

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster Universitario Biotecnología Clínica



IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN PACIENTES CON LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA B GRANDE A PARTIR DE BIOPSIAS SÓLIDAS Y LÍQUIDAS

Autor: Diana García Ramírez

Tutor: Margarita Sánchez-Beato Gómez

Villaviciosa de Odón, 17 de julio de 2025

AGRADECIMIENTOS

A Margarita, por darme la oportunidad de trabajar en un equipo tan increíble y profesional con tanta dedicación por la ciencia.

Sara, Sagra, Maria, Marta, Celia, Marina y Davide, esta experiencia habría sido completamente diferente sin vosotras. Gracias por la paciencia, ayuda y sobretodo el apoyo desde el minuto uno.

A mi madre, por estar a mi lado en cada una de las etapas de mi vida. Gracias por tu amor, tú capacidad de afrontar la vida con fuerza, dignidad y generosidad, incluso en los momentos más difíciles. Con tu ejemplo, me has enseñado a ser fuerte, a no rendirme y luchar por lo que quiero. Este logro también es tuyo.

A mis hermanas, Valeria y Ainoa, por quererme, acompañarme en todo momento y por hacerme sentir que nunca estoy sola. La alegría con la que afrontáis la vida y el amor que dais me hace sentir tremendamente orgullosa de vosotras. Siempre a vuestro lado, para lo que sea.

A mi abuela, por siempre creer en mí.

A Carla, mi fiel compañera desde el primer día de carrera. Estos 6 años no habrían sido los mismos si no te hubiese tenido a mi lado. Por todo lo que nos queda por vivir.

Y a ti John, por darme la mano desde el día uno y no soltarme. No sé qué habría sido de mí sin ti. Te quiero.

Gracias.

INDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
1. Neoplasias linfoides.....	6
2. Linfoma No Hodking (LNH).....	6
3. Linfoma difuso de células B grandes (LDCBG)	6
3.1 Clasificación	7
3.1.1 Célula de origen.....	7
3.1.2 Clasificación genética.....	8
4. Biopsia líquida.....	10
OBJETIVOS	11
METODOLOGIA.....	12
1. Preparación de la base de datos con <i>RStudio</i> y <i>GraphPad Prism</i>	12
2. Extracción de ADNlc de muestras de plasma	12
3. Diluciones seriadas	13
4. Preparación de librerías de ADNlc para secuenciación masiva de nueva generación	13
5. Secuenciación masiva.....	15
6. Análisis bioinformático	15
RESULTADOS	16
1. Características y descripción de la cohorte de pacientes LBDCG	16
1.2 Sexo	17
1.3 Tratamiento recibido.....	18
1.4 Célula de origen.....	19
2. Obtención de ADNlc a partir de muestras de plasma.....	19
3. Preparación de las librerías y secuenciación masiva	21
4. Comparativa ADNct de plasma vs ADNg de FFPEt.....	22
5. Cálculo del ADNct	24
6. Clasificación por 2-S de las muestras de pacientes con LDCBG.....	25
7. Análisis de sensibilidad del panel de NGS en biopsia líquida	26
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA	32
ANEXOS.....	36

RESUMEN

El linfoma no Hodgkin (LNH) es un conjunto heterogéneo de neoplasias hematológicas, siendo el linfoma difuso de célula B grande (LDCBG) su subtipo más prevalente. A pesar de los avances en la mejora con inmunoterapia con rituximab, el tratamiento estándar, una parte significativa de pacientes no responden adecuadamente, dando así importancia a la necesidad de buscar estrategias diagnósticas más precisas. En este contexto, la biopsia líquida (BL), basada en el análisis del ADN tumoral circulante (ADNct) presente en el plasma, sobresale como alternativa mínimamente invasiva para la caracterización molecular de los linfomas. Este estudio evaluó la utilidad de la BL como herramienta complementaria a la biopsia sólida (BS) para identificar subtipos genéticos del LDCBG, comparando los resultados obtenidos del ADNct del plasma (BL) con el ADN genómico extraído de muestras de tejido fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPEt, por sus siglas en inglés). Además, se evaluó la sensibilidad de detección de mutaciones somáticas con el procedimiento del laboratorio. Se llevó a cabo el análisis de una cohorte de 51 pacientes con LDCBG y se seleccionaron 8 pacientes con muestras tanto de tejido como de plasma, y se llevó a cabo el análisis de su secuenciación masiva junto con el clasificador genético *Two-Step* (2-S). Los resultados mostraron coincidencias entre el ADNct y ADNg, aunque generalmente el ADNct presentaba frecuencias alélicas más bajas. En casos con mayor carga tumoral, se encontraron mayores coincidencias entre ambas muestras, incluyendo la misma clasificación genética. Además, se encontraron mutaciones exclusivas del ADNct evidenciando su potencial para detectar mutaciones genéticas relevantes. La sensibilidad del método alcanzó una sensibilidad de 10^{-3} , suficiente para el diagnóstico, aunque limitada para detectar la enfermedad mínima residual. Se requiere estudios con cohortes más amplias y con mayor profundidad de secuenciación para consolidar su aplicación clínica.

ABSTRACT

Non-Hodgkin lymphoma (NHL) is a heterogeneous group of hematological neoplasms, with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) being its most prevalent subtype. Despite advances achieved with immunochemotherapy using rituximab, the standard treatment, a substantial proportion of patients do not respond adequately, highlighting the need for more accurate diagnostic strategies. In this context, liquid biopsy (LB), based on the analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) present in plasma, stands out as a minimally invasive alternative for the molecular characterization of lymphomas. This study evaluated the usefulness of LB as a complementary tool to solid biopsy (SB) for the

identification of genetic subtypes in DLBCL. The analysis compared results obtained from plasma ctDNA (LB) with genomic DNA (gDNA) extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples (SB). In addition, the sensitivity of somatic mutation detection using the laboratory's protocol was assessed. A cohort of 51 patients with DLBCL was analyzed, and 8 patients with matched tissue and plasma samples were selected for massive parallel sequencing, combined with the Two-Step (2-S) genetic classifier. The results showed concordance between ctDNA and gDNA, although ctDNA generally showed lower allele frequencies. In cases with higher tumor burden, a greater degree of concordance was observed between both sample types, including the same genetic classifications. Moreover, mutations found exclusive to ctDNA were identified, demonstrating its potential to detect clinically relevant genetic alterations. The method reached a sensitivity of 10^{-3} which is sufficient for diagnostic purposes, although limited in detecting minimal residual disease (MRD). Further studies involving larger cohorts and greater sequencing depth are needed to consolidate its clinical application.

Palabras clave: linfoma no Hodgkin (LNH), linfoma difuso de célula B grande (LDCBG), biopsia líquida (BL), ADN libre circulante (ADNlc), ADN tumoral circulante (ADNct), R-CHOP, NGS, *Two-Step* (2-S).

Clave de abreviaturas:

ABC	Linfoma Difuso de células B activadas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNct	ADN circulante tumoral
ADNlc	ADN libre de células
COO	Célula de origen
CNV	Variaciones del número de copias
EGh/ml	Equivalentes de genoma haploide por mililitro
EMR	Enfermedad mínima residual
FFPEt	Tejido fijado en formol e incluido en parafina
IPI	Índice Pronóstico Internacional
GCB	Linfoma difuso de células B del centro germinal
GOTEL	Grupo Español para el Tratamiento y Estudio de los Linfomas
IDIPHISA	Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana
LDCBG	Linfoma difuso de célula B grande
LDCBG-NOS	Linfoma difuso de célula B grande no especificado
LH	Linfoma de Hodgkin
LNH	Linfoma no Hodgkin
PCR	Rección en cadena de la polimerasa
R-CHOP	Rituximab más ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona
UDI	Índices duales únicos
UMI	Molécula única de identificación
VAF	Frecuencia del alelo variante

INTRODUCCIÓN

1. Neoplasias linfoides

Las neoplasias linfoides representan las formas más comunes de tumores sólidos de origen hematológico y se pueden clasificar en dos tipos principales: el linfoma no Hodgkin (LNH), que representa el 85-90% de los casos, y el linfoma de Hodgkin (LH) que comprende el 10-15% restante (Wang et al., 2020). Estas neoplasias se originan a partir de los linfocitos y tejidos linfoides, y con el paso del tiempo han ido experimentado un aumento significativo en su incidencia (Fitzmaurice et al., 2018). La gran heterogeneidad que caracteriza este tipo de neoplasias ha motivado la creación de distintos sistemas de clasificación, con el objetivo de identificar entidades específicas basándose en criterios clínicos, morfológicos, genéticos y moleculares. Estas clasificaciones son fundamentales para mejorar el diagnóstico de los pacientes (Shankland et al., 2012). Actualmente, se emplean las características físicas tumorales y los datos genéticos para intentar predecir que tratamientos son mejores para cada paciente. Sin embargo, pacientes con linfomas más agresivos, las terapias alternativas suelen basarse en prueba y error, sin tener en cuenta toda la complejidad del tumor (revisado en Yanguas-Casás et al., 2021).

2. Linfoma No Hodgkin (LNH)

El LNH abarca un conjunto heterogéneo de neoplasias con características clínicas y moleculares particulares. El 85-90% tienen su origen en linfocitos B, dentro de los cuales se incluyen el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), el linfoma folicular (LF), el linfoma de la zona marginal y el linfoma del manto, entre otros. EL resto de los casos derivan de linfocitos T o de células NK o *natural killers* (revisado en Fu et al., 2025).

3. Linfoma difuso de células B grandes (LDCBG)

El LDCBG es una neoplasia linfoide maligna, derivada de células B maduras, que se caracteriza por su curso clínico-patológico heterogéneo y una naturaleza relativamente agresiva. Constituye el subtipo más común de LNH en adultos, representando el 30-35 % de los casos (Susanibar-Adaniya & Barta, 2021). El LDCBG-NOS (*not other way specified*) es el subtipo más común dentro de este grupo y no tiene una presentación clínica o patología específica (Alaggio et al., 2022; Campo et al., 2022).

La incorporación de rituximab a la combinación quimioterapéutica estándar compuesto por ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP) ha representado un avance significativo en el tratamiento del LDCBG (Kurtz et al., 2018). Sin embargo,

entre el 30-40% de los pacientes con LDCBG no responden a los tratamientos inmunoterapéuticos convencionales, y las alternativas terapéuticas se basan en ensayo y error, sin tener en cuenta la heterogeneidad clínica y molecular de esta enfermedad. Esto se debe a múltiples causas, entre ellas las alteraciones genéticas y los procesos epigenéticos, como la metilación y desmetilación del ADN, que son responsables de la plasticidad dinámica de las células B y tienen un impacto directo en el comportamiento tumoral. De hecho, muchas de las mutaciones genéticas afectan a genes implicados en el remodelado de la cromatina (como *EZH2*, *CREBBP*, *KMT2D*, entre otros) y en funciones epigenéticas como la metilación del ADN (*TET2*) (Sánchez-Beato et al., 2024).

3.1 Clasificación

El diagnóstico preciso y, por tanto, la clasificación de los linfomas B agresivos es esencial tanto en la práctica clínica, como en el diseño de estrategias terapéuticas personalizadas. Si bien el diagnóstico del linfoma se basa en características clínicas, morfológicas o fenotípicas, el perfil genético ha contribuido a la comprensión actual de linfomas (Fend et al., 2024). En los últimos años, tanto la Clasificación Internacional de Consenso (ICC-022) (Campo et al., 2022) como la quinta edición de la Clasificación de Tumores Hematolinfoides de la Organización Mundial de la Salud (WHO-HAEM5) (Alaggio et al., 2022) han ido reflejando avances en la comprensión genética y molecular de estos linfomas. Las clasificaciones ICC y WHO, clasifican el LDCBG en variantes morfológicas, subtipos moleculares y distintas entidades patológicas. Aquellos casos no clasificados en ninguno de esos grupos, en torno al 80%, se clasifican como LDCBG no especificado (DLBCL-NOS, por sus siglas en inglés) (Alaggio et al., 2022; Campo et al., 2022)

3.1.1 Célula de origen

El LDCBG se puede clasificar en función de sus características morfológicas o por su perfil molecular y genético. Según su célula de origen (COO, por sus siglas en inglés) se han identificado 3 subtipos moleculares distintos: los LDCBG tipo célula B activada (ABC), que imitan a las células B activadas en la sangre periférica; el LDCBG de tipo célula B del centro germinal (GCB), que presentan un patrón similar a las células B del centro germinal; y un tercer grupo no clasificado, heterogéneo y no bien definido, pero con pronóstico similar al ABC (Hans, 2004). El grupo GCB se asocia con una evolución más favorable, mientras que el grupo ABC presenta peor pronóstico. A pesar de esta clasificación, todos los subtipos reciben el mismo tratamiento denominado R-CHOP (Young et al., 2019).

Ciertos estudios han intentado clasificar los casos en dos grupos: GCB y no-GCB, aunque los resultados obtenidos han sido contradictorios. En este contexto Hans evaluó y describió un clasificador usando inmunohistoquímica de los marcadores CD10, BCL-6 y MUM1 (Hans, 2004).

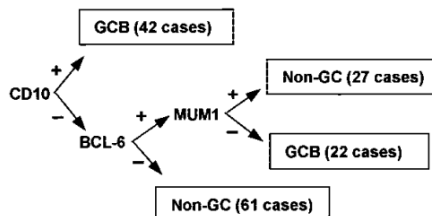


Figura 1: Clasificador de los grupos GCB y no-GCB en función de los marcadores CD10, BCL-6 y MUM1 (Hans, 2004).

3.1.2 Clasificación genética

En los últimos años, se han identificado subtipos genéticos del LDCBG en función de sus alteraciones genéticas específicas. Tres investigaciones (Schmitz et al., 2018; Chapuy et al., 2018; Lacy et al., 2020) de manera independiente clasificaron el LDCBG en seis subtipos genéticos, cada uno con perfiles genéticos característicos.

En primer lugar, se definieron cuatro subtipos (MCD, BN2, N1 y EZB) agrupando datos mutacionales, translocaciones y variaciones del número de copias (CNV) (Schmitz et al., 2018). Posteriormente, con el algoritmo *LymphGene* refinaron esta propuesta incorporando dos subtipos nuevos (ST2 y A53) (Wright et al., 2020).

Dentro de esta clasificación, los subtipos MCD y N1 se asociaron a un peor pronóstico, donde el primero se caracteriza por mutaciones *MYD88L265P* y *CD79B*, mientras que el segundo presenta mutaciones recurrentes en el dominio PEST de *NOTCH1*. Por otro lado, los subtipos BN2 (con fusiones *BCL6* y mutaciones en *NOTCH2*) y el subtipo EZB (con traslocaciones de *BCL2* y mutaciones en *EZH2*), se asocian a un mejor curso clínico (Schmitz et al., 2018). El subtipo ST2, con mutaciones recurrentes en *SGK1* y *TET2*, suelen tener mayor supervivencia global siendo en su mayoría casos GCB. En último lugar, el subtipo A53 presenta aneuploidías y mutaciones y/o deleciones en *TP53*, además de tener un peor pronóstico entre los ABC (Wright et al. 2020).

DLBclass	LymphGen	HMRN	Landmark Alterations	COO Enrichment
C1	BN2	NOTCH2	<i>BCL6</i> SV, <i>NOTCH2</i> , <i>SPEN</i> , <i>CD70</i> , <i>BCL10</i> , <i>TNFAIP3</i>	ABC, unclass
C2	A53	-	Deletic <i>TP53</i> inactivation, aneuploidy	ABC, GCB
C3	EZB EZB-MYC+	<i>BCL2</i> <i>BCL2-MYC</i>	<i>BCL2</i> SV, <i>EZH2</i> , <i>CREBBP</i> , <i>KMT2D</i> , <i>TNFSF14</i>	GCB
C4	ST2	<i>TET2/SGK1</i> <i>SOCS1/SGK1</i>	<i>SGK1</i> , <i>TET2</i> , <i>KLHL6</i> , <i>BRAF</i> <i>SGK1</i> , <i>TET2</i> , <i>SOCS1</i> , <i>CD83</i> , <i>NFKBIA</i> , <i>NFKBIE</i> , <i>STAT3</i>	GCB
C5	MCD	<i>MYD88</i>	<i>MYD88^{L265P}</i> , <i>CD79B</i> , <i>PIM1</i> , <i>TBL1XR1</i> , <i>ETV6</i>	ABC
-	N1	<i>NOTCH1</i>	<i>NOTCH1</i> , <i>IGJ</i>	ABC

Figura 2: Clasificación de los LDCBG según sus mutaciones y la célula origen (Alig et al., 2024).

Además de la anterior clasificación, se encuentra otro estudio donde se combinaron mutaciones, alteraciones somáticas del número de copias y cambios estructurales. Dentro del grupo ABC se identificaron dos subtipos: C1, con un riesgo clínico menor y con traslocaciones en *BCL6* y mutaciones en *NOTCH2* característicos; y C5 con un peor pronóstico y con alteraciones genéticas en *MYD88*, *CD79B* y *PIM1*. Asimismo, se definieron otros dos grupos para GCB, uno con buen pronóstico y caracterizado por mutaciones en *SGK1* (C4) y uno con mal pronóstico y con traslocaciones de *BCL2* y mutaciones en *CREBBP* y *EZH2* (C3). El último subtipo denominado C2, presenta casos tanto ABC como GCB y se asocia con mutaciones de *TP53* (Chapuy et al., 2018).

Otro subtipo de linfoma B agresivo es el linfoma B de alto grado con doble reordenamiento (DH), de *MYC* y *BCL2*. Además, los LDCBG con expresión simultánea de *MYC* y *BCL2*, conocidos como linfomas de doble expresión, tienden a tener un pronóstico más desfavorable en comparación con otros LDCBG, aunque no tan agresivo como los linfomas DH (Alig et al., 2024; Pedrosa et al., 2021). La WHO-HAEM5 reclasificó los casos con reordenamientos de *MYC* y *BCL6* como LDCBG- o LBAG-NOS (Alaggio et al., 2022). Por el contrario, la Clasificación ICC de 2022 mantuvo HGBL-DH-*BCL2* e introdujo HGBL-DH-*BCL6* como entidad provisional (Campo et al., 2022). Diversos estudios han pretendido buscar un método simplificado y aplicable a la clínica para clasificar el LDCBG a partir de datos genómicos. La propuesta *two-step* (2-S) surge como respuesta a la necesidad de identificar perfiles moleculares aplicables en la práctica clínica sin la complejidad de algoritmos como *LymphGen*. El clasificador 2-S define cinco subtipos en función de sus mutaciones y translocaciones en dos pasos. El grupo N1 se caracteriza por la presencia de mutaciones en *NOTCH1*. El subtipo MCD2, con mutaciones en *MYD88*, *CD79B* y *PIM1*, mientras que el grupo BN2 agrupa casos con traslocaciones en *BCL6* o mutaciones en *NOTCH2*, *BCL10* y *TNFAIP3*. El grupo EZB

integra translocaciones de *BCL2* o mutaciones en *BCL2*, *EZH2* y *CREBB*. Por último, el grupo ST2 se caracteriza por mutaciones en *SGK1*, *TET2* y *SOC31*. Para aquellos casos que no se puedan clasificar en esta primera etapa, se pueden complementar considerando mutaciones adicionales asociadas a cada subtipo.

El grupo BN2 puede complementarse con alteraciones en *UBE2A*, *CD70*, *CCND3* y *DTX1*; el subtipo EZB puede también agrupar mutaciones en *TNFRSF14*, *KMT2D*, *IRF8* y *EP300*; y el subtipo ST2 puede complementarse con mutaciones en *STAT3*. Esta clasificación, basada en 26 genes y 2 reordenamientos ha demostrado ser equivalente a la de *LymphGen* y clínicamente aplicable (Pedrosa et al., 2021).

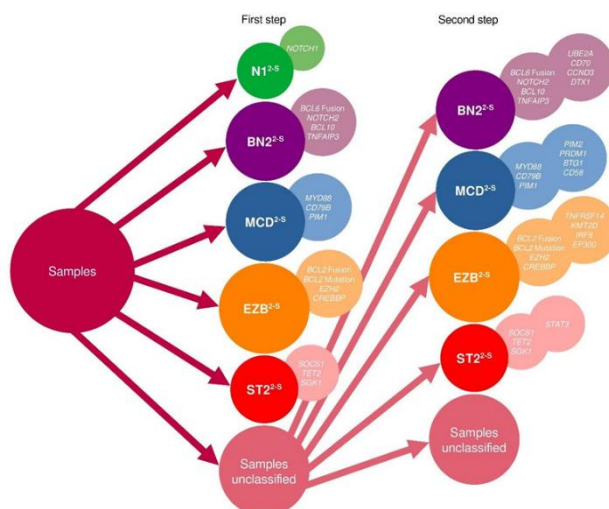


Figura 3: Clasificador two-step (2-S) para asignar el subtipo genético a cada una de las muestras en función de las alteraciones detectadas (Pedrosa et al., 2021).

4. Biopsia líquida

La caracterización genética en linfomas suele realizarse sobre mediante biopsias sólidas (BS) invasivas de tejido. Aunque estas permiten identificar biomarcadores esenciales, presentan limitaciones como la obtención de una zona pequeña localizada del tumor o la dificultad para extraer muestras repetidas para un seguimiento dinámico de la enfermedad. Por todo esto, la biopsia líquida (BL) emerge como una alternativa menos invasiva, capaz de detectar alteraciones moleculares a partir de componentes tumorales circulantes presentes en fluidos corporales (revisado en Talotta et al., 2023).

El ADN libre circulante (ADNlc) es ADN que se encuentra libre en el torrente sanguíneo y otros fluidos corporales. Hace referencia a pequeños fragmentos de ADN (entre 70-200 pares de bases) que se libera como resultado de procesos de apoptosis (muerte celular programada) o necrosis (muerte celular por daño). Estos fragmentos se han detectado en sangre, orina, saliva y otros fluidos biológicos y varían en función de las condiciones

fisiológicas y patológicas, lo cual lo convierte en un biomarcador de gran interés (Fu et al., 2025).

El ADN tumoral circulante (ADNct), es el ADNlc proveniente de células tumorales (Siravegna et al., 2019). Este es liberado al torrente sanguíneo como consecuencia de la apoptosis y necrosis de las células tumorales, lo que hace que compartan las mismas alteraciones moleculares del tumor de origen, destacando así su utilidad para estudiar las características del cáncer sin la realización de una biopsia excisional (Diaz & Bardelli, 2014).

En los últimos años, el análisis del ADNlc, ha ganado bastante relevancia como método no invasivo para monitorizar diferentes neoplasias como cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer colorrectal (Fu et al., 2025). En particular, la detección de ADNct ha permitido estimar la carga tumoral y evaluar la enfermedad mínima residual (EMR). La EMR hace referencia al reducido número de células malignas que quedan tras la finalización del tratamiento, tras una respuesta completa sin signos ni síntomas evidentes de la enfermedad. A pesar de los protocolos actuales, la extinción completa de la enfermedad es poco frecuente, lo que conlleva a una alta probabilidad de recaída (Hauwel & Matthes, 2014).

La secuenciación masiva aplicada al ADNlc ha demostrado ser eficaz para la identificación de alteraciones genéticas y reordenamientos en linfomas, y otras enfermedades hematológicas. Además, se asocia con un peor pronóstico cuando se encuentra en niveles altos de concentración lo que respalda su utilidad como herramienta complementaria para el monitoreo de la enfermedad (Fernández-Miranda et al., 2023).

OBJETIVOS

Partiendo de la hipótesis de que la BL puede suplir o completar la biopsia sólida, el objetivo general del estudio es:

- Validar el uso de la BL, concretamente el ADNct, para determinar el subtipo genético del LDCBG.

Para llegar a este objetivo general se proponen los siguientes objetivos secundarios:

- Determinar las características generales de la serie de casos de LDCBG de estudio. Para ello se realizará un análisis descriptivo de las características clínicas de los pacientes para determinar una serie representativa de las características generales de los pacientes con LDCBG.

- Comparar la capacidad de detectar mutaciones en el ADNct con respecto a su biopsia pareada. Se seleccionará una serie de muestras pareadas de biopsia diagnóstica (BS) y de plasma (BL) para realizar un estudio comparativo de detección de mutaciones somáticas de ADN genómico (ADNg), de muestras de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPEt, por sus siglas en inglés), y ADNlc en BL.
- Determinar la sensibilidad de detección de mutaciones somáticas en el ADNct. Se realizará un análisis de dilución seriada para determinar la sensibilidad de detección de mutaciones del ADNlc del panel NGS usado en el estudio.

METODOLOGIA

1. Preparación de la base de datos con *RStudio* y *GraphPad Prism*.

Se construyó una base de datos con ayuda del programa *RStudio*, donde se emparejó información clínica de muestras de BS (FFPEt) y BL (plasma) de pacientes diagnosticados con LDCBG. Se partió de una base de datos del Grupo Español para el Tratamiento y Estudio de los Linfomas (GOTEL) de 198 casos de pacientes con LDCBG del laboratorio de Linfomas y se acotaron las siguientes variables clínicas: edad al diagnóstico, sexo, tratamiento (incluyendo solo pacientes tratados con R-CHOP o derivados), estadio del tumor, progresión de la enfermedad, respuesta al tratamiento, antecedentes oncológicos, estado del paciente, la COO (según Hans) y los reordenamientos genéticos. Los pacientes incluidos debían tener biopsia al diagnóstico o previa al tratamiento. Resultó en una cohorte final de 51 pacientes, donde se seleccionaron aquellas muestras de biopsia líquida cuya biopsia sólida había sido ya secuenciada por el Grupo de Linfomas de IDIPHISA, asegurando así la disponibilidad de datos para comparar ambos resultados.

Se realizó el análisis de las distintas variables con ayuda del programa *GraphPad Prism* para comparar la cohorte final y ver la significancia relativa entre ellas.

De la cohorte de 51 pacientes, se seleccionaron 9 pacientes con mutaciones ya analizadas en la biopsia diagnóstica. Por otro lado, se seleccionaron otros 3 pacientes de la base de datos, con las variaciones genéticas ya analizadas tanto en FFPEt como en BL.

2. Extracción de ADNlc de muestras de plasma

Se obtuvo el ADNlc del plasma de los 9 pacientes con LDCBG, todas recogidas antes del tratamiento. Se aisló también ADNlc de 26 muestras de plasma de donante sano cedidas por el Biobanco del IDIPHISA.

Se utilizó el kit *QIAmp® Circulating Nucleic Acid* (QUIAGEN®) usando el sistema de vacío *QIAvac Vacuum Systems* (QUIAGEN®), que permite que las muestras se filtren correctamente y el ADNlc permanezca intacto. Posteriormente, la cuantificación del ADNlc se llevó a cabo con la maquinaria *Qubit Assay* (Thermo Fisher Scientific) con el kit *Qubit™ 1X dsDNA HS Assay* y su calidad fue evaluada con el kit *Cell-free DNA ScreenTape Assay for TapeStation Systems* (Agilent). Se preparó una mezcla o *pool* del ADNlc de las 26 muestras de plasma sano, de la cual también se midió su calidad y concentración. Se seleccionaron las cinco muestras de pacientes con LDCBG con cantidad suficiente para secuenciarse individualmente y en las diluciones seriadas. Se necesitó evaporar las muestras de ADNlc para concentrarlas a la concentración mínima necesaria (2 ng/ul) y se hizo mediante un sistema de evaporación con la máquina *Automatic Environmental SpeedVac with VaporNet* (Savant), siguiendo el protocolo del laboratorio.

3. Diluciones seriadas

Una vez se extrajo el ADNlc del plasma de donantes sanos (grupo control) y de los pacientes diagnosticados con LDCBG, se procedió a realizar una serie de diluciones seriadas con el objetivo de determinar la sensibilidad de la secuenciación y averiguar que frecuencia alélica mínima de las mutaciones se podían detectar. De cada una de las 5 muestras de plasma de pacientes con LDCBG, se separó 6ng/muestra haciendo un *pool* con un total de 30ng de ADNlc. Este *pool* se mezcló con 30ng totales de ADNlc de los controles sanos (Nx). A partir de este *pool* se prepararon las diluciones seriadas de acuerdo con el siguiente esquema:

- D₁ 1:10 a 6 ng de cada ADNlc (30 ng totales) + 30 ng de ADNlc Nx
- D₂ 1:100 a 6 ng D₁ + 54 ng Nx
- D₃ 1:1.000 a 6 ng D₂ + 54 ng Nx
- D₄ 1:10.000 a 6 ng D₃ + 54 ng Nx
- D₅ 1:100.000 a 6 ng D₄ + 54 ng Nx

4. Preparación de librerías de ADNlc para secuenciación masiva de nueva generación

Para la preparación de las librerías, se siguió el protocolo del *Twist Library Preparation kit with amp mix, mechanical fragmentation* junto con el *Twist Custom Panel* (Twist Bioscience) que se divide en varias partes.

En primer lugar, se preparó una mezcla de reactivos *End Repair and dA-Tailing* (ERA) proporcionados por el kit, que reparó los extremos de las muestras y añadió la cola poliA (dA). Posteriormente las muestras se incubaron durante 30 minutos a 20 °C y otros 30 minutos a 65 °C, en un termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez reparado se procedió a la ligación de los adaptadores *Unique Molecular Identifiers* (UMIs) a los fragmentos de ADN para poder distinguir entre copias originales y duplicados generados en la PCR posterior. Se añadieron los reactivos proporcionados del kit y se incubaron las muestras en el termociclador 15 minutos a 20°C, según el protocolo.

Tras la ligación y purificación de las muestras con bolas magnéticas, se agregó los *Unique Dual Index Primer pair* (UDI) para identificar cada muestra, el reactivo *Kapa HiFi Ready Mix* para amplificar el ADN y se hizo una PCR con 8 ciclos. Finalizada la amplificación, se volvió a purificar y se procedió a analizar la concentración y calidad de las mismas. Esto se llevó a cabo con el equipo *Qubit Assay* (Thermo Fisher Scientific) con el *Qubit™ IX dsDNA HS Assay kit* y con el *Cell-free DNA ScreenTape Assay for TapeStation Systems kit* (Agilent). Para los análisis posteriores, las muestras debían cumplir las siguientes condiciones: concentración mínima de 10 ng/ul y tamaño medio de fragmentos de 200-250 pb.

Par continuar con la preparación de las librerías y teniendo en cuenta las condiciones posteriores de secuenciación de cada tipo de muestra, se prepararon los siguientes *pools*:

- **Pool 1** con las 5 muestras de los pacientes. Estas muestras se secuenciarían a una profundidad final (Pf) de 10.000X/muestra.
- **Pool 2** con el control sano y la D₅, a una Pf de 100.000X/muestra.
- **Pool 3** compuesto por las diluciones D₁-D₄, a una Pf de 10.000X/muestra.

Una vez preparados, se calculó la cantidad de cada librería por *pool* necesaria y se purificó con bolas magnéticas. Se añadió el reactivo *Hybridization Mix*, proporcionado por el kit, que permitió la hibridación con las sondas específicas de los genes de interés. Una vez tenemos el *pool*, con las bolas magnéticas y el *mix*, se procedió con la hibridación de las sondas de captura, junto con un *Hybridization Enhancer* y se incubaron en el termociclador a 70 °C durante 16 horas.

Las sondas de captura, biotiniladas, se capturaron con bolas de estreptavidina, que son afines a este tipo de moléculas. La mezcla completa se incubó en un termobloque y se lavaron las bolas con los reactivos proporcionados por el fabricante.

Posteriormente, se realizó una PCR post-captura y una purificación final, se transfirió un total de 30 ul del sobrenadante con la librería final a un tubo nuevo sin bolas magnéticas. Se realizó el control de calidad de las de las librerías de ADNlc, con el equipo *TapeStation 4150* con el *Cell-free DNA ScreenTape Assay for TapeStation Systems kit* (Agilent); y la concentración se midió con el *Qubit™ 1X dsDNA HS Assay kit* (Thermo Fisher Scientific).

5. Secuenciación masiva

Las librerías de ADNlc se enviaron a un proveedor externo de servicios de secuenciación para secuenciar en la plataforma *NovaSeq* de *Illumina*. El panel de genes utilizado para la secuenciación se describe en el **Anexo 1**.

6. Análisis bioinformático

El análisis bioinformático lo realizó el personal bioinformático del Grupo de Linfomas (Marina Pérez).

Se llevó a cabo a partir de los archivos FASTQ proporcionados por el proveedor externo de servicios de secuenciación. Las lecturas procesadas se alinearon con el genoma de referencia humano GRCh38/hg38, generando archivos BAM ordenados e indexados. Se realizó una llamada de variantes de los alineamientos con *Mutect2* para detectar las variantes respecto al genoma de referencia. Por último, se llevó a cabo la anotación con *AnnoVar*.

En el análisis final se incluyeron 8 muestras: las 5 muestras secuenciadas, junto con las 3 secuenciadas anteriormente por el laboratorio de Linfomas del IDIPHISA.

Para el análisis de los resultados se llevó a cabo un filtrado de las variantes aplicando los siguientes criterios:

- Frecuencia alélica (VAF) mínima del 1%.
- Cobertura superior o igual a 1.000 lecturas.
- Variantes en regiones codificantes (exones) o de splicing.
- Filtro de *Mutect2*: *germline*, *PASS*, *clustered events*, *haplotype* y *multiallelic* o combinaciones de estas.
- Frecuencia de la variante en la población inferior al 1%.

Se visualizaron y validaron las variantes obtenidas utilizando la herramienta *Integrative Genomics Viewer* o IGV (Broad Institute, UC San Diego, San Diego, CA, EE. UU).

La búsqueda de alteraciones tumorales encontradas a partir del ADNlc se llevó a cabo tomando como referencia aquellas alteraciones genéticas identificadas en el ADNg de las biopsias de tejido diagnóstico.

Se llevó a cabo la identificación del subtipo genético del ADNlc, mediante el clasificador 2-S (Pedrosa et al., 2021) y se comparó con el subtipo genético del ADNg. Esto se llevó a cabo en la página: <https://github.com/Lymphoma-IDIPHISA/Two-step-classifier>, diseñada para clasificar genéticamente los LDCBG.

RESULTADOS

1. Características y descripción de la cohorte de pacientes LBDCG

A partir de la base general de LDCBG del Grupo de Investigación en Linofmas de IDIPHISA, se seleccionó una cohorte de estudio. Una vez filtrada la base de datos con *RStudio*, Se analizaron 12 variables clínicas de 51 pacientes con LDCBG con biopsia diagnóstica y de plasma al diagnóstico o previa al tratamiento. Se recoge un resumen de las características de los pacientes en la Tabla 1. Los datos clínicos de la cohorte de los 8 pacientes seleccionados para el estudio piloto se recogen en el **Anexo 2**.

Se analizaron las siguientes variables con el programa *GraphPad Prism*: edad, sexo, tratamiento empleado, progresión de la enfermedad, IPI, COO (de acuerdo con el algoritmo de Hans), respuesta al tratamiento y estado del paciente. Se realizó la prueba χ^2 para buscar la significancia, ninguna de ellas mostró un p-valor < 0,05, debido, probablemente al bajo número de pacientes incluidos en la cohorte.

Variable clínica	N	Categoría	N	Porcentaje (%)
Sexo	51	Mujer	24	47,1
		Hombre	27	52,9
Edad	51	≥ 60	32	62,7
		< 60	18	35,3
Estado del paciente	51	Vivo con enfermedad	2	3,9
		Vivo sin enfermedad	32	62,7
		Fallecido	15	29,4
Tratamiento	51	Otros	7	13,7
		R-CHOP	39	76,5
		R-COMP	3	5,9
		R-CVP	2	3,9
		Alto	8	15,7
IPI	51	Bajo	13	25,5
		Bajo-Intermedio	15	29,4
		Intermedio-Alto	11	21,6
		I	3	5,9
Estadio tumoral	51	II	18	35,3
		III	15	29,4
		IV	12	23,5
		Desconocido	3	5,9
		Fin del tratamiento	37	86,0
Respuesta al tratamiento	51	Recaída	3	7,0
		Revisión a los 6 meses de fin de tratamiento	2	4,7
		Tercer Ciclo de tratamiento	1	2,3
Progresión de la enfermedad	51	Sí	10	19,6
		No	38	74,5
		Desconocido	3	5,9
Antecedentes oncológicos	51	Sí	7	13,7
		No	39	76,5
		Desconocido	5	9,8
COO (Hans)	51	no-GCB	19	52,8
		GCB	17	47,2
		Desconocido	15	41,7
FISH	51	Reordenamiento de <i>MYC</i>	1	2,0
		Reordenamiento de <i>BCL2</i>	6	11,8
		Reordenamiento de <i>BCL6</i>	5	9,8

Tabla 1: Análisis descriptivo de la cohorte. Se incluyen datos de Índice Pronóstico Internacional (IPI), clasificación de la célula de origen (COO) según el algoritmo de Hans, presencia de reordenamientos genéticos de *MYC*, *BCL2*, y *BCL6*. Se muestra el número de pacientes (N), y el porcentaje relativo.

1.1 Edad

Primero se analizó si alguna variable clínica estaba relacionada con la edad al diagnóstico de los pacientes, divididos en dos grupos con punto de corte en 60 años (Figura 4). Se analizaron los grupos en función de la progresión del tumor (Figura 4A), el estado del paciente (Figura 4B) y la respuesta al tratamiento (Figura 4C). Se observó más pacientes con progresión de la enfermedad en el grupo de edad mayor o igual a 60. Se observó una mayor proporción de pacientes fallecidos en pacientes mayor o igual a 60 años. Ninguna resultó significativa.

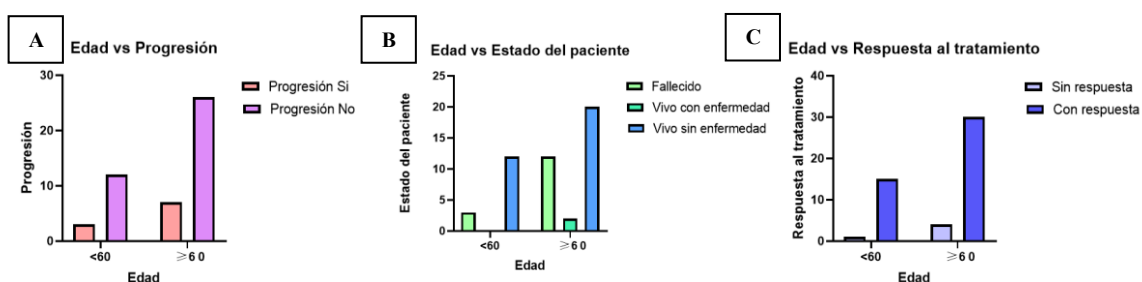


Figura 4: Distribución de la cohorte filtrada con 51 pacientes con LDCBG según el sexo en relación con cuatro parámetros clínicos: progresión tumoral (A), estado del paciente (B) y respuesta al tratamiento (C).

1.2 Sexo

Posteriormente, se analizó si el sexo de los pacientes estaba relacionado con la progresión del tumor (Figura 5A), el estado el paciente (Figura 5B), la respuesta al tratamiento (Figura 5C) y el IPI (Figura 5D). Los resultados muestran que, aunque existan diferencias en la distribución de los parámetros según el sexo, no parecen ser significativas. En cuanto a la progresión tumoral (Figura 5A), se observa una ligera proporción mayor de hombres con progresión respecto a las mujeres. El estado de los pacientes (Figura 5B), la mayoría de los casos en ambos sexos permanecen vivos sin enfermedad, siendo ligeramente mayor en hombres. Si es cierto que, en este caso, la mortalidad es ligeramente superior en hombres que en mujeres. Por otro lado, tanto el grupo de hombres como el de mujeres presentaron una respuesta favorable al tratamiento (Figura 5C); mientras que, la distribución del IPI (Figura 5D) hay una mayor proporción de mujeres en la categoría de alto riesgo respecto a los hombres.

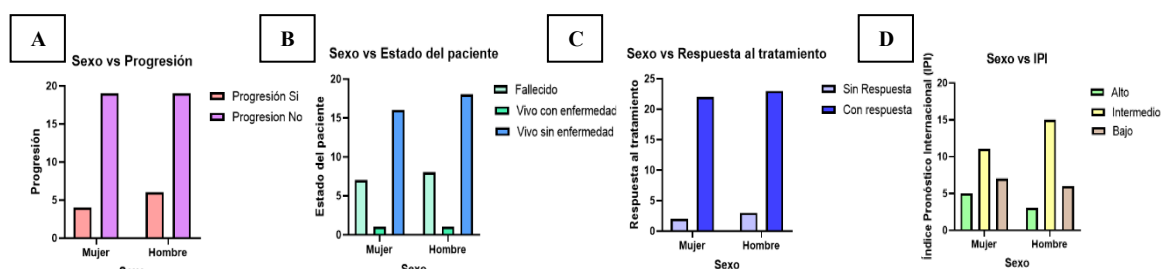


Figura 5: Distribución de la cohorte filtrada con 51 pacientes con LDCBG según el sexo en relación con cuatro parámetros clínicos: progresión tumoral (A), estado del paciente (B), respuesta al tratamiento (C) y el índice de pronóstico internacional IPI (D).

1.3 Tratamiento recibido

Se analizó la influencia del tratamiento administrado en la progresión de la enfermedad (Figura 6A), el estado clínico de los pacientes (Figura 6B), la respuesta al tratamiento (Figura 6C) y el IPI (Figura 6D). En todos los casos, se comparó los resultados entre pacientes tratados con R-CHOP y aquellos que recibieron otro tipo de tratamiento.

En cuanto a la progresión (Figura 6A), tanto los pacientes tratados con R-CHOP como los que recibieron otros, en su mayoría presentaron una ausencia de progresión, siendo esto especialmente notable en el grupo de pacientes que recibieron R-CHOP. El estado clínico del paciente (Figura 6B) fue notablemente mejor en el grupo R-CHOP, con una clara mayoría de pacientes que presentaron un estado “vivo sin enfermedad”. En cuanto a la respuesta al tratamiento (Figura 6C), en el grupo R-CHOP se observó una clara mayoría de pacientes que respondieron positivamente al tratamiento, en comparación con aquellos que recibieron un tratamiento alternativo. Por último, el análisis del IPI (Figura 6D), mostró una mayor proporción de pacientes tratados con R-CHOP con las categorías intermedia y baja, mientras que el grupo de tratamientos distintos a R-CHOP predominó el riesgo intermedio.

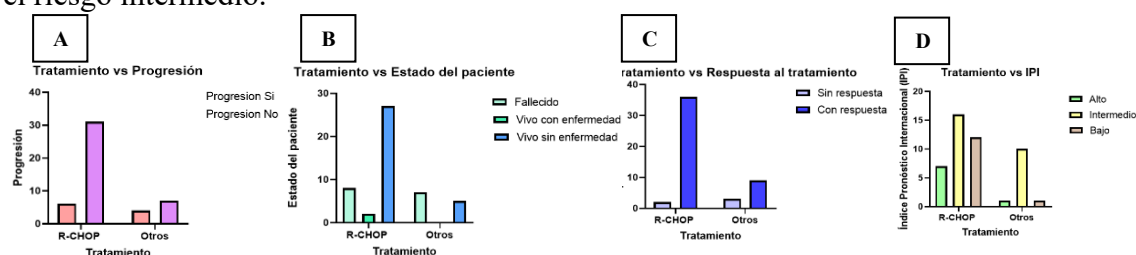


Figura 6: Distribución de la cohorte filtrada con 51 pacientes con LDCBG según el tratamiento recibido, ya sea R-CHOP u otro tratamiento alternativo, en relación con cuatro parámetros clínicos: progresión tumoral (A), estado del paciente (B), respuesta al tratamiento (C) y el índice de pronóstico internacional IPI (D).

1.4 Célula de origen

La influencia del subtipo celular (según el algoritmo de Hans) (Figura 7) se analizó frente a la progresión de la enfermedad (Figura 7A), el estado clínico de los pacientes (Figura 7B), la respuesta al tratamiento (Figura 7C) y el IPI (Figura 7D). Se comparó el grupo clasificado como GCB y el clasificado como no-GCB. Los pacientes no-GCB presentaron una mayor proporción de casos con progresión (Figura 7A) y una mayor proporción de pacientes “vivos sin enfermedad” (Figura 7B) respecto al grupo GCB. En cuanto a la respuesta al tratamiento (Figura 7C) el grupo no-GCB presentó una respuesta más favorable que el grupo GCB. Por último, en cuanto al IPI (Figura 7D), en el grupo no-GCB mayoritariamente presentaban un IPI bajo respecto al grupo GCB. Si bien es cierto, el grupo no-GCB, comparándose con el grupo GCB presentaron una mayor proporción de pacientes en un nivel de riesgo alto respecto al grupo no-GCB, mientras que el grupo no-GCB el IPI en su mayoría era bajo.

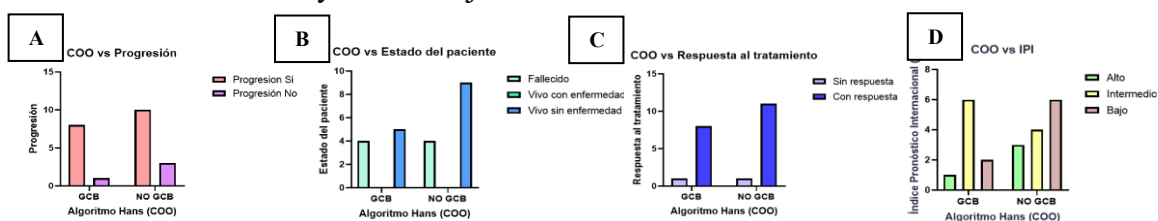


Figura 7: Distribución de la cohorte filtrada con 51 pacientes con LDCBG según clasificación por la célula de origen (COO, Hans) en relación con cuatro parámetros clínicos: progresión tumoral (A), estado del paciente (B), respuesta al tratamiento (C) y el índice de pronóstico internacional IPI (D).

2. Obtención de ADNlc a partir de muestras de plasma

Se extrajo el ADNlc de 26 donantes sanos (controles) y de 11 muestras de 9 pacientes con LDCBG, todas recogidas antes del tratamiento. Además, se incluyeron en el estudio datos obtenidos, tanto de la biopsia diagnóstica como del ADNlc, como de 3 pacientes incluidos en la cohorte. Tras la cuantificación de las muestras los datos de los controles sanos se recogieron en la Tabla 2, los pacientes con LDCBG en la Tabla 3 y los pacientes ya analizados en el **Anexo 3**. Por otro lado, de las 11 muestras de pacientes con LDCBG se seleccionaron las cinco que presentaban mayor concentración de ADNlc para poder hacer las diluciones seriadas, por un lado, y secuenciarlas individualmente por otro. Se observó una clara diferencia entre las concentraciones de ADNlc de los pacientes con LDCBG, siendo la concentración inicial de ADNlc en el plasma muy variable: mientras que el paciente BL05-17 contenía una gran concentración inicial de ADNlc en el plasma (112,48 ng/ml) el resto de paciente partían de menos de 20 ng/ml de ADNlc (Tabla 3).

Plasma Sano	Código de la muestra	Volumen inicial total (ml) de plasma	Concentración final (ng/ul) de ADNlc	Volumen final (ul)	Cantidad total (ng) de ADNlc
1	03BS23010504	4	0,37	25	9,20
2	03BS24001006	4	0,38	25	9,40
3	03BS25000204	4	0,46	25	11,50
4	03BS25002901	4	1,14	25	28,50
5	03BS5004001	4	0,33	25	8,25
6	03BS25004201	4	0,43	25	10,85
7	03BS25004301	4	0,99	25	24,75
8	03BS2500301	4	0,66	25	16,45
9	03BS25004501	4	0,40	37	14,80
10	03BS25004801	4	0,55	37	20,28
11	03BS25004901	4	0,52	37	19,24
12	03BS25005001	4	0,44	37	16,35
13	03BS230124	2	0,51	37	18,72
14	03BS250030	3	0,28	37	10,29
15	03BS250031	3	0,62	37	22,87
16	03BS250032	3	0,61	37	22,57
17	03BS250033	3	0,61	37	22,50
18	03BS250034	2	0,34	37	12,73
19	03BS250035	3	1,14	37	42,18
20	03BS25005601	4	0,18	37	6,73
21	03BS25005701	4	0,54	37	19,91
22	03BS25005801	4	0,57	37	21,24
23	03BS25005901	4	0,74	37	27,31
24	03BS25006001	4	0,36	37	13,39
25	03BS24016504	4	0,23	37	8,66
26	03BS25006101	4	0,27	37	10,14

Tabla 2: Datos de las 26 muestras de donantes sanos (controles) cedidas por el Biobanco del IDIPHSA, donde se muestra el volumen de plasma inicial, la concentración de ADNlc obtenida, y la cantidad total de ADNlc.

Plasma	Código de la muestra	Volumen inicial total (ml) de plasma	Concentración final (ng/ul) de ADNlc	Volumen final (ul)	Cantidad total (ng) de ADNlc	Concentración inicial (ng/ml) de ADNlc en el plasma
1	BL02-02-01	2	0,19	37	6,88	3,44
1	BL02-02-01 BIS	2	0,29	37	10,73	5,37
2	BL02-05	2	0,42	37	15,39	7,70
2	BL02-05 BIS	2	0,83	37	30,78	15,39
3	BL02-01	3	0,79	37	29,16	9,72
4	BL02-07	2	0,26	37	9,77	4,88
5	BL09-23	1	0,14	37	5,33	5,33
6	BL03-02	4	0,38	37	13,99	3,50
7	BL02-18	4	0,91	37	33,60	8,40
8	BL02-09	4	0,69	37	25,46	6,36
9	BL03-09	4	0,85	37	31,52	7,88
10	BL05-09	2	0,97	37	35,74	17,87
11	BL05-17	5	15,20	37	562,40	112,48

Tabla 3: Datos de las 11 muestras de 9 pacientes seleccionados con LDCBG. Se incluyen los datos la concentración de ADNlc inicial en el plasma. Aquellas muestras denominadas con la palabra “BIS”, corresponden a repeticiones realizadas por una baja concentración con el objetivo de identificar algún error en su extracción y/o cuantificación. Las muestras en color azul son las seleccionadas para el estudio.

Tras la cuantificación, se evaporaron las muestras para que quedasen a una concentración de 2ng/ul. Las muestras controles se juntaron en una mezcla o *pool*, y la cantidad total (ng) final para la librería tanto del *pool* de controles sanos como para los pacientes se

reflejan en las Tablas 4 y 5. El ADNlc total de los pacientes es aproximadamente de 30ng/muestra que correspondería a unos 10.000 equivalentes genómicos.

Código de la muestra	Cantidad total (ng) de ADNlc	Concentración final (ng/ul)	Volumen final (ul) tras evaporar	Volumen (ul) a coger para librería	Cantidad total de ADNlc (ng) para librería
BL02-05	30,784	2	15,4	12,4	24,8
BL02-18	33,60	2	16,8	13,8	27,6
BL03-09	31,52	2	15,8	12,8	25,5
BL05-09	35,74	2	17,9	14,9	29,7
BL05-17	45,60	2	22,8	19,8	39,6

Tabla 4: Cuantificación de las muestras de pacientes seleccionados con LDCBG: se incluye la cantidad total de ADNlc de partida y la concentración final tras la evaporación (2ng/ul), así como el volumen y la cantidad total de ADNlc a coger para la preparación de las librerías. Cada una de las muestras está identificada por su código correspondiente.

Número de controles	Ng/ul mix controles	Ng totales controles	Volumen total (ul)	Cf(ng /ul)	Vf (ul) tras evaporar	Vi (ul) para librería	Cantidad total (ng) para hacer librería
26	0,414	331,2	800	2	165,6	15	30

Tabla 5: Datos del *pool* total de muestras control, incluyendo la concentración final de ADNlc a la que se dejó (2ng/ul) y el volumen tras la evaporación. También se calculó tanto el volumen necesario y la cantidad total de ADNlc para preparar las librerías.

3. Preparación de las librerías y secuenciación masiva

Tras la extracción y cuantificación del ADNlc, se procedió a la realización de librerías para su posterior secuenciación. Se prepararon las librerías de los 5 pacientes de manera individual, del *pool* de controles sanos (Nx), y de las diluciones seriadas. Tras la librería y previo a la hibridación con sondas de captura, se volvió a cuantificar las muestras. Los resultados de la cuantificación se recogieron en la Tabla 6.

	Muestra	Cf (ng/ul) tras la librería
Código de la muestra pacientes LDCBG	BL02-05	116
	BL02-18	94,4
	BL03-09	96,8
	BL05-09	79
	BL05-17	153,2
Pool controles sanos	Control sano	145,6
Diluciones	D1	220
	D2	172
	D3	220
	D4	177,6
	D5	204

Tabla 6: Cuantificación de ADNlc de las cinco muestras de pacientes seleccionadas con LDCBG, el *pool* de controles sanos y de las diluciones seriadas, con la maquinaria *Qubit Assay* (Thermo Fisher Scientific) tras la realización de las librerías y antes de la hibridación de las sondas de captura.

Para la hibridación con las sondas, se prepararon tres *pools*: uno de pacientes, otro con las diluciones D1 a D4, y otro con el *pool* control y la dilución D5. Información adicional

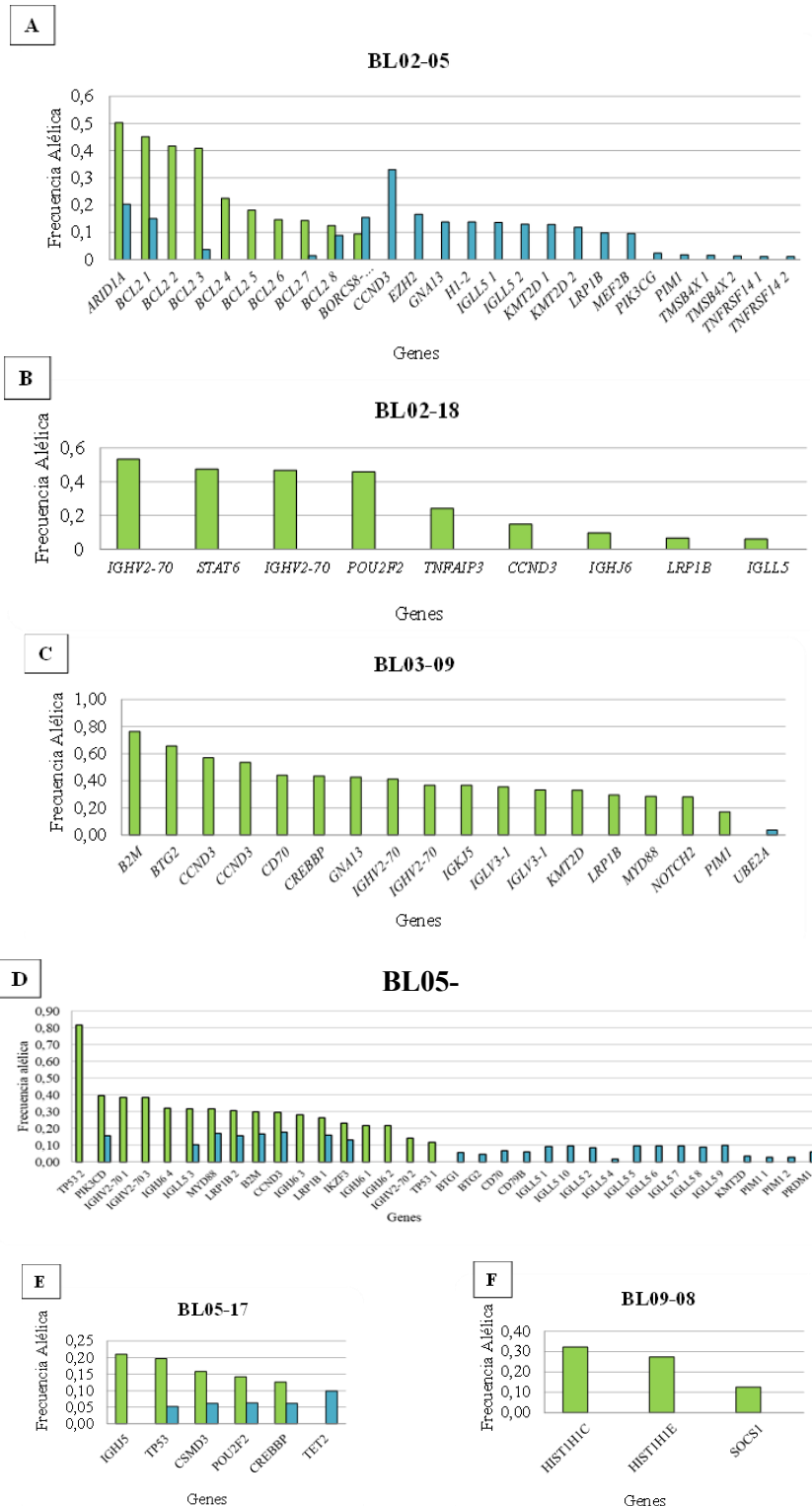
sobre los *pools* finales en el **Anexo 4**. Una vez completadas las librerías, se enviaron a secuenciar a un proveedor externo de servicios de secuenciación.

4. Comparativa ADNct de plasma vs ADNg de FFPEt

Tras el análisis bioinformático, se obtuvo el listado de variantes detectadas en el ADNlc de las 5 muestras seleccionadas, junto con las 3 muestras previamente analizadas por el Grupo de Linfomas (IDIPHISA), y se llevó a cabo un análisis comparativo. Se comparó el ADNct obtenido del plasma de los pacientes con el ADNg de las muestras FFPE (Figura 8).

En el caso del paciente BL02-05 (Figura 8A), se observan mutaciones detectadas tanto en ADNct como en ADNg como *ARID1* o varias de *BCL2*. Sin embargo, existen variantes únicas tanto en ADNg (*BCL2-2* o *BCL2-5* entre otras), como en ADNct con mutaciones en *CCND3* o *IGLL5*. Cabe mencionar el gen *CCND3*, pues no solo se encuentra exclusivamente en ADNct, sino que presenta una alta frecuencia en comparación con el resto de las variantes mutadas. En el plasma del paciente BL02-18 (Figura 8B) se detectaron mutaciones exclusivamente en ADNg, donde destacan genes como *IGHV2-70*, *STAT6*, *POU2F2* o *TNFAIP3* donde la frecuencia del alelo variante (VAF) superaba el 0,4. La ausencia de ADNct puede indicar una baja carga tumoral del linfoma de partida. En el caso del paciente BL03-09 (Figura 8C) se detectaron 17 mutaciones únicamente en ADNg, como *B2M*, *BTG2* o *CCND3*; mientras que en ADNct se detectó 1 único gen mutado, *UBE2A*, que en ADNg no se encuentra. En el paciente BL05-09 (Figura 8D) se observan mutaciones tanto en ADNct como en ADNg, aunque en general las frecuencias de ADNct son considerablemente menores. Hay que destacar que aunque compartan variantes, si es cierto que algunas son exclusivas para ADNg como *TP53*, y otras para ADNct como *CD70*. El paciente BL05-17 (Figura 8E) tenía común todas las variantes detectadas tanto por ADNct como por ADNg a excepción de un único gen detectado solo en ADNg, *IGHJ5*. Para el caso BL09-08 (Figura 8F), debido a una posible baja carga tumoral, solo se encontraron variantes en el ADNg. En el caso del paciente BL09-14 (Figura 8G), todas las variantes alélicas encontradas coincidían tanto en el ADNg como en el ADNct, aunque este último presentaban menor frecuencia alélica. Por último, el paciente BL09-21 (Figura 8H), solo presenta 4 variantes comunes para ADNg y para

ADNct. Si es cierto que, en este caso (en comparación con el resto de las pacientes), la frecuencia alélica de dos de ellos en el ADNct es mayor que en el ADNg.



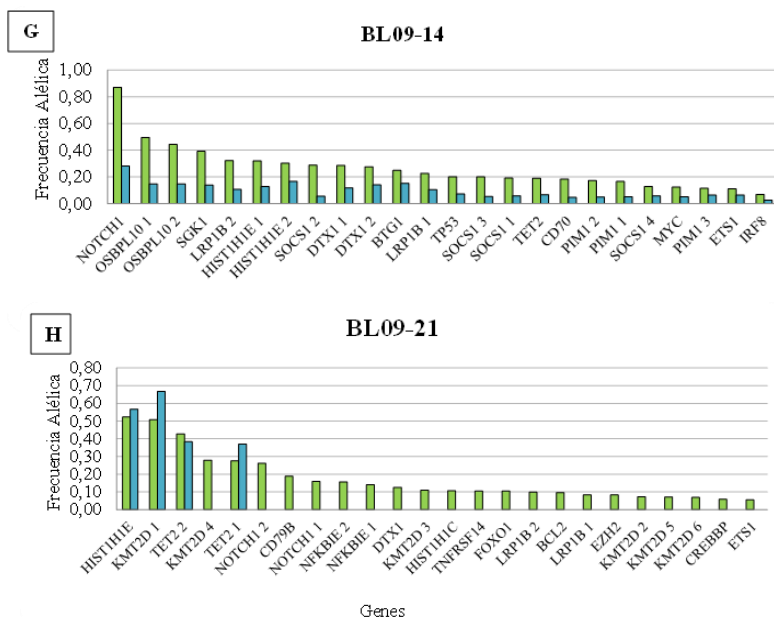


Figura 8: Gráficos comparativos de los 8 pacientes seleccionados con LDCBG. Las barras en color azul representan las frecuencias alélicas del ADN circulante tumoral (ADNct) obtenido del plasma, mientras que en verde se muestra las frecuencias alélicas de las mutaciones presentes en el ADN genómico (ADNg) de las muestras FFPE que ya estaban secuenciadas.

5. Cálculo del ADNct

Para estimar la cantidad de ADNct presente en las muestras de plasma se utilizó la fórmula: $\text{hGE/ml} = (\text{VAF medio} \times \text{concentración de ADNlc en pg/ml}) / 3,3$, donde VAF medio corresponde al promedio de VAF de las mutaciones detectadas en el plasma (expresada en porcentaje) y el 3,3pg corresponde el peso aproximado de un genoma humano haploide. Esto permitió obtener valores expresados en hGE/ml, facilitando la comparación entre pacientes y el seguimiento de la carga tumoral, donde se puede ver una amplia variabilidad. Mientras que los pacientes BL02-18 y BL09-08 no presentaban ADNct, pacientes como BL05-17, BL09-14 o BL09-21 presentaban una alta concentración de ADNct.

Código de muestra	Concentración inicial (ng/ml) de ADNlc en el plasma	Concentración inicial (pg/ml) de ADNlc en el plasma	VAF medio	Concentración ADNct (hGE/ml) en el plasma
BL02-05	15,39	15392	10	46642
BL02-18	8,40	8399	0	0
BL03-09	7,88	7881	4	9553
BL05-09	17,87	17871	9	48739
BL05-17	112,48	112480	7	238594
BL09-08	21,50	21500	0	0
BL09-14	89	89000	10	269697
BL09-21	314	314000	50	4757576

Tabla 7: Concentración de ADN circulante tumoral (ADNct) en plasma. Se muestra la concentración inicial de ADN libre de células (ADNlc) en ng/ml y en pg/ml, el valor medio de la frecuencia del alelo

variante (VAF medio) y los a concentración de ADN circulante tumoral (ADNct) en haploides equivalentes de genoma por ml de plasma (hGE/mL).

Por otro lado, se comparó la VAF de las mutaciones detectadas en ADNg con la obtenida en el ADNct (Figura 9). En la cohorte analizada, se observó una correlación positiva entre los valores de VAF en ambas aunque las mutaciones detectadas en plasma presentaron no se detectan en plasma o viceversa, siendo más frecuente en tejido.

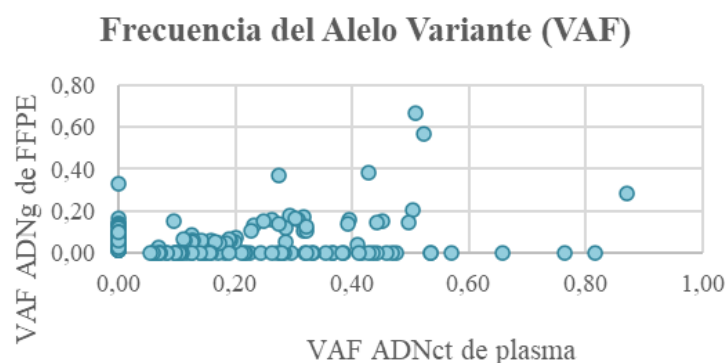


Figura 9: Correlación entre la frecuencia del alelo variante (VAF) en ADNct de plasma y ADNg de tejido FFPE. Cada punto representa una variante detectada en ambos grupos.

6. Clasificación por 2-S de las muestras de pacientes con LDCBG

Una vez analizadas todas las mutaciones de las muestras de pacientes, se determinó el subtipo genético con el clasificador 2-S con las mutaciones detectadas en ADNg y en ADNlc. No en todas las muestras se pudo determinar el subtipo genético, debido a la ausencia de ADNct en el plasma, y en una de ellas, la información era insuficiente para clasificarla correctamente (Tabla 8). En el caso de BL02-05, BL05-09 y BL09-21, el subtipo genético obtenido del ADNlc era el mismo que el del ADNg de las muestras FFPEt.

Código de la muestra	Subtipo genético ADNlc	Subtipo genético ADNg	¿Igual ADNlc y ADNg?
BL02-05	EZB.BCL2	EZB.BCL2	Si
BL02-18	NA	BN2.NOTCH2	No
BL03-09	NA	MCD.MYD88	No
BL05-09	MCD.MYD88	MCD.MYD88	Si
BL05-17	EZB/ST2*	EZB.BCL2	No
BL09-08	NA	NA	Si
BL09-14	N1	N1	Si
BL09-21	ST2.SGK1	EZB.BCL2	No

Tabla 8: Comparación de los subtipos genéticos determinados en el ADNlc y el ADNg de las muestras analizadas. Se indica si ambos subtipos coinciden o difieren. “*”: muestra con una mutación EZB y otra en ST2. NA: no clasificados ya que presentan una o ninguna mutación.

7. Análisis de sensibilidad del panel de NGS en biopsia líquida

Por último y con el objetivo de evaluar la sensibilidad para la detección de variantes genéticas en BL mediante NGS con el sistema utilizado en el laboratorio, se analizaron las mutaciones en los datos de las diluciones seriadas (D₁-D₅) descritas anteriormente (Figura 10).

Las diluciones se prepararon en factores de 1:10 (D₁) hasta alcanzar una dilución 1:100.000 (D₅). La plataforma de secuenciación fue capaz de detectar variantes genéticas (Figura 8) en la dilución D₃, pero no en la D₄. En la D₃, a pesar de las VAFs bajas, se detectaron en su gran mayoría, mostrando, por tanto, que en las condiciones del análisis se alcanzaba una sensibilidad de 10^{-3} sensibilidad que permitiría la identificación de ADNct al diagnóstico en condiciones de baja carga tumoral.

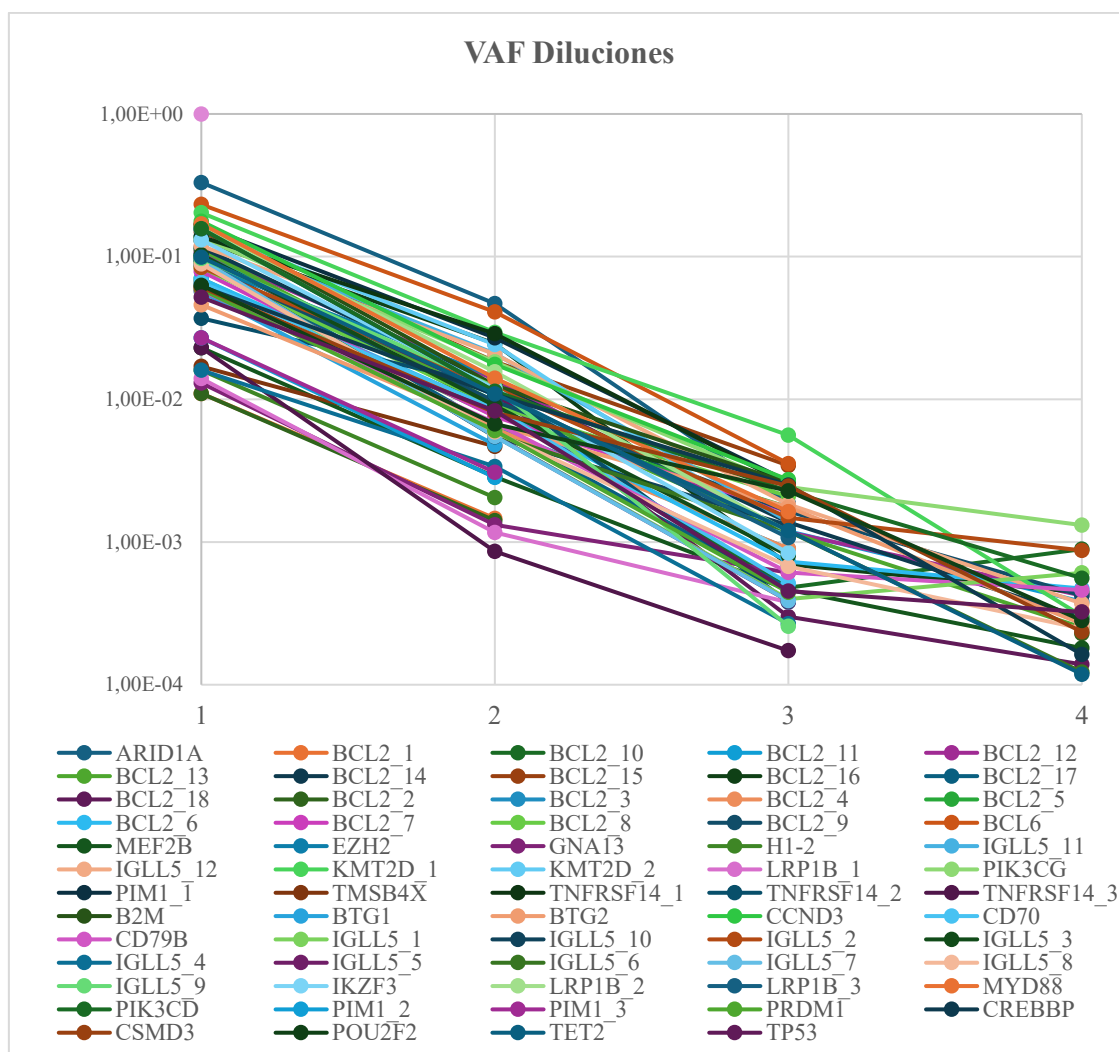


Figura 10: Gráfico de la frecuencia del alelo variante de las diluciones seriadas. En el eje X se representan los puntos de dilución del 1 al 4, donde el número 2 corresponde a la D₁ (10^{-1}), el 3 a la D₂ (10^{-2}), y el 4 a

la D_3 (10^{-3}). El eje Y muestra la VAF en escala logarítmica. Cada uno de los diferentes colores referencian a una mutación somática.

DISCUSIÓN

La caracterización molecular de los linfomas se ha realizado tradicionalmente en las muestras de tejido obtenidas por resección quirúrgica o biopsia. Si bien estas aproximaciones constituyen la referencia diagnóstica, presenta limitaciones importantes. En este contexto, la BL emerge como una estrategia innovadora y mínimamente invasiva (Siravegna et al., 2017). El uso del ADNct como apoyo a las herramientas diagnósticas clásicas se debe a las ventajas que presenta, ya no solo que sea poco invasiva, sino que también permite la monitorización de la enfermedad y la detección de EMR (Huet & Salles, 2020). Estudios previos han establecido una asociación entre las características clínicas y moleculares, junto con el pronóstico en pacientes con LDCBG. Sin embargo, la implementación de dichas herramientas ha tenido un impacto limitado en la mejora clínica de este tipo de pacientes (Kurtz et al., 2018).

En el actual estudio, el objetivo principal era evaluar la utilidad de la BL para detectar mutaciones en pacientes con LDCBG, comparando el ADNct en el plasma con el ADNg de muestras sólidas (FFPE).

En la primera parte, se llevó a cabo un análisis descriptivo y estadístico sobre una serie de pacientes con LDCBG con muestras al diagnóstico o previas al tratamiento resultando en una cohorte final de 51 pacientes. Con el fin de poder caracterizarlas, se evaluaron distintas variables clínicas destacando que ninguna de las comparaciones realizadas alcanzó significancia estadística ($p\text{-valor} > 0,05$), debido, probablemente al pequeño tamaño muestral. En relación con la edad (Figura 4), se observó una mayor progresión tumoral y mortalidad en pacientes mayores o iguales a 60 años. Esto es coherente pues una edad avanzada se asocia normalmente con peor curso clínico, una menor tolerancia al tratamiento y una mayor inmunodeficiencia (Freedman & Jacobsen, 2020).

Respecto al sexo, los datos mostraron una ligera mayor mortalidad y progresión en hombres que en mujeres, aunque la mayoría en ambos grupos permanecieron vivos sin enfermedad (Figura 5). En el caso de la distribución del IPI, la mayor proporción tanto de mujeres como de hombres presentaron un riesgo intermedio.

En cuanto al tratamiento recibido, se evidenció una mejor evolución clínica en los pacientes tratados con R-CHOP, con menor tasa de progresión, mayor proporción de pacientes vivos sin enfermedad y mejor respuesta, en comparación con aquellos que recibieron otras alternativas (Figura 6).

Finalmente, en el análisis según la COO se observó que tanto los GCB como los no-GCB mostraron resultados similares en cuanto a la progresión tumoral, estado del paciente y respuesta al tratamiento. Cabe destacar que en el grupo GCB predominaban pacientes con IPI bajo (Figura 8). Este hecho, limitado por el tamaño muestral, sugiere que no se observaron diferencias clínicamente relevantes entre los dos grupos, a pesar de que estudios previos asocian el subtipo GCB con un mejor pronóstico (Rosenwald et al., 2002), lo que es coherente con su asociación con un IPI menor.

Uno de los principales hallazgos del estudio fue la identificación de mutaciones coincidentes entre ADNct y ADNg de muestras FFPEt de varios pacientes con LDCBG, aunque con diferencias en cuanto a la VAF de detección. Se observó que la mayoría de las mutaciones presentes en BL suelen presentar frecuencias menores en comparación con las obtenidas a partir de FFPEt (Fernández-Miranda et al., 2023). Esto se evidenció en casos como BL05-17 (Figura 8E) y BL09-14 (Figura 8G), en los que casi todas las variantes detectadas en FFPEt también se identifican en BL, en este caso con menor frecuencia alélica. Estos pacientes presentaban una concentración inicial de ADNct alto (Tabla 3) y un cuadro clínico desfavorable (IPI intermedio y ambos fallecidos) (**Anexo 2**). En otros casos, como BL02-18 (Figura 8B) o BL09-08 (Figura 8F) no se detectaron mutaciones en el ADNct a pesar de su clara presencia en ADNg. Esto podría deberse a una baja carga tumoral del linfoma, con menor agresividad, evidenciado en la concentración inicial de ADNlc del plasma (Tabla 3), donde se observó que estos pacientes presentaban menor concentración que el resto. Además, estos dos pacientes presentaron un IPI bajo, se encontraban vivos y sin la enfermedad al momento del estudio (**Anexo 2**), lo que refuerza la hipótesis de que una carga tumoral baja limita la detección de mutaciones en ADNct. Lo mismo ocurre para el paciente BL03-09 (Figura 6C), que también presentaba menor concentración de ADNlc en el plasma y presentaba un estado clínico favorable (IPI bajo y vivos sin enfermedad). Se observó que no compartía ninguna variante con el ADNg a excepción de una mutación exclusiva del ADNct. Esta mutación, detectada únicamente a través del ADNlc, podría aportar información crucial y útil para optimizar el diagnóstico, seleccionar terapias dirigidas más precisas y realizar un seguimiento del tumor. El resto de los pacientes en los que se detectaron tanto variantes comunes como exclusivas para ADNg y para ADNct, presentaban una concentración de ADNct intermedia o alta (Tabla 3) y un IPI alto (**Anexo 2**).

En linfomas agresivos, la concordancia entre ADNct y los datos genómicos de muestras FFPEt alcanzan aproximadamente el 80%, mientras que en linfomas indolentes con baja

carga tumoral esta concordancia suele ser menor (Fernández-Miranda et al., 2023), dando evidencia estos resultados y resaltando la importancia del análisis del ADNct como herramienta complementaria para una caracterización más precisa y completa del perfil mutacional del tumor, que no sería posible únicamente con la BS.

La dispersión de los datos (Figura 9) en las variantes con frecuencias bajas en el ADNct se debe a la dilución del ADNct en todo el ADNlc. Esto sugiere que el ADNct de plasma, puede reflejar el perfil mutacional del tejido, aunque con limitaciones en aquellas variantes con baja frecuencia o en tumores con baja carga tumoral y que, por tanto, liberan poco ADN tumoral al torrente sanguíneo.

Para poder validar más rigurosamente la utilidad de la BL como herramienta complementaria, será necesario analizar una cohorte más amplia para obtener mayor representatividad. Esto permitirá evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica en diferentes contextos clínicos, como en tumores localizados en regiones poco accesibles para poder hacer una biopsia convencional, donde esta técnica complementaria puede ayudar significativamente al diagnóstico. Además, y de acuerdo con estos resultados, sería recomendable aumentar la cantidad de ADNlc de partida y el incremento en la profundidad de secuenciación.

La clasificación genética de los pacientes mediante el clasificador 2-S permitió asignar los subtipos moleculares del ADNct (Tabla 8). Aunque la ausencia de ADNct en algunas muestras impidió la clasificación y por tanto la comparativa respecto al subtipo genético en muestras sólidas, en casos como los pacientes BL02-05, BL05-09 y BL09-21, se observó una concordancia de la clasificación. Estos resultados podrían validar el uso del ADNlc como alternativa para la caracterización molecular no invasiva, especialmente cuando realizar una biopsia convencional sea imposible. Sin embargo, será necesario aumentar el número de pacientes analizados para consolidar estos resultados y reforzar su aplicabilidad clínica.

Es importante señalar los hallazgos obtenidos en el análisis de sensibilidad. En este estudio (Figura 10) la sensibilidad del método alcanzó un límite de detección del orden de 10^{-3} . Esto indica que en al menos una de cada mil moléculas de ADN analizado es posible detectar variantes genéticas. Si bien, este nivel de sensibilidad es adecuado para identificar mutaciones con relevancia clínica al diagnóstico, si es cierto que puede representar una limitación para la detección de variantes presentes en baja frecuencia alélica y para seguimiento del paciente y detección de EMR, lo que puede deberse a limitaciones propias de la secuenciación (Fernández-Miranda et al., 2023).

Este estudio piloto sugiere que debería optimizarse el procedimiento aumentando la cantidad de ADNlc analizado y la profundidad de secuenciación. Incrementar la concentración podría mejorar la representación de variantes, mientras que una lectura más profunda permitiría captar mutaciones de baja frecuencia con mayor precisión y fiabilidad.

De la misma manera, el desarrollo algoritmos bioinformáticos que son capaces de reducir el ruido de fondo y discriminar variantes somáticas de baja frecuencia, constituye un elemento fundamental para el incremento de la sensibilidad del experimento.

La continua mejora en la sensibilidad de las tecnologías de secuenciación, así como la reducción de sus costes favorecerán la adición de la BL como una nueva herramienta para abordar pacientes oncológicos. Esta aproximación podría ampliar no solo la BL como método complementario para el diagnóstico, sino también para identificar eventos moleculares asociados a la progresión tumoral o la resistencia de los tratamientos, favoreciendo así una intervención clínica concreta y una mejora en la clasificación de los tumores. Sin embargo, será fundamental abordar los problemas actuales planteados que tiene el uso de la BL en relación con la detección de mutaciones en niveles muy bajos de ADNlc para poder maximizar su uso.

Desde una perspectiva de sostenibilidad, este estudio se alinea con diferentes objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), especialmente en “Salud y bienestar” (ODS 3), al contribuir mediante estrategias menos invasivas y más accesibles mejorando el diagnóstico oncológico. La implementación de la BL como herramienta diagnóstica en LDCBG, además de mejorar los métodos invasivos tradicionales, promueve prácticas diagnósticas más eficientes y sostenibles dentro del ámbito sanitario, relacionados con la “Producción y consumo responsable” (ODS 12). Este estudio promueve una sostenibilidad ambiental, pues la BL requiere menores cantidades de reactivos y materiales de laboratorio, evitando procedimientos quirúrgicos así como una reducción de materiales biomédicos y un uso más eficiente de los recursos. Al facilitar el acceso al diagnóstico molecular de manera menos invasiva, especialmente en poblaciones vulnerables o con limitaciones para someterse a una biopsia convencional, también se promueve una sostenibilidad tipo social. Por ende, también se promueve una sostenibilidad económica pues, al optimizar los recursos del sistema sanitario y reducir los costes asociados a procedimientos hospitalarios. En este contexto, se planea como estrategia a futuro el desarrollo de zonas accesibles para implementar la BL en entornos con recursos limitados.

CONCLUSIONES

1. La BL permite identificar mutaciones coincidentes con las presentes en la BS, aunque con frecuencias generalmente más bajas. Esto concuerda con pacientes con mayor ADNct en el plasma y con un cuadro clínico desfavorable. Esto respalda la utilidad del ADNct como herramienta complementaria en el análisis mutacional del LDCBG.
2. La ausencia de detección de mutaciones en el ADNct en determinados pacientes con baja carga tumoral sugiere una limitación técnica relacionada con la cantidad de ADNct liberado al plasma. Esto refuerza la idea de que la carga tumoral es un factor determinante en la sensibilidad de la BL.
3. La identificación de variantes exclusivas en ADNct no detectadas en BS resalta el valor añadido de la BL para detectar alteraciones genéticas potencialmente relevantes desde el punto de vista clínico. Esto sugiere que el ADNct puede aportar información complementaria al perfil tumoral, con implicaciones diagnósticas y terapéuticas.
4. La sensibilidad del método de detección de variantes genéticas alcanzó un umbral de 10^{-3} , identificando mutaciones relevantes en el contexto del diagnóstico. Sin embargo, esta sensibilidad puede ser insuficiente para detectar variantes de muy baja frecuencia o para seguimiento de la EMR.
5. La BL representa una herramienta prometedora y mínimamente invasiva para la caracterización molecular de LDCBG, aunque es necesario validación en una cohorte más amplia, y mejorar la sensibilidad del procedimiento.

BIBLIOGRAFIA

- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. de O., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A. M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J. K. C., Cheuk, W., Chng, W.-J., Choi, J. K., Chuang, S.-S., Coupland, S. E., Czader, M., Dave, S. S., ... Xiao, W. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1720–1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
- Alig, S. K., Chapuy, B., Ennishi, D., Dunleavy, K., & Hodson, D. J. (2024a). Evolving molecular classification of aggressive B-cell lymphoma. In *Histopathology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/his.15350>
- Campo, E., Jaffe, E. S., Cook, J. R., Quintanilla-Martinez, L., Swerdlow, S. H., Anderson, K. C., Brousset, P., Cerroni, L., de Leval, L., Dirnhofer, S., Dogan, A., Feldman, A. L., Fend, F., Friedberg, J. W., Gaulard, P., Ghia, P., Horwitz, S. M., King, R. L., Salles, G., ... Zelenetz, A. D. (2022). The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*, 140(11), 1229–1253. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015851>
- Chapuy, B., Stewart, C., Dunford, A. J., Kim, J., Kamburov, A., Redd, R. A., Lawrence, M. S., Roemer, M. G. M., Li, A. J., Ziepert, M., Staiger, A. M., Wala, J. A., Ducar, M. D., Leshchiner, I., Rheinbay, E., Taylor-Weiner, A., Coughlin, C. A., Hess, J. M., Pedomallu, C. S., ... Shipp, M. A. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nature Medicine*, 24(5), 679–690. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0016-8>
- Diaz, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*, 32(6), 579–586. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011>
- Fend, F., van den Brand, M., Groenen, P. J., Quintanilla-Martinez, L., & Bagg, A. (2024). Diagnostic and prognostic molecular pathology of lymphoid malignancies. *Virchows Archiv*, 484(2), 195–214. <https://doi.org/10.1007/s00428-023-03644-0>
- Fernández-Miranda, I., Pedrosa, L., Llanos, M., Franco, F. F., Gómez, S., Martín-Acosta, P., García-Arroyo, F. R., Gumá, J., Horcajo, B., Ballesteros, A. K., Gálvez, L., Martínez, N., Marín, M., Sequero, S., Navarro, M., Yanguas-Casás, N., Calvo, V., Rueda-Domínguez, A., Provencio, M., & Sánchez-Beato, M. (2023a). Monitoring of Circulating Tumor DNA Predicts Response to Treatment and Early Progression in Follicular Lymphoma: Results of a Prospective Pilot Study. *Clinical Cancer Research*, 29(1), 209–220. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-1654>
- Fitzmaurice, C., Akinyemiju, T. F., Al Lami, F. H., Alam, T., Alizadeh-Navaei, R., Allen, C., Alsharif, U., Alvis-Guzman, N., Amini, E., Anderson, B. O., Aremu, O., Artaman, A., Asgedom, S. W., Assadi, R., Atey, T. M., Avila-Burgos, L., Awasthi, A., Ba Saleem, H. O., Barac, A., ... Naghavi, M. (2018). Global, Regional, and

- National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016. *JAMA Oncology*, 4(11), 1553. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2706>
- Freedman, A., & Jacobsen, E. (2020). Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management. *American Journal of Hematology*, 95(3), 316–327. <https://doi.org/10.1002/ajh.25696>
- Fu, L., Zhou, X., Zhang, X., Li, X., Zhang, F., Gu, H., & Wang, X. (2025). Circulating tumor DNA in lymphoma: technologies and applications. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-025-01673-7>
- Hans, C. P. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1), 275–282. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545>
- Hauwel, M., & Matthes, T. (2014). Minimal residual disease monitoring: the new standard for treatment evaluation of haematological malignancies? *Swiss Medical Weekly*. <https://doi.org/10.4414/smw.2014.13907>
- Huet, S., & Salles, G. (2020). Potential of Circulating Tumor DNA for the Management of Patients With Lymphoma. *JCO Oncology Practice*, 16(9), 561–568. <https://doi.org/10.1200/JOP.19.00691>
- Kurtz, D. M., Scherer, F., Jin, M. C., Soo, J., Craig, A. F. M., Esfahani, M. S., Chabon, J. J., Stehr, H., Liu, C. L., Tibshirani, R., Maeda, L. S., Gupta, N. K., Khodadoust, M. S., Advani, R. H., Levy, R., Newman, A. M., Dührsen, U., Hüttmann, A., Meignan, M., ... Alizadeh, A. A. (2018). Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 36(28), 2845–2853. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.5246>
- Lacy, S. E., Barrans, S. L., Beer, P. A., Painter, D., Smith, A. G., Roman, E., Cooke, S. L., Ruiz, C., Glover, P., Van Hoppe, S. J. L., Webster, N., Campbell, P. J., Tooze, R. M., Patmore, R., Burton, C., Crouch, S., & Hodson, D. J. (2020). *Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report*. <https://www.hmrn.org>
- Pedrosa, L., Fernández-Miranda, I., Pérez-Callejo, D., Quero, C., Rodríguez, M., Martín-Acosta, P., Gómez, S., González-Rincón, J., Santos, A., Tarin, C., García, J. F., García-Arroyo, F. R., Rueda, A., Camacho, F. I., García-Cosío, M., Heredero, A., Llanos, M., Mollejo, M., Piris-Villaespesa, M., ... Sánchez-Beato, M. (2021). Proposal and validation of a method to classify genetic subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80376-0>

- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Powell, J., ... Staudt, L. M. (2002). The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 346(25), 1937–1947. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012914>
- Sánchez-Beato, M., Méndez, M., Guirado, M., Pedrosa, L., Sequero, S., Yanguas-Casás, N., de la Cruz-Merino, L., Gálvez, L., Llanos, M., García, J. F., & Provencio, M. (2024). A genetic profiling guideline to support diagnosis and clinical management of lymphomas. In *Clinical and Translational Oncology* (Vol. 26, Issue 5, pp. 1043–1062). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s12094-023-03307-1>
- Schmitz, R., Wright, G. W., Huang, D. W., Johnson, C. A., Phelan, J. D., Wang, J. Q., Roulland, S., Kasbekar, M., Young, R. M., Shaffer, A. L., Hodson, D. J., Xiao, W., Yu, X., Yang, Y., Zhao, H., Xu, W., Liu, X., Zhou, B., Du, W., ... Staudt, L. M. (2018). Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 378(15), 1396–1407. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801445>
- Shankland, K. R., Armitage, J. O., & Hancock, B. W. (2012). Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, 380(9844), 848–857. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60605-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60605-9)
- Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(9), 531–548. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>
- Siravegna, G., Mussolin, B., Venesio, T., Marsoni, S., Seoane, J., Dive, C., Papadopoulos, N., Kopetz, S., Corcoran, R. B., Siu, L. L., & Bardelli, A. (2019). How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Annals of Oncology*, 30(10), 1580–1590. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz227>
- Susanibar-Adaniya, S., & Barta, S. K. (2021). 2021 Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management. *American Journal of Hematology*, 96(5), 617–629. <https://doi.org/10.1002/ajh.26151>
- Talotta, D., Almasri, M., Cosentino, C., Gaidano, G., & Moia, R. (2023). Liquid biopsy in hematological malignancies: current and future applications. *Frontiers in Oncology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1164517>
- Wang, L., Qin, W., Huo, Y.-J., Li, X., Shi, Q., Rasko, J. E. J., Janin, A., & Zhao, W.-L. (2020). Advances in targeted therapy for malignant lymphoma. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 15. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0113-2>

- Wright, G. W., Huang, D. W., Phelan, J. D., Coulibaly, Z. A., Roulland, S., Young, R. M., Wang, J. Q., Schmitz, R., Morin, R. D., Tang, J., Jiang, A., Bagaev, A., Plotnikova, O., Kotlov, N., Johnson, C. A., Wilson, W. H., Scott, D. W., & Staudt, L. M. (2020). A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell*, 37(4), 551-568.e14. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.015>
- Yanguas-Casás, N., Pedrosa, L., Fernández-Miranda, I., & Sánchez-Beato, M. (2021). An overview on diffuse large b-cell lymphoma models: Towards a functional genomics approach. *Cancers*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/cancers13122893>
- Young, R. M., Phelan, J. D., Wilson, W. H., & Staudt, L. M. (2019). Pathogenic B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies: New insights to improve treatment. *Immunological Reviews*, 291(1), 190–213. <https://doi.org/10.1111/imr.12792>

ANEXOS

Anexo 1: Panel de genes para la secuenciación NGS de las 8 muestras de pacientes con LDCBG seleccionadas de la cohorte de 51 pacientes.

GENES PANEL							
ARID1A	chr7	IRF4	POU2AF1	EZH2	NFKBIE	SPEN	BTK
B2M	CREBBP	IRF8	POU2F2	FOXO1	NOTCH1	ST6GAL1	CARD11
BACH2	CSMD3	KMT2D	PRDM1	GNA13	NOTCH2	STAT3	CCND3
BCL10	DDX3X	LRMP	RHOH	GRHPR	OSBPL10	STAT6	CD19
BCL2	DTX1	LRP1B	RRAGC	H1-2	PAX5	TBL1XR1	CD58
BCL6	DUSP2	MEF2B	SERPINA9	H1-4	PIK3CA	TCL1A	CD70
BCL7A	EP300	MS4A1	SETD1B	HLA-A	PIK3CD	TET2	CD74
BTG1	ETS1	MYC	SGK1	HLA-B	PIK3CG	TMSB4X	CD79B
BTG2	ETV6	MYD88	SOCS1	chr16	PIK3R1	TNFAIP3	HLA-C
chr22	IGK	PIM2	TP53	chr2	PIM1	TNFRSF14	IGH
IKZF3	IGL	PLCG2	UBE2A				

Anexo 2: Análisis descriptivo de los 8 pacientes seleccionados para el estudio. Se incluyen datos sobre el sexo, la edad, el tratamiento recibido, el estadio tumoral, la progresión de la enfermedad, la presencia de antecedentes oncológico, el Índice Pronóstico Internacional (IPI), la clasificación de la célula de origen (COO) según el algoritmo de Hans, y la presencia de reordenamientos genéticos de *MYC*, *BCL2*, y *BCL6*.

Código muestras de pacientes	Sexo	Edad	IPI	Tratamiento	Estadio del tumor	Progresión de la enfermedad	Estado del paciente	Antecedentes oncológicos	COO (Hans)	Reordenamiento MYC	Reordenamiento BCL2	Reordenamiento BCL6
BL02-05	Mujer	72	Alto	R-CHOP	III	No	Vivo sin enfermedad	No	-	No	Si	No
BL02-18	Varón	62	Bajo	R-CHOP	II	No	Vivo sin enfermedad	No	-	-	-	-
BL03-09	Mujer	62	Intermedio	R-CHOP	II	No	Vivo sin enfermedad	No	No-GCB	No	-	-
BL05-09	Varón	64	Alto	R-CHOP	IV	Sí	Fallecido	No	No-GCB	-	-	-
BL05-17	Varón	76	Intermedio	R-CVP	II	Sí	Fallecido	No	No-GCB	-	-	-
BL09-08	Varón	62	Bajo	R-CHOP	II	No	Vivo sin enfermedad	No	-	-	-	-
BL09-14	Mujer	54	Intermedio	Otros	IV	Sí	Fallecido	No	-	-	-	-
BL09-21	Varón	58	Intermedio	R-CHOP	IV	No	Vivo sin enfermedad	No	GCB	-	-	-

Anexo 3: Datos de los 3 pacientes seleccionados con LDCBG ya secuenciados por el laboratorio de Linfomas. Se incluyen los datos la concentración de ADNlc inicial en el plasma.

Código de la muestra	Volumen inicial total (ml) de plasma	Concentración final (ng/ul) de ADNlc	Volumen final (ul)	Cantidad total (ng) de ADNlc	Concentración inicial (ng/ml) de ADNlc en el plasma
BL09-08	1	0,43	50	21,5	21,5
BL09-14	1	1,78	50	89	89
BL09-21	1	6,28	50	314	314

Anexo 4: En esta tabla se reflejan los datos que componen los 3 *pools* realizados para el proceso de hibridación de las sondas de captura. Las variables reflejadas indican la posición de los *Unique Dual Index Primer pair* (UDIs) donde se incluyeron cada una de las librerías y los índices correspondientes a dichas posiciones. Por último, se refleja la concentración total de ADNlc de cada *pool* determinado con el equipo *Qubit Assay* (Thermo Fisher Scientific).

		Index_Plate_Well	Index	Index2	Cf (ng/ul) de ADNlc
Pool 1	BL02-05 BIS	A_C03	CCGATAACTT	GTATACGGAG	18 ng/ul
	BL03-09	A_D03	TTGGACATCG	GACCAGATTC	
	BL05-09	A_E03	AACGTTGAGA	TTACCGACCG	
	BL05-17	A_F03	GGCCAGTGAA	CATTAGCAGA	
	BL02-18	A_G03	ATGTCTCCGG	CGAATAAGAG	
Pool 2	Control sano	A_H03	GAAGGCGTTC	GCTAGAGGTG	14,6 ng/ul
	D5	A_E04	TCCGCATAGC	TGCCTTGCGT	
Pool 3	D1	A_A04	TGTTCCTAGA	CGGTAAGTAA	19,3 ng/ul
	D2	A_B04	CTCTCGAGGT	TAAGGCATAG	
	D3	A_C04	CTGTACGGTA	CGTACCTTCC	
	D4	A_D04	CTTATGGCAA	ACGTCTCCTC	