



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE MUTACIONES DE *EGFR*
Y *KRAS* EN ADN CIRCULANTE EN
PACIENTES AFECTOS DE CÁNCER
DE PULMÓN DE CÉLULA NO PEQUEÑA**

Tesis presentada por:

Álvaro Taus García

Dirigida por:

Edurne Arriola Aperribay

Joan Albanell Mestres

Tutor académico:

David Benaiges Boix

Programa de doctorado en Medicina, departamento de Medicina de la Universitat
Autònoma de Barcelona

Año 2020

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE MUTACIONES DE *EGFR*
Y *KRAS* EN ADN CIRCULANTE EN
PACIENTES AFECTOS DE CÁNCER
DE PULMÓN DE CÉLULA NO PEQUEÑA**

Tesis presentada por:

Álvaro Taus García

Dirigida por:

Edurne Arriola Aperribay

Joan Albanell Mestres

Tutor académico:

David Benaiges Boix

Programa de doctorado en Medicina, departamento de Medicina de la Universitat
Autònoma de Barcelona

Año 2020

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar esta tesis a:

Eduarne Arriola, el espejo en el que me he mirado. Sin ti no sería el oncólogo que soy hoy.

Joan Albanell. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar en el mejor servicio de oncología que puedo imaginar.

Beatriz Bellosillo, que se ha comprometido con el proyecto como una directora más, y a Laura Camacho del Departamento de Biología Molecular. Sin vosotras este trabajo no hubiera sido posible.

A mis padres y mi hermana. Gracias por apoyarme siempre.

A Eva, Eric y Mia. Las *driver mutations* de mi vida. Hacéis que todo tenga sentido.

LISTADO DE ABREVIACIONES

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNtc:	ADN tumoral circulante
ARN:	ácido ribonucleico
ATP:	adenosín trifosfato
BEAMing:	beads, emulsion, amplification and magnetics
CPCNP:	cáncer de pulmón de célula no pequeña
CPCP:	cáncer de pulmón de célula pequeña
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
EGFR:	receptor del factor de crecimiento epidérmico
HR:	cociente de riesgo
KRAS:	sarcoma de la rata Kirsten
NGS:	Secuenciación de nueva generación
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
dPCR:	PCR digital
rtPCR:	PCR con retrotranscripción
TC:	tomografía computarizada
TK:	tirosina quinasa
TKI:	inhibidor tirosina quinasa

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES	33
4.1. <i>Dynamics of EGFR mutational load in plasma for prediction of treatment response and progression in patients with EGFR-mutant lung adenocarcinoma</i>	
Á. Taus, L. Camacho, P. Rocha, M. Hardy-Werbin, L. Pijuan, G. Piquer, E. López, A. Dalmases, R. Longarón, S. Clavé, M. Salido, J. Albanell, B. Bellosillo, E. Arriola. Clin Lung Cancer. 2018 Sep;19(5):387-394.e2	34
4.2. <i>Plasmatic KRAS kinetics for the prediction of treatment response and progression in patients with KRAS-mutant lung adenocarcinoma</i>	
Á. Taus, L. Camacho, P. Rocha, A. Hernández, R. Longarón, S. Clavé, L. Fernández-Ibarrondo, M. Salido, M. Hardy-Werbin, C. Fernández-Rodríguez, J. Albanell, B. Bellosillo, E. Arriola. Arch Bronconeumol. 2020 Apr 3:S0300-2896(20)30055-7	43
5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS	51
6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN	52
7. CONCLUSIONES	58
8. LÍNEAS DE FUTURO	59
9. BIBLIOGRAFÍA	60
10. ANEXO 1. Financiación	84

RESUMEN

El análisis molecular del tumor se ha convertido en un procedimiento fundamental para definir el manejo de los pacientes con cáncer de pulmón. Aunque el análisis del tejido tumoral se considera la técnica de elección para el estudio molecular, esta aproximación tiene una serie de limitaciones, como la ausencia de material tumoral suficiente o la imposibilidad para capturar la heterogeneidad tumoral. El uso de la biopsia líquida podría ayudar a superar estas limitaciones.

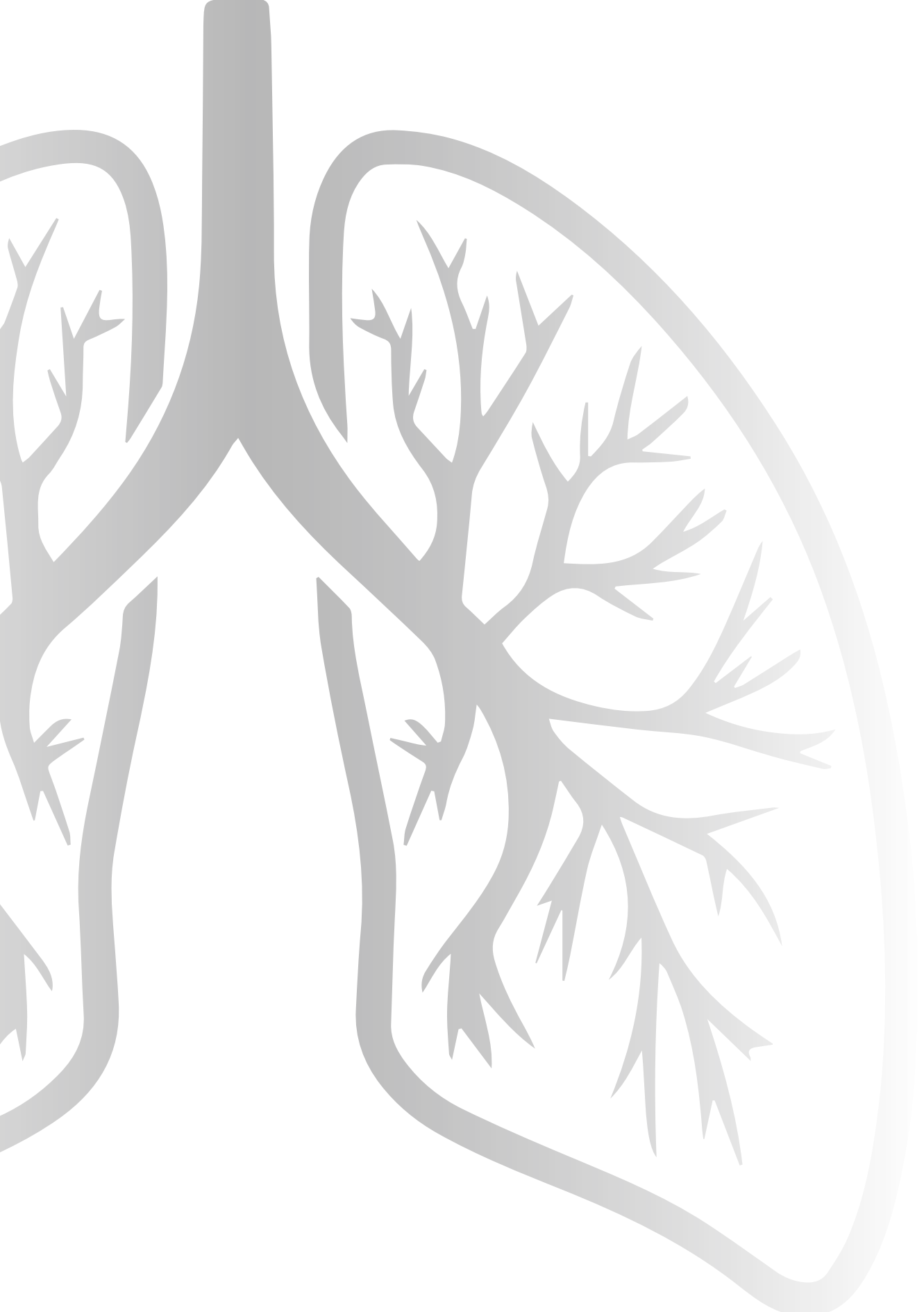
En este trabajo analizamos la capacidad de la biopsia líquida de detectar mutaciones de *EGFR* o *KRAS* en plasma. Utilizando la biopsia líquida hemos detectado mutaciones de *EGFR* en un 83% de los casos (100% en casos con diseminación extratorácica) y en un 82% de los casos *KRAS* mutados (96% en casos con más de una localización metastática). Además, nuestro trabajo demuestra la capacidad del análisis de la dinámica de la carga mutacional circulante de prever la respuesta o progresión con antelación. En los casos *EGFR* mutados, la dinámica de la carga mutacional permitió predecir la respuesta en un 83% de los casos y la progresión en un 89% con una antelación mediana de 38 y 80 días respectivamente. En los casos con mutaciones de *KRAS*, la tasa de predicción de la respuesta y progresión radiológicas fue del 93% y 63% respectivamente con una antelación mediana de 33 y 50 días. Por otro lado, tanto en los casos *EGFR* como en los *KRAS* mutados, la supervivencia libre de progresión fue significativamente superior en los casos en los que, tras el inicio de tratamiento, las mutaciones dejaron de ser detectables en ADN tumoral circulante.

En resumen, nuestro trabajo demuestra, en un entorno de práctica clínica habitual, la utilidad de la biopsia líquida para el manejo de pacientes con cáncer de pulmón.

Molecular profiling of the tumor has become a crucial procedure in the management of patients with lung cancer. Although the analysis of the tumor tissue is considered the gold standard for the molecular profiling, this approach has some limitations, such as the absence of the required amount of tissue or the inability to capture the tumor heterogeneity. The use of liquid biopsy may help to overcome these limitations.

In this work we analyze the ability of the liquid biopsy to detect EGFR or KRAS mutations in plasma. Using liquid biopsy, we detected EGFR mutations in 83% of cases (100% in cases with extrathoracic metastases) and in 82% of mutated KRAS cases (96% in cases with more than one metastatic location). Furthermore, our work demonstrates the ability of the analysis of the circulating mutational load dynamics to predict the response or progression well in advance. In the EGFR mutated cases, the dynamics of the mutational load allowed predicting the response in 83% of the cases and the progression in 89% with a median advance of 38 and 80 days respectively. In the cases with KRAS mutations, the radiological response and progression prediction rate was 93% and 63%, respectively, with a median lead time of 33 and 50 days. On the other hand, in both EGFR and KRAS mutated cases, progression-free survival was significantly higher in cases in which, after starting treatment, the mutations became undetectable in circulating tumor DNA.

In summary, our work demonstrates, in a routine clinical practice setting, the utility of liquid biopsy for the management of patients with lung cancer.



1. INTRODUCCIÓN

A pesar de los avances realizados en los últimos años en prevención, detección y tratamiento, el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Se estima que en 2018 hubo 18.1 millones de nuevos casos (17 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma) y 9.6 millones de muertes por cáncer (9.5 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma)¹. Globalmente, el cáncer de pulmón es, junto al cáncer de mama el tumor más frecuentemente diagnosticado (11.6% del total de casos) y la principal causa de muerte por cáncer (18.4% del total de muertes por cáncer). Por sexos, en hombres, el cáncer de pulmón es el tumor más frecuente (14.5%) y la principal causa de muerte por cáncer (22%), mientras que en mujeres es el tercero en incidencia (8.4%) tras el cáncer de mama (24.2%) y colorrectal (9.5%) y la segunda causa de muerte por cáncer (13.8%) por detrás del cáncer de mama (15%)¹.

El cáncer de pulmón constituye un grupo heterogéneo de enfermedades. Clásicamente, se ha dividido en dos grandes grupos: El cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) y cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP). Este último representa más del 85% de los cánceres de pulmón. Actualmente el CPCNP se define en función de características histopatológicas en 2 subgrupos: el CPCNP escamoso, que representa aproximadamente el 40% de los CPCNP, y el no escamoso, que incluye el adenocarcinoma ($\approx 50\%$), el carcinoma de célula grande ($\approx 10\%$) y otras histologías poco frecuentes^{2,3}.

De manera global, y a pesar de los avances realizados en el conocimiento de la enfermedad y la aprobación de nuevos tratamientos, la probabilidad de supervivencia a los 5 años de los pacientes diagnosticados de un CPCNP se sitúa alrededor del 18%. Esta baja tasa de curación se debe principalmente a que aproximadamente el 60% de los casos debutan con afectación metastásica, en cuyo caso la probabilidad de supervivencia a los 5 años ha sido hasta la actualidad inferior al 5%⁴.

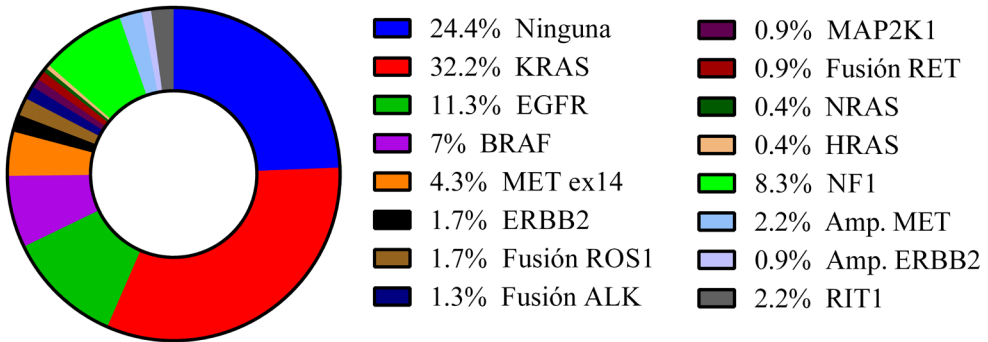
Una de las mayores revoluciones en el tratamiento del cáncer en general y del CPCNP en particular, ha sido la identificación de alteraciones genéticas que son responsables de la proliferación, supervivencia y diferenciación celular de los tumores. El tratamiento dirigido frente a algunas de estas alteraciones genéticas, ha significado un importante avance en el tratamiento de algunos pacientes con cáncer⁵.

Aunque al CPCNP inicialmente solo se clasificaba en función de la histología– escamosa o no escamosa– hoy en día se considera un diverso y complejo grupo de enfermedades con diferentes alteraciones genéticas. Desde la identificación inicial de las mutaciones sensibilizadoras de *EGFR*, cuya presencia se asocia a una respuesta al tratamiento con inhibidores tirosina-quinasa de *EGFR* (EGFR TKIs)^{6,7}, la investigación se ha focalizado en la identificación de otras mutaciones *driver*, consiguiendo en algunos casos desarrollar tratamientos dirigidos eficaces que se utilizan en la práctica clínica diaria^{3,8}.

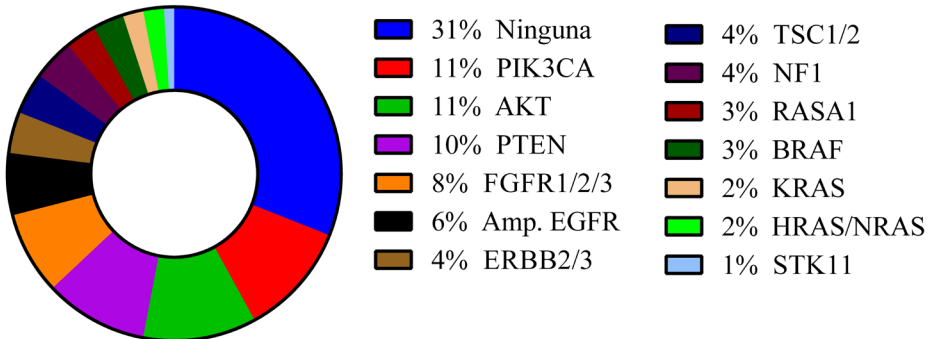
Las publicaciones del grupo de *The Cancer Genome Atlas Research Network* de los datos correspondientes a la caracterización molecular tanto del carcinoma escamoso⁹ como del adenocarcinoma¹⁰ de pulmón, han permitido identificar múltiples alteraciones genéticas (**FIGURA 1**). Mientras que para algunas de estas alteraciones ya existen tratamientos dirigidos disponibles, en otros casos estos tratamientos se encuentran todavía en fase de investigación.

FIGURA 1. Alteraciones genéticas en adenocarcinoma (A) y carcinoma escamoso (B) de pulmón.

A. Adenocarcinoma



B. Carcinoma escamoso



1.1 EGFR

El descubrimiento de las mutaciones de *EGFR* inició en 2004 una revolución en la manera de tratar las neoplasias de pulmón^{6,7}. El gen *EGFR* se localiza en el cromosoma 7p12-7p13¹¹. Perteneció a la familia de receptores tirosina-quinasa (TK) conocida como HER o ErbB, compuesta por 4 miembros: EGFR (HER-1/ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). La actividad TK intracelular de EGFR se incrementa como consecuencia de la unión al receptor de varios ligandos específicos (*epidermal growth factor* (EGF),

transforming growth factor-alpha (TGFA), *heparin-binding EGF-like growth factor* (HBE-GF), *betacellulin* (BTC), *amphiregulin* (AREG), *epiregulin* (EREG), y *epigen* (EPGN)) produciendo la homodimerización de dos EGFRs o la heterodimerización de EGFR con otro miembro de la familia HER. La activación del dominio TK produce la autofosforilación del dominio intracelular de EGFR, lo que finalmente conduce a la activación de varias vías de señalización, entre las que se incluyen la de RAS-RAF-MEK-ERK (vía de las MAP quinasas) y la de PI3KCA-AKT-mTOR¹². En las células tumorales, la mutación de *EGFR* puede producir la activación constitutiva –independiente de ligando– de la vía de señalización, lo que induce procesos que promueven la proliferación celular, la supervivencia, la angiogénesis, la invasión y la formación de metástasis^{13,14}. Las mutaciones somáticas activadoras de *EGFR* implican al bolsillo de unión adenosina trifosfato (ATP) en el dominio TK del receptor, produciendo una activación ligando-independiente de la vía de señalización intracelular.

Globalmente, la frecuencia de mutaciones somáticas activadoras en el gen de *EGFR* en CPCNP es de 15-20% dependiendo de la población estudiada, siendo más frecuente en mujeres, no fumadores, histología de adenocarcinoma y raza asiática^{13,15}. En nuestro medio, la mutación de *EGFR* está presente en aproximadamente un 15% de los CPCNP¹⁶. Aunque se han descrito más de 188 mutaciones diferentes en el gen *EGFR*¹⁷, el 85% de los casos con sensibilidad a los EGFR TKIs son portadores de uno de los dos tipos de mutaciones principales conocidas como “mutaciones comunes”: deleciones en el exón 19 (45-50%) o la mutación puntual *EGFR*^{L858R} en el exón 21 (40-45%)¹⁴, que implica la sustitución de aminoácidos –una leucina por una arginina– en la posición 858 del gen. Estas “mutaciones comunes” confieren sensibilidad al tratamiento con EGFR TKIs, con un 60-80% de respuestas radiológicas, lo que se traduce en una mediana de supervivencia de 20-30 meses¹⁸⁻²³. El 10% restante de las mutaciones de *EGFR*, las conocidas como “mutaciones poco comunes”, son un grupo heterogéneo de mutaciones que se encuentran en los exones 18-21 y que muestran respuestas variables a los EGFR TKIs²⁴⁻²⁶. En los casos en los que no se detecta mutación la respuesta a EGFR TKIs es inferior al 10%^{27,28}. En base a estos resultados, los EGFR TKIs se han convertido en el tratamiento

de elección del CPCNP con mutaciones activadoras de *EGFR*^{3,8}. Actualmente están comercializados en nuestro país EGFR TKIs de primera (gefitinib y erlotinib), segunda (afatinib, dacomitinib) y tercera generación (osimertinib).

1.1.1 Resistencia adquirida a los EGFR TKIs

La adquisición de resistencia ocurre virtualmente en todos los CPCNP que inicialmente han respondido a los EGFR TKIs tras 10-19 meses de tratamiento¹⁸⁻²². La resistencia adquirida a los EGFR TKIs es un fenómeno complejo con múltiples mecanismos a través de los que las células tumorales resisten al efecto de la terapia anti *EGFR*, resultando en el mantenimiento de la propagación de la señal oncogénica a través de las vías de señalización intracelulares. Los más frecuentes son los que implican una modificación de la diana oncogénica, particularmente la mutación secundaria *EGFR*^{T790M} –sustitución de una treonina por una metionina en la posición 790– en el exón 20 de *EGFR*, cuya presencia se ha descrito en hasta un 50% de los casos en el momento de la progresión al tratamiento con EGFR TKIs de primera o segunda generación²⁹⁻³¹. La mutación *EGFR*^{T790M} confiere resistencia mediante la modificación de la conformación espacial del lugar de unión del fármaco, impidiendo así su actividad³². La teoría más aceptada sobre el mecanismo de adquisición de esta mutación de resistencia, plantea que la mutación *EGFR*^{T790M} coexistiría al diagnóstico con las mutaciones de sensibilidad comunes con una baja carga alélica que la haría indetectable para las técnicas diagnósticas menos sensibles y, como consecuencia de la presión selectiva del tratamiento con EGFR TKIs, estas subclonas crecerían hasta predominar sobre las mutaciones de sensibilidad en el momento de la progresión tumoral. En el momento de la progresión a EGFR TKIs de primera o segunda generación, es imprescindible determinar la presencia de la mutación de resistencia *EGFR*^{T790M}, ya que su detección permite el uso de osimertinib, que ha demostrado ser más eficaz que la quimioterapia en esta situación, como tratamiento de segunda línea³³. La coexistencia de la mutación *EGFR*^{T790M} con las mutaciones de sensibilidad comunes en tumores que no han recibido tratamiento se ha descrito con más frecuencia a medida que han ido mejorando las técnicas de diagnóstico molecular,

pasando de una tasa de detección del 0,4-8% mediante secuenciación directa³⁴⁻³⁷, a una del 66-80% mediante PCR digital (dPCR)^{38,39}. El impacto clínico de la presencia concomitante al diagnóstico de una pequeña proporción de clonas *EGFR*^{T790M} junto con la mutación de sensibilidad es controvertido, ya que se han publicado datos que le confieren tanto un valor predictivo negativo^{40,41} como positivo^{38,42-44} de respuesta a EGFR TKIs.

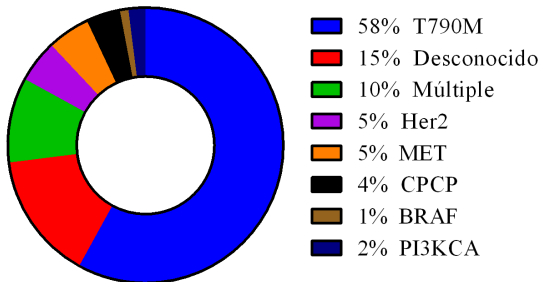
Otros mecanismos de resistencia, los llamados independientes de *EGFR*, en los que se activan vías de señalización paralelas para hacer un *bypass* a la vía inhibida de *EGFR*, incluyen mutaciones en los genes de *KRAS*, *PI3KCA* o *HER2*⁴⁵⁻⁴⁷; así como la desregulación de la vía de señalización de *MET*⁴⁸⁻⁵⁰.

Aunque a día de hoy el mecanismo más frecuente de resistencia a EGFR TKIs es el mediado por la mutación *EGFR*^{T790M}, la aprobación del EGFR TKIs de tercera generación osimertinib como tratamiento inicial de los tumores *EGFR* mutados²², hará que el uso de inhibidores de primera y segunda generación disminuya considerablemente por lo que es previsible que también lo haga la importancia de *EGFR*^{T790M} como mecanismo de resistencia. Los mecanismos de resistencia a osimertinib más frecuentes descritos hasta la fecha son la desregulación de la vía de *MET* y la aparición de la mutación *EGFR*^{C797S}—sustitución de una cisteína por una serina en la posición 797— en el exón 20⁵¹.

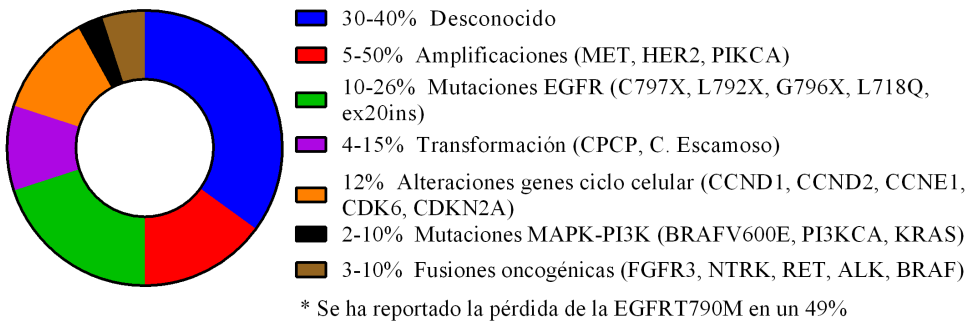
Por último, se ha descrito también como mecanismo de resistencia a los EGFR TKIs la transformación histológica en carcinoma microcítico de pulmón⁵²⁻⁵⁵. La frecuencia de los diferentes mecanismos de resistencia a EGFR TKIs de primera/segunda y tercera generación están reflejados en la **FIGURA 2**. La respuesta a si las alteraciones moleculares que confieren resistencia a los EGFR TKIs aparecen *de novo* o bien son consecuencia de la selección de clonas resistentes preexistentes en un tumor heterogéneo, que se convierten en mayoritarias como consecuencia de la destrucción de clonas sensibles al tratamiento inicial, todavía no ha podido ser contestada con certeza.

FIGURA 2. Mecanismos de resistencia a EGFR TKIs de 1ª y 2ª generación (A) y de 3ª generación (osimertinib) administrado en 1ª (B) y 2ª línea (C).

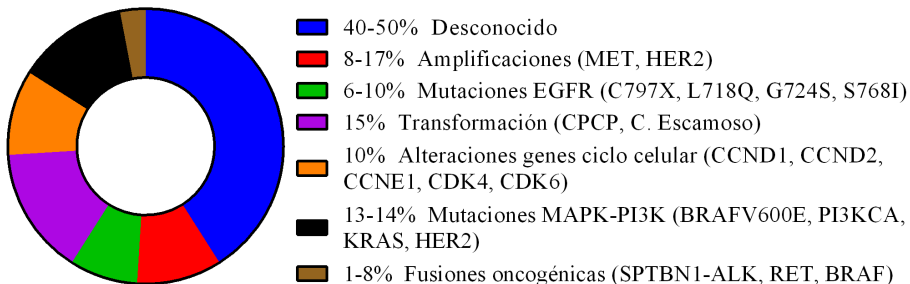
A. Mecanismos de resistencia a EGFR TKIs de 1ª y 2ª generación



B. Mecanismos de resistencia a EGFR TKIs de 3ª generación (osimertinib) administrados en 2ª línea



C. Mecanismos de resistencia a EGFR TKIs de 3ª generación (osimertinib) administrados en 2ª línea



Adaptado de Del Re *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3951 y Leonetti *Br J Cancer.* 2019 Oct; 121(9):725-737.

1.2 *KRAS*

La familia *RAS*, formada por los genes *KRAS*, *HRAS* y *NRAS*, es la que aparece mutada con más frecuencia en los cánceres humanos. Estos genes codifican pequeñas enzimas que hidrolizan guanosina trifosfato, activando así varias vías de señalización como RAF-MEK-ERK, PI3KCA-AKT-mTOR y RALGDS-RA. Como consecuencia, los genes *RAS* tienen un rol crucial en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares⁵⁶. Las mutaciones en *RAS* suelen consistir en sustituciones de una única base que producen una estabilización de la unión a la guanosina trifosfato y, como consecuencia, una activación constitutiva de la vía de señalización intracelular⁵⁷. Las diferentes isoformas mutadas de *RAS* varían en función del tipo de tumor, siendo *KRAS* las más frecuente en el cáncer pulmonar, colo-rectal y pancreático; *NRAS* en melanoma y *HRAS* en el cáncer de vejiga⁵⁶.

La mutación en el gen de *KRAS*, la más frecuente de las mutaciones conductoras en CPCNP, está presente en alrededor del 30% de los casos, principalmente en los adenocarcinomas. Su presencia es más frecuente en población occidental (26%) que en asiática (11%), y en fumadores (30%) que en no fumadores (10%). En la gran mayoría de los casos (90%), las mutaciones de *KRAS* afectan al codón 12 localizado en el exón 2, en el resto de los casos afectan al codón 13 – también en el exón 2- y ocasionalmente al codón 61 localizado en el exón 3^{58,59}.

Históricamente se ha considerado que la presencia de mutaciones de *KRAS* confería mal pronóstico debido al papel crítico de la proteína RAS en la proliferación celular. Tras la publicación inicial de datos que asociaban la presencia de mutaciones de *KRAS* en CPCNP en estadios iniciales con recidiva precoz y peor supervivencia⁶⁰, la publicación posterior de datos de ensayos clínicos aleatorizados con brazos control en los que no se administraba tratamiento han puesto en duda esta asociación, sugiriendo que la presencia de mutaciones de *KRAS* no tenía un valor pronóstico en CPCNP en estadio inicial intervenido quirúrgicamente⁶¹, ni predictivo de respuesta a la primera línea de quimioterapia en tumores

metastásicos⁶². Estos datos contradictorios podrían explicarse por la heterogeneidad dentro del grupo de CPCNP con mutaciones de *KRAS*, donde se ha reportado diferente respuesta a la quimioterapia dependiendo del codón en el que se encuentra la mutación⁶³, así como por el posible impacto de la presencia de otras mutaciones concomitantes a *KRAS* como *TP53*, *STK11* o *KEAP1*⁶⁴⁻⁶⁶. La presencia de mutaciones de *KRAS* se ha asociado también a la falta de respuesta al tratamiento con EGFR TKIs⁶⁷, aunque es probable que esta falta de respuesta se deba, no tanto a la presencia de mutaciones de *KRAS*, como a la ausencia de mutaciones de *EGFR*.

A pesar de los múltiples esfuerzos, a día de hoy no existe ningún tratamiento dirigido aprobado frente a *KRAS*^{68,69}. Se han comunicado recientemente datos de dos estudios fase 1 con resultados muy prometedores de los inhibidor de *KRAS* sotorasib (AMG 510)⁷⁰ y adagrasib (MRTX849)⁷¹ en tumores portadores de la mutación *KRAS*^{G12C}—sustitución de una glicina por una cisteína en el codón 12—, la más frecuente de las mutaciones de *KRAS*, presente en aproximadamente un 13% de los CPCNP. Estos resultados han de confirmarse en ensayos clínicos en marcha.

1.3 Heterogeneidad intratumoral y dinámica clonal adaptativa

La heterogeneidad intratumoral es un factor clave para explicar la alta letalidad del cáncer, ya que proporciona al tumor diverso material genético y epigenético sobre el que la selección y evolución Darwiniana pueden actuar^{72,73}. El concepto de diversidad genómica dentro de un mismo tumor así como su potencial importancia fue descrito en 1959 por Julian Huxley⁷⁴. Sin embargo, no ha sido hasta la publicación de estudios que utilizan tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) cuando se ha empezado a conocer la verdadera extensión de la heterogeneidad intratumoral, haciendo evidente que una biopsia de una única localización tumoral pueda no ser representativa de la variación genética del tumor

completo. Como en otros tumores⁷⁵⁻⁷⁹, en CPCNP la heterogeneidad genética está bien descrita, tanto dentro de un mismo tumor⁸⁰⁻⁸², como entre el tumor primario y las metástasis⁸³. Los tratamientos anti-cáncer suponen una presión selectiva que modifica la evolución tumoral, seleccionando clonas preexistentes resistentes que siguen creciendo a pesar del tratamiento y son las responsables de la progresión tumoral⁸⁴⁻⁸⁸. Debido a que la mutación de *EGFR* es la más frecuente de las alteraciones genéticas tratables de manera dirigida en CPCNP, es en este subgrupo donde más se ha estudiado la selección clonal como consecuencia de los tratamientos, especialmente en el momento de la progresión a EGFR TKIs⁸⁹.

El uso de técnicas de secuenciación de alta sensibilidad ha permitido demostrar que en algunos casos las alteraciones moleculares que confieren resistencia al tratamiento, como la mutación *EGFR*^{T790M} o la amplificación de *MET*, detectadas en la muestra tumoral en el momento de la progresión ya estaban presentes en muy baja frecuencia en la muestra tumoral pre-tratamiento^{30,37,48}. Considerando la heterogeneidad tumoral, es fácil imaginar que algunas subclonas tumorales con mutaciones menos prevalentes no sean identificadas en la biopsia realizada en una sola región tumoral, por lo que no podemos descartar que la coexistencia en un mismo tumor de clonas sensibles y de resistencia a los EGFR TKIs sea más frecuente de lo esperado⁷⁵.

1.4 Biopsia líquida

El análisis molecular del tumor ha sido la piedra angular en la comprensión de, no solo los mecanismos de acción de los tratamientos dirigidos en oncología, sino también de los mecanismos de resistencia adquirida a dichos tratamientos. Dado su importante valor predictivo, es necesario realizar en la rutina diagnóstica del CPCNP metastásico un estudio molecular para determinar la presencia de alteraciones que permitan elegir el tratamiento más adecuado para cada paciente^{3,8}.

Aunque el análisis del tejido tumoral se considera la técnica de elección para el estudio molecular, en los últimos años se han desarrollado formas de evaluar las alteraciones moleculares de los tumores en fuentes alternativas. La biopsia líquida puede medir dichas alteraciones, además de en ADNtc, en células tumorales circulantes, exosomas así como ARN plaquetario o circulante. El concepto biopsia líquida engloba técnicas moleculares que se realizan no solo en la sangre, sino también en otros fluidos corporales como la orina, el líquido pleural, la saliva o el líquido cefalorraquídeo⁹⁰⁻⁹³.

El desarrollo de la biopsia líquida tiene particular importancia en el CPCNP debido a que la utilización de la biopsia para la obtención de tejido tumoral tiene algunas limitaciones: por un lado, no siempre es posible la obtención de material tumoral suficiente para el análisis molecular, sobre todo en los casos en los que el acceso a las lesiones tumorales es complicado. En CPCNP se ha reportado que solo en un 20-50% de las biopsias se obtiene material suficiente para el análisis molecular⁹⁴⁻¹⁰⁰; por otro lado, la biopsia es un procedimiento invasivo y no está exenta de complicaciones, se ha reportado hasta un 17% de complicaciones secundarias a biopsias en tórax y un 1.6% en abdomen y pelvis¹⁰¹. Este punto es especialmente relevante si el objetivo es la monitorización o la búsqueda de mecanismos de resistencia al tratamiento, pues las biopsias repetidas no siempre son posibles, seguras o aceptadas por el paciente¹⁰². Por otro lado, probablemente la mayor limitación de las biopsias tumorales es la heterogeneidad tumoral que presenta el CPCNP^{80-83,103}. Como se ha comentado en el apartado anterior, el cáncer es heterogéneo, con distintas áreas dentro de cada lesión o en diferentes metástasis mostrando diferentes perfiles genéticos. Por tanto, una biopsia de una parte de una de las lesiones tumorales pasará por alto tanto la heterogeneidad intratumoral como la intermetastática.

En este sentido, la biopsia líquida ofrece diversas ventajas. Por un lado, es un método mucho menos invasivo que la biopsia tumoral que permite la obtención de muestras

seriadas de manera segura y poco molesta para los pacientes. Asimismo, aunque no todas las localizaciones metastásicas lo hagan en la misma medida¹⁰⁴, los fragmentos de ADN tumoral circulante (ADNtc) son vertidos al torrente sanguíneo desde todas las localizaciones tumorales del cuerpo, por lo que la biopsia líquida capturaría mejor que la biopsia del tejido la heterogeneidad tumoral¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Otras ventajas de la biopsia líquida sobre la biopsia tumoral son un mejor tiempo de respuesta y una mejor relación coste-efectividad, sobre todo durante el seguimiento del tratamiento o a la progresión a un tratamiento dirigido¹⁰⁸.

A pesar de las ventajas descritas anteriormente, la biopsia líquida tiene una serie de limitaciones: al contrario que la biopsia tumoral, no puede dar información histológica. Además, su sensibilidad se basa en que las células tumorales viertan ADNtc al torrente sanguíneo, así que es posible obtener resultados falsos negativos en casos en los que haya poco volumen tumoral¹⁰⁹ o cuándo no existen metástasis fuera del tórax¹⁰⁴. Por otro lado, un factor que puede dar resultados falsos positivos es el conocido como fenómeno de la hematopoyesis clonal, en el que se encuentran mutaciones somáticas en células hematopoyéticas no malignas, de particular importancia en el contexto de esta tesis, la mutación de *KRAS*¹¹⁰. Por último, también hay que tener en cuenta las condiciones preanalíticas que pueden interferir en los resultados, la más importante tiene que ver con el tiempo entre la extracción sanguínea y la extracción del plasma que, en caso de utilizar tubos con EDTA, ha de realizarse en menos de 2 horas para evitar la contaminación resultante de la lisis, y el consiguiente vertido de ADN, de las células nucleadas presentes en la misma muestra. En caso de utilizar tubos preservantes como los tubos *Streck Cell-Free DNA BTC®* (La Vista, Nevada), la extracción de plasma puede realizarse en los primeros 3-14 días¹⁰⁸. Hay que tener en cuenta también la posibilidad de detectar de manera incidental mutaciones germinales en plasma, lo que requerirá una valoración multidisciplinar y posiblemente valoración por una unidad de consejo genético^{111,112}. La **TABLA 1** resume las fortalezas y retos de la aplicación clínica de la biopsia líquida basada en el análisis de ADNtc.

TABLA 1. Aplicación clínica de la biopsia líquida basada en ADNtc: Fortalezas y retos.

	FORTALEZAS	RETOS
CLÍNICA	Refleja la heterogeneidad intratumoral e intermetastásica	No proporciona diagnóstico histológico
	Permite una evaluación temprana de la respuesta tumoral	Menor sensibilidad en casos con poca carga tumoral o enfermedad limitada al tórax
	Detecta enfermedad mínima residual y recaída precoz	Interpretación de hallazgos incidentales de mutaciones germinales
	Detecta la evolución de la resistencia en tiempo real	
TÉCNICA	Procedimiento mínimamente invasivo, prácticamente sin complicaciones	Homogenización de las diferentes técnicas analíticas y preanalíticas
	Acceso a la muestra en casos en los que la biopsia tumoral es complicada	Sensibilidad en enfermedad localizada
	Rápido tiempo de respuesta	Hematopoyesis clonal
	Buena relación coste/efectividad	

Dado que es la modalidad en la que existe más evidencia, y es la utilizada en los trabajos que dan cuerpo a esta tesis, de ahora en adelante nos focalizaremos en la biopsia líquida basada en la detección de ADNtc en plasma sanguíneo. Además de en el CPCNP, el papel del ADNtc se está estudiando en otros tipos de tumores, entre los que destacan el cáncer de mama, colo-rectal, melanoma, próstata, gástrico y ovárico¹¹³⁻¹¹⁸.

En 1948 se describió por primera vez la presencia de fragmentos de ADN circulando por el torrente sanguíneo¹¹⁹, desde entonces su utilidad clínica ha sido estudiada, además de en oncología, en otros escenarios como la medicina fetal¹²⁰⁻¹²², la insuficiencia renal crónica¹²³, el infarto agudo de miocardio¹²⁴, el daño cerebral tras un traumatismo¹²⁵ o en el ictus¹²⁶. En oncología, el interés radica en la obtención y análisis del ADN circulante procedente del tumor, que llega a la circulación probablemente a través de la necrosis celular o la apoptosis.

A medida que el tumor crece, también lo hace el recambio celular y, por lo tanto, el número de células necróticas y apoptóticas cuyos restos son liberados al torrente circulatorio y por tanto son potencialmente detectables en la sangre de los pacientes¹⁰⁷.

A diferencia de otros campos de investigación en los que se analiza el ADN circulante normal, el estudio del ADNtc ha tenido que superar dificultades como la necesidad de discriminar el ADNtc del ADN circulante normal y el hecho de que habitualmente los niveles de ADNtc son extremadamente bajos, representando normalmente menos de un 1% del ADN circulante total¹²⁷⁻¹²⁹. Diferenciar el ADNtc del ADN circulante normal es posible en base al hecho de que el ADN tumoral se define por la presencia de mutaciones somáticas, que no están presentes en el ADN normal. Por otro lado, la baja fracción de ADNtc que normalmente circula por el torrente sanguíneo hace que las técnicas de secuenciación estándar como la secuenciación por Sanger y la pirosecuenciación solo puedan identificar fragmentos de ADN mutantes derivados del tumor en pacientes con un gran volumen tumoral y por tanto altos niveles de ADN circulante, haciendo la detección de ADNtc inconsistente¹³⁰⁻¹³³. La introducción de nuevas técnicas digitales de detección o la secuenciación masiva¹³⁴⁻¹³⁷ ha supuesto un gran avance en el estudio de las aplicaciones clínicas de la detección de ADNtc.

1.4.1 Métodos de detección de ADNtc

Globalmente, los métodos de detección de ADNtc pueden dividirse en 2 categorías: Los dirigidos, que evalúan una única región específica de interés dentro de una región de ADN relativamente pequeña; y los no dirigidos, que utilizan técnicas de NGS para analizar de forma simultánea grandes regiones de múltiples genes.

Entre los métodos dirigidos se encuentran los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, que se utiliza frecuentemente para la búsqueda de alteraciones genéticas específicas, sobre todo en tejido tumoral^{138,139}. La principal limitación de esta aproximación es que no proporciona información sobre la cantidad de moléculas de ADN mutado. La PCR digital (dPCR) ofrece un método alternativo a la PCR en tiempo real

convencional para la cuantificación directa de los alelos mutados, información imprescindible para la aplicación del análisis del ADNtc en la monitorización del estado de la enfermedad. Cuando se utiliza la dPCR, el ADN se fracciona hasta obtener moléculas individuales de ADN que se analizan de manera independiente en diferentes compartimentos (pocillos, gotitas o cámaras en función de la variante de dPCR empleada). Cada compartimento contiene un fragmento de ADN, mutado o no mutado, que será amplificado mediante PCR. Para la cuantificación se utilizan sondas fluorescentes que pueden detectar los fragmentos mutados y no mutados. La dPCR tiene una alta sensibilidad para detectar alteraciones presentes en hasta el 0.01% - 0.1% de la muestra¹⁴⁰, lo que la convierte en una técnica óptima para la detección de mutaciones en ADNtc. El *beads, emulsion, amplification and magnetics* (BEAMing)¹³⁵, es una técnica en la que el segmento del ADN objeto se amplifica usando cebadores que contienen secuencias de etiquetas conocidas, para unirse posteriormente de manera covalente a cuentas magnéticas. Finalmente, se cuantifican las cuentas que contienen la mutación mediante citometría de flujo. Se ha reportado una buena sensibilidad para detectar alteraciones presentes en hasta el 0.01%¹²⁸. La principal limitación de las técnicas dirigidas es que solo pueden buscar mutaciones conocidas.

Los métodos no dirigidos utilizan técnicas de NGS para realizar un análisis masivo en paralelo de millones de pequeñas secuencias de moléculas de ADN y una posterior comparación con secuencias de referencia. La NGS puede potencialmente detectar mutaciones puntuales, inserciones o deleciones, amplificaciones, así como reordenamientos como inversiones o traslocaciones. Puede utilizarse para secuenciar el genoma o exoma completos o pueden utilizarse paneles que restrinjan la cobertura a entre unos pocos y cientos de regiones de interés. La *ratio* de error con NGS, sobre todo en análisis muy amplios y dependiendo de la plataforma utilizada, puede llegar al 1%¹⁴¹, lo que podría limitar su uso para la detección de mutaciones poco frecuentes. Mediante la utilización de paneles de genes seleccionados puede restringirse la cobertura a dianas clínicamente relevantes, lo que permite que cada lectura se secuencie miles de veces, asegurando una alta sensibilidad para detectar alteraciones presentes en menos del 0.01% de la muestra¹⁴². Además, utilizando estos paneles se reduce tanto la cantidad de ADN necesario por análisis como el coste¹⁰⁸. La posibilidad de

estudiar múltiples genes al mismo tiempo, lo que supone una gran ventaja dado el aumento progresivo del número de alteraciones a testar en cáncer, y teniendo en cuenta que los continuos avances tecnológicos están reduciendo tanto el tiempo de respuesta como los costes, es de esperar que los métodos basados en NGS se utilicen de manera preferente en el campo de la biopsia líquida a corto plazo¹⁰⁸.

1.4.2 Análisis del ADNtc en casos *EGFR* mutados

El análisis del ADNtc puede aplicarse en pacientes con CPCNP con mutación de *EGFR* en varias situaciones: en pacientes que todavía no han recibido tratamiento previo, en el momento de la progresión a EGFR TKIs o para monitorizar la respuesta al tratamiento.

1.4.2.1 Análisis del ADNtc en casos sin tratamiento previo

Las principales guías clínicas aconsejan el uso de la biopsia líquida como complemento a la biopsia tumoral en el momento del diagnóstico del CPNCP en todos los casos en los que sea necesario realizar un estudio molecular^{3,108,111}. Su uso es especialmente útil en casos en los que el tejido tumoral es escaso, no esté disponible o se prevea un retraso significativo en su obtención (por ejemplo, superior a 2 semanas). También está especialmente indicada en casos en los que la realización de una biopsia comporte un alto riesgo para el paciente o esté contraindicada, o en caso de biopsias óseas, que pueden no ser adecuadas para el estudio molecular porque algunos productos descalcificadores pueden dañar el ADN¹⁰⁸.

Un resultado positivo para una mutación tratable mediante una terapia dirigida otorga la suficiente evidencia para iniciarla. Sin embargo, debido a la posibilidad de falsos negativos en casos con poco volumen tumoral o poco vertido de ADN al torrente sanguíneo, en caso de ser negativa ha de considerarse no concluyente y debe valorarse realizar otro test¹⁰⁸. Aunque se han reportado resultados variables en función de la técnica utilizada, en general el análisis del ADNtc muestra mejor especificidad (87-100%) que sensibilidad (59-100%) y una concordancia con el tejido tumoral de 80-97% (TABLA 2).

TABLA 2. Sensibilidad, especificidad y concordancia con el tejido tumoral del análisis de ADNtc en pacientes con CPCNP *EGFR* mutado sin tratamiento previo.

Técnica	n*	Mutación	S (%)*	E (%)*	Conc (%)*	Ref
rtPCR	238	L858R + delección exón 19	75	96	88	143
rtPCR	196	L858R + delección exón 19	60	96	91	144
rtPCR	96	L858R + delección exón 19	78	NR	NR	145
dPCR	120	L858R	69	100	80	146
		delección exón 19	86	100	91	
dPCR	58	L858R	70.8	NR	87.9	147
		delección exón 19	76.5		86.2	
BEAMing	216	L858R	86	97	NR	148
		delección exón 19	82	98		
BEAMing	38	L858R	93	100	95	149
		delección exón 19	100	93	95	
rtPCR	38	L858R	90	100	97	149
		delección exón 19	86	100	89	
dPCR	38	L858R	90	100	97	149
rtPCR	226	L858R	59	100	NR	150
		delección exón 19	85	99		
dPCR	208	L858R	69	98	NR	150
		delección exón 19	72	100		
NGS (MiSeq)	227	L858R	62	99	NR	150
		delección exón 19	81	99		
BEAMing	44	Mutaciones activadoras	72.7	NR	NR	151
NGS (Guardant360)	102	panel 70 genes	NR	NR	79	152
NGS (Iontorrent)	31	Panel 5 genes	58	87	68	153
NGS (Guardant360)	34	Panel 70 Genes	NR	NR	76.5	154

* En los casos de NGS en los que el estudio evalúa varios genes, el número de casos y los resultados de la sensibilidad, especificidad y concordancia corresponde a los casos *EGFR* mutados.

n, número de pacientes; E, especificidad; S, sensibilidad; Conc, concordancia; Ref, referencia; rtPCR, PCR con retrotranscripción; dPCR, PCR digital; NGS, secuenciación de nueva generación; NR, no reportado; BEAMing, *beads, emulsion, amplification and magnetics*.

1.4.2.2 Análisis del ADNtc a la progresión a EGFR TKIs

En la actualidad, probablemente el uso más frecuente de la biopsia líquida en CPCNP es el de la búsqueda de mecanismos de resistencia en pacientes cuyo tumor ha progresado a tratamiento con EGFR TKIs. En ese momento, sobre todo en casos de progresión a EGFR TKIs de primera o segunda generación en los que la presencia de la mutación *EGFR*^{T790M} determina el tratamiento a realizar, es de vital importancia su estudio. En este contexto, la biopsia líquida permite evitar un procedimiento invasivo, contando además con la ventaja de poder evitar el sesgo de estudiar solo la población celular representada en la única zona en la que se realiza la biopsia. Como se ha comentado anteriormente, y aunque lo esperable es que su importancia disminuya con el uso de EGFR TKIs de tercera generación como osimertinib en primera línea, a día de hoy el mecanismo de resistencia a EGFR TKIs más frecuente es la mutación *EGFR*^{T790M}. En la **TABLA 3** se puede encontrar datos de varios estudios que analizan la detección de *EGFR*^{T790M} en ADNtc en el contexto de progresión al tratamiento con EGFR TKIs. El uso de NGS en esta situación tiene la ventaja sobre los métodos basados en PCR de poder revelar otros mecanismos de resistencia diferentes a la *EGFR*^{T790M} en el mismo análisis. Mientras que un resultado positivo para *EGFR*^{T790M} en ADNtc se considera adecuado para iniciar tratamiento con osimertinib, su ausencia debería considerarse un resultado no concluyente, sobre todo si tampoco se detecta la mutación de sensibilidad de *EGFR* inicial, y debe valorarse el uso de una técnica alternativa en ADNtc más sensible o realizar el análisis en una biopsia tumoral si es posible¹⁰⁸.

TABLA 3. Detección de *EGFR*^{T790M} en ADNtc.

Técnica	n	Mutación	S (%)	E (%)	Conc (%)	Ref
dPCR	60	T790M	77	63	NR	¹⁴⁶
BEAMing	216	T790M	70	69	NR	¹⁴⁸
rtPCR	38	T790M	41	100	57	¹⁴⁹
dPCR	38	T790M	71	83	74	¹⁴⁹
BEAMing	38	T790M	71	67	70	¹⁴⁹
rtPCR	226	T790M	51	NR	NR	¹⁵⁰
dPCR	208	T790M	57	NR	NR	¹⁵⁰
NGS (MiSeq)	227	T790M	65	NR	NR	¹⁵⁰
NGS (Panel personalizado)	63	T790M	90,5	100	97	¹⁵⁵
rtPCR	306	T790M	42	NR	NR	¹⁵⁶
dPCR	306	T790M	56	NR	NR	¹⁵⁶

n, número de pacientes; E, especificidad; S, sensibilidad; Conc, concordancia; Ref, referencia; rtPCR, PCR con retrotranscripción; dPCR, PCR digital; NGS, secuenciación de nueva generación; NR, no reportado; BEAMing, beads, emulsion, amplification and magnetics.

1.4.2.3 Análisis del ADNtc para la monitorización de la respuesta al tratamiento

La aplicación en la que el análisis del ADNtc es, de momento, menos utilizada es la monitorización de la respuesta al tratamiento, pero existen datos al respecto. Por un lado, la persistencia de mutaciones de *EGFR* en ADNtc en pacientes semanas después del inicio de tratamiento con EGFR TKIs, se asocia con menor supervivencia libre de progresión y tasa de respuesta^{143,157}. Por otro lado, la presencia de la mutación *EGFR*^{T790M} puede detectarse en el plasma de pacientes en tratamiento con EGFR TKIs de primera o segunda generaciones meses antes de que se objetive una progresión radiológica, ya que el inicio precoz de tratamiento con EGFR TKIs de tercera generación en presencia de la mutación *EGFR*^{T790M} pero en ausencia de progresión radiológica sea útil todavía está por demostrarse¹⁵⁸.

1.4.3 Evidencia en casos *KRAS* mutados

Al no disponer de tratamiento dirigido aprobado, el estudio de mutaciones de *KRAS* en ADNtc en CPCNP está mucho menos desarrollado que el de *EGFR*. En espera de la llegada del tratamiento dirigido, la determinación de *KRAS* puede dar información útil para el manejo del CPCNP. Por un lado, la presencia de la mutación de *KRAS* al diagnóstico descarta, en principio, la presencia de otras alteraciones tratables de manera dirigida por lo que en estos casos podría no ser necesario continuar con el estudio molecular, aunque con la aplicación generalizado de la NGS, se hallan cada vez más casos de mutación potencialmente conductora concomitante como *EGFR* o *TP53*^{47,159}. Por otro lado, la monitorización del *KRAS* circulante podría relacionarse con la respuesta a la quimioterapia¹⁶⁰⁻¹⁶³, o para distinguir la pseudoprogresión de la verdadera progresión tumoral en pacientes tratados con inmunoterapia¹⁶⁴. Como ocurre con las mutaciones de *EGFR*, y aunque los resultados varían en función de la plataforma utilizada, el uso de ADNtc para la detección de mutaciones de *KRAS* parece más específico (87-100%) que sensible (58-86%). La *ratio* de concordancia plasma/tejido reportada en casos con cáncer de pulmón varía entre 68-80%^{109,146,153,165-16}.

2. HIPÓTESIS

1. La detección de mutaciones en ADNtc de *EGFR* y *KRAS* tendrá una elevada sensibilidad y especificidad, permitiendo así que estas determinaciones sean una alternativa en pacientes con CPCNP en los que no es posible la obtención de tejido tumoral adecuado.
2. La detección de ADNtc puede resultar de utilidad en la monitorización del tratamiento de pacientes con CPCNP y mutaciones de *EGFR* o *KRAS* para predecir la respuesta o resistencia al tratamiento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Correlacionar los resultados del estudio mutacional obtenidos en ADNtc con los obtenidos en la muestra tumoral.

3.2 Objetivos secundarios

Determinar el valor de la detección de ADNtc en la monitorización de los pacientes con CPCNP y mutaciones de *EGFR* o *KRAS*, analizando las variaciones en la detección de ADN tumoral circulante a lo largo de la evolución de cada paciente, y correlacionándolas con la evolución de la enfermedad.

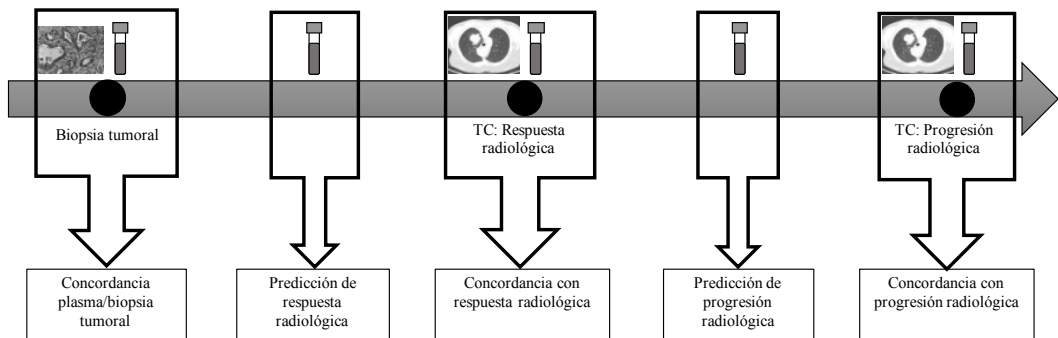
Evaluar si la tasa de detección de mutaciones en ADNtc y su uso para predecir la respuesta y progresión radiológicas depende de características clínicas del paciente (carga tumoral, localización de las metástasis) y/o del tipo de mutación.

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

La población seleccionada fue los pacientes diagnosticados en el Hospital del Mar de adenocarcinoma de pulmón con mutaciones de *EGFR* o *KRAS* entre 2012 y 2017. En todos los casos se conocía el estudio molecular de la biopsia tumoral. El primer estudio incluyó casos *EGFR* mutados mientras que el segundo incluyó casos *KRAS* mutados. Se obtuvieron muestras de plasma antes del inicio del tratamiento y en diferentes momentos durante el transcurso del mismo.

El objetivo primario de ambos estudios fue la concordancia entre la detección de mutaciones –de *EGFR* en caso del primer estudio y de *KRAS* en el segundo– mediante el análisis de ADNtc en la muestra de plasma obtenida antes del inicio de tratamiento o en el momento de la rebiopsia tumoral, y la basada en la biopsia tumoral, considerada la técnica de referencia de cara a realizar los análisis estadísticos. Otro objetivo fue estudiar la posible asociación entre la dinámica de la carga mutacional plasmática de *EGFR* o *KRAS* y la respuesta o progresión radiológica al tratamiento. Con este propósito, las muestras obtenidas en diferentes momentos durante el tratamiento se utilizaron para analizar tanto la concordancia con la respuesta o progresión radiológica, como la predicción de las mismas (**FIGURA 3**).

FIGURA 3. Diseño de los estudios: La imagen del tejido al microscopio representa el momento de la biopsia tumoral; la imagen del tubo de sangre representa el momento de la obtención de plasma; la imagen de un TC representa el momento en el que se realiza la valoración de respuesta radiológica.



TC, tomografía computada

4.1 Dynamics of *EGFR* mutational load in plasma for prediction of treatment response and progression in patients with *EGFR*-mutant lung adenocarcinoma

Á. Taus, L. Camacho, P. Rocha, M. Hardy-Werbin, L. Pijuan, G. Piquer, E. López, A. Dalmases, R. Longarón, S. Clavé, M. Salido, J. Albanell, B. Bellosillo, E. Arriola. Clin Lung Cancer. 2018 Sep;19(5):387-394.e2

DOI artículo *EGFR*: 10.1016/j.clc.2018.03.015

DOI artículo *EGFR*: 10.1016/j.cllc.2018.03.015

DOI artículo *EGFR*: 10.1016/j.clc.2018.03.015

DOI artículo *EGFR*: 10.1016/j.cllc.2018.03.015

DOI artículo *EGFR*: 10.1016/j.clc.2018.03.015

DOI artículo *EGFR*: 10.1016/j.cllc.2018.03.015

DOI artículo *EGFR*: 10.1016/j.clc.2018.03.015

DOI artículo *EGFR*: 10.1016/j.cllc.2018.03.015

4.2 Plasmatic *KRAS* kinetics for the prediction of treatment response and progression in patients with *KRAS*-mutant lung adenocarcinoma

Á. Taus, L. Camacho, P. Rocha, A. Hernández, R. Longarón, S. Clavé, L. Fernández-Ibarrondo, M. Salido, M. Hardy-Werbin, C. Fernández-Rodríguez, J. Albanell, B. Bellosillo, E. Arriola. Arch Bronconeumol. 2020 Apr 3:S03002896(20)30055-7

DOI artículo *KRAS*: 10.1016/j.arbres.2020.01.023

DOI artículo *KRAS*: 10.1016/j.arbres.2020.01.023

DOI artículo *KRAS*: 10.1016/j.arbres.2020.01.023

DOI artículo *KRAS*: 10.1016/j.arbres.2020.01.023

DOI artículo *KRAS*: 10.1016/j.arbres.2020.01.023

DOI artículo *KRAS*: 10.1016/j.arbres.2020.01.023

DOI artículo *KRAS*: 10.1016/j.arbres.2020.01.023

5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

Globalmente, la concordancia entre la determinación de las mutaciones en tejido tumoral y en plasma fue del 82.9% en los casos *EGFR* mutados y del 82.4% en los *KRAS* mutados. En la serie de tumores *EGFR* mutados la ratio de detección fue significativamente superior en los casos con afectación metastásica extratorácica (100% vs 60%; $p=0.002$); dos o más órganos con metástasis (100% vs 60%; $p=0.002$); y en los casos con más ADN total circulante (equivalente genómico en el segundo o tercer tercil comparado con el primero) (100% vs 70%; $p=0.01$). En la misma línea, en la serie de *KRAS* la *ratio* de detección fue significativamente superior en los casos con afectación metastásica en más de un órgano (96.4% vs 65.2%; $p=0.004$) y en casos con más ADN total circulante (equivalente genómico por encima de la media) (100% vs 76%; $p=0.009$). La sensibilidad de la biopsia, especificidad y el valor predictivo positivo y negativo de la biopsia líquida fue de 0.82, 1, 1 y 0.88 respectivamente para la detección de mutaciones de *EGFR*; y de 0.82, 1, 1 y 0.62 para las de *KRAS*.

Respecto al análisis de la utilidad de la biopsia líquida en la monitorización de la respuesta a los tratamientos, la concordancia entre la dinámica de la carga mutacional circulante de *EGFR* con la respuesta radiológica fue del 95.8% y con la progresión del 80%, llegando al 100% y 85% respectivamente en los casos tratados con EGFR TKIs en primera línea. En la serie de casos *KRAS* mutados, la concordancia fue del 88% con la respuesta y del 80% con la progresión radiológica. Además, el análisis de la dinámica del ADNtc en los casos *EGFR* mutados permitió predecir la respuesta radiológica en un 93% de los casos con una antelación mediana de 38 días (20 – 69), y la progresión radiológica en un 89%, siendo en este caso la antelación mediana de 80 días (17 – 292). Por lo que respecta a los casos *KRAS* mutados, el análisis de la dinámica de la carga mutacional circulante permitió predecir la respuesta radiológica en un 93% y la progresión en un 63% de los casos con una antelación mediana de 33 (14 – 67) y 50 (13 – 120) días respectivamente.

Por otro lado, la supervivencia libre de progresión fue significativamente superior en los casos en los que, tras el inicio de tratamiento, las mutaciones dejaron de ser detectables en ADNtc, tanto en la serie de *EGFR* (9.8 vs 1.8 días; HR: 17.11; $p<0.001$), como en la de *KRAS* (7.7 vs 3.2 meses; HR: 0.44; $p=0.004$).

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

En este trabajo hemos estudiado, en un marco de práctica clínica diaria, el uso de la biopsia líquida basada en el análisis del ADNtc para la detección de mutaciones de *EGFR* y *KRAS* en pacientes con adenocarcinoma de pulmón, describiendo los patrones de detección de las mismas y explorando factores potencialmente asociados con resultados discordantes. Además, hemos estudiado el potencial del estudio del ADNtc para la monitorización de la enfermedad.

El cáncer de pulmón es, año tras año, la principal causa de mortalidad por cáncer⁴. En la última década se han identificado y validado como biomarcadores predictivos de respuesta, alteraciones moleculares cuya identificación permite administrar tratamientos dirigidos con mejor eficacia y tolerancia que la quimioterapia tradicional^{3,8}. La ausencia de material tumoral suficiente para realizar todo el estudio molecular necesario en la biopsia es relativamente frecuente en cáncer de pulmón, además en muchas ocasiones la repetición de la biopsia es complicada o no aceptada por los pacientes. En este escenario, la biopsia líquida ha ido ganando presencia en la práctica clínica habitual, pues permite realizar estudios moleculares mediante un procedimiento mínimamente invasivo, además de ayudar a superar limitaciones inherentes a la biopsia tumoral como la heterogeneidad tumoral.

En ambos estudios hemos demostrado una buena concordancia en términos de detección de mutaciones entre la biopsia tumoral y el estudio de ADNtc, sobre todo en los casos con la enfermedad diseminada más allá de tórax y con mayor número de metástasis. En la serie de casos *EGFR* mutados, la *ratio* de concordancia entre ADNtc y biopsia tumoral fue del 100% en los casos con metástasis fuera del tórax. La concordancia global en los casos *KRAS* mutados fue del 82.4%, llegando al 96.4% en los casos con más de una localización metastásica. El único caso con metástasis en más de una localización en el que no hubo concordancia tenía el hueso, tejido que vierte poco ADN al torrente sanguíneo¹⁰⁴, como una de sus dos únicas localizaciones metastásicas. En la serie completa, la biopsia líquida

detectó mutaciones de *EGFR* o *KRAS* en todos los pacientes con niveles altos de ADN total circulante medido mediante el equivalente genómico (2° o 3er tercil en la serie de *EGFR*, casos por encima de la mediana en la de *KRAS*). Aunque el tamaño de la muestra en la serie de *EGFR* no permite confirmarlo de manera estadísticamente significativa, en la serie de casos *KRAS* mutados la afectación metastásica en más de una localización se asociaba a ADN circulante total alto, por lo que parece lógico pensar que no que son variables independientes. El aumento de la tasa de detección de mutaciones en casos con más localizaciones metastásicas también ha sido previamente reportado^{104,146,173}. Las tasas de concordancia del análisis del ADNtc con la biopsia tumoral reportadas son muy variables dependiendo no solo de la técnica utilizada, sino también de las características de la población. Un ejemplo es la menor tasa de detección de mutaciones de *KRAS* reportada por Sacher y colaboradores¹⁴⁶, 64% frente al 82.4% en nuestra serie, a pesar de utilizar técnica similar a la utilizada en nuestro trabajo. Esta diferencia podría explicarse por la diferencia en la carga de enfermedad entre los pacientes de ambas series: el porcentaje de casos con 4 o más localizaciones metastásicas en la serie de Sacher y colaboradores era del 10%, mientras que en la nuestra era del 25%. En ambos estudios la tasa de detección de mutaciones aumentaba con el número de localizaciones metastásicas¹⁴⁶.

En la línea de la evidencia publicada en casos *EGFR* (TABLA 2) y *KRAS* mutados^{109,146,153,165-168}, la detección de mutaciones en ADNtc tiene en nuestra serie una especificidad y valor predictivo negativo perfectos (1), con una sensibilidad (0.82 en ambos casos) y valor predictivo negativo más bajos (0.88 y 0.62 para *EGFR* y *KRAS* respectivamente), confirmando así la utilidad de la biopsia líquida para la detección de mutaciones presentes en el tumor.

Nuestro trabajo también ha explorado la capacidad del análisis de la dinámica mutacional circulante de *EGFR* y *KRAS* para monitorizar la respuesta a los tratamientos. El estudio de la dinámica de la carga mutacional circulante concordaba con la respuesta tumoral

radiológica en la mayoría de los casos, siendo del 95.8% en los casos *EGFR* mutados y del 88% en los *KRAS* mutados. En la serie global, en solo 3 casos observamos discordancia entre la dinámica de la carga mutacional circulante y la respuesta radiológica, uno de ellos (*KRAS* mutado) tenía un tumor en estadio III y los otros dos (un *EGFR* mutado y un *KRAS* mutado) tenían una lesión ósea única como única localización metastásica fuera del tórax. La tasa de concordancia con la progresión radiológica fue elevada, aunque algo menor, del 80% en los casos *EGFR* mutados y del 71% en los *KRAS* mutados. Una posible explicación es que, a diferencia de lo que ocurre con la respuesta tumoral, en muchos casos la resistencia está conducida por alteraciones moleculares diferentes a las mutaciones de *EGFR* y *KRAS*. El hecho de que la concordancia con la progresión sea menor en la serie de casos *KRAS* mutados apoya esta posibilidad, pues en el caso de *EGFR*, la técnica utilizada en nuestro trabajo era capaz de detectar la mutación *EGFR*^{T790M}, mecanismo de resistencia más frecuente a EGFR TKIs.

El estudio de los cambios en los porcentajes de mutaciones circulantes demostró una excelente capacidad de predicción de la respuesta radiológica, tanto en los casos con mutaciones de *EGFR* como de *KRAS* mutados (93% en ambos casos) con una antelación mediana de más de un mes en los dos casos. Los únicos dos casos (uno en cada serie) en los que no pudo predecirse la respuesta radiológica tenían de nuevo el hueso como única localización metastásica fuera del tórax. La tasa de predicción de la progresión radiológica fue menor, 89% para casos *EGFR* mutados y 63% en *KRAS* mutados. Como con la concordancia con la respuesta, esta diferencia puede explicarse por mecanismos de resistencia diferentes a las estudiadas, sobre todo en los casos *KRAS* mutados. Nuestro trabajo pone de manifiesto la utilidad de la biopsia líquida en la monitorización de los pacientes utilizándose quizá para adaptar el seguimiento radiológico en función de la carga mutacional en sangre.

La detección de la mutación de resistencia *EGFR*^{T790M} en los pacientes *EGFR* mutados ha adquirido una importancia desde que el tratamiento con osimertinib ha demostrado ser activo contra tumores portadores de dicha mutación³³. Como era de esperar, la mutación

EGFR^{T790M} fue detectada en aproximadamente la mitad de nuestros pacientes a la progresión a EGFR TKIs. Un hallazgo interesante ha sido identificar diferentes patrones en la dinámica de la carga mutacional de mutaciones de sensibilidad y resistencia entre el grupo de pacientes con *EGFR*^{T790M}. Aunque en estos casos se conoce que la resistencia es consecuencia de la mutación *EGFR*^{T790M}, ésta puede ocurrir mediante la selección de clones *EGFR*^{T790M} preexistentes o a través de la evolución de células *EGFR*^{T790M} negativas tolerantes al tratamiento. Los tumores de nuestros pacientes cuyo tumor progresó a pesar de tener una baja carga mutacional de *EGFR*^{T790M}, podrían tener varias clones tumorales que portaran solo la mutación de sensibilidad, solo la de resistencia o ambas¹⁷⁴. Este asunto requerirá de investigaciones adicionales, pues podría proporcionar información relevante para optimizar las estrategias terapéuticas tras el fallo a EGFR TKIs. La predicción de la progresión radiológica es especialmente interesante pues, aunque todavía está por demostrar que el aumento de la carga mutacional o detección de una mutación de resistencia sea suficiente para plantear un cambio de tratamiento¹⁵⁸, su detección podría servir para adelantar la valoración radiológica y evitar, en caso de confirmarse la progresión, tratamientos que no son (o han dejado de ser) efectivos y efectos secundarios innecesarios. En nuestras series, la mediana de tiempo con la que se anticipaba la progresión fue de 80 días en los casos *EGFR* mutados y de 50 en los casos *KRAS* mutados. La capacidad de la biopsia líquida para predecir la respuesta a los tratamientos ha sido previamente reportada tanto en casos *EGFR* mutados tratados con EGFR TKIs¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, como en casos *KRAS* mutados tratados con quimioterapia¹⁶⁰⁻¹⁶³.

En ambos estudios hemos demostrado una mediana de supervivencia libre de progresión significativamente más prolongada en los casos en los que, tras el inicio del tratamiento, dejaban de detectarse mutaciones de *EGFR* o *KRAS* circulante en comparación con los casos en los que las mutaciones continuaban siendo detectables en plasma: 295 vs 55 días (HR: 17.11; p<0.001) en los casos *EGFR* mutados y 7.7 vs 3.2 meses (HR: 0.44; p=0.004) en los casos *KRAS* mutados. Estos resultados, de nuevo, están en línea con lo previamente publicado^{148,175,176}.

Ambos estudios al estar realizados en la práctica clínica habitual ofrecen datos aplicables nuestra realidad asistencial y a hospitales de nuestro medio. Por el mismo motivo tienen unas limitaciones inherentes. Una de las críticas potenciales que puede realizarse al estudio con casos *EGFR* mutados es el uso de dos técnicas diferentes (dPCR y BEAMing) para la detección de mutaciones de *EGFR* en plasma. Sin embargo, ambas son consideradas técnicas sensibles para el análisis de ADNtc^{127,177} y, cuando se han utilizado ambas técnicas sobre la misma muestra en los casos con suficiente plasma tras el análisis inicial mediante BEAMing, la concordancia ha sido alta. Por otro lado, la cadencia con la que se han obtenido las muestras de plasma no es homogénea entre los diferentes pacientes. Las muestras se obtenían coincidiendo con las visitas de los pacientes a la consulta, cuya frecuencia varía en función de la evolución clínica, estado general, toxicidad por los tratamientos, así como de otros factores logísticos. El hecho de que el tiempo entre la obtención de las muestras de plasma y la realización de los TC que definían la respuesta o progresión radiológicas no sea uniforme entre todos los casos, hace que los resultados sobre la capacidad de predicción de la respuesta o progresión radiológica, así como la asociación entre la negativización de la detección de mutaciones en plasma con un aumento de la supervivencia libre de progresión, tengan que ser interpretados con prudencia. Otra limitación que es consecuencia del momento en el que se han realizado los estudios radica en el hecho de haber utilizado una técnica de análisis del ADNtc que solo es capaz de detectar un único gen, lo que impide evaluar el impacto de mutaciones concurrentes diferentes a *EGFR* y *KRAS*. El uso cada vez más generalizado de técnicas de NGS con paneles que cubren un amplio espectro de genes de interés, o incluso la secuenciación de todo el exoma o genoma, está proporcionando gran cantidad de información sobre el papel de estas mutaciones concurrentes, bien en el momento de la progresión tumoral⁵⁵ o como biomarcador de respuesta a la inmunoterapia en el caso de las mutaciones concurrentes con *KRAS*^{65,66}.

Hasta ahora, en todos los estudios se ha considerado la biopsia tumoral como técnica de referencia para evaluar las diferentes técnicas de biopsia líquida. Teniendo en cuenta la limitación que supone para el genotipado a través de biopsia del tejido la heterogenei-

dad tumoral, así como el rápido desarrollo tecnológico que está permitiendo la secuenciación de regiones cada vez más amplias con una sensibilidad cada vez mejor y con costes decrecientes; es posible que a medio plazo el genotipado tumoral mediante biopsia líquida acabe convirtiéndose en la técnica de referencia y que, lo que actualmente consideremos falsos positivos con técnicas de biopsia líquida, pasen a considerarse resultados falsos negativos de la biopsia tumoral producto de la heterogeneidad tumoral.

En resumen, en nuestro trabajo la biopsia líquida basada en el análisis de ADNtc ha mostrado una buena concordancia con la detección de mutaciones de *EGFR* y *KRAS* en biopsia tumoral, especialmente en casos con afectación metastásica fuera del tórax. Además, en la mayoría de los casos ha sido capaz de predecir con una antelación significativa la respuesta y progresión radiológicas, demostrando así ser una herramienta de confianza aplicable en la práctica clínica habitual.

Teniendo en cuenta la evidencia actual derivada no solo de nuestro trabajo sino también de los múltiples trabajos publicados, pensamos que el uso de la biopsia líquida, al menos en casos *EGFR* mutados o con alta sospecha clínica de ser portadores de una alteración genética tratable de manera dirigida, no ha de considerarse solo como una opción diagnóstica más. Dada la imposibilidad en algunos casos de obtener material suficiente para un estudio molecular, el retraso que suele conllevar la repetición de la biopsia y el riesgo de complicaciones asociadas a las mismas; los clínicos hemos de asegurar a nuestros pacientes a una prueba mínimamente invasiva, sin complicaciones significativas y con una especificidad excelente como es la biopsia líquida. El beneficio para los pacientes no solo vendrá derivado de la detección de alteraciones en el momento del diagnóstico que permitan administrar un tratamiento eficaz; sino también de la monitorización de la carga mutacional y la identificación precoz de cambios moleculares tumorales que frecuente se observan a la progresión, lo que permitirá evitar continuar con la administración de tratamientos no efectivos con efectos secundarios innecesarios.

7. CONCLUSIONES

1. La detección de mutaciones de *EGFR* o *KRAS* mediante el análisis de ADNtc ha mostrado una concordancia superior al 80% con la basada en el análisis de una biopsia tumoral.
2. El análisis de la dinámica de la carga mutacional circulante de *EGFR* o *KRAS* ha permitido, en la mayoría de los casos, prever la respuesta o progresión radiológicas con antelación. La desaparición de las mutaciones de *EGFR* o *KRAS* plasmáticas tras el inicio del tratamiento se asocia a un aumento de la supervivencia libre de progresión.
3. La alta carga tumoral, definida como presencia de metástasis fuera del tórax o afectación de varias localizaciones metastásicas, se asocia con una tasa cercana al 100% (96.4-100%) de detección de mutaciones de *EGFR* o *KRAS* en ctDNA.

8. LÍNEAS DE FUTURO

Este proyecto se puso en marcha en el seno de un proyecto más ambicioso que incluía estudios que evaluaban el papel del análisis de ADNtc, además de en el cáncer de pulmón, en otras patologías como el cáncer colorrectal¹⁷⁸⁻¹⁸¹ y el melanoma¹⁸². Estos estudios continúan desarrollándose a día de hoy. La puesta en marcha de estos proyectos supuso el diseño, puesta en marcha y mejora continua de un circuito de recogida, procesado, almacenamiento y análisis de muestras de plasma que finalmente ha desembocado en la creación de una unidad de biopsia líquida en nuestro centro. La biopsia líquida se utiliza en nuestro centro a día de hoy tanto a nivel asistencial en casos de cáncer de pulmón y melanoma como en múltiples proyectos de investigación en otros tumores como cáncer de colon, próstata o mama. La reciente inclusión en el circuito asistencial del análisis de biopsias tumorales de cáncer de pulmón mediante técnicas de NGS y el proyecto en marcha en el que el Hospital del Mar es centro de referencia al que se derivarán desde diferentes hospitales muestras para secuenciar mediante NGS, asegura la continuidad de la investigación en la caracterización molecular del cáncer de pulmón.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2018;144(8):ijc.31937.
2. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong K-K. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 2014;14(8):535–46.
3. Non-Small Cell Lung Cancer (version 3.2019). Accessed March 1.2019. Natl Compr Cancer Netw
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65(1):5–29.
5. Schwaederle M, Zhao M, Lee JJ, et al. Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials. *J Clin Oncol* 2015;33(32):3817–25.
6. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350(21):2129–39.
7. Paez JG, Jänne P a, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304(5676):1497–500.
8. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2019

9. Hammerman PS, Voet D, Lawrence MS, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012;489(7417):519–25.
10. Cancer Genome Atlas Research Network EA, Campbell JD, Brooks AN, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511(7511):543–50.
11. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 2010;277(2):301–8.
12. Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(10):1742–51.
13. Irmer D, Funk JO, Blaukat A. EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene* 2007;26(39):5693–701.
14. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009;28 Suppl 1:S24–31.
15. Riely GJ, Pao W, Pham D, et al. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 2006;12(3 I):839–44.
16. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361(10):958–67.

17. Yeh P, Chen H, Andrews J, Naser R, Pao W, Horn L. DNA-mutation Inventory to Refine and Enhance Cancer Treatment (DIRECT): A catalog of clinically relevant cancer mutations to enable genome-directed anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1894–901.
18. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. 2009.
19. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362(25):2380–8.
20. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13(3):239–46.
21. Yang JC-H, Wu Y-L, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 2015;16(2):141–51.
22. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in Untreated *EGFR* -Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018;378(2):113–25.
23. Ahn M, Tsai C, Shepherd FA, et al. Osimertinib in patients with T790M mutation-positive, advanced non-small cell lung cancer: Long-term follow-up from a pooled analysis of 2 phase 2 studies. *Cancer* 2019;125(6):892–901.

24. De Pas T, Toffalorio F, Manzotti M, et al. Activity of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung cancer harboring rare epidermal growth factor receptor mutations. *J Thorac Oncol* 2011;6(11):1895–901.
25. Wu J-Y, Yu C-J, Chang Y-C, Yang C-H, Shih J-Y, Yang P-C. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on “uncommon” epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(11):3812–21.
26. Yang JC-H, Sequist L V, Geater SL, et al. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol* 2015;2045(15):1–9.
27. Laurie S a, Goss GD. Role of epidermal growth factor receptor inhibitors in epidermal growth factor receptor wild-type non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(8):1061–9.
28. Arriola E, Taus A, Casadevall D. Is there a role for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor receptor wildtype non-small cell lung cancer? *World J Clin Oncol* 2015;6(4):45–56.
29. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med* 2005;352(8):786–92.
30. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:0225–35.

31. Wu SG, Liu YN, Tsai MF, et al. The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget* 2016;7(11):12404–13.
32. Yun CH, Boggon TJ, Li Y, et al. Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell* 2007;11(3):217–27.
33. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, et al. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017;376(7):629–40.
34. Sequist L V., Martins RG, Spigel D, et al. First-Line Gefitinib in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer Harboring Somatic *EGFR* Mutations. *J Clin Oncol* 2008;26(15):2442–9.
35. Li H, hu haichuan, Wang R, et al. Primary concomitant EGFR T790M mutation predicted worse prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Onco Targets Ther* 2014;7:513.
36. Su K-Y, Chen H-Y, Li K-C, et al. Pretreatment Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*) T790M Mutation Predicts Shorter EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Response Duration in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2012;30(4):433–40.
37. Inukai M, Toyooka S, Ito S, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66(16):7854–8.

38. Vendrell J, Mazieres J, Senal romain, et al. Ultra-sensitive *EGFR* T790M detection as an independent prognostic marker for lung cancer patients harboring *EGFR*^{del19} mutations and treated with first-generation TKIs. *Clin Cancer Res* 2019;clincanres.2683.2018.
39. Watanabe M, Kawaguchi T, Isa SI, et al. Ultra-sensitive detection of the pretreatment *EGFR* T790M mutation in non-small cell lung cancer patients with an *EGFR*-activating mutation using droplet digital PCR. *Clin Cancer Res* 2015;21(15):3552–60.
40. Lu S, Ding D, Yu Y, Li Z, Niu X. The predictive role of pretreatment epidermal growth factor receptor T790M mutation on the progression-free survival of tyrosine-kinase inhibitor-treated non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2014;7:387.
41. Liu Y, SUN L, XIONG Z-C, et al. Meta-analysis of the impact of de novo and acquired *EGFR* T790M mutations on the prognosis of patients with non-small cell lung cancer receiving *EGFR*-TKIs. *Onco Targets Ther* 2017;Volume 10:2267–79.
42. Fujita Y, Suda K, Kimura H, et al. Highly Sensitive Detection of *EGFR* T790M Mutation Using Colony Hybridization Predicts Favorable Prognosis of Patients with Lung Cancer Harboring Activating *EGFR* Mutation. *J Thorac Oncol* 2012;7(11):1640–4.
43. Oxnard GR, Arcila ME, Chmielecki J, Ladanyi M, Miller VA, Pao W. New Strategies in Overcoming Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(17):5530–7.
44. Matsuo N, Azuma K, Sakai K, et al. Association of *EGFR* Exon 19 Deletion and *EGFR*-TKI Treatment Duration with Frequency of T790M Mutation in *EGFR*-Mutant Lung Cancer Patients. *Sci Rep* 2016;6(1):36458.

45. Xu J, Wang J, Zhang S. Mechanisms of resistance to irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8(52):90557–78.
46. Hong S, Gao F, Fu S, et al. Concomitant genetic alterations with response to treatment and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-Mutant advanced non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol* 2018;4(5):739–42.
47. Jakobsen JN, Santoni-Rugiu E, Grauslund M, Melchior L, Sørensen JB. Concomitant driver mutations in advanced EGFR-mutated nonsmall- cell lung cancer and their impact on erlotinib treatment. *Oncotarget* 2018;9(40):26195–208.
48. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, et al. Preexistence and Clonal Selection of MET Amplification in EGFR Mutant NSCLC. *Cancer Cell* 2010;17(1):77–88.
49. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* (80-) 2007;316(5827):1039–43.
50. Planchard D, Loriot Y, André F, et al. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann Oncol* 2015;26(10):2073–8.
51. Le X, Puri S, Negrao M V., et al. Landscape of EGFR-dependent and -independent resistance mechanisms to osimertinib and continuation therapy beyond progression in EGFR-mutant NSCLC. *Clin Cancer Res* 2018;24(24):6195–203.

52. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 2013;19(8):2240–7.
53. Sequist L V, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3(75):75ra26.
54. Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, Whetton AD. Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments. *Cancer Treat Rev* 2015;41(4):361–75.
55. Del Re M, Vasile E, Falcone A, Danesi R, Petrini I. Molecular analysis of cell-free circulating DNA for the diagnosis of somatic mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2014;14(4):453–68.
56. Garrido P, Olmedo ME, Gómez A, et al. Treating KRAS -mutant NSCLC: Latest evidence and clinical consequences. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2017;
57. Westcott PMK, Halliwill KD, To MD, et al. The mutational landscapes of genetic and chemical models of Kras-driven lung cancer. *Nature* 2015;517(7535):489–92.
58. Vargas AJ, Harris CC. Biomarker development in the precision medicine era: lung cancer as a case study. *Nat Rev Cancer* 2016;16(8):525–37.
59. Wood K, Hensing T, Malik R, Salgia R. Prognostic and Predictive Value in KRAS in Non–Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2016;2(6):805.

60. Slebos RJC, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K- ras Oncogene Activation as a Prognostic Marker in Adenocarcinoma of the Lung. *N Engl J Med* 1990;323(9):561–5.
61. Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P, et al. Pooled Analysis of the Prognostic and Predictive Effects of KRAS Mutation Status and KRAS Mutation Subtype in Early-Stage Resected Non–Small-Cell Lung Cancer in Four Trials of Adjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013;31(17):2173–81.
62. Mellema WW, Dingemans A-MC, Thunnissen E, et al. KRAS Mutations in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated with First-Line Platinum-Based Chemotherapy Have No Predictive Value. *J Thorac Oncol* 2013;8(9):1190–5.
63. Mellema WW, Masen-Poos L, Smit EF, et al. Comparison of clinical outcome after first-line platinum-based chemotherapy in different types of KRAS mutated advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2015;90(2):249–54.
64. Shepherd FA, Lacas B, Le Teuff G, et al. Pooled Analysis of the Prognostic and Predictive Effects of TP53 Comutation Status Combined With KRAS or EGFR Mutation in Early-Stage Resected Non–Small-Cell Lung Cancer in Four Trials of Adjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol* 2017;35(18):2018–27.
65. Arbour KC, Jordan E, Kim HR, et al. Effects of Co-occurring Genomic Alterations on Outcomes in Patients with KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2018;24(2):334–40.
66. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, et al. STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov* 2018;CD-18-0099.

67. Zer A, Ding K, Lee SM, et al. Pooled analysis of the prognostic and predictive value of KRAS mutation status and mutation subtype in patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. In: *Journal of Thoracic Oncology*. 2016.
68. Blumenschein GR, Smit EF, Planchard D, et al. A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* 2015;26(5):894–901.
69. Jänne PA, van den Heuvel MM, Barlesi F, et al. Selumetinib Plus Docetaxel Compared With Docetaxel Alone and Progression-Free Survival in Patients With KRAS -Mutant Advanced Non–Small Cell Lung Cancer. *JAMA* 2017;317(18):1844.
70. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, et al. KrAsG12C inhibition with sotorasib in advanced solid tumors. *N Engl J Med* 2020;383(13):1207–17.
71. Jänne PA, Rybkin I., Spira A, et al. KRYSTAL-1: Activity and Safety of Adagrasib (MRTX849) in Advanced/Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Harboring KRAS G12C Mutation. In: *EORTC-NCI-AACR Symposium*. 2020.
72. Greaves M. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discov*. 2015;
73. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017;
74. Huxley J. Biological aspects of cancer. *Am J Med Sci* 1959;238(2):256.

75. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883–92.
76. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013;339(6127):1546–58
77. Gerlinger M, Quezada SA, Peggs KS, et al. Ultra-deep T cell receptor sequencing reveals the complexity and intratumour heterogeneity of T cell clones in renal cell carcinomas. *J Pathol* 2013;231(4):424–32.
78. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 2010;467(7319):1114–7.
79. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008:1807–12.
80. Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* (80-) 2014;346(6206):256–9.
81. Casadevall D, Gimeno J, Clavé S, et al. MET expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC). *Oncotarget* 2015;6(18):16215–26.
82. Casadevall D, Clavé S, Taus Á, et al. Heterogeneity of Tumor and Immune Cell PD-L1 Expression and Lymphocyte Counts in Surgical NSCLC Samples. *Clin Lung Cancer* 2017;18(6).

-
83. Kim EY, Cho EN, Park HS, et al. Genetic heterogeneity of actionable genes between primary and metastatic tumor in lung adenocarcinoma. *BMC Cancer* 2016;16(1):1–9.
 84. Gainor JF, Shaw AT. Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3987–96.
 85. Marte B. Tumour heterogeneity. *Nature* 2013;501(7467):327.
 86. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013;501(7467):338–45.
 87. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 2013;501(7467):328–37.
 88. Klein CA. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* 2013;501(7467):365–72.
 89. Hata A, Katakami N, Yoshioka H, et al. Spatiotemporal T790M heterogeneity in individual patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer after acquired resistance to EGFR-TKI. *J Thorac Oncol* 2015;
 90. Husain H, Melnikova VO, Kosco K, et al. Monitoring daily dynamics of early tumor response to targeted therapy by detecting circulating tumor DNA in urine. *Clin Cancer Res* 2017;
 91. Jiang BY, Li YS, Guo WB, et al. Detection of driver and resistance mutations in leptomeningeal metastases of NSCLC by next-generation sequencing of cerebrospinal fluid circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 2017;

92. Wei F, Lin CC, Joon A, et al. Noninvasive saliva-based EGFR gene mutation detection in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;
93. Wang Y, Liu Z, Yin H, et al. Improved detection of EGFR mutations in the tumor cells enriched from the malignant pleural effusion of non-small cell lung cancer patient. *Gene* 2018;
94. Reck M, Hermes A, Tan E-H, Felip E, Klughammer B, Baselga J. Tissue sampling in lung cancer: a review in light of the MERIT experience. *Lung Cancer* 2011;74(1):1–6.
95. Fukuoka M, Wu Y-L, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011;29(21):2866–74.
96. Tsao M-S, Sakurada A, Cutz J-C, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005;353(2):133–44.
97. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(31):5034–42.
98. Douillard J-Y, Shepherd FA, Hirsh V, et al. Molecular Predictors of Outcome With Gefitinib and Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer: Data From the Randomized Phase III INTEREST Trial. *J Clin Oncol* 2009;28(5):744–52.
99. Brugger W, Triller N, Blasinska-Morawiec M, et al. Prospective molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(31):4113–20.

100. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol* 2008;26(6):983–94.
101. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, et al. Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol* 2013;31(1):17–22.
102. Uozu S, Imaizumi K, Yamaguchi T, et al. Feasibility of tissue re-biopsy in non-small cell lung cancers resistant to previous epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapies. *BMC Pulm Med* 2017;
103. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, et al. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017;NEJMoa1616288.
104. Passiglia F, Rizzo S, Rolfo C, et al. Metastatic Site Location Influences the Diagnostic Accuracy of ctDNA EGFR- Mutation Testing in NSCLC Patients: a Pooled Analysis. *Curr Cancer Drug Targets* 2018;
105. Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497(7447):108–12.
106. Diaz LA, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486(7404):537–40.
107. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014;32(6):579–86.
108. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti G V., et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *J. Thorac. Oncol.* 2018;

109. Sacher AG, Komatsubara KM, Oxnard GR. Application of plasma genotyping technologies in non-small cell lung cancer: a practical review. *J Thorac Oncol* 2017;
110. Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, et al. False-positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis. *Clin Cancer Res* 2018;
111. Remon J, García-Campelo R, de Álava E, et al. Liquid biopsy in oncology : a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol* 2019;(Ici).
112. Scilla KA, Rolfo C. The Role of Circulating Tumor DNA in Lung Cancer: Mutational Analysis, Diagnosis, and Surveillance Now and into the Future. *Curr Treat Options Oncol* 2019;
113. Taly V, Pekin D, Benhaim L, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 2013;59(12):1722–31.
114. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013;368(13):1199–209.
115. Delgado PO, Alves BCA, Gehrke F de S, et al. Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumour Biol* 2013;34(2):983–6.
116. No JH, Kim K, Park KH, Kim Y-B. Cell-free DNA level as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* 2012;32(8):3467–71.
117. Park J-L, Kim HJ, Choi BY, et al. Quantitative analysis of cell-free DNA in the plasma of gastric cancer patients. *Oncol Lett* 2012;3(4):921–6.

118. Salvianti F, Pinzani P, Verderio P, et al. Multiparametric analysis of cell-free DNA in melanoma patients. *PLoS One* 2012;7(11):e49843.
119. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142(3-4):241-3.
120. Lo YMD, Chiu RWK. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012;13:285-306.
121. Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med* 2011;17(4):510-3.
122. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(42):16266-71.
123. Tovbin D, Novack V, Wiessman MP, Abd Elkadir A, Zlotnik M, Douvdevani A. Circulating cell-free DNA in hemodialysis patients predicts mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27(10):3929-35.
124. Antonatos D, Patsilinos S, Spanodimos S, Korkonikitas P, Tsigas D. Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:278-81.
125. Macher H, Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, et al. Role of early cell-free DNA levels decrease as a predictive marker of fatal outcome after severe traumatic brain injury. *Clin Chim Acta* 2012;414:12-7.

126. Tsai N-W, Lin T-K, Chen S-D, et al. The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta* 2011;412(5–6):476–9.
127. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14(9):985–90.
128. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(45):16368–73.
129. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic *KRAS* mutations. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(18):1284–5.
130. Daniotti M, Vallacchi V, Rivoltini L, et al. Detection of mutated *BRAFV600E* variant in circulating DNA of stage III-IV melanoma patients. *Int J Cancer* 2007;120(11):2439–44.
131. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(13):3915–21.
132. Shinozaki M, O’Day SJ, Kitago M, et al. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007;13(7):2068–74.
133. Morgan SR, Whiteley J, Donald E, et al. Comparison of *KRAS* Mutation Assessment in Tumor DNA and Circulating Free DNA in Plasma and Serum Samples. *Clin Med Insights Pathol* 2012;5:15–22.
134. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(16):9236–41.

135. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(15):8817–22.
136. Liu Q, Sommer SS. Pyrophosphorolysis-activated polymerization (PAP): application to allele-specific amplification. *Biotechniques* 2000;29(5):1072–6, 1078, 1080 passim.
137. Papadopoulou E, Tsoulos N, Tsantikidi K, et al. Clinical feasibility of NGS liquid biopsy analysis in NSCLC patients. *PLoS One* 2019;14(12):e0226853.
138. Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* 1999;17(8):804–7.
139. Ugozzoli LA, Latorra D, Puckett R, Pucket R, Arar K, Hamby K. Real-time genotyping with oligonucleotide probes containing locked nucleic acids. *Anal Biochem* 2004;324(1):143–52.
140. Dong L, Meng Y, Sui Z, Wang J, Wu L, Fu B. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Sci Rep* 2015;5:13174.
141. Quail M, Smith ME, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 2012;13(1):341.
142. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins CC. Cell-free DNA (cfDNA): clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. *Mol Cancer Res* 2016;14(778):molcanres.0044.2016.

143. Mok T, Wu Y-L, Lee JS, 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(14):3196–203.
144. Weber B, Meldgaard P, Hager H, et al. Detection of EGFR mutations in plasma and biopsies from non-small cell lung cancer patients by allele-specific PCR assays. *BMC Cancer* 2014;14:294.
145. Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, et al. Association of *EGFR* L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA Oncol* 2015;1(2):149.
146. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, et al. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2016;2(8):1014–22.
147. Lee JY, Qing X, Xiumin W, et al. Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02). *Oncotarget* 2016;7(6):6984–93.
148. 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(28):3375–82.
149. 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(3):509–15.

150. Jenkins S, Yang JCH, Ramalingam SS, et al. Plasma ctDNA Analysis for Detection of the EGFR T790M Mutation in Patients with Advanced Non–Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2017;
151. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011;17(24):7808–15.
152. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, et al. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next-generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res* 2016;
153. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, 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;
154. Schwaederlé MC, Patel SP, Husain H, et al. Utility of genomic assessment of blood-derived circulating tumor DNA (ctDNA) in patients with advanced lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2017;
155. Malapelle U, Mayo De-Las-Casas C, Rocco D, et al. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br J Cancer* 2017;
156. Zhou C, Wang M, Cheng Y, et al. 1331P. Detection of EGFR T790M in Asia-Pacific patients (pts) with EGFRmutation-positive advanced non-small cell lung cancer (NSCLC):Circulating tumour (ct) DNA analysis across 3 platforms. *Ann Oncol* 2017;28(mdx380.033-mdx380.033).

157. Thress KS, Markovets A, Barrett JC, et al. Complete clearance of plasma EGFR mutations as a predictor of outcome on osimertinib in the AURA trial. *J Clin Oncol* 2017;
158. Remon J, Menis J, Hasan B, et al. The APPLE Trial: Feasibility and Activity of AZD9291 (Osimertinib) Treatment on Positive PLasma T790M in EGFR-mutant NSCLC Patients. EORTC 1613. *Clin Lung Cancer* 2017;
159. Gibert J, Clavé S, Hardy-Werbin M, et al. Concomitant genomic alterations in KRAS mutant advanced lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2020;140:42–5.
160. Gautschi O, Huegli B, Ziegler A, et al. Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer Lett* 2007;254(2):265–73.
161. Nygaard AD, Garm Spindler K-L, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013;79(3):312–7.
162. Dowler Nygaard A, Spindler K-LG, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. Levels of cell-free DNA and plasma KRAS during treatment of advanced NSCLC. *Oncol Rep* 2014;31(2):969–74.
163. Ai B, Liu H, Huang Y, Peng P. Circulating cell-free DNA as a prognostic and predictive biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2016;7(28):44583–95.
164. Guibert N, Mazieres J, Delaunay M, et al. Monitoring of KRAS-mutated ctDNA to discriminate pseudo-progression from true progression during anti-PD-1 treatment of lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2017;8(23):38056–60.

165. Guibert N, Pradines A, Farella M, et al. Monitoring KRAS mutations in circulating DNA and tumor cells using digital droplet PCR during treatment of KRAS-mutated lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2016;
166. Garzón M, Villatoro S, Teixidó C, et al. KRAS mutations in the circulating free DNA (cfDNA) of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Transl Lung Cancer Res* 2016;5(5):511–6.
167. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, et al. Noninvasive detection of response and resistance in egfrmutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 2014;
168. Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, 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;
169. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17(6):1471–4.
170. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, 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;11(1):39–51.
171. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45(2):228–47.
172. Camacho L, Taus Á, Piquer G, et al. Digital PCR Assessment for EGFR mutation detection in non-small cell lung cancer patients. *Eur Hum Genet Conf* 2016;

173. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin. Chim. Acta.* 2015;450:243–53.
174. Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL, et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat Med* 2016;22(3):262–9.
175. Iwama E, Sakai K, Azuma K, et al. Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for EGFR activating mutations. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2017;28(1):136–41.
176. 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(10):1437–43.
177. Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2014;4:6269.
178. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2017;28(6):1325–32.
179. Grasselli J, Elez E, Caratù G, et al. Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2017;28(6):1294–301.

180. García-Foncillas J, Tabernero J, Élez E, et al. Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2018;119(12):1464–70.
181. Van Emburgh BO, Arena S, Siravegna G, et al. Acquired RAS or EGFR mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nat Commun* 2016;7:13665.
182. Gonzalez-Cao M, Mayo de Las Casas C, Jordana Ariza N, et al. Early evolution of BRAFV600 status in the blood of melanoma patients correlates with clinical outcome and identifies patients refractory to therapy. *Melanoma Res* 2018;28(3):195–203.

10. ANEXO 1

Financiación

Los trabajos que componen esta tesis han recibido financiación de manera directa o a través de colaboraciones.

Para trabajo de mutaciones *EGFR* contamos con la colaboración de Sysmex Inostics, que realizó la determinación de mutaciones de *EGFR* en plasma mediante BEAMing; y de Boehringer-Ingelheim, que proporcionó el soporte de un reactor de textos médicos.

El trabajo de mutaciones de *KRAS* fue financiado a través de las siguientes becas: *Fundació La Marató de TV3* (666/C/2013); ISCiii/FEDER (CIBERONC CB16/12/00241, RD12/0036/0051, PIE15/00008, PI15/00146, PI16/00591, PI13/00140); *Xarxa de Bancs de Tumors* (XBTC); *Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca* (AGAUR), *Generalitat de Catalunya* (2017SGR507); y *Fundació Cellex*.

Ninguno de los patrocinadores tuvo algún papel en el diseño del estudio; recopilación, análisis ni interpretación de los datos; ni en la decisión de enviar los artículos para su publicación.





UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona