto al análisis molecular del cáncer de pulmón de células no pequeñas. La guía de la European Society for Molecular Oncology (ESMO), y otras guías internacionales como la del National Comprehensive Cancer Network (NCCN), College of American Pathologists (CAP)/International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)/Association for Molecular Pathology (AMP), American Society of Clinical Oncology (ASCO) y las guías Pan-Asiáticas recomiendan el análisis de mutaciones en los genes *EGFR* y *BRAF*, así como los reordenamientos en *ALK*, *ROS1* y *NTRK* y la determinación de la expresión de *PD-L1*, con pequeñas discrepancias en sus recomendaciones (Figura 10a). Sin embargo, recomendaciones sobre el diagnóstico molecular de marcadores emergentes (panel secundario) como *KRAS*, *MET*, *RET*, *ERBB2/HER2* y *TMB* solo están incluidas en las guías NCCN, CAP/IASLC/AMP y ASCO (Figura 10b)(82).

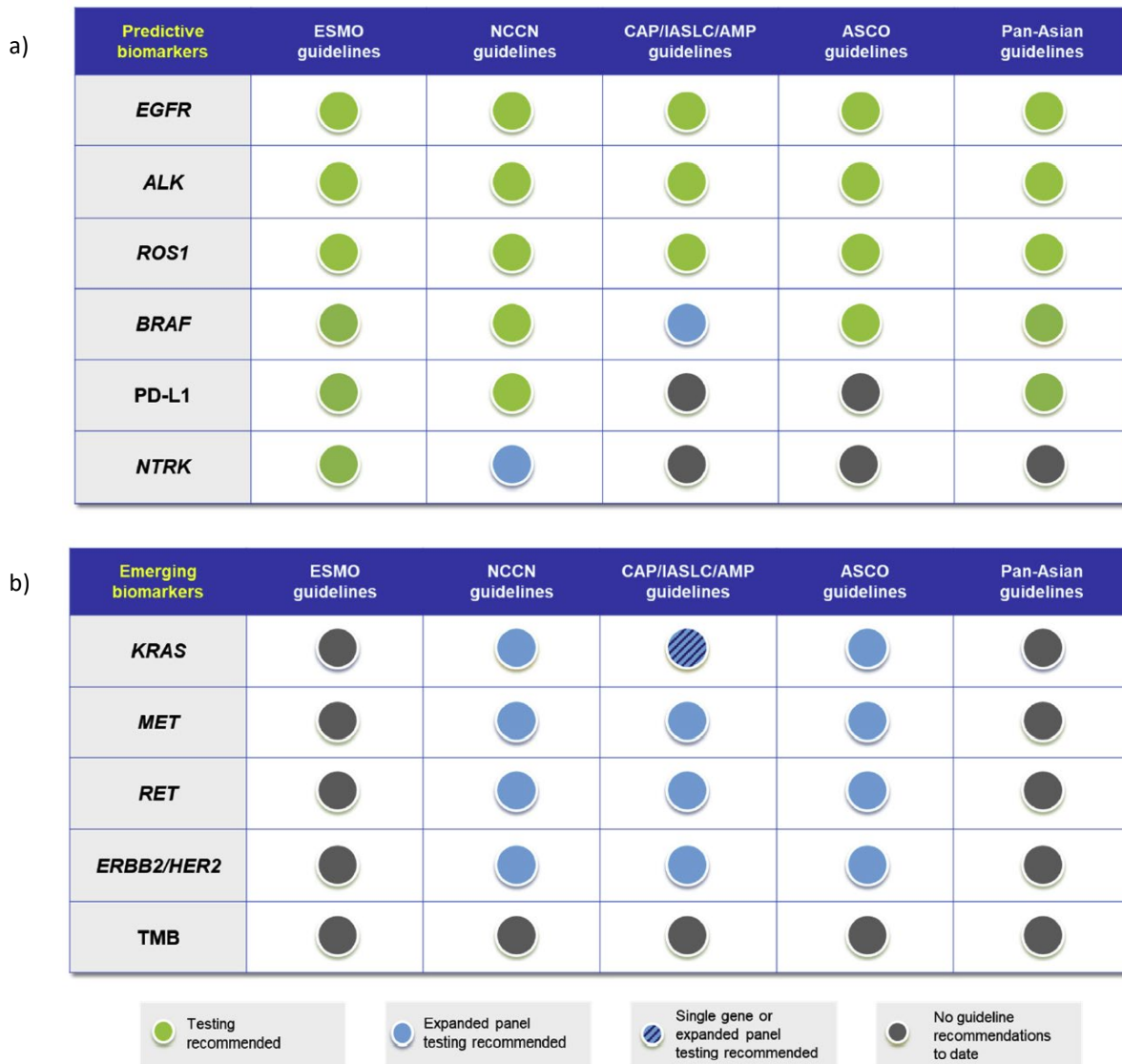


Figura 10. Recomendaciones sobre diagnóstico de biomarcadores moleculares de diferentes sociedades. a) Panel principal b) Panel secundario. Adaptado de Kerr et al. (82)

En cuanto al análisis de mutaciones en el gen *EGFR*, la guía europea (ESMO) establece que los métodos de análisis molecular utilizados deben cubrir las mutaciones más importantes del gen como las deleciones en el exón 19 y la mutación p.L858R. También recomienda que estos métodos cubran el resto de las mutaciones contenidas en los exones 18 a 21. Para esta guía, la necesidad de alcanzar un diagnóstico histológico y molecular apropiado y preciso requiere la obtención de muestra de tejido, ya que la mayoría de las decisiones terapéuticas se basarán en la información proporcionada por la muestra obtenida en el diagnóstico. Para el diagnóstico de mutaciones en los genes *EGFR*, *KRAS* y *ALK* también se aceptan muestras citológicas obtenidas mediante aspiración con aguja fina guiada por ecografía endoscópica(69).

La guía CAP/IASLC/AMP recomienda el análisis universal de las mutaciones oncogénicas en los exones 18 al 21 del gen *EGFR* con una prevalencia de al menos un 1% en pacientes con cáncer de pulmón avanzado con componente adenocarcinoma. Aceptan como métodos de detección aquellos con una adecuada sensibilidad analítica y un tiempo de respuesta como máximo de diez días. El uso de la inmunohistoquímica no se recomienda para el análisis de mutaciones en el gen *EGFR*(66).

Respecto a las técnicas utilizadas para la detección de las dianas moleculares incluidas en el panel principal de las principales guías clínicas, estas recomiendan, siempre que sea posible, el uso de paneles genéticos mediante secuenciación de nueva generación (next generation sequencing, NGS). En los casos en los que no se dispone de plataformas de NGS, las mutaciones en los genes *EGFR* y *BRAF* pueden ser determinadas mediante test tipo reacción en cadena de la polimerasa alelo específica (AS-PCR). Los análisis de los reordenamientos de *ALK*, *ROS1* y *NTKR* se deben realizar mediante procedimientos inmunohistoquímicos y/o FISH, y los análisis de PD-L1 mediante inmunohistoquímica(83). Además de estas técnicas, las guías recomiendan la utilización de la NGS en determinadas circunstancias como la confirmación de reordenamientos, la detección de mutaciones poco comunes o con una baja carga mutacional. Todas las técnicas que se utilicen en la práctica clínica deben estar sujetas a la participación en programas externos de garantía de la calidad(66,69,80).

En cada laboratorio clínico, los algoritmos diagnósticos y la elección de las técnicas de diagnóstico molecular dependen principalmente del acceso a las diferentes técnicas moleculares, del tiempo de respuesta requerido, de los recursos económicos disponibles y de la existencia o no de fármacos contra las dianas moleculares a analizar.

La PCR a tiempo real (RT-PCR) representa una alternativa rápida para la amplificación de ácidos nucleicos. Sin embargo, presenta valores bajos de sensibilidad, por lo que se han desarrollado algunas variaciones para mejorar estas características, como la AS-PCR. Las técnicas tipo RT-PCR no requieren una gran infraestructura y permiten caracterizar molecularmente una muestra a bajo coste y con un rápido tiempo de respuesta. Existen numerosos kits comerciales disponibles en el mercado, que deben cubrir al menos las mutaciones más prevalentes en el gen para el que han sido diseñados, por ejemplo, deleciones en el exón 19 y la mutación p.L858R en el exón 21 para el gen *EGFR*, o la mutación p.V600E en el gen *BRAF*. El Cobas® *EGFR* Test Mutation v1 fue aprobado en 2013 por la FDA para la detección de la mutación p.L858R y deleciones en el exón 19 en el gen *EGFR* en muestras de tejido. En el año 2015 se aprobó la versión 2 del test, que incluía a la mutación de resistencia p.T790M además de otras mutaciones en el exón 18,

inserciones y sustituciones en el exón 20, y la mutación p.L861Q en el exón 21. El Cobas Test está implementado en la práctica clínica y presenta valores altos de eficacia diagnóstica respecto a la secuenciación Sanger(84). También existe una versión del test para la mutación p.V600E del gen *BRAF*, el Cobas® BRAF V600 Mutation Test, que presenta valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica altos para diferentes neoplasias(85–87). El principal problema de estas técnicas es que proporcionan información limitada a las mutaciones incluidas en los paneles de detección, las cuales son las alteraciones más recurrentes, por lo que otras alteraciones menos frecuentes no son detectadas. Algunos laboratorios complementan estas técnicas de alta resolución de fusión (high resolution melting, HRM) y secuenciación tipo Sanger o pirosecuenciación para detectar estas mutaciones menos prevalentes. Las técnicas tipo PCR no son válidas para la detección de reordenamientos genéticos, aunque se han introducido mejoras como la comparación del nivel de expresión de los extremos 5' y 3' de la quinasa analizada. El mayor inconveniente de las técnicas tipo PCR hoy en día es la falta de ensayos para la detección de la expresión de PD-L1(83).

A diferencia de las técnicas basadas en RT-PCR, la NGS permite el análisis de múltiples genes clínicamente relevantes en un solo análisis. La NGS permite analizar de forma paralela de unos pocos a cientos de regiones exónicas, o incluso intrónicas (paneles personalizados). Esta estrategia también permite la secuenciación del genoma o exoma completo y ARN transcriptómico. Actualmente se puede analizar mediante NGS tanto ADN o ARN de tejido como de ADN libre circulante (cell-free DNA, cfDNA). La introducción de la NGS en la rutina clínica permite incrementar la eficiencia diagnóstica y analizar en un único test las alteraciones en genes de interés, evaluar cambios en el número de copias y, en el caso de utilizar ARN, estudiar los reordenamientos en los genes *ALK*, *ROS1* o *NTRK*. En general, las técnicas NGS cubren las necesidades en el análisis molecular de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, excepto para el análisis de expresión de PD-L1, que no es practicable por esta técnica(88).

Algunos de los inconvenientes que presenta la NGS a día de hoy son su alto coste y el equipamiento que requiere, su elevado tiempo de respuesta comparado con otras técnicas como las tipo PCR, y la complejidad de interpretación de los resultados y el manejo de los datos generados(82,83).

1.4. ADN libre circulante (cfDNA)

1.4.1. Origen del cfDNA

El cfDNA se refiere a cualquier molécula de ADN extracelular (ADN nuclear y ADN mitocondrial) que se encuentra en fluidos biológicos originario de cualquier tipo de célula(89). El cfDNA se encuentra presente en la sangre y en otros fluidos como por ejemplo la saliva, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido pleural. La presencia de ácidos nucleicos en sangre fue descrita por primera vez en 1948(90). El análisis de metilación del cfDNA ha demostrado que en individuos sanos, la mayoría del mismo es liberado desde las células hematopoyéticas (91,92). En pacientes con cáncer, el cfDNA proviene de diferentes fuentes como son las células cancerígenas, las células del microambiente tumoral y las células no cancerosas procedentes de otras regiones del cuerpo. Los mecanismos de liberación principales del cfDNA son la apoptosis, la necrosis y la secreción activa, aunque otras formas de muerte celular pueden contribuir a su liberación(93). La liberación de cfDNA a la circulación está influenciada por factores biológicos y ambientales como la edad, el género, la etnia, el índice de masa corporal, el consumo de tabaco, la actividad física, la medicación, infecciones, menstruación y embarazo(94,95).

Respecto a las características biológicas del cfDNA, su vida media en la circulación sanguínea se encuentra entre 16 minutos y 2.5 horas, y es aclarado de la circulación mediante la acción de nucleasas y por excreción renal hacia la orina. La captación del cfDNA en el hígado y en el bazo y su posterior procesamiento mediante macrófagos también puede contribuir a su aclaramiento(96). El aclaramiento mediante estos métodos puede ser influenciado por la asociación del cfDNA con complejos proteicos, vesículas extracelulares o la unión de fragmentos de cfDNA con proteínas séricas como la albúmina, la transferrina, la fibrina, el fibrinógeno, protrombina, globulinas, proteína C reactiva, HDL, Ago2 y SAA(94). La unión, disociación e internalización del cfDNA por las células, dependiente del pH, la temperatura y la presencia de sustancias como heparina, también condicionan la presencia del cfDNA en sangre.

1.4.2. Concentración y patrón de fragmentos del cfDNA

La concentración de cfDNA en plasma en individuos sanos se encuentra entre 1-10 ng/mL. Se han descrito incrementos de la concentración de cfDNA en pacientes con cáncer, pero también en otras situaciones como en pacientes con traumatismos, infartos cerebrales, durante el ejercicio físico, pacientes trasplantados e infecciones(96). La concentración de cfDNA se encuentra significativamente elevada en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas con respecto a pacientes con enfermedades pulmonares no neoplásicas(97) y a controles sanos(98). Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre la concentración de

cfDNA y los diferentes estadios tumorales no metastásicos, el subtipo histológico(97) o las características del tumor (tamaño, grado, estadio)(99).

A pesar de que existen diferencias en cuanto a la concentración del cfDNA entre individuos sanos y pacientes oncológicos, su papel como biomarcador para el diagnóstico de cáncer de pulmón no presenta valores de sensibilidad y especificidad suficientes como para ser utilizado como único marcador(100). Sin embargo, la concentración de cfDNA si que tiene un alto valor pronóstico. Se ha descrito que la concentración de cfDNA en el momento del diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas es un factor pronóstico de menor supervivencia, y que la mediana de dicha concentración era más alta en pacientes que fallecieron respecto a los que sobrevivieron(101). También se ha demostrado la utilidad del cfDNA como marcador de progresión de la enfermedad(102) y la monitorización de su cinética le permite ser considerado como un posible marcador de respuesta al tratamiento(103).

Es importante tener en cuenta los factores preanalíticos a la hora de realizar la extracción del cfDNA. Existen varios factores que provocan cambios significativos en la cantidad de cfDNA presente en una muestra de suero o plasma debido a un enriquecimiento de ADN genómico causado por la lisis de leucocitos o células hematopoyéticas después de la obtención de la muestra. Los factores preanalíticos más importantes son la elección de la matriz (suero o plasma), el tipo de tubo y sus anticoagulantes, las condiciones de centrifugación de la muestra, la temperatura de conservación y el proceso del descongelado de la muestra, el propio proceso de extracción del cfDNA, su almacenamiento y el método de cuantificación(104).

El cfDNA de una muestra de plasma presenta una longitud variable. Dicha longitud se asocia a los procesos de liberación del mismo. La mayoría del cfDNA tiene un tamaño modal de 166 pares de bases (pb) y se encuentra asociado a mecanismos de apoptosis celular. Esta longitud corresponde a 147 pb de ADN, que se encuentra enrollado alrededor de un nucleosoma más el tramo de ADN en la histona H1, que une dos núcleos de nucleosoma. Además, dependiendo de la acción de las nucleasas, la apoptosis puede producir fragmentos de mayor longitud correspondiente al ADN que se encuentra empaquetado en di, tri o polinucleosomas. Se ha observado que el tamaño del ADN libre circulante tumoral (ctDNA) es más corto que el cfDNA de origen no tumoral. A diferencia de la apoptosis, los fragmentos de más de 10000 pb se relacionan con procesos de necrosis celular. Otras formas de muerte celular como la piroptosis, la autofagia, la fagocitosis, eventos mitóticos y la NETosis también son una fuente de cfDNA, aunque las características estructurales del cfDNA derivado de estos mecanismos no ha sido estudiado en profundidad(105).

El ADN mitocondrial también puede encontrarse circulando en sangre, asociado o no con fragmentos de la membrana interna y externa mitocondrial. Su rango de tamaño se encuentra entre 40-300 pb, lo que puede ser debido a la ausencia de unión con histonas, que provoca su exposición a enzimas de digestión(106).

También existe una fracción de cfDNA liberada por secreción activa y no asociado a procesos apoptóticos ni necróticos cuyo tamaño se encuentra entre 1000-3000 pb. Aunque los mecanismos exactos de liberación del cfDNA mediante secreción activa son desconocidos, se cree que puede ser una consecuencia de la inestabilidad genómica. Recientemente, mediante la secuenciación de 26 librerías de NGS de tres donantes de sangre y de controles negativos se ha demostrado la presencia de ADN extracromosómico circular en sangre, con un tamaño entre 30 y 20000 pb(107). Otra forma de secreción regulada de cfDNA son los fragmentos de ADN relacionados con partículas como los exosomas, que contienen fragmentos entre 150 y 6000 pb(105)(Figura 11).

Hasta la fecha, la relevancia clínica del patrón de fragmentación del cfDNA en pacientes con cáncer ha sido poco explorada. A pesar de ello, estudios en pacientes con cáncer de próstata, cáncer de mama o cáncer pancreático avanzado sugieren que el patrón de fragmentos del cfDNA puede tener un papel diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer(108,109). La integridad del cfDNA, calculada como el ratio entre fragmentos largos y cortos de cfDNA, es más alta en pacientes con enfermedades pulmonares no neoplásicas como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y en sujetos sanos que en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas(110).

1.5. ADN tumoral circulante (ctDNA)

El ADN libre circulante tumoral (ctDNA) corresponde a la fracción de cfDNA procedente de las células tumorales(111) y que presenta las mutaciones, los reordenamientos cromosómicos, la variación en el número de copias y la metilación del ADN específicas del tumor(112). El ctDNA deriva o bien de las células tumorales circulantes (CTCs) o de las células localizadas en el lecho tumoral(113). Fue descrito por primera vez en 1994, cuando se detectaron mutaciones en el gen *KRAS* en el plasma de pacientes con cáncer de páncreas. Estas mutaciones eran idénticas a las identificadas en el tumor del paciente, por lo que se confirmaba el origen tumoral del ctDNA(114). Los fragmentos de ctDNA encontrados en plasma mimetizan el estado del tumor, su evolución y las alteraciones genómicas presentes en el tumor primario o metastásico(94).

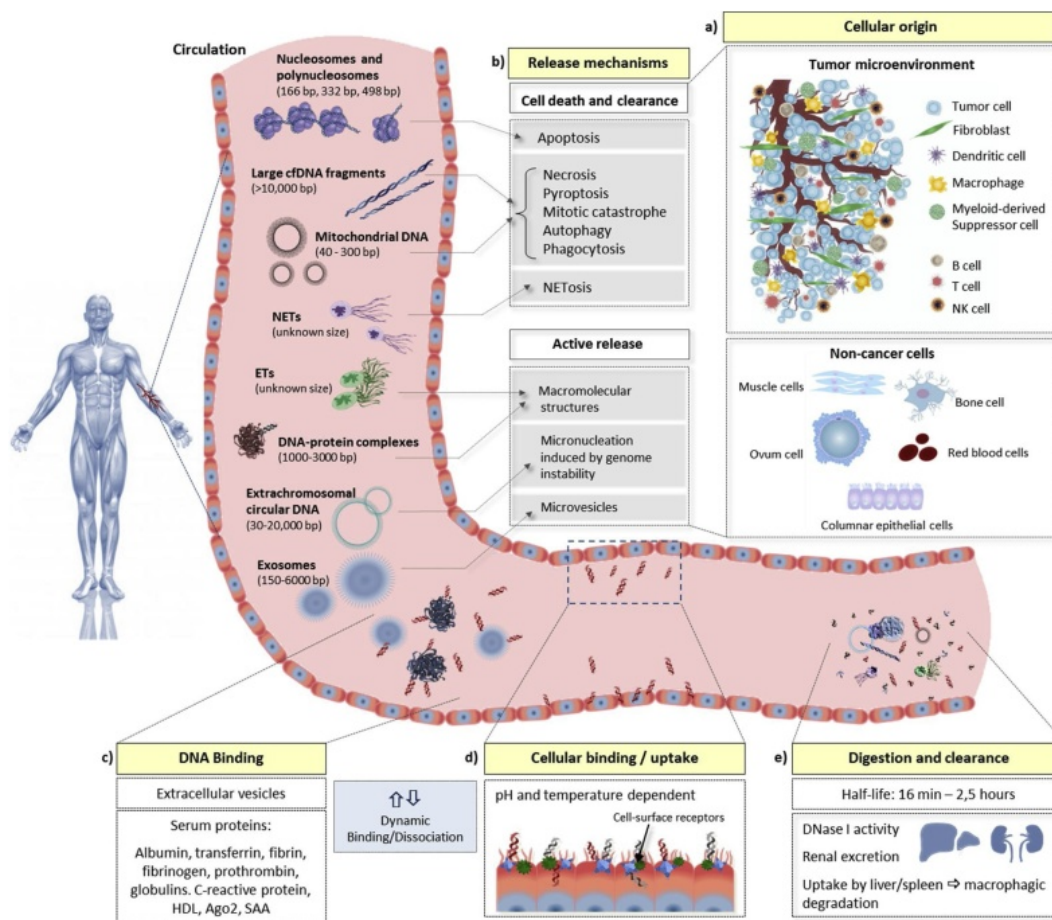


Figura 11. Características del cfDNA. a) Origen celular del cfDNA. b) Mecanismos de liberación del cfDNA. c) Unión del cfDNA a vesículas extracelulares y proteínas. d) Adhesión e internalización celular del cfDNA dependiente de pH y temperatura. e) Digestión y aclaramiento del cfDNA. Adaptado de Bronkhorst et al. (105)

Las moléculas de ctDNA están más fragmentadas que las moléculas de cfDNA no mutado, observándose en modelos animales un tamaño entre 134 y 144 pb(96), y entre 90-150 pb en pacientes con diferentes neoplasias(115). Esta diferencia con respecto al cfDNA puede ser causada por factores biológicos como son las diferencias en la envoltura del nucleosoma o al modo de acción de las nucleasas entre diferentes tipos de tejidos. También factores técnicos, como diferencias en la recuperación de tamaño de cfDNA con diferentes métodos de extracción, o sesgos introducidos en los métodos de preparación de librerías de ADN monocatenario podrían explicar esta diferencia. De forma similar a lo observado en el cfDNA, la liberación a la circulación de fragmentos más grandes de ctDNA por parte de las células tumorales se relaciona con procesos necróticos y procesos de secreción activa(105,112). Las células necróticas no liberan moléculas ADN a la circulación, sino que son los macrófagos que limpian el material muerto, incluyendo ADN, los que lo digieren en fragmentos más pequeños que liberan en el torrente sanguíneo(116). Se ha descrito una correlación entre la extensión de la necrosis y cantidad de ctDNA en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, además de con un mayor índice de proliferación Ki67 y captación de FDG en el PET(117).

La vida media del ctDNA se ha estimado en 114 minutos(118), lo que podría tener importantes implicaciones en el diagnóstico del cáncer, ya que una vida media corta lo haría un marcador ideal al estar su desaparición y reaparición relacionadas con la respuesta al tratamiento y la recurrencia de la enfermedad(113).

A diferencia del cfDNA, varios factores impactan en la presencia y cantidad de ctDNA en la sangre de pacientes oncológicos como son la carga y el estadio tumoral, la localización anatómica del tumor y su vascularización. En un estudio pan-cancer, se detectó ctDNA en el plasma de 47% de los pacientes en estadio I frente al 82% de pacientes en estadio IV(119). La fracción de alelo mutado (mutant allele fraction, MAF) o fracción de alelo variante (variant allele fraction, VAF) representa la cantidad de alelo mutado de un determinado gen respecto a la cantidad de alelo *wild-type* en el cfDNA. En estadios metastásicos la VAF puede ser > 10%, mientras que en estadios más precoces o para la detección de la enfermedad mínima residual (EMR) esta puede ser < 0.1%, por lo que son necesarias técnicas muy sensibles que puedan detectar hasta un 0.01% de VAF. Se ha estimado que en pacientes con estadios tempranos de cáncer de pulmón de células no pequeñas solo se encontrarán 1.7 copias genómicas de ctDNA en 15 mL de sangre en tumores con un volumen de 1 cm³(120), o que en pacientes con una VAF de 0.01% solo se encontraría una molécula de ctDNA en 30 gr de cfDNA. Esta cantidad de ctDNA puede estar por debajo del límite de detección incluso de técnicas altamente sensibles, por lo que su papel como herramienta para el screening del cáncer de pulmón es limitado.

1.6. Tecnologías utilizadas para la detección de ctDNA

Actualmente se siguen dos estrategias para la detección de ctDNA. La primera se basa en estrategias que analizan la presencia de una única alteración genética o un número reducido de alteraciones, como pueden ser la AS-PCR, la PCR cuantitativa (Q-PCR), BEAMing (beads, emulsion, amplification, magnetics), o técnicas de NGS como FAST-SeqS (Fast Aneuploidy Screening Test-Sequencing System), Safe-SeqS (Safe-Sequencing System), CAPP-Seq (CAnCER Personalized Profiling by deep sequencing), y TAm-Seq (Tagged-Amplicon Deep sequencing), entre otras. La principal desventaja de estos métodos es que se requiere conocimiento genómico previo del tumor, mientras que sus ventajas son su alta sensibilidad, pudiendo detectar alteraciones con una VAF de hasta el 0.01% con alta especificidad, su rápido tiempo de respuesta y su alto coste-efectividad. La segunda estrategia consiste en un cribado no dirigido del genoma completo, bien analizando las alteraciones en el número de copias, o secuenciando el genoma completo (Whole-Genome Sequencing, WGS) o el WES(121) (Figura 12, Tabla 1).

Algunas guías internacionales recomiendan el análisis del ctDNA en plataformas de NGS clínicamente validadas antes que en plataformas de tipo RT-PCR, tanto en pacientes al diagnóstico antes del tratamiento como en aquellos que hayan desarrollado múltiples mecanismos de resistencia al mismo. En los casos en los que los métodos NGS no estén disponibles, métodos dirigidos a un solo gen o métodos multiplex a pequeña escala representan una alternativa apropiada.

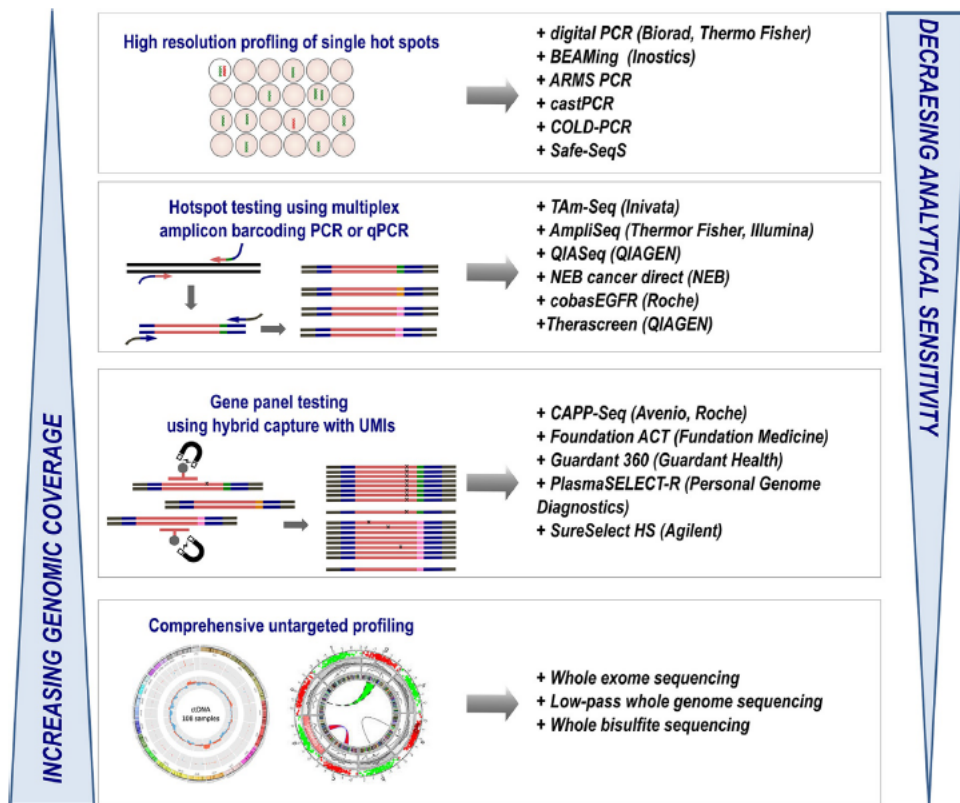


Figura 12. Diferentes metodologías para la detección del ctDNA. Adaptado de Elazezy et al. (122).

1.6.1. Métodos basados en RT-PCR

Los métodos tipo RT-PCR son un método rápido, coste-efectivo y fácil de utilizar para la detección de mutaciones en ctDNA. La AS-PCR utiliza sondas marcadas con fluoróforos cuya señal es detectada. Es muy utilizada en la práctica clínica para la detección de mutaciones puntuales o pequeñas deleciones o inserciones tanto en muestra de tejido como en ctDNA y permiten detectar VAFs hasta el 1% con una alta especificidad(53). Modificaciones de la RT-PCR como la Peptide Nuclei Acid-Locked NucleicAcid PCR clamp (PNA-LNA PCR clamp), que impide la amplificación del alelo *wild-type*, o la Co-amplification at Lower Denaturation temperature (COLD-PCR), que permite el enriquecimiento del alelo mutado, permiten detectar mutaciones con una frecuencia alélica del 0.1% con una alta especificidad. Utilizando una curva de

calibración se puede cuantificar el número copias de ctDNA en la muestra analizada (qPCR)(102,121).

1.6.2. Plataformas de PCR Digital

Las plataformas de PCR digital son unos métodos robustos para detectar mutaciones puntuales con bajas frecuencias alélicas. Se incluyen dos tipos: los basados en plataformas de microfluidos como la droplet digital PCR (ddPCR) y el tipo BEAMing.

La ddPCR se basa en la distribución del ADN de la muestra en miles de gotas y fue desarrollada con el objetivo de proporcionar un alta precisión y una cuantificación absoluta de la variación en el número de copias del ADN diana, así como para la cuantificación de mutaciones somáticas(121). Una gota contendrá una única molécula de ADN que puede ser detectada por citometría de flujo usando sondas fluorescentes tipo Taqman®. La Picodroplet ddPCR permite la detección de varias mutaciones en el ctDNA siempre que su frecuencia alélica sea > 0.1%. Las ventajas de la ddPCR son su alta sensibilidad para detectar mutaciones puntuales y que es una tecnología asequible que permite la cuantificación absoluta. Sus desventajas son que solo permite la detección de mutaciones conocidas y que solo se pueden evaluar un número limitado de las mismas en cada análisis(121).

BEAMing es un método basado en gotas, emulsión, amplificación y partículas magnéticas. Esta tecnología utiliza gotas de agua en una emulsión oleosa como lugar de reacción, y contiene una mezcla de ADN molde, cebadores, reactivos de PCR y esferas magnéticas. En cada reacción de PCR se produce la amplificación del ADN molde, ya sea el ADN mutado o *wild-type*, y cada partícula magnética contendrá miles de copias idénticas a la original. Se utilizan desoxinucleótidos terminadores marcados con fluorescencia para distinguir las gotas que contengan secuencias divergentes con la secuencia de referencia, y se analizan mediante citometría de flujo(123). Además de la identificación, permite la cuantificación de moléculas de ADN con la secuencia mutada respecto a la *wild-type*(124). Esta técnica puede detectar ctDNA con una frecuencia del 0.01% y una especificidad del 100%. A pesar de estas ventajas, es una técnica cuyo flujo de trabajo es complicado, además de costosa, lo que dificulta su implantación en los laboratorios clínicos de rutina.

1.6.3. Next Generation Sequencing (NGS)

La NGS ha surgido en la última década como una estrategia eficaz y coste-eficiente para la secuenciación del ADN. Se basa en la obtención de millones de pequeñas secuencias de ADN en paralelo, las cuales son analizadas bioinformáticamente para identificar aquellas variantes genéticas que difieren de un genoma de referencia. A pesar de su alta sensibilidad y

especificidad, la NGS tiene una tasa de error entre el 0.1-1%(125). Es por ello por lo que se han desarrollado diferentes modificaciones para tratar de mejorar las características de la técnica. Una modalidad de NGS, Deep sequencing, se basa en secuenciar las regiones dianas con una alta cobertura (>10000x), lo que permite detectar mutaciones con una VAF < 0.2%(126). Su principal ventaja es la posibilidad de analizar múltiples regiones con una alta sensibilidad mientras que su principal desventaja es la extremadamente alta profundidad de lectura que hay que realizar para detectar mutaciones a VAFs tan bajas, lo que eleva significativamente sus costes(121). Adaptaciones como la Bias-Corrected Targeted PCR, que consiste en un panel de NGS dirigido a 11 alteraciones en cáncer de pulmón de células no pequeñas que maximiza las lecturas en estos genes y minimiza los artefactos, han permitido la detección de VAFs > 0.4% con una especificidad del 100% en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas(127). La multiplex-PCR NGS está basada en el diseño de un panel de PCR que facilita la amplificación de regiones diana específicas, y permite detectar VAFs > 0.1% con una alta especificidad.

Se han desarrollado numerosas variaciones de la NGS con tal de alcanzar valores de VAFs más bajos. FAST-SeqS puede amplificar hasta 38.000 amplicones con solo un par de cebadores en un subconjunto de regiones repetidas y es utilizada para la detección de aneuploidías(128). TAM-Seq se basa en la utilización de cebadores dirigidos a las regiones de interés que se desean amplificar. Para evitar errores y pérdidas alélicas, los cebadores se unen a la región de interés en el primer paso de la amplificación y posteriormente las muestras son amplificadas individualmente. Pueden detectar alteraciones genéticas con VAFs del 2% con una especificidad del 97%(129). Una nueva versión mejorada, e-TAM-Seq, permite detectar alteraciones con VAFs de hasta el 0.02%, además de alteraciones en el número de copias y deleciones e inserciones(130). Safe-Seqs se basa en tres pasos: la identificación de cada molde de ADN con un identificador único, la amplificación de cada molécula marcada de forma única para crear familias en base al amplificador y la secuenciación redundante de los productos de amplificación. Esta tecnología ha permitido una reducción de la tasa de error enormemente con una especificidad del 99%(131). El CAPP-Seq se desarrolló para detectar concentraciones muy bajas de ctDNA mediante el uso de selectores, que son oligonucleótidos biotinilados de ADN complementarios a áreas con mutaciones recurrentes previamente definidas. Posteriormente, se realiza una Deep sequencing. Mutaciones puntuales, reordenamientos y variación del número de copias pueden ser detectadas por esta metodología, que puede detectar alteraciones a bajas VAFs (0.02%)(132). Sin embargo, esta técnica presenta una tasa de error del 50% de las posiciones genómicas secuenciadas, debido a artefactos en la secuenciación y a la baja cantidad de ctDNA utilizada. Es por ello por lo que se desarrolló una herramienta

computacional que corrige los errores de secuenciación, resultando en una detección teórica del 0.00025% de la VAF. En la práctica, se ha visto que esta modificación permite la detección de mutaciones en el gen *EGFR* en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas con VAFs del 0.004% con una especificidad > 99.9%(133).

Las técnicas de captura híbrida ofrecen la ventaja de que pueden detectar fusiones y alteraciones en el número de copias, y tanto su precio como su complejidad de procesamiento y tiempo de análisis se han reducido considerablemente. Estas técnicas utilizan sondas para atrapar las secuencias diana en una librería de NGS, con una alta profundidad de secuenciación y corrección de errores. Su diseño permite la detección de mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, así como fusiones clave y alteraciones en el número de copias que son relevantes en el cáncer de pulmón de células no pequeñas(134).

Tabla 1. Características de las diferentes tecnologías para el análisis de ctDNA

TECNOLOGÍA	PLATAFORMA	VAF MÍNIMA DETECTADA	ESPECIFICIDAD	CANTIDAD DE CFDNA	NÚMERO DE GENES DIANAS	TIPO DE ALTERACIÓN DETECTADA	LIMITACIONES
NGS	Deep sequencing	0.2%	80-90%	2 ng	Panel	Variación en el número de copias a nivel genómico	Incapaz de detectar reordenamientos sin modificaciones específicas del ensayo
	TAm-Seq	0.02%	99.99997%	0.9-2 ng	Panel	Mutaciones puntuales conocidas	Solo mutaciones conocidas
	Safe-SeqS	0.1%	98.9%	3 ng	Panel	Mutaciones puntuales conocidas y variación en el número de copias	Menos completo que WES
	FASTSeqS	>10%	80%	5-10 ng	Panel	Variación en el número de copias a nivel genómico	Baja sensibilidad y especificidad
	CAPP-Seq	0.004%	>99.99%	32 ng	Panel	Mutaciones puntuales conocidas, variación en el número de copias y reordenamientos	Gran cantidad de cfDNA, solo mutaciones conocidas
	Bias-Corrected Targeted NGS	>0.4%	100%		Panel	Mutaciones puntuales conocidas, variación en el número de copias y reordenamientos	Solo mutaciones conocidas
	Multiplex-PCR NGS	>0.1%	100%	2-50ng	Panel	Mutaciones puntuales conocidas	Solo mutaciones conocidas
DIGITAL-PCR	ddPCR	0.1%	100%	25 ng	1-3	Mutaciones puntuales conocidas	Detecta locis genómicos específicos: limitado en multiplex
RT-PCR	BEAMing	0.01%	100%	1 ng	1-20	Mutaciones puntuales conocidas	Solo mutaciones conocidas
	AS-PCR	1%	98%	3-50 ng	1	Mutaciones puntuales conocidas	Baja sensibilidad, solo mutaciones conocidas
	PNA-LNA PCR clamp	0.1 -1%	79%	30 ng	1	Mutaciones puntuales conocidas	Baja especificidad, solo mutaciones conocidas
	COLD-PCR	0.1%	94.9%	1-10 ng	1-3	Mutaciones puntuales conocidas	Detecta locis genómicos limitados, limitado en multiplex

Abreviaturas: VAF: Variant Allele Frequency; TAm-Seq: Tagged-amplicon deep sequencing; Safe-SeqS: Safe-Sequencing System; WES: whole exome sequencing; CAPP-Seq: Cancer Personalized Profiling by deep sequencing; ddPCR: Droplet Digital polymerase chain reaction; BEAMing: Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics; AS-PCR: Allele-specific amplification; PNA-LNA PCR clamp: Peptide Nuclei Acid-Locked Nucleic Acid; COLD-PCR: co-amplification at lower denaturation temperature. Adaptado de Elazes et al(121).

1.7. Análisis de mutaciones en el gen *EGFR* en ctDNA

El uso de técnicas tipo RT-PCR para el análisis de mutaciones en el *EGFR* en plasma para la estratificación molecular inicial en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas es apropiada en poblaciones en donde la prevalencia de estas mutaciones es alta. Sin embargo, este análisis no se considera completo en aquellos casos en que el resultado es negativo, en donde se deberá expandir el diagnóstico molecular para identificar otras alteraciones.

Diferentes opciones tecnológicas permiten la determinación de mutaciones en el gen *EGFR* en ctDNA, desde técnicas tipo RT-PCR y variantes, a espectrometría de masas, ddPCR y BEAMing y plataformas de NGS, con sensibilidades que van desde el 17% al 100%, en todos los casos con una especificidad mínima del 80%(135). La heterogeneidad en los valores de sensibilidad entre las distintas técnicas se debe a la capacidad de detectar diferentes mutaciones en cada una de ellas, así como a diferencias en la sensibilidad analítica(136). El test Cobas® *EGFR* Mutation Test v2 (Cobas Test) fue aprobado en 2016 por la FDA como el primer test para la detección de mutaciones en el gen *EGFR* en plasma en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas para la selección de candidatos a recibir terapia tipo inhibidores de la tirosina quinasa(137). Se trata de un test tipo AS-PCR diseñado para la detección de 42 mutaciones, incluyendo mutaciones puntuales, inserciones y deleciones localizadas en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen *EGFR*(138). De acuerdo con la aprobación de la FDA, el Cobas Test puede ser usado tanto en muestras de tejido como en plasma como prueba de diagnóstico complementario para la identificación de pacientes con la mutación p.L858R o deleciones en el exón 19 del gen *EGFR*, con el objetivo de establecer el tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa (osimertinib, erlotinib o gefitinib) en primera línea. También dispone de aprobación para el uso de osimertinib en segunda línea en adelante en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico con la mutación p.T790M en el gen *EGFR*(139).

El Cobas Test presenta una alta especificidad y una sensibilidad moderada-alta comparado con la biopsia de tejido, con valores de concordancia del 85-97%, sensibilidad del 71-90% y especificidad del 92-100%, en función de la mutación estudiada(53,140). Otras plataformas con tecnologías tipo ddPCR, BEAMing, ARMS-PCR y NGS han mostrado valores similares de sensibilidad y especificidad(141–143). El estudio observacional RING trial comparó la concordancia entre siete plataformas diferentes para la determinación de mutaciones en el gen *EGFR* en muestras de plasma, incluyendo dos métodos de NGS (OncoPrint™ y QIAseq™), tres métodos tipo PCR de alta sensibilidad como son la ddPCR, BEAMing y PNA-qPCR y 2 métodos tipo AS-PCR aprobados por la FDA (Cobas Test y el Therascreen® *EGFR* RGQ PCR Kit (Therascreen)). Respecto a las deleciones en el exón 19, el rango de valores de sensibilidad

obtenido para los diferentes métodos fue del 50-71%, y la especificidad entre el 92-100%. Para la mutación p.L858R, se obtuvieron valores de sensibilidad más altos, entre el 50-90%, mientras que la especificidad fue del 100% en todos los casos. Los autores concluyeron que la mayoría de resultados discordantes entre las plataformas se obtuvieron con valores de VAF < 0.5%, y consideran este parámetro el más informativo a la hora de evaluar la veracidad de un resultado de *EGFR* en plasma, sugiriendo su inclusión en los informes de laboratorio(144).

Los valores de sensibilidad y especificidad pueden variar según el estadio tumoral y la VAF. El Cobas Test y el Therascreen mostraron valores de sensibilidad más bajos en estadios no avanzados (44.4% y 25.7%) frente a estadios avanzados (82.4% y 52.9%)(136). Por otro lado, un estudio de validación del panel NGS comercial Oncomine™, demostró una creciente sensibilidad según aumentaba el valor de la VAF(145).

1.7.1. Índice semicuantitativo (SQI) obtenido en el Cobas Test

El Cobas Test proporciona un parámetro llamado índice semicuantitativo (SQI) en los casos en los que se detecta una mutación en el gen *EGFR*. Este parámetro refleja la proporción de copias mutadas frente a copias *wild-type* del gen, y deriva de unas diluciones seriadas que contienen un número conocido de copias del gen *EGFR* mutado y un número fijo de copias de *EGFR wild-type*(146). El Cobas Test está aprobado para su uso como un test cualitativo y no cuantitativo, por lo que el valor de SQI no tiene actualmente aplicación en la práctica clínica(147). Algunos estudios han tratado de establecer una correlación entre el SQI y las copias mutadas/mL o la VAF del alelo mutado del gen *EGFR* en muestras de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas obteniendo resultados dispares. Mientras que en un estudio el SQI correlacionaba con la VAF obtenido mediante NGS, y sugería que los cambios en el SQI pueden reflejar la progresión tumoral(146), otros estudios no observaron una correlación entre el valor de SQI y la VAF obtenida por ddPCR(148).

Sin embargo, en un estudio derivado de un programa de garantía externa de la calidad se demostró una buena correlación entre el valor del SQI y la VAF de diferentes mutaciones del gen *EGFR* (deleciones el exón 19, p.L858R, p.T790M e inserciones en el exón 20) analizados mediante Cobas Test y NGS. El estudio observó una alta imprecisión de los valores de SQI en muestras con valores bajos de VAF (< 1%). Además, de forma relevante, observaron que los valores de SQI eran diferentes en función de la alteración estudiada(149), lo que sugiere que aspectos técnicos pueden impactar en el valor SQI obtenido en una muestra.

1.8. Aplicaciones del análisis del cfDNA/ctDNA

El análisis del ctDNA ha cobrado relevancia clínica gracias a la introducción de las técnicas moleculares descritas anteriormente en los laboratorios clínicos, y a que se trata de una estrategia mínimamente invasiva que permite obtener la información molecular asociada a un tumor. Se han propuesto varias aplicaciones clínicas donde el análisis del cfDNA/ctDNA tiene interés, desde el screening y el diagnóstico precoz, al estadiaje y localización del tumor hasta la monitorización de la terapia e identificación de recaídas (Figura 13).

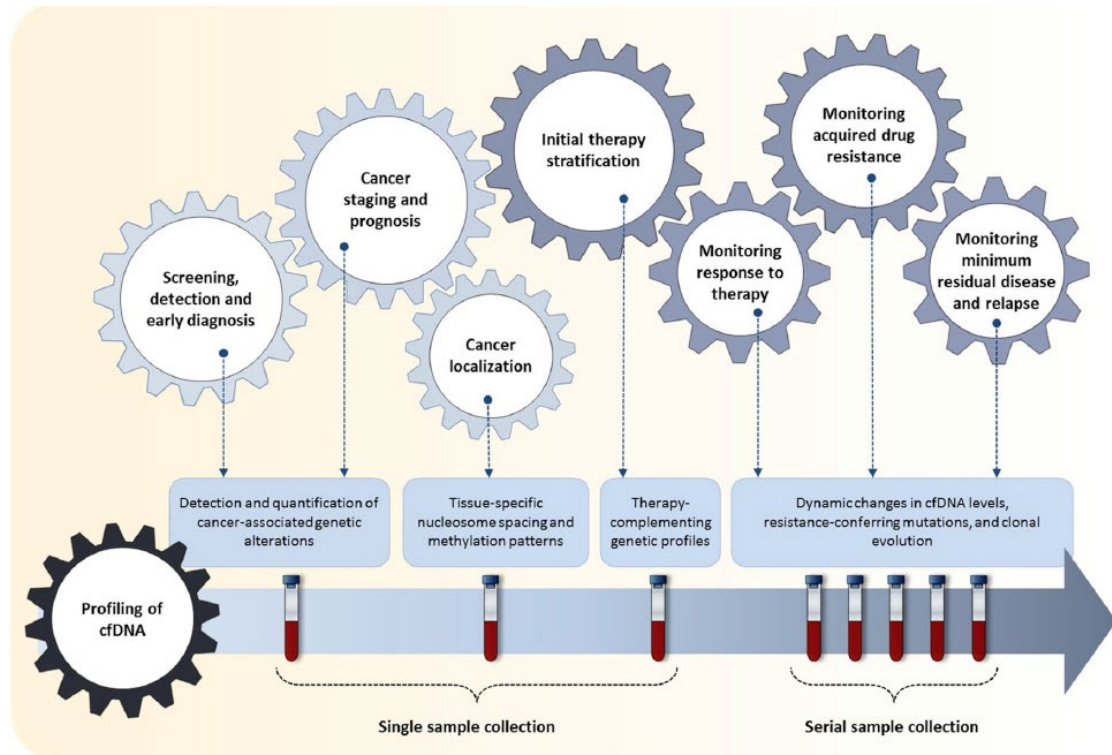


Figura 13. Diferentes aplicaciones del cfDNA/ctDNA en el cáncer. Adaptado de Bronkhorst et al. (105)

A la hora de elegir estrategias de análisis molecular mediante análisis de ctDNA en plasma en lugar de la biopsia de tejido, hay que tener en cuenta las diferencias entre ambos procedimientos. En términos de conveniencia, aplicar estrategias de análisis molecular en plasma resulta adecuado cuando el tejido no está disponible inmediatamente o es inadecuado para su análisis molecular. Algunos estudios cifran entre el 10-60% el número de biopsias que no son adecuadas para el análisis molecular debido a cantidad de tejido insuficiente o falta de material genético amplificable(146,150,151). La mayoría de los especímenes que llegan al laboratorio son muestras pequeñas, ya que los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas son diagnosticados en estadios avanzados y no se les realizan procedimientos quirúrgicos donde obtener piezas grandes de resección(83). Estas muestras pueden ser adecuadas para análisis histopatológicos pero insuficientes para análisis genómicos(152).

Además, la biopsia de tejido presenta numerosos inconvenientes como la heterogeneidad intratumoral que puede existir entre diferentes zonas del mismo tumor, así como entre el tumor primario y las metástasis locales y a distancia; la existencia de subclones resistentes al tratamiento que pueden estar presentes en menor frecuencia en el tumor primario; la baja accesibilidad al tumor debido a las complicaciones clínicas derivadas de los procedimientos para obtener el tejido tumoral; el estado clínico del paciente que puede contraindicar este procedimiento; la posibilidad de resultados falsos positivos derivados de los métodos de preservación del tejido, y el alto coste y tiempo de respuesta. En contraposición a las biopsias tradicionales de tejido, el ctDNA en plasma es una fuente fresca de material derivado del tumor no alterada con conservantes, cuya extracción es un proceso mínimamente invasivo y que evita las complicaciones derivadas de la biopsia de tejido. Además, permite establecer las dinámicas de los diferentes clones celulares durante la terapia e identificar mecanismos de resistencia moleculares precozmente, antes que clínica y radiológicamente. Por tanto, el análisis de ctDNA en plasma proporciona una muestra alternativa cuando la biopsia de tejido no está disponible, no es apropiada o es difícil de obtener(153).

El tiempo de respuesta del laboratorio en la entrega de resultados es generalmente menor para el plasma, gracias a la facilidad de recolección, transporte y procesamiento de la muestra. El coste en ambos procedimientos es variable, y en el caso del análisis del ctDNA podría incrementarse si fuera necesario obtener una muestra de tejido en el caso de que el resultado en plasma fuese negativo. La sensibilidad diagnóstica en el análisis molecular es más alta en el caso del tejido, en las muestras que son adecuadas para el análisis. El ctDNA puede ser no detectable en algunos casos con alteraciones con una baja VAF, lo que condiciona sus valores de sensibilidad diagnóstica. La especificidad para el análisis molecular es excelente en muestras de tejido con el inconveniente de que algunas variantes germinales pueden ser reportadas como somáticas. Los valores de especificidad también son excelentes para las mutaciones diana en el caso del ctDNA, aunque se han reportado casos de falsos positivos, especialmente a bajos valores de VAF, en algunos genes derivados de la hematopoyesis clonal(154).

Las nuevas tecnologías que han permitido la detección de alteraciones genéticas con frecuencias alélicas tan bajas como 0.008% en pacientes con cáncer de pulmón con estadios T1b(155) han hecho que el análisis de ctDNA en plasma esté siendo considerada como una alternativa al TC de baja dosis para el cribado del cáncer de pulmón, siempre que se puedan diferenciar las mutaciones derivadas de los clones hematopoyéticos de las propias del tumor. El análisis de metilación del cfDNA, que difiere entre pacientes oncológicos e individuos sanos, puede ser otra aproximación al screening de cáncer de pulmón(156).

Se ha observado que los pacientes con estadios tempranos de cáncer de pulmón de células no pequeñas presentan menor concentración de cfDNA que estadios avanzados, y que esta aumenta en función del número de órganos metastásicos afectados(157). A pesar de estos datos, la concentración de cfDNA aún no se utiliza para la estadificación tumoral en cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Una de las aplicaciones más importantes del análisis de ctDNA en plasma la caracterización molecular de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas para la selección del tratamiento oncoespecífico. La guía ESMO recomienda el uso del análisis del cfDNA en plasma únicamente para detectar la mutación de resistencia p.T790M en pacientes en recaída. En aquellos pacientes con un resultado negativo en el análisis del cfDNA se debe realizar una biopsia de tejido y realizar de nuevo el estudio molecular. Respecto a los métodos de detección de alteraciones en cfDNA, recomiendan cualquiera apropiado y validado y que esté sujeto a programas de garantía de control externo de la calidad(69). Por su parte, la guía CAP/IASLC/AMP indica que actualmente no hay evidencias que soporten la utilización del cfDNA en el diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón primario. Sin embargo, en los casos en que el tejido no esté disponible o sea difícil de obtener, se pueden utilizar métodos de análisis en cfDNA en plasma para la detección de mutaciones en el gen *EGFR*. En aquellos pacientes que tengan una mutación de sensibilidad y la enfermedad progrese se les ha de realizar el análisis de la mutación p.T790M antes de comenzar el tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa de tercera generación. En este caso es aceptable el uso de cfDNA en plasma, pero tal y como sugiere la guía ESMO, ante un resultado negativo se debe realizar una biopsia de tejido y repetir el estudio genético(66)

Los test tipo RT-PCR han demostrado su eficacia en la práctica clínica para la detección de mutaciones específicas que cuentan con tratamientos dirigidos. Otros test basados en otras tecnologías como ddPCR o BEAMing han demostrado ser capaces de detectar mutaciones derivadas del tumor primario o relacionadas con la respuesta a determinados fármacos con una alta concordancia respecto a las muestras obtenidas mediante biopsia de tejido(89). Las plataformas multigen tipo NGS han ido cobrando relevancia en la práctica clínica en los últimos años. Su principal ventaja es que permiten una caracterización molecular más amplia e informativa. Un estudio realizado mediante NGS en cfDNA, con más de 8.000 muestras de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón de células no pequeñas encontró alteraciones somáticas en el 86% de los pacientes, encontrándose estas mutaciones en genes accionables terapéuticamente en el 48% de los casos(158).

Recientemente, dos plataformas comerciales basadas en NGS, Guardant360 y FoundationOne Liquid CDx han recibido la aprobación de la FDA para la evaluación de tumores sólidos, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Ambos métodos utilizan una metodología de captura híbrida. El Guardant 360 CDx es capaz de detectar mutaciones puntuales, inserciones y deleciones en 55 genes, amplificaciones en el número de copias en 2 genes y fusiones en 4 genes. Sin embargo, sólo ha sido aprobado para la detección de deleciones en exón 19, la mutación puntual p.L858R y la mutación de resistencia p.T790M en el gen *EGFR*. El FoundationOne Liquid CDx incluye el análisis de 311 genes, reordenamientos en 4 genes y alteración en el número de copias en 2 genes. Su indicación incluye la detección de la mutación p.L858R y deleciones en el exón 19 en el gen *EGFR*, así como reordenamientos en el gen *ALK*. Además de para estas indicaciones, ambos test fueron aprobados como test complementarios en el diagnóstico de pacientes con cualquier neoplasia sólida, cuya información, en conjunto con otras pruebas diagnósticas, pueda ser usada en la toma de decisiones clínicas(154).

Numerosos estudios han demostrado que el ctDNA refleja mejor la heterogeneidad molecular del tumor que las biopsias tradicionales. Además, permite la monitorización longitudinal de la respuesta molecular del tumor, por lo que puede usarse para monitorizar la aparición de mutaciones de resistencia, como la p.T790M en el caso del gen *EGFR*(148).

La vida media del ctDNA, así como el hecho de ser un método poco invasivo respecto a las alternativas (biopsia de tejido y técnicas de imagen) hacen del ctDNA un marcador ideal de respuesta al tratamiento, o de monitorización de la carga tumoral después la cirugía o EMR(105). La guía ESMO enfatiza el posible valor de las determinaciones seriadas de ctDNA en plasma durante el tratamiento. La desaparición de la mutación de sensibilidad podría estar asociada con la respuesta radiológica al tratamiento. Por otro lado, su reaparición, con o sin la mutación de resistencia p.T790M, podría indicar una recaída bioquímica(69).

Estudios previos han demostrado una reducción drástica del ctDNA en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios no metastásicos tras la cirugía(159,160). Con la metodología CAPP-Seq descrita anteriormente, se ha demostrado que la presencia de ctDNA es pronóstica de recurrencia a pesar de que las pruebas de imagen muestren una respuesta completa en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas(132). Con la misma metodología, en pacientes con estadios I-III, el ctDNA se detectó en el 94% de los pacientes que sufrieron una recaída en la primera muestra postratamiento(161). Por otro lado, la ratio del cfDNA postquimioterapia respecto al cfDNA pretratamiento fue capaz de distinguir a los

pacientes respondedores de los no respondedores, además de correlacionar negativamente con la progresión libre de enfermedad(103).

En el caso del cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico, se ha demostrado que aquellos pacientes en que el ctDNA era indetectable a las 12 semanas de empezar el tratamiento presentaron una mejor respuesta, además de una mayor progresión libre de enfermedad y supervivencia, que aquellos en los que este era detectable(162). Estos resultados también se han objetivado en pacientes con la mutación de resistencia p.T790M en el gen *EGFR*. En un estudio que incluyó 41 pacientes se asoció la presencia de la mutación p.T790M, así como un aumento de la VAF de la mutación de sensibilidad, con progresión de la enfermedad. Por otro lado, la mutación de resistencia p.T790M fue detectada en plasma 51 días antes de la progresión medida mediante TC(163). Otros estudios también han observado una correlación entre la VAF del ctDNA con la progresión libre de enfermedad y la supervivencia en pacientes tratados con inmunoterapia(164).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas, a la luz de la revisión de la literatura sobre el tema y el trabajo de compilación de publicaciones que se presenta en esta tesis, fueron las siguientes:

- La caracterización molecular del gen *EGFR* en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas mediante el análisis de ADN libre circulante en plasma representa una alternativa adecuada al análisis molecular en muestras obtenidas mediante biopsia de tejido.
- El Cobas® EGFR Test v2 diseñado para el análisis de ADN libre circulante en plasma presenta características de eficacia diagnóstica adecuadas para su introducción como test diagnóstico en un entorno clínico real.
- El índice semicuantitativo (SQI) reportado por el Cobas® EGFR Test v2 representa la cantidad de alelo mutado del gen *EGFR* en una muestra de ADN libre circulante en plasma y es equivalente a la fracción de alelo mutado.
- En pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, la concentración del ADN libre circulante en plasma se asocia a las características clínicas del paciente y a las características del tumor, y puede tener valor como biomarcador diagnóstico.
- En pacientes con cancer de pulmón de células no pequeñas, el patrón de fragmentos del ADN libre circulante en plasma correlaciona con el tamaño tumoral y las características biológicas del tumor.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es implementar el análisis de alteraciones en el gen *EGFR* a partir de ADN libre circulante en plasma en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en un laboratorio clínico de diagnóstico molecular.

Los objetivos específicos de la tesis son:

1. Evaluar el impacto de la introducción en un entorno clínico real de un test tipo RT-PCR para el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* en cfDNA en plasma en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzado o metastásico en el momento del diagnóstico.
2. Evaluar las características del índice semicuantitativo (SQI) obtenido en los pacientes con alteraciones en el gen *EGFR*.
3. Evaluar la correlación del índice semicuantitativo (SQI) con la fracción alélica de la variante (VAF) y su potencial como biomarcador de seguimiento en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña.
4. Evaluar la utilidad clínica de la concentración del cfDNA y la fracción de fragmentos cortos como biomarcadores de estadificación de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzado o metastásico.
5. Evaluar la asociación de la concentración del cfDNA y sus fracciones de fragmentos con parámetros derivados del FDG PET/TC y del TC toracoabdominal respecto a la lesión primaria, las lesiones extrapulmonares y a la enfermedad global en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzado o metastásico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS Y RESULTADOS

PUBLICACIÓN 1

Cell-free DNA concentration and fragment size fraction correlate with FDG PET/CT-derived parameters in NSCLC patients

Objetivos específicos de este artículo

- Evaluar la utilidad de la caracterización molecular del gen *EGFR* mediante cfDNA en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado o metastásico antes de recibir tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa.
- Analizar el potencial como biomarcadores de estadio tumoral de la concentración de cfDNA y el patrón de fragmentos de cfDNA en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado o metastásico.



Molecular characterization of advanced non-small cell lung cancer patients by cfDNA analysis: experience from routine laboratory practice

José Manuel González de Aledo-Castillo^{1^}, Ainara Arcocha^{2,3}, Iván Victoria^{2,3}, Ana Isabel Martínez-Puchol⁴, Cristina Sánchez⁴, Pedro Jares^{2,4,5}, Gabriel Felipe Rodríguez⁴, Núria Viñolas^{2,3}, Roxana Reyes^{2,3}, Noemí Reguart^{2,3,6}, Joan Antón Puig-Butillé^{2,4,6}

¹Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ²Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ³Medical Oncology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ⁴Molecular Biology CORE, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ⁵Pathology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ⁶August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona, Spain

Contributions: (I) Conception and design: JM González de Aledo-Castillo, N Reguart, JA Puig-Butillé; (II) Administrative support: AI Martínez-Puchol, C Sanchez; (III) Provision of study materials or patients: A Arcocha, I Victoria, N Viñolas, N Reguart; (IV) Collection and assembly of data: JM González de Aledo-Castillo, I Victoria, AI Martínez-Puchol, C Sanchez, GF Rodríguez, JA Puig-Butillé; (V) Data analysis and interpretation: JM González de Aledo-Castillo, N Reguart, JA Puig-Butillé; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: Dr. Joan Anton Puig-Butillé. Thoracic Oncology Unit, Molecular Biology CORE, Hospital Clínic de Barcelona, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Email: japuig@clinic.cat.

Background: Analysis of circulating free DNA (cfDNA) by the real-time PCR cobas[®] EGFR Mutation Test v2 (cobas[®] EGFR Test) is a diagnostic approach used in clinical practice for the characterization of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. The test additionally outputs a semiquantitative index (SQI) which reflects the proportion of mutated versus wild-type copies of the *EGFR* gene in cfDNA with potential use as a biomarker. CfDNA concentration and cfDNA fragmentation pattern have also shown potential utility as biomarkers for cancer patients. We evaluated the implementation of *EGFR* testing and cfDNA related parameters in NSCLC patients in routine clinical setting as biomarkers for disease stage and diagnosis.

Methods: A prospective cohort of 173 locally advanced or metastatic NSCLC TKI-naïve patients analyzed by the cobas[®] EGFR Test were included in the study. Reproducibility of the test was assessed in 56 patients. The concentration of cfDNA and fragment size pattern was measured using fluorometry and microchip electrophoresis respectively.

Results: The test showed high diagnostic accuracy when compared to the gold standard of biopsy tumor tissue testing. The SQI value showed a moderate reproducibility ($r^2=0.70$) and did not correlate with cfDNA concentration ($r^2=0.17$, $P=0.28$) or disease stage (stage III patients SQI = 9.1 ± 3.1 and stage IV patients SQI = 11.5 ± 4.8 , $P=0.41$). We found differences in SQI values according to the type of *EGFR* mutation (Ex19Del mutations, SQI = 13.6; p.L858R, SQI = 8.88; $P=0.001$). Stage IV patients had higher concentrations of cfDNA ($P<0.0001$) and higher fractions of cfDNA 100–250 base pairs (bp) fragments ($P=0.01$) compared to stage III patients. From the ROC curve analysis, cfDNA concentration showed higher AUC compared to cfDNA 100–250 bp fragments (0.86 vs. 0.71). We obtained a cut-off value for cfDNA concentration of 20.3 ng/mL with 72.3% sensitivity and 95% specificity for predicting disease stage in TKI-naïve advanced NSCLC patients.

Conclusions: The study indicates that cfDNA analysis in plasma for *EGFR* testing by RT-PCR is an accurate and fast method to initially stratify NSCLC patients in a real-world clinical setting. However, the

[^] ORCID: 0000-0002-7622-417X.

SQI has limited clinical value. The cfDNA concentration and fragmentation pattern have clear potential clinical utility for tumor staging in NSCLC patients.

Keywords: EGFR; cfDNA; plasma; non-small cell lung cancer (NSCLC); tyrosine kinase inhibitor (TKI)

Submitted Oct 24, 2020. Accepted for publication Jan 20, 2021.

doi: 10.21037/jtd-20-3142

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/jtd-20-3142>

Introduction

Lung cancer, which is one of the most frequent and lethal cancers worldwide (1), has traditionally been classified, based on clinical-histopathological characteristics, into the non-small cell lung carcinoma (NSCLC) subgroup, including adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and large cell carcinoma; and the small cell lung cancer (SCLC) subgroup. The NSCLC and SCLC subgroups correspond to 85% and 15% of all lung cancers respectively (2).

Recently, advances in the understanding of the molecular bases of lung cancer have promoted a new classification based on molecular profiling (2). Mutations in the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene are common driver events in lung adenocarcinomas (3) with the prevalence of *EGFR* mutations ranging from 14.1% in European patients to 38.4% in Asian patients. Treatment with *EGFR* tyrosine kinase inhibitors (TKIs) is the standard-of-care in first-line therapy for NSCLC patients with *EGFR* mutant tumors. While several generations of TKIs have considerably improved the prognosis of the disease (4), patients ultimately develop resistance to TKI treatment. The acquisition of the p.T790M *EGFR* mutation is a common mechanism of resistance observed in 50% of patients treated with first and second-generation TKIs (5). Osimertinib, a third-generation TKI, is the standard of care in patients with an acquired p.T790M *EGFR* mutation. To date, several clinical guidelines recommend testing for *EGFR* mutations in all advanced NSCLC patients, independently of the clinical characteristics, to identify those patients most likely to benefit from targeted *EGFR* inhibition (6). In addition, a new biopsy is strongly advised at the time of progression to first-line *EGFR* TKIs to rule out the targetable p.T790M mutation (7).

Tumor tissue is the gold standard for the molecular characterization of NSCLC tumors. However, up to 60% of patients do not have a biopsy sample suitable for molecular analysis (8). Furthermore, tissue biopsies are

obtained by invasive procedures that increase the risk of adverse events, and genotyping possibilities are limited due to inter- and intra-tumor heterogeneity (9). To overcome these limitations, circulating free DNA (cfDNA) in serum or plasma has emerged as an alternative and easily accessible sample source. Clinical guidelines recommend *EGFR* molecular testing of cfDNA from plasma in mutant *EGFR* lung cancer patients when resistance develops or at diagnosis when tissue availability is limited or difficult to obtain (7). *EGFR* mutation analysis in cfDNA can be carried out by distinct polymerase chain reaction (PCR) or next-generation sequencing (NGS) methods, and its clinical utility has mainly been evaluated in patients in clinical trials (10,11) or by analyzing synthetic DNA (12-14). Although different methods have shown differing sensitivity/specificity and diagnostic accuracy, *EGFR* testing in plasma has proven to be a reliable substitute for tissue testing (10,15-20). The cobas® *EGFR* Mutation Test v2 (cobas® *EGFR* Test) (Hoffman-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) is an FDA and CE approved real-time PCR test currently used in the clinical setting to analyze specific target *EGFR* mutations in metastatic NSCLC patients (12,21). The test provides a semiquantitative index (SQI), which reflects a trend for the proportion of mutated versus wild-type copies of the *EGFR* gene in the cfDNA (8).

cfDNA is comprised of short nuclear DNA fragments of variable length that are released into plasma and other biological fluids by stromal and tumor cells (circulating tumor DNA; ctDNA). Although the biology of cfDNA is poorly understood, apoptosis and necrosis have been established as the major mechanisms of release. Higher concentrations of cfDNA have been found in lung cancer patients compared to healthy individuals (22,23). In addition, levels of both cfDNA and ctDNA have been associated with disease prognosis and relapse, highlighting their potential clinical utility (24,25).

The length of cfDNA fragments has been associated with the mechanism of their release. While apoptosis promotes

the release of DNA fragments of approximately 180 base pairs (bp) or multiples thereof, necrosis produces larger fragments. Moreover, fragments between 1,000–3,000 bp are associated with active release processes (26). In contrast to total cfDNA levels, the significance of cfDNA fragmentation pattern has been less explored in the clinical context. Recent studies in advanced pancreatic cancer patients (27) and breast or prostate cancer patients (28), however, suggest that the cfDNA fragmentation pattern may provide diagnostic and prognostic value in cancer patients.

In this report, we evaluate the utility of molecular cfDNA characterization of advanced or metastatic NSCLC TKI-naïve patients in a routine clinical setting, using *EGFR* mutation testing and analysis of the concentration and fragmentation pattern of cfDNA.

We present the following article in accordance with the STARD reporting checklist (available at <http://dx.doi.org/10.21037/jtd-20-3142>).

Methods

Patient enrollment

The study includes a prospectively recruited cohort of 173 NSCLC patients referred for plasma *EGFR* molecular testing at Hospital Clínic, Barcelona, between 2017 and 2020. At the time of inclusion, all patients were diagnosed with locally advanced or metastatic NSCLC and were TKI-naïve. Clinical data such as gender, age, tumor histology, disease stage, smoking status and molecular status of *EGFR* in tissue biopsy were obtained from their medical records.

The protocol was approved by the Hospital Clinic Ethics Committee (approval registration HCB/2016/0889) and was conducted in accordance with Declaration of Helsinki (as revised in 2013). Written informed consent was obtained from all patients.

Isolation of cfDNA from plasma

For cfDNA analysis, peripheral whole blood was collected from each subject in a 5 ml EDTA-K2 tube. When possible, two blood extractions were taken from each patient in order to evaluate the reproducibility of the test. After 15 to 20 minutes at rest in an upright position at room temperature, samples were centrifuged at 1,600 g for 10 minutes to collect 2 mL of plasma, which was transferred to a clean sterile tube. After a second centrifugation at 16,000 g for 10 minutes,

plasmas were stored at -20°C . The entire procedure is completed within three hours of blood extraction. The cfDNA was isolated using the cobas[®] cfDNA Sample Preparation Kit as per the manufacturer's instructions.

Determination of cfDNA concentration and fragment size

The concentration of eluted cfDNA was measured using a Qubit 4 Fluorometer. The cfDNA fragment size for each sample was determined by microchip electrophoresis using an Agilent 2100 Bioanalyzer and the Agilent High Sensitivity DNA. The Agilent 2100 Bioanalyzer software was used to obtain the fraction of cfDNA and average size corresponding to apoptotic DNA fragments (100–250 and 250–700 bp). The fraction of cfDNA fragment size and cfDNA levels were obtained by individuals blinded to the clinical data to reduce potential bias.

EGFR mutation analysis

Analysis of *EGFR* mutations in cfDNA was performed by the cobas[®] *EGFR* Test. The test allows the detection of 42 recurrent point mutations, deletions, and insertions located in exons 18 to 21. The cobas[®] *EGFR* Test is a RT-PCR assay designed to detect G719X substitution mutations in exon 18, deletion mutations in exon 19, T790M and S768I substitution mutations in exon 20, insertion mutations in exon 20, and L858R and L861Q substitution mutations in exon 21. However, the specific mutation found in each sample is not displayed in the final test report. The cobas[®] z480 software reports a SQI value. Mutation status from tumor biopsy and the method used for the molecular characterization was obtained from medical records. Both plasma and tissue analysis were performed by individuals blinded to the clinical data.

Statistical analysis

Analysis of cfDNA concentration between groups was carried out by non-parametric rank tests; Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U. Comparisons of the SQI of the two most prevalent mutations were made using the Student's *t*-test. Correlation between SQI and cfDNA concentration was carried out using the Spearman rank correlation test. The chi square test was used to compare the prevalence of *EGFR* mutations between groups. A simple linear regression was made to determine the correlation coefficient between the two vials of the same patient.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the advanced or metastatic NSCLC TKI-naïve patient cohort

Characteristic	N (%)
Age, years, median [range]	69 [24–91]
Gender	
Male	89 (51.4)
Female	84 (48.6)
Smoking history	
Current smokers	34 (19.7)
Former smokers	80 (46.2)
Never smokers	59 (34.1)
Histology and stage	
ADK	140 (80.9)
Other lung cancer	33 (19.1)
ADK III	11 (7.9)
ADK IV	129 (92.1)
Other lung cancers stage III	6 (18.1)
Other lung cancers stage IV	27 (81.8)

ADK, adenocarcinoma; n, sample size.

To evaluate concordance in molecular status between tissue and plasma, only patients with both tissue and plasma samples analyzed with less than two months difference were selected. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, global accuracy, and 95% confidence intervals were calculated as standard measures of diagnostic test validity. Results were considered statistically significant when the P value was <0.05. We calculate the predictive capability for distinguishing stage III and stage IV for the cfDNA concentration and integrity using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, by identifying the cut-off for both parameters for the detection of patients with stage IV lung cancer with 95% specificity and maximal sensitivity. All statistical analysis was performed using IBM SPSS software (version 23).

Results

Association of clinicopathological characteristics to cfDNA concentration and fragmentation pattern

We prospectively analyzed cfDNA from 173 advanced or metastatic NSCLC TKI-naïve patients. Among them,

80.9% (140/173) were diagnosed with lung adenocarcinoma (ADK) and 19.1% (33/173) with other histologies such as adenoid cystic carcinoma, pulmonary pleomorphic carcinoma, cancer of unknown primary, squamous cell carcinoma or NSCLC-non-otherwise specified (NSCLC-NOS). Stage III and IV represented 9.8% (17/173) and 90.2% (156/173) of cancer patients respectively. The demographic and clinical characteristics of the patients are shown in *Table 1*.

We assessed whether cfDNA concentration and fragmentation pattern were associated with the clinical characteristics of the patients (*Table 2*). The cfDNA concentration and fragmentation pattern were determined in 99.4% (172/173) and 79.8% (138/173) of patients respectively (*Figure 1*).

The median cfDNA concentration detected among patients was 28.3 ng/mL (range, 6.1–529). We did not find any difference in cfDNA concentration among *EGFR* mutant patients based on the type of *EGFR* mutation. We found significant differences in the cfDNA concentration among patients based on disease stage. Stage IV cancer patients showed higher concentrations of cfDNA compared to stage III patients (31 *vs.* 13.9 ng/mL; $P < 0.0001$). Such differences were observed among patients with adenocarcinoma tumors as well as patients with other histological subtypes.

The analysis of the fragmentation pattern was split between the fraction of fragment sizes between 100–250 bp, corresponding to nucleosome fragments; and the fraction of fragment sizes between 250–700 bp, corresponding to polynucleosome fragments. All patients showed cfDNA in both size ranges with a median size of 175 and 438 bp in each range respectively. Overall, the stage IV cancer patients presented a higher fraction of 100–250 bp fragment size compared to stage III cancer patients (43.0% *vs.* 33.0%; $P = 0.01$, *Figure 2A*). Among adenocarcinoma patients, stage IV patients showed a higher fraction of 100–250 bp fragment size but also 250–700 bp fragment size (*Figure 2B*). These differences were not observed among patients with other NSCLC tumors probably due to the reduced sample size.

We evaluated the diagnostic utility of both cfDNA concentration and fraction of 100–250 bp fragment size as biomarkers for the disease stage in NSCLC patients. We performed ROC curve analysis to identify the cut-off value for both parameters with 95% specificity and maximal sensitivity. In our cohort of patients, 20.3 ng/mL of cfDNA concentration and 50.5% of 100–250 bp fragment size were

Table 2 Association of concentration of cfDNA and fragmentation pattern with clinicopathological characteristics in advanced or metastatic NSCLC TKI-naïve patients

Characteristics	Median cfDNA concentration (ng/mL)	P value	Median cfDNA, 100–250 bp (%) (mean size ± SD)	P value	Median cfDNA, 250–700 bp (%) (mean size ± SD)	P value
Gender						
Male	28.8	NS	39.0 (175.3±5.6)	NS	17.0 (436.7±34.8)	NS
Female	27.8		45.0 (174.1±4.9)		15.0 (423.9±58.3)	
Smoking history						
Current smokers	36.6	NS	43.0 (174.9±4.9)	NS	15.0 (438.0±44.5)	NS
Former smokers	26.0		38.0 (175.2±6.1)		17.0 (435.2±30.4)	
Never smokers	33.1		44.0 (174.0±4.1)		16.0 (419.1±65.6)	
Histology and stage of the disease						
ADK patients	27.1	NS	41.0 (175.0±4.8)	NS	16.0 (429.0±50.0)	NS
Other NSCLC patients	35.8		44.0 (173.8±7.1)		17.0 (437.7±34.7)	
ADK III patients	13.1	<0.0001	24.5 (178.0±4.1)	0.008	10.5 (434.1±39.0)	0.02
ADK IV patients	29.0		41.0 (174.7±4.8)		16.0 (428.6±50.9)	
Other NSCLC III patients	12.8	<0.0001	41.0 (179.8±4.2)	NS	18.0 (448.6±8.10)	NS
Other NSCLC IV patients	41.1		45.0 (172.3±6.9)		17.0 (435.0±38.3)	
All stage III patients	13.1	<0.0001	33.0 (178.7±4.1)	0.013	14.0 (439.7±31.0)	NS
All stage IV patients	31.9		43.0 (174.3±5.2)		16.0 (429.6±49.0)	

ADK, (adenocarcinoma); NSCLC, non-small cell lung cancer (includes non-adenoid cystic carcinoma, pulmonary pleomorphic carcinoma, unknown primary side cancer, squamous cell carcinoma and NSCLC-non-otherwise specified); NS, no significant, P value.

the optimal cut-offs to detect stage IV cancer patients with a sensitivity of 72.3% for cfDNA concentration and 36.8% for fragmentation pattern. Although both parameters reached statistical significance, the cfDNA concentration showed higher AUC compared to the 100–250 bp fraction (0.86% vs. 0.71%) (Table 3).

Characterization of EGFR mutations in cfDNA from plasma

We analyzed the presence of EGFR mutations in cfDNA in all patients. The median turnaround time for delivering the EGFR mutation status to the clinicians was 7 days. We detected EGFR mutations in 24.3% (42/173) of cases, corresponding to deletions in exon 19 (14.5% of cases), p.L858R mutation (7.5% of cases), mutations at codon p.G719X (1.2% of cases), mutations at codon p.L861Q (0.6% of cases) and Ex20Ins (0.6% of cases). All mutant EGFR tumors belonged to patients with adenocarcinoma,

except for two patients in which the histological information of the tumor was not available.

We detected a higher prevalence of EGFR mutations in plasma from women vs. men (34.5% vs. 14.6%, P=0.002) and non-smokers vs. past or current smokers (49.2% vs. 11.4%, P<0.0001). In contrast, we found similar frequencies between different disease stages. EGFR mutations were found in 17.6% of stage III cancer patients and 25.0% of stage IV cancer patients.

We evaluated the reproducibility of the cobas® EGFR Test in 56 patients by analyzing two distinct vials obtained during the same blood draw. The cfDNA concentration showed a correlation coefficient of $r^2=0.99$ between both vials (Figure 3A). Among EGFR mutant patients, the SQI value for the EGFR mutation showed a correlation coefficient of $r^2=0.70$ between the vials (Figure 3B). We obtained the same molecular status of EGFR in both vials in 96.5% (54/56) of patients. The two remaining cases with discrepant results between the vials harbored the p.L858R

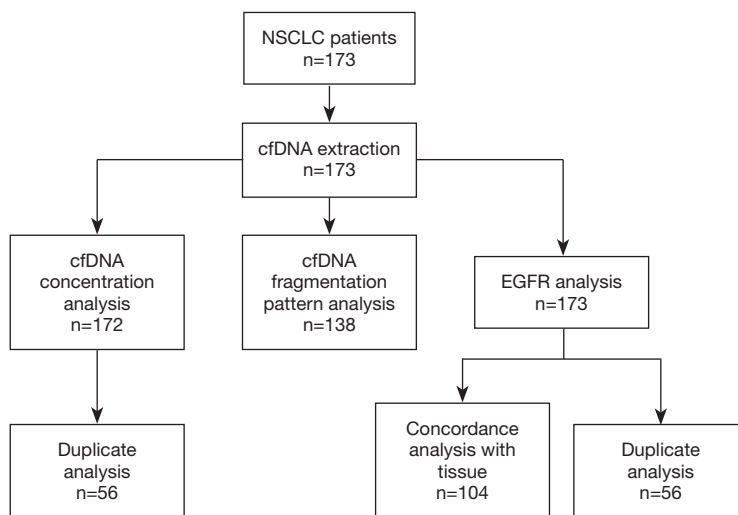


Figure 1 Groups description and subanalysis disposition. This chart shows the workflow followed in the study. All patients enrolled in the study underwent cfDNA extraction and EGFR mutation analysis, while subanalysis was carried out only when the required sample was available. NSCLC, non-small cell lung cancer; cfDNA, circulating-free DNA; EGFR, epidermal growth factor receptor; N, sample size.

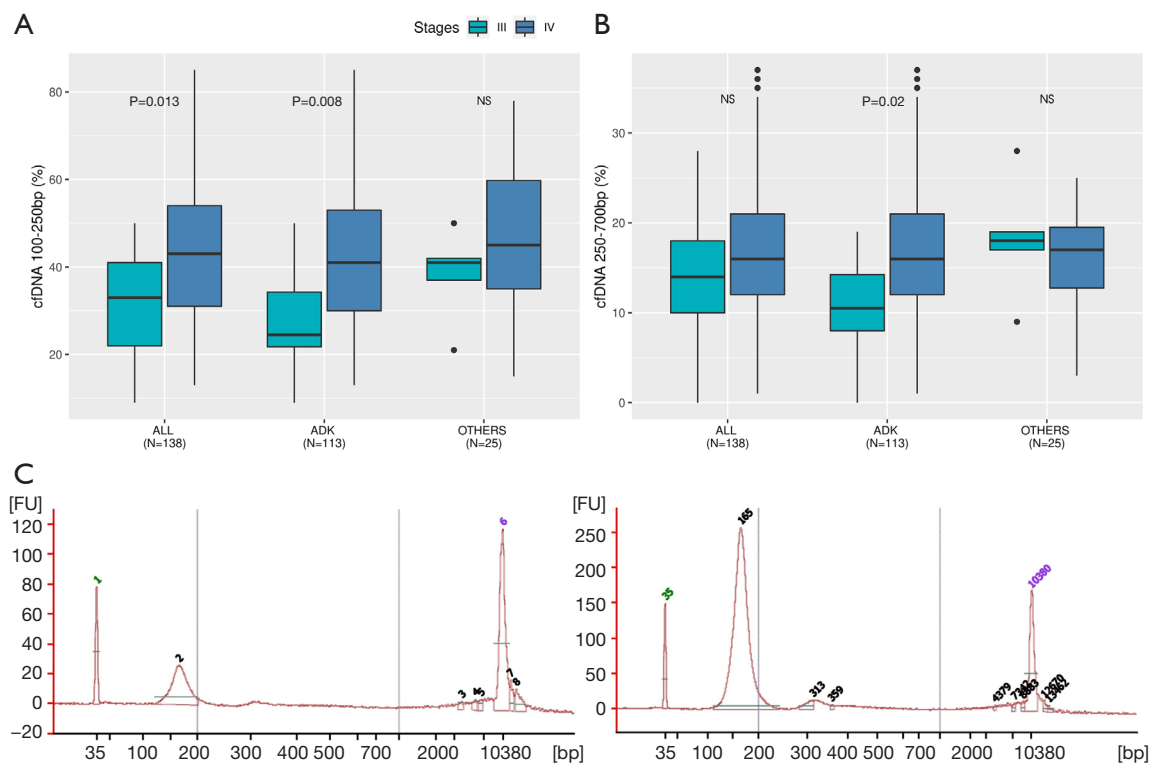


Figure 2 cfDNA integrity related to histology and stage. (A) Median of 100–250 bp cfDNA fraction (%) in all lung cancers, adenocarcinomas and other NSCLC regarding stage of the disease. (B) Median of 250–700 bp cfDNA fraction (%) in all lung cancers, adenocarcinomas and other NSCLC by disease stage. (C) Examples of Agilent 2100 Bioanalyzer electropherogram from *EGFR* mutated samples showing peak intensity in different base pairs fractions. ADK, adenocarcinomas; ALL, all lung cancers; OTHERS, non-adenocarcinomas non-small cell lung cancers; cfDNA, circulating-free DNA; bp, base pairs.

Table 3 Area under the receiver operating characteristic (ROC) curve and corresponding cut-off values for cfDNA concentration and cfDNA 100–250 bp fragment fraction for assessing tumor stage in advanced or metastatic NSCLC TKI-naïve patients

Parameter	AUC	AUC 95% CI	P value	Cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)
cfDNA concentration (ng/mL)	0.86	0.79–0.93	<0.0001	20.3	72.3	95
100–250 bp cfDNA fraction (%)	0.71	0.59–0.83	0.013	50.5	36.8	95

The table shows the cut-off value and the corresponding sensitivity of each parameter maintaining a specificity of 95% for the test. cfDNA, circulating-free DNA; bp, base pairs, AUC, area under the receiver operating characteristic curve; CI, confidence interval.

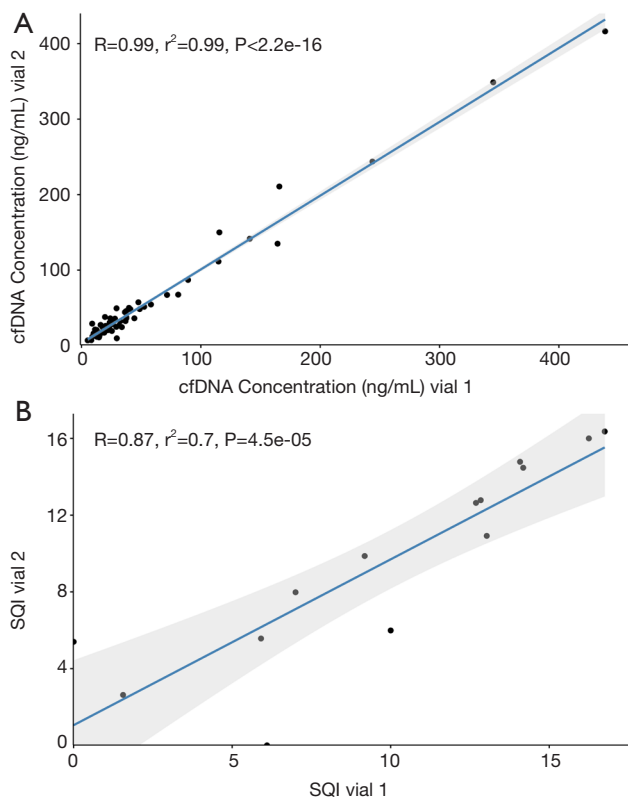


Figure 3 Correlation of parameters between vials within the same blood extraction. (A) cfDNA concentration (ng/mL). (B) SQI index of *EGFR* mutated patients. r^2 = correlation coefficient; cfDNA, circulating-free DNA; SQI, semiquantitative index.

EGFR mutation. The mutation was only detected in one of the vials, and the test reported a SQI value of 5.4 in one patient and an SQI value of 6.1 in the other patient. In both patients, the cfDNA concentration was higher in the vial in which the mutation was detected (12.9 *vs.* 11.6 and 30.4 *vs.* 23.6 ng/mL) but these differences were not statistically significant.

Among *EGFR* mutant cancer patients, the SQI values

varied from 2.1 up to 25.0, indicating a large variability among patients. To further explore the SQI variability, we analyzed the SQI values based on the cfDNA concentration and the disease stage. The SQI value did not correlate with the cfDNA concentration ($r^2=0.17$, $P=0.28$) or disease stage (stage III patients = 9.1 ± 3.1 and stage IV patients = 11.5 ± 4.8 , $P=0.41$). We analyzed the SQI values based on the type of mutations, and found statistically significant differences between the SQI values for Ex19Del mutations ($n=25$ patients) and p.L858R ($n=13$ patients). The Ex19Del *EGFR* patients had higher SQI values compared to p.L858R *EGFR* patients (mean Ex19Del *EGFR* SQI = 13.6 *vs.* mean p.L858R *EGFR* SQI = 8.9; $P=0.001$) indicating that technical factors related to the detection of each mutation target impact the obtained SQI values.

Correlation between molecular status of cfDNA from plasma and tissue tumour

We evaluated the concordance between the molecular status in cfDNA and tissue biopsy in 60.1% (104/173) of patients (Table 4). The molecular analysis of the tumour was carried out by NGS in 93.3% (97/104) of patients, by the cobas® *EGFR* Test in tissue in 4.8% (5/104), by SCORPIONS and ARMS in 0.95% (1/104) and by 5' NUCLEASE ASSAY in 0.95% (1/104). Activating *EGFR* mutations were detected in tissue tumour in 24% (25/104) of patients.

The overall accuracy of plasma cfDNA testing was 95.2%. Global sensitivity of *EGFR* testing in plasma was 78.3% and specificity 100%. The positive predictive value of the test was 100%, while the negative predictive value of the test was 94.2%.

Among patients with no *EGFR* mutations detected in cfDNA ($n=86$), seven of them harbored an *EGFR* mutation in the tumour tissue (8.2% of patients). Five discrepant cases were stage IV adenocarcinoma patients, one was a stage III adenocarcinoma patient and one was

Table 4 Concordance between the EGFR mutation status in tissue and plasma samples in advanced or metastatic NSCLC TKI-naïve patients

	TISSUE SAMPLE	
	EGFR mutation (n=23)	EGFR wild-type (n=81)
cfDNA		
EGFR mutation (n=18)	18	0
EGFR wild-type (n=86)	5	81
Sensitivity (95%, CI), %	78.3 (89.2–97.9)	
Specificity (95%, CI), %	100 (95.5–100)	
PPV (95%, CI), %	100 (82.4–100)	
NPV (95%, CI), %	94.2 (87.1–97.5)	
Overall concordance (95%, CI), %	95.2 (89.2–97.9)	

n, sample size; cfDNA, circulating-free DNA; EGFR, epidermal growth factor receptor; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

a stage IV NSCLC patient. Tissue testing identified an Ex19Del *EGFR* mutation in four tumors, a p.L858R in one tumor and an *EGFR* mutation not included in the cobas® *EGFR* Test in two tumors. In these two tumors, the alterations were a point mutation in exon 18 (c.211T>C; p.(Ile706Thr) plus a deletion in exon 19 in one case (c.2260_2277del18 (Lys754_Ile759del)) and an insertion in exon 20 (c.2317_2318insGTT) and an insertion in exon 20 (c.2317_2318insGTT) in the other case. Patients with concordant *EGFR* results in tissue and plasma and those with discordant results showed similar cfDNA concentration (28.8 vs. 30.3; P=0.73) suggesting that discordant results were not related to the initial amount of cfDNA. In addition, an oncogenic driver mutation in other genes was detected in 81.0% (64/79) of patients by tissue testing.

There was no available tumor tissue for molecular characterization in 39.9% (69/173) of NSCLC patients. Molecular characterization and posterior clinical management of these patients was carried out exclusively by testing the *EGFR* gene in plasma. We detected *EGFR* mutations in plasma in 34.8% of these cases (24/69), all of them diagnosed with adenocarcinoma, except for one patient diagnosed with NSCLC. Deletions of exon 19 and p.L858R point mutations accounted for 62.5% (15/24) and 33.3% (8/24) of cases respectively, while the G719X mutation was found in one case (4.2%).

Discussion

In the present study, we report the impact of introducing the analysis of cfDNA from plasma in a cohort of advanced or metastatic NSCLC TKI-naïve patients in a real-world clinical setting. The introduction of cfDNA testing in clinical diagnostics laboratories is a challenge for laboratory professionals (29) since both pre-analytical factors and the methodological approach used for cfDNA testing impact the robustness of the assay (30–32). The cobas® *EGFR* Test was introduced into the clinical practice of our hospital in 2017 to prospectively identify *EGFR* mutant NSCLC patients at baseline for treatment selection. In our study, the test showed a high diagnostic accuracy as previously reported in other studies (18,21). The clinical performance of the test reached similar values to other current approaches such as BEAMing dPCR (10) or NGS (20) which are more complex tests with longer turnaround times (8,33). In our cohort, we found *EGFR* mutations in 24.3% of patients and a mutation distribution similar to a recent study in NSCLC patients of European origin (21), but higher when compared to other cohorts (34,35). Such differences might be related to clinical and demographic characteristics, as well as patient selection biases. We found a distinct prevalence and distribution of *EGFR* mutations which depends on the histopathological tumor subtype and the clinical characteristics of the patients such as gender and smoking habit, as observed in NSCLC patient cohorts molecularly characterized by tumor tissue testing (33–35). This highlights the fact that cfDNA from plasma accurately reflects the molecular status of the tumor. A potential limitation of our study is that different approaches were used for tissue *EGFR* testing. However, NGS was used in the vast majority of patients, with various other methodologies used in the rest of the patients. All methods are adequate in terms of sensitivity and specificity (36,37) with the main difference being that NGS covers all possible mutations in the *EGFR* gene while the other methods are limited to specific *EGFR* mutations.

Although cfDNA is an optimal source for *EGFR* testing in NSCLC patients, undetectable *EGFR* mutations in plasma still are present in up to 20% of patients (18,35,38). In our cohort, a negative result by cfDNA testing was obtained in 8.2% of mutant *EGFR* NSCLC patients. Moreover, in two p.L858R *EGFR* NSCLC patients the test reported the mutation in one of the two distinct vials from the same blood extraction. The lack of detection of the *EGFR* mutation in cfDNA might be due to biological factors, such as a low concentration of cfDNA or low

allelic fraction of ctDNA (18,39), or related to intrinsic technical factors of the assay. The analytical sensitivity of the Cobas EGFR Mutation Test v2 RT-PCR is limited to specific target EGFR mutations which have distinct sensitivity (14). Despite these limitations, implementing an initial *EGFR* testing in plasma prior to a tissue analysis in the clinical routine would accurately identify most of *EGFR* mutated locally in advanced or metastatic NSCLC patients with fast laboratory turnaround times. In addition, the straightforward analysis of cfDNA for *EGFR* testing would reduce the intrinsic issues related to the lack of tumor tissue for molecular characterization which occurs in a substantial subset of patients (8). This was supported by our cohort, where no tissue sample was available in 39.9% of patients. Among them, 34.8% of patients presented an *EGFR* mutation in cfDNA and received a targeted therapy immediately, underlining the important clinical impact of this strategy. Thus, the inclusion of *EGFR* analysis by non-invasive methods in the clinical setting is crucial to apply personalized medicine strategies especially in those NSCLC patients with no tissue tumor available. Although *EGFR* testing in plasma can reduce the time before starting treatment, a tissue biopsy is desirable when possible to properly classify patients histologically to avoid inappropriate treatment in patients with metastasis from an unknown primary, or primary lung cancer other than NSCLC, as TKIs are currently only approved for NSCLC.

In addition to an initial molecular stratification, cfDNA testing in NSCLC patients is mostly used for the evaluation of disease progression, prognosis, and treatment response. The mutant allele fraction (MAF) has been proposed as a potential marker for disease outcome in treated NSCLC patients since the MAF increases with the disease stage and tumor burden (40,41). Furthermore, a semi-quantitative index (SQI) of mutated allele fractional abundance (MAFA) has been correlated to a shorter progression-free survival and overall survival in *KRAS* mutated NSCLC patients (42). The cobas® EGFR Test provides a SQI value similar to the MAF value (8). We obtained significantly higher SQI values for the Ex19Del mutant tumors than for the L858R mutant tumors, and we did not observe any difference regarding disease stage or cfDNA concentration. In addition, we found no differences in cfDNA concentration among the *EGFR* mutations, as previously reported (43).

A pilot external quality assurance (EQA) study has previously demonstrated the imprecision of SQI for various *EGFR* mutations. The EQA study showed that distinct mutations with the same allele frequency resulted

in different SQI values which were higher for the Ex19Del mutations (14). Moreover, the SQI value in our study showed only moderate reproducibility. A study conducted in samples from NSCLC patients observed that the SQI value does not accurately correlate with the number of mutant copies/mL (44). Thus, the lack of correlation between SQI and cfDNA concentration observed in our cohort suggest that technical factors impact the SQI value reported by the assay. This data indicates that the SQI value has only a moderate clinical utility as a follow-up biomarker in NSCLC patients since SQI variation during longitudinal monitoring of patients might not reflect changes in tumor development. Additional longitudinal studies in NSCLC patients are required to fully elucidate the relevance of the SQI value for each target mutation included in the assay prior to its implementation in the clinical routine.

The concentration of cfDNA has also been suggested as a plausible biomarker for tumor burden and prognosis in lung cancer patients (45–47). As observed in our cohort, higher levels of cfDNA are found in stage IV patients compared to stage III patients (48). We found a high diagnostic value of cfDNA concentration with a threshold value of 20 ng/mL to identify stage IV NSCLC patients with 72.3% sensitivity and 95% specificity. The obtained AUC value of 0.86 is excellent (49), indicating that cfDNA concentration is an optimal biomarker for diagnostic purposes. CfDNA levels are routinely measured, after cfDNA extraction, by accurate and standardized techniques (50). Thus, to include the cfDNA concentration result in the laboratory report would represent a fast and optimal strategy for NSCLC patient stratification.

The fragment pattern in NSCLC patients provides further information. Soliman *et al.* evaluated the diagnosis and prognosis value of cfDNA integrity by analyzing serum from NSCLC patients (46). They found that cfDNA integrity, calculated as the ratio between longer and shorter DNA fragments, is higher in NSCLC patients than in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients and control subjects, and that lower cfDNA integrity is related with better survival. In our cohort, stage IV patients showed a higher fraction of 100–250 bp fragments. Apoptosis processes, which are associated with malignant progression and metastasis of cancer (51), promote the release of short cfDNA fragments. Thus, we hypothesized that the fraction of 100–250 bp fragments might be a biomarker for apoptosis in NSCLC patients. In fact, we found that the fraction of 100–250 bp showed a limited predictive value to identify stage IV NSCLC patients when compared to cfDNA concentration. To date, there is no consensus about the

method used to measure cfDNA fragmentation. Current methods in use show variability in terms of the quality of the results (52). While capillary electrophoresis has shown good accuracy and reproducibility of the size distribution, it is sensitive to the presence of impurities in the samples, which could affect the results. However, it is simpler and faster than more accurate techniques such as quantitative real-time PCR (q-PCR), whose main disadvantage is the impact of gDNA contamination and requires the parallel analysis of reference samples; droplet digital PCR (ddPCR), which is sensitive to enzymatic inhibitors and might need a re-extraction process to ensure the quality of the sample; and NGS methods, which, while being the most accurate, are costly and time consuming. Additional studies are necessary to compare these more sensitive methods to capillary electrophoresis to assess the clinical significance of cfDNA fragmentation pattern as a biomarker in lung cancer patients and its potential introduction to clinical routine practice.

In summary, the introduction of plasma *EGFR* mutation analysis has proven useful as an initial approach for molecular characterization of locally advanced or metastatic NSCLC patients at diagnosis using a commercially available RT-PCR method. However, the low reproducibility and lack of correlation of the manufacturer's SQI value with biological parameters limit its utility in the clinical practice. In addition, the study suggests that cfDNA concentration and cfDNA fragmentation pattern are interesting biomarkers for tumor stage in lung cancer patients.

Acknowledgments

The authors would like to dedicate this manuscript to Dr. Rafael Molina, who recently passed away and was a significant contributor to this study. His dedication and passion to the field of cancer were an inspiration to all of us. The authors also would like to thank the patients for their participation in the study and the study staff who were involved in collecting specimen material at the study sites. The authors would like to express our gratitude to Dr. James Hugall for providing language help for the manuscript.

Funding: This work was supported by Hoffman-La Roche Ltd., who supplied the reagents cobas[®] cfDNA Sample Preparation Kit and cobas[®] EGFR Mutation Test v2 to carry out the study. Hoffman-La Roche Ltd. has not been involved in the design, execution of the study, results interpretation nor manuscript elaboration.

Footnote

Reporting Checklist: The authors have completed the STARD reporting checklist. Available at <http://dx.doi.org/10.21037/jtd-20-3142>

Data Sharing Statement: Available at <http://dx.doi.org/10.21037/jtd-20-3142>

Conflicts of Interest: All authors have completed the ICMJE uniform disclosure form (available at <http://dx.doi.org/10.21037/jtd-20-3142>). Dr. NR reports personal fees from MSD, personal fees from AMGEN, personal fees from TAKEDA, personal fees from ASTRAZENECA, personal fees from NOVARTIS, personal fees from ABBVIE, personal fees from PFIZER, personal fees from GUARDANT HEALTH, personal fees from BOEHRINGER INGELHEIM, personal fees from ROCHE, personal fees from BMS, outside the submitted work. Dr. NV reports personal fees from ROCHE, personal fees from PFIZER, personal fees from LILLY and other financial relationships with BMS, BOEHRINGER INGELHEIM, LILLY and ASTRAZENECA, outside the submitted work. The other authors have no conflicts of interest to declare.

Ethical Statement: The authors are accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. The protocol was approved by the Hospital Clinic Ethics Committee (approval registration HCB/2016/0889) and was conducted in accordance with Declaration of Helsinki (as revised in 2013). Written informed consent was obtained from all patients.

Open Access Statement: This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0), which permits the non-commercial replication and distribution of the article with the strict proviso that no changes or edits are made and the original work is properly cited (including links to both the formal publication through the relevant DOI and the license). See: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

References

1. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014

- [Online]. World Heal Organ. Epub ahead of print 2014. DOI: 9283204298.
2. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol* 2017;7:193.
 3. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:339-46.
 4. Nan X, Xie C, Yu X, et al. EGFR TKI as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8:75712-26.
 5. Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: Learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:473-81.
 6. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Patho. *J Thorac Oncol* 2013;8:823-59.
 7. Novello S, Barlesi F, Califano R, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016;27:v1-v27.
 8. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients. *J Thorac Oncol* 2015;10:1437-43.
 9. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014;32:579-86.
 10. Karlovich C, Goldman JW, Sun JM, et al. Assessment of EGFR mutation status in matched plasma and tumor tissue of NSCLC patients from a phase I study of rociletinib (CO-1686). *Clin Cancer Res* 2016;22:2386-95.
 11. Arriola E, Paredes-Lario A, García-Gomez R, et al. Comparison of plasma ctDNA and tissue/cytology-based techniques for the detection of EGFR mutation status in advanced NSCLC: Spanish data subset from ASSESS. *Clin Transl Oncol* 2018;20:1261-7.
 12. Keppens C, Palma JF, Das PM, et al. Detection of EGFR Variants in Plasma: A Multilaboratory Comparison of a Real-Time PCR EGFR Mutation Test in Europe. *J Mol Diagn* 2018;20:483-94.
 13. Vollbrecht C, Lehmann A, Lenze D, et al. Validation and comparison of two NGS assays for the detection of EGFR T790M resistance mutation in liquid biopsies of NSCLC patients. *Oncotarget* 2018;9:18529-39.
 14. Kim Y, Shin S, Lee KA. A Comparative Study for Detection of EGFR Mutations in Plasma Cell-Free DNA in Korean Clinical Diagnostic Laboratories. *Biomed Res Int* 2018;2018:7392419.
 15. Singh AP, Li S, Cheng H. Circulating DNA in EGFR-mutated lung cancer. *Ann Transl Med* 2017;5:379.
 16. Normanno N, Denis MG, Thress KS, et al. Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8:12501-16.
 17. Szumera-Ciećkiewicz A, Olszewski WT, Tysarowski A, et al. EGFR mutation testing on cytological and histological samples in non-small cell lung cancer: A Polish, single institution study and systematic review of European incidence. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6:2800-12.
 18. Thress KS, Brant R, Carr TH, et al. 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.
 19. Li Y, Xu H, Su S, et al. Clinical validation of a highly sensitive assay to detect EGFR mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2017;12:1-14.
 20. Li BT, Janku F, Jung B, et al. Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium. *Ann Oncol* 2019;30:597-603.
 21. Soria-Comes T, Palomar-Abril V, Ureste MM, et al. Real-World Data of the Correlation between EGFR Determination by Liquid Biopsy in Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) and the EGFR Profile in Tumor Biopsy. *Pathol Oncol Res* 2020;26:845-51.
 22. Szepechinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer* 2015;113:476-83.
 23. Yoon KA, Park S, Lee SH, et al. Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. *J Mol Diagn* 2009;11:182-5.
 24. Weng JL, Atyah M, Zhou CH, et al. Progress in quantitative technique of circulating cell free DNA and its role in cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Genet* 2019;239:75-84.
 25. Provencio M, Torrente M, Calvo V, et al. Prognostic value of quantitative ctDNA levels in non small cell lung cancer patients. *Oncotarget* 2018;9:488-94.

26. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif* 2019;17:100087.
27. Lapin M, Oltedal S, Tjensvoll K, et al. Fragment size and level of cell-free DNA provide prognostic information in patients with advanced pancreatic cancer. *J Transl Med* 2018;16:300.
28. Arko-Boham B, Aryee NA, Blay RM, et al. Circulating cell-free DNA integrity as a diagnostic and prognostic marker for breast and prostate cancers. *Cancer Genet* 2019;235-236:65-71.
29. Jiménez W. Liquid biopsy. A challenge for clinical laboratories. *Adv Lab Med* 2020;1.
30. Arechederra M, Ávila MA, Berasain C. Liquid biopsy for cancer management: a revolutionary but still limited new tool for precision medicine. *Adv Lab Med* 2020;1.
31. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta* 2015;450:243-53.
32. Sorber L, Zwaenepoel K, Jacobs J, et al. Circulating Cell-Free DNA and RNA Analysis as Liquid Biopsy: Optimal Centrifugation Protocol. *Cancers (Basel)* 2019;11:458.
33. Steendam CMJ, Atmodimedjo P, de Jonge E, et al. Plasma Cell-Free DNA Testing of Patients With EGFR Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: Droplet Digital PCR Versus Next-Generation Sequencing Compared With Tissue-Based Results. *JCO Precis Oncol* 2019; 1-9.
34. Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2016;7:78985-993.
35. Reck M, Hagiwara K, Han B, et al. CtDNA determination of EGFR mutation status in European and Japanese patients with advanced NSCLC: The ASSESS study. *J Thorac Oncol* 2016;11:1682-9.
36. Ellison G, Zhu G, Moulis A, et al. EGFR mutation testing in lung cancer: A review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J Clin Pathol* 2013;66:79-89.
37. Mehta A, Vasudevan S, Sharma SK, et al. Biomarker testing for advanced lung cancer by next-generation sequencing; a valid method to achieve a comprehensive glimpse at mutational landscape. *Appl Cancer Res* 2020;40:4.
38. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. 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.
39. Alegre E, Fusco JP, Restituto P, et al. Total and mutated EGFR quantification in cell-free DNA from non-small cell lung cancer patients detects tumor heterogeneity and presents prognostic value. *Tumour Biol* 2016;37:13687-94.
40. Del Re M, Bordi P, Rofi E, et al. The amount of activating EGFR mutations in circulating cell-free DNA is a marker to monitor osimertinib response. *Br J Cancer* 2018;119:1252-8.
41. Shen S, Wei Y, Zhang R, et al. Mutant-allele fraction heterogeneity is associated with non-small cell lung cancer patient survival. *Oncol Lett* 2018;15:795-802.
42. Zulato E, Attili I, Pavan A, et al. Early assessment of KRAS mutation in cfDNA correlates with risk of progression and death in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2020;123:81-91.
43. Zhang Y, Xu Y, Zhong W, et al. Total DNA input is a crucial determinant of the sensitivity of plasma cell-free DNA EGFR mutation detection using droplet digital PCR. *Oncotarget* 2017;8:5861-73.
44. Macías M, Alegre E, Alkorta-Aranburu G, et al. The Dynamic Use of EGFR Mutation Analysis in Cell-Free DNA as a Follow-Up Biomarker during Different Treatment Lines in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Dis Markers* 2019;2019:7954921.
45. Tissot C, Toffart AC, Villar S, et al. Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *Eur Respir J* 2015;46:1773-80.
46. Soliman SES, Alhanafy AM, Habib MSE, et al. Serum circulating cell free DNA as potential diagnostic and prognostic biomarker in non small cell lung cancer. *Biochem Biophys Rep* 2018;15:45-51.
47. Hanibuchi M, Kanoh A, Kuramoto T, et al. Development, validation, and comparison of gene analysis methods for detecting EGFR mutation from non-small cell lung cancer patients-derived circulating free DNA. *Oncotarget* 2019;10:3654-666.
48. Mirtavoos-Mahyari H, Ghafouri-Fard S, Khosravi A, et al. Circulating free DNA concentration as a marker of disease recurrence and metastatic potential in lung cancer. *Clin Transl Med* 2019;8:14.
49. Mandrekar JN. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *J Thorac Oncol* 2010;5:1315-6.
50. Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, 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.
51. Wang RA, Li QL, Li ZS, et al. Apoptosis drives cancer

- cells proliferate and metastasize. *J Cell Mol Med* 2013;17:205-11.
52. Alcaide M, Cheung M, Hillman J, et al. Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. *Sci Rep* 2020;10:12564.

Cite this article as: González de Aledo-Castillo JM, Arcocha A, Victoria I, Martínez-Puchol AI, Sánchez C, Jares P, Rodríguez GF, Viñolas N, Reyes R, Reguart N, Puig-Butillé JA. Molecular characterization of advanced non-small cell lung cancer patients by cfDNA analysis: experience from routine laboratory practice. *J Thorac Dis* 2021;13(3):1658-1670. doi: 10.21037/jtd-20-3142

PUBLICACIÓN 2

Cell-free DNA concentration and fragment size fraction correlate with FDG PET/CT-derived parameters in NSCLC patients

Objetivo específico de este artículo

- Evaluar la asociación entre la concentración de cfDNA y la fracción de los tamaños de sus fragmentos con parámetros derivados del FDF PET/TC y del TC correspondientes a las lesiones primarias, extrapulmonares y a la enfermedad global en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas no tratados previamente.



Cell-free DNA concentration and fragment size fraction correlate with FDG PET/CT-derived parameters in NSCLC patients

JM. González de Aledo-Castillo¹ · S. Casanueva-Eliceiry² · A. Soler-Perromat³ · D. Fuster^{2,4,6,7} · V. Pastor⁸ · N. Reguart^{4,5,6} · N. Viñolas⁵ · R. Reyes⁵ · I. Vollmer^{3,4} · P. Paredes^{2,4,6,7} · JA. Puig-Butillé^{4,6,8}

Received: 24 November 2020 / Accepted: 7 March 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Purpose The aim of our study was to investigate the correlation between cfDNA concentration and fragment size fraction with FDG PET/CT- and CT-derived parameters in untreated NSCLC patient.

Methods Fifty-three patients diagnosed of locally advanced or metastatic NSCLC who had undergone FDG PET/CT, CT and cfDNA analysis prior to any treatment were included in this retrospective study. CfDNA concentration was measured by fluorometry and fragment size fractions were determined by microchip electrophoresis. [¹⁸F]F-FDG PET/CT was performed and standardised uptake values (SUV), metabolic tumour volume (MTV) and total lesion glycolysis (TLG) were calculated for primary, extrapulmonary and total disease. CT scans were evaluated according to RECIST 1.1 criteria.

Results CfDNA concentration showed a positive correlation with extrapulmonary MTV ($r^2 = 0.36$, $P = 0.009$), and extrapulmonary TLG ($r^2 = 0.35$, $P = 0.009$) and their whole-body (wb) ratios. Higher concentrations of total cfDNA were found in patients with liver lesions. Short fragments of cfDNA (100–250 bp) showed a positive correlation with extrapulmonary MTV ($r^2 = 0.49$, $P = 0.0005$) and extrapulmonary TLG ($r^2 = 0.39$, $P = 0.006$) and their respective wb ratios, and a negative correlation with SUVmean ($r^2 = -0.31$, $P = 0.03$) and SUVmean/SUVmax ratio ($r^2 = -0.34$, $P = 0.02$). A higher fraction of short cfDNA fragments was found in patients with liver and pleural lesions.

Conclusions This study supports the hypothesis that cfDNA concentration and short cfDNA fragment size fraction reflect the tumour burden as well as metabolic activity in advanced NSCLC patients. This suggests their suitability as complementary tests for a more accurate diagnosis of tumour metabolic behaviour and to allow personalised therapies.

Keywords NSCLC · cfDNA concentration · cfDNA fragment size fractions · FDG PET/CT · CT

P. Paredes and JA. Puig-Butillé contributed equally to this manuscript

This article is part of the Topical Collection on Oncology - Chest.

✉ JA. Puig-Butillé
japuig@clinic.cat

¹ Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

² Nuclear Medicine Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

³ Radiology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁴ Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁵ Medical Oncology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁶ August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁷ Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁸ Molecular Biology CORE, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

Introduction

Lung cancer is one of the most prevalent and lethal cancers worldwide [1]. To guide accurate therapeutic decision-making, current stratification of non-small-cell lung cancer (NSCLC) is based on tumour staging and molecular profiling [2], which has resulted in significant improvements to overall survival through increasingly personalised treatments [3]. Further incorporation of additional tumour features, based on imaging and molecular parameters, may provide more precise information on lung cancer prognosis allowing improved treatment choices and appropriate follow-up plans.

Cell-free DNA (cfDNA) has emerged as an alternative source for molecular diagnosis in lung cancer [4, 5] and a surrogate marker for prognosis and treatment response [6–11]. CfDNA is composed of fragments of DNA with variable length released by both non-tumoural and tumoural cells

into a variety of biologic fluids including plasma. Levels of cfDNA are significantly elevated in cancer patients (including lung cancer patients) compared to non-cancer subjects [12] and are associated with disease prognosis and relapse [13].

The fragment size fraction of cfDNA is associated with the release mechanism of cfDNA. Apoptotic cfDNA size is between 160 and 180 base pairs (bp), with a modal size of 166 bp and apoptotic activity might also produce larger fragments corresponding to di (332 bp), tri (498 bp) or polynucleosomes. Necrosis results in nuclear chromatin clumping and non-specific digestion, producing cfDNA fragments that are typically larger than 10,000 bp. Fragments between 1000 and 3000 bp are associated with active release processes [14]. Although DNA fragments released from tumours are shorter compared to those released from non-malignant cells [15–17], the significance of precise cfDNA fragment length patterns is poorly understood. In clinical practice, the diagnostic and prognostic value of short fragments of cfDNA has been observed in renal cell carcinoma [18], pancreatic cancer [19] and lung cancer [20].

Routine imaging of NSCLC for diagnosis includes computed tomography (CT) combined with 2-[¹⁸F]F-FDG PET/CT (FDG PET/CT), a radiolabelled glucose analogue which accumulates in tissues with high glucose metabolism. The degree of FDG uptake is assessed by the maximum standardised uptake value (SUV_{max}) in routine practice, but other quantitative volumetric parameters, such as total lesion glycolysis (TLG), which incorporates both the metabolic activity measured as the mean level of tumour glucose intake (SUV_{mean}) and volumetric data obtained by the metabolic tumour volume (MTV), have gained interest over the last decade as prognostic markers of survival in several tumour types [21–23]. Volumetric parameters such as TLG and MTV represent the tumour burden more accurately than the tumour burden assessed by the CT scan alone, as they take into account the metabolic activity of the disease.

To date, little is known about the relationship between cfDNA or ctDNA concentration and volumetric parameters extracted from FDG PET/CT. A few studies do exist for various tumour types [24–27], including non-small-cell lung cancer (NSCLC) [28–30], but they use differing approaches, comparing the parameters only either to the primary tumour [27] or to the whole-body disease [30], and present conflicting conclusions. In fact, these studies have yet to show any clear correlations. They do, however, hint at the potential of cfDNA concentration as a biomarker for tumour metabolic behaviour. Moreover, the association between FDG PET/CT parameters and cfDNA fragment size fraction has yet to be investigated.

This study sought to investigate the association between cfDNA concentration and fragment size fraction, and various FDG PET/CT and CT parameters derived from the primary lesion, the extrapulmonary lesions and the whole-body disease, in a single cohort of non-treated advanced NSCLC patients.

Material and methods

Patient enrolment

The study included a retrospective cohort of 102 patients diagnosed with locally advanced or metastatic NSCLC at Hospital Clínic of Barcelona between November 2016 and June 2018. All patients had cfDNA collected for analysis. Among the initial cohort, we only evaluated those patients that fulfilled the following criteria: (a) cfDNA analysis before treatment, (b) interval between radiological examination and blood extraction less than 2 months, (c) no previous surgery and (d) availability of a complete FDG PET/CT examination (Fig. 1).

Clinical data such as gender, age, tumour histology, disease stage, smoking status and molecular status of *EGFR* in plasma were obtained from medical records.

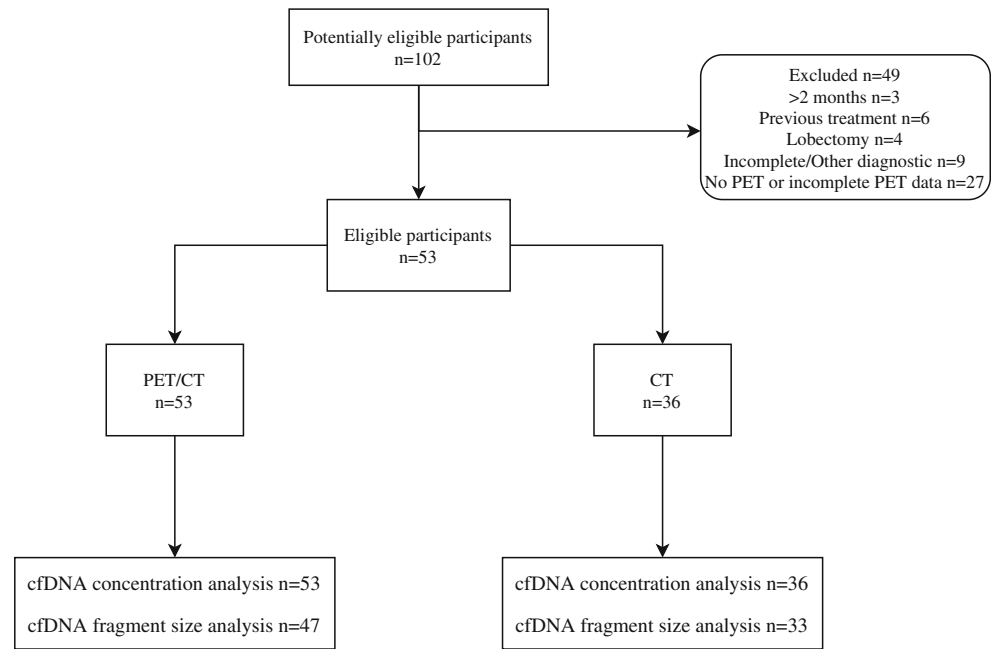
The patients belong to a prospective observational study approved by the Hospital Clínic Ethics Committee (approval registration number HCB/2016/0889) whose aim was to molecularly stratify NSCLC patients through cfDNA analysis. The study was conducted in accordance with the precepts of the Code of Ethics of The World Medical Association (Declaration of Helsinki). Written informed consent was obtained from all patients.

Isolation of cfDNA from plasma

For cfDNA analysis, peripheral whole blood was collected from each subject in a 5-mL EDTA-K2 tube. After 15 to 20 min at rest in an upright position at room temperature, samples were centrifuged at 1600g for 10 min to collect 2 mL of plasma, which was transferred to a clean sterile tube. After a second centrifugation at 16,000g for 10 min, plasmas were stored at –20 °C. The entire procedure is completed within 3h of blood extraction. The cfDNA was isolated using the cobas® cfDNA sample preparation kit as per the manufacturer's instructions.

Determination of total cfDNA concentration and cfDNA fragment size fractions

The concentration of eluted cfDNA was measured using a Qubit 4 Fluorometer. The semiquantitative cfDNA fragment size fraction for each sample was determined by microchip electrophoresis using an Agilent 2100 Bioanalyzer and the Agilent High Sensitivity DNA. The Agilent 2100 Bioanalyzer software was used to obtain the fraction of cfDNA and average size from the electropherogram for the following ranks: 100–250 bp (short fragments) and 250–700 bp (medium fragments) (Fig. 2a). Samples fulfilling the quality criteria established in the laboratory were included in the analysis ($n = 47$). Determination of cfDNA fragment size

Fig. 1 Flow diagram of participants enrolled in the study

fractions and cfDNA levels were performed by individuals blinded to the clinical data.

CT scan

CT was performed on all patients at the time of diagnosis or during follow-up with various apparatus (Siemens Sensation 16, Siemens Sensation 64 and Siemens Flash 128; Erlangen, Germany). All the studies were carried out with the same exploration protocol: collimation of 5 mm with reconstruction of 3 mm in the mediastinal window and 1.5 mm in the lung window for the thoracic part; 5 mm collimation with 3 mm reconstruction in the soft tissue window for the abdomen.

All the studies were evaluated according to RECIST 1.1, with a maximum of five target lesions from the following regions: bone, adrenal glands, liver, pleura, as well as lymph node involvement. Additionally, global necrosis, which has been related to the presence of cfDNA [31], and carcinomatous lymphangitis, which has been suggested as a potential tumour size descriptor (T) in the TNM classification [32], were also considered as possible target lesions. The overall tumour burden was assessed as the sum of all target lesions. The primary lung lesion was considered as target lesion 1 in all cases.

[¹⁸F]F-FDG PET/CT scan

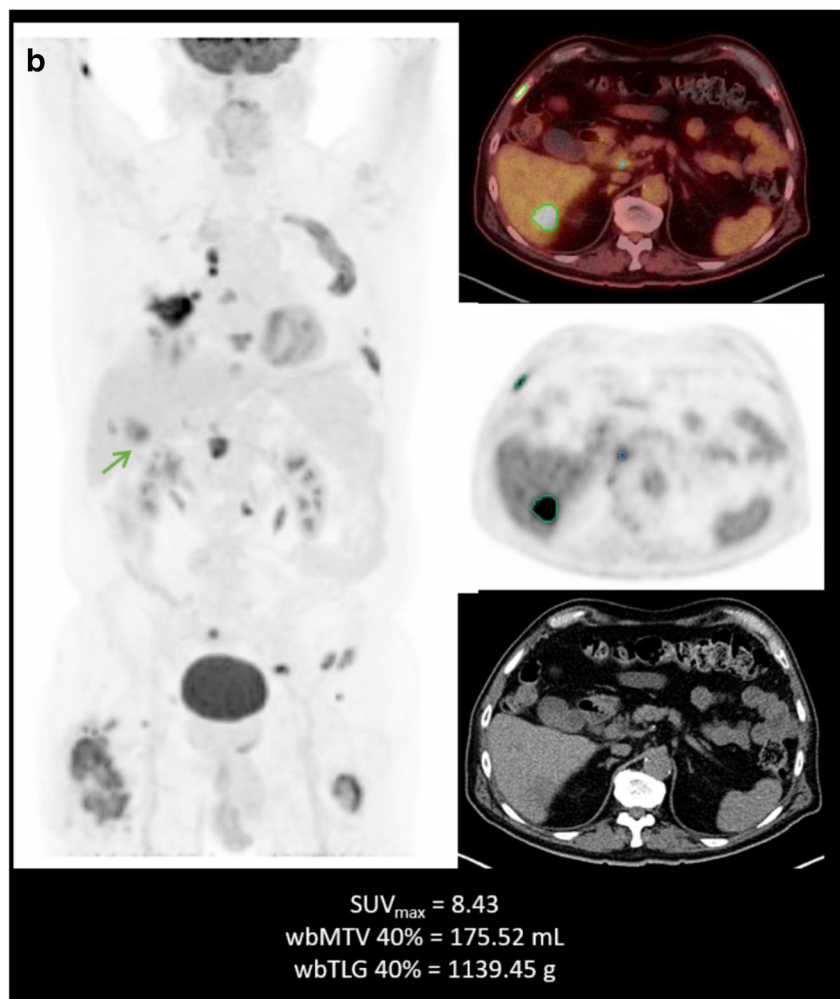
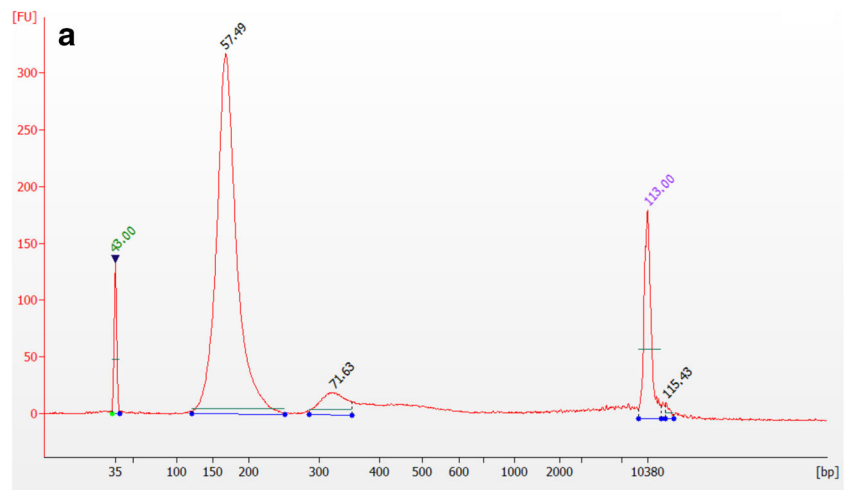
After a 6-h fasting period to achieve blood glucose concentrations below 160 mg/dL, patients were required to rest quietly in a dimly lit room during the 60 min following intravenous administration of about 4.07 MBq/kg 18F-FDG. PET/CT scans were performed using a Biograph mCT TrueV PET/

CT hybrid device (Siemens, USA), with a low-dose CT for attenuation correction and image fusion. FDG PET/CT imaging was acquired from the skull base to the proximal third thigh with arms raised above the head. PET data reconstruction was performed using a standard iterative algorithm from CT records.

Image interpretation

FDG PET/CT images were assessed using a workstation (syngo.PET&CT Oncology VA20A, Siemens Healthineers AG, Erlangen, Germany) by a physician in training and a senior nuclear medicine specialist who were blinded to the patients' clinical and molecular features. Any discrepancies were overcome by consensus. Pathological findings were defined as hypermetabolic lesions with higher uptake than the surrounding tissues. Spherical or ellipsoidal regions of interest were placed over all the pathological uptakes on attenuation-corrected PET and FDG PET/CT images, assuring the enclosure of the entire hypermetabolic lesion on axial, sagittal and coronal projections. SUV values (SUVmax and SUVmean) were then automatically calculated based on measured activity concentration (Bq/mL) multiplied by patient weight (kg) and normalised to injected activity (Bq). The highest SUVmax of all the malignant lesions was considered for analysis. To obtain MTV values, the contouring margins of each lesion were delimited by a threshold of 40% SUVmax using an SUV-based automated contouring program. Volumetric whole-body analysis was performed to assess the metabolic tumour burden, including all metabolic lesions: primary lung tumour, lymph nodes and distant metastases, which together constitute the whole-body metabolic tumour burden. The sum of the

Fig. 2 Electropherogram and FDG PET/CT images of one of the patients included in the study **(a)** cfDNA fragment size electropherogram pattern. The main peak corresponds to 169 bp, related to apoptotic events. **(b)** Measurement of SUV_{max} , wbMTV and wbTLG. On the left side, maximum intensity projection (MIP) in a coronal and right lateral view of FDG PET/CT and on the right side axial fused FDG PET/CT. PET and CT images of a patient with hypermetabolic metastases in the pleura



MTV of each lesion was defined as the whole-body (wb) MTV (wbMTV) and wb TLG (wbTLG) was the summation of the MTV of each lesion multiplied by its SUV_{mean} (Fig. 2b). SUV_{max} , SUV_{mean} , MTV and TLG were recorded for the primary tumour and calculated for the whole disease, as

described. To avoid bias from large areas of necrosis, SUV_{mean} was also registered and the ratio SUV_{max}/SUV_{mean} was calculated for the primary tumour and the whole-body disease (“mean_max_primary_ratio” and “mean_max_wb_ratio”, respectively). In addition,

considering lung cancer's dissemination routes, four groups were defined for metastatic analysis: bone, adrenal glands, liver and pleura. The presence of lesions in one of these locations was considered as extrapulmonary disease, and volumetric parameters were registered as the sum of the volumetric parameters in all these locations: extrapulmonary MTV (EP_MTV) and extrapulmonary TLG (EP_TLG). The presence of necrosis was registered on both FDG PET/CT and CT, and lymphangitis and nodal metastases were recorded on the latter only. To evaluate the role of metastatic disease over the volume of the whole-body disease, a ratio between extrapulmonary disease and the whole-body disease was calculated ("EP_MTV_wb_ratio" and "EP_TLG_wb_ratio").

Statistical analysis

The association among cfDNA concentration, cfDNA fragment fractions and CT and FDG PET/CT-derived parameters was calculated using the Spearman rank correlation coefficient. Mann-Whitney *U* unpaired tests were performed to evaluate differences in cfDNA and cfDNA fragment fractions with respect to the presence or absence of necrosis, bone, adrenal, liver and pleura lesions for FDG PET/CT and global necrosis, bone, adrenal, liver, pleura lesions, lymph node involvement and carcinomatous lymphangitis for CT. Results were considered statistically significant with *P* values <0.05. All statistical analysis was performed using STATA/IC software version 13.1 (StataCorp LLC, TX, USA).

Results

Patient characteristics

The evaluated cohort included 53 NSCLC patients, 58.5% (31/53) male and 41.5% (22/53) female. Overall, 79.3% (42/53) of patients were diagnosed with lung adenocarcinoma and 20.7% (11/53) of patients with tumours of other NSCLC histological types. Stage III and Stage IV patients accounted for 7.6% (4/53) and 92.4% (49/53) of patients, respectively. The distribution of patients based on smoking habit was 15.1% (8/53) current smokers, 56.6% (30/53) former smokers and 28.3% (15/53) never smokers. *EGFR* mutation in cfDNA in plasma was detected in 22.6% (12/53) of patients (Table 1). Median time between molecular analysis and imaging examination was 13 days (range 0–57) for FDG PET/CT and 28 days (range 0–64) for CT.

All patients underwent FDG PET/CT study, of which 81% (43/53) presented at least one metastatic lesion. Among them, 49.1% (26/53) presented necrotic lesions and metastatic sites included bone (41.5%, 22/53), pleura (39.6%, 21/53), adrenal gland (30.2%, 16/53) and liver (17.0%, 9/53). A CT examination was available in 67.9% (36/53) of patients, of which

Table 1 Patient cohort characteristics

Characteristics	<i>n</i> (%)
Age (y) median (range)	66 (41–84)
Gender	
Male	31 (58.5)
Female	22 (41.5)
Smoking history	
Currently smokers	8 (15.1)
Former smokers	30 (56.6)
Never smokers	15 (28.3)
Histology and stage	
Adenocarcinoma	42 (79.3)
Other NSCLC	11 (20.7)
Stage III	4 (7.6)
Adenocarcinoma	3 (7.1)
Other NSCLC	1 (9.0)
Stage IV	49 (92.4)
Adenocarcinoma	39 (92.9)
Other NSCLC	10 (91.0)
<i>EGFR</i> status in plasma cfDNA	
Mutated <i>EGFR</i>	12 (22.6)
No mutated <i>EGFR</i>	41 (77.4)

EGFR, epidermal growth factor receptor; *n*, sample size; *NSCLC*, non-small-cell lung cancer

91.7% (33/36) presented at least one metastatic lesion. Among them, 41.7% (15/36) presented necrotic lesions and metastatic sites included the following: bone (16.7%, 6/36), pleura (52.8%, 19/36), adrenal gland (11.1%, 4/36), liver (13.9%, 5/36), lymph nodes (61.1%, 22/36) and carcinomatous lymphangitis (22.2%, 8/36).

We observed differences among the histopathological type of tumour and FDG PET/CT parameters. Patients with adenocarcinoma tumours showed a lower median total TLG compare to other NSCLC subtypes (282 vs. 955, *P* = 0.01), as well as a lower total SUVmax (13.6 vs. 17.6, *P* = 0.04). A trend towards significance was also observed in the total SUVmean (8.36 vs. 9.71, *P* = 0.05) (Table 2). In contrast, no differences in cfDNA concentration or fragment size pattern were found among histopathological type of tumours.

The concentration of cfDNA correlates with metabolic status of extrapulmonary disease and the presence of liver lesions in advanced NSCLC patients

The median cfDNA concentration in the set of patients was 25.3 ng/mL (range 7.5–428). The FDG PET/CT parameters were analysed according to the primary tumour, extrapulmonary disease and whole-body disease. The concentration of cfDNA did not correlate with the primary tumour or

Table 2 FDG PET/CT- and CT-derived parameters for tumour histology

	Variable	Adenocarcinoma		Other NSCLC		<i>P</i>
		<i>n</i>	Median (range)	<i>n</i>	Median (range)	
PET/CT parameters						
Primary tumour	SUVmax	42	11.97 (4.99–30.18)	11	16.11 (9.89–35.11)	0.07
	SUVmean	42	7.11 (2.95–18.85)	11	9.51 (6.22–19.73)	0.07
	Mean_max ratio	42	0.59 (0.49–0.67)	11	0.60 (0.52–0.66)	0.97
	MTV	42	10.28 (0.80–279.13)	11	37.22 (0.80–120.88)	0.25
	TLG	42	65.20 (5.85–2191.81)	11	361.50 (5.33–1552.57)	0.11
Whole Body	SUVmax	42	13.62 (6.59–48.15)	11	17.06 (12.19–35.11)	0.04
	SUVmean	42	8.36 (3.60–29.02)	11	9.71 (7.14–19.79)	0.05
	Mean_max_ratio	42	0.60 (0.38–0.67)	11	0.59 (0.52–0.77)	0.93
	MTV	42	54.69 (1.74–345.41)	11	116.65 (8.86–304.26)	0.14
	TLG	42	282.03 (15.22–2706.70)	11	955.13 (65.52–2323.87)	0.01
Extrapulmonary disease	EP MTV	42	33.00 (0.00–335.16)	11	59.21 (0.00–183.38)	0.37
	EP MTV/wb MTV ratio	42	0.75 (0.00–0.98)	11	0.60 (0.00–0.97)	0.87
	EP TLG	42	162.09 (0.00–2532.3)0	11	369.22 (0.00–1502.32)	0.10
	EP TLG/wb MTV ratio	42	0.62 (0.00–0.98)	11	0.40 (0.00–0.94)	0.97
CT parameters	Tumour burden	25	81.00 (21.00–170.00)	8	119.00 (20.00–157.00)	0.31
	Target 1	28	48.50 (15.00–144.00)	8	51.00 (20.00–95.00)	0.73

CT, computed tomography; EP, extrapulmonary; *n*, sample size; MTV: metabolic tumour volume; NSCLC, non-small-cell lung cancer; PET/CT, 2-[¹⁸F]F-FDG PET/CT; SUV, standardised uptake value; TLG, total lesion glycolysis; wb, whole body

The meaning of the italic emphasis is to highlight the statistical significance

whole-body disease. In contrast, we found a positive correlation between the cfDNA concentration and the metabolic status of the extrapulmonary (EP) disease including EP_MTV ($r^2 = 0.36$, $P = 0.009$), EP_MTV_wb_ratio ($r^2 = 0.32$, $P = 0.02$), EP_TLG ($r^2 = 0.35$, $P = 0.0009$) and EP_TLG_wb_ratio ($r^2 = 0.33$, $P = 0.02$) (Table 3).

Next, we assessed the association between the concentration of cfDNA and thoracoabdominal CT. The concentration of cfDNA did not correlate with the whole-body tumour burden but, unlike FDG PET/CT, patients with lesions in the liver showed significantly higher levels of cfDNA compared to patients without liver lesions (149.63 vs. 21.71 ng/mL, $P = 0.01$) (Table 4).

The fraction of 100–250 bp cfDNA fragments is associated with metabolic characteristics of the primary tumour, extrapulmonary disease and liver metastases in advanced NSCLC patients

We detected both 100–250 bp (nucleosome fragments) and 250–700 bp (polynucleosomes fragments) in the cfDNA samples from all patients. The median size was 176 bp (range 153–183) and 439 bp (range 370–471) for each range of fragments. The median cfDNA fraction per patient was 37% (range 16–84) and 16% (range 3–28) for 100–250 bp and 250–700 bp cfDNA fragments, respectively. The remaining fraction included fragments longer than 700 bp.

The 100–250 bp cfDNA fragment fraction correlated with FDG PET/CT parameters from primary tumour, extrapulmonary disease and whole-body disease. However, variables showed a distinct pattern of correlation depending on the parameters of the disease evaluated (Table 5). The amount of 100–250 bp cfDNA fragments negatively correlated with the primary tumour's SUVmean ($r^2 = -0.31$, $P = 0.03$) and mean_max_primary_ratio ($r^2 = -0.34$, $P = 0.02$) and also showed a negative trend with SUVmax ($r^2 = -0.29$, $P = 0.05$). In contrast, we found a significant positive correlation with all other parameters related to the extrapulmonary disease, including EP_MTV ($r^2 = 0.49$, $P = 0.0005$), EP_MTV_wb_ratio ($r^2 = 0.49$, $P = 0.0004$), EP_TLG ($r^2 = 0.39$, $P = 0.006$) and EP_TLG_wb_ratio ($r^2 = 0.51$, $P = 0.0003$) (Fig. 3). Finally, we also found a positive correlation with whole-body MTV ($r^2 = 0.34$, $P = 0.02$) and a trend to significant negative correlation with the mean_max_wb_ratio ($r^2 = -0.29$, $P = 0.05$) (Table 5). No correlations were found for larger 250–700 bp cfDNA fractions, neither when evaluating correlations between 100 and 250 bp cfDNA fragments and thoracoabdominal CT tumour burden (Table 5).

When correlating according to the presence of specific lesion sites, a significantly higher fraction of 100–250 bp cfDNA was noted in patients with liver lesions both by thoracoabdominal CT (78.0 vs. 33.0%, $P = 0.02$) and FDG PET/CT examination (58.0 vs. 33.5%, $P = 0.01$) (Table 6). By FDG PET/CT examination, a significant correlation was also observed for patients with pleural lesions (42.0 vs. 32.5%,

Table 3 Correlation between total cfDNA concentration with PET/CT- and CT-derived parameters

Variable	<i>n</i>	Rho Spearman	<i>P</i>
PET/CT parameters			
Primary tumour			
SUVmax	53	0.10	0.47
SUVmean	53	0.10	0.47
Mean_max_ratio	53	-0.11	0.44
MTV	53	-0.10	0.47
TLG	53	-0.06	0.66
Whole body			
SUVmax	53	0.19	0.18
SUVmean	53	0.16	0.26
Mean_max_wb_ratio	53	-0.15	0.27
MTV	53	0.21	0.13
TLG	53	0.20	0.14
Extrapulmonary disease			
EP_MTV	53	<i>0.36</i>	<i>0.009</i>
EP_MTV_wb_ratio	53	<i>0.32</i>	<i>0.02</i>
EP_TLG	53	<i>0.35</i>	<i>0.009</i>
EP_TLG_wb_ratio	53	<i>0.33</i>	<i>0.02</i>
CT parameters			
Tumour burden	33	0.08	0.67
Target 1	36	-0.20	0.24

CT, computed tomography; EP, extrapulmonary; MTV, metabolic tumour volume; *n*, sample size; PET/CT, 2-[¹⁸F]F-FDG PET/CT; SUV, standardised uptake value; TLG, total lesion glycolysis; *wb*, whole body

The meaning of the italic emphasis is to highlight the statistical significance

P = 0.02) (Table 6). Finally, patients with carcinomatous lymphangitis showed a higher fraction of 250–700 bp cfDNA fragments (14.0 vs. 17.0%, *P* = 0.02).

Table 4 cfDNA concentration (ng/mL) in absence or presence of body lesions assessed by FDG PET/CT and CT

	Absence of lesions		Presence of lesions		<i>P</i>
	<i>n</i>	Median (range)	<i>n</i>	Median (range)	
PET/CT					
Necrosis	27	30.1 (7.5–427.5)	26	21.6 (10.7–149.6)	0.37
Bone	31	20.1 (7.5–188.8)	22	32.4 (12.8–427.5)	0.18
Adrenal	37	21.5 (7.5–427.5)	16	29.4 (11.7–74.3)	0.55
Liver	44	22.1 (7.5–188.8)	9	34.6 (13.6–427.5)	0.16
Pleural	32	26.0 (7.5–346.9)	21	22.4 (10.6–427.5)	0.86
CT					
Necrosis	21	34.6 (7.5–427.5)	15	21.5 (11.7–346.9)	0.34
Bone	30	28.2 (7.5–427.5)	6	17.1 (11.7–69.4)	0.16
Adrenal	32	27.1 (7.5–427.5)	4	21.6 (11.7–74.3)	0.76
Liver	31	21.7 (7.5–141.3)	5	149.6 (18.0–427.5)	<i>0.01</i>
Pleural	17	21.7 (7.5–346.9)	19	26.7 (10.6–427.5)	0.94
Lymph nodes	14	21.0 (7.5–53.3)	22	31.7 (7.5–427.5)	0.30
C. lymphangitis	28	26.0 (7.5–346.9)	8	24.4 (7.5–427.5)	0.79

C. lymphangitis, carcinomatous lymphangitis; CT, computed tomography; *n*, sample size; PET/CT, 2-[¹⁸F]F-FDG PET/CT

The meaning of the italic emphasis is to highlight the statistical significance

Discussion

In the present study, we assessed the correlation between cfDNA concentration and cfDNA fragment size fractions, and image derived parameters from FDG PET/CT and CT in a treatment-naïve patient population diagnosed with advanced NSCLC. In contrast to previous studies, which use a limited number of parameters [27, 28, 30] and focus mostly on the largest lesion [29], we analysed a range of FDG PET/CT volumetric parameters not only from the primary tumour but also from the extrapulmonary disease and whole-body disease. Furthermore, this is the first study to evaluate the correlation between cfDNA fragment size fractions and image parameters.

We found lower *wb_SUVmax* and *wb_TLG* values in adenocarcinoma tumour subtypes compared to other NSCLC subtypes. This suggests that distinct histopathological NSCLC tumours have different glucose metabolisms. Despite the relatively small sample size of our study, our findings are corroborated by existing studies which show that such differences can be explained by the differing rates of cellular proliferation across NSCLC subtypes [33, 34]. However, the large variety in 2-[¹⁸F]F-FDG uptake between different adenocarcinomas subtypes, which can even overlap with other NSCLC subtypes, limits the clinical utility of FDG PET/CT parameters for histological classification purposes [35].

The clinical value of cfDNA concentration for diagnosis, prognosis and treatment response has previously been

Table 5 Correlation between 100 and 250 bp cfDNA fragments, and FDG PET/CT- and CT-derived parameters

	Variable	<i>n</i>	Rho Spearman	<i>p</i>
PET/CT parameters				
Primary tumour	SUVmax	47	-0.29	0.05
	SUVmean	47	-0.31	0.03
	Mean_max_ratio	47	-0.34	0.02
	MTV	47	-0.13	0.40
	TLG	47	-0.18	0.24
Whole body	SUVmax	47	-0.09	0.53
	SUVmean	47	-0.13	0.38
	Mean_max_wb_ratio	47	-0.29	0.05
	MTV	47	0.34	0.02
	TLG	47	0.19	0.19
Extrapulmonary disease	EP_MTV	47	0.49	0.0005
	EP_MTV_wb_ratio	47	0.49	0.0004
	EP_TLG	47	0.39	0.0061
	EP_TLG_wb_ratio	47	0.51	0.0003
CT parameters	Tumour burden	30	0.23	0.23
	Target 1	33	-0.18	0.32

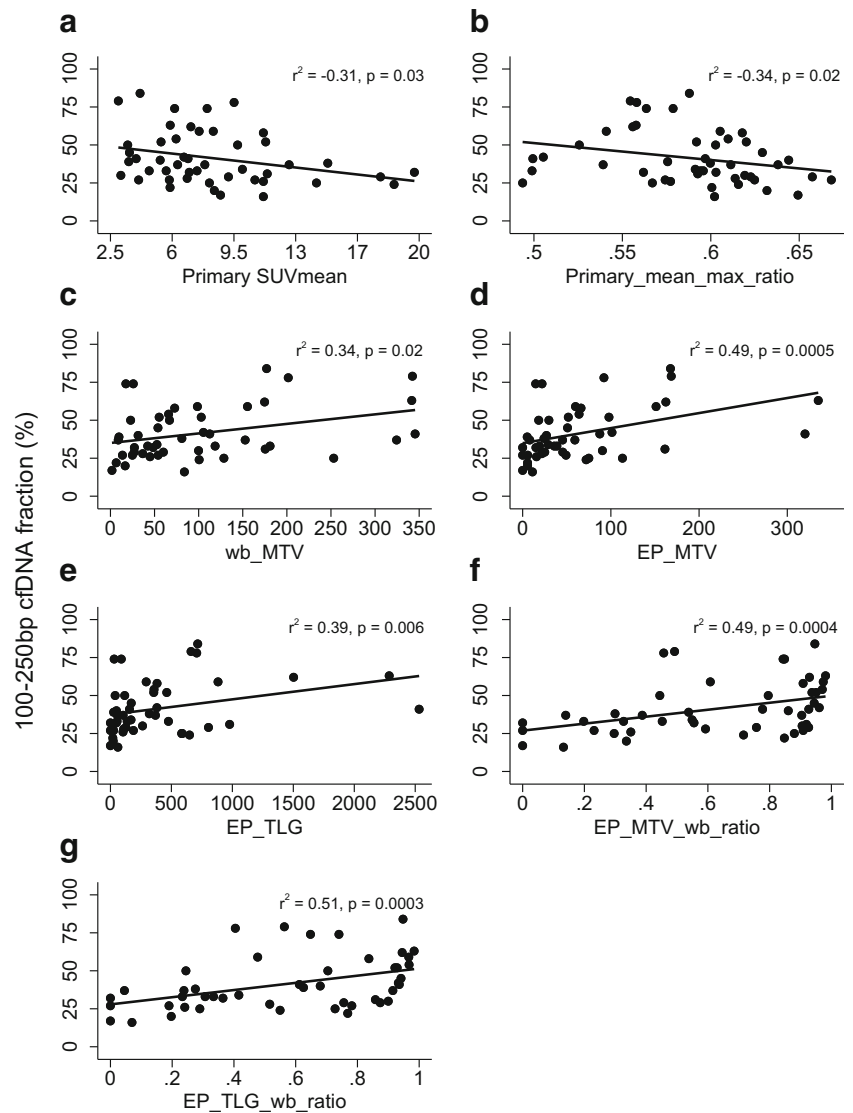
CT, computed tomography; EP, extrapulmonary; MTV, metabolic tumour volume; *n*, sample size; PET/CT, 2-[¹⁸F]F-FDG PET/CT; SUV, standardised uptake value; TLG, total lesion glycolysis; *wb*, whole body

The meaning of the italic emphasis is to highlight the statistical significance

described for NSCLC patients [7, 11, 36]. Our results show a significant correlation between cfDNA concentration and the metabolic status (MTV and TLG) of extrapulmonary disease but no correlation to the primary tumour or whole-body disease. These correlations to MTV and TLG remain significant when normalised by the extrapulmonary/whole-body ratio (to take into account the impact of the metastases in the whole-body disease) indicating that cfDNA levels reflect the tumour burden and aggressiveness of the metastatic lesions rather than the primary tumour. Two previous studies have assessed the correlation between cfDNA levels and FDG PET/CT in treatment-naïve NSCLC patients. Nygaard et al. [30] analysed the information from primary tumour, lymph nodes and metastases but evaluated it as whole-body MTV and TLG, and, similarly to us, did not find any association between them and cfDNA levels. The main difference between their study and ours is that we analysed not only the whole-body disease but also the separate influence of the primary tumour and the metastatic lesions on the whole-body results. Another key strength of our study is the protocol followed for cfDNA extraction. However, Nygaard et al. isolated plasma from blood draw following a protocol not recommended for cfDNA extraction [37]. Our extensive experience in cfDNA extraction for molecular testing with an FDA and CE approved extraction kit allows us to ensure the quality of the cfDNA, as it is known that the correct preanalytical processes are crucial to obtain reliable results in cfDNA studies since incorrect

sampling and centrifugation procedures can result in cell lysis and DNA contamination [38]. Morbelli et al. [29] focused their analysis on the largest metastatic lesion of NSCLC patients. They observed a significant correlation between cfDNA concentration and SUVmax suggesting that cfDNA concentration correlates with the highest metabolic activity rather than the disease burden. In our study, we calculated the metastatic FDG PET/CT parameters as the sum of all extrapulmonary lesions, more accurately reflecting the whole extrapulmonary tumour burden and metabolic activity. Morbelli et al. [29] also found a significantly higher cfDNA concentration in NSCLC patients with metabolically active bone lesions but did not provide information from other metastatic sites. We observed a trend towards higher cfDNA concentration in patients with metabolically active bone, liver and adrenal lesions but the differences did not reach statistical significance, probably due to the small sample size. These findings suggest that cfDNA level correlation might be organ specific. It is known that primary tumour characteristics such as tumour vascularisation, histological features, perfusion, turnover activity and proliferation rate impact the cfDNA levels [14]. We hypothesise that biological features influencing the primary disease might also affect metastatic lesions, making some organs more prone to release higher amounts of cfDNA into the blood stream. Additional studies with larger patient cohorts are necessary to further investigate this hypothesis.

Fig. 3 The fraction of 100–250 bp cfDNA fragments (%) is a biomarker for metabolic activity in advanced lung cancer patients. Scatter plots showing the correlation between percentage (%) of 100–250 bp cfDNA fragments and (a) SUVmean in primary lesion, (b) primary SUVmean/SUVMax index, (c) wbMTV, (d) extrapulmonary MTV, (e) extrapulmonary TLG, (f) extrapulmonary MTV/wbMTV ratio and (g) extrapulmonary TLG/wbTLG ratio



The search for new biomarkers that provide accurate information about tumour behaviour and biology, along with information derived from molecular testing, has developed an increasing interest in cfDNA fragment size fractions [39]. Previous studies have shown that advanced NSCLC patients have a higher concentration of short cfDNA fragments than early-stage patients [20]. Similarly, an increased fraction of short cfDNA fragments has been associated with shorter progression-free survival in pancreatic cancer [19]. Our study is the first to examine the correlation between cfDNA fragment size fractions and FDG PET/CT and CT parameters.

The cfDNA short fragment fraction showed significant strong positive correlations with the extrapulmonary MTV and TLG, and remained significantly correlated when normalised to the whole-body disease. This is understandable from the metastatic origin of these short fragments and indicates that metastatic lesions mainly undergo apoptotic processes.

It has previously been demonstrated that a high FDG uptake is associated with tumours with a high degree of proliferation [40], related to apoptosis and metastasis [41]. Thus, a high fraction of short cfDNA fragments may be an indirect biomarker for both highly proliferative tumours and highly apoptotic tumours.

Interestingly, the cfDNA short fragment fraction showed a positive correlation with the whole-body MTV while no correlation was observed with the whole-body TLG. This is in contrast to the correlations shown with extrapulmonary MTV and TLG but can be explained by the negative correlations observed between cfDNA short fragment fraction and SUVmean. Since TLG is defined as the product of MTV and SUVmean, this may be offsetting the effect seen in MTV. It is worth noticing that whereas TLG can differ between PET devices, MTV, which is obtained from a threshold of SUVmax values, allows reliable comparison between devices, providing external reproducibility.

Table 6 cfDNA 100–250 bp cfDNA fragments (%) in absence or presence of body lesions assessed by FDG PET/CT and thoracoabdominal CT

	Absence of lesions		Presence of lesions		<i>p</i>
	<i>n</i>	Median (range)	<i>n</i>	Median (range)	
PET/CT					
Necrosis	22	40.5 (17.0–84.0)	25	34.0 (16.0–78.0)	0.62
Bone	26	33.0 (16.0–78.0)	21	42.0 (20.0–84.0)	0.06
Adrenal	32	35.0 (16.0–84.0)	15	38.0 (20.0–63.0)	0.61
Liver	38	33.5 (16.0–74.0)	9	58.0 (30.0–84.0)	<i>0.01</i>
Pleural	28	32.5 (16.0–84.0)	19	42.0 (25.0–79.0)	<i>0.02</i>
CT					
Necrosis	18	37.0 (22.0–79.0)	15	34.0 (16.0–84.0)	0.59
Bone	27	33.0 (16.0–84.0)	6	35.5 (27.0–62.0)	0.76
Adrenal	29	33.0 (16.0–84.0)	4	37.0 (29.0–50.0)	0.78
Liver	28	33.0 (16.0–84.0)	5	78.0 (31.0–84.0)	<i>0.02</i>
Pleural	15	32.0 (22.0–84.0)	18	37.0 (16.0–79.0)	0.42
Lymph nodes	12	35.0 (22.0–54.0)	21	33.0 (16.0–84.0)	0.69
<i>C. lymphangitis</i>	26	33.5 (22.0–84.0)	7	33.0 (16.0–79.0)	0.95

CT, computed tomography; *C. lymphangitis*, carcinomatous lymphangitis; *n*, sample size; PET/CT, 2-[¹⁸F]F-FDG PET/CT

The meaning of the italic emphasis is to highlight the statistical significance

Parameters of the primary tumour such as the SUVmean and the SUVmean/SUVmax ratio showed an inverse association with the fraction of short cfDNA fragments. A low fraction of short cfDNA fragments may be due to the presence of larger size fragments released by other processes such as necrosis of the surrounding healthy tissue caused by the infiltration of tumour cells [42]. Although this observation was significant, it showed weak correlation and additional studies are necessary to elucidate this association or discard it as a spurious result.

Although a bigger sample size is needed to fully understand the processes related to the primary tumour regarding cfDNA fragment size fractions, a strong correlation between the short fragments and extrapulmonary volumetric and metabolic parameters has been established, indicating the metastatic origin of these fragments and making it a feasible biomarker for extrapulmonary tumour proliferation.

A higher fraction of short cfDNA was found in patients with liver and pleural lesions. These findings are related to the number of lesions, their grade, their capability to uptake glucose and molecular factors [43]. The high inter-tumour heterogeneity regarding this variable means that no reliable conclusions can be drawn before a more representative sample size for each targeted lesion is studied.

Although RECIST, based on CT imaging, is the routine tool for response assessment and follow-up, no correlations between total cfDNA concentration and fragment size

fractions were found when evaluating CT scan parameters. The study population for CT parameters was small, so additional studies with a larger sample size are needed to corroborate that total cfDNA concentration and fragment size fraction do not correlate with RECIST 1.1 criteria. On the other hand, the RECIST 1.1 criteria do not indicate the total amount of tumour and this probably affects the results of our study regarding the pure CT analysis.

The incorporation of both cfDNA concentration and fragment size fraction analysis could be a reliable complementary source of information to the existing clinical and imaging data of the patient. This could be especially true at initial diagnosis in cases where the existence of distance metastasis is unclear, particularly for liver or pleural metastases. Further prospective studies evaluating the role of these biomarkers for patient follow-up are necessary to establish their usefulness in assessing, and even predicting, disease progression.

Our study is the first to analyse a large number of imaging parameters against both cfDNA concentration and fragment size fractions. cfDNA extraction and analysis as well as FDG PET/CT and CT scans were carried out using standardised protocols as routine clinical procedures before the study was conceived, thus reducing the potential interpretation bias. However, there remain some inherent limitations of our study including its retrospective nature and small sample size.

In conclusion, our study suggests that cfDNA concentration and fragment size fraction reflect the tumour burden as well as metabolic activity in advanced NSCLC patients. Additional prospective studies are needed to explore its usefulness as a complementary clinical source of information to the imaging data, allowing a deeper understanding of the extent and behaviour of the disease.

Acknowledgements The authors would like to dedicate this manuscript to Dr. Rafael Molina, who recently passed away. His dedication and passion to the field of cancer diagnosis were an inspiration to all of us. The authors thank the patients for their participation in the study and the study staff who were involved in collecting specimen material at the study sites. The authors would like to express our gratitude to Dr. James Hugall for providing language assistance for the manuscript.

Author contribution Conceptualisation: JM. González de Aledo-Castillo, I. Vollmer, P. Paredes, JA. Puig-Butillé; data curation: JM. González de Aledo-Castillo, S. Casanueva-Eliceiry, A. Soler, V. Pastor, N. Reguart, N. Viñolas, R. Reyes, I. Vollmer, P. Paredes, JA. Puig-Butillé; formal analysis: JM. González de Aledo-Castillo; investigation: JM. González de Aledo-Castillo, I. Vollmer, P. Paredes, JA. Puig-Butillé; methodology: JM. González de Aledo-Castillo, JA. Puig-Butillé; project administration: P. Paredes, JA. Puig-Butillé; resources: P. Paredes, I. Vollmer, D. Fuster, N. Reguart, JA. Puig-Butillé; supervision: P. Paredes, JA. Puig-Butillé; visualisation: JM. González de Aledo-Castillo, I. Vollmer, P. Paredes, JA. Puig-Butillé; writing – original draft: JM. González de Aledo-Castillo; writing – review and editing: JM. González de Aledo-Castillo, I. Vollmer, P. Paredes, N. Reguart, JA. Puig-Butillé. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Hoffman-La Roche Ltd. supplied the reagent cobas® cfDNA Sample Preparation Kit for cfDNA extraction.

Data availability The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of Hospital Clinic de Barcelona (approval registration number HCB/2016/0889).

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394–424.
- Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Front Oncol*. 2017;7:1–7.
- Pakkala S, Ramalingam SS. Personalized therapy for lung cancer: striking a moving target. *JCI insight*. 2018;3.
- Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32:579–86.
- Wiener RS, Schwartz LM, Woloshin S, Welch HG. Population-based risk for complications after transthoracic needle lung biopsy of a pulmonary nodule: an analysis of discharge records. *Ann Intern Med*. 2011;155:137–44.
- Valpione S, Gremel G, Mundra P, Middlehurst P, Galvani E, Girotti MR, et al. Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients. *Eur J Cancer*. 2018;88:1–9.
- Tissot C, Toffart A-C, Villar S, Souquet P-J, Merle P, Moro-Sibilot D, et al. Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *Eur Respir J*. 2015;46:1773–80.
- Spindler K-LG, Boysen AK, Pallisgård N, Johansen JS, Taberero J, Sørensen MM, et al. Cell-free DNA in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist*. 2017;22:1049–55.
- Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2013;368:1199–209.
- Singh N, Gupta S, Pandey RM, Chauhan SS, Saraya A. High levels of cell-free circulating nucleic acids in pancreatic cancer are associated with vascular encasement. *Metastasis Poor Surviv Cancer Invest*. 2015;33:78–85.
- Winther-Larsen A, Fledelius J, Demuth C, Bylov CM, Meldgaard P, Sørensen BS. Early change in FDG-PET signal and plasma cell-free DNA level predicts erlotinib response in EGFR wild-type NSCLC patients. *Transl Oncol*. 2016;9:505–11.
- Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, Kupis W, Rudzinski P, Langfort R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer*. 2015;113:476–83.
- Weng J-L, Atyah M, Zhou C-H, Ren N. Progress in quantitative technique of circulating cell free DNA and its role in cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Gene Ther*. 2019;239:75–84.
- Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*. 2019;17:100087.
- Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, et al. Fragment length of circulating tumor DNA. *PLoS Genet*. 2016;12:1–24.
- Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, Cheng SH, Wong J, Wong VWS, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:E1317–25.
- Mouliere F, Robert B, Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*. 2011;6(9):e23418.
- Yamamoto Y, Uemura M, Nakano K, Hayashi Y, Wang C, Ishizuya Y, et al. Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9:20467–75.
- Lapin M, Oltedal S, Tjensvoll K, Buhl T, Smaaland R, Garresori H, et al. Fragment size and level of cell-free DNA provide prognostic information in patients with advanced pancreatic cancer. *J Transl Med*. 2018;16:1–10.
- Soliman SES, Alhanafy AM, Habib MSE, Hagag M, Ibrahim RAL. Serum circulating cell free DNA as potential diagnostic and prognostic biomarker in non small cell lung cancer. *Biochem Biophys Reports*. 2018;15:45–51.
- Lin J, Xie G, Liao G, Wang B, Yan M, Li H, et al. Prognostic value of 18F-FDG-PET/CT in patients with nasopharyngeal carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:33884–96.
- Infante JR, Cabrera J, Rayo JI, Cruz C, Serrano J, Moreno A, et al. 18F-FDG PET/CT quantitative parameters as prognostic factor in localized and inoperable lung cancer. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2020;39:353–9.
- Zhu D, Wang L, Zhang H, Chen J, Wang Y, Byanju S, et al. Prognostic value of 18F-FDG-PET/CT parameters in patients with pancreatic carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2017;96:e7813.
- McEvoy AC, Warburton L, Al-Ogaili Z, Celliers L, Calapre L, Pereira MR, et al. Correlation between circulating tumour DNA and metabolic tumour burden in metastatic melanoma patients. *BMC Cancer*. 2018;18:1–8.
- Woff E, Kehagias P, Vandeputte C, Ameye L, Guiot T, Paesmans M, et al. Combining 18F-FDG PET/CT-based metabolically active tumor volume and circulating cell-free DNA significantly improves outcome prediction in chemorefractory metastatic colorectal cancer. *J Nucl Med*. 2019;60:1366–72.
- Vizza E, Corrado G, De Angeli M, Carosi M, Mancini E, Baiocco E, et al. Serum DNA integrity index as a potential molecular biomarker in endometrial cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37:16.
- Çelik F, Tan YZ, Özdemir S, Silan F. Comparison of SUVmax values obtained from F-18 FDG PET/CT and cell-free DNA levels measured from plasma in oncology patients. *Mol Imaging Radionucl Ther*. 2019;28:46–52.
- Winther-Larsen A, Demuth C, Fledelius J, Madsen AT, Hjorthaug K, Meldgaard P, et al. Correlation between circulating mutant DNA and metabolic tumour burden in advanced non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2017;117:704–9.
- Morbelli S, Alama A, Ferrarazzo G, Coco S, Genova C, Rijavec E, et al. Circulating tumor DNA reflects tumor metabolism rather than tumor burden in chemotherapy-naïve patients with advanced non-

- small cell lung cancer: 18F-FDG PET/CT study. *J Nucl Med.* 2017;58:1764–9.
30. Nygaard AD, Holdgaard PC, Spindler KLG, Pallisgaard N, Jakobsen A. The correlation between cell-free DNA and tumour burden was estimated by PET/CT in patients with advanced NSCLC. *Br J Cancer.* 2014;110:363–8.
 31. Hu Z, Chen H, Long Y, Li P, Gu Y. The main sources of circulating cell-free DNA: apoptosis, necrosis and active secretion. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;157:103166.
 32. Giroux DJ, Rami-Porta R, Chansky K, Crowley JJ, Groome PA, Postmus PE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: data elements for the prospective project. *J Thorac Oncol.* 2009;4:679–83.
 33. Vesselle H, Salskov A, Turcotte E, Wiens L, Schmidt R, Jordan CD, et al. Relationship between non-small cell lung cancer FDG uptake at PET, tumor histology, and Ki-67 proliferation index. *J Thorac Oncol.* 2008;3:971–8.
 34. Cappabianca S, Porto A, Petrillo M, Greco B, Reginelli A, Ronza F, et al. Preliminary study on the correlation between grading and histology of solitary pulmonary nodules and contrast enhancement and [18F]fluorodeoxyglucose standardised uptake value after evaluation by dynamic multiphase CT and PET/CT. *J Clin Pathol.* 2011;64:114–9.
 35. Chiu C-H, Yeh Y-C, Lin K-H, Wu Y-C, Lee Y-C, Chou T-Y, et al. Histological subtypes of lung adenocarcinoma have differential 18F-fluorodeoxyglucose uptakes on the positron emission tomography/computed tomography scan. *J Thorac Oncol.* 2011;6:1697–703.
 36. Stewart CM, Tsui DWY. Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management. *Cancer Gene Ther.* 2018;228–229:169–79.
 37. Sorber L, Zwaenepoel K, Jacobs J, De Winne K, Goethals S, Reclusa P, et al. Circulating cell-free DNA and RNA analysis as liquid biopsy: optimal centrifugation protocol. *Cancers (Basel).* 2019;11:458.
 38. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta.* 2015;450:243–53.
 39. Shi J, Zhang R, Li J, Zhang R. Size profile of cell-free DNA: a beacon guiding the practice and innovation of clinical testing. *Theranostics.* 2020;10:4737–48.
 40. Doms C, van Baardwijk A, Verbeke E, van Suylen RJ, Stroobants S, De Ruyscher D, et al. Association between 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake values and tumor vitality: prognostic value of positron emission tomography in early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4:822–8.
 41. Wang R-A, Li Q-L, Li Z-S, Zheng P-J, Zhang H-Z, Huang X-F, et al. Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize. *J Cell Mol Med.* 2013;17:205–11.
 42. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R-D, 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.
 43. Kaira K, Okumura T, Ohde Y, Takahashi T, Murakami H, Oriuchi N, et al. Correlation between 18F-FDG uptake on PET and molecular biology in metastatic pulmonary tumors. *J Nucl Med.* 2011;52:705–11.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

PUBLICACIÓN 3

Technical Evaluation of the COBAS EGFR Semiquantitative Index (SQI) for Plasma cfDNA Testing in NSCLC Patients with EGFR Exon 19 Deletions

Objetivo específico de este artículo

- Evaluar el parámetro SQI derivado del Cobas EGFR Test v2 como una medida del número de copias mutadas/mL y de la frecuencia del alelo variante (VAF) del gen *EGFR* en plasma en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado con deleciones en el exón 19 del gen *EGFR*.

Article

Technical Evaluation of the COBAS EGFR Semiquantitative Index (SQI) for Plasma cfDNA Testing in NSCLC Patients with EGFR Exon 19 Deletions

José Manuel González de Aledo-Castillo ¹, Samira Serhir-Sgheiri ², Neus Calbet-Llopart ³, Ainara Arcocha ^{4,5}, Pedro Jares ^{2,5,6}, Noemí Reguart ^{4,5} and Joan Antón Puig-Butillé ^{2,3,5,*}

- ¹ Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain; gonzalezde@clinic.cat
² Molecular Biology CORE, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain; samira_serhir@hotmail.com (S.S.-S.); pjares@clinic.cat (P.J.)
³ Melanoma Unit, Division of Oncology and Hematology, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; calbet@clinic.cat
⁴ Medical Oncology Department, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain; arcocha@clinic.cat (A.A.); nreguart@clinic.cat (N.R.)
⁵ Thoracic Oncology Unit, Medical Oncology Department, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain
⁶ Pathology Department, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain
* Correspondence: japuig@clinic.cat



Citation: González de Aledo-Castillo, J.M.; Serhir-Sgheiri, S.; Calbet-Llopart, N.; Arcocha, A.; Jares, P.; Reguart, N.; Puig-Butillé, J.A. Technical Evaluation of the COBAS EGFR Semiquantitative Index (SQI) for Plasma cfDNA Testing in NSCLC Patients with EGFR Exon 19 Deletions. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1319. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081319>

Academic Editors: Brian Chiu and Consolato M. Sergi

Received: 8 June 2021
Accepted: 22 July 2021
Published: 22 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The cobas[®] EGFR Test provides a semiquantitative index (SQI) that reflects the proportion of mutated versus wild-type copies of the *EGFR* gene in plasma. The significance of SQI as an indirect measure of the variant allele frequency (VAF) or mutated copies/mL remains unclear. The aim of this study was to evaluate the correlation of SQI with the VAF and the number of mutated copies/mL obtained by a digital droplet PCR (ddPCR) test in NSCLC samples. The study included 118 plasma samples from a retrospective cohort of 25 stage IV adenocarcinoma patients with *EGFR* exon 19 deletions (Ex19Del), obtained before and during tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment. Both SQI and VAF and SQI and mutated copies/mL showed the same significant correlation ($r^2 = 0.79$, $p < 0.00001$) across the whole study cohort. We found better correlation in samples collected at the baseline between SQI and VAF ($r^2 = 0.94$, $p < 0.00001$) and SQI and mutated copies/mL ($r^2 = 0.97$, $p < 0.00001$) compared to samples collected during TKI treatment: $r^2 = 0.76$; $p < 0.00001$ for SQI and VAF and $r^2 = 0.75$; $p < 0.00001$ for SQI and mutated copies/mL. The study indicates that SQI is a robust quantitative indirect measure of VAF and the number of mutated copies/mL in plasma from patients with an *EGFR* Ex19Del mutation. Further studies are desirable to assess the SQI cut-off values related to the clinical status of the patient.

Keywords: EGFR; VAF; SQI; mutated copies/mL; NSCLC; cfDNA; cobas

1. Introduction

Molecular characterization of non-small cell lung cancer (NSCLC) has allowed a better classification of NSCLC tumors, permitting the introduction of personalized therapies that reduce toxicity and increase survival rates [1]. Recurrent genetic drivers in NSCLCs are mutations in the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene. These mutations are present in 10 to 30% of patients [2], with deletions in exon 19 (Ex19Del) being the most common *EGFR* mutation [3]. *EGFR* tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are currently the standard-of-care in first line therapy for patients with mutant *EGFR* NSCLC, with new generations of TKIs developed for patients with acquired resistance to the first and second generation TKIs [4]. This enhances the need for simplified strategies to measure the patient's molecular response to TKI treatment to enable further treatment optimization and improved outcomes.

Tumor tissue analysis remains the gold standard to molecularly stratify advanced NSCLC patients to select optimal TKI treatment, but cell-free DNA (cfDNA) analysis is now recommended when the tissue biopsy is not available or insufficient [5]. Moreover, cfDNA from plasma is more informative than tissue analysis since it captures the heterogeneity of the tumor [6]. The analysis of cfDNA to molecularly stratify advanced NSCLC patients has proven useful in the clinical setting by our group, among others [7]. Beyond the qualitative information provided by such testing, the quantitative information of the variant allele frequency (VAF) has been proposed as a biomarker for monitoring treatment response [8,9], for minimal residual disease assessment (MRD) [10], and for relapse prediction in NSCLC patients [11].

Distinct approaches for cfDNA analysis exist such as real-time PCR (RT-PCR), beads, emulsion, amplification, and magnetics (BEAMing), droplet digital PCR (ddPCR), and next generation sequencing (NGS). These techniques differ both in terms of the sensitivity they achieve and their complexity [12]. Another technique is the commercial assay cobas[®] EGFR Mutation Test v2 (cobas[®] EGFR Test, Hoffman-La Roche Ltd., Basel, Switzerland). This test was approved by the FDA in 2016 as the first test for the identification of NSCLC patients harboring *EGFR* mutations in cfDNA from plasma [13] for TKI treatment selection. The cobas[®] EGFR Test is a RT-PCR based method that interrogates 42 mutations located in exons 18, 19, 20, and 21 of the *EGFR* gene [14] and provides a semiquantitative index (SQI) for the *EGFR* mutation, which reflects the trend for the proportion of mutated versus wild-type copies of the *EGFR* gene in the cfDNA. However, the cobas[®] EGFR Test is not approved as a quantitative test [15].

Robust and sensitive techniques are needed to translate liquid biopsy strategies to the clinical setting, since the threshold level of mutation corresponding to therapeutic implications is extremely low (VAF < 0.1%) [11,16]. The cobas[®] EGFR Test has a detection limit of around 0.1–1% of the VAF [17]. In comparison, ddPCR techniques have a higher VAF sensitivity with a detection limit of 0.01–0.1% while also quantifying the absolute number of *EGFR* mutated copies (copies/mL) [18].

The correlation between SQI provided by the cobas[®] EGFR Test and the number of *EGFR* mutated copies/mL and VAF has previously been explored with contradictory results. One study observed that SQI reflects the VAF of the *EGFR* mutant allele obtained by NGS methods and that dynamic changes in SQI reflect the tumor progression [19]. In contrast, Macías et al. [20] did not find a significant correlation between SQI and the number of *EGFR* mutated copies/mL obtained by ddPCR, concluding that the parameters are not interchangeable. One external quality assurance (EQA) program found a good correlation between SQI and VAF for *EGFR* Ex19Del, but showed low reproducibility of SQI when VAF was <1% [21]. Other studies have not found steady correlations between SQI and VAF for different *EGFR* mutations [22,23]. The reproducibility and correlation of SQI values to VAF and mutated copies/mL need to be validated in real patient material before using the data for the interpretation of clinical samples [24]. Further studies are therefore necessary to elucidate the value of SQI as a measure of VAF in *EGFR* mutations.

In this study, we evaluated the SQI parameter from the cobas[®] EGFR Test as a measure for the number of mutated copies/mL and for the VAF of mutant *EGFR* allele in plasma in advanced NSCLC patients harboring an Ex19Del of *EGFR* gene.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Plasma Samples

The study included 118 cfDNA samples from plasma belonging to 25 stage IV adenocarcinoma patients harboring an Ex19Del of *EGFR* gene. The samples were collected at Hospital Clínic of Barcelona between June 2017 and May 2019. A sample was collected at the baseline before TKI treatment in 12 patients, and in the remaining 13 patients, all samples were collected exclusively over the clinical follow-up during TKI treatment. Clinical data such as gender, age, tumor histology, molecular status in tumor, and disease stage were obtained from the patients' medical records.

The patients belong to a prospective observational study approved by the Hospital Clínic Ethics Committee (approval registration number HCB/2016/0889). The study was conducted in accordance with the precepts of the Code of Ethics of The World Medical Association (Declaration of Helsinki). Written informed consent was obtained from all patients.

2.2. Extraction of cfDNA from Plasma Samples

Peripheral whole blood was collected from each subject in a 5 mL EDTA-K2 tube. After 15 to 20 min at rest in an upright position at room temperature, samples were centrifuged at $1600\times g$ for 10 min to collect 2 mL of plasma, which was transferred to a sterile tube. After a second centrifugation at $16,000\times g$ for 10 min, plasma samples were stored at -20 C . The entire procedure was completed within three hours of blood extraction. The cfDNA was isolated using the cobas[®] cfDNA Sample EGFR Preparation Kit as per the manufacturer's instructions.

The cfDNA quantification and quality assessment were performed using a Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with the Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit, and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with the Agilent High Sensitivity DNA Assay respectively.

2.3. Molecular Characterization of EGFR in cfDNA from Plasma

Analysis of EGFR mutations in cfDNA was first assessed with the cobas[®] EGFR Test (Hoffman-La Roche Ltd., Basel, Switzerland), following the manufacturer's recommendations, which provided a SQI value along with the detected EGFR mutation. The limit of detection for EGFR Ex19Del declared by the manufacturer is 75 mutated copies/mL.

A second analysis of the EGFR mutations was then performed using a ddPCR[™] EGFR exon 19 Deletion Screening Kit Assay (ddPCR[™] EGFR Test, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The ddPCR[™] EGFR Test detects 15 deletion mutations in exon 19 of the EGFR gene. The ddPCR was carried out in a reaction volume of 20 μL on a QX200[™] Droplet Digital[™] PCR System (Bio-Rad). The 20 μL PCR mix contained 10 μL of $2\times$ ddPCR Supermix for probes (No dUTP), 1 μL of $20\times$ of the corresponding probe, 1 μL of ECOR1 enzyme, 1 μL of water, and 7 μL of plasma cfDNA. Droplets were generated by the QX200[™] droplet generator and PCR was performed using a C1000[™] Touch thermal cycler (Bio-Rad). Reading and analysis was executed using Quantasoft[™] software (Bio-Rad). The results were reported as wild-type and the number of mutated copies/mL of plasma and the VAF of the EGFR mutation was then calculated as $((\text{mutated copies/mL})/(\text{total copies/mL})) \times 100$. The criteria to determine if the assay worked properly were: number of accepted droplets $\geq 13,000$, good separation between the different clusters, and at least 50 copies/reaction. The limit of detection reported by the manufacturer is 0.5% of VAF.

2.4. Statistical Analysis

The agreement between the two methods was measured by calculating the Kappa coefficient. Spearman rank correlation was used to analyze the associations between SQI and VAF and SQI and the number of mutated copies/mL. Results were considered statistically significant with a p -value < 0.05 . All statistical analysis was performed using STATA/IC software version 13.1 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA).

3. Results

3.1. Study Cohort

The 25 stage IV adenocarcinoma patients consisted of 18 females and seven males, harboring a deletion in exon 19 of the EGFR gene. We selected the patients included in the study based on a positive result obtained by the initial cobas[®] EGFR Test in the first sample tested. The mean age at first sample collection was 68.2 ± 13.6 years old. Overall, we analyzed 118 plasma samples ranging from 1 to 20 (Median = 3) per patient. A plasma sample was collected at baseline before TKI treatment in 12 patients (N = 12 samples), and

only during follow-up in 13 patients (N = 85 samples). Nine of the 12 patients analyzed at the baseline also had at least one sample analyzed in follow-up (N = 21). The molecular status of *EGFR* in tumor tissue was available in 60% (15/25) of patients. In this subset of patients, five different *EGFR* mutations were found: four deletions and one insertion (Table 1).

The cobas[®] *EGFR* Test and the ddPCR[™] *EGFR* Test differ in which exon 19 deletions are evaluated. Thirteen mutations are common to both tests, while the cobas[®] *EGFR* Test includes a further 16 mutations not included in the ddPCR[™] *EGFR* Test. The ddPCR test also analyzes two mutations not included in the cobas[®] *EGFR* Test. Based on the characterization of tumor tissue, the five *EGFR* mutations could be detected by the cobas[®] *EGFR* Test while two patients harbored an *EGFR* Ex19Del included in the cobas[®] *EGFR* Test but not included in the ddPCR[™] *EGFR* exon 19 deletion screening kit. However, the ddPCR analysis resulted in positive droplets in samples belonging to these patients. In the patient who harbored the c.2337_2255insT *EGFR* mutation, positive droplets were observed in both samples analyzed. In the other patient, with the c.2240_2251del12 *EGFR* mutation, positive droplets were found in two out of four samples analyzed.

Table 1. Characteristics of lung cancer patients.

ID	Age	Sex	EGFR Status by Tissue Analyses	Number of Samples	Baseline Samples	Follow-Up Samples	Mutation Included in Cobas EGFR Test	Mutation Included in ddPCR Assay
ID01	91	F	NA	1	1	0	NA	NA
ID02	73	M	c.2235_2249del15	1	1	0	Yes	Yes
ID03	53	M	c.2240_2251del12	4	1	3	Yes	No
ID04	40	M	c.2236_2250del15	5	1	4	Yes	Yes
ID05	56	F	NA	3	1	2	NA	NA
ID06	70	M	NA	2	1	1	NA	NA
ID07	77	M	NA	3	1	2	NA	NA
ID08	87	M	c.2236_2250del15	2	1	1	Yes	Yes
ID09	72	F	c.2235_2249del15	6	1	5	Yes	Yes
ID10	87	F	c.2236_2250del15	2	1	1	Yes	Yes
ID11	70	F	NA	1	1	0	NA	NA
ID12	79	F	NA	3	1	2	NA	NA
ID13	61	F	c.2235_2249del15	2	0	2	Yes	Yes
ID14	81	F	NA	4	0	4	NA	NA
ID15	69	F	c.2240_2257del18	20	0	20	Yes	Yes
ID16	56	F	c.2337_2255insT	2	0	2	Yes	No
ID17	74	F	c.2235_2249del15	1	0	1	Yes	Yes
ID18	83	F	NA	8	0	8	NA	NA
ID19	67	F	NA	2	0	2	NA	NA
ID20	67	M	NA	12	0	12	NA	NA
ID21	80	F	c.2235_2249del15	1	0	1	Yes	Yes
ID22	45	F	c.2235_2249del15	11	0	11	Yes	Yes
ID23	49	F	c.2236_2250del15	5	0	5	Yes	Yes
ID24	58	F	c.2240_2254del15	2	0	2	Yes	Yes
ID25	61	F	c.2236_2250del15	15	0	15	Yes	Yes

ID: Identification; F: Female; M: Male; NA: Information not available.

3.2. Agreement between Cobas[®] *EGFR* Test and the ddPCR[™] *EGFR* Test

First, we evaluated the agreement between the cobas[®] *EGFR* Test and the ddPCR Test and found discrepancies in the positive results obtained by each method. A total of 72.0% (85/118) of samples presented an *EGFR* Ex19Del positive result by at least one method. We detected a positive result by the cobas[®] *EGFR* Test in 76 samples but in 26.3% (20/76) of these, the *EGFR* mutation was not detected by ddPCR. In all of these cases, the SQI value reported was below 12. On the other hand, we found a positive Ex19Del *EGFR* result by ddPCR in 65 samples, of which the *EGFR* mutation was not detected by the cobas[®] *EGFR* Test in 13.8% (9/65) of cases. In all these samples, the number of mutated copies was

<75 copies/mL. All samples that had a positive result by the ddPCRTM EGFR Test in which the mutation was not detected by the cobas[®] EGFR Test were obtained during follow-up under TKI treatment.

Next, we analyzed the samples regarding Ex19Del EGFR status depending on TKI treatment status. In the subset of samples obtained at the baseline before TKI treatment, an Ex19Del EGFR mutation was detected in 100% (12/12) of patients by the cobas[®] EGFR Test and in 75.0% (9/12) by the ddPCRTM EGFR Test. In samples drawn after the TKI treatment was initiated, a mutation was found in 60.4% (64/106) of samples by the cobas[®] EGFR Test and in 52.8% (56/106) by ddPCR.

The agreement between both methods for samples at the baseline before TKI treatment was 75%, and for the follow-up samples, it was 75.5% with a Kappa coefficient of 0.50 ($p < 0.00001$). The overall agreement between all samples was 75.4% with a Kappa coefficient of 0.49 ($p < 0.00001$).

The median SQI of Ex19Del EGFR mutation was significantly lower in those samples where there was no agreement between the two methods (8.3 vs. 12.1, $p < 0.00001$) as well as VAF (0.2 vs. 0.8, $p = 0.002$) and the number of mutated copies/mL (11.7 vs. 49.0, $p = 0.02$).

We also evaluated the agreement between the cobas[®] EGFR Test and the ddPCRTM EGFR Test in the subset of samples where tissue analysis was available (N = 15 patients, 79 samples) and obtained concordant results to those of the whole study cohort. The percentage of samples that presented a positive result by at least one method was slightly higher (73.4%, 58/79), and the discrepancies between methods were slightly lower (21.2% for the mutations detected by the cobas[®] EGFR Test and not by ddPCR, and 12.8% the other way around).

An Ex19Del EGFR mutation was detected in 100% (6/6) of patients by the cobas[®] EGFR Test and in 66.7% (4/6) by the ddPCRTM EGFR Test in samples obtained before TKI treatment and in 63.0% (46/73) of samples by the cobas[®] EGFR Test and in 58.9% (43/73) by ddPCR in samples drawn after the TKI treatment was initiated. The agreement for samples at the baseline before TKI treatment was 66.7% and for follow-up samples 79.5% with a Kappa coefficient of 0.57 ($p < 0.00001$). The overall agreement between all samples was 78.5% with a Kappa coefficient of 0.54 ($p < 0.00001$).

As in the whole study cohort, the median SQI of Ex19Del EGFR mutation was significantly lower in those samples where there was no agreement between the two methods (9.0 vs. 12.1, $p < 0.001$). However, VAF (0.3 vs. 0.7, $p = 0.07$) and the number of mutated copies/mL (17.5 vs. 49.4, $p = 0.11$) were also lower in samples with no agreement, but these differences were not significant.

3.3. The SQI from Cobas[®] EGFR Test Correlates with the VAF and the Number of Mutated Copies/mL from ddPCRTM EGFR Test

In patients with an Ex19Del mutation detected by the cobas[®] EGFR Test, the median SQI value was 11.1 (IQR = 4.3), ranging from 6.0 to 22.5. We observed higher SQI values for samples at the baseline before TKI treatment than for those taken during follow-up under TKI treatment (Median = 12.4 vs. 11.0, $p = 0.19$). In patients with an Ex19Del mutation detected by ddPCR, the median VAF was 0.62 (IQR = 2.5), ranging from 0.04 to 39.3; and the median mutated copies/mL was 34.0 (IQR = 123.3), ranging from 9.2 to 42798. Samples obtained at the baseline before TKI treatment presented higher VAF values (median = 1.6 vs. 0.4, $p = 0.02$) and mutated copies/mL (Median = 109.5 vs. 25.4, $p = 0.03$) than the samples collected during follow-up.

We evaluated the correlation between the SQI and the VAF value in the whole set of samples and found a statistically significant correlation between both parameters ($r^2 = 0.79$, $p < 0.00001$). Next, we evaluated the samples based on TKI treatment. Samples collected before TKI treatment showed a better correlation ($r^2 = 0.94$, $p < 0.00001$) than the samples obtained after TKI treatment ($r^2 = 0.76$, $p < 0.00001$).

We obtained similar results comparing SQI to the number mutated copies/mL. For the whole study cohort, we found a statistically significant correlation between SQI and the mutated copies/mL ($r^2 = 0.79$, $p < 0.00001$). A higher correlation was detected for samples before TKI treatment ($r^2 = 0.97$, $p < 0.00001$) than for samples obtained after TKI treatment ($r^2 = 0.75$, $p < 0.00001$) (Figure 1).

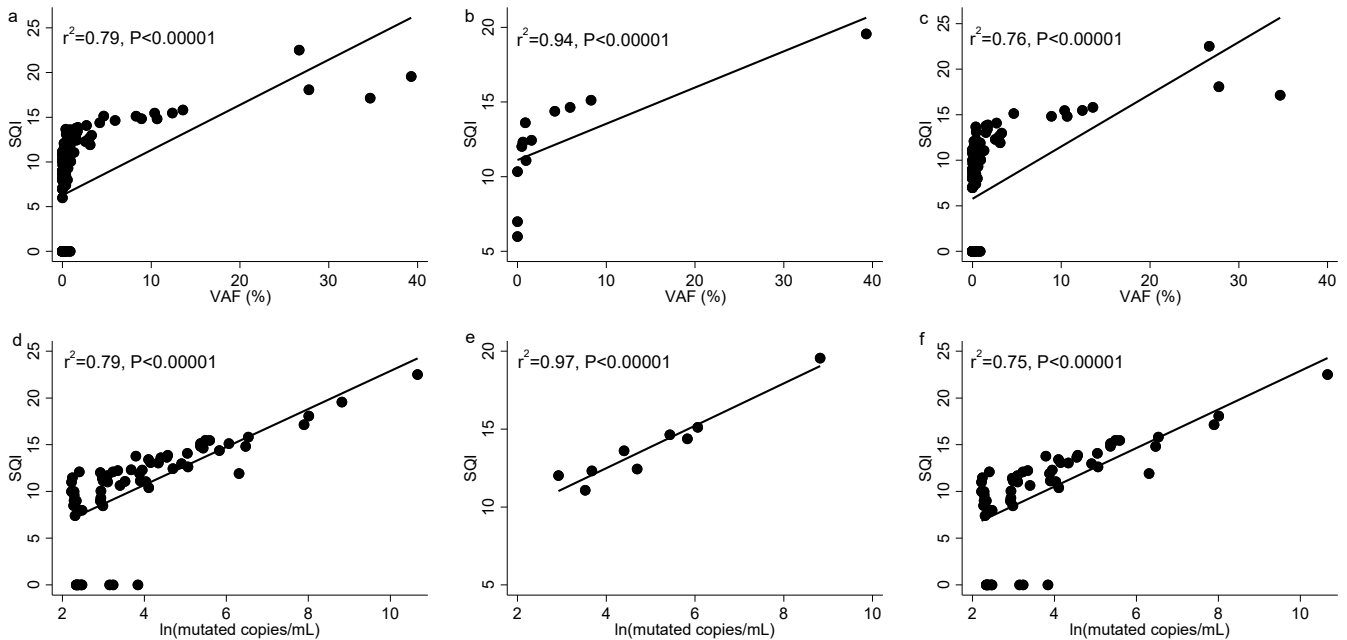


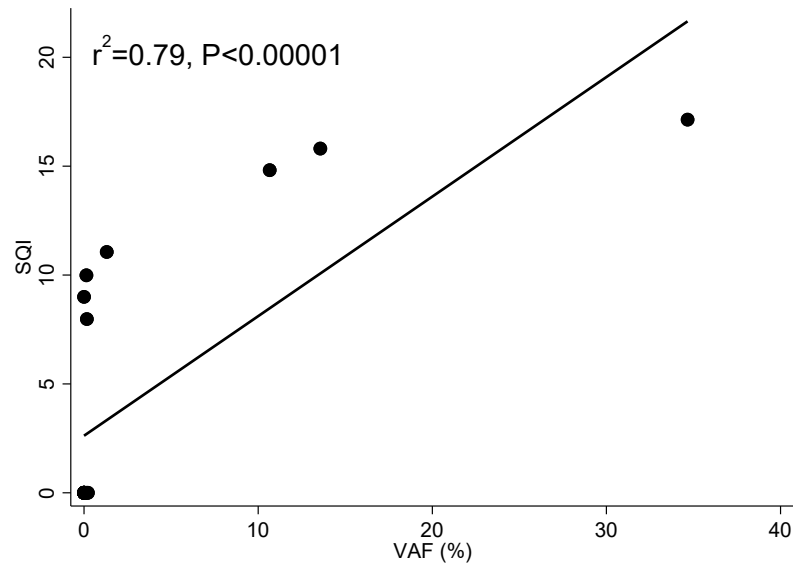
Figure 1. Correlation analysis between (a) SQI and VAF in all samples, (b) SQI and VAF in samples at the baseline before TKI treatment, (c) SQI and VAF in the samples after TKI treatment, (d) SQI and ln (mutated copies/mL) in all samples, (e) SQI and ln (mutated copies/mL) in samples at the baseline before TKI treatment, and (f) SQI and ln (mutated copies/mL) in samples after TKI treatment. Mutated copies/mL were transformed to their natural logarithm to ease graphical representation.

In the subset of patients in which tissue analysis was available, the correlations for SQI and VAF for both the whole set of samples and for samples from patients under TKI treatment were practically the same as for the whole study cohort ($r^2 = 0.78$, $p < 0.00001$ and $r^2 = 0.8$, $p < 0.00001$, respectively). However, in samples collected before TKI treatment was initiated, the correlation was better in patients where the tissue result was known ($r^2 = 0.99$, $p = 0.0003$). The same trend was observed for the SQI and mutated copies/mL, where the correlation for the whole set of samples was $r^2 = 0.75$ ($p < 0.00001$), for samples before TKI treatment it was $r^2 = 0.99$ ($p = 0.0003$), and for samples obtained after TKI treatment, it was $r^2 = 0.72$ ($p < 0.00001$).

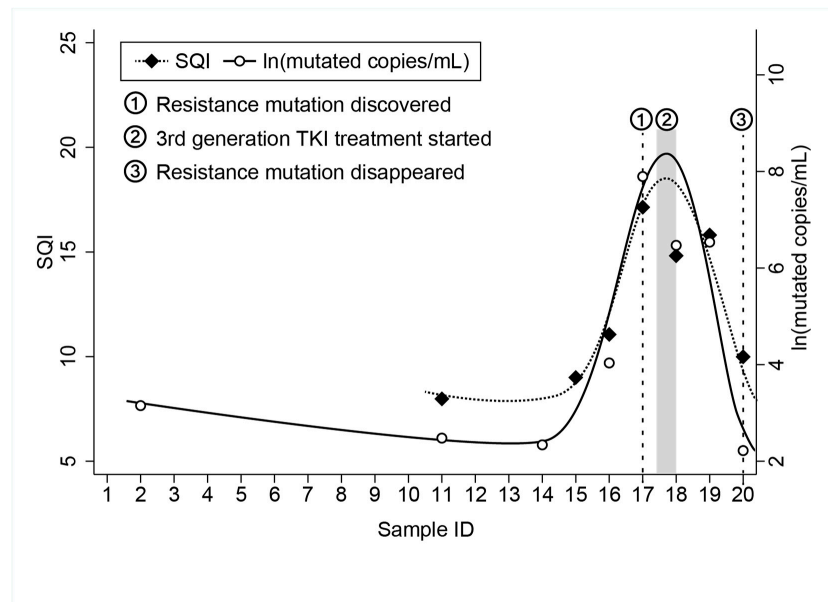
3.4. Example of Correlation between SQI and VAF and SQI and Mutated Copies/mL in a Patient with Longitudinal Follow-Up

One patient included in the study had a long follow-up with frequent monthly cfDNA sample analysis (ID15). She was monitored with the cobas® EGFR Test every month from three months after initial diagnosis (sample 1) until follow-up was lost. At the time of the first sample included in this study, the patient had already been under TKI treatment for three months. The agreement between the result of the cobas® EGFR Test and the ddPCR™ EGFR Test was 85.0% (17/20). Two out of the three discordant results corresponded to two samples that tested positive for the ddPCR method, but not for the cobas® EGFR Test. These two samples showed low VAF values (0.23% and 0.15%) and 23.4 and 10.4 mutated copies/mL. The sample that tested positive for the cobas® EGFR Test, but not for the ddPCR method had a SQI value of 9.0. The correlation between the SQIs and VAF and SQI and mutated copies/mL was $r^2 = 0.79$ ($p < 0.00001$) (Figure 2a). When representing the SQI value and the natural log (ln) of the mutated copies/mL throughout the chronological

monitoring process of this patient, we can see how both SQI and the mutated copies/mL were zero or very low during the first 13 monitoring analyses. However, in sample 14, a small amount of mutated copies/mL was detected. In sample 15, the SQI appeared and in sample 16, both parameters reached their highest level thus far. In sample 17, the resistance mutation T790M was detected along with the sensitizing mutation Ex19Del. Between sample 17 and sample 18, treatment with Osimertinib, a third generation TKI, began, and both SQI and mutated copies/mL began to decline until sample 20, when the resistance mutation T790M disappeared and SQI and mutated copies/mL returned to low levels (Figure 2b).



(a)



(b)

Figure 2. (a) Correlation between SQI and VAF in patient ID15. (b) Chronological monitoring of SQI and ln(mutated copies/mL) in patient ID 15. Samples in chronological order with one month between each sample. Guides to the eye are included to indicate the trend in the values as resistance mutation was found and treatment adjusted.

4. Discussion

In this study, we compared the qualitative and quantitative performance of the cobas[®] EGFR Test and the ddPCR[™] EGFR Test for the detection of deletions in exon 19 in the EGFR gene in 118 samples from 25 NSCLC patients. The overall agreement between both tests was 79%, which was slightly lower compared to other qualitative studies [25]. The lower number of probes in the ddPCR[™] EGFR Test compared to the cobas[®] EGFR Test as well as technical factors such as the differential performance of these probes in samples with low mutated copies/mL might have affected our results.

Serial molecular analysis of cfDNA from plasma during treatment may have potential clinical utility, but the periodicity of longitudinal blood sampling is not yet established [26]. In our study, for follow-up samples during treatment, we obtained several negative results using one method that gave positive results in the other using the Cobas[®] EGFR and the ddPCR[™] EGFR Test, regardless of their analytical sensitivity. The false negative results seen for the cobas[®] EGFR Test, involved samples with less than 75 mutated copies/mL, which is the limit of detection declared by the manufacturer, and agrees with other published papers [24]. In the case of the false negative results seen with the ddPCR method, the EQA study [21] has shown that SQI values below 12 correlate to VAFs below 0.5%, which is the limit of detection reported by the manufacturer for this method. In our study, all samples that gave a false negative result on the ddPCR method had a SQI value below 12. This emphasizes the need for higher sensitivity methods like ddPCR to test samples collected during TKI treatment, where the response to the treatment results in a decrease in the tumor burden and consequently lower levels of mutation.

There is no consensus on how to act in front of a negative result during monitoring analysis. Clinical guidelines recommend a tissue biopsy to assess the resistance mutation T790M if plasma testing is negative due to the high risk of false negative results [26,27], but no such recommendations have been set for sensitizing mutations. One way to approach this issue would be to reanalyze the negative sample through an alternative method where possible. Another approach would be to repeat the blood extraction and plasma analysis in a defined period, following the example of serum tumor marker analysis, in which retesting is recommended at 3–4 weeks, or at least a period longer than the tumor marker's plasma half-life, which is 15–20 days for most of them [28,29], or, as recommended for radiological diagnosis, every 6–12 weeks for advanced NSCLC [30] or 6–12 months for stage III NSCLC [31]. As liquid biopsy is rapidly gaining more relevance in clinical practice, the need for standardized protocols and algorithms regarding its usefulness as a treatment monitoring tool has become an important issue that must soon be addressed by clinical guidelines.

Both the cobas[®] EGFR Test [24,32] and ddPCR tests [33,34] have proven useful in routine clinical practice to molecularly stratify NSCLC patients. Fast and robust tests like the cobas[®] EGFR Test are useful as an initial approach for molecular characterization. However, in terms of quantitative outcomes, the significance of the SQI value and its role as a reliable measure of VAF remains unclear. This is a crucial point when the cobas[®] EGFR Test in cfDNA is used for quantitative rather than qualitative purposes such as for evaluating minimal residual disease or for monitoring TKI treatment response. The EQA study showed that the SQI value presents high imprecision among different EGFR mutations, especially at low VAF values [21]. In a previous study, we observed a lack of correlation between the SQI value with the cfDNA concentration or the stage of the disease, and a moderate reproducibility that differed between distinct mutations [7]. However, in this study, we focused on the most recurrent EGFR alterations, and found a strong correlation between the SQI value and VAF and SQI and the number of mutated copies/mL, indicating that the SQI accurately reflects the VAF kinetics in NSCLC patients harboring deletions in exon 19 in EGFR. The correlation was stronger in samples collected before the initiation of TKI treatment compared to samples obtained during treatment, most probably because the circulating tumor DNA (ctDNA) levels significantly decreased with TKI treatment [35]. Notably, our study and the EQA study found a similar correlation

between SQI and the VAF for deletions in exon 19. However, the EQA study was carried out with reference standards spiked to normal human plasma and the correlation was assessed only as part of a sensitivity study evaluation, while our results were obtained from samples collected in a real clinical setting, which enhances the translational meaning of our work, since the results were validated under the standardized conditions of the clinical laboratory. Therefore, based on our results, the SQI value is a robust quantitative measure that has the potential to provide useful information of the mutation load of the tumor. We saw in the longitudinal example shown in the study that the SQI and the mutated copies/mL showed similar kinetics in the patient's follow-up, with low or undetectable values during treatment, higher levels when resistance was acquired, and again a descent in both parameters as the patient responded to new treatment. However, while cut-off values for VAF to predict progression-free survival were calculated both for activating *EGFR* (act-*EGFR*) mutations and for the ratio T790M/act-*EGFR* [8], further studies are needed to calculate SQI cut-offs with clinical relevance for the management of NSCLC patients, especially to detect TKI response failure or MDR.

When introducing a new test in a clinical laboratory, it must be verified or validated to fulfill international standard criteria [36]. For qualitative tests, it is important to calculate the standard measures of diagnostic accuracy, like sensitivity, specificity, and accuracy. False negative results can result in underdiagnosis, while false positives can result in inappropriate treatment, unnecessary tests, and anxiety for the patient [37]. It is worth noting that in our study, samples from two patients harboring *EGFR* mutations not available in the ddPCRTM *EGFR* Test resulted in positive droplets. In samples with positive results with extremely low fractions of mutant DNA, the possibility of experimental artifacts cannot be completely ruled out. Non-specific annealing of PCR primers could result in a false positive result when the concentration of the wild-type template is much higher than the mutant template [38]. One of the false positive results in our study showed a very low amount of mutated copies/mL compared to the wild-type copies/mL. In the other confirmed false positive case, the proportion of mutated copies/mL vs. wild-type copies/mL was not low, which suggests another origin of the false positive result. In these cases, it is most likely due to cross-reactivity with the probes which are designed for mutations within the same region, as has been previously described in ddPCR methods [39]. These findings illustrate the importance of technical factors such as the specificity of designed probes in ddPCR that need to be evaluated prior to their use in the clinical setting to avoid potential false positive results.

One limitation of our study is the lack of molecular results obtained by tissue biopsy in 40% of the patients. This means that we cannot confirm that the mutations present are correctly covered by the cfDNA detection kits used in the study. However, since all patients without tissue biopsy returned positive results for both cfDNA detection kits used in the study, it is fair to assume that this should not significantly affect the results or the conclusions drawn. Due to the number of available samples, we focused on exon 19 deletions. Differences in SQI among distinct *EGFR* mutations [7,21] mean that our results cannot be extrapolated to other less common *EGFR* mutations such as the p.L858R *EGFR* mutation.

In conclusion, this study indicates that SQI strongly correlates with VAF and to the number of mutated copies/mL in patients with exon 19 deletions in the *EGFR* gene, highlighting that SQI is a robust quantitative measure whose magnitude could have clinical impact as confirmed in the longitudinal study of a patient. Additional studies are needed to assess the clinical relevance of SQI cut-off values for the management of NSCLC patients.

Author Contributions: Conceptualization, J.M.G.d.A.-C., S.S.-S., N.C.-L., and J.A.P.-B.; Methodology, J.M.G.d.A.-C., S.S.-S., N.C.-L., and J.A.P.-B.; Formal analysis, J.M.G.d.A.-C. and S.S.-S.; Investigation, J.M.G.d.A.-C., S.S.-S., and J.A.P.-B.; Resources, N.R. and J.A.P.-B.; Data curation, J.M.G.d.A.-C., S.S.-S., A.A., P.J., N.R., and J.A.P.-B.; Writing—original draft preparation, J.M.G.d.A.-C. and S.S.-S.; Writing—review and editing, J.M.G.d.A.-C. and J.A.P.-B.; Visualization, J.M.G.d.A.-C. and J.A.P.-B.;

Supervision, J.A.P.-B.; Project administration, J.A.P.-B.; Funding acquisition, N.R. and J.A.P.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Hoffman-La Roche Ltd., who supplied the reagents, cobas[®] cfDNA Sample Preparation Kit, and cobas[®] EGFR Mutation Test v2 to carry out the study.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Hospital Clinic de Barcelona (approval registration number HCB/2016/0889).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank the patients for their participation in the study and the study staff who were involved in collecting specimen material at the study sites. The authors would like to express our gratitude to James T. Hugall for providing language assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Travis, W.D.; Brambilla, E.; Nicholson, A.G.; Yatabe, Y.; Austin, J.H.M.; Beasley, M.B.; Chirieac, L.R.; Dacic, S.; Duhig, E.; Flieder, D.B.; et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, *10*, 1243–1260. [[CrossRef](#)]
2. Testa, U.; Castelli, G.; Pelosi, E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers* **2018**, *10*, 248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Harrison, P.T.; Vyse, S.; Huang, P.H. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *61*, 167–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Camidge, D.R.; Pao, W.; Sequist, L.V. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: Learning from lung cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11*, 473–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lindeman, N.I.; Cagle, P.T.; Aisner, D.L.; Arcila, M.E.; Beasley, M.B.; Bernicker, E.H.; Colasacco, C.; Dacic, S.; Hirsch, F.R.; Kerr, K.; et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors guideline from the college of American pathologists, the international association for the study of lung cancer, and the a. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2018**, *142*, 321–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Diaz, L.A., Jr.; Bardelli, A.; Diaz, L.A.; Bardelli, A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 579–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. González de Aledo-Castillo, J.M.; Arcocha, A.; Victoria, I.; Martínez-Puchol, A.I.; Sánchez, C.; Jares, P.; Rodríguez, G.F.; Viñolas, N.; Reyes, R.; Reguart, N.; et al. Molecular characterization of advanced non-small cell lung cancer patients by cfDNA analysis: Experience from routine laboratory practice. *J. Thorac. Dis.* **2021**, *13*, 1658–1670. [[CrossRef](#)]
8. Del Re, M.; Bordi, P.; Rofi, E.; Restante, G.; Valleggi, S.; Minari, R.; Crucitta, S.; Arrigoni, E.; Chella, A.; Morganti, R.; et al. The amount of activating EGFR mutations in circulating cell-free DNA is a marker to monitor osimertinib response. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 1252–1258. [[CrossRef](#)]
9. Guibert, N.; Pradines, A.; Favre, G.; Mazieres, J. Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages. *Eur. Respir. Rev.* **2020**, *29*. [[CrossRef](#)]
10. Abbosh, C.; Birkbak, N.J.; Swanton, C. Early stage NSCLC—Challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 577–586. [[CrossRef](#)]
11. Abbosh, C.; Birkbak, N.J.; Wilson, G.A.; Jamal-Hanjani, M.; Constantin, T.; Salari, R.; Le Quesne, J.; Moore, D.A.; Veeriah, S.; Rosenthal, R.; et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* **2017**, *545*, 446–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pisapia, P.; Malapelle, U.; Troncione, G. Liquid Biopsy and Lung Cancer. *Acta Cytol.* **2018**, *63*, 489–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Siravegna, G.; Marsoni, S.; Siena, S.; Bardelli, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 531–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Roche cobas[®] EGFR Mutation Test v2 for in vitro diagnostic use. *FDA* 2016; pp. 1–71.
15. Ntzifa, A.; Kroupis, C.; Haliassos, A.; Lianidou, E. A pilot plasma-ctDNA ring trial for the Cobas[®]EGFR Mutation Test in clinical diagnostic laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2019**, *57*, e97–e101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Chae, Y.K.; Oh, M.S. Detection of Minimal Residual Disease Using ctDNA in Lung Cancer: Current Evidence and Future Directions. *J. Thorac. Oncol.* **2019**, *14*, 16–24. [[CrossRef](#)]

17. Mok, T.; Wu, Y.-L.; Lee, J.S.; Yu, C.-J.; Sriuranpong, V.; Sandoval-Tan, J.; Ladrera, G.; Thongprasert, S.; Srimuninnimit, V.; Liao, M.; 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*, 3196–3203. [[CrossRef](#)]
18. Herbreteau, G.; Vallée, A.; Charpentier, S.; Normanno, N.; Hofman, P.; Denis, M.G. Circulating free tumor DNA in non-small cell lung cancer (NSCLC): Clinical application and future perspectives. *J. Thorac. Dis.* **2019**, *11*, S113. [[CrossRef](#)]
19. Marchetti, A.; Palma, J.F.; Felicioni, L.; De Pas, T.M.; Chiari, R.; Del Grammasio, M.; Filice, G.; Ludovini, V.; Brandes, A.A.; Chella, A.; et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, *10*, 1437–1443. [[CrossRef](#)]
20. Macías, M.; Alegre, E.; Alkorta-Aranburu, G.; Patiño-García, A.; Mateos, B.; Andueza, M.P.; Gúrpide, A.; Lopez-Picazo, J.M.; Gil-Bazo, I.; Perez-Gracia, J.L.; et al. The Dynamic Use of EGFR Mutation Analysis in Cell-Free DNA as a Follow-Up Biomarker during Different Treatment Lines in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Dis. Markers* **2019**, *2019*, 7954921. [[CrossRef](#)]
21. Kim, Y.; Shin, S.; Lee, K.-A. A Comparative Study for Detection of EGFR Mutations in Plasma Cell-Free DNA in Korean Clinical Diagnostic Laboratories. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 7392419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Esteva-Socias, M.; Enver-Sumaya, M.; Gómez-Bellvert, C.; Guillot, M.; Azkárate, A.; Marsé, R.; Sastre, Ú.; Blasco, A.; Calabuig-Fariñas, S.; Asensio, V.J.; et al. Detection of the EGFR G719S Mutation in Non-small Cell Lung Cancer Using Droplet Digital PCR. *Front. Med.* **2020**, *7*, 594900. [[CrossRef](#)]
23. So, M.-K.; Park, J.-H.; Kim, J.-W.; Jang, J.-H. Analytical Validation of a Pan-Cancer Panel for Cell-Free Assay for the Detection of EGFR Mutations. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1022. [[CrossRef](#)]
24. Keppens, C.; Palma, J.F.; Das, P.M.; Scudder, S.; Wen, W.; Normanno, N.; van Krieken, J.H.; Sacco, A.; Fenizia, F.; Gonzalez de Castro, D.; et al. Detection of EGFR Variants in Plasma: A Multilaboratory Comparison of a Real-Time PCR EGFR Mutation Test in Europe. *J. Mol. Diagn.* **2018**, *20*, 483–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Buder, A.; Setinek, U.; Hochmair, M.J.; Schwab, S.; Kirchbacher, K.; Keck, A.; Burghuber, O.C.; Pirker, R.; Filipits, M. EGFR Mutations in Cell-free Plasma DNA from Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma: Improved Detection by Droplet Digital PCR. *Target Oncol.* **2019**, *14*, 197–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Planchard, D.; Popat, S.; Kerr, K.; Novello, S.; Smit, E.F.; Faivre-Finn, C.; Mok, T.S.; Reck, M.; Van Schil, P.E.; Hellmann, M.D.; et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, iv192–iv237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kalemkerian, G.P.; Narula, N.; Kennedy, E.B.; Biermann, W.A.; Donington, J.; Leighl, N.B.; Lew, M.; Pantelas, J.; Ramalingam, S.S.; Reck, M.; et al. 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 Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 911–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ayala de la Peña, F.; Ortiz-Muñoz, B.; Quintanar-Verdúguez, T.; Santotoribio, J.D.; de la Cruz, S.; Trapé-Pujol, J.; Galve-Calvo, E.; Augé-Fradera, J.M.; García-Gómez, J.; González-Hernández, Á. Consensus of the Spanish society of laboratory medicine and the Spanish society of medical oncology on the methodology and criteria for evaluation of circulating tumour markers in breast cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **2021**, *23*, 1272–1280. [[CrossRef](#)]
29. Gaspar Blázquez, M.J.; Trapé Pujol, J.; Augé Fradera, J.M.; Barco Sánchez, A.; Carbonell Muñoz, R.; Filella Pla, X.; Fernández Suarez, A.; González Hernández, Á.; Martínez Peinado, A.; Pérez Barrios, C.; et al. Recomendaciones para la optimización del uso de marcadores tumorales de utilización frecuente. Recomendación (2018). *Rev. Lab. Clínico* **2019**, *12*, 38–52. [[CrossRef](#)]
30. de Castro, J.; Cobo, M.; Isla, D.; Puente, J.; Reguart, N.; Cabeza, B.; Gayete, A.; Sánchez, M.; Torres, M.I.; Ferreirós, J. Recommendations for radiological diagnosis and assessment of treatment response in lung cancer: A national consensus statement by the Spanish Society of Medical Radiology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin. Transl. Oncol.* **2015**, *17*, 11–23. [[CrossRef](#)]
31. Majem, M.; Hernández-Hernández, J.; Hernando-Trancho, F.; Rodríguez de Dios, N.; Sotoca, A.; Trujillo-Reyes, J.C.; Vollmer, I.; Delgado-Bolton, R.; Provencio, M. Multidisciplinary consensus statement on the clinical management of patients with stage III non-small cell lung cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **2020**, *22*, 21–36. [[CrossRef](#)]
32. Soria-Comes, T.; Palomar-Abril, V.; Ureste, M.M.; Guerola, M.T.; Maiques, I.C.M. Real-World Data of the Correlation between EGFR Determination by Liquid Biopsy in Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) and the EGFR Profile in Tumor Biopsy. *Pathol. Oncol. Res.* **2020**, *26*, 845–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sacher, A.G.; Paweletz, C.; Dahlberg, S.E.; Alden, R.S.; O’Connell, A.; Feeney, N.; Mach, S.L.; Jänne, P.A.; Oxnard, G.R. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol.* **2016**, *2*, 1014–1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Oxnard, G.R.; Paweletz, C.P.; Kuang, Y.; Mach, S.L.; O’Connell, A.; Messineo, M.M.; Luke, J.J.; Butaney, M.; Kirschmeier, P.; Jackman, D.M.; et al. 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*, 1698–1705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Taus, Á.; Camacho, L.; Rocha, P.; Hardy-Werbin, M.; Pijuan, L.; Piquer, G.; López, E.; Dalmases, A.; Longarón, R.; Clavé, S.; et al. Dynamics of EGFR Mutation Load in Plasma for Prediction of Treatment Response and Disease Progression in Patients with EGFR-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Clin. Lung Cancer* **2018**, *19*, 387–394.e2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Roelofsen-de Beer, R.; Wiolders, J.; Boursier, G.; Vodnik, T.; Vanstapel, F.; Huisman, W.; Vukasović, I.; Vaubourdolle, M.; Sönmez, Ç.; Linko, S.; et al. Validation and verification of examination procedures in medical laboratories: Opinion of the EFLM Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WG-A/ISO) on dealing with ISO 15189:2012 demands for method verification and validation. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2020**, *58*, 361–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Brooks, J.D. Translational genomics: The challenge of developing cancer biomarkers. *Genome Res.* **2012**, *22*, 183–187. [[CrossRef](#)]
38. Wang, L.; Guo, Q.; Yu, W.; Qiao, L.; Zhao, M.; Zhang, C.; Hu, X.; Yang, G.; Xiong, L.; Lou, J. Quantification of plasma EGFR mutations in patients with lung cancers: Comparison of the performance of ARMS-Plus and droplet digital PCR. *Lung Cancer* **2017**, *114*, 31–37. [[CrossRef](#)]
39. Pender, A.; Garcia-Murillas, I.; Rana, S.; Cutts, R.J.; Kelly, G.; Fenwick, K.; Kozarewa, I.; Gonzalez de Castro, D.; Bhosle, J.; O'Brien, M.; et al. Efficient Genotyping of KRAS Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Using a Multiplexed Droplet Digital PCR Approach. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139074. [[CrossRef](#)]

4. DISCUSIÓN

1. Implementación del estudio molecular del gen *EGFR* mediante el análisis de cfDNA en plasma en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas

Hoy en día, el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* a partir de biopsias de tejido está plenamente consolidado en la práctica clínica. Los avances técnicos que permiten la obtención de ADN de nuevas fuentes como el cfDNA, así como el desarrollo de nuevos métodos analíticos multiplican el abanico de posibilidades disponibles para estudios moleculares. Implementar estrategias diagnósticas basadas en el análisis del cfDNA supone un reto para los laboratorios clínicos de diagnóstico molecular. Las guías internacionales recomiendan el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* en muestras de biopsia de tejido frente al cfDNA, excepto en casos excepcionales, como en aquellos casos en los que la muestra de tejido no esté disponible, sea difícil de obtener, o no sea adecuada para el análisis molecular.

Los datos obtenidos en el trabajo I muestran que la caracterización del gen *EGFR* en cfDNA en plasma mediante el Cobas Test tiene una alta eficacia diagnóstica (95.2%). En la cohorte de pacientes, el Cobas Test presentó una sensibilidad del 78%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 94.2%. Los resultados obtenidos concuerdan con los publicados en un metaanálisis reciente en el que se incluyeron 32 estudios con 4.527 pacientes y la práctica totalidad de las aproximaciones metodológicas disponibles actualmente. Dicho estudio observó una sensibilidad y especificidad global del 70% y 98%, respectivamente(165), lo que confirma que el Cobas Test presenta valores de sensibilidad y especificidad similares a métodos teóricamente más sensibles y técnicamente más complejos.

En el grupo de pacientes incluidos en el trabajo I, la prevalencia de mutaciones en el gen *EGFR* detectada mediante el análisis de cfDNA en plasma (24.3%) fue ligeramente superior a la obtenida en cohortes caracterizadas mediante muestras de plasma(19.6%)(53), y claramente superior a la observada en cohortes caracterizadas mediante análisis de tejido(166–168). La distribución de mutaciones en el gen *EGFR* según las características clínicas de los pacientes fue similar a la observada en otras cohortes caracterizadas mediante biopsia de tejido: superior en mujeres (34.5%) respecto a hombres (14.6%), pacientes no fumadores (49.2%) respecto a pacientes fumadores o exfumadores (11.4%), y pacientes en estadio metastásico (25%) frente a estadios menos avanzados (17.6%). Los sesgos en la inclusión de pacientes como la ratio hombre/mujer, el porcentaje de pacientes no fumadores, el subtipo histológico del tumor y el estadio pueden impactar en las diferencias observadas en la prevalencia de alteraciones observada entre los diferentes estudios. Además, como se ha reportado recientemente, el sustrato genético de los pacientes podría también influir en la frecuencia de alteraciones del gen

EGFR en pacientes con cáncer de pulmón(169). Probablemente, la implementación del análisis del gen *EGFR* en cfDNA en plasma en la práctica clínica de forma más generalizada, aportará información de la prevalencia real de las mutaciones de este gen en la población.

De forma relevante, el tiempo de respuesta medio de nuestro laboratorio en la entrega de resultados fue de 7 días. Por lo que, implementar el análisis del cfDNA en plasma permite identificar con un reducido tiempo de respuesta a la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) con mutaciones en el gen *EGFR*, los cuales serán candidatos recibir terapia con inhibidores de la tirosina quinasa (TKIs) de manera inmediata. La rápida respuesta del laboratorio también es relevante en el seguimiento longitudinal de pacientes para la monitorización de la respuesta al tratamiento, ya que permite detectar la progresión de la enfermedad y la aparición de mutaciones de resistencia en un corto espacio de tiempo, permitiendo la introducción de nuevas terapias de forma rápida.

A pesar de que los resultados obtenidos en el trabajo I como los obtenidos en otros estudios avalan el uso del cfDNA en plasma para el análisis de mutaciones en el gen *EGFR* como muestra alternativa al tejido, aún no se ha alcanzado un consenso internacional que recomiende su uso salvo en los casos en que este no esté disponible. Una de las razones esgrimidas es que la muestra de tejido permite la correcta clasificación histológica del cáncer de pulmón. Dicha clasificación evita el tratamiento inapropiado de los pacientes, debido a que los TKIs sólo están aprobados para el tratamiento de pacientes con CPCNP metastásico con mutaciones en el gen *EGFR*. El hecho de no disponer del diagnóstico histológico podría llevar a tratar a pacientes con otra histología diferente a CPCNP o con metástasis de un tumor de origen desconocido. En el trabajo I, todos los tumores en los que se detectó la mutación en el gen *EGFR* presentaban el subtipo histológico adenocarcinoma, con la excepción de dos pacientes en que la información histológica del tumor no estaba disponible. Cabe destacar que los dos pacientes recibieron tratamiento con TKIs en base al estudio molecular en plasma. Por otro lado, estudios moleculares de cohortes de pacientes con los diferentes subtipos histológicos de cáncer de pulmón confirman que las mutaciones en el gen *EGFR* contra las que se dirigen los TKIs raramente se encuentran en otras histologías no incluidas en el grupo de CPCNP, siendo predominantes en los adenocarcinomas. Además, la alta especificidad de los métodos disponibles actualmente, cercana al 100%, reduce considerablemente la posibilidad de encontrar resultados falsos positivos.

La introducción del análisis del cfDNA en el entorno clínico es especialmente importante en aquellos pacientes en los que no se dispone de muestra de tejido. Dentro de la cohorte de

pacientes incluidos en el trabajo I, esta circunstancia se dio en el 40% de los casos, lo que concuerda con los datos reportados previamente(146,150,151). En este grupo de pacientes, se identificaron mutaciones en el gen *EGFR* en 35% de los casos, los cuales recibieron un tratamiento dirigido de manera inmediata. La inclusión del análisis del gen *EGFR* en plasma por métodos no invasivos en la práctica clínica es crucial para la aplicación de estrategias de medicina personalizada en aquellos pacientes en los que no se dispone de muestra de tejido, los cuales reciben tratamiento con TKIs aunque el diagnóstico histológico no esté disponible.

Ante los datos expuestos anteriormente, nos encontramos ante una encrucijada, decidir si es necesario el diagnóstico histológico en pacientes con una mutación en el gen *EGFR* en plasma para recibir tratamiento con TKIs o si por el contrario pueden recibir el tratamiento sin la necesidad de esperar al análisis de la biopsia de tejido. Los resultados indican que no es necesario esperar al resultado de la biopsia en tejido para comenzar el tratamiento con TKIs en pacientes que presenten una mutación en el gen *EGFR* en plasma. No obstante, es necesario que las guías clínicas internacionales respalden este modo de proceder ante esta situación, la cual muy probablemente será habitual en la práctica clínica.

No existe en las guías clínicas ninguna recomendación sobre cómo actuar en el caso de un resultado negativo en una muestra de plasma. Dicho resultado puede tratarse de un falso negativo debido a la sensibilidad analítica de la técnica. Por otro lado, existe un porcentaje variable de tumores en estadios avanzados en los que no se detecta cfDNA(170). En el trabajo I se obtuvo un 8% de falsos negativos en plasma. Además, un resultado negativo puede ser un verdadero negativo en el momento del diagnóstico debido a que se trata de un tumor *EGFR* no mutado, o de un verdadero negativo en un tumor *EGFR* mutado que responde al tratamiento durante el seguimiento del paciente.

En el momento del diagnóstico, ante un resultado negativo en plasma en plataformas dirigidas solo a mutaciones en el gen *EGFR*, sería recomendable ampliar el estudio genético mediante paneles tipo NGS dirigidos a más genes con mutaciones accionables en CPCNP, siempre que sea posible, ya que esta aproximación presenta un rendimiento diagnóstico superior(158). En el caso de pacientes en seguimiento, en los cuales se ha determinado previamente la existencia de una mutación en el gen *EGFR*, y basándonos en otros biomarcadores o pruebas diagnósticas utilizados en seguimiento del CPCNP, ante un resultado negativo en plasma sería recomendable repetir la extracción de sangre en un período de 3-4 semanas, siguiendo el ejemplo de los marcadores tumorales en suero. En los casos en que sea posible, también sería útil reanalizar la muestra por un método alternativo.

En el trabajo III se comparó el rendimiento del Cobas Test con un kit basado en ddPCR para la detección de deleciones en el exón 19 del gen *EGFR*. El estudio incluyó tanto muestras en el momento del diagnóstico previo a cualquier tratamiento como muestras de seguimiento postratamiento, e identificó la alteración por un único método en un 25% de las muestras analizadas. El valor de concordancia entre ambos métodos (75%) fue ligeramente inferior al hallado en estudios previos(144,171). Esta discrepancia puede explicarse por la diferencia entre el número de sondas incluidas en cada método, además de otros factores. Los falsos negativos obtenidos por el Cobas Test presentaban un número de copias mutadas/mL inferior al límite de detección de la técnica declarado por el fabricante. Por otro lado, los casos falsos negativos obtenidos por ddPCR presentaban valores de SQI que correlacionan con valores de VAF < 0.5%, que es el límite de detección de este kit de ddPCR reportado por el fabricante. La capacidad de realizar determinaciones seriadas que nos aporta el análisis de cfDNA en plasma nos permitirá minimizar los problemas asociados a la sensibilidad analítica con bajos valores de VAF, ya que ante un resultado negativo tenemos la oportunidad de realizar un nuevo análisis en un corto período de tiempo.

De manera opuesta, aunque la especificidad de la mayoría de los métodos incluido el Cobas Test es del 100%, también existe la posibilidad de encontrar resultados falsos positivos. En el trabajo I no se produjo ningún caso falso positivo con el Cobas Test, sin embargo, en el trabajo III se obtuvieron resultados positivos mediante ddPCR en 4 muestras de pacientes con tumores cuyas mutaciones, que conocíamos por el análisis previo en tejido, no estaban incluidas en el panel de mutaciones del test. Existen dos explicaciones a este fenómeno. La primera es que en muestras en que la concentración del alelo *wild-type* es mucho mayor que la del alelo mutado pueden ocurrir apareamientos no específicos de los cebadores, resultando en amplificaciones no específicas. La segunda explicación es la posibilidad de reacciones cruzadas con sondas diseñadas para mutaciones que se encuentra en la misma región que la mutación de interés, como ha sido descrito para métodos tipo ddPCR(172). Es importante conocer estas limitaciones especialmente en aquellos métodos en los que se sabe que pueden producirse estos fenómenos, como la ddPCR, que además cuentan con un número limitado de sondas que no cubren todo el espectro de mutaciones del gen, por ejemplo, de las deleciones en el exón 19 del gen *EGFR*.

La posibilidad de falsos positivos o falsos negativos, aunque sea baja, subraya la importancia de la validación o verificación de los métodos analíticos siguiendo los estándares internacionales de calidad, como los requeridos por la norma UNE-EN ISO 15189 para la acreditación de los laboratorios clínicos(173). En el caso de test cualitativos para el diagnóstico molecular genético, se recomienda el estudio de las medidas estándar de eficacia diagnóstica como la sensibilidad,

especificidad, precisión y límite de detección antes de su introducción en la práctica clínica, lo que nos permitirá ofrecer resultados amparados por estándares de calidad, que sean útiles tanto a los pacientes como a los clínicos(174). Además, la norma UNE-EN ISO 15189 incluye como requisito indispensable para obtener la acreditación según esta norma la participación en Programas de Garantía Externa de la Calidad. En el caso del análisis del gen *EGFR* en plasma, la European Molecular Quality Network (EMQN) ha desarrollado el programa *EMQN Molecular testing of cfDNA in plasma for EGFR gene mutations*, con frecuencia anual, que permite evaluar la eficiencia del laboratorio en la extracción del cfDNA, el análisis de la mutación en el gen *EGFR*, y el análisis y la interpretación del genotipo, mediante el materiales de referencia artificiales designados para mimetizar muestras de cfDNA con mutaciones clínicamente relevantes.

2. Características y utilidad clínica del índice semicuantitativo (SQI) de la alteración *EGFR* en plasma

La cinética de parámetros cuantitativos asociados al ctDNA como la VAF o el número de copias mutadas/mL se ha propuesto como un biomarcador capaz de predecir la respuesta al tratamiento en los pacientes con CPCNP con alteraciones en el gen *EGFR* en plasma. Estos parámetros pueden ser útiles para establecer la EMR, la predicción de recaídas y la supervivencia(155,175,176). Actualmente, incluir información cuantitativa en el análisis del *EGFR* en plasma es complejo. La introducción de esta información en la práctica clínica requiere de un conocimiento previo de las características metroológicas del biomarcador.

En la cohorte de pacientes con CPCNP del trabajo I se dispuso de un pequeño subgrupo de pacientes en el que se evaluó la reproducibilidad de los valores SQI analizando dos viales obtenidos en la misma extracción de plasma. En este subgrupo se obtuvo una reproducibilidad moderada entre el SQI obtenido en ambos viales. Estos datos difieren de la información reportada por el fabricante, el cual indica una excelente reproducibilidad tanto para las deleciones en el exón 19 como las mutaciones p.T790M y p.L858R. Las diferencias detectadas entre el trabajo I y la información del fabricante podrían deberse a diferentes factores. Por un lado, el número de muestras utilizadas para evaluar la reproducibilidad en el trabajo I es menor comparado con el número de muestras analizadas por el fabricante. Por otro lado, en el trabajo I se incluyeron muestras con deleciones en el exón 19 con valores de SQI por debajo de 8, en las cuales según los datos del fabricante existe una mayor imprecisión en los replicados. Por último, en dos pacientes incluidos en nuestro estudio que presentaban la mutación p.L858R se obtuvo un valor de SQI de 0 en uno de los duplicados, mientras que en el otro duplicado el valor del SQI

era ≤ 6 , cercano al límite de detección de la técnica. En el trabajo I, observamos que valores bajos de SQI se asocian con una mayor dispersión de los resultados en las muestras analizadas por duplicado, tanto para las deleciones en el exón 19 como para la mutación puntual p.L858R. Kim et al. estudiaron la reproducibilidad del SQI de diferentes mutaciones del gen *EGFR* a fracciones alélicas crecientes y obtuvieron que valores bajos de VAF presentan una alta variabilidad de valores de SQI(149)

De forma significativa, en el trabajo I se observó que las muestras de los pacientes con deleciones en el exón 19 presentaron valores significativamente más altos de SQI que aquellos con la mutación p.L858R, lo que sugiere que factores técnicos pueden influir en los valores SQI. Estas diferencias en el valor de SQI en función de la mutación también han sido reportadas por el fabricante y por Kim et al. Cabe destacar que los resultados observados en nuestra cohorte clínica concuerdan con los observados en el programa de garantía externa de la calidad coreano, en el que se analizaron materiales de referencia obtenidos de líneas celulares.

En el trabajo I, la concentración de cfDNA no correlacionó con el tipo de mutación ni con los valores de SQI detectados. Por lo tanto, se puede concluir que las características metrológicas del SQI en una muestra de plasma dependen principalmente de la mutación que presenta el paciente, ya que su rango de valores es variable en función de esta, y que su reproducibilidad es moderada en aquellos casos con mutaciones con una baja frecuencia alélica.

En el trabajo III se observó que solo el 73.7% de las muestras con un resultado positivo mediante el Cobas Test presentaba también un resultado positivo mediante ddPCR. Previo al trabajo III, se han descrito disparidades en la detección de deleciones en el exón 19 en el gen *EGFR* al analizar las muestras mediante Cobas Test y ddPCR. Ebert et al. observaron que mientras que en las muestras de pacientes con la mutación p.L858R se detectaba la alteración mediante ambos métodos en el 100% de los casos, en aquellos pacientes con deleciones en el exón 19 detectadas mediante Cobas Test, únicamente en el 67% de las muestras se detectaba la alteración por ddPCR(177).

Más allá de la evaluación técnica de estos parámetros, la falta de puntos de corte clínicamente relevantes es también un motivo por el que la información cuantitativa no está implementada en la práctica clínica. Varios estudios han propuesto diferentes puntos de corte de la VAF de la mutación de sensibilidad del gen *EGFR* para diferentes escenarios clínicos. En el estudio ASTRIS se determinó un punto de corte pronóstico de una mayor progresión libre de enfermedad en pacientes que habían adquirido la mutación de resistencia p.T790M(178). En un reciente estudio del Grupo Español de Cáncer de Pulmón, se establecieron puntos de corte predictores de una

mayor supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes antes de comenzar el tratamiento o a los 3 o 6 meses del inicio de la terapia con TKIs(179). Por otro lado, en pacientes con CPCNP avanzado tratados con inmunoterapia, la respuesta molecular medida como un descenso > 50% de la VAF entre muestras pretratamiento y muestras obtenidas a las 9 semanas postratamiento correlacionó con una mayor progresión libre de enfermedad y supervivencia global(180).

Pocos estudios han evaluado el valor del SQI en la práctica clínica. Marchetti et al. evaluaron la utilidad del SQI mediante la monitorización de este parámetro en pacientes con CPCNP a partir del inicio de la terapia con TKIs. La cinética de descenso del SQI correlacionó con el porcentaje de disminución del tumor y permitió dividir a los pacientes en respondedores rápidos, respondedores lentos y no respondedores. Por lo tanto, el SQI correlaciona con la progresión de la enfermedad, lo que se traduce en una posible aplicación del mismo como biomarcador de la respuesta a TKIs. La monitorización longitudinal permitiría además identificar mutaciones de resistencia meses antes de que la progresión clínica sea evidente(146).

El valor del SQI como un marcador equivalente a la VAF no está establecido. Esto cobra relevancia cuando el Cobas Test es utilizado con fines cuantitativos además de cualitativos. Pocos estudios han intentado correlacionar el SQI con la VAF, y los resultados obtenidos hasta el momento son contradictorios. Los datos obtenidos en el trabajo III demuestran una alta correlación entre el SQI y el VAF y el SQI y las copias mutadas/mL en deleciones del exón 19 del gen *EGFR*. Esta correlación fue mayor en muestras obtenidas antes de iniciar el tratamiento comparado con las muestras obtenidas durante el seguimiento de la terapia, probablemente debido al descenso en la cantidad de ctDNA una vez iniciado el tratamiento(181), ya que como se ha indicado anteriormente, el valor de SQI muestra una mayor variabilidad en muestras con una baja VAF(149). Por su parte, Marchetti et al. encontraron una correlación entre el SQI y la VAF obtenida por NGS para las deleciones en el exón 19 y las mutaciones p.L858R y p.T790M(146). De manera contraria, Macías et al. no hallaron una correlación entre el SQI y el número de copias mutadas/mL mediante ddPCR. A pesar de ello, sí que consideran que el SQI tiene valor como marcador de respuesta y progresión de la enfermedad(148). Como se ha explicado anteriormente, el valor del SQI varía en función de la mutación encontrada en el gen *EGFR*. En el estudio de Macías et al. la correlación entre SQI y las copias mutadas/mL fue obtenida en una cohorte de pacientes con deleciones en el exón 19 y con la mutación p.L858R, por lo que sus resultados no son comparables con los de nuestro estudio, en el que nos hemos centrado en las deleciones del exón 19, que son las mutaciones más prevalentes.

De los datos a obtenidos en el trabajo III se deduce que en pacientes con deleciones en el exón 19 en el gen *EGFR* el SQI es un parámetro robusto que correlaciona con la VAF, y que se puede inferir la VAF a partir del valor de SQI. Por tanto, el valor del SQI es útil como marcador de la carga mutacional del tumor. Un ejemplo lo encontramos en uno de los pacientes incluidos en el trabajo III al que se le realizó un estudio longitudinal con determinaciones seriadas de cfDNA cada 30 días. En este paciente se observó cómo, tras el inicio del tratamiento con un TKI, los valores de SQI y VAF de la mutación de sensibilidad se mantenían indetectables, hasta un punto en el que comenzaron a incrementarse de manera paralela, alcanzando el pico máximo en el momento de la detección de la mutación de resistencia p.T790M y posteriormente comenzando a descender en paralelo tras el inicio del tratamiento con osimertinib. La cinética del SQI subraya la importancia de las determinaciones seriadas, ya que, tras la reaparición de la mutación de resistencia, y siguiendo la cinética del SQI, se podría haber detectado la progresión de la enfermedad 3 meses antes de la detección clínica y radiológica.

Los resultados del trabajo I y III ponen de manifiesto la necesidad de evaluar las características metrológicas del parámetro SQI antes de utilizarlo en la práctica clínica. En el caso de test cuantitativos, se recomienda calcular la exactitud, precisión y límite de detección de la técnica(174). Una vez establecidas las características metrológicas del SQI, es necesario evaluar su utilidad en el entorno clínico, y determinar puntos de corte útiles en diferentes situaciones, de manera similar a los marcadores bioquímicos. En primer lugar, sería necesario determinar cuál es el valor de SQI en muestras obtenidas antes del tratamiento que permita predecir el curso de la enfermedad. También habría que establecer la periodicidad para la monitorización longitudinal de la eficacia del tratamiento mediante el análisis del gen *EGFR* en plasma, y por otro lado el porcentaje de cambio del valor de SQI entre determinaciones que se considera significativo. A día de hoy, no existen recomendaciones en las guías clínicas al respecto, y solo la guía de la ESMO menciona el potencial clínico de la monitorización seriada en sangre tras el inicio del tratamiento(69).

Sin embargo, sí existen recomendaciones para otros biomarcadores utilizados para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con diferentes neoplasias. En el caso del cáncer de mama, la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC) en consenso con la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) recomienda el análisis de marcadores tumorales en suero cada 3-4 semanas, y define un cambio significativamente clínico que marca el progreso de la neoplasia como dos incrementos consecutivos del >25% o un incremento > 50%(182). El grupo de trabajo de Marcadores Biológicos del Cáncer de la SEQC recomienda la determinación de los marcadores tumorales en un intervalo no inferior a 3-4 semanas en el proceso del diagnóstico

diferencial y cada tres meses para la detección precoz de recidiva. En la valoración de la eficacia del tratamiento, se hace eco de la recomendación del European Group of Tumor Markers (EGTM), que recomienda la determinación de marcadores tumorales en el control analítico inmediatamente anterior a la administración del tratamiento. Respecto al valor del cambio clínicamente relevante, no existe un criterio único, sino que depende del marcador tumoral y del tipo de tumor estudiado. Ante un incremento en un marcador tumoral recomiendan una nueva determinación a las 3-4 semanas, interpretando dos incrementos > 25% como muy sugestivo de progresión(183). En el caso del análisis de los marcadores tumorales en suero en cáncer de pulmón, un incremento superior a 2 veces el valor basal de estos correlacionó con peor supervivencia y progresión libre de enfermedad(184). Así pues, en consonancia con los trabajos publicados, se puede considerar que determinar la presencia de mutaciones en el gen *EGFR* y el valor SQI mensualmente es una estrategia adecuada, y que dos aumentos consecutivos en el valor del SQI podrían considerarse como sugestivos de progresión de la enfermedad.

3. Valor de la concentración de cfDNA como biomarcador en el diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña

Más allá del análisis del ctDNA, diferentes estudios han evaluado el papel de la concentración de cfDNA total como biomarcador en el manejo de pacientes con CPCNP. La concentración de cfDNA correlaciona con la carga tumoral(103), es significativamente mayor en pacientes con CPCNP respecto a controles normales y en pacientes con estadios III-IV respecto a estadios I-II, y presenta una buena capacidad diagnóstica para distinguir entre pacientes con CPCNP de pacientes sanos(185).

Algunos estudios han estimado la capacidad de la concentración de cfDNA para diferenciar entre cáncer metastásico de no metastásico. En el trabajo I se observó que la concentración de cfDNA fue significativamente más alta en pacientes con CPCNP metastásico que en pacientes con estadio III, tanto para el grupo de pacientes con adenocarcinomas como para el grupo de pacientes con otras histologías. Se obtuvo un punto de corte de concentración de cfDNA de 20.3 ng/mL que permite clasificar a los pacientes con CPCNP como metastásico, con valores de sensibilidad y especificidad elevados, y un AUC de 0.86 .

En los trabajos de esta tesis, el método utilizado para medir la concentración de cfDNA fue el Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific). Este equipo presenta una alta correlación con la q-PCR, la cual es el gold-estándar para la medida de la concentración de cfDNA(186). Mirtavoos et al. compararon dos kits comerciales para la extracción del cfDNA, y sus resultados arrojaron

un AUC de 0.98 en ambos kits para distinguir CPCNP metastásico de no metastásico, estableciendo como puntos de corte 10.1 y 13.0 ng/mL para cada uno de los métodos(157). Una de las fortalezas del trabajo I y que refuerza la validez analítica de nuestros resultados es que analizamos las muestras de un alto número de pacientes por duplicado, obteniendo una reproducibilidad casi perfecta ($r^2=0.99$) para la concentración de cfDNA entre los dos viales analizados.

El diagnóstico del CPCNP mediante técnicas de imagen combina el TC con el FDG-PET (FGF PET/TC) y proporciona información anatómica del tumor e información metabólica del mismo. La relación entre los parámetros derivados del FGF PET/TC y la concentración de cfDNA ha sido poco explorada, y los resultados obtenidos son contradictorios. En el trabajo II observamos una correlación significativa entre la concentración de cfDNA y los parámetros volumétricos y metabólicos (*metabolic tumor burden* (MTV) y *total lesion glycolysis* (TLG)) de la enfermedad metastásica. A diferencia de otros estudios en los que solo se analizaron los datos referentes a la enfermedad global, en el trabajo II se evaluó la información relativa a la enfermedad primaria y a la enfermedad metastásica extrapulmonar, además de la enfermedad global. Los parámetros relativos a la enfermedad metastásica extrapulmonar se calcularon como la suma de todas las lesiones extrapulmonares, lo que refleja de manera más fidedigna la carga tumoral extrapulmonar y la actividad metabólica. En el trabajo II no se encontraron correlaciones significativas entre la concentración de cfDNA y los parámetros del FDG PET/TC derivados de la lesión primaria o de la enfermedad total. Las ratios entre los parámetros de la enfermedad metastásica y los parámetros de la enfermedad total, calculados para evaluar el impacto de las metástasis en la enfermedad global, también presentaron correlaciones significativas con la concentración de cfDNA, indicando que esta refleja la carga tumoral y la agresividad de las lesiones metastásicas en lugar del tumor primario.

Hasta la fecha, únicamente dos estudios han evaluado la relación entre la concentración de cfDNA y la información de FDG PET/TC en pacientes con CPCNP, con diseños experimentales diferentes y resultados contradictorios. Por un lado, Nygaard et al. analizaron la información derivada del tumor primario, los nódulos linfáticos y las metástasis evaluados como enfermedad total. El estudio no detectó una relación entre la información derivada del FDG PET/TC y la concentración de cfDNA(187). Por otro lado, el estudio de Morbelli et al. se centró en evaluar la lesión metastásica más grande. Este trabajo detectó una correlación entre el SUVMax (la lesión con mayor captación de FDG) y la concentración de cfDNA, sugiriendo que la concentración de cfDNA correlaciona con la lesión con mayor actividad metabólica y no con la carga tumoral. Además, hallaron una mayor concentración de cfDNA en pacientes con lesiones metastásicas

metabólicamente activas en el hueso, aunque no proporcionaron información del resto de órganos(188).

El diseño del trabajo II refleja de manera más precisa el comportamiento del tumor y permite extraer conclusiones más robustas sobre su relación con la concentración de cfDNA, ya que separó la influencia de la lesión primaria y de las metástasis en la enfermedad global y evaluaba el conjunto de lesiones metastásicas y no únicamente la lesión metastásica mayor.

En el trabajo II encontramos una mayor concentración de cfDNA en las muestras de plasma de pacientes con lesiones hepáticas, de manera similar a los datos obtenidos por Morbelli, y en otros trabajos(189). Se ha publicado que las características del tumor primario como la vascularización, la histología, el grado de perfusión y de proliferación afectan a la concentración de cfDNA(105). Los resultados previamente publicados y del trabajo II sugieren que factores biológicos que afectan al tumor primario afectan también a las lesiones metastásicas, produciéndose una mayor liberación de cfDNA a la sangre por parte de algunos órganos, como en el caso del hígado, en el que la ausencia de membrana basal capilar puede facilitar la liberación de cfDNA a la circulación(190). Un estudio encontró una asociación estadísticamente significativa entre la sensibilidad analítica de un método tipo ddPCR para la detección de mutaciones en los genes *EGFR* y *KRAS* en cfDNA y la presencia de metástasis hepáticas y óseas, y concluyó que las lesiones metastásicas en estos órganos son predictivas de una mayor liberación de cfDNA(191).

Actualmente el valor de la concentración de cfDNA es medida sistemáticamente para la calcular la cantidad de ADN necesario para la realización de las diferentes técnicas moleculares. Sin embargo, su valor no es reportado en el informe de laboratorio junto con el resultado del análisis molecular. En nuestro estudio hemos observado que la concentración de cfDNA es un parámetro metrológicamente robusto y que permite diferenciar pacientes con CPCNP metastásico de estadios más iniciales. Además, hemos demostrado una correlación entre la concentración de cfDNA y los parámetros de imagen de enfermedad metastásica extrapulmonar. Por lo tanto, los datos del trabajo I y II sugieren que sería útil incluir la concentración de cfDNA obtenida en una muestra de plasma junto con el resultado molecular de *EGFR*.

4. Valor del patrón de fragmentos de cfDNA como biomarcador en el manejo de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña

La utilidad del patrón de fragmentos de cfDNA para el estadiaje de pacientes con CPCNP ha sido menos estudiado que la concentración de cfDNA(192). En pacientes con cáncer de pulmón, Soliman et al. hallaron que la integridad del cfDNA calculada como el ratio entre fragmentos largos y fragmentos cortos de cfDNA permitió diferenciar entre pacientes con cáncer de pulmón y pacientes con patología respiratoria no neoplásica y población sana(110). Recientemente, un estudio ha validado en una cohorte prospectiva de pacientes con cáncer de pulmón un modelo creado mediante *machine learning* que combina el patrón de fragmentación del cfDNA, la concentración del marcador tumoral CEA, factores clínicos de riesgo e imágenes del TC para la detección de pacientes con cáncer de pulmón en todos los estadios, con una alta sensibilidad y especificidad(193).

Sin embargo, no existen estudios publicados que comparen la fracción de fragmentos cortos entre pacientes de CPCNP según el estadio tumoral. En el trabajo I, los pacientes con CPCNP en estadio IV presentaron una mayor fracción de fragmentos cortos (100-250 pb), así como de fragmentos medios (250-700 pb), con respecto a pacientes en estadio III. Se ha descrito que los pacientes con una alta carga tumoral, normalmente pacientes con cáncer avanzado, presentan una distribución trimodal de fragmentos de cfDNA, con un pico en la zona de fragmentos cortos y dos picos en la zona de fragmentos medios(194). En el trabajo I, una fracción de fragmentos cortos del 50.5% discriminaba a los pacientes con CPCNP en estadio IV frente aquellos con estadio III (AUC de 0.71). Sin embargo, el bajo valor de sensibilidad obtenido sugiere que la fracción de fragmentos cortos no tiene una utilidad clínica para discriminar entre pacientes metastásicos y pacientes en estadios menos avanzados.

El trabajo II ha sido el primer trabajo publicado hasta la fecha en evaluar la correlación del patrón de fragmentos de cfDNA con los parámetros derivados del FDG PET/TC. La fracción de fragmentos cortos cfDNA correlacionó positivamente con los parámetros volumétricos como el MTV y metabólicos como el TLG derivados de la enfermedad metastásica, así como con sus ratios con la enfermedad total, indicando el origen metastásico de los mismos. Se ha demostrado previamente que los tumores con valores altos de MTV y TLG correlacionan con un alto grado de proliferación tumoral, que a su vez está relacionado con procesos apoptóticos y metastásicos(195,196). Durante mucho tiempo se ha creído que el éxito de los procesos metastásicos radicaba en la habilidad de las células malignas de escapar de la apoptosis. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado teorías contrarias a este hecho. Una de ellas afirma que la apoptosis puede promover la proliferación celular necesaria para compensar la pérdida celular tras la terapia, y así restaurar la homeostasis tisular(197). También se ha hipotetizado que la apoptosis de células tumorales puede activar múltiples vías de señalización

oncogénicas, que promueven el crecimiento de células tumorales y su supervivencia, así como la angiogénesis, el remodelado tisular y las metástasis, además de inhibir la respuesta inmune antitumoral(198). Por otro lado, es conocida la relación entre los fragmentos de tamaño cortos de cfDNA y procesos apoptóticos(105).

Por tanto, el trabajo II sugiere que los pacientes con un alto grado de proliferación tumoral medido como MTV y TLG tienen un alto grado de procesos apoptóticos, lo que refuerza la teoría de que cuanto mayor es la proliferación, mayor es la apoptosis. La relación entre los fragmentos cortos de cfDNA con la enfermedad metastásica sugiere que las lesiones metastásicas sufren procesos apoptóticos y que, por lo tanto, la fracción de fragmentos cortos de cfDNA podría tener un papel como un biomarcador indirecto de tumores con un alto grado de proliferación y apoptosis extrapulmonar.

Al igual que con la concentración de cfDNA, se encontraron diferencias en la fracción de fragmentos cortos según la presencia o ausencia de lesiones metastásicas en diferentes órganos. Pacientes con lesiones hepáticas, pleurales y óseas presentaron una mayor fracción de fragmentos cortos. Debido al tamaño muestral, estos resultados no permiten extraer conclusiones robustas y se deberán llevar a cabo estudios prospectivos con una muestra más representativa de cada órgano para confirmar estos resultados.

Los trabajos II y III ponen de manifiesto el potencial de la fracción de fragmentos cortos del cfDNA como biomarcador de enfermedad metastásica en pacientes con CPCNP. Sin embargo, una de las potenciales limitaciones del análisis del patrón de fragmentos de cfDNA como biomarcador es la falta de estandarización de su medida. Existen varias alternativas que difieren en base a la tecnología utilizada, la sensibilidad a impurezas, inhibidores y contaminación por ADN genómico, el tiempo de procesamiento y el coste(199). En los trabajos I y III se ha utilizado un equipo que se basa en la electroforesis capilar. Este tipo de tecnología presenta buenos valores de sensibilidad, un bajo consumo de muestra, un tiempo de análisis rápido y un límite de detección que se ha reducido de 100 ng/mL a 1-5 ng/mL en los últimos años. El principal inconveniente de esta técnica es que, a bajas concentraciones de cfDNA, la sensibilidad de estos sistemas es insuficiente para la caracterización del tamaño del mismo, por lo que son necesarios métodos de preconcentración de la muestra(200). Por tanto, este tipo de técnica no sería recomendable para analizar cfDNA proveniente de pacientes sanos o en estadios tempranos de la enfermedad neoplásica.

La incorporación del análisis tanto de la concentración de cfDNA como de la fracción de los tamaños de los fragmentos del cfDNA podría convertirse en información complementaria a los

datos clínicos, moleculares o de imagen disponibles actualmente. Sin embargo, antes de incorporar estos parámetros a la práctica clínica se han de llevar a cabo estudios prospectivos que evalúen el rol de estos biomarcadores en el seguimiento del paciente, y establecer su utilidad en el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes con CPCNP. Ambos biomarcadores podrían tener aplicación en el proceso diagnóstico de pacientes con CPCNP en los que la existencia de metástasis a distancia no está clara, particularmente en hígado. Estos biomarcadores también podrían ser útiles para monitorizar a pacientes en seguimiento después del tratamiento con inmunoterapia, o que presenten respuesta disociada, en los que la progresión de la enfermedad se sospecha por un incremento del SUV pero no puede ser objetivada mediante los criterios RECIST.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis del gen *EGFR* en ADN libre circulante en plasma mediante el Cobas EGFR mutation test v2 es una alternativa adecuada, en términos de eficacia diagnóstica, a la biopsia de tejido para la caracterización molecular del gen *EGFR* en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña avanzado o metastásico.
2. La introducción del Cobas EGFR mutation test v2 en la práctica clínica ha permitido el acceso a terapias dirigidas a los pacientes en los que no se dispone de muestra de tejido.
3. El índice semicuantitativo (SQI) obtenido en el Cobas EGFR mutation test v2 es un parámetro robusto que correlaciona con la fracción alélica de la variante cuantificada mediante ddPCR en pacientes con deleciones en el exón 19 del gen *EGFR*.
4. La concentración de ADN libre circulante correlaciona con el estadio tumoral y con parámetros de imagen del tumor derivados de las lesiones metastásicas en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña avanzado o metastásico.
5. La fracción de fragmentos cortos del ADN libre circulante en plasma correlaciona con parámetros volumétricos y metabólicos de las lesiones metastásicas obtenidos a partir del FDG PET/TC en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña avanzado o metastásico.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May 1;71(3):209–49.
2. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019 Oct;28(10):1563-1579
3. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology glossary. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4):217–22.
4. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Heal*. 2019 Jan;85(1).
5. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. World cancer report: Cancer Research for Cancer Prevention World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. 2020
6. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans [Internet]. World Health Organization. 2021 [Updated 2020; cited 2021 Mar 25]. Available from <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>.
7. Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, Bickeböller H, Rosenberger A, McCormack V, et al. Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Am J Epidemiol*. 2012 Oct;176(7):573–85.
8. Durham AL, Adcock IM. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer*. 2015 Nov;90(2):121-7
9. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA*. 2016 Jan 5;315(1):68–76.
10. Coté ML, Liu M, Bonassi S, Neri M, Schwartz AG, Christiani DC, et al. Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Eur J Cancer*. 2012 Sep;48(13):1957–68.
11. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med*. 2011 Jun 29;365(5):395–409.

12. Becker N, Motsch E, Trotter A, Heussel CP, Dienemann H, Schnabel PA, et al. Lung cancer mortality reduction by LDCT screening—Results from the randomized German LUSI trial. *Int J Cancer*. 2020 Mar 15;146(6):1503–13.
13. de Koning HJ, van der Aalst CM, de Jong PA, Scholten ET, Nackaerts K, Heuvelmans MA, et al. Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *N Engl J Med*. 2020 Jan 29;382(6):503–13.
14. Oudkerk M, Devaraj A, Vliegenthart R, Henzler T, Prosch H, Heussel CP, et al. European position statement on lung cancer screening. *Lancet Oncol*. 2017 Dec 1;18(12):e754–66.
15. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol*. 2017 Aug 28;7:193
16. What is precision medicine? [Internet]. National Institutes of Health (NIH). [Updated 2020; cited 30 Aug 2021]. Available from: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/precisionmedicine/definition/>
17. Garrido P, Aldaz A, Vera R, Calleja MA, de Álava E, Martín M, et al. Proposal for the creation of a national strategy for precision medicine in cancer: a position statement of SEOM, SEAP, and SEFH. *Clin Transl Oncol*. 2018 Apr;20(4):443–7.
18. Brown NA, Aisner DL, Oxnard GR. Precision Medicine in Non–Small Cell Lung Cancer: Current Standards in Pathology and Biomarker Interpretation. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2018 May 23;(38):708–15.
19. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *J Thorac Oncol*. 2015 Sep 1;10(9):1240–2.
20. Travis WD. Lung Cancer Pathology: Current Concepts. *Clin Chest Med*. 2020 Mar;41(1):67–85.
21. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. International Agency for Research on Cancer. 2015.
22. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017. Natl Cancer Institute Bethesda. 2019.

23. Franco F, Carcereny E, Guirado M, Ortega AL, López-Castro R, Rodríguez-Abreu D, et al. Epidemiology, treatment, and survival in small cell lung cancer in Spain: Data from the Thoracic Tumor Registry. *PLoS One*. 2021;16(6):e0251761.
24. Provencio M, Carcereny E, Rodríguez-Abreu D, López-Castro R, Guirado M, Camps C, et al. Lung cancer in Spain: information from the Thoracic Tumors Registry (TTR study). *Transl lung cancer Res*. 2019 Aug;8(4):461–75.
25. The Cancer Genome Atlas Program. National Institutes of Health (NIH). [Updated 2019; cited 25 Aug 2021]. [Internet]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>
26. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446–54.
27. Robinson DR, Wu Y-M, Lonigro RJ, Vats P, Cobain E, Everett J, et al. Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature*. 2017;548(7667):297–303.
28. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543–50.
29. Kashima J, Kitadai R, Okuma Y. Molecular and Morphological Profiling of Lung Cancer: A Foundation for “Next-Generation” Pathologists and Oncologists. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr;11(5).
30. Skoulidis F, Heymach J V. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2019 Sep;19(9):495–509.
31. Bruno R, Fontanini G. Next Generation Sequencing for Gene Fusion Analysis in Lung Cancer: A Literature Review. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Jul 27;10(8):521.
32. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012;18(3):378–81.
33. Oberndorfer F, Müllauer L. Molecular pathology of lung cancer: current status and perspectives. *Curr Opin Oncol*. 2018 Mar;30(2):69–76.
34. Hammerman PS, Lawrence MS, Voet D, Jing R, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519–25.

35. Walter RFH, Vollbrecht C, Christoph D, Werner R, Schmeller J, Flom E, et al. Massive parallel sequencing and digital gene expression analysis reveals potential mechanisms to overcome therapy resistance in pulmonary neuroendocrine tumors. *J Cancer*. 2016;7(15):2165–72.
36. Armengol G, Sarhadi VK, Rönty M, Tikkanen M, Knuutila A, Knuutila S. Driver Gene Mutations of Non-Small-Cell Lung Cancer are Rare in Primary Carcinoids of the Lung: NGS Study by Ion Torrent. *Lung*. 2015;193(2):303–8.
37. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015;524(7563):47–53.
38. Rekhtman N, Pietanza MC, Hellmann MD, Naidoo J, Arora A, Won H, et al. Next-Generation Sequencing of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma Reveals Small Cell Carcinoma–like and Non–Small Cell Carcinoma–like Subsets. *Clin Cancer Res*. 2016 Jul 15;22(14):3618-29.
39. Miyoshi T, Umemura S, Matsumura Y, Mimaki S, Tada S, Makinoshima H, et al. Genomic Profiling of Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung. *Clin Cancer Res*. 2017 Feb 1;23(3):757-65.
40. George J, Walter V, Peifer M, Alexandrov LB, Seidel D, Leenders F, et al. Integrative genomic profiling of large-cell neuroendocrine carcinomas reveals distinct subtypes of high-grade neuroendocrine lung tumors. *Nat Commun*. 2018;9(1):1048.
41. Fallet V, Saffroy R, Girard N, Mazieres J, Lantuejoul S, Vieira T, et al. High-throughput somatic mutation profiling in pulmonary sarcomatoid carcinomas using the LungCarta™ Panel: exploring therapeutic targets. *Ann Oncol*. 2015 Aug 1;26(8):1748–53.
42. Hirsch FR, Scagliotti G V, Mulshine JL, Kwon R, Curran Jr WJ, Wu Y-L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017 Jan 21;389(10066):299–311.
43. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. 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. *J Thorac Oncol*. 2016 Jan;11(1):39–51.
44. Herbst RS, Heymach J V, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep;359(13):1367–80.

45. Dong R-F, Zhu M-L, Liu M-M, Xu Y-T, Yuan L-L, Bian J, et al. EGFR mutation mediates resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC: From molecular mechanisms to clinical research. *Pharmacol Res.* 2021 May;167:105583.
46. Cataldo VD, Gibbons DL, Pérez-Soler R, Quintás-Cardama A. Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer with Erlotinib or Gefitinib. *N Engl J Med.* 2011 Mar 9;364(10):947–55.
47. Reguart N, Remon J. Common EGFR-mutated subgroups (Del19/L858R) in advanced non-small-cell lung cancer: chasing better outcomes with tyrosine kinase inhibitors. *Future Oncol.* 2015;11(8):1245–57.
48. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020 Apr;61:167–79.
49. Wang T, Zhang J, Wang S, Sun X, Wang D, Gao Y, et al. The exon 19-deleted EGFR undergoes ubiquitylation-mediated endocytic degradation via dynamin activity-dependent and -independent mechanisms. *Cell Commun Signal.* 2018 Jul 5;16(1):40.
50. Id MZT, Koivu M, Elenius K, Johnson MS. Structural characterization of EGFR exon 19 deletion mutation using molecular dynamics simulation. 2019;1–23.
51. Zhang Y-L, Yuan J-Q, Wang K-F, Fu X-H, Han X-R, Threapleton D, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2016;7(48):9–13.
52. Reck M, Hagiwara K, Han B, Tjulandin S, Grohé C, Yokoi T, et al. CtDNA determination of EGFR mutation status in European and Japanese patients with advanced NSCLC: The ASSESS study. *J Thorac Oncol.* 2016;11(10):1682–9.
53. Soria-Comes T, Palomar-Abril V, Ureste MM, Guerola MT, Maiques ICM. Real-World Data of the Correlation between EGFR Determination by Liquid Biopsy in Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) and the EGFR Profile in Tumor Biopsy. *Pathol Oncol Res.* 2020 Apr;26(2):845–51.
54. Shah R, Lester JF. Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of EGFR Mutation-Positive Non–Small-Cell Lung Cancer: A Clash of the Generations. *Clin Lung Cancer.* 2020;21(3):e216–28.
55. Nakamura T, Nakashima C, Komiya K, Kitera K, Hirai M, Kimura S, et al. Mechanisms of acquired resistance to afatinib clarified with liquid biopsy. *PLoS One.* 2018 Dec 14;13(12):e0209384–e0209384.

56. Carpenter RL, Lo H-W. Dacomitinib, an emerging HER-targeted therapy for non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2012 Dec;4(6):639–42.
57. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005 Feb;352(8):786–92.
58. Cortot AB, Jänne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev.* 2014 Sep 1;23(133):356-66.
59. Camidge DR, Pao W, Sequist L V. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: Learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(8):473–81.
60. 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.* 2019 May 1;30(5):858.
61. Niederst MJ, Hu H, Mulvey HE, Lockerman EL, Garcia AR, Piotrowska Z, et al. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clin cancer Res.* 2015 Sep;21(17):3924–33.
62. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med.* 2015 Jun;21(6):560–2.
63. Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2019;121(9):725–37.
64. Woodard GA, Jones KD, Jablons DM. Lung Cancer Staging and Prognosis. *Cancer Treat Res.* 2016;170:47-75.
65. Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol.* 2018 Oct;52(Pt 1):103–9.
66. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists,

- the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321–46.
67. Inamura K. Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Mar 14;10(3):72.
 68. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep;99(19):12293–7.
 69. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018 Oct;29(Suppl 4):iv192–237.
 70. Callister MEJ, Baldwin DR, Akram AR, Barnard S, Cane P, Draffan J, et al. British Thoracic Society guidelines for the investigation and management of pulmonary nodules: accredited by NICE. *Thorax*. 2015 Aug 1;70(Suppl 2):ii1 LP-ii54.
 71. Chen Z-Q, Huang L-S, Zhu B. Assessment of Seven Clinical Tumor Markers in Diagnosis of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Dis Markers*. 2018 Dec 11;2018:9845123.
 72. Molina R, Filella X, Augé-Fradera JM, Escudero JM. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. Estado actual y perspectivas de futuro III. *Roche Diagnostics*. 2011; 11–43.
 73. Molina R, Augé JM, Bosch X, Escudero JM, Viñolas N, Marrades R, et al. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology. *Tumour Biol*. 2009;30(3):121–9.
 74. Molina R, Marrades RM, Augé JM, Escudero JM, Viñolas N, Reguart N, et al. Assessment of a combined panel of six serum tumor markers for lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(4):427–37.
 75. De Wever W, Coolen J, Verschakelen JA. Imaging techniques in lung cancer. *Breathe*. 2011 Jun 1;7(4):338–46.
 76. Rami-Porta R, Call S, Doooms C, Obiols C, Sánchez M, Travis WD, et al. Lung cancer staging: a concise update. *Eur Respir J*. 2018 May;51(5).
 77. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2015 May;1:15009.

78. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009 Jan;45(2):228–47.
79. Im HJ, Bradshaw T, Solaiyappan M, Cho SY. Current Methods to Define Metabolic Tumor Volume in Positron Emission Tomography: Which One is Better? *Nucl Med Mol Imaging*. 2018 Feb;52(1):5-15.
80. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. 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 Mar;36(9):911–9.
81. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, Marchetti A, Mok T, Novello S, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25(9):1681–90.
82. Kerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, Botling J, Ryška A, Wolf J, et al. The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe. *Lung Cancer*. 2021 Apr;154:161–75.
83. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko E V. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;157:103194.
84. Ardakani NM, Giardina T, Grieu-Iacopetta F, Tesfai Y, Carrello A, Taylor J, et al. Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Adenocarcinoma: Comparing Cobas 4800 EGFR Assay With Sanger Bidirectional Sequencing. *Clin Lung Cancer*. 2016 Sep;17(5):e113–9.
85. Zhao J, Liu P, Yu Y, Zhi J, Zheng X, Yu J, et al. Comparison of diagnostic methods for the detection of a BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Oncol Lett*. 2019 May;17(5):4661–6.
86. Qu K, Pan Q, Zhang X, Rodriguez L, Zhang K, Li H, et al. Detection of BRAF V600 Mutations in Metastatic Melanoma: Comparison of the Cobas 4800 and Sanger Sequencing Assays. *J Mol Diagnostics*. 2013;15(6):790–5.

87. Janku F, Claes B, Huang HJ, Falchook GS, Devogelaere B, Kockx M, et al. BRAF mutation testing with a rapid, fully integrated molecular diagnostics system. *Oncotarget*. 2015 Sep;6(29):26886–94.
88. Pennell NA, Arcila ME, Gandara DR, West H. Biomarker Testing for Patients With Advanced Non–Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2019 May 1;(39):531–42.
89. Keller L, Belloum Y, Wikman H, Pantel K. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. *Br J Cancer*. 2021;124(2):345–58.
90. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948 Feb;142(3-4):241-3.
91. Tug S, Helmig S, Deichmann ER, Schmeier-Jürchott A, Wagner E, Zimmermann T, et al. Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exerc Immunol Rev*. 2015;21:164–73.
92. Lui YYN, Chik K-W, Chiu RWK, Ho C-Y, Lam CWK, Lo YMD. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. 2002 Mar;48(3):421–7.
93. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev*. 2018;93(3):1649–83.
94. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(3):347–76.
95. Van Der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Aug 1;1137(1):18–26.
96. 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;17(4):223–38.
97. Szepechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, Kupis W, Rudzinski P, Langfort R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer*. 2015;113(3):476–83.

98. Yoon K-A, Park S, Lee SH, Kim JH, Lee JS. Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. *J Mol Diagn*. 2009 May;11(3):182–5.
99. Zaher E, Anwar M, Kohail H, El-Zoghby S, Abo-El-Eneen M. Cell-free DNA concentration and integrity as a screening tool for cancer. *Indian J Cancer*. 2013 Jul 1;50(3):175–83.
100. Zhang R, Shao F, Wu X, Ying K. Value of quantitative analysis of circulating cell free DNA as a screening tool for lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. 2010 Aug;69(2):225–31.
101. van der Drift MA, Hol BEA, Klaassen CHW, Prinsen CFM, van Aarssen YAWG, Donders R, et al. Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010;68(2):283–7.
102. Weng J-L, Atyah M, Zhou C-H, Ren N. Progress in quantitative technique of circulating cell free DNA and its role in cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Genet*. 2019;239:75–84.
103. Zhou X, Li C, Zhang Z, Li DY, Du J, Ding P, et al. Kinetics of plasma cfDNA predicts clinical response in non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):7633.
104. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta*. 2015 Oct;450:243–53.
105. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*. 2019;17:100087.
106. Chiu RWK, Chan LYS, Lam NYL, Tsui NBY, Ng EKO, Rainer TH, et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem*. 2003 May;49(5):719–26.
107. Zhu J, Zhang F, Du M, Zhang P, Fu S, Wang L. Molecular characterization of cell-free eccDNAs in human plasma. *Sci Rep*. 2017;7(1):10968.
108. Lapin M, Oltedal S, Tjensvoll K, Buhl T, Smaaland R, Garresori H, et al. Fragment size and level of cell-free DNA provide prognostic information in patients with advanced pancreatic cancer. *J Transl Med*. 2018;16(1):1–10.
109. Arko-Boham B, Aryee NA, Blay RM, Owusu EDA, Tagoe EA, Doris Shackie E-S, et al. Circulating cell-free DNA integrity as a diagnostic and prognostic marker for breast and prostate cancers. *Cancer Genet*. 2019;235–236:65–71.
110. Soliman SES, Alhanafy AM, Habib MSE, Hagag M, Ibrahim RAL. Serum circulating cell free DNA as potential diagnostic and prognostic biomarker in non small cell lung cancer. *Biochem Biophys Reports*. 2018;15(May):45–51.

111. Aggarwal C, Rolfo CD, Oxnard GR, Gray JE, Sholl LM, Gandara DR. Strategies for the successful implementation of plasma-based NSCLC genotyping in clinical practice. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(1):56–62.
112. Filipaska M, Rosell R. Mutated circulating tumor DNA as a liquid biopsy in lung cancer detection and treatment. *Mol Oncol*. 2021 Jun;15(6):1667–82.
113. Papadopoulos N. Pathophysiology of ctDNA Release into the Circulation and Its Characteristics: What Is Important for Clinical Applications. *Recent Results Cancer Res*. 2020;215:163-180.
114. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(1):67–71.
115. Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris J, Ahlborn LB, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med*. 2018 Nov 7;10(466):eaat4921.
116. Choi J-J, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*. 2005 May;115(1):55–62.
117. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. 2017 Apr;545(7655):446–51.
118. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008 Sep;14(9):985–90.
119. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224).
120. Avanzini S, Kurtz DM, Chabon JJ, Moding EJ, Hori SS, Gambhir SS, et al. A mathematical model of ctDNA shedding predicts tumor detection size. *Sci Adv*. 2020 Dec 1;6(50):eabc4308.
121. Elazezy M, Joosse SA. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018 Oct 9;16:370–8.

122. El-Heliebi A, Heitzer E. Chapter 5 - State of the Art and Future Direction for the Analysis of Cell-Free Circulating DNA. In: Filice M, Ruiz-Cabello JBT-NAN, editors. *Micro and Nano Technologies*. Elsevier; 2019. p. 133–88.
123. 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*. 2003 Jul 22;100(15):8817-22.
124. Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods*. 2006;3(2):95–7.
125. Petrackova A, Vasinek M, Sedlarikova L, Dyskova T, Schneiderova P, Novosad T, et al. Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. *Front Oncol*. 2019 Sep 4;9:851.
126. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanché H, et al. Noninvasive Diagnosis of Actionable Mutations by Deep Sequencing of Circulating Free DNA in Lung Cancer from Never-Smokers: A Proof-of-Concept Study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res*. 2014 Sep 1;20(17):4613-24.
127. Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, Alden RS, O’Connell A, Mach SL, et al. Bias-Corrected Targeted Next-Generation Sequencing for Rapid, Multiplexed Detection of Actionable Alterations in Cell-Free DNA from Advanced Lung Cancer Patients. *Clin cancer Res*. 2016 Feb;22(4):915–22.
128. Kinde I, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. FAST-SeqS: A Simple and Efficient Method for the Detection of Aneuploidy by Massively Parallel Sequencing. *PLoS One*. 2012 Jul 18;7(7):e41162.
129. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med*. 2012 May;4(136):136ra68.
130. Gale D, Lawson ARJ, Howarth K, Madi M, Durham B, Smalley S, et al. Development of a highly sensitive liquid biopsy platform to detect clinically-relevant cancer mutations at low allele fractions in cell-free DNA. *PLoS One*. 2018 Mar 16;13(3):e0194630.
131. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Jun 7;108(23):9530-35.

132. Newman AM, Bratman S V, To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014;20(5):548–54.
133. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016 May;34(5):547–55.
134. Rolfo C, Mack P, Scagliotti G V, Aggarwal C, Arcila ME, Barlesi F, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Consensus Statement from The International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC). *J Thorac Oncol.* 2021 Oct;16(10):1647-1662.
135. Mayo-de-Las-Casas C, Jordana-Ariza N, Garzón-Ibañez M, Balada-Bel A, Bertrán-Alamillo J, Viteri-Ramírez S, et al. Large scale, prospective screening of EGFR mutations in the blood of advanced NSCLC patients to guide treatment decisions. *Ann Oncol.* 2017 Sep;28(9):2248–55.
136. Szepehinski A, Bryl M, Wojcik P, Czyzewicz G, Wojda E, Rudzinski P, et al. Detection of EGFR mutations in liquid biopsy samples using allele-specific quantitative PCR: A comparative real-world evaluation of two popular diagnostic systems. *Adv Med Sci.* 2021 Jul;66(2):336–42.
137. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(9):531–48.
138. cobas[®] EGFR Mutation Test v2 For in vitro diagnostic use. 2016;1–42. Available from https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf12/P120019S007c.pdf
139. Gray JE, Okamoto I, Sriuranpong V, Vansteenkiste J, Imamura F, Lee JS, et al. Tissue and Plasma EGFR Mutation Analysis in the FLAURA Trial: Osimertinib versus Comparator EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor as First-Line Treatment in Patients with EGFR-Mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin cancer Res.* 2019 Nov;25(22):6644–52.
140. Thress KS, Brant R, Carr TH, Dearden S, Jenkins S, Brown H, et al. 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(3):509–15.

141. Karlovich C, Goldman JW, Sun JM, Mann E, Sequist L V., Konopa K, et al. Assessment of EGFR mutation status in matched plasma and tumor tissue of NSCLC patients from a phase I study of rociletinib (CO-1686). *Clin Cancer Res.* 2016;22(10):2386–95.
142. Li Y, Xu H, Su S, Ye J, Chen J, Jin X, et al. Clinical validation of a highly sensitive assay to detect EGFR mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced lung adenocarcinoma. *PLoS One.* 2017;12(8):1–14.
143. Li BT, Janku F, Jung B, Hou C, Madwani K, Alden R, et al. Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium. *Ann Oncol.* 2019 Apr 1;30(4):597–603.
144. Romero A, Jantus-Lewintre E, García-Peláez B, Royuela A, Insa A, Cruz P, et al. Comprehensive cross-platform comparison of methods for non-invasive EGFR mutation testing: results of the RING observational trial. *Mol Oncol.* 2021 Jan;15(1):43–56.
145. So MK, Park JH, Kim JW, Jang JH. Analytical Validation of a Pan-Cancer Panel for Cell-Free Assay for the Detection of EGFR Mutations. *Diagnostics (Basel).* 2021 Jun 2;11(6):1022.
146. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, De Pas TM, Chiari R, Del Grammastro M, et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients. *J Thorac Oncol.* 2015;10(10):1437–43.
147. Ntzifa A, Kroupis C, Haliassos A, Lianidou E. A pilot plasma-ctDNA ring trial for the Cobas® EGFR Mutation Test in clinical diagnostic laboratories. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(5):e97–101.
148. Macías M, Alegre E, Alkorta-Aranburu G, Patiño-García A, Mateos B, Andueza MP, et al. The Dynamic Use of EGFR Mutation Analysis in Cell-Free DNA as a Follow-Up Biomarker during Different Treatment Lines in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Dis Markers.* 2019 Jan 23;2019:7954921.
149. Kim Y, Shin S, Lee KA. A Comparative Study for Detection of EGFR Mutations in Plasma Cell-Free DNA in Korean Clinical Diagnostic Laboratories. *Biomed Res Int.* 2018 May 8;2018:7392419.
150. Liam C-K, Mallawathantri S, Fong KM. Is tissue still the issue in detecting molecular alterations in lung cancer? *Respirology.* 2020 Sep 1;25(9):933–43.

151. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol*. 2014 Sep;9(9):1345–53.
152. Gutierrez ME, Choi K, Lanman RB, Licitra EJ, Skrzypczak SM, Pe Benito R, et al. Genomic Profiling of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in Community Settings: Gaps and Opportunities. *Clin Lung Cancer*. 2017 Nov 1;18(6):651–9.
153. Ilić M, Hofman P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Transl lung cancer Res*. 2016 Aug;5(4):420–3.
154. Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic — implementation issues and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(5):297–312.
155. Abbosh C, Birkbak NJ, Swanton C. Early stage NSCLC - challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Sep;15(9):577–86.
156. Rolfo C, Russo A. Liquid biopsy for early stage lung cancer moves ever closer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Sep;17(9):523–4.
157. Mirtavoos-Mahyari H, Ghafouri-Fard S, Khosravi A, Motevaseli E, Esfahani-Monfared Z, Seifi S, et al. Circulating free DNA concentration as a marker of disease recurrence and metastatic potential in lung cancer. *Clin Transl Med*. 2019 Apr 18;8(1):14.
158. Mack PC, Banks KC, Espenschied CR, Burich RA, Zill OA, Lee CE, et al. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases. *Cancer*. 2020 Jul 15;126(14):3219–28.
159. Guo N, Lou F, Ma Y, Li J, Yang B, Chen W, et al. Circulating tumor DNA detection in lung cancer patients before and after surgery. *Sci Rep*. 2016;6(1):33519.
160. Chen K, Zhang J, Guan T, Yang F, Lou F, Chen W, et al. Comparison of plasma to tissue DNA mutations in surgical patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* . 2017 Sep 1;154(3):1123-1131.e2.
161. Chaudhuri AA, Chabon JJ, Lovejoy AF, Newman AM, Stehr H, Azad TD, et al. Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer Discov*. 2017 Dec 1;7(12):1394-403.
162. Mok T, Wu Y-L, Lee JS, Yu C-J, Sriuranpong V, Sandoval-Tan J, 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 Jul 15;21(14):3196-203.

163. Provencio M, Torrente M, Calvo V, Pérez-Callejo D, Gutiérrez L, Franco F, et al. Prognostic value of quantitative ctDNA levels in non small cell lung cancer patients. *Oncotarget*. 2018 Jan;9(1):488–94.
164. Goldberg SB, Narayan A, Kole AJ, Decker RH, Teysir J, Carriero NJ, et al. Early Assessment of Lung Cancer Immunotherapy Response via Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res*. 2018 Apr 15;24(8):1872–80.
165. Zhou S, Huang R, Cao Y. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in peripheral blood circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis and systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Oct;99(40):e21965.
166. Hantson I, Dooms C, Verbeken E, Vandenberghe P, Vliegen L, Roskams T, et al. Performance of standard procedures in detection of EGFR mutations in daily practice in advanced NSCLC patients selected according to the ESMO guideline: a large Caucasian cohort study. *Transl Respir Med*. 2014;2(1):9.
167. Szumera-Ciećkiewicz A, Olszewski WT, Tysarowski A, Kowalski DM, Głogowski M, Krzakowski M, et al. EGFR mutation testing on cytological and histological samples in non-small cell lung cancer: A Polish, single institution study and systematic review of European incidence. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(12):2800–12.
168. Esteban E, Majem M, Martínez Aguillo M, Martínez Banaclocha N, Dómine M, Gómez Aldaravi L, et al. Prevalence of EGFR mutations in newly diagnosed locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer Spanish patients and its association with histological subtypes and clinical features: The Spanish REASON study. *Cancer Epidemiol*. 2015 Jun;39(3):291–7.
169. Carrot-Zhang J, Soca-Chafre G, Patterson N, Thorner AR, Nag A, Watson J, et al. Genetic Ancestry Contributes to Somatic Mutations in Lung Cancers from Admixed Latin American Populations. *Cancer Discov*. 2021 Mar 1;11(3):591-598.
170. Khier S, Lohan L. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. *Futur Sci OA*. 2018 Feb 23;4(4):FSO295.

171. Buder A, Setinek U, Hochmair MJ, Schwab S, Kirchbacher K, Keck A, et al. EGFR Mutations in Cell-free Plasma DNA from Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma: Improved Detection by Droplet Digital PCR. *Target Oncol.* 2019 Apr;14(2):197–203.
172. Pender A, Garcia-Murillas I, Rana S, Cutts RJ, Kelly G, Fenwick K, et al. Efficient Genotyping of KRAS Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Using a Multiplexed Droplet Digital PCR Approach. *PLoS One.* 2015 Sep 28;10(9):e0139074.
173. Roelofsen-de Beer R, Wielders J, Boursier G, Vodnik T, Vanstapel F, Huisman W, et al. Validation and verification of examination procedures in medical laboratories: opinion of the EFLM Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WG-A/ISO) on dealing with ISO 15189:2012 demands for method verification and validation. *Clin Chem Lab Med.* 2020 Feb;58(3):361–7.
174. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(12):1276–88.
175. Herbreteau G, Vallée A, Charpentier S, Normanno N, Hofman P, Denis MG. Circulating free tumor DNA in non-small cell lung cancer (NSCLC): clinical application and future perspectives. *J Thorac Dis.* 2019 Jan;11(Suppl 1):S113-S126.
176. Ulrich B, Pradines A, Mazières J, Guibert N. Detection of Tumor Recurrence via Circulating Tumor DNA Profiling in Patients with Localized Lung Cancer: Clinical Considerations and Challenges. Vol. 13, *Cancers.* 2021; 13(15):3759.
177. Ebert EBF, McCulloch T, Hansen KH, Linnet H, Sorensen B, Meldgaard P. Clearing of circulating tumour DNA predicts clinical response to first line tyrosine kinase inhibitors in advanced epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2020 Mar;141:37–43.
178. Del Re M, Bordi P, Rofi E, Restante G, Valleggi S, Minari R, et al. The amount of activating EGFR mutations in circulating cell-free DNA is a marker to monitor osimertinib response. *Br J Cancer.* 2018;119(10):1252–8.
179. Provencio M, Serna-Blasco R, Franco F, Calvo V, Royuela A, Auglyté M, et al. Analysis of circulating tumour DNA to identify patients with epidermal growth factor receptor-positive non-small cell lung cancer who might benefit from sequential tyrosine kinase inhibitor treatment. *Eur J Cancer.* 2021 May;149:61–72.

180. Thompson JC, Carpenter EL, Silva BA, Rosenstein J, Chien AL, Quinn K, et al. Serial Monitoring of Circulating Tumor DNA by Next-Generation Gene Sequencing as a Biomarker of Response and Survival in Patients With Advanced NSCLC Receiving Pembrolizumab-Based Therapy. *JCO Precis Oncol*. 2021 Mar 19;(5):510–24.
181. Taus Á, Camacho L, Rocha P, Hardy-Werbin M, Pijuan L, Piquer G, et al. Dynamics of EGFR Mutation Load in Plasma for Prediction of Treatment Response and Disease Progression in Patients With EGFR-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Clin Lung Cancer*. 2018 Sep;19(5):387-394.e2.
182. Ayala de la Peña F, Ortiz-Muñoz B, Quintanar-Verdúñez T, Santotoribio JD, de la Cruz S, Trapé-Pujol J, et al. Consensus of the Spanish society of laboratory medicine and the Spanish society of medical oncology on the methodology and criteria for evaluation of circulating tumour markers in breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2021 Jul;23(7):1272-1280.
183. Gaspar Blázquez MJ, Trapé Pujol J, Augé Fradera JM, Barco Sánchez A, Carbonell Muñoz R, Filella Pla X, et al. Recomendaciones para la optimización del uso de marcadores tumorales de utilización frecuente. Recomendación (2018). *Rev del Lab Clínico*. 2019;12(1):38–52.
184. Lang D, Horner A, Brehm E, Akbari K, Hergan B, Langer K, et al. Early serum tumor marker dynamics predict progression-free and overall survival in single PD-1/PD-L1 inhibitor treated advanced NSCLC-A retrospective cohort study. *Lung Cancer*. 2019 Aug;134:59–65.
185. Wei L, Wu W, Han L, Yu W, Du Y. A quantitative analysis of the potential biomarkers of non-small cell lung cancer by circulating cell-free DNA. *Oncol Lett*. 2018;16(4):4353–60.
186. 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.
187. Nygaard AD, Holdgaard PC, Spindler KLG, Pallisgaard N, Jakobsen A. The correlation between cell-free DNA and tumour burden was estimated by PET/CT in patients with advanced NSCLC. *Br J Cancer*. 2014;110(2):363–8.
188. Morbelli S, Alama A, Ferrarazzo G, Coco S, Genova C, Rijavec E, et al. Circulating tumor DNA reflects tumor metabolism rather than tumor burden in chemotherapy-naive

- patients with advanced non-small cell lung cancer:18F-FDG PET/CT study. *J Nucl Med.* 2017;58(11):1764–9.
189. Hyun MH, Sung JS, Kang EJ, Choi YJ, Park KH, Shin SW, et al. Quantification of circulating cell-free DNA to predict patient survival in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017 Oct 10;8(55):94417–30.
 190. Pécuchet N, Zonta E, Didelot A, Combe P, Thibault C, Gibault L, et al. Base-Position Error Rate Analysis of Next-Generation Sequencing Applied to Circulating Tumor DNA in Non-Small Cell Lung Cancer: A Prospective Study. *PLoS Med.* 2016 Dec;13(12):e1002199.
 191. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O’Connell A, Feeney N, et al. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2016 Aug 1;2(8):1014–22.
 192. Chen E, Cario CL, Leong L, Lopez K, Márquez CP, Chu C, et al. Cell-free DNA concentration and fragment size as a biomarker for prostate cancer. *Sci Rep.* 2021;11(1):5040.
 193. Mathios D, Johansen JS, Cristiano S, Medina JE, Phallen J, Larsen KR, et al. Detection and characterization of lung cancer using cell-free DNA fragmentomes. *Nat Commun.* 2021;12(1):5060.
 194. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res.* 2016;14(10):898–908.
 195. Wang R-A, Li Q-L, Li Z-S, Zheng P-J, Zhang H-Z, Huang X-F, et al. Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize. *J Cell Mol Med.* 2013 Jan;17(1):205–11.
 196. Dooms C, van Baardwijk A, Verbeken E, van Suylen RJ, Stroobants S, De Ruyscher D, et al. Association between 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake values and tumor vitality: prognostic value of positron emission tomography in early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009 Jul;4(7):822–8.
 197. Labi V, Erlacher M. How cell death shapes cancer. *Cell Death Dis.* 2015;6(3):e1675–e1675.
 198. Willems JJ, Arnold BP, Gregory CD. Sinister self-sacrifice: the contribution of apoptosis to malignancy. *Front Immunol.* 2014 Jul 4;5:299.

199. Alcaide M, Cheung M, Hillman J, Rassekh SR, Deyell RJ, Batist G, et al. Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. *Sci Rep.* 2020;10(1):12564.
200. Malbec R, Cacheux J, Cordelier P, Leichlé T, Joseph P, Bancaud A. Microfluidics for minute DNA sample analysis: open challenges for genetic testing of cell-free circulating DNA in blood plasma. *Micro Nano Eng.* 2018;1:25–32.

El doctorando José Manuel González de Aledo Castillo

MANIFIESTA

Que durante la elaboración de la memoria de la tesis doctoral "**Implementación del análisis del ADN libre circulante en plasma en el diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas**", presentada para aspirar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona, se han cumplido los códigos éticos y de buenas prácticas y que la tesis no contiene plagio. Asimismo, manifiesto que conozco y consiento que mi tesis sea sometida a un procedimiento para comprobar su originalidad.


Barcelona, 21 de Septiembre de 2021



Fdo. José Manuel González de Aledo Castillo

Los Dres. Joan Anton Puig Butillé y Wladimiro Jiménez Povedano ratifican que durante el proceso de realización de esta tesis doctoral se ha cumplido con los códigos éticos y de buenas prácticas y no tienen conocimiento de que se haya producido plagio alguno en la elaboración de la misma o en los artículos que la componen.

Barcelona, 21 de Septiembre de 2021



Fdo. Joan Anton Puig-Butillé



Fdo. Wladimiro Jiménez Povedano