



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Utilidad clínica de la biopsia líquida en el diagnóstico y  
seguimiento de pacientes afectados de síndrome de PROS

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Ortuño Moya, Carla

Tutor/a: Jantus Lewintre, Eloisa

Cotutor/a externo: MUNERA MARAVILLA, ESTER

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



FUNDACIÓ  
INVESTIGACIÓ  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Trabajo Final de Grado

# Utilidad clínica de la biopsia líquida en el diagnóstico y seguimiento de pacientes afectados de síndromes de PROS

**Alumno: Carla Ortuño Moya**

Grado en Biotecnología

Tutora académica: Eloisa Jantus Lewintre

Tutora externa: Ester Munera Maravilla

Curso 2022-2023

Valencia, Julio-1 2023



## **Título:**

**Utilidad clínica de la biopsia líquida en el diagnóstico y seguimiento de pacientes afectados de síndromes de PROS**

## **Resumen:**

El espectro de síndromes de sobrecrecimiento relacionado con *PIK3CA* (PROS, por sus siglas en inglés) constituye un grupo de enfermedades poco comunes que provocan el sobrecrecimiento de varias partes del cuerpo debido a mutaciones en mosaico en el gen *PIK3CA*. Diferentes áreas del cuerpo (tronco, extremidades, cerebro) y tejidos (grasa, huesos, vasos sanguíneos) pueden verse afectados individualmente o en combinación. Actualmente, los enfoques tecnológicos de diagnóstico basados en la detección de la mutación en biopsias de tejido afecto y su ausencia en el tejido sano, pueden caracterizar genéticamente solo una proporción limitada de pacientes, ya que sigue siendo un procedimiento de diagnóstico invasivo y de alto riesgo.

La biopsia líquida hace referencia a cualquier fluido biológico en el cual puede determinarse un biomarcador y que es representativo del tejido en el que se ha producido, y ya ha demostrado ser de gran utilidad en otras áreas como es la oncología. Por ello, se propone como una alternativa mínimamente invasiva para mejorar y agilizar el diagnóstico de los pacientes afectados por el síndrome de PROS.

El objetivo del presente trabajo es detectar mutaciones en el gen *PIK3CA* mediante *Next Generation Sequencing* (NGS) a partir de DNA circulante libre en el plasma de pacientes con clínica de PROS, validando así la biopsia líquida como herramienta útil para el diagnóstico y monitorización en este tipo de enfermedades.

En colaboración con el Servicio de Dermatología del Hospital General Universitario de Valencia, se han incluido en el presente estudio 11 pacientes con una clínica vinculada al espectro PROS. Se obtuvieron muestras de sangre en tubos EDTA de todos los pacientes y se procesaron para la obtención de plasma. A partir del plasma se extrajeron los ácidos nucleicos libres en circulación y finalmente fueron secuenciados usando el panel OncoPrint™ Pan-Cancer *Cell-Free Assay*.

De los 11 pacientes analizados, se logró determinar mutaciones de *PIK3CA* en 3 de ellos con una MAF de 1,70, 0,62 y 0,35 %. Sin embargo, más del 50 % de los pacientes analizados presentaron diversas limitaciones: (i) cantidad insuficiente de cfDNA, (ii) mutaciones no contempladas en el panel de secuenciación. Por ello, como objetivo secundario de este trabajo, se ha diseñado un panel específico para la secuenciación completa del gen *PIK3CA*, el cual abarca la detección de un rango mayor de mutaciones asociadas al síndrome de PROS. Se espera que la implementación de este panel pueda validar la secuenciación de próxima generación de cfDNA en biopsia líquida como una herramienta prometedora para el diagnóstico de mutaciones en el síndrome de PROS.

Por consiguiente, este trabajo se relaciona íntimamente con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) número 3, salud y bienestar.

**Palabras clave:** PROS; Biopsia líquida; *Next Generation sequencing*; *PIK3CA*; DNA libre circulante

**Autor/a:** Carla Ortuño Moya

**Localidad y fecha:** Valencia, Julio-1 2023

**Tutor/a académico:** Eloisa Jantus Lewintre

**Tutor/a externo:** Ester Munera Maravilla

**Title:**

**Clinical utility of liquid biopsy in the diagnosis and monitoring of patients affected by PROS syndromes.**

**Summary:**

*PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS) is a group of rare diseases that cause overgrowth in various parts of the body due to mosaic mutations in the *PIK3CA* gene. Different areas of the body (trunk, limbs, brain) and tissues (fat, bones, blood vessels) can be individually or collectively affected. Currently, diagnostic technological approaches are based on the detection of the mutation in affected tissue biopsies and its absence in healthy tissue and they can genetically characterize only a limited proportion of patients, as it remains an invasive and high-risk diagnostic procedure.

Liquid biopsy refers to any biological fluid in which a biomarker can be determined and is representative of the tissue where it was originated, and it has already proven to be very useful in other areas such as oncology. Therefore, it is proposed as a minimally invasive alternative to improve and accelerate the diagnosis of patients affected by PROS.

The objective of this study is to detect mutations in the *PIK3CA* gene using Next Generation Sequencing (NGS) from cell-free DNA (cfDNA) in the plasma of patients with PROS clinical features, thus validating liquid biopsy as a useful tool for the diagnosis and monitoring of this type of disease.

In collaboration with the Dermatology Department of the Hospital General Universitario de Valencia, in this study 11 patients with clinical features associated with the PROS spectrum were included. Blood samples were collected in EDTA tubes from all patients and processed to obtain plasma. Circulating free nucleic acids were extracted from the plasma and finally sequenced using the OncoPrint™ Pan-Cancer Cell Free Assay panel.

Out of the 11 analysed patients, *PIK3CA* mutations were detected in 3 of them with a minor allele frequency (MAF) of 1.70, 0.62, and 0.35 %. However, over 50 % of the analysed patients presented various limitations: (i) insufficient amount of cfDNA, (ii) mutations not covered by the sequencing panel. Therefore, as a secondary objective of this study, a specific panel has been designed for the comprehensive sequencing of the *PIK3CA* gene, which encompasses the detection of a wider range of mutations associated with PROS. It is expected that the implementation of this panel can validate next-generation sequencing of cfDNA in liquid biopsy as a promising tool for diagnosing mutations in PROS syndrome.

Therefore, this study is intimately related to the Sustainable Development Goals (SDG) number 3, good health and well-being.

**Key words:** PROS; Liquid biopsy; Next generation Sequencing; *PIK3CA*, cell-free DNA

**Author:** Carla Ortuño Moya

**Location and date:** Valencia, Julio-1 2023

**Academic supervisor:** Eloisa Jantus Lewintre

**External supervisor:** Ester Munera Maravilla

## ÍNDICE:

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. ESPECTRO DE SÍNDROME DE PROS	1
1.1.1. <i>Descripción pato-fisiológica</i>	1
1.1.2. <i>Alteraciones genéticas: mutaciones en el gen PIK3CA</i>	2
1.1.3. <i>Diagnóstico</i>	3
1.1.4. <i>Tratamiento</i>	4
1.2. BIOPSIA LÍQUIDA	5
1.2.1. <i>La biopsia líquida como herramienta de diagnóstico</i>	6
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
3.1. MUESTRAS	9
3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	9
3.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES DE PLASMA	9
3.4. CUANTIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES LIBRES EN CIRCULACIÓN	10
3.5. NEXT GENERATION SEQUENCING	10
3.5.1. <i>Preparación de librerías</i>	11
3.5.2. <i>Generación de plantilla y secuenciación</i>	12
3.5.3. <i>Análisis de resultados</i>	12
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>13</b>
4.1. DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	13
4.2. CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DE LAS MUESTRAS	13
4.3. CONTROL CALIDAD RESULTADOS SECUENCIACIÓN	15
4.4. DETECCIÓN DE PIK3CA EN PLASMA Y CORRELACIÓN CON RESULTADOS EN TEJIDO	16
4.5. DISEÑO PANEL PERSONALIZADO PARA SECUENCIACIÓN	18
4.6. COMPARACIÓN DEL TIEMPO DE EMISIÓN DE RESULTADOS	18
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>22</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>23</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>27</b>
8.1. ANEXO A: APROBACIÓN COMITÉ ÉTICO	27
8.2. ANEXO B: MODELO CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO	29
8.3. ANEXO C: RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS ODS DE LA AGENDA 2030	35
8.4. ANEXO D: RECIBO TURNITIN	37

## ÍNDICE DE TABLAS:

<b>TABLA 1.</b> ALTERACIONES MOLECULARES GÉNICAS ESTUDIADOS POR EL PANEL DE SECUENCIACIÓN ONCOMINE™ PAN-CANCER CELL-FREE ASSAY.....	11
<b>TABLA 2.</b> MUTACIONES EN <i>PIK3CA</i> RECOGIDAS POR EL PANEL ONCOMINE™ PAN-CANCER CELL-FREE ASSAY. ....	11
<b>TABLA 3.</b> CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	13
<b>TABLA 4.</b> RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DEL cfdna EXTRAÍDO. ....	14
<b>TABLA 5.</b> PARÁMETROS RECOGIDOS DEL CONTROL DE CALIDAD DEL PROCESO DE SECUENCIACIÓN. ....	15
<b>TABLA 6.</b> RESULTADOS SECUENCIACIÓN <i>PIK3CA</i> EN BIOPSIA LÍQUIDA, JUNTO AL PORCENTAJE EN EL QUE SE DETECTAN Y EL LÍMITE DE DETECCIÓN DETERMINADO PARA CADA MUESTRA. ....	17
<b>TABLA 7.</b> COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN DE LAS MUTACIONES EN BIOPSIA LÍQUIDA Y TEJIDO, JUNTO A LA CARGA MUTACIONAL QUE PRESENTARON LOS PACIENTES EN TEJIDO. ....	17

## ÍNDICE DE FIGURAS:

<b>FIGURA 1.</b> A: SOBRECRECIMIENTO Y NEVO EPIDÉRMICO CON MALFORMACIONES CAPILARES. B: SOBRECRECIMIENTO CON DEFORMACIÓN DE PIE EN SANDALIA. C: MACRODACTILIA EN PIE IZQUIERDO EN UN INFANTE. EXTRAÍDO DE KALO ET AL., 2023, MIRZAA ET AL., 2012. ....	1
<b>FIGURA 2.</b> ESQUEMA GRÁFICO DEL FENOTIPO DE MOSAICISMO A CAUSA DEL TIEMPO Y EL LUGAR DE LA APARICIÓN DE LA MUTACIÓN DE <i>PIK3CA</i> . EXTRAÍDO DE MADSEN ET AL, 2018. ....	2
<b>FIGURA 3.</b> MUTACIONES MÁS COMUNES EN <i>PIK3CA</i> ANALIZADAS EN LAS ENFERMEDADES RECOGIDAS EN EL SÍNDROME DE PROS. EXTRAÍDO DE KEPPLER-NOREUIL ET AL., 2015. ....	3
<b>FIGURA 4.</b> COMPONENTES MOLECULARES LIBERADOS AL FLUJO CIRCULATORIO QUE ESTÁN PRESENTES EN UNA MUESTRA DE BIOPSIA LÍQUIDA. EXTRAÍDO DE MORENO-MANUEL ET AL., 2021. ....	5
<b>FIGURA 5.</b> FIGURA REPRESENTATIVA DEL ANÁLISIS DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR. cfDNA: DNA LIBRE EN CIRCULACIÓN; BP: PARES DE BASES. ....	14
<b>FIGURA 6.</b> FIGURAS ESQUEMÁTICAS OBTENIDAS DEL SOFTWARE DE CONTROL DE CALIDAD. A: ANÁLISIS DE LA DENSIDAD DE PARTÍCULAS ISP UTILIZADAS PARA LA SECUENCIACIÓN. B: COMPUTO TOTAL DE LECTURAS ÚTILES DE LA SECUENCIACIÓN DE LAS ISP Y DESGLOSE DE LAS LECTURAS ELIMINADAS DE LA LIBRERÍA FINAL. ISP: ION SPHERES PARTICLES. ....	16



## ABREVIATURAS:

**BL:** Biopsia Líquida

**bp:** *base pair* (par de bases)

**CDS:** *coding sequence* (regiones codificantes)

**cfDNA:** *cell-free DNA* (DNA libre en circulación)

**cfNA:** *cell-free nucleic acids* (Ácidos nucleicos totales libres en circulación)

**CNV:** *Copy number variant* (Variación en el número de copias)

**CHGUV:** Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

**CLOVES:** *Congenital Lipomatous Overgrowth, Vascular Malformations, Epidermal Nevis, Spinal/Skeletal Anomalies/Scoliosis* (Sobrecrecimiento congénito lipomatoso, malformaciones, nevus epidérmicos, anomalías/escoliosis espinales/esqueléticas).

**ctDNA:** *circulating tumor DNA* (DNA circulante tumoral)

**DMEG:** megalencefalia displásica

**dNTP:** Deoxinucleósido trifosfato

**EMA:** *European Medicine Agency* (Agencia Europea del Medicamento)

**ISP:** *Ion sphere particles* (Partículas esféricas de *ion*)

**KTS:** *Klippel-Trenaunay syndrome* (síndrome de Klippel-Trenaunay)

**LOD:** *Limit of detection* (Límite de Detección)

**MAF:** *Minor allele frequency* (Frecuencia del alelo minoritario)

**MV:** Malformación vascular

**NGS:** *Next Generation Sequencing* (Secuenciación de nueva generación)

**PI3K:** fosfoinositol 3-quinasa

**PROS:** *PIK3CA-related overgrowth spectrum* (Síndrome de sobrecrecimiento asociado a *PIK3CA*)

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**SNV:** *Single nucleotide variant* (Variación en un nucleótido)

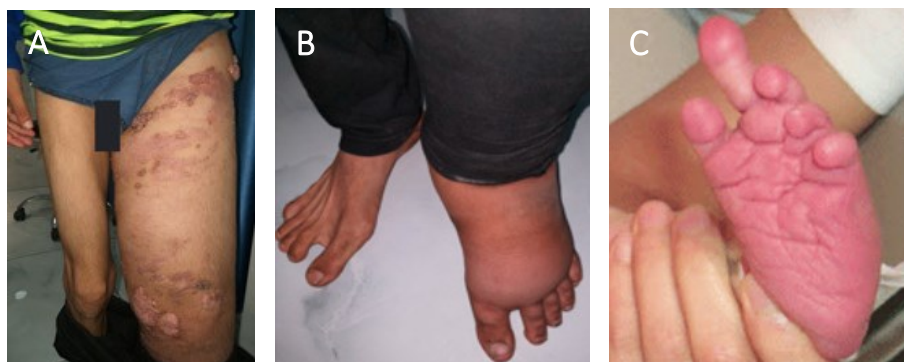
## 1. Introducción

### 1.1. Espectro de síndrome de PROS

#### 1.1.1. Descripción pato-fisiológica

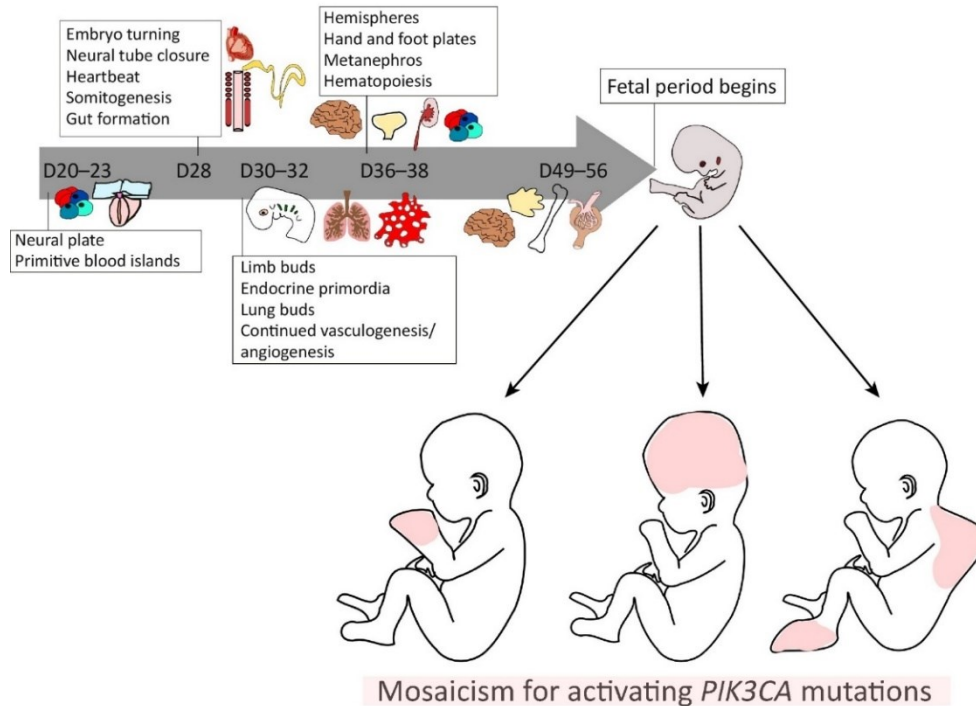
El espectro del síndrome de PROS (*PIK3CA-related overgrowth spectrum*) constituye un grupo de enfermedades poco comunes heterogéneas, causadas durante el desarrollo embrionario por mutaciones en el gen *PIK3CA*. Antes de la identificación de *PIK3CA* como gen causante, PROS se dividía en diversos síndromes clínicos dependiendo del lugar de afectación y el fenotipo del paciente (Keppler-Noreuil et al., 2014). Por ello, este síndrome recoge diversas enfermedades con una clínica y fenotipo semejante como son el sobrecrecimiento fibroadiposo (FAO), lipomatosis múltiple hemihiperplásica (HHML), síndrome de Klippel-Trenaunay (KTS), crecimiento lipomatoso congénito, macrodactilia, malformaciones vasculares, nevos epidérmicos, síndrome de sobrecrecimiento lipomatoso congénito, malformaciones vasculares, nevos epidérmicos, escoliosis/esquelético y espinal (CLOVES), macrodactilia, lipomatosis con infiltración fibroadiposa, síndromes de megalencefalia, malformación megalencefálica-capilar (MCAP) y megalencefalia displásica (DMEG) entre otras (Keppler-Noreuil et al., 2015).

La presentación clínica del síndrome de PROS es muy variada ya que los pacientes pueden presentar afectaciones a nivel endocrino, nervioso, renal, polidactilia, macrodactilia y malformaciones vasculares (Jansen et al., 2015) (Figura 1). Además, se encuentran en mayor riesgo de complicaciones tromboembólicas asociadas a las malformaciones vasculares (Zenner et al., 2021). Sin embargo, la afectación más característica de este síndrome es el sobrecrecimiento celular en forma de mosaico. El mosaicismo se define como la presencia en un individuo de dos o más poblaciones celulares con diferente genotipo (Mirzaa et al., 2016). En el caso de PROS, este mosaicismo ocurre a nivel somático y su extensión y lugar de afectación dependerá del momento del desarrollo embrionario en el que ocurrió la mutación (Figura 2).



**Figura 1.** A: Sobrecrecimiento y nevo epidérmico con malformaciones capilares. B: Sobrecrecimiento con deformación de pie en sandalia. C: Macrodactilia en pie izquierdo en un infante. Extraído de Kalo et al., 2023, Mirzaa et al., 2012.

### Timing and location of *PIK3CA* mutations determine phenotype



Trends in Molecular Medicine

**Figura 2.** Esquema gráfico del fenotipo de mosaicismo a causa del tiempo y el lugar de la aparición de la mutación de *PIK3CA*. Extraído de Madsen et al, 2018.

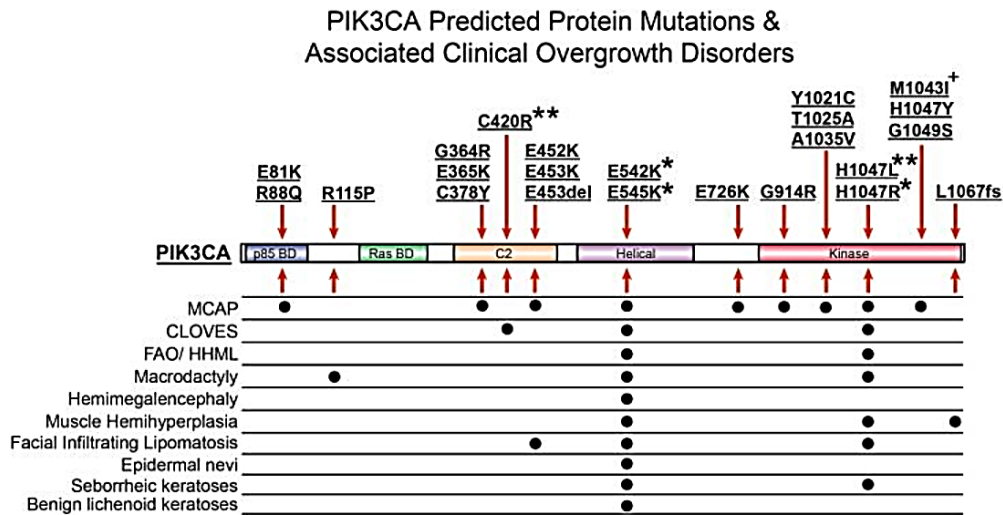
Las condiciones sintomáticas de PROS pueden afectar la calidad de vida de los pacientes y su entorno, generando diversos desafíos a nivel físico, emocional y social que van desde impactos funcionales y retrasos en el desarrollo hasta dolor crónico, problemas de movilidad y sentimientos de aislamiento. Asimismo, la baja prevalencia y gran variabilidad clínica deriva un diagnóstico largo y complejo (Iriarte Fuster et al., 2021), por ello, confirmar una mutación en *PIK3CA* puede contribuir a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

#### 1.1.2. Alteraciones genéticas: mutaciones en el gen *PIK3CA*

El gen *PIK3CA* codifica la subunidad catalítica alfa (p110a) de la proteína fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), la cual pertenece a la ruta señalización intracelular de PI3K-AKT-mTOR (Lee et al., 2012). PI3K cataliza la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) que actúa como mensajero secundario activando AKT. Una vez activa, la proteína AKT puede controlar procesos celulares relacionados, principalmente, con el ciclo celular. Así pues, mutaciones en el gen *PIK3CA* activan permanentemente esta ruta señalizando para un aumento en el metabolismo, angiogénesis y proliferación celular, junto a una reducción del proceso de apoptosis (Riquelme et al., 2016). De hecho, la mayor parte de desórdenes vasculares son causados por mutaciones post

cigóticas, activando variantes patogénicas en las rutas de PI3K-mTOR o RAS-MAPK (Zenner et al., 2021).

A pesar de que las mutaciones pueden aparecer a lo largo de todo el gen, se ha comprobado que los dominios helicasa y quinasa son los más afectados en el síndrome de PROS (Chang et al., 2017). En la Figura 3 quedan reflejadas las mutaciones más comunes, no obstante, hoy en día se siguen encontrando más mutaciones relacionadas con el síndrome de PROS.



**Figura 3.** Mutaciones más comunes en *PIK3CA* analizadas en las enfermedades recogidas en el síndrome de PROS. Extraído de Keppler-Noreuil et al., 2015.

### 1.1.3. Diagnóstico

A la hora de entender desórdenes de crecimiento en mosaico, hay numerosas limitaciones en el conocimiento, especialmente, en que metodología utilizar para analizarlos, que tejidos se deberían estudiar o incluso, que relación hay entre el fenotipo del paciente y su genotipo (Mirzaa et al., 2016). Actualmente, el *gold standard* para el diagnóstico del síndrome de PROS se basa en la determinación de las alteraciones moleculares en el gen *PIK3CA* en el tejido afectado y la ausencia de estas en tejido sano, lo que supone realizar una técnica invasiva e incómoda para el paciente. Debido al mosaicismo que presenta el espectro de PROS, el proceso de diagnóstico puede mostrar una baja correlación entre el nivel mutacional encontrado en el tejido analizado y la distribución de dicha mutación y, por tanto, deriva una elevada tasa de falsos negativos. Es decir, un resultado negativo no necesariamente excluye un diagnóstico clínico de PROS, ya que dicho resultado se puede deber a limitaciones, tanto en la obtención de la muestra, como en la propia secuenciación (Keppler-Noreuil et al., 2015).

Por otro lado, las muestras deben ser remitidas a centros externos para realizar el estudio, suponiendo esto una media de demora de dos años para el resultado final. Esta técnica tampoco permite una fácil monitorización del tratamiento, en la actualidad, la única monitorización validada de respuesta al tratamiento es la realización de resonancias magnéticas nucleares (RMN) seriadas con el sobrecoste que esto supone para el sistema de salud pública y las dificultades que pueden causarle a ciertos pacientes.

Debido a la clínica solapante de las enfermedades de sobrecrecimiento, la elevada tasa de falsos negativos y la escasez de técnicas para un correcto diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, gran parte de los pacientes son comúnmente maldiagnosticados. Por ello, la confirmación de una mutación en el gen *PIK3CA* mediante diagnóstico genético puede proporcionar alivio a algunos pacientes con problemas en su valoración clínica. Además, el diagnóstico genético empieza a tomar una gran relevancia y ser clave para dirigir el manejo de los pacientes, ya que ofrece la oportunidad de darles acceso a terapias dirigidas (Rodríguez-Laguna et al., 2022).

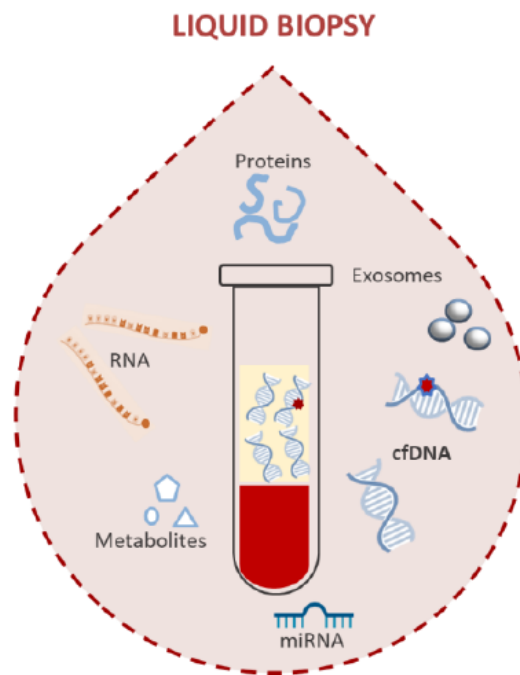
#### 1.1.4. Tratamiento

La principal opción de tratamiento para los pacientes de PROS, actualmente, consiste en la eliminación de la zona afectada mediante cirugía, la cual puede volver a aparecer pasado un tiempo (Pagliuzzi et al., 2021). El otro enfoque terapéutico se centra en controlar la sintomatología clínica mediante terapia farmacológica para poder mejorar la calidad de vida de los pacientes.

En los últimos años han surgido terapias dirigidas para mutaciones en *PIK3CA*. Concretamente, aquellos pacientes con el gen *PIK3CA* mutado se podrían beneficiar del fármaco *apellisib*, un inhibidor específico de la subunidad alfa de PI3K (André et al., 2019), que ya ha demostrado su eficacia en oncología. Fue aprobado para pacientes con cáncer de mama, *ER* positivas y *HER2* negativas, y por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) desde el 2021 como fármaco huérfano para enfermedades raras, como el síndrome de PROS. Se está, además, analizando la eficacia de este fármaco en varios ensayos clínicos en fase II (clinicaltrials.gov: NCT04589650, NCT04980833) para esta enfermedad.

## 1.2. *Biopsia líquida*

La biopsia líquida (BL) hace referencia a cualquier fluido biológico en el cual pueda determinarse un biomarcador y que este sea representativo del tejido en el que se ha producido. Está aportando una nueva dimensión y parece ser una alternativa fiable a las biopsias convencionales (Calabuig-Fariñas et al., 2016), ya que permite detectar y cuantificar diversos componentes celulares liberados al flujo circulatorio (Figura 4).



**Figura 4.** Componentes moleculares liberados al flujo circulatorio que están presentes en una muestra de biopsia líquida. Extraído de Moreno-Manuel et al., 2021.

Entre los componentes que se hallan presentes en la muestra de biopsia líquida encuentra el DNA libre en circulación (cfDNA). Estos ácidos nucleicos pueden ser liberados por las células sanas del individuo, tras pasar por procesos de apoptosis y necrosis, siendo sus niveles bajos en pacientes sanos (Crowley et al., 2013). Sin embargo, en algunas condiciones fisiológicas o patológicas como el embarazo, trasplante de órganos, inflamación exacerbada, daño celular o cáncer, el tejido afectado podría secretar DNA adicional a la circulación periférica (Yan et al., 2021).

Al contrario que una biopsia de tejido convencional, la biopsia líquida es mínimamente invasiva, más fácil de obtener y se considera una alternativa más segura ya que no implica un procedimiento quirúrgico. También presenta la ventaja de poder obtener la información en tiempo real, es posible repetirla múltiples veces para monitorizar a los pacientes y recapitula mejor la heterogeneidad que pueden presentar diversas patologías (Bai & Zhao, 2018). Por ello,

la biopsia líquida con el análisis de cfDNA, es una potente herramienta tanto para el diagnóstico como el seguimiento de alguna enfermedad con componente genético.

Por otro lado, presenta ciertas limitaciones biológicas, técnicas y socioeconómicas. La biopsia líquida requiere que todos los pasos del análisis estén bien validados y estandarizados, ya que pueden influir en la especificidad y sensibilidad de los resultados (Rolfo et al., 2020). Además, al ser plasma el medio principal que se utiliza para la obtención del cfDNA, escasez o alteraciones en este pueden alterar los resultados de la secuenciación. Una buena comprensión de los límites de las diferentes técnicas de biopsia líquida es esencial para una correcta interpretación de los resultados de las pruebas, así como para la elección de la metodología óptima.

### 1.2.1. La biopsia líquida como herramienta de diagnóstico

La biopsia líquida es actualmente un campo en desarrollo para el estudio y diagnóstico de enfermedades con componente genético. A pesar de que el conocimiento al respecto es todavía limitado, el análisis mediante biopsia líquida se ha expandido a numerosos campos médicos como pueden ser el diagnóstico prenatal (Gormus et al., 2021), análisis de fallos gestacionales (Qiao et al., 2022), diagnóstico de enfermedades contagiosas (Caya et al., 2023) e incluso en el estudio de enfermedades neurológicas (Cheng et al., 2023) proporcionando información valiosa sobre los mecanismos moleculares que subyacen en estos casos y patologías.

Uno de los campos en lo que la biopsia líquida ha tenido un importante papel en los últimos años es la oncología molecular. Actualmente, la biopsia líquida se ha convertido en una potente herramienta de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad oncológica y ya se encuentra en la cartera de servicios de varios hospitales, empleándose en la práctica clínica para cáncer de pulmón y de mama (Rolfo et al., 2020). Se utiliza para analizar mutaciones oncogénicas presentes en el DNA circulante tumoral (ctDNA), una fracción del cfDNA, que puede dar acceso a los pacientes a terapias dirigidas y facilitar la monitorización de la enfermedad.

Adicionalmente, en algunos estudios piloto, ya se ha analizado la utilidad de la biopsia líquida como herramienta de diagnóstico y monitorización en enfermedades raras (Nakamura et al., 2022), como el síndrome de PROS (Palmieri et al., 2021). En dichos estudios consiguieron, mediante el uso de muestras de biopsia líquida, determinar las mutaciones patogénicas características de las enfermedades estudiadas, en un gran porcentaje de los pacientes que analizaron.

La determinación de las mutaciones presentes en el cfDNA de la muestra de biopsia líquida se realiza mediante *Next Generation Sequencing* (NGS). La tecnología de NGS permite la secuenciación paralela con alto rendimiento de muchos genes y variantes al mismo tiempo. Hay diferentes aproximaciones a la hora de realizar NGS, sin embargo, una secuenciación dirigida permite una mayor especificidad y sensibilidad a la hora de detectar mosaicismo de bajo grado (Chang et al., 2017). Por ello, la biopsia líquida se propone como una potente alternativa para el estudio molecular de enfermedades raras con componente genético, que puede dar acceso a los pacientes a un diagnóstico temprano y más económico para el sistema de salud.



## **2. Hipótesis y objetivos**

El objetivo principal del presente trabajo, en base al conocimiento actual, se centra en analizar el uso de la biopsia líquida como posible alternativa a la biopsia de tejido para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes afectados por las enfermedades pertenecientes al espectro de PROS. Los objetivos específicos de este estudio son:

- Detectar mutaciones en el gen *PIK3CA* mediante NGS, a partir de cfDNA extraído del plasma de pacientes con síndrome de PROS.
- Correlacionar las mutaciones detectadas mediante biopsia líquida con los resultados obtenidos en biopsia de tejido.
- Comparar los tiempos desde la toma de muestra hasta la obtención de resultados mediante aproximación en tejido y en biopsia líquida, para el diagnóstico de pacientes con clínica de PROS.
- Diseñar un panel personalizado de NGS específico para el gen *PIK3CA* para el síndrome de PROS.

### **3. Materiales y métodos**

#### *3.1. Muestras*

En colaboración con el servicio de dermatología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV), se recolectó 1 tubo EDTA de 10 ml por venopunción de aquellos pacientes que presentaban un cuadro clínico del síndrome de PROS. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la institución (Anexo A: Aprobación Comité Ético) y todos los pacientes incluidos firmaron previamente el consentimiento informado (Anexo B: Modelo consentimiento informado de los pacientes del estudio).

#### *3.2. Procesamiento de las muestras de sangre*

Las muestras se centrifugaron a 1700 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para luego extraer la fracción superior, es decir, el plasma. Dicho plasma se vuelve a centrifugar a 6000 g durante 10 minutos, también a temperatura ambiente. Tras el procesamiento, el plasma obtenido se traslada a su criotubo definitivo de 4,5 mL y se guarda en el congelador de -80 °C para su uso posterior.

#### *3.3. Extracción de ácidos nucleicos totales de plasma*

La extracción de los ácidos nucleicos totales libres en circulación (cfNA) se realiza a partir de 5 ml del plasma obtenido anteriormente, utilizando el kit *MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Thermo Fisher), según las instrucciones del fabricante.

Brevemente, una vez descongeladas las muestras de plasma, estas se digieren con proteinasa K para eliminar posibles proteínas contaminantes y se añaden las bolas magnéticas con su correspondiente solución. Los fragmentos generados se unirán a las bolas magnéticas debido a interacciones electrostáticas, por lo que es importante que haya una distribución homogénea que nos permita capturar el mayor número posible de moléculas de la muestra.

Se realizan varios procesos de lavado de las bolas magnéticas, primero con su correspondiente solución de lavado y colocando los tubos en el imán durante 2 minutos y, luego, repitiendo el mismo proceso, pero con etanol al 80 %. Posteriormente, dichas bolas magnéticas se secan al aire y se añade la solución de elución, pero esta vez en una cantidad inferior, para así concentrar los ácidos nucleicos en un volumen menor. Tras la elución final de estos ácidos nucleicos en un volumen de 15 µL de la solución de elución, se procede a su cuantificación.

Debido a limitaciones presentadas por los kits usados posteriormente, el volumen final de este paso no puede incrementarse.

### 3.4. Cuantificación y control de calidad de ácidos nucleicos totales libres en circulación

La cuantificación de los ácidos nucleicos se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit *Qubit dsDNA HS Assay*, empleando 2  $\mu$ L de la solución final de cfNA. Este proceso se basa en una fluorimetría específica de DNA de doble cadena, aunque cabe recalcar que también habrá RNA presente en la muestra, sin embargo, para el estudio de mutaciones en *PIK3CA* no es relevante la presencia o el análisis del RNA. Por limitaciones establecidas por las técnicas y materiales utilizados, se necesitan una cantidad mínima de 20 ng de cfDNA.

Posteriormente, la calidad de las muestras se analiza mediante Agilent 4200 TapeStation™ system siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema requiere 1-2  $\mu$ L de las muestras y realiza una electroforesis para cada una de ellas, separadas en canales individuales, de manera automática.

### 3.5. Next Generation Sequencing

La secuenciación del cfDNA obtenido se realiza mediante la tecnología de secuenciación Ion Torrent™, en este estudio se usó específicamente el secuenciador Ion Chef™ Instrument y se siguieron los pasos indicados por el proveedor. El sistema de Ion Torrent™ aprovecha que la adición de un deoxinucleósido trifosfato (dNTP) al DNA libera un protón, entonces, mediante el uso de semiconductores, se miden las variaciones en el pH para determinar la secuencia de cada fragmento. Esta aproximación permite un flujo de trabajo más sencillo y rápido.

En este sistema existen 2 situaciones: hay incorporación de un dNTP o no hay emparejamiento. El secuenciador va introduciendo en el chip un tipo de dNTP tras otro, si el dNTP que se introduce se empareja y se incorpora, liberará un protón que producirá un cambio en el pH y se registra la alteración en voltaje en relación con la base incorporada. En el caso de que se incorporen dos bases iguales seguidas, el voltaje detectado será doble y el chip reconocerá las dos bases juntas. Por el contrario, si el dNTP introducido no se empareja con el de la secuencia y, por ende, no se añade, no se producirán cambios en el pH.

### 3.5.1. Preparación de librerías

Para la preparación de las librerías de NGS se utiliza el panel de secuenciación Oncomine™ Pan-Cancer *Cell-Free Assay*, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor. El panel utilizado es específico de oncología, permitiendo el análisis de más de 50 genes (Tabla 1). Sin embargo, para el presente trabajo solo se han considerado como relevantes las mutaciones en el gen *PIK3CA* recogidas en este panel, que quedan resumidas en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Alteraciones moleculares génicas estudiados por el panel de secuenciación Oncomine™ Pan-Cancer *Cell-Free Assay*.

SNV/Indels					CNVs			Fusiones	
<i>AKT1</i>	<i>EGFR</i>	<i>FLT3</i>	<i>KRAS</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>APC</i>	<i>CCND1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>ALK</i>	<i>FGFR3</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB2</i>	<i>GNA11</i>	<i>MAP2K1</i>	<b><i>PIK3CA</i></b>	<i>FBXW7</i>	<i>CCND2</i>	<i>FGFR1</i>	<i>BRAF</i>	<i>MET</i>
<i>AR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>RAF1</i>	<i>PTEN</i>	<i>CCND3</i>	<i>FGFR2</i>	<i>ERG</i>	<i>NTRK1</i>
<i>ARAF</i>	<i>ESR1</i>	<i>GNAS</i>	<i>MET</i>	<i>RET</i>	<i>TP53</i>	<i>CDK4</i>	<i>FGFR3</i>	<i>ETV1</i>	<i>NTRK3</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR1</i>	<i>HRAS</i>	<i>MTOR</i>	<i>ROS1</i>		<i>CDK6</i>	<i>MET</i>	<i>FGFR1</i>	<i>RET</i>
<i>CHEK2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>IDH1</i>	<i>NRAS</i>	<i>SF3B1</i>		<i>EGFR</i>	<i>MYC</i>	<i>FGFR2</i>	<i>ROS1</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IDH2</i>	<i>NTRK1</i>	<i>SMAD4</i>					
<i>DDR2</i>	<i>FGFR4</i>	<i>KIT</i>	<i>NTRK3</i>	<i>SMO</i>					

Nota. SNV: Variaciones en un nucleótido; CNV: Variaciones en número de copias.

**Tabla 2.** Mutaciones en *PIK3CA* recogidas por el panel Oncomine™ Pan-Cancer *Cell-Free Assay*.

Mutaciones en <i>PIK3CA</i> analizadas		
• p.R99Q	• p.E545Q	• p.T1025S
• p.393W	• p.E545K	• p.M1043V
• p.G106V	• p.E545G	• p.M1043I
• p.G118D	• p.E545A	• p.N1044K
• p.N345K	• p.E545D	• p.H1047Y
• p.C420R	• p.Q546E	• p.H1047R
• p.E453K	• p.Q546K	• p.H1047Y
• p.P539R	• p.Q546P	• p.H1047L
• p.E542K	• p.Q546R	• p.H1049R
• p.E542V	• p.E726K	

Para la amplificación de las dianas por PCR, se utilizan 13 µL de DNA, 2 µL del panel y otros 15 µL de la *master mix*. Una vez las librerías están amplificadas, se purificarán utilizando *beads* magnéticas. Para ello, se utiliza el Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (Beckman Coulter), y se incuban y limpian utilizando un imán y etanol absoluto. Finalmente, las librerías purificadas se eluirán utilizando Low TE Buffer y se cuantificarán utilizando el Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific) en el equipo de RTqPCR Lightcycler® 480 II (Roche). Por último, se diluyen las librerías a una concentración de 100 pM y se añaden a los tubos de muestras correspondientes.

### 3.5.2. Generación de plantilla y secuenciación

La generación de la plantilla se realiza de manera computacional en el servidor en línea de Ion Torrent™ utilizando el esquema que dicha web proporciona. En este esquema, se debe detallar el número de identificación específico asociado a cada una de las muestras. Una vez la platilla está generada, se procede a colocar los reactivos necesarios en el Ion Chef™ Instrument. Se instalan los chips correspondientes en el secuenciador y se añaden las librerías diluidas y ya combinadas en el tubo de muestras de librerías. Finalmente, se comprueba que el instrumento dispone de los materiales necesarios para la secuenciación y se siguen los pasos indicados en la pantalla del instrumento.

### 3.5.3. Análisis de resultados

El análisis de resultados de las muestras procesadas en NGS se ha realizado utilizando principalmente dos *softwares* aportados por la plataforma de secuenciación, cada uno utilizado en fases diferentes del análisis.

El análisis primario se realizó mediante el *Ion Torrent Suite™ Software* (ThermoFisher Scientific), y se revisó la calidad de la carrera y de las muestras secuenciadas. A continuación, las variantes encontradas se analizaron utilizando el *Ion Reporter™ Software* (ThermoFisher Scientific), donde también se revisan parámetros de control de calidad de cada una de las muestras, así como la frecuencia de la mutación que presenta el paciente. Los resultados se recopilarán y almacenarán en una base de datos para uso interno del laboratorio, con acceso restringido e información anónima del paciente.

## 4. Resultados

### 4.1. Descripción de los pacientes incluidos en el estudio

Para el desarrollo de este trabajo se empleó una cohorte de 11 muestras de sangre periférica de pacientes remitidos por el servicio de dermatología del CHGUV y que habían consentido su participación en el estudio. Todos los individuos fueron seleccionados por sospecha de alguna enfermedad catalogada dentro del espectro de PROS debido a su cuadro clínico. Los datos clínico-patológicos de los pacientes se muestran recogidos en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Identificación paciente (n=11)	Sexo	Edad	MV	Sobrecrecimiento	Afectaciones neurológicas	MV visceral
ID-01	M	3	Sí	Sí	Sí	No
ID-02	M	6	No	Sí	No	No
ID-03	M	7	Sí	No	No	No
ID-04	M	27	No	Sí	No	No
ID-05	M	32	Sí	Sí	Sí	No
ID-06	H	2	Sí	Sí	No	No
ID-07	H	3	Sí	Sí	Sí	No
ID-08	H	9	Sí	Sí	No	No
ID-09	H	16	Sí	No	No	No
ID-10	H	29	Sí	Sí	No	Sí
ID-11	M	22	No	Sí	No	No

Nota. MV: malformación vascular; H: hombre; M: mujer.

Se observa una distribución equitativa de pacientes de ambos sexos en el estudio (54,56 % mujeres y 45,44 % hombres) mientras que hay una mayor proporción de pacientes pediátricos (63,64 %) que de individuos adultos (36,36 %). Los pacientes incluidos en el estudio muestran características clínicas heterogéneas, desde sobrecrecimiento en diversas zonas del cuerpo hasta afectaciones neurológicas. Además, se observaron malformaciones vasculares viscerales en uno de los pacientes, identificado como ID-10, con afectación en la pared anterior de la vejiga.

Estos hallazgos resaltan la complejidad de la enfermedad y la importancia de considerar la variabilidad individual al desarrollar enfoques de diagnóstico y tratamiento.

### 4.2. Cuantificación y calidad de las muestras

Los datos obtenidos de la cuantificación del cfNA extraído quedan recogidos en la Tabla 4. Es importante destacar que el método empleado cuantifica el cfDNA presente en la muestra, pero en la extracción también se aísla el RNA en circulación. Estos ácidos nucleicos no son relevantes para el estudio del síndrome de PROS.

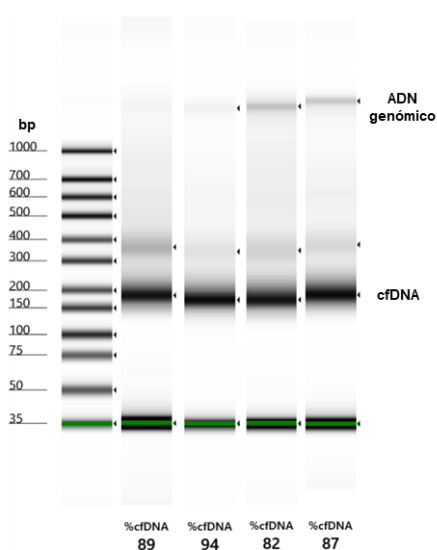
**Tabla 4.** Resultados de la cuantificación del cfDNA extraído.

Identificación paciente (n=11)	Cantidad cfDNA (ng)
ID-01	62,10
ID-02	30,15
ID-03	33,90
ID-04	17,55*
ID-05	96,15
ID-06	24,15
ID-07	45,00
ID-08	37,20
ID-09	32,85
ID-10	39,90
ID-11	17,55*

Nota. Las muestras marcadas con \* indican que la cantidad de cfDNA estudiado era menor a los límites establecidos. cfDNA: DNA libre en circulación.

Como se ha comentado anteriormente (apartado 3.4, Materiales y métodos), 20 nanogramos es la cantidad mínima de cfDNA requerida por el kit de secuenciación para garantizar unos resultados óptimos. La mayor parte de las muestras analizadas superaron este umbral, sin embargo, en los casos de ID-04 e ID-11, que no llegaron a la cantidad mínima exigida, se procedió igualmente con el fin de cumplir los objetivos del estudio.

Posteriormente, se comprobó la calidad del cfDNA mediante electroforesis capilar automatizada (Figura 5). Todas las muestras analizadas superaron el 80 % en cuanto a la composición de cfDNA, es decir, todas las muestras presentaron más de un 80 % de contenido en cfDNA, siendo el porcentaje restante contaminación de DNA genómico. Además, se puede apreciar que el tamaño medio del cfDNA extraído queda comprendido entre 150 y 200 pares de bases (bp), aproximadamente.



**Figura 5.** Figura representativa del análisis de calidad de las muestras mediante electroforesis capilar. cfDNA: DNA libre en circulación; bp: pares de bases.

### 4.3. Control calidad resultados secuenciación

Un total de 11 muestras de plasma de pacientes con sospecha clínica de PROS fueron procesadas y analizadas. Se aseguró en todo momento el cumplimiento de las normas de seguridad y calidad del laboratorio, así como el uso de los protocolos normalizados de trabajo. En la Tabla 5 quedan recogidos los parámetros del control de calidad obtenidos de la secuenciación. Adicionalmente, todas las muestras presentaron una uniformidad superior a 90 % y una cobertura por fragmento de 20000 X.

**Tabla 5.** Parámetros recogidos del control de calidad del proceso de secuenciación.

Identificación paciente (n=11)	Q20 (%)	Lecturas mapeadas	Tamaño medio lectura (bp)
ID-01	90,71	22.476.615	101
ID-02	89,05	15.518.372	96
ID-03	94,78	18.190.919	95
ID-04	90,73	16.544.294	91
ID-05	89,99	19.040.923	99
ID-06	90,92	16.893.594	97
ID-07	89,89	25.775.294	102
ID-08	88,18	19.295.411	97
ID-09	94,70	15.739.411	97
ID-10	90,54	17.319.323	98
ID-11	92,75	15.928.733	92

El primer parámetro para analizar es el Q20, que forma parte del nivel de calidad de Phred (*Phred quality score*). Es una medida de calidad en la identificación de las bases secuenciadas del DNA (Ewing et al., 1998) y define la probabilidad de encontrar un error al identificar una base mediante la Ecuación 1, siendo Q el índice de calidad de Phred y P la probabilidad de que el secuenciador cometa un error. Entonces, una puntuación de calidad de 20, Q20, representa una tasa de error de 1 en cada 100 bases determinadas, con una precisión asignada del 99%.

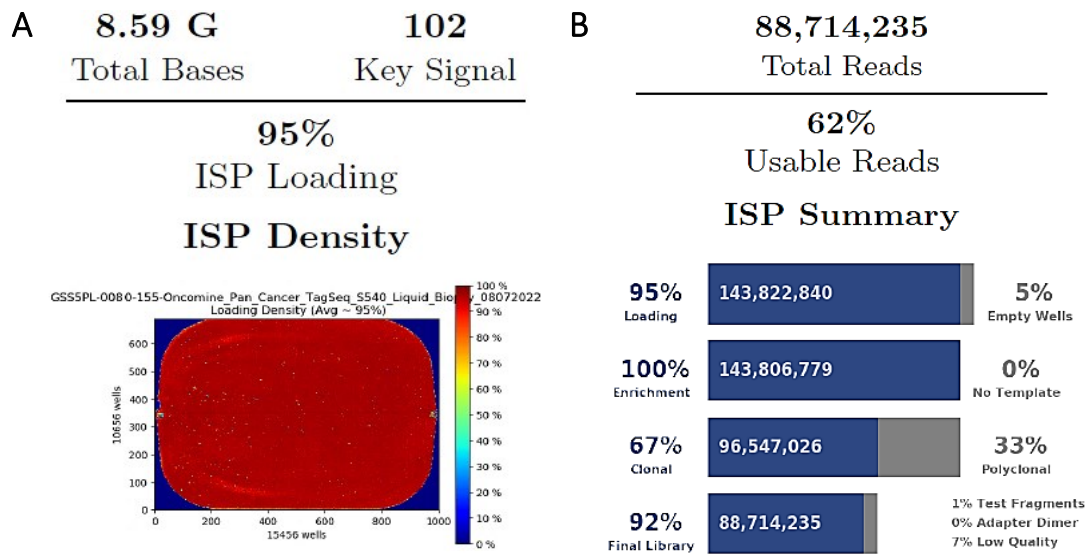
$$Q = -10 \log_{10} P \quad (1)$$

De los resultados recogidos, se ha observado que en todas las muestras más del 85 % de las bases secuenciadas superan el Q20. Aquellas bases, y con ello lecturas, que no pasaron el límite fueron descartadas por el *software* del estudio para evitar errores en el análisis.

Por otro lado, en el momento de cargar el chip de secuenciación, este ha de presentar una distribución uniforme de las partículas *Ion Sphere Particles* (ISP), de forma que la densidad mínima que puede mostrar es de un 90 %. Todos los chips que se utilizaron en este estudio exhibieron una densidad de ISP comprendida entre el 90 y el 100 % (Figura 6-A), indicando con un color rojo intenso las zonas correctamente cargadas. Este parámetro, junto a la cantidad de



cfDNA empleada, es crucial para un buen rendimiento de la secuenciación. Además, se establece que 10 millones de lecturas mapeadas es el mínimo para considerar que la cobertura y la información obtenida es suficiente para el análisis, característica que cumplieron todas las muestras del estudio. De estas lecturas, un al menos 60 % han de ser lecturas útiles (*usable reads*) como queda reflejado en la Figura 6-B. El último parámetro por analizar es el tamaño medio de lectura medido en bp y que se establece entre 90 y 110 bp. Todas las muestras analizadas presentaron un tamaño medio de lectura admitido en los rangos mencionados.



**Figura 6.** Figuras esquemáticas obtenidas del software de control de calidad. A: Análisis de la densidad de partículas ISP utilizadas para la secuenciación. B: Computo total de lecturas útiles de la secuenciación de las ISP y desglose de las lecturas eliminadas de la librería final. ISP: Ion Spheres Particles.

#### 4.4. Detección de PIK3CA en plasma y correlación con resultados en tejido

Los resultados de las determinaciones moleculares de *PIK3CA* en las muestras de biopsia líquida quedan recogidos en la Tabla 6. Se considera una mutación presente cuando la frecuencia del alelo minoritario (MAF), que en este caso el alelo minoritario hace referencia a la variante de *PIK3CA*, es mayor al límite de detección (LOD). Así pues, mediante biopsia líquida se determinó la mutación c.2176 G>A p.(E726K) para los pacientes ID-01 e ID-08 y c.1258 T>C p.(C420R) para ID-10.

**Tabla 6.** Resultados secuenciación *PIK3CA* en biopsia líquida, junto al porcentaje en el que se detectan y el límite de detección determinado para cada muestra.

Identificación paciente (n=11)	Mutación de <i>PIK3CA</i> en BL	MAF (%)	LOD
ID-01	c.2176 G>A p.(E726K)	1,6973	0,0769
ID-02	-	-	-
ID-03	-	-	-
ID-04	-	-	-
ID-05	-	-	-
ID-06	-	-	-
ID-07	-	-	-
ID-08	c.2176 G>A p.(E726K)	0,6151	0,0762
ID-09	-	-	-
ID-10	c.1258 T>C p.(C420R)	0,3486	0,1065
ID-11	-	-	-

*Nota.* Las muestras marcadas con un – indican que no se consiguió determinar la mutación en plasma. BL: biopsia líquida; MAF: frecuencia alelo minoritario; LOD: límite de detección.

A continuación, los resultados obtenidos por biopsia líquida se comparan con la información disponible de la determinación molecular en tejido (Tabla 7). Cabe destacar que a algunos pacientes se les realizó la determinación en biopsia líquida mientras se estaba a la espera del resultado de su muestra de tejido. Actualmente, cuatro pacientes siguen a la espera de sus resultados, quedando esto reflejado por el símbolo \*.

**Tabla 7.** Comparativa de los resultados de secuenciación de las mutaciones en biopsia líquida y tejido, junto a la carga mutacional que presentaron los pacientes en tejido.

Identificación paciente (n=11)	Mutación en BL	Mutación <i>PIK3CA</i> en tejido	Otras mutaciones en tejido	MAF tejido (%)
ID-01	c.2176 G>A p.(E726K)	*		
ID-02	-	*		
ID-03	-			
ID-04	-		IDH1: c.394 C>T p.(R132C)	3
ID-05	-	c.1133 G>A p.(C378Y)		4
ID-06	-	*		
ID-07	-			
ID-08	c.2176 G>A p.(E726K)	*		
ID-09	-			
ID-10	c.1258 T>C p.(C420R)	c.1258 T>C p.(C420R)		4
ID-11	-	c.1633 G>A p.(E545K)		15

*Nota.* Las muestras marcadas con un – indican que no se consiguió determinar la mutación en plasma y aquellas marcadas con \* significa que está pendiente el resultado de la determinación en tejido. BL: biopsia líquida; MAF: frecuencia alelo minoritario.

El paciente ID-05 no mostró mutación en biopsia líquida, sin embargo, presentó la mutación de *PIK3CA* c.1133 G>A p.(C378Y) cuando la determinación en tejido. Esta mutación no está incluida en el panel de secuenciación utilizado (Tabla 2), demostrando esto la necesidad de un panel específico que abarque más regiones de este gen. En cuanto al paciente ID-04, exhibió en tejido una mutación en otro gen, *IDH1*. Esta mutación sí que queda recogida en el panel, no obstante, no se pudo determinar mediante biopsia líquida, se desconoce si es debido a la baja cantidad de cfDNA que presentó la muestra. El único paciente para el cual se obtuvieron resultados de la secuenciación, tanto en biopsia líquida como en tejido, fue el ID-10, presentando la misma mutación en ambos casos. Por último, el paciente ID-11 no mostró presencia de ninguna mutación mediante biopsia líquida a pesar de haber presentado la mutación c.1633 G>A p.(E545K) en *PIK3CA* en el análisis tisular. Es preciso señalar que este paciente lleva un año de tratamiento con *alpelisib*, inhibidor específico de *PIK3CA* mencionado previamente, lo cual podría conllevar la no determinación de dicha mutación en la muestra de biopsia líquida.

#### 4.5. Diseño panel personalizado para secuenciación

Debido a la ausencia de paneles específicos de NGS para mutaciones en dermatología en el CHGUV, se ha procedido al diseño de un panel propio utilizando la herramienta Ion AmpliSeq Designer (ThermoFisher Scientific). Se ha diseñado un panel AmpliSeq HD con una elevada sensibilidad alélica, por lo que permite detectar mutaciones somáticas en muestras de biopsia líquida. El panel diseñado va dirigido a las regiones codificantes (CDS) del gen *PIK3CA*, y tiene un tamaño de 3,15 kb. Se ha logrado una cobertura de 87,33 %, por lo que quedan 459 pares de bases sin cubrir. No obstante, se revisaron las regiones no cubiertas utilizando el navegador genómico UCSC y ninguna de las variantes de interés plasmadas en la bibliografía se encuentra en esas regiones. Cabe mencionar que este panel personalizado cubre más de 150 *hotspot* y todas las variantes descritas previamente en la Figura 3.

#### 4.6. Comparación del tiempo de emisión de resultados

Como se ha mencionado anteriormente (apartado 1.1.3), el diagnóstico molecular del síndrome de PROS mediante biopsia de tejido supone una larga demora para los resultados, una media de dos años tras la extracción y envío de la muestra. No obstante, en este estudio, mediante biopsia líquida se consiguió reducir el tiempo de diagnóstico molecular de los pacientes con cuadro clínico de PROS a una sola semana, considerando el tiempo desde la toma de la muestra hasta la notificación del resultado a los pacientes.

## 5. Discusión

Las enfermedades raras, como el síndrome de PROS, se caracterizan por una baja prevalencia en la población. Por ello, los estudios que se centran en este tipo de enfermedades presentan dificultades a la hora de analizar los datos recogidos (Zenner et al., 2021). Entre estos problemas se destaca la heterogeneidad entre los pacientes (Tabla 3), la dificultad de incluir más muestras en el estudio y el escaso conocimiento de la enfermedad (Day et al., 2018). Adicionalmente, la recogida de las muestras en pacientes pediátricos supone otra limitación ya que la cantidad que se puede obtener es reducida, existen múltiples restricciones éticas (Corno, 2013) y el propio comportamiento de los pacientes puede alterar el proceso e incluso los resultados.

En cuanto a los resultados de este trabajo, se ha logrado determinar una mutación en *PIK3CA* en 3 pacientes, ID-01, ID-08 e ID-10, con un cuadro clínico con características del espectro del síndrome de PROS. A pesar de que los dos primeros pacientes mencionados siguen a la espera de los resultados de la biopsia tisular, en ID-10 se corroboraron los resultados obtenidos mediante biopsia líquida con una determinación molecular que se le realizó al paciente en tejido, el *gold standard* de diagnóstico de esta enfermedad. La biopsia líquida se muestra, entonces, como una alternativa prometedora a las biopsias convencionales, beneficiando a los pacientes de una reducción en los tiempos de diagnóstico. Al ser una técnica mínimamente invasiva, disminuiría el malestar de los pacientes y se podría aumentar la frecuencia de estudio para realizar seguimientos sobre el efecto del tratamiento (Ren et al., 2023). Asimismo, la determinación de biomarcadores mediante biopsia líquida se está convirtiendo en una de las pruebas estándar para el estudio de diversas enfermedades de componente genético, habiendo demostrado ya su utilidad y eficacia en el campo de la oncología (Rolfo et al., 2020)(Kopystecka et al., 2023). No obstante, al solo haber podido confirmar resultados en un caso, más estudios al respecto son necesarios para poder afirmar los beneficios de la biopsia líquida sobre la técnica de diagnóstico tradicional del síndrome de PROS.

El paciente ID-04 mostró en tejido una mutación en *IDH1* que no se pudo encontrar por biopsia líquida, aunque queda recogida en el panel utilizado. Esta muestra presentaba una concentración de cfDNA inferior a los 20 nanogramos requeridos por la metodología empleada, lo cual puede implicar una reducción en la sensibilidad y la incapacidad de detectar dicha mutación en biopsia líquida. El último paciente incluido en el estudio, ID-11, no presentó en el análisis mediante biopsia líquida la mutación que sí presentaba en tejido, si bien, dicho paciente llevaba, en el momento de extracción de la muestra, un año de tratamiento con un inhibidor

específico de *PIK3CA* (*alpelisib*). En otros inhibidores de quinasa, se ha visto una relación entre la efectividad del tratamiento y una bajada de los niveles de cfDNA (Barthelemy et al., 2023). Por ello, la efectividad del fármaco administrado podría incentivar una bajada de la concentración de cfDNA a niveles no patológicos y, con ello, la imposibilidad de detectar la mutación en la muestra de biopsia líquida.

Por otro lado, al paciente ID-05 se le detectó en la biopsia cutánea una mutación que no se reconoció mediante biopsia líquida, al no estar esa zona incluida en el panel utilizado. El panel OncoPrint™ Pan-Cancer *Cell-Free Assay* analiza múltiples regiones *hot-spot* de los genes mencionados en la Tabla 1, ya que su uso habitual es para el estudio de mutaciones oncológicas y no cubre los genes en su totalidad. Es por ello que se propone la creación y utilización de un panel específico para el estudio exclusivo de *PIK3CA*, que pueda abarcar regiones más amplias y cubrir, a su vez, más variantes. Se conjetura que, con la posibilidad de tener un panel único para *PIK3CA*, o incluso uno para enfermedades dermatológicas, se podría dar un diagnóstico a aquellos pacientes que no obtuvieron resultados ni en biopsia líquida ni en tejido, como son ID-02, ID-03, ID-06, ID-07 e ID-09.

Sin embargo, hay 3 grandes limitaciones a la hora de implantar la biopsia líquida en la práctica clínica como son el coste de la secuenciación, el requerimiento de grandes cantidades de un DNA de alta calidad y el intenso análisis de datos posterior a la secuenciación (Sisodiya et al., 2023). De hecho, un problema intrínseco que presenta la NGS en cuanto a su aplicación en la clínica, es el manejo de grandes cantidades de datos (Crowley et al., 2013) y su interpretación. Además, en este estudio se ha comprobado que no hay relación aparente entre la concentración de cfDNA y la MAF obtenida, en aquellos casos que sí se detectó una mutación. Aunque al ser un campo muy novedoso, la información disponible al respecto es escasa e inconclusa.

El diagnóstico molecular de PROS presenta otro gran reto en cuanto a las muestras biológicas y la metodología, debido a que las muestras pueden presentar cargas mutacionales variadas dependiendo del lugar de extracción de la muestra en el paciente y de la sensibilidad de la técnica empleada (Kuentz et al., 2017). De hecho, se ha visto que, en la vena eferente a la zona con mutación, se encuentra un mayor porcentaje de cfDNA (Palmieri et al., 2021) y que, si el paciente presenta MCAP, se puede llegar a detectar mutaciones en *PIK3CA* en muestras bucales de saliva (Kuentz et al., 2017). Estos hechos, junto al mosaicismo característico de la enfermedad, destacan la necesidad de un planteamiento más personalizado y enfocado a la clínica que presente cada paciente. Una mejor selección de la fuente de biopsia líquida podría contribuir a la optimización del proceso de diagnóstico molecular.

El futuro de la investigación de las enfermedades raras es incierto, pero como se ha demostrado, el estudio del síndrome de PROS va a estar marcado por las diferentes mejoras en las tecnologías de secuenciación genética. El desarrollo de paneles específicos, acceso a terapias dirigidas o incluso el aumento de la sensibilidad de las técnicas de secuenciación puede permitir a los profesionales un mejor entendimiento de las bases de la enfermedad que, al mismo tiempo, daría paso a una nueva etapa para los pacientes afectados por este síndrome. Cabe destacar que la investigación avanza rápidamente y los desarrollos futuros pueden traer avances adicionales en el diagnóstico molecular del síndrome PROS, así como en el conocimiento actual sobre la enfermedad.

## **6. Conclusiones**

En conclusión, la biopsia líquida para el análisis molecular del síndrome de PROS es un campo en desarrollo y más investigación es requerida para esclarecer su utilidad clínica, así como la estandarización de protocolos específicos en este contexto.

1. La biopsia líquida es una técnica que permite la determinación de alteraciones de *PIK3CA* en cfDNA de pacientes con cuadro clínico de PROS.
2. Existe correlación entre los resultados de tejido y los observados mediante biopsia líquida. Sin embargo, existen casos en los que no se pudo comprobar debido a la falta de resultados en tejido.
3. El diagnóstico en pacientes con clínica de PROS mediante biopsia líquida optimiza el tiempo desde la toma de las muestras hasta la obtención de resultados.
4. Se ha diseñado un panel de secuenciación específico de *PIK3CA* que pretende resolver las limitaciones observadas en la determinación de mutaciones en los pacientes del presente trabajo.

## 7. Bibliografía

- ANDRÉ, F., CIRUELOS, E., RUBOVSKY, G., CAMPONE, M., LOIBL, S., RUGO, H. S., IWATA, H., CONTE, P., MAYER, I. A., KAUFMAN, B., YAMASHITA, T., LU, Y.-S., INOUE, K., TAKAHASHI, M., PÁPAI, Z., LONGIN, A.-S., MILLS, D., WILKE, C., HIRAWAT, S., & JURIC, D. (2019). Alpelisib for PIK3CA -Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer . *New England Journal of Medicine*, 380(20), 1929–1940. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1813904>
- BAI, Y., & ZHAO, H. (2018). Liquid biopsy in tumors: opportunities and challenges. *Annals of Translational Medicine*, 6(Suppl 1), S89–S89. <https://doi.org/10.21037/ATM.2018.11.31>
- BARTHELEMY, D., LESCUYER, G., GEIGUER, F., GROLLEAU, E., GAUTHIER, A., BALANDIER, J., RAFFIN, M., BARDEL, C., BOUYSSOUNOUSE, B., RODRIGUEZ-LAFRASSE, C., COURAUD, S., WOZNY, A. S., & PAYEN, L. (2023). Paired Comparison of Routine Molecular Screening of Patient Samples with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in Circulating Cell-Free DNA Using Three Targeted Assays. *Cancers*, 15(5), 1574. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15051574>
- CALABUIG-FARIÑAS, S., JANTUS-LEWINTRE, E., HERREROS-POMARES, A., & CAMPS, C. (2016). Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in lung cancer-which one will win? *Translational Lung Cancer Research*, 5(5), 466–482. <https://doi.org/10.21037/TLCR.2016.10.02>
- CAYA, C., SINGH, A. E., SERHIR, B., MORIN, V., LIBMAN, M. D., CORSINI, R., GOLDFARB, D. M., WONG, T., XIA, Y., MAHEU-GIROUX, M., & YANSOUNI, C. P. (2023). Rapid diagnostic testing for syphilis in Arctic communities (the STAR study): A multisite prospective field diagnostic accuracy study in an intended-use setting. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2023.06.013>
- CHANG, F., LIU, L., FANG, E., ZHANG, G., CHEN, T., CAO, K., LI, Y., & LI, M. M. (2017). Molecular Diagnosis of Mosaic Overgrowth Syndromes Using a Custom-Designed Next-Generation Sequencing Panel. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 19(4), 613–624. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2017.04.006>
- CHENG, Y., XU, S.-M., TAKENAKA, K., LINDNER, G., CURRY-HYDE, A., & JANITZ, M. (2023). A Unique Circular RNA Expression Pattern in the Peripheral Blood of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome Patients. *Gene*, 877, 147568. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2023.147568>
- CORNO, A. F. (2013). Great challenges in Pediatrics. *Frontiers in Pediatrics*, 1(5), 40628. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fped.2013.00005>
- CROWLEY, E., DI NICOLANTONIO, F., LOUPAKIS, F., & BARDELLI, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(8), 472–484. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.110>
- DAY, S., JONKER, A. H., LAU, L. P. L., HILGERS, R. D., IRONY, I., LARSSON, K., ROES, K. C., & STALLARD, N. (2018). Recommendations for the design of small population clinical trials. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13023-018-0931-2/METRICS>



- EWING, B., HILLIER, L. D., WENDL, M. C., & GREEN, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, 8(3), 175–185. <https://doi.org/10.1101/GR.8.3.175>
- GORMUS, U., CHAUBEY, A., SHENOY, S., WONG, Y. W., CHAN, L. Y., CHOO, B. P., ORAHA, L., GOUSSEVA, A., PERSSON, F., PRENSKY, L., CHIN, E., & HEGDE, M. (2021). Assessment and Clinical Utility of a Non-Next-Generation Sequencing-Based Non-Invasive Prenatal Testing Technology. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(2), 958–964. <https://doi.org/10.3390/CIMB43020068>
- IRIARTE FUSTER, A., CERDÀ SERRA, P., & RIERA-MESTRE, A. (2021). PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): New insight in known diseases. *Medicina Clínica (English Edition)*, 157(10), 483–488. <https://doi.org/10.1016/J.MEDCLE.2021.03.018>
- JANSEN, L. A., MIRZAA, G. M., ISHAK, G. E., O'ROAK, B. J., HIATT, J. B., RODEN, W. H., GUNTER, S. A., CHRISTIAN, S. L., COLLINS, S., ADAMS, C., RIVIÈRE, J. B., ST-ONGE, J., OJEMANN, J. G., SHENDURE, J., HEVNER, R. F., & DOBYNS, W. B. (2015). PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain : A Journal of Neurology*, 138(6), 1613–1628. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWV045>
- KALO, C., KHANA, F., JAZMATI, A., KALO, S., ISHKHANIAN, S., KAYYALI, A., & SAWAS, T. (2023). PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): a rare case report. *Annals of Medicine and Surgery*, 85(5), 2001–2006. <https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000000485>
- KEPPLER-NOREUIL, K. M., RIOS, J. J., PARKER, V. E. R., SEMPLE, R. K., LINDHURST, M. J., SAPP, J. C., ALOMARI, A., EZAKI, M., DOBYNS, W., & BIESECKER, L. G. (2015). PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *American Journal of Medical Genetics*, 167A(2), 287–295. <https://doi.org/10.1002/AJMG.A.36836>
- KEPPLER-NOREUIL, K. M., SAPP, J. C., LINDHURST, M. J., PARKER, V. E. R., BLUMHORST, C., DARLING, T., TOSI, L. L., HUSON, S. M., WHITEHOUSE, R. W., JAKKULA, E., GRANT, I., BALASUBRAMANIAN, M., CHANDLER, K. E., FRASER, J. L., GUCEV, Z., CROW, Y. J., BRENNAN, L. M., CLARK, R., SELLARS, E. A., ... BIESECKER, L. G. (2014). Clinical delineation and natural history of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *American Journal of Medical Genetics*, 164A(7), 1713–1733. <https://doi.org/10.1002/AJMG.A.36552>
- KOPYSTECKA, A., PATRYN, R., LEŚNIEWSKA, M., BUDZYŃSKA, J., & KOZIOŁ, I. (2023). The Use of ctDNA in the Diagnosis and Monitoring of Hepatocellular Carcinoma-Literature Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9342. <https://doi.org/10.3390/IJMS24119342>
- KUENTZ, P., ST-ONGE, J., DUFFOURD, Y., COURCET, J. B., CARMIGNAC, V., JOUAN, T., SORLIN, A., ABASQ-THOMAS, C., ALBUISSON, J., AMIEL, J., AMRAM, D., ARPIN, S., ATTIE-BITACH, T., BAHU-BUISSON, N., BARBAROT, S., BAUJAT, G., BESSIS, D., BOCCARA, O., BONNIÈRE, M., ... RIVIÈRE, J. B. (2017). Molecular diagnosis of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) in 162 patients and recommendations for genetic testing. *Genetics in Medicine*, 19(9), 989–997. <https://doi.org/10.1038/GIM.2016.220>
- LEE, J. H., HUYNH, M., SILHAVY, J. L., KIM, S., DIXON-SALAZAR, T., HEIBERG, A., SCOTT, E., BAFNA, V., HILL, K. J., COLLAZO, A., FUNARI, V., RUSS, C., GABRIEL, S. B., MATHERN, G. W., & GLEESON, J. G. (2012). De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR

- pathway cause hemimegalencephaly. *Nature Genetics*, 44(8), 941. <https://doi.org/10.1038/NG.2329>
- MADSEN, R. R., VANHAESEBROECK, B., & SEMPLE, R. K. (2018). Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth Disorders. *Trends in molecular medicine*, 24(10), 856–870. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.08.003>
- MIRZAA, G. M., CONWAY, R. L., GRIPP, K. W., LERMAN-SAGIE, T., SIEGEL, D. H., DEVRIES, L. S., LEV, D., KRAMER, N., HOPKINS, E., GRAHAM, J. M., & DOBYNS, W. B. (2012). Megalencephaly-capillary malformation (MCAP) and megalencephaly-polydactyly-polymicrogyria-hydrocephalus (MPPH) syndromes: two closely related disorders of brain overgrowth and abnormal brain and body morphogenesis. *American Journal of Medical Genetics*, 158A(2), 269–291. <https://doi.org/10.1002/AJMG.A.34402>
- MIRZAA, G., TIMMS, A. E., CONTI, V., BOYLE, E. A., GIRISHA, K. M., MARTIN, B., KIRCHER, M., OLDS, C., JUUSOLA, J., COLLINS, S., PARK, K., CARTER, M., GLASS, I., KRÄGELOH-MANN, I., CHITAYAT, D., PARIKH, A. S., BRADSHAW, R., TORTI, E., BRADDOCK, S., ... DOBYNS, W. B. (2016). PIK3CA-associated developmental disorders exhibit distinct classes of mutations with variable expression and tissue distribution. *Journal of Clinical Investigation Insight*, 1(9). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.87623>
- MORENO-MANUEL, A., CALABUIG-FARIÑAS, S., OBRADOR-HEVIA, A., BLASCO, A., FERNÁNDEZ-DÍAZ, A., SIRERA, R., CAMPS, C., & JANTUS-LEWINTRE, E. (2021). dPCR application in liquid biopsies: divide and conquer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(1), 3–15. <https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1860759>
- NAKAMURA, Y., ONODERA, S., TAKANO, M., KATAKURA, A., NOMURA, T., & AZUMA, T. (2022). Development of a targeted gene panel for the diagnosis of Gorlin syndrome. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 51(11), 1431–1444. <https://doi.org/10.1016/J.IJOM.2022.03.054>
- PAGLIAZZI, A., ORANGES, T., TRAFICANTE, G., TRAPANI, C., FACCHINI, F., MARTIN, A., SEMERARO, A., PERRONE, A., FILIPPESCHI, C., & GIGLIO, S. (2021). PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum From Diagnosis to Targeted Therapy: A Case of CLOVES Syndrome Treated With Alpelisib. *Frontiers in Pediatrics*, 9, 930. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.732836/BIBTEX>
- PALMIERI, M., PINTO, A. M., DI BLASIO, L., CURRÒ, A., MONICA, V., SARNO, L. DI, DODDATO, G., BALDASSARRI, M., FRULLANTI, E., GILIBERTI, A., MUSSOLIN, B., FALLERINI, C., MOLINARO, F., VAGHI, M., RENIERI, A., & PRIMO, L. (2021). A pilot study of next generation sequencing-liquid biopsy on cell-free DNA as a novel non-invasive diagnostic tool for Klippel-Trenaunay syndrome. *Vascular*, 29(1), 85–91. <https://doi.org/10.1177/1708538120936421>
- QIAO, L., ZHANG, B., WU, X., ZHANG, C., XUE, Y., TANG, H., TANG, H., SHI, J., LIANG, Y., YU, B., & WANG, T. (2022). A fetal fraction enrichment method reduces false negatives and increases test success rate of fetal chromosome aneuploidy detection in early pregnancy loss. *Journal of Translational Medicine*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-022-03555-9>
- REN, X. D., SU, N., SUN, X. G., LI, W. M., LI, J., LI, B. W., LI, R. X., LV, J., XU, Q. Y., KONG, W. L., & HUANG, Q. (2023). Advances in liquid biopsy-based markers in NSCLC. *Advances in Clinical Chemistry*, 114, 109–150. <https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2023.02.004>

- RIQUELME, I., TAPIA, O., ESPINOZA, J. A., LEAL, P., BUCHEGGER, K., SANDOVAL, A., BIZAMA, C., ARAYA, J. C., PEEK, R. M., & ROA, J. C. (2016). The Gene Expression Status of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Gastric Cancer Tissues and Cell Lines. *Pathology Oncology Research : POR*, 22(4), 797. <https://doi.org/10.1007/S12253-016-0066-5>
- RODRÍGUEZ-LAGUNA, L., DAVIS, K., FINGER, M., AUBEL, D., VLAMIS, R., & JOHNSON, C. (2022). Mapping the PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) patient and caregiver journey using a patient-centered approach. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13023-022-02338-1/TABLES/4>
- ROLFO, C., CARDONA, A. F., CRISTOFANILLI, M., PAZ-ARES, L., DIAZ MOCHON, J. J., DURAN, I., RAEZ, L. E., RUSSO, A., LORENTE, J. A., MALAPELLE, U., GIL-BAZO, I., JANTUS-LEWINTRE, E., PAUWELS, P., MOK, T., & SERRANO, M. J. (2020). Challenges and opportunities of cfDNA analysis implementation in clinical practice: Perspective of the International Society of Liquid Biopsy (ISLB). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 151, 102978. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVNOC.2020.102978>
- SISODIYA, S., KASHERWAL, V., KHAN, A., ROY, B., GOEL, A., KUMAR, S., ARIF, N., TANWAR, P., & HUSSAIN, S. (2023). Liquid Biopsies: Emerging role and clinical applications in solid tumours. *Translational Oncology*, 35, 101716. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2023.101716>
- YAN, Y. Y., GUO, Q. R., WANG, F. H., ADHIKARI, R., ZHU, Z. Y., ZHANG, H. Y., ZHOU, W. M., YU, H., LI, J. Q., & ZHANG, J. Y. (2021). Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(639233), 192. <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2021.639233/BIBTEX>
- ZENNER, K., JENSEN, D. M., COOK, T. T., DMYTERKO, V., BLY, R. A., GANTI, S., MIRZAA, G. M., DOBYNS, W. B., PERKINS, J. A., & BENNETT, J. T. (2021). Cell-free DNA as a diagnostic analyte for molecular diagnosis of vascular malformations. *Genetics in Medicine*, 23(1), 123–130. <https://doi.org/10.1038/S41436-020-00943-8>

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo A: Aprobación Comité Ético



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación con medicamentos

#### APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

#### - ANEXO 11 -

Este CEIm tras evaluar en su reunión de 16 de Diciembre de 2022 el Proyecto de Investigación:

Título:	Utilidad clínica de la biopsia líquida en el diagnóstico y seguimiento de pacientes afectados de síndrome de pros		
I.P.:	Altea Esteve Martínez	Servicio/Unidad	Dermatología

Acuerda respecto a esta documentación:

REGISTRO: 100/2022  
Protocolo: Versión V.2; 30/11/2022  
HIP- HIP/CI Versión oct2022  
Que se cumplen los requisitos éticos y metodológicos y la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIm, por tanto se decide su APROBACIÓN.

#### COMPOSICIÓN DEL CEIm

**Presidente:** Dr. LOPEZ ALCINA, EMILIO (Especialista en Urología)

**Vicepresidente:** Dr. GARCIA DEL TORO, MIGUEL (Especialista en Enf.Infecciosas)

**Vocales:**

Dr., ALVAREZ PITI, JULIO (Especialista en Pediatría)

Dr. ANTON GARCIA, FRANCISCO (Especialista en M.Familia Atención Primaria)

Dra. LOPEZ ALARCON, DOLORES (Especialista Anestesia y Reanimación)

Dra. MARCAIDA BENITO, GOITZANE (Especialista en Análisis Clínicos)

Dr. MARTORELL ARAGONES, ANTONIO (Especialista en Pediatría)

Dra. MIR SANCHEZ CAROLINA (Especialista en M.Familia Atención Primaria)

Dra. OCETE MOCHON DOLORES (Especialista en Microbiología)

Dr. QUESADA DORADOR, AURELIO (Especialista en Cardiología)

Dra SAFONT AGUILERA, Mª JOSE (Especialista en Oncología)

Dr. VALDERRAMA ZURIAN JUAN CARLOS (Especialista en Historia de la ciencia y documentación)

Dr. SANCHEZ CARAZO, JOSÉ LUIS (Especialista en Dermatología)

Dr. SANCHEZ JUAN, CARLOS (Especialista en Endocrinología)

Dr. RUIZ ROJO, ELIAS (Farmacéutico de Atención Primaria)

Dra. PEDROS CHOLVI, CONSUELO (Especialista en Farmacología clínica)

Dra. OISHI KONARI, MIRIAM NATSUKI (Especialista en Otorrinolaringología)

Dr. PEREZ SILVESTRE, JOSE (Especialista en Medicina Interna)

Don GRACIA PEREZ FRANCISCO JAVIER (Enfermero)

Dña. MARTÍ MONROS, ANNA (Enfermera)

Doña SARMIENTO CABAÑES, Mª DEL CARMEN (Miembro independiente del centro)

Doña DOMINGUEZ GARCIA, CONCEPCION (Licenciado en derecho)

Dr. CORTIJO GIMENO, JULIO (Especialista en Farmacia)

Don MARTINEZ GARCIA, NEMESIO (Licenciado en derecho)

Secretaria Técnica: BERNALTE SESE, ALEJANDRO (Especialista en Farmacia Hospitalaria)

El CEIm del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) tanto en su composición como en sus procedimientos y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dr. Emilio Lopez Alcina (Presidente CEIm CHGUV)	
<b>EMILIO JOSE LOPEZ ALCINA</b>	<small>Firmado digitalmente por EMILIO JOSE LOPEZ  ALCINA Nombre de reconocimiento (DN): cn=EMILIO JOSE LOPEZ ALCINA, serialNumber=20001943Q, givenName=EMILIO JOSE, sn=LOPEZ ALCINA, ou=CIUDADANOS, o=ACCV, c=ES Fecha: 2022.12.22 13:07:30 +01'00'</small>

## 8.2. Anexo B: Modelo consentimiento informado de los pacientes del estudio



### DOCUMENTO DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONANTE: \_\_\_\_\_

ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	Oncología Molecular
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Dr. Carlos Camps
TLF CONTACTO (despacho)	963131800 Ext: 437461
EMAIL	Camps_car@gva.es
CENTRO	Servicio de Oncología Médica (SOM) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) y Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV)
EQUIPO INVESTIGADOR	Facultativos del SOM, personal de la Unidad de Investigación Clínica del SOM, y del laboratorio de Oncología Molecular, miembros de los servicios quirúrgicos involucrados (Cirugía Torácica, Cirugía General), facultativos del servicio de Anatomía Patológica.

**1. DESCRIPCIÓN GENERAL:** La línea de investigación de "Oncología Molecular" centra sus esfuerzos en la comprensión de la patogénesis de los eventos genéticos y moleculares implicados en el origen y la progresión del cáncer. Uno de los aspectos de mayor interés en esta línea de investigación es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser usados en la clínica y ayuden a la individualización del tratamiento del cáncer.

**PROPÓSITO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:** Analizar en diferentes tipos de muestras, factores que puedan ser importantes en el diagnóstico, pronóstico y en la respuesta del cáncer a los tratamientos empleados, así como en la aparición de efectos tóxicos asociados a dichos tratamientos. Si bien la constitución genética de los seres humanos es muy similar, existen pequeñas diferencias entre las personas que, en algunos casos podrían asociarse con el desarrollo o evolución de diferentes enfermedades. Por otra parte, los tumores también presentan diferencias a nivel genético que necesitan seguir siendo estudiadas. Por lo tanto, para poder llevar a cabo esta línea de investigación, es necesario disponer de muestras biológicas para poder realizar estos estudios genéticos. También es necesario recoger datos sobre su historial médico para obtener información que pudiera tener relevancia para nuestros estudios.

**2. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:** Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido en las instalaciones del CHGUV se tomarán muestras de sus tejidos y/o sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente una parte de la muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a una colección de muestras que se usará con fines de investigación biomédica, sin que esto suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. También es posible que le recojamos muestras biológicas que no requieran un procedimiento invasivo, como orina heces, saliva etc. o que el procedimiento de obtención sea mínimamente invasivo como una extracción de sangre. Las muestras que se almacenarán en una colección de muestras que corresponden a una Línea de Investigación sobre Oncología Molecular, que se encuentra en las instalaciones de la FIHGUV y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras solo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente y que hayan sido evaluados y aprobados por el CEIC, en los que participen miembros del equipo investigador que forma parte de esta línea de investigación.

**3. OBJETIVO:** El Centro Sanitario en el que usted está siendo atendido/tratado, dispone de investigadores que desean recoger y almacenar sus muestras biológicas para poder realizar proyectos de investigación biomédica en el área de la Oncología. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico, pronóstico y tratamientos.

**4. BENEFICIOS ESPERADOS:** Por su participación no percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Sin embargo, si las intervenciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

**5. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN:** Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información con la que contamos relacionada con su enfermedad.

Es posible, que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de los datos obtenidos en la investigación. A estos efectos se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que y se adjunta al presente documento.

**6. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.** La decisión de donar muestras biológicas es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se han llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

**7. RIESGOS.** El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestras sobrantes de la intervención, muestras invasivas obtenidas durante los procedimientos de diagnóstico, o muestras de sangre extra que se han obtenido para ser utilizadas en investigación. En este último caso, la extracción de sangre, apenas tiene efectos secundarios, lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días. En el caso de las muestras que requieren procedimientos más complejos o invasivos, estos sólo se realizarán si forman parte del procedimiento habitual que debe realizarse para su correcto diagnóstico o tratamiento de su enfermedad.

**8. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD.** Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el Investigador del Proyecto, que debe estar inscrita en un registro nacional dependiente del Instituto de Salud Carlos III y que debe cumplir con todos los requisitos legales. Sólo el INVESTIGADOR RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento y de garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación. La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias de los proyectos derivados de la Línea de Investigación, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento de la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

La cesión de muestras así como de la información contenida en las bases de datos vinculadas a las mismas, solo se realizará si forman parte de la línea de investigación en la cual participan miembros del equipo investigador, realizándose un procedimiento de codificación previo, que consiste en desligar la información que le identifica sustituyéndola por un código.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, y ejercer los derechos de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el



apartado 11) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al titular del centro el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de un documento acreditativo de su identidad.

**9. DESTINO DE LAS MUESTRAS TRAS FINALIZACION DE LA LÍNEA DE INVESTIGACION.** En el supuesto de finalización de la línea de investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones: a) la destrucción de la muestra sobrante, b) su utilización en otros proyectos de investigación biomédica, para lo cual, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al Biobanco del CHGUV (en el siguiente apartado le explicamos de manera resumida en que consiste un biobanco y cuáles son sus objetivos). En este caso, deberá marcar esta opción en el consentimiento incluido en este documento. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

**10. BIOBANCO. DEFINICIÓN Y OBJETIVOS.** El Biobanco del CHGUV es un establecimiento público, sin ánimo de lucro, que acoge una colección organizada de muestras biológicas. Estas muestras almacenadas en el biobanco, tienen por finalidad ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que hayan sido aprobados por los comités ético y científico a los que esté adscrito el biobanco. Los resultados de las investigaciones realizadas con estas muestras pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades o en nuevas formas de tratamientos de las mismas. Sus muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.



## 11. DECLARACIONES Y FIRMAS.

### Declaración del donante:

D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ y nº de SIP \_\_\_\_\_

D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ y nº de SIP \_\_\_\_\_

### DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes del procedimiento
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán tratados de acuerdo a la legislación vigente.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas. Esta eliminación no se extenderá a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo
- Que en cualquier momento, yo, mi representante legal, o tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, puedo solicitar información sobre los datos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

### CONSIENTO

- Que el CHGUV y la FIGUV, a través de los miembros del equipo investigador de la Línea de Investigación: "Oncología Molecular", utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas dentro del marco de la línea de investigación antes mencionada, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.
- Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de: (márquese con una cruz lo que proceda)
  - Mis tejidos excedentes
  - Muestra de heces, orina o saliva
  - Muestra de sangre
  - Muestras obtenidas en procedimientos que sean necesario para el diagnóstico
- Yo, mi representante legal o tutor, accedo (márquese sí o no) a que los miembros del equipo investigador puedan contactarme en el futuro en el caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.
  - Sí
  - No
- Que en el supuesto de finalización de la línea de investigación, mis muestras sean (márquese con una cruz lo que proceda)
  - destruidas
  - cedidas al Biobanco del CHGUV y anonimizadas
  - cedidas al Biobanco del CHGUV codificada, junto a los datos clínicos asociados.

D. Dña : \_\_\_\_\_ FIRMA: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

### DECLARACIÓN DEL PROFESIONAL DE SALUD:

He informado debidamente al donante:

Nombre facultativo: \_\_\_\_\_ DNI \_\_\_\_\_ Colegiado Nº \_\_\_\_\_

FIRMA : \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_



## 12. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.

Yo, D./Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_, revoco el consentimiento prestado en fecha \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_

Yo, D./Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ como representante legal de D./ Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ revoco el consentimiento prestado en fecha \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_



SOLICITUD DE INFORMACION DE DATOS O RESULTADOS DERIVADOS DE LAS INVESTIGACIONES

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	Oncología Molecular
------------------------	---------------------

PACIENTE: \_\_\_\_\_

D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ y nº de SIP _____
D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ _____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente _____, con DNI _____ y nº de SIP _____

SOLICITO

Ser informado/a del resultado de las investigaciones realizadas con la/las muestra/s donada/s de manera voluntaria en fecha \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

### 8.3. Anexo C: Relación del trabajo con los ODS de la agenda 2030

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) son un conjunto de objetivos globales que fueron adoptados por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) el 25 de septiembre de 2015, como parte de la Agenda 2030. Estos objetivos buscan abordar los desafíos sociales, económicos y ambientales que enfrenta el mundo y fomentar un desarrollo sostenible en todas sus dimensiones. Resulta, por tanto, de gran importancia hacer cumplir estos objetivos en la práctica profesional y en todos los ámbitos.

El presente trabajo se encuentra estrechamente relacionado con el ODS 3 (Tabla C-1), que tiene como finalidad garantizar una vida sana y promover el bienestar de la población. En concreto, se puede relacionar con el punto 3.4 que propone para 2030, reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles mediante la prevención y el tratamiento y promover la salud mental y el bienestar. El marco del ODS 3 pretende garantizar que las personas con enfermedades raras, como el síndrome de PROS, tengan acceso a servicios de salud integrales y de calidad, incluyendo diagnóstico temprano, atención médica especializada, medicamentos y terapias apropiadas, así como apoyo psicológico y social. Esto implica fortalecer los sistemas de salud, promover la investigación y la innovación en el campo de las enfermedades raras, y fomentar la cooperación internacional para compartir conocimientos y recursos. Además, el ODS 3 también aboga por la reducción de las desigualdades en el acceso a la atención médica. Dado que las enfermedades raras a menudo afectan a grupos minoritarios y vulnerables, es fundamental garantizar que todas las personas, independientemente de su condición o ubicación geográfica, tengan igualdad de oportunidades para recibir un diagnóstico y tratamiento adecuados a situación.

**Tabla C-1.** Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

#### 8.4. Anexo D: Recibo Turnitin



## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Carla Ortuño Moya  
Título del ejercicio: GENERAR INFORME TURNITIN TFGTFM ETSEAMN  
Título de la entrega: 49181676:TFG\_Carla\_Ortuño.pdf  
Nombre del archivo: nments\_680310e5-1a87-4b80-a2ff-2ef7f290df40\_TFG\_Carla\_...  
Tamaño del archivo: 1.39M  
Total páginas: 42  
Total de palabras: 10,562  
Total de caracteres: 56,578  
Fecha de entrega: 29-jun.-2023 04:40p. m. (UTC+0200)  
Identificador de la entrega: 2124355103

