TESIS DE DOCTORADO

RADIOGENÓMICA EN CÁNCER DE PULMÓN Y MÁS ALLÁ: VALIDACIÓN FUNCIONAL DE LA REGIÓN GENÓMICA 2q24.1

MIGUEL ELÍAS AGUADO BARRERA

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

« RADIOGENÓMICA EN CÁNCER DE PULMÓN Y MÁS ALLÁ: VALIDACIÓN FUNCIONAL DE LA REGIÓN GENÓMICA 2q24.1 »

D. ***MIGUEL ELÍAS AGUADO BARRERA***,

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Santiago de Compostela, 1 de diciembre de 2019

Fdo. **MIGUEL ELÍAS AGUADO BARRERA**

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

« RADIOGENÓMICA EN CÁNCER DE PULMÓN Y MÁS ALLÁ: VALIDACIÓN FUNCIONAL DE LA REGIÓN GENÓMICA 2q24.1 »

Dña. Ana Paula Vega Gliemmo

D. Ángel Carracedo Álvarez

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. **MIGUEL ELÍAS AGUADO BARRERA**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

Santiago de Compostela, 1 de diciembre de 2019

Fdo. Dña. Ana Paula Vega Gliemmo

Fdo. D. Ángel Carracedo Álvarez

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Parte de la tesis fue financiada por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), por la iniciativa del Ministerio de Economía e Innovación, parcialmente apoyada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI19 / 01424; PI16 / 00046; PI13 / 02030; PI10 / 00164), y a través del Gobierno Autónomo de Galicia (Programa de consolidación y estructuración: IN607B)

El doctorando recibió el apoyo del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (Axudas Predoutorais IDIS-2013, 28/04/2014-28/04/2019)

El doctorando **declara no tener ningún conflicto de interés en relación con esta tesis doctoral.**

Santiago de Compostela, 1 de diciembre de 2019

Doctorando: **Miguel Elías Aguado Barrera**
NIE: Y2625529-R

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

El cáncer de pulmón es el cáncer con mayor incidencia a nivel mundial en ambos sexos, con una incidencia global de 2,09 millones de nuevos casos. La radioterapia será parte del tratamiento de aproximadamente dos tercios de estos pacientes. Durante el tratamiento radioterápico, el tejido sano es inevitablemente irradiado por lo que algunos pacientes presentarán reacciones adversas que afectarán su calidad de vida. La radiogenómica estudia la variación genética asociada con dicha respuesta a la radioterapia. Se han descrito algunos genes asociados con el desarrollo de toxicidad en respuesta a la radiación, como es el gen *TANC1*, asociado con toxicidad global tardía en pacientes con cáncer de próstata. El presente trabajo se centra en la radiogenómica del cáncer de pulmón y en el estudio de las propiedades y caracterización funcional en respuesta a la radiación del gen *TANC1*.

En el estudio de variantes genéticas asociadas al desarrollo de toxicidad en cáncer de pulmón no microcítico hemos realizado las siguientes aproximaciones: i) Realizamos, en nuestra cohorte de pacientes, un estudio de validación de los resultados reportados hasta el momento a partir de estudios gen candidato; ii) Realizamos un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) teniendo en cuenta toxicidad aguda, tardía, así como toxicidades específicas asociadas a la irradiación del pulmón; iii) Evaluamos el riesgo poligénico de desarrollar cáncer de pulmón como predictor de riesgo de toxicidad a la radioterapia y iv) Analizamos las variantes del gen *TANC1* en relación a la toxicidad de los pacientes de cáncer de pulmón tratados con radioterapia.

En el estudio de las propiedades del gen *TANC1* y su caracterización funcional nos hemos centrado en: i) Identificar un modelo celular para estudiar funcionalmente al gen *TANC1,* así como estudiar el efecto de la radiación ionizante en dicho modelo; ii) Localizar a la proteína *TANC1* y evaluar el efecto de su silenciamiento génico; iii) Estudiar el efecto de la radiación ionizante cuando el gen *TANC1* está silenciado.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Esta tesis está dedicada a mi hija,
una campeona, que me enseñó de valentía
y fortaleza desde el primer momento en que llegó,

a Xanat

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis. Gracias Ana Vega, por tu confianza, por tu dedicación y sobre todo por tu paciencia. Por tener siempre un momento para atenderme y ayudarme a concretar y aterrizar cuando las ideas lo nublan todo; por supuesto, muchas gracias por guiarme en esta tesis y en los otros tantos proyectos en los que colaboramos. Gracias Ángel Carracedo, por haber confiado en mí desde el primer momento en que nos conocimos, fuiste clave en mi decisión de venir a Santiago de Compostela y fue también gracias a tu apoyo que logré quedarme un poco más de lo esperado. Hay mucho que aprender de ti, ¡muchas gracias!

Esta tesis ha sido posible en gran medida, gracias al inagotable apoyo, día a día, más allá del laboratorio, como investigadora, compañera, amiga y esposa. Muchas gracias Majo, por compartir tus conocimientos y ayudarme a entender un poco de ese mundo *in vitro* que tanto te apasiona.

Al grupo de Genética en Cáncer y Enfermedades Raras: gracias a Belinda siempre dispuesta a ayudarme; Olivia, gracias por tu ayuda hasta el último momento; Juan, gracias por siempre hacer un espacio entre tanto trabajo y echarme la mano; Uxía, gracias por aquella risa contagiosa que se echa de menos por acá; Dra. Paloma Sosa, has sido un gran apoyo, gracias por esa alegría y energía que transmites; Laura, llegaste en el momento justo, gracias por tu ayuda; Marta, Ana Blanco, Pablo, Belén, Ana Crujeiras y tantos con los que he coincidido en este periodo, ¡muchas gracias!

Al departamento de Oncología Radioterápica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, al Dr. Antonio Gómez Caamaño por su apoyo en todos estos años, al Radiofísico Ramón Lobato con tu ayuda es que fue posible gran parte de esta tesis. Al equipo completo de médicos oncólogos radioterápicos con los que he trabajado, la Dra. Patricia Calvo, Dra. Begoña Taboada, Dra. Ana Carballo, Dra. Paula Peleteiro, Dra. Ana Varela, Dra. Inés Formoso, Dra. Laura Torrado, al equipo de radiofísica, al personal de enfermería, en especial a Isabel Domínguez. Al personal técnico del departamento ¡muchas gracias a todos!

Al *Radiogenomics Consortium* y a REQUITE, ¡muchas gracias! ha sido un privilegio convivir y aprender de tan grandes investigadores. En especial Catharine West, Sarah Kerns, Alison Dunning, Laura Fachal, Gillian Barnett, Jenny Chang-Claude, Chris Talbot, Sara Gutierrez, Tiziana Rancati, Søren Bentzen, Dirk de Ruysscher, Corinne Faivre-Finn, Carsten Herskind, Marlon Veldwijk, Barry Rosenstein y muchos más.

La parte experimental habría sido aún más complicada sin la ayuda de muchas personas con los que coincidí en el IDIS, los cuales no tuvieron problema en compartir su experiencia y en más de una ocasión algún reactivo para 'hacer una prueba', gracias especiales a Marta Alonso y Ángel Fernández, a Sandra Alijas y Luis Andrade, Sabela da Silva, Jessie, Alba, Gus, Carmen, Pablo, Cristina Castro, por mencionar algunos. A los miembros del grupo GENVIP y GenPoB, Toño, Federico, Albert, Miriam, Rut, Sara, Xabi, Mirian, Belén, a todos gracias por su apoyo. Gracias a Marta Picado, por las excelentes imágenes del microscopio confocal.

Un agradecimiento especial a los miembros y ex miembros del grupo de Medicina Xenómica con los que he coincidido en este tiempo. A todo el personal de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, a mis compañeros de despacho Ceres, Jorge, Rita. Al equipo de

CEGEN - PRB3 - ISCIII (nodo Santiago), en especial a Juan Ansede, José Suarez e Inés Quintela.

Y fuera del ámbito profesional, debo agradecer a mi familia, que es mi punto de apoyo. Gracias a mi mamá Elva Barrera por ser un gran ejemplo, apoyar mis decisiones, motivarme siempre a seguir adelante y cumplir mis sueños; a mi papá por enseñarme a volar; a mi hermana Jeanett por siempre estar a mi lado, a mis ahijados Emiliano y Damián, por cada saludo y sonrisa que me ayudan a seguir adelante, a mi Abi por ese cariño que atraviesa océanos. A mis suegros Luisa y Enrique, a mi cuñada Fer, a Marisa. Dulce, como siempre un sitio especial para agradecerte el estar siempre con nosotros. A los amigos de aquí, a los amigos de allá y a los amigos de siempre ¡gracias a todos!

He reservado el último sitio en este apartado de agradecimientos para los que considero son los grandes merecedores de mi gratitud. Muchas gracias a cada uno de los pacientes con cáncer de pulmón que aceptaron participar en este estudio, los resultados de esta tesis son una pequeña parte de la contribución real que se obtendrá gracias a su participación. Todos los que trabajamos en el área de Radiogenómica estamos trabajando intensamente para poder ayudar a mejorar su calidad de vida e intentar personalizar su tratamiento. Mi respeto, admiración y profundo agradecimiento a ustedes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LISTA DE ABREVIATURAS

2DRT:	Radioterapia bidimensional
3DRT:	Radioterapia conformacional tridimensional
ADD;	Modelo genético aditivo
ADN:	Ácido desoxiribonucléico
Al:	Alelo
Alt:	Alelo alterado
bioDBnet	Red de Bases de Datos Biológicas (Siglas en inglés)
BED:	Dosis biológica equivalente (Siglas en inglés)
CCV:	Variantes causales creíbles (Siglas en inglés)
Chr:	Cromosoma
CRT:	Quimioradioterapia
CTCAE:	Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos (Siglas en inglés)
Ctrl:	Controles
CTV:	Volumen blanco clínico (Siglas en inglés)
DART:	Radioterapia adaptada a la respiración (Siglas en inglés)
dNTPs:	Deoxinucleósido trifosfato (Siglas en inglés)
ddNTPs:	Dideoxinucleótidos (Siglas en inglés)
DE:	Desviación estándar
DLCO:	Capacidad de difusión pulmonar (Siglas en inglés)
DLCO/VA:	Capacidad de difusión pulmonar corregido por el volumen alveolar (Siglas en inglés)
DMEM:	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DOM:	Modelo genético dominante
Dosis Max 1cc:	dosis máxima administrada en 1 centímetro cúbico del órgano de riesgo
DVH:	Histogramas dosis-volumen (Siglas en inglés)
EBUS:	Ecobroncoscopia

ECG:	Electrocardiograma
ECOG:	*Eastern Cooperative Oncology Group*
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EORTC:	Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (Siglas en inglés)
EPACTS:	*Efficient and Parallellizable Association Container Toolbox*
EPOC:	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
eQTL:	Loci de rasgos cuantitativos de expresión (Siglas en inglés)
ESMO:	Sociedad Europea de Oncología Médica (Siglas del inglés)
EUS:	Ecoendoscopia esofágica
FA:	Frecuencia Alélica
FEV1:	Volumen espiratorio forzado en el primer Segundo (Siglas en inglés)
FDR:	Tasa de falsos descubrimientos (Siglas en inglés)
FITC:	isotiocianato de fluoresceína (Siglas en inglés)
FOCAL:	Fusión de tomografía computarizada y acelerador lineal (Siglas en inglés)
FPGMX:	Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica
FVC:	Capacidad vital forzada (Siglas en inglés)
Geno:	SNP genotipado
GO:	Ontología de genes (Siglas en inglés)
GTV:	Volumen tumoral macroscópico (Siglas en inglés)
GWAS:	Estudios de asociación de genoma compleeto (Siglas en inglés)
HR:	Hazard ratio
HWE:	Equilibrio de Hardy-Weinberg (Siglas en inglés)
IARC:	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (Siglas del inglés)
IASLC:	Asociación Internacional para el estudio del cáncer de pulmón (Siglas en inglés)
IC:	Intervalo de confianza
ICRU:	Comisión Internacional de Unidades y Mediciones de Radiación (Siglas en inglés)
iCHAV:	Conjunto independiente de variantes altamente asociadas correlacionadas (Siglas en inglés)
IECA:	Antihipertensivo del grupo de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

IGRT:	Radioterapia guiada por imagen (Siglas en inglés)
IMC:	Indice de masa corporal
Imp:	SNP imputado
IMRT:	Radioterapia de intesnsidad modulada (Siglas en inglés)
KPS:	Escala Karnofsky de estatus funcional
MAF:	Frecuencia del alelo menor (Siglas en inglés)
MedDRA:	Diccionario médico para la regulación de actividades (Siglas en inglés)
MOI:	Índice de Multiplicidad de Infección (Siglas en inglés)
MSEF:	Puntuación de la Función Eréctil – Mont Sinai (Siglas en inglés)
NA:	Dato no disponible (Siglas en inglés)
NCI:	Instituto Nacional del Cáncer (Siglas en inglés)
NIH:	Institutos Nacinoales de Salud en Estados Unidos (Siglas en inglés)
NSCLC:	Cáncer de pulmón no microcítico (Siglas en inglés)
OR:	*Odds ratio* (Siglas en inglés)
PCA:	Análisis de Componentes Principales (Siglas en inglés)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PET-FDG:	Tomografía por emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa (Siglas en inglés)
PET:	Tomografía por emisión de positrones
PRS:	Puntaje de riesgo poligénico (Siglas en inglés)
PTV:	Volumen blanco de planificación (Siglas en inglés)
PVDF:	Membrana de baja fluorescencia de Fluoruro de Polivinilideno (Siglas en inglés)
R1:	Márgenes de resección positivos
REC:	Modelo genético recesivo
Ref:	Alelo de referencia
RGC:	*RadioGenomics Consortium*
RIET:	Toxicidad esofágica inducida por radiación (Siglas en inglés)
RILA:	Ensayo de apoptosis inducida por la radiación (Siglas en inglés)
RM:	Resonancia magnética
RT:	Radioterapia

RTOG:	Puntuación de morbilidad por radiación tardía del grupo de Oncología Radioterápica
SBRT:	Radioterapia estereotáxica corporal (Siglas en inglés)
SCLC:	Cáncer de pulmón microcítico / de células pequeñas (Siglas en inglés)
SEOR:	Sociedad Española de Oncología Radioterápica
sh:	*Short hairpin*
SHIM:	Cuestionario Inventario de Salud Sexual para hombres (Siglas en inglés)
SNP/SNPs:	polimorfismo de un solo nucleótido, SNPs en plural (Siglas en inglés)
STAT:	Toxicidad promedio total estandarizada (Siglas en inglés)
STROGAR:	Fortalecimiento de los informes de estudios de asociación genética en radiogenómica (Siglas en inglés)
TAC:	Tomografía axial computarizada
TANC1:	*Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1*
TNM:	Clasificación del tamaño tumoral (T), afectación de ganglios linfáticos (N) y presencia de metástasis a distancia (M)
TU:	Unidades de Transducción (Siglas en inglés)
USA:	Estados Unidos de Norteamérica (Siglas en inglés)
UV:	Luz Ultravioleta
V5%:	Porcentaje del volumen del órgano que recibe al menos 5 Gy
V20%:	Porcentaje del volumen del órgano que recibe al menos 20 Gy
V25%:	Porcentaje del volumen del órgano que recibe al menos 25Gy
V40%:	Porcentaje del volumen del órgano que recibe al menos 40 Gy
V60%:	Porcentaje del volumen del órgano que recibe al menos 60 Gy
VATS:	Videotoracoscopia (Siglas en inglés)
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WB:	Western Bloot

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN 35

1.1 CÁNCER DE PULMÓN 37

1.1.1 Epidemiología **37**

1.1.2 Factores de riesgo **38**

1.1.3 Diagnóstico del cáncer de pulmón **40**

1.1.4 Clasificación del cáncer de pulmón **40**

1.1.4.1 Clasificación histológica 40

1.1.4.2 Clasificación TNM y Estadiaje 41

1.1.4.3 Clasificación molecular 42

1.1.5 Tratamiento **43**

1.1.5.1 Tratamiento SCLC 43

1.1.5.2 Tratamiento NSCLC 43

1.1.5.2.1 Cirugía ***44***

1.1.5.2.2 Tratamientos sistémicos ***44***

1.1.5.2.3 Radioterapia ***44***

1.1.5.2.4 Ablación por radiofrecuencia ***44***

1.1.5.2.5 Tratamiento personalizado ***45***

1.2 RADIOTERAPIA PARA CÁNCER DE PULMÓN – NSCLC 46

1.2.1 Tipos de radioterapia **46**

1.2.2 Prescripción y restricción de dosis **48**

1.2.3 Proceso de preparación para la radioterapia **48**

1.2.3.1 Consulta inicial 48

1.2.3.2 Consentimiento informado 49

1.2.3.3 Posicionamiento del paciente 49

1.2.3.4 Adquisición de imágenes 49

1.2.3.5 Delineado de volúmenes 50

1.2.3.5.1 GTV ***50***

1.2.3.5.2 CTV ***50***

1.2.3.5.3 PTV51

1.2.3.6 Delineado de órganos en riesgo 51

1.2.3.6.1 Delineado de pulmón ***51***

1.2.3.6.2 Delineado de esófago ***52***

1.2.3.6.3 Delineado de corazón ***52***

1.2.4 Planificación de la dosis **52**

1.2.5 Simulación **53**

1.2.6 Simulación-verificación **53**

1.2.7 Radiobiología del tumor **54**

1.3 EFECTOS ADVERSOS A LA RADIOTERAPIA EN PACIENTES NSCLC 57

1.3.1 Radiobiología en el tejido sano **58**

1.3.2 Patogénesis de los efectos adversos **59**

1.3.3 Factores de riesgo relacionados con efectos adversos a la radiación 60

1.3.4 Manifestaciones clínicas de los efectos adversos a la radiación en pacientes con NSCLC 60

1.3.4.1 Toxicidades pulmonares 60

1.3.4.2 Toxicidades esofágicas 61

1.3.4.3 Toxicidades cardíacas 61

1.3.4.4 Toxicidades neurológicas 61

1.3.4.5 Toxicidad cutánea 61

1.3.5 Criterios de terminología y gradación de efectos adversos 62

1.4 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA A LOS EFECTOS ADVERSOS PRODUCIDOS POR LA RADIACIÓN IONIZANTE 63

1.4.1 Cronología de estudios de susceptibilidad genética a los efectos adversos a la radiación. 63

1.4.2 Radiogenómica 64

1.4.3 *RadioGenomics Consotrium* (RGC) 65

1.4.4 Estudios de asociación gen-candidato 66

1.4.4.1. Estudios gen-candidato en radiogenómica del cáncer de pulmón 67

1.4.5 Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) 71

1.4.6 Post-GWAS análisis 78

1.4.7 Meta-análisis de GWASs 79

1.4.8 Otras aproximaciones: *Machine Learning* en Radiogenómica 83

1.4.9 Riesgo poligénico 83

1.4.10 Estudio REQUITE 85

1.5 *TANC1* Y SU ASOCIACIÓN CON TOXICIDAD A LA RADIACIÓN 89

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 91

3. MATERIAL Y MÉTODOS 95

3.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS 97

3.2 COHORTE RADIOGEN-PULMÓN 97

3.2.1 Población de estudio 97

3.2.1.1 Criterios de inclusión 97

3.2.1.2 Criterios de exclusión 97

3.2.2 Cálculo del poder estadístico 97

3.2.3 Obtención de muestra 100

3.2.4 Extracción y cuantificación del ADN 100

3.3 VALIDACIÓN DE SNPS 101

3.3.1 Preparación de las muestras 101

3.3.2 Selección de estudios para la validación de SNPs 101

3.3.3 Genotipado y controles de calidad **101**

3.3.4 Análisis estadístico **103**

3.4 GWAS – EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN EN PACIENTES CON CÁNCER NSCLC 104

3.4.1 Controles de calidad del ADN y genotipado **104**

3.4.2 Control de calidad GWAS **105**

3.4.3 Imputación **106**

3.4.4 Controles de calidad de la imputación **106**

3.4.5 Definición de fenotipos **107**

3.4.6 STAT score **107**

3.4.7 Selección de covariables **107**

3.4.8 Análisis GWAS **108**

3.4.9 Comparación de resultados GWAS **110**

3.4.9.1 Comparación de resultados GWAS entre los diferentes fenotipos estudiados en los pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN 110

3.4.9.2 Comparación entre los resultados GWAS en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN y resultados previos en RGC 110

3.5 RIESGO POLIGÉNICO DE SUSCEPTIBILIDAD A CÁNCER DE PULMÓN ASOCIADO CON LOS EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN 111

3.5.1 Selección de estudios y selección de SNPs **111**

3.5.2 Selección de pacientes y extracción de la información de los SNPs **111**

3.5.3 Definición de fenotipo y selección de covariables **111**

3.5.4 Análisis estadístico **111**

3.5.4.1 Puntuaciones de riesgo poligénico no ponderado 111

3.5.4.2 Puntuaciones de riesgo poligénico ponderado 111

3.5.4.3 Análisis estadístico 112

3.6 SNAPSHOT-PCR PARA ANÁLISIS DE VARIANTES *TANC1* 113

3.6.1 Diseño **113**

3.6.2 Condiciones de SNaPshot-PCR para análisis de SNPs de *TANC1* **114**

3.6.3 Validación **115**

3.6.4 Análisis estadístico **115**

3.7 GENÓMICA FUNCIONAL DE *TANC1* 116

3.7.1 Generalidades de cultivos celulares **116**

3.7.1.1 Descongelación celular 116

3.7.1.2 Preparación de medios de cultivo complementado 116

3.7.1.3 Contaje celular 116

3.7.1.4 Viabilidad celular 117

3.7.1.5 Subcultivo celular 117

3.7.1.6 Criopreservación 118

3.7.2 Proliferación celular **118**
3.7.3 Diferenciación celular **119**
3.7.3.1 Preparación de medios de diferenciación 119
3.7.3.2 Procedimiento de diferenciación celular 119
3.7.4 Silenciamiento génico **119**
3.7.4.1 Selección de las partículas lentivirales para la transfección. 119
3.7.4.2 Silenciamiento por transfección de partículas lentivirales 120
3.7.5 Radiación celular **121**
3.7.5.1 Planificación de tratamiento 121
3.7.5.2 Procedimiento para la radiación de cultivos celulares 122
3.7.6 Western Blot **123**
3.7.6.1 Extracción de proteínas a partir de placas de cultivo celular 123
3.7.6.2 Cuantificación de proteínas 123
3.7.6.3 Preparación de la muestra 124
3.7.6.4 Electroforesis en gel de Poliacrilamida 124
3.7.6.5 Transferencia 124
3.7.6.6 Bloqueo 125
3.7.6.7 Detección 125
3.7.7 Inmunofluorescencia **126**
3.7.7.1 Adhesión celular al cubreobjetos con fibronectina 126
3.7.7.2 Cultivo y diferenciación celular 127
3.7.7.3 Fijación y permeabilización celular 127
3.7.7.4 Inmunomarcaje 127
3.7.7.5 Captura y análisis de imágenes 128
3.7.7.6 Análisis morfométricos de los miotubos C2C12 128

4. RESULTADOS **129**
4.1 CAPÍTULO 1. VALIDACIÓN INDEPENDIENTE DE VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN 131
4.1.1 Características de los pacientes **131**
4.1.2. SNPs asociados con esofagitis **137**
4.1.3. SNPs asociados con neumonitis **141**
4.2 CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS VARIANTES ASOCIADAS A EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN MEDIANTE ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO 142
4.2.1 Inclusión de pacientes, toxicidades evaluadas y selección de covariables **142**
4.2.2 GWAS en toxicidad aguda a la radioterapia en pacientes NSCLC **144**
4.2.2.1 GWAS en $STAT_{agudo}$ para evaluar la toxicidad global inducida por la radioterapia en pacientes NSCLC 145

4.2.2.2 GWAS en toxicidades agudas inducidas por la radioterapia en pacientes NSCLC. 148

4.2.3 GWAS en toxicidad tardía a la radioterapia en pacientes NSCLC **151**

4.2.3.1 GWAS en $STAT_{tardío}$ para evaluar la toxicidad global inducida por la radioterapia en pacientes NSCLC 151

4.2.3.2 GWAS en toxicidades tardías inducidas por la radioterapia en pacientes NSCLC 156

4.2. 4 Comparación de nuestros resultados con los GWAS previos del RGC **157**

4.3 CAPÍTULO 3. RIESGO POLIGÉNICO DE CÁNCER DE PULMÓN COMO PREDICTOR DE RIESGO DE PRESENTAR EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN 161

4.3.1 Inclusión de pacientes, toxicidades evaluadas y covariables seleccionadas **161**

4.3.2 Análisis univariable del PRS y su asociación con los efectos adversos a la radiación en NSCLC **162**

4.3.3 Análisis univariable de los SNPs individuales incluidos en el PRS y su asociación con los efectos adversos a la radiación en NSCLC **164**

4.3.4 Análisis multivariable del PRS y su asociación con los efectos adversos a la radiación en NSCLC **164**

4.4 CAPÍTULO 4. SNPS EN *TANC1* Y SU ASOCIACIÓN CON EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN EN PACIENTES NSCLC 166

4.4.1 Inclusión de pacientes, toxicidades evaluadas y genotipado **166**

4.4.2 Estimación Kaplan-Meier para las toxicidades inducidas por la radiación en pacientes NSCLC y las variantes del gen *TANC1* **166**

4.5 CAPÍTULO 5. PROPIEDADES DEL GEN *TANC1* Y SU CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL EN RESPUESTA A LA RADIACIÓN 169

4.5.1 Selección de la línea celular **169**

4.5.2 Diferenciación de las células C2C12 en condiciones normales **169**

4.5.3 Localización de la proteína TANC1 durante el proceso de diferenciación celular 171

4.5.4 Efecto de la radiación de los mioblastos C2C12 en la miogénesis **174**

4.5.5 Efecto del silenciamiento del gen *Tanc1* en la miogénesis en las células C2C12 ..... **175**

4.5.6 Efecto de la radiación en la miogénesis en células C2C12 con silenciamiento del gen *Tanc1* **180**

5. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS **185**

6. CONCLUSIONES **199**

7. BIBLIOGRAFÍA **203**

8. ANEXOS **221**

ANEXO 1. Séptima edición de la clasificación TNM 223

ANEXO 2. Estadio pronóstico basado en TNM 7ª edición 225

ANEXO 3. Alteraciones genéticas contra las que existe una terapia dirigida NSCLC 227

ANEXO 4. Eventos adversos a la radioterapia en pacientes con NSCLC según las versiones del CTCAE.....229

ANEXO 5. Dictamen del comité de ética de investigación de Santiago-Lugo.....237

ANEXO 6. Diseño de primers para genotipar los SNPs validados asociados con efectos adversos a la radiación en pacientes NSCLC mediante la tecnología Agena Bioscience MassARRRAY®.....239

ANEXO 7. Variantes genéticas y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón identificado por GWAS en población europea.....241

ANEXO 8. Visualización de resultados GWAS de toxicidades agudas individuales.....243

ANEXO 9. Visualización de resultados GWAS de toxicidades tardías individuales.....243

ANEXO 10. Publicación relacionada 1. "REQUITE_ A prospective multicentre cohort study of patients undergoing radiotherapy for breast, lung or prostate cancer"....247

ANEXO 11. Publicación relacionada 2. "Radiogenomics Consortium Genome-Wide Association Study Meta-analysis of Late Toxicity after Prostate Cancer Radiotherapy" 269

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas diagnósticas - ESMO 40
Tabla 2. Prescripción de dosis en pacientes NSCLC 48
Tabla 3. Restricción de dosis en pacientes NSCLC 48
Tabla 4. Estudios gen candidato de efectos adversos a la radiación en pacientes con cáncer de pulmón 69
Tabla 5. Primer GWAS de disfunción eréctil como radiotoxicidad en pacientes con cáncer de próstata 72
Tabla 6. Segundo GWAS de disfunción eréctil como radiotoxicidad en pacientes con cáncer de próstata 73
Tabla 7. GWAS de radiotoxicidad (sangrado rectal tardío) en pacientes con cáncer de próstata 74
Tabla 8. SNPs asociados con toxicidad global en pacientes con cáncer de mama y próstata 75
Tabla 9. Resultados del GWAS en tres etapas y el meta-análisis del locus TANC1 asociado a toxicidad tardía en pacientes con cáncer de próstata tratados con radioterapia 76
Tabla 10. Resultados del GWAS en tres etapas asociados con daño en el lóbulo temporal como efecto adverso a la radiación en pacientes con cárcinoma nasofaríngeo 77
Tabla 11. Primer meta-análisis de GWASs en asociación con radiotoxicidad en pacientes con cáncer de próstata 81
Tabla 12. Segundo meta-análisis de GWASs en asociación con radiotoxicidad en pacientes con cáncer de próstata 82
Tabla 13. Resultados PRS de susceptibilidad a cáncer de próstata en asociación con efectos adversos a la radiación 84
Tabla 14. Resultados PRS de susceptibilidad a cáncer de mama en asociación con efectos adversos a la radiación 85
Tabla 15. Resumen de las características iniciales de los pacientes de REQUITE 87
Tabla 16. Primers diseñados para SNaPshot-PCR de TANC1 113
Tabla 17. Primers de extensión diseñados para SNaPshot-PCR de TANC1 114
Tabla 18. Características de los pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177) 131
Tabla 19. Parámetros clínicos y patológicos en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177) 132
Tabla 20. Descripción de tratamiento oncológico en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177) 133
Tabla 21. Datos del tratamiento radiooncológico en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177) 134
Tabla 22. Pruebas de función respiratoria previa al tratamiento en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177) 135
Tabla 23. Categorización de variables incluidas en el estudio de validación de variantes genéticas previamente descritas en asociación con radiotoxicidad en pacientes NSCLC 135
Tabla 24. Validación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN de los SNPs previamente replicados en asociación con esofagitis 138
Tabla 25. Frecuencia de efectos adversos agudos y tardíos estudiados en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN 142
Tabla 26. Variables clínicas asociadas a los efectos adversos usadas como covariables en los GWAS en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN 143

Tabla 27. Loci asociados con toxicidad global aguda evaluado como STATagudo en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN....147

Tabla 28. SNPs del locus 1q22.1 en el GWAS de esofagitis aguda inducida por la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN....148

Tabla 29. Loci identificados por medio de GWAS asociados con esofagitis aguda....149

Tabla 30. SNPs del locus 21q22.12 en el GWAS de tos aguda....149

Tabla 31. Loci identificados por medio de GWAS asociados con la presencia de tos aguda....150

Tabla 32. Loci identificados por medio de GWAS asociados con disnea aguda....150

Tabla 33. Loci asociados con toxicidad global tardia evaluado como STATtardío en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN....153

Tabla 34. Loci identificados por GWAS en asociación con las toxicidades tardías individuales en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN....156

Tabla 35. SNPs identificados en GWAS previos en asociación con efectos adversos a la radiación dentro del RGC con al menos una cohorte de validación....157

Tabla 36. Presencia de efectos adversos tardíos a la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 155)....161

Tabla 37. Variables clínicas asociadas a STAT global en los pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN....162

Tabla 38. Análisis univariable de las puntuaciones de riesgo poligénico no ponderado para cáncer de pulmón con la radiotoxicidad en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n=127)....163

Tabla 39. Análisis univariable de las puntuaciones de riesgo poligénico ponderado por OR para cáncer de pulmón, con la radiotoxicidad en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n=127)....163

Tabla 40. Análisis univariable de los SNPs incluidos en el PRS y su asociación con los efectos adversos....164

Tabla 41. Análisis multivariable de los puntajes de riesgo poligénico para cáncer de pulmón con los efectos adversos a la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 127)....165

Tabla 42. Asociación entre SNPs del locus 2q24.1 y los efectos adversos a la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n=159)....167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón. 37
Figura 2. Diagrama de factores de riesgo para cáncer de pulmón. 38
Figura 3. Ventana pulmonar en la tomografía computarizada para estadiaje de NSCLC. 42
Figura 4. Algoritmo de tratamiento en pacientes SCLC. 43
Figura 5. Acelerador lineal (LINAC). 47
Figura 6. Adquisición de imágenes para planificación de tratamiento radioterápico. 49
Figura 7. Esquema del delineado de volúmenes. 50
Figura 8. Reconstrucción del delineado con FOCAL. 51
Figura 9. Delineado de estructuras. 52
Figura 10. Planificación de la dosis. 53
Figura 11. Comprobación de la planificación previa al tratamiento. 54
Figura 12. Mecanismos directos e indirectos de muerte celular y daño asociado con la exposición a la radiación ionizante. 55
Figura 13. Radiosensibilidad en el ciclo celular. 55
Figura 14. Curvas teóricas dosis-respuesta para el control tumoral y el daño al tejido normal. 57
Figura 15. Modelo hipotético de interacción de variantes genéticas en la radiosensibilidad del tejido sano. 64
Figura 16. Logo de RGC. 65
Figura 17. Manhattan plot del primer GWAS radiogenómico. 72
Figura 18. Manhattan plot de la toxicidad global tardía asociada a radioterapia en pacientes con cáncer de próstata en la cohorte RADIOGEN. 76
Figura 19. Manhattan plot del meta-análisis de toxicidades asociadas a la radiación en pacientes con cáncer de próstata. 82
Figura 20. Logo del estudio REQUITE 85
Figura 21. Esquema del protocolo de REQUITE. 88
Figura 22. Locus 2q24.1 89
Figura 23. Cálculo de poder y tamaño de muestra para un MAF=0,45 dependiendo del OR. 98
Figura 24. Cálculo de poder y tamaño de muestra para un MAF=0,50 dependiendo del OR. 98
Figura 25. Cálculo de poder y tamaño de muestra para un MAF=0,30 dependiendo del OR. 98
Figura 26. Cálculo de poder y tamaño de muestra para un MAF=0,05 dependiendo del OR. 99
Figura 27. Cálculo de poder y tamaño de muestra para modelo aditivo dependiendo del MAF. 99
Figura 28. Cálculo de poder dependiendo del MAF y el coeficiente Beta. 100
Figura 29. Agena Bioscience MassARRAY®. 101
Figura 30. Genotype-calling en el MassARRAY Typer (Agena Bioscience). 102
Figura 31. Comprobación de integridad del ADN. 104

Figura 32. GeneTitan™ Multi-Chanel (MC) Instrument. 104
Figura 33. Diagrama de flujo del control de calidad del genotipo en la cohorte RADIOGEN-pulmón. 105
Figura 34. Esquema de un recuadro de la cámara de Neubauer. 117
Figura 35. Vector pLKO.1-puro. 120
Figura 36. Planificación del tratamiento en placa de cultivo celular. 122
Figura 37. Microscopio invertido de fluorescencia Axio Vert A1 (Carl Zeiss). 128
Figura 38. Esofagitis a los 3 meses post-RT en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177). 137
Figura 39. Curva de Kaplan-Meier para el grado CTCAE ≥ 2 de esofagitis en función del tiempo, en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN para los genotipos HSPB1 rs2868371. 139
Figura 40. Probabilidad acumulada de grado CTCAE ≥ 2 de esofagitis en función del tiempo, en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN de acuerdo con los genotipos HSPB1 rs2868371. 140
Figura 41. Neumonitis a los 3 meses post-RT en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177). 141
Figura 42. Histogramas y curvas de densidad del STAT agudo (A) y tardío (B) en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 142
Figura 43. Visualización de los resultados del GWAS STATagudo en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 145
Figura 44. Análisis de componentes principales de los resultados de GWAS-STATagudo en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 146
Figura 45. Análisis de haplotipos de los SNPs más significativos identificadas en asociación con el STATagudo en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 146
Figura 46. Análisis de haplotipos de loci compartidos en toxicidades agudas. 151
Figura 48. Análisis de componentes principales de los resultados de GWAS-STATtardío en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 152
Figura 47. Visualización de los resultados del GWAS STATtardío en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 152
Figura 49. Análisis de haplotipos de los SNPs más significativos identificadas en asociación con el STATtardío en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 154
Figura 50. Manhattan plot circular de los resultados de los GWAS del STATagudo y STATtardío en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 155
Figura 51. Análisis de haplotipos de loci compartidos en toxicidades tardías. 156
Figura 52. Análisis de haplotipos de loci compartidos entre toxicidades agudas y tardías. 157
Figura 53. Comparación del análisis de enriquecimiento de ontología de genes entre los resultados identificados en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN y estudios previos del RGC. 159
Figura 54. Comparación del análisis de pathways entre los genes identificados por GWAS en estudios previos del RGC y en los pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 160
Figura 55. Histogramas del STATtardío global, STATtardío esofágico y STATtardío pulmonar en la cohorte de pacientes NSCLC. 161
Figura 56. Distribución de los puntajes de riesgo poligénico en los pacientes con NSCLC de la cohorte RADIOGEN. 162
Figura 57. Análisis de Kaplan-Meier de la asociación del SNPs rs10497203 con el desarrollo de disnea como efecto adverso a la radioterapia en pacientes NSCLC en la cohorte RADIOGEN. 167
Figura 58. Análisis de Kaplan-Meier de la asociación de los SNPs rs264588, rs264631, rs64312 y rs7582141 con el desarrollo de disnea como efecto adverso a la radioterapia en pacientes NSCLC en la cohorte RADIOGEN. 168

Figura 59. Curva de proliferación/diferenciación del análisis celular en tiempo real en células C2C12..... 169
Figura 60. Esquema de la diferenciación celular de mioblastos maduros en las células C2C12..... 170
Figura 61. Diferenciación de mioblastos a miotubos en las células C2C12..... 170
Figura 62. Localización de la proteína TANC1 durante la diferenciación celular de mioblastos a miotubos maduros en las células C2C12..... 171
Figura 63. Esquema de la fusión de los mioblastos, con la participación de Rols (ortólogo de TANC1)..... 172
Figura 64. Localización de TANC1 durante el momento de la fusión de los mioblastos en las células C2C12. 173
Figura 65. Efecto de la radiación de mioblastos en la diferenciación y formación de miotubos maduros en células C2C12..... 174
Figura 66. Western Blot de la comprobación del silenciamiento de Tanc1 en las células C2C12..... 175
Figura 67. Curva de proliferación/diferenciación del análisis celular en tiempo real en las células transfectadas..... 176
Figura 68. Primeras fases de la diferenciación en las células transfectadas..... 176
Figura 69. Diferenciación de mioblastos a miotubos maduros en las células transfectadas C2C12..... 177
Figura 70. Western Blot de la proteína Miosina de cadena pesada en la diferenciación en las células transfectadas..... 178
Figura 71. Efecto del silenciamiento del gen Tanc1 en la diferenciación de mioblastos a miotubos en las células C2C12..... 179
Figura 72. Efecto de la radiación en la formación de miotubos maduros en las células C2C12 transfectadas.... 181
Figura 73. Diferencias en la morfología de los miotubos dependiendo del grado de silenciamiento del gen Tanc1 y la radiación recibida..... 182
Figura 74. Estudio morfológico de los miotubos maduros después de siete días de diferenciación en las células transfectadas..... 183

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.1 CÁNCER DE PULMÓN

1.1.1 Epidemiología

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad relacionada con cáncer en todo el mundo. El reporte de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) informa que, en 2018, el cáncer de pulmón fue considerado el cáncer con mayor incidencia a nivel mundial en ambos sexos, fue el cáncer más mortal en hombres, y ocupó el tercer lugar en mujeres. La IARC reporta una incidencia global de 2,09 millones de nuevos casos (1,36 millones hombres y 725.000 mujeres) (***Figura 1A***) y una mortalidad global de 1,76 millones (1,18 millones hombres y 576.000 mujeres) (***Figura 1B***). [1,2]

En Europa se estima una incidencia anual de 470.083 nuevos casos (***Figura 1C)*** y una mortalidad de 385.913 (***Figura 1D***). El sur de Europa tiene una incidencia de 100.000 nuevos casos y una mortalidad de 86.000. En España la incidencia estimada es de 27.351 nuevos casos (20.437 hombres y 6.914 mujeres) y una mortalidad de 22.896 (17.559 hombres y 5.337 mujeres). [1]

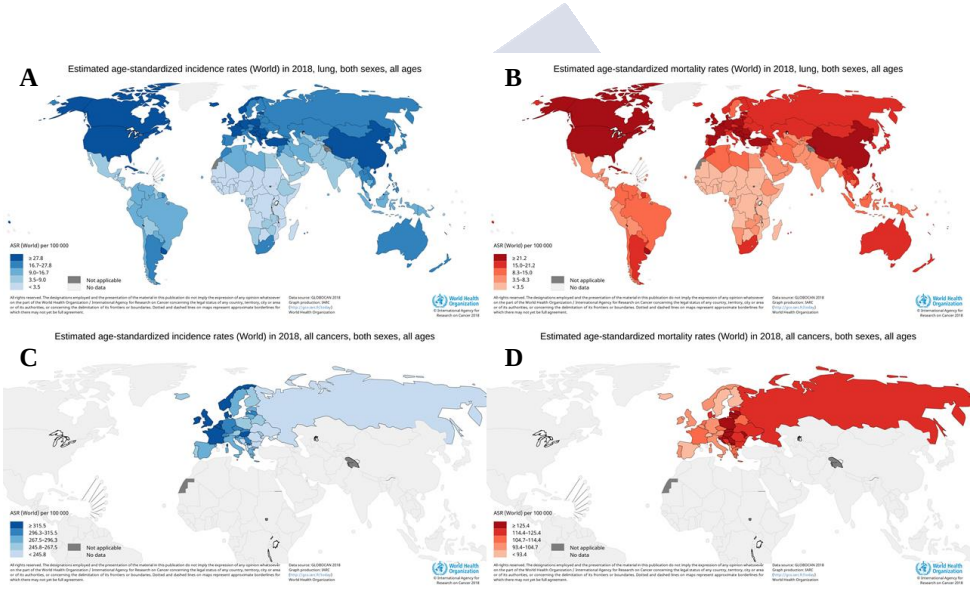


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón.
A) Incidencia y B) mortalidad global; C) incidencia y D) motralidad en Europa.
Permitido por: *International Agency for research on Cancer*, Ferlay J, et al. (2018). [1] *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: *International Agency for Research on Cancer*. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today, consultado el: [11 Oct 2019].

La IARC estima un aumento de la incidencia 72,5% para el 2040, esto se traduce en pasar de 2,09 millones de nuevos casos actuales a una incidencia global de 3,61 millones de nuevos casos anuales. La mortalidad aumenta en la misma proporción, en el 2020 se espera un aumento del 5,7% de muertes, 39,4% en 2030 y 76,3% en 2040, lo que equivale a aumentar 1,34 millones de muertes anuales según los datos estimados a partir del crecimiento demográfico. [1]

La incidencia de cáncer de pulmón en Europa se estima que incrementará 2,8% en el 2020, mientras que en España el incremento se calcula en 4,1%; en el 2040 en Europa se estima un aumento de 24,7% y España de 41,7%. La mortalidad en Europa en el 2040 se estima que incrementará un 28,3% que equivale a incrementar 109.601 muertes anuales, mientras que en España pasaría de 22.000 a 33.000 muertes anuales (45,7%). [1]

El aumento de la incidencia se ve influenciado por factores como el crecimiento poblacional, el envejecimiento, así como por la modificación de ciertos factores de riesgo de cáncer de pulmón.

1.1.2 Factores de riesgo

Un factor de riesgo es cualquier rasgo, característica, exposición de un individuo que aumente la probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión. [3] En el cáncer de pulmón los más importantes se ilustran en el diagrama de la ***Figura 2***.

El factor de riesgo más importante para desarrollar cáncer de pulmón es el uso de cigarrillos de tabaco, al cual se le atribuye hasta el 90% de los cánceres de pulmón. [4] La identificación de esta relación causal data de las décadas de 1920 y 1930, [5–9] pero no fue hasta 1950 que se estableció definitivamente que fumar provoca cáncer de pulmón. [10,11] Los fumadores tienen un riesgo de 20 a 50 veces mayor que los no fumadores, y la duración del tabaquismo es un factor determinante del riesgo de cáncer de pulmón en los fumadores. [12]

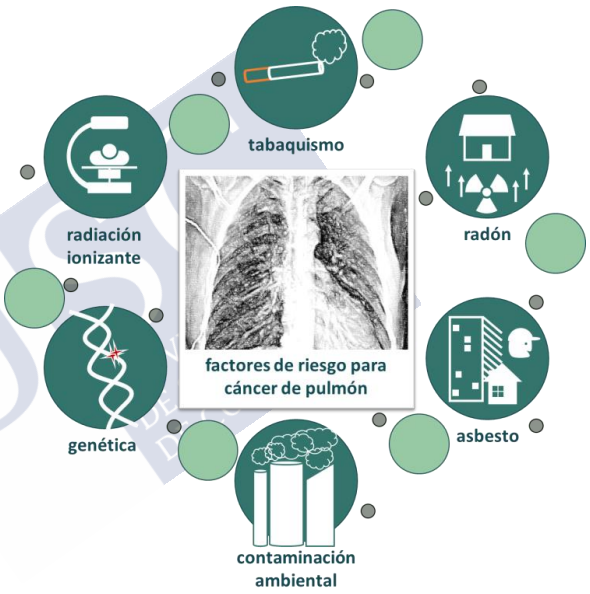


Figura 2. Diagrama de factores de riesgo para cáncer de pulmón.

El radón residencial es la segunda causa más común de cáncer de pulmón [13–19] se le atribuye el 9-10% de los casos. [17,20] Esta asociación se describió por primera vez en trabajadores en minas de uranio. [4,20,21] El radón es un producto de descomposición del uranio localizado en suelos y rocas de forma natural, su desintegración se produce en forma de gas radioactivo que son aspiradas y a medida que se desintegran liberan radiación que puede provocar daños al ADN en el tejido pulmonar. [13] La exposición a radón y el tabaquismo tienen un efecto sinérgico incrementando el riesgo de cáncer de pulmón. [17]

La exposición a los carcinógenos en el ambiente laboral representa del 5 al 10% de los cánceres de pulmón. [22–25] De estos el asbesto es el más común. La exposición laboral al asbesto se correlaciona con un riesgo cinco veces mayor de presentar cáncer de pulmón. [25] La principal vía de exposición al asbesto es por la inhalación de las microfibras de asbesto suspendidas en el aire; el riesgo de que esta exposición pueda causar cáncer de pulmón depende de la dosis, duración, tamaño, forma y composición química de las fibras de asbesto. Una vez

inhaladas las fibras pueden alojarse en el tejido pulmonar provocando una inflamación crónica, estrés oxidativo y daño al ADN. [26–29] La exposición al asbesto y el consumo de tabaco tienen un efecto sinérgico y el riesgo de cáncer de pulmón se incrementa. [30]

El aire contaminado es considerado uno de los factores de riesgo más importantes para cáncer de pulmón. La mala calidad del aire ambiental fue descrito como un potencial riesgo en la década de 1920 [6] y múltiples estudios desde entonces han descrito esta asociación. [31–34] En 2013 el grupo de trabajo de la IARC declara la mala calidad del aire exterior como carcinogénico para humanos. [32,35] Las exposiciones laborales al aire altamente contaminado, como lo es la industria de camiones, se asoció con el aumento del 50% en el riesgo relativo de desarrollar cáncer de pulmón. [30]

El fumador pasivo, fumador involuntario, de segunda mano o flujo lateral tiene un riesgo aumentado del 20-30% a desarrollar cáncer de pulmón [36] Varios estudios han determinado que los cónyuges no fumadores de fumadores tienen un riesgo aumentado de 20-30% de desarrollar cáncer de pulmón. [37–39] Se ha descrito que algunos carcinógenos como el benzopireno presentan concentraciones hasta cuatro veces más alta en el humo de flujo lateral en comparación con el humo del cigarrillo principal. [37]

Estar expuesto a radiación ionizante aumenta el riesgo de cáncer de pulmón. [40] Se describió esta relación en los sobrevivientes de la bomba atómica [41] y más tarde en pacientes tratados con radioterapia en el tórax. [42–46] Un estudio demostró que existe un aumento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón en pacientes con cáncer de mama que recibieron radioterapia. [44]

Se han investigado factores dietéticos asociados al cáncer de pulmón, algunos con efecto protector como las dietas ricas en vegetales crucíferos [47,48], el consumo de β-carotenos [49] o el efecto quimioprotector del té verde en fumadores [50]; otros con aumento de riesgo como el alto consumo de carne roja frita o bien hecha [51], el consumo de más de 6 tazas de café al día [52] o el consumo del alcohol aunque este tiene una fuerte correlación con el tabaquismo o el aire contaminado por el humo de tabaco, por lo que ha sido complicado atribuirle el riesgo aislado. [53–55]

Otros factores como la terapia hormonal de reemplazo se ha asociado a una disminución del riesgo [56–58] el bajo índice de masa corporal al aumento del riesgo, [59] las infecciones bacterianas en el aumento del riesgo, en el caso de la tuberculosis [60,61] y la clamidia. [62]

Por otro lado, se ha observado que presentar historia familiar de cáncer de pulmón aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón 1,7 veces. [63] En estudios que controlan el factor tabaquismo, se ha observado que el riesgo aumenta de 2 a 4 veces si el familiar con cáncer de pulmón es de primer grado. [64,65]

Mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS) se han descrito variantes genéticas en las regiones cromosómicas 5p15, 15q25-26 y 6q21 asociadas con mayor riesgo de cáncer de pulmón. [66–81] La región 5p15 se asocia con el cáncer de pulmón del tipo histológico adenocarcinoma tanto en fumadores como en no fumadores. [79] Esta región codifica para el gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa (*TERT*), involucrado en el mecanismo de replicación celular y para el gen *CLPTM1L* (gen transmembrana-1 de labio leporino y paladar hendido). [77] Las región 15q25-26 es la única que se ha replicado consistentemente en todos los tipos de cáncer, independientemente de la histología, [80] pero además de asociarse con el cáncer de pulmón, se asocia con una mayor predisposición a la adicción al tabaco, [67] así como a comportamientos tabáquicos tóxicos, como es el consumo de un alto número de cigarrillos al día. [82,83] En esta región se encuentran seis *loci* codificantes que incluyen tres genes de receptores colinérgicos de nicotina (*CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNB4*). [67] Las variantes descritas en la región 6p21 se asocian con el aumento del riesgo

en los no fumadores. [84] Esta región regula la señalización de la proteína G, los genes identificados en esta región son *BAT3* y *MSH5*. *BAT3* está implicado en la apoptosis y los complejos unión de proteínas necesarias para la acetilación de p53 en respuesta al daño en el ADN. [85] *MSH5* está involucrado en la reparación por *mismatch* del ADN y la recombinación meiótica, procesos descritos con importancia en el desarrollo del cáncer de pulmón. [76,86]

1.1.3 Diagnóstico del cáncer de pulmón

La broncoscopia fibroóptica es la prueba diagnóstica más común utilizada para diagnosticar el cáncer de pulmón, pudiendo utilizarse ultrasonido endobronquial para explorar los ganglios linfáticos regionales (EBUS) o ultrasonido endoscópico (EUS). Aunque varias pruebas deberían utilizarse de manera obligatoria, según las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, por sus siglas en inglés), existen otras pruebas opcionales, que podrían servir para mejorar la precisión del diagnóstico. (***Tabla 1***)

Tabla 1. Pruebas diagnósticas - ESMO

	Obligatorio	Opcional
General	Historia médica Examen físico Evaluación comorbilidades Escala calidad de vida (ECOG)	
Imagen	Radiografía de Tórax TAC de Tórax PET-TC Tórax RM magnética cerebral	 Gammagrafía ósea TAC de cerebro c/contraste
Laboratorio	Biometría hemática Función renal Enzimas hepáticas Parámetros óseos	
Función cardiopulmonar	FVC, FEV1, DLCO ECG Prueba cardiopulmonar de ejercicio (si está indicado)	 Fracción de eyección, Angiografía coronaria
Toma de muestra	Broncoscopia EBUS/EUS nódulos mediastino Biopsia dirigida por TAC	 Mediastinoscopia

ESMO, Sociedad Europea de Oncología Médica; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; TAC, tomografía axial computarizada; PET-TAC, Tomografía por emisión de positrones – tomografía computarizada; RM, Resonancia magnética; FVC, Capacidad vital forzada; FEV1, Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; DLCO, capacidad de difusión pulmonar; ECG, electrocardiogama; EBUS, Ecobroncoscopia; EUS, Ecoendoscopia esofágica.
Tabla adaptada de: Postmus PE, et al. 2017 [87], con permiso de: *Oxford University Press*.

1.1.4 Clasificación del cáncer de pulmón

La clasificación precisa del tumor es primordial, puesto que las decisiones terapéuticas se basan en gran medida en los datos reportados por esta clasificación.

1.1.4.1 Clasificación histológica

Los cánceres de pulmón se dividen tradicionalmente en dos grandes grupos, el carcinoma de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) que representa el 80-85% de los casos y el carcinoma de células pequeñas (microcítico o SCLC por sus siglas en inglés) que corresponde al 15-20% restante. [88] Los SCLC se comportan agresivamente y las metástasis cerebrales son comunes. [89]

Dentro del grupo de los NSCLC los tres subtipos histológicos más frecuentes son adenocarcinoma (40%), carcinoma de células escamosas (30%) y carcinoma de células grandes (9%), otros subgrupos son carcinoma adenoescamosos y carcinoma sarcomatoide; aunque es común encontrar diferentes subtipos histológicos en el mismo tumor. Existe gran variedad de subtipos, antiguamente considerados únicamente como NSCLC pero que actualmente han sido descritas y reguladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). [88]

Dentro del grupo de los SCLC, únicamente se identifican los SCLC puros (90%) y el SCLC mezclado con otro subtipo de NSCLC (10%). [88,90]

La identificación histológica se realiza mediante inmunohistoquímica y para codificarla se usa la Clasificación de Tumores de Pulmón de la OMS 2015, [88] la cual cataloga a los tipos histológicos en grupos principales que incluyen: tumores epiteliales, mesenquimales, linfohistiocitarios, ectópicos y metastásicos. Dentro del grupo de tumores epiteliales se identifican los subgrupos más frecuentes: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, tumores neuroendocrinos, papilares, entre otros. La importancia de la subclasificación, por ejemplo, en el caso de los adenocarcinomas, es la existencia de diferencias en la forma en que se desarrollan y se distribuyen las metástasis, la recurrencia del cáncer y la supervivencia. [88] Además, el uso de quimioterapia adyuvante después de la resección puede variar dependiendo de esta subclasificación. [87,91–93]

1.1.4.2 Clasificación TNM y Estadiaje

La clasificación TNM considera el tamaño tumoral (T), la afectación de ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis a distancia (M), y con estos datos le asigna una categoría. (**ANEXO 1)**

Los datos del TNM se utilizan para clasificar el grado de afección de la enfermedad, con este estadiaje se puede predecir la supervivencia del paciente y definir las opciones de tratamiento. [94] Normalmente el estadiaje se realiza sobre imágenes obtenidas mediante una tomografía del paciente. (***Figura 3***)

Los estadios (**ANEXO 2**) se estructuran a su vez en tres etapas: la etapa inicial, temprana o localizada, que incluye a los pacientes con estadios 0, IA, IB, IIA y IIB; la etapa localmente avanzada o con metástasis locorregionales, que incluye aquellos pacientes con estadios IIIA y IIIB; y la etapa avanzada o metastásica, que incluye el estadio IV.

La tasa de supervivencia a 5 años depende de la etapa en la que se diagnostica. Los pacientes diagnosticados en una etapa inicial o localizada tienen una supervivencia del 47%, mientras que este porcentaje baja al 24% en los diagnosticados en etapa localmente avanzada y llega al 4% en los pacientes con metástasis a distancia. Aunque es importante añadir que los diagnósticos en etapas iniciales únicamente se llevan a cabo en el 16% de los pacientes, mientras que el 22% se diagnostican en etapa localmente avanzada y el 57% presentan metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. [95]

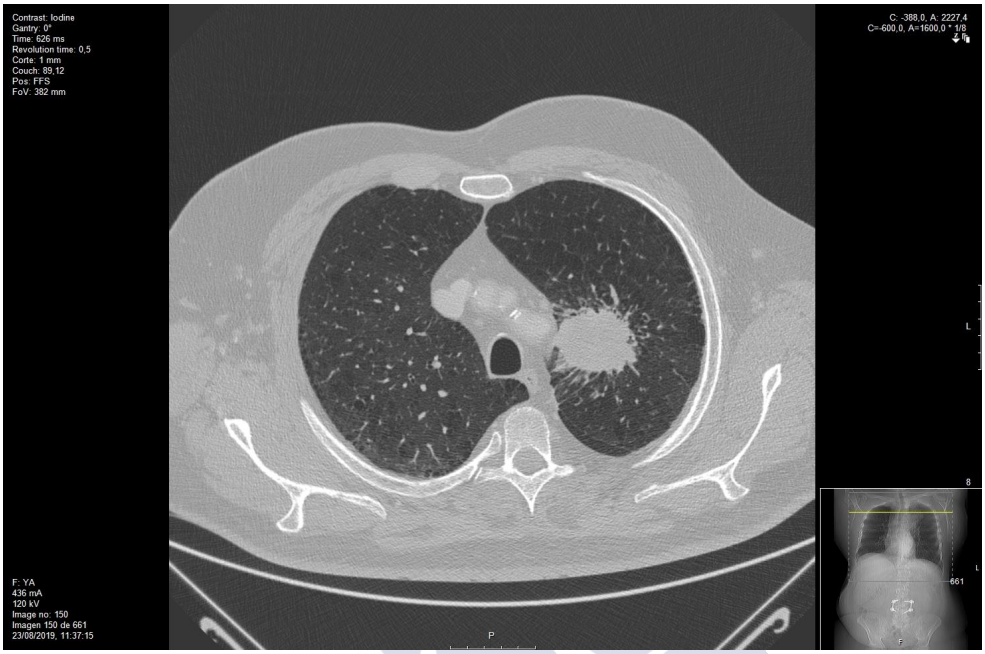


Figura 3. Ventana pulmonar en la tomografía computarizada para estadiaje de NSCLC.

1.1.4.3 Clasificación molecular

Las características genéticas del tumor de cada paciente permitirán personalizar el tratamiento de forma más eficaz, haciendo uso de las nuevas opciones terapéuticas. El tumor adquiere alteraciones genéticas durante su formación. La detección de estas podría predecir la respuesta al tratamiento, estratificar el pronóstico y utilizarse en la detección temprana del cáncer de pulmón. [96,97]

La mayoría de las mutaciones somáticas se encuentran en las vías de señalización celular como la familia de proteínas ErbB, en especial el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico *EGFR* que regula la proliferación celular y la angiogénesis y cuyas mutaciones son las más frecuentes en adenocarcinomas. También es frecuente encontrar mutaciones en el oncogén *KRAS* presentes en el 20-30% de los adenocarcinomas, mutaciones en *ROS1* y *ALK* se encuentran presentes en el 1-5% de los NSCLC. También se han descrito cambios genéticos o epigenéticos en genes supresores tumorales como son *TP53*, *CDKN2A* o *PTEN*. [98,99]

Aun cuando estos marcadores predictivos han sido evaluados en varios estudios prospectivos, las guías internacionales recomiendan no guiar la terapia adyuvante por análisis moleculares. Tampoco se recomienda el uso de terapia dirigida como terapia adyuvante. [87]

La ESMO contempla el uso de la clasificación molecular para definir las opciones terapéuticas en pacientes con cáncer de pulmón metastásico (estadio IV) indicando el tipo de quimioterapia o terapias dirigidas basándose principalmente en las mutaciones del gen *EGFR*, reordenamientos en el gen *ALK*, reordenamiento en *ROS*, mutación en *BRAF* y la expresión de la proteína PD-L1. [100]

1.1.5 Tratamiento

La planificación del tratamiento de cada paciente requiere la opinión multidisciplinaria donde interaccionan varios médicos de diferentes especialidades que examinan la información clínica del paciente y discuten las opciones de tratamiento que pueden ofrecerse. Este foro llamado "Comité de tumores" está integrado, por oncólogos médicos, oncólogos radioterápicos, cirujanos torácicos, neumólogos, radiólogos, médicos nucleares y anatomopatólogos.

Las guías clínicas internacionales de tratamiento hacen recomendaciones generales y separan sus recomendaciones entre los NSCLC y los SCLC.

1.1.5.1 Tratamiento SCLC

Por su relación estrecha con el tabaquismo, la intervención principal en estos pacientes es abandonar el hábito tabáquico.

En la enfermedad localizada el tratamiento es curativo combinando quimioterapia y radioterapia, que resulta en tasas de supervivencia del 20 al 25% a 5 años. Una vez que se encuentra en estadio IV, el tratamiento es paliativo, con alta probabilidad de recaída rápida y limitada respuesta al tratamiento de segunda línea; la supervivencia general es por debajo de 10 meses. Todos los pacientes que responden al tratamiento de primera línea deben ser evaluados para recibir irradiación craneal profiláctica.

El algoritmo de tratamiento, [101] según las recomendaciones de ESMO para el SCLC es el siguiente (***Figura 4***):

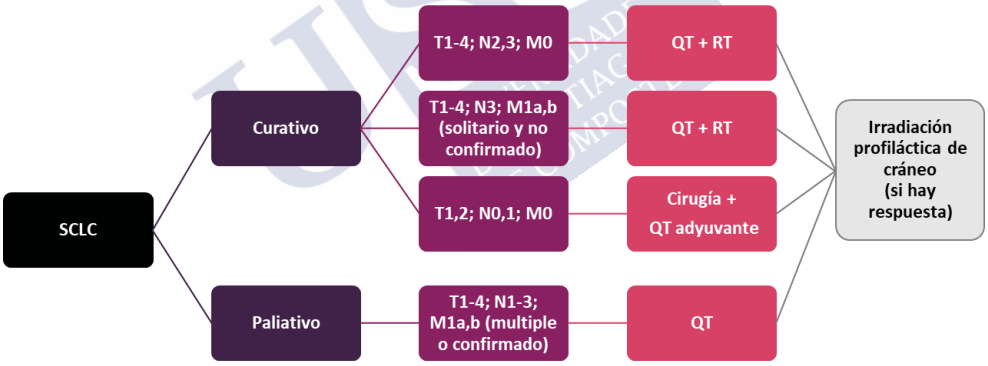


Figura 4. Algoritmo de tratamiento en pacientes SCLC.
Adaptada de: Früh et al. 2013 [101], con permiso de: *Oxford University Press*.

1.1.5.2 Tratamiento NSCLC

La ESMO divide el tratamiento de los pacientes con NSCLC dependiendo del estadio clínico en tres subgrupos: tratamiento de estadios tempranos (estadio I y II), localmente avanzados (estadio III) y estadio metastásico (estadio IV). [87]

En los estadios tempranos, el paciente se trata con cirugía y dependiendo del estadiaje patológico, el paciente se mantiene en vigilancia (estadio IA), se somete a quimioterapia adyuvante (estadio IB, II, III) o radioterapia postquirúrgica, resección quirúrgica y quimioterapia (estadio R1, márgenes de resección positivo).

En estadios localmente avanzados, el tratamiento se decide en comité de tumores y en el estadio metastásico, puede tratarse con terapias dirigidas, que dependerán del diagnóstico molecular del tumor.

1.1.5.2.1 Cirugía

Es recomendable ofrecer la extirpación quirúrgica del tumor a todos los pacientes con NSCLC en estadios I y II como primera opción terapéutica, siempre y cuando puedan asumirse los riesgos relacionados con el procedimiento, entre ellos que el tumor no debe estar localizado centralmente y no deben existir metástasis ganglionares.

La resección quirúrgica recomendada es la anatómica, por encima de la resección en cuña; la segmentectomía generalmente es la opción cuando se observa en la radiografía lesiones con opacidad de vidrio esmerilado puras o adenocarcinomas *in situ* o con invasión mínima. Los tumores de 2 cm que tienen apariencia sólida en la tomografía el procedimiento quirúrgico estándar es la lobectomía. La disección de los ganglios linfáticos se debe realizar cuando se cumplan las especificaciones de la IASLC. La técnica quirúrgica puede ser toracotomía abierta o cirugía videotoracoscopia (VATS), ésta última debiera ser la elección en tumores estadio I. La neumonectomía es recomendada en pacientes con cáncer multifocal.

1.1.5.2.2 Tratamientos sistémicos

La quimioterapia adyuvante es beneficiosa para las enfermedades N1 y N2 (estadio II y III), lo que resulta en el incremento del 4-5% de la supervivencia global a cinco años. [102] Por ello debe ofrecerse a pacientes con NSCLC con tumor resecado estadios II y III y se puede considerar en los pacientes resecados estadio IB y un tumor primario mayor de 4 cm. El comité de tumores debe considerar las comorbilidades del paciente, el tiempo transcurrido desde la cirugía y la recuperación postoperatoria.

El esquema recomendado para estos pacientes es la combinación de dos fármacos con cisplatino, con una dosis acumulada recomendada de cisplatino de hasta 300 mg/m^2, administrado en tres o cuatro ciclos. El esquema más utilizado es cisplatino-vinorelbina. [87]

1.1.5.2.3 Radioterapia

El tratamiento no quirúrgico de elección para pacientes NSCLC estadio I es la radioterapia estereotáxica, con tasas de control local del 90% a los 5 años. [103,104] En caso de no contar con radioterapia estereotáxica, se prefiere la radioterapia radical usando esquemas hipofraccionados frente a la radioterapia fraccionada convencional. [105,106] La dosis tumoral biológica equivalente (BED, por sus siglas en inglés) recomendada debe ser ≥ 100 Gy.

En pacientes irresecables estadio IIIA y IIIB se recomienda quimioradioterapia concurrente basada en cisplatino. La radioterapia postquirúrgica no está recomendada en estadios tempranos, únicamente en caso de que haya R1 en la pared torácica. [87]

1.1.5.2.4 Ablación por radiofrecuencia

Pacientes NSCLC estadio I que tienen contraindicación absoluta de cirugía y radioterapia, pueden ser tratados con radiofrecuencia. [87] La radiofrecuencia es una técnica percutánea guiada por imagen, que usa una corriente alterna electromagnética de alta energía aplicada a través de un electrodo-aguja, para elevar la temperatura dentro del tumor, provocando necrosis por coagulación. Para conseguir el efecto la temperatura dentro del tumor debe aumentar hasta los 90-120ºC.

1.1.5.2.5 Tratamiento personalizado

Se ha aprobado recientemente, el uso de marcadores moleculares para el estadio IV de NSCLC. La ESMO publica en septiembre del 2019, [100] las recomendaciones y guías de tratamiento usando los biomarcadores EGFR, ALK, ROS1, BRAF y PD-L1.

Las alteraciones genéticas específicas y sus respectivos tratamientos dirigidos se describen en el **ANEXO 3**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2 RADIOTERAPIA PARA CÁNCER DE PULMÓN – NSCLC

1.2.1 Tipos de radioterapia

La radioterapia radical exclusiva se administra principalmente a los pacientes con diagnóstico en estadios tempranos y, debiera limitarse a aquellos que no serán sometidos a cirugía. Los volúmenes de irradiación se limitan al tumor, sin irradiar los ganglios o el mediastino y la dosis que se administra va de 60 a 74 Gy en fracciones de 180-200 cGy. En los estadios III, se limita a los pacientes inoperables que no recibirán quimioterapia.

La radioterapia estereotáxica corporal (SBRT, por sus siglas en inglés), se trata de una técnica de alta precisión que administra altas dosis monofraccionadas o hipofraccionadas (1-4 fracciones) que se reserva para pacientes inoperables, normalmente con una BED mayor de 100 Gy.

Los pacientes estadio III que no son candidatos a rescate quirúrgico, se benefician del tratamiento de quimioradioterapia radical, que, dependiendo del orden de los tratamientos, se puede tratar de quimioterapia concomitante o secuencial. Los volúmenes de irradiación incluyen el tumor y las zonas ganglionares, las dosis varían de entre 60 y 74 Gy con el fraccionamiento de 180-200 cGy al día. Cuando el plan de tratamiento se ve limitado por estructuras vitales se puede plantear la utilización de radioterapia de intensidad modulada (IMRT), con el objetivo de evitar toxicidades.

La radioquimioterapia neoadyuvante se caracteriza por dosis que van de 45 Gy en adelante. Es una de las alternativas a la quimioterapia exclusiva en estadio III con posible rescate quirúrgico.

La radioterapia postoperatoria se limita a aquellos pacientes con enfermedad residual tras la cirugía, R1 o N2 postquirúrgicos. Los esquemas normalmente incluyen también quimioterapia. Las dosis establecidas para la radioterapia postoperatoria van de 50 a 70 Gy dependiendo de la presencia de enfermedad residual.

La irradiación profiláctica craneal disminuye el riesgo de recurrencia local, normalmente se limita a estadios III, con respuesta al tratamiento multimodal con histologías desfavorables. No es un tratamiento estándar en NSCLC, ya que no se ha demostrado que mejore la supervivencia general.

La radioterapia paliativa se administra en dosis que van de 8 a 40 Gy dependiendo del tipo de fraccionamiento que se vaya a utilizar, siempre recomendándose altas dosis por fracción, pero en volúmenes limitados.

Existen técnicas especiales como la radioterapia guiada por imagen (IGRT) que consiste en verificar el tratamiento antes o durante la radioterapia, para detectar errores en el posicionamiento, así como evaluar el movimiento de los órganos o el tumor.

Radioterapia adaptada a la respiración (DART), como su nombre indica, es el tipo de radioterapia que incluye el movimiento respiratorio en la tomografía de simulación (4D) o incluso durante el proceso del tratamiento, de ésta última existe la modalidad *dampening* en el que el campo de irradiación se abre cuando el paciente detiene la respiración; otra modalidad es *gatting* en donde el campo de irradiación se abre cuando el tumor esté en la dirección del campo; y también está la modalidad de *tracking* que el campo de irradiación se mueve siguiendo el desplazamiento del tumor durante la respiración del paciente.

En cuanto a las partículas que se emplean en la radiación, existen diferentes tipos: fotones, neutrones, protones, electrones, rayos gamma o iones de carbono.

Los fotones (rayos X) son el tipo de partículas más comúnmente utilizadas en radioterapia. Mediante un acelerador lineal se genera un haz de energía (***Figura 5***) que se administra sobre

el tumor; el haz tiene un trayecto de entrada y uno de salida, administrando dosis bajas de radiación en los órganos y tejidos normales-sanos.



Figura 5. Acelerador lineal (LINAC).
Permitido por: *Varian Medical Systems, Inc. All rights reserved.*

Los neutrones se usan como radiación única de alta transferencia de energía lineal (*high*-LET), generada a través de un ciclotrón. Tiene aplicación limitada en la oncología radioterápica, porque, aunque ofrece mejor control loco-regional, no hay mejora significativa en la supervivencia y las toxicidades grados 3 o 4 a largo plazo son mayores que con otras técnicas.

Los protones se producen mediante un ciclotrón y su principal característica es que la liberación de la energía se puede controlar, depositando la mayor cantidad de energía en el tumor y limitando así la radiación en el tejido circundante sano.

Los electrones son usados como complemento o en combinación con otros tratamientos, debido a que esta energía no es capaz de penetrar profundamente. Se utiliza como radiación externa, limitándose su aplicación a procedimientos intraoperatorios o en el tratamiento de cáncer cutáneo.

Los rayos gamma son una forma de fotones, pero producidos por isótopos radioactivos. Los más utilizados son el radio, uranio o cobalto 60. Este último fue uno de los tratamientos más utilizados antes de la incorporación de los aceleradores lineales de fotones. Actualmente se utiliza como radiocirugía estereotáxica.

Los iones carbono son un tipo de radiación que no utiliza fotones, sino iones cargados positivamente. Su principal característica es su gran peso, lo que permite una aceleración rápida al entrar en contacto con el cuerpo, una desaceleración con pérdida de energía y una liberación de la energía eficaz en el sitio en el que se detiene.

1.2.2 Prescripción y restricción de dosis

La Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR) publica en 2013 las Guías Prácticas de Oncología Radioterápica en donde especifica las prescripciones y restricciones recomendadas y resumidas en las siguientes tablas: (***Tablas 2 y 3)***

Tabla 2. Prescripción de dosis en pacientes NSCLC

Radioterapia	Dosis
RT radical (fraccionamiento convencional)	63-66 Gy (1,8-2 Gy fracción) 77,4 Gy (sin quimoterapia; mantener V20 < 35%)
RT radical (hipfraccionada)	48 Gy (4 Gy fracción)
RT postoperatoria (N2)	50 Gy (1,8-2 Gy fracción)
RT postoperatoria (R1)	63-66 Gy (1,8-2 Gy fracción)
RT postoperatoria (extensión extracapsular)	63-66 Gy (1,8-2 Gy fracción)
RT estereotáxica extracraneal	60 Gy (20 Gy fracción)

NSCLC, cáncer de pulmón no microcítico; RT, Radioterapia.
Tabla adaptada de: Guías Prácticas de Oncología Radioterápica [107], con permiso de: la Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR).

Tabla 3. Restricción de dosis en pacientes NSCLC

Órgano	RT exclusiva	RT/quimioterapia
Pulmón	V20 ≤ 40 % Dosis media ≤ 20 Gy	V20 ≤ 30-35 % Dosis media ≤ 16-20 Gy V5 ≤ 65 %
Médula	Dosis máxima ≤ 50 Gy	Dosis máxima ≤ 46 Gy
Esófago	V60 ≤ 50 % V55 ≤ 65 % Dosis media ≤ 34 Gy	V55 ≤ 50 % Dosis media ≤ 34 Gy
Corazón	V40 ≤ 80 % V45 ≤ 65 % Dosis media ≤ 35 Gy	V40 ≤ 80 % V45 ≤ 60 % Dosis media ≤ 35 Gy
Plexo braquial	Dosis máxima ≤ 66 Gy	Dosis máxima ≤ 66 Gy

NSCLC, cáncer de pulmón no microcítico; RT, Radioterapia.
Tabla adaptada de: Guías Prácticas de Oncología Radioterápica [107], con permiso de: la SEOR.

1.2.3 Proceso de preparación para la radioterapia

1.2.3.1 Consulta inicial

Una vez decidido que la mejor opción terapéutica es la radioterapia, el paciente acude al servicio de oncología radioterápica, en donde es evaluado por un oncólogo de radioterapia para definir el tipo de radioterapia que se utilizará. En esta primera consulta se realiza una anamnesis extensa y una exploración física detallada, se revisa la historia clínica y todas las pruebas, exámenes y análisis de los que se disponga.

Al paciente se le explica detalladamente las características del procedimiento, el objetivo del tratamiento, los riesgos existentes, las posibles complicaciones, los beneficios esperados y se resuelven todas las dudas que el paciente o sus acompañantes tengan con respecto al tratamiento.

1.2.3.2 Consentimiento informado

Una vez que se han resuelto todas las dudas del paciente sobre el tratamiento propuesto, se le da el tiempo que considere necesario para comprender las implicaciones del tratamiento y se le pide que firme un formulario de consentimiento en donde acepta recibir el tratamiento propuesto.

1.2.3.3 Posicionamiento del paciente

La posición es importante en la radioterapia, por lo que en ocasiones es necesario el uso de dispositivos destinados a minimizar el movimiento del paciente durante las fracciones del tratamiento, pero también para reproducir la misma posición del paciente durante todo el periodo de tratamiento.

Siempre que sea posible, el paciente debe estar en posición supina con ambos brazos por encima de la cabeza, según las recomendaciones de la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC). [108] Se recomienda el uso de colchonetas de vacío o apoyabrazos para fijar la posición. El paciente debe respirar con normalidad durante el tratamiento.

1.2.3.4 Adquisición de imágenes

Las imágenes sobre las que se realiza el plan del tratamiento se obtienen mediante una tomografía computarizada, con el paciente en la posición en la que será tratado, para ayudar a delinear el tumor primario, el volumen objetivo de los ganglios linfáticos y los órganos de riesgo. La tomografía debe tener una matriz de 512 x 512 vóxeles (unidad cúbica que compone un objeto tridimensional) en el plano axial, un grosor de corte de entre 2 y 3 mm y un rango de exploración longitudinal que cubra al menos desde el cricoides hasta la mitad del abdomen. [109] Además puede estar complementada con un estudio de PET. (***Figura 6***)

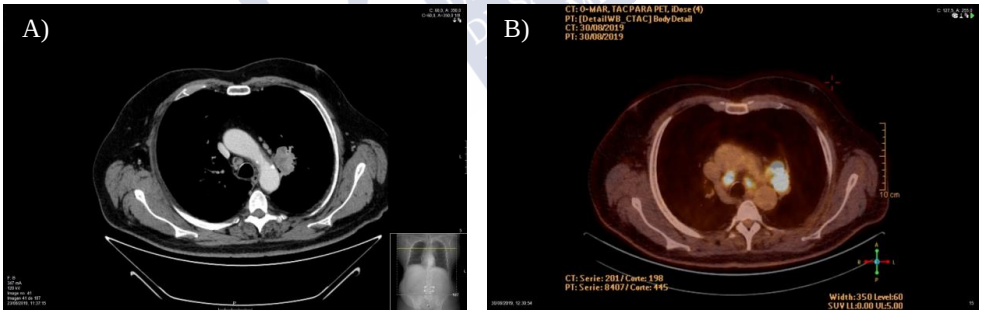


Figura 6. Adquisición de imágenes para planificación de tratamiento radioterápico.
A) Tomografía axial computarizada, B) tomografía con emisión de positrones.

1.2.3.5 Delineado de volúmenes

El volumen tumoral macroscópico (*gross tumor volume*, GTV) se delinea tomando en cuenta el tumor primario y las adenopatías. El volumen blanco clínico (*clinical target volume*, CTV) se considera el GTV más 1-1,5 cm y el volumen blanco de planificación (*planning target volume*, PTV) es el CTV + 0,5-1 cm. (***Figura 7***) El delineado de los volúmenes se realiza con *software* especializados como Aria® (Varian *medical systems*) o sistemas de contorneado FOCAL (fusión de tomografía computarizada y acelerador lineal).

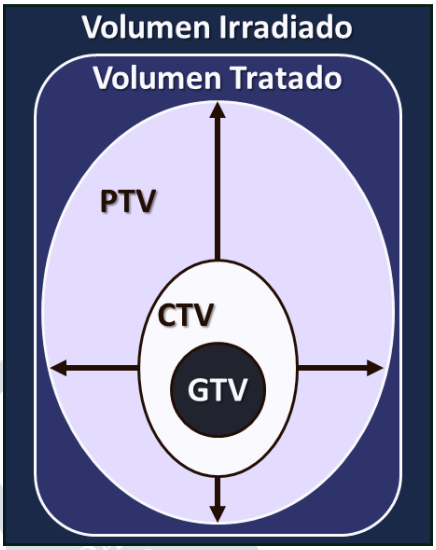


Figura 7. Esquema del delineado de volúmenes. GTV, volumen tumoral macroscópico; CTV, volumen blanco clínico; PTV, volumen blanco de planificación.

1.2.3.5.1 GTV

Las guías internacionales [109] recomiendan delinear, de forma obligatoria, el GTV en la planificación del tratamiento de los pacientes con NSCLC.

El GTV del tumor primario y el GTV de los ganglios linfáticos deben contornearse por separado, siempre que se puedan distinguir anatómicamente. [109] El delineado se realizará usando configuraciones de nivel de ventana apropiadas; la configuración de la ventana pulmonar preestablecida es W (ancho de ventana) =1600 y L (nivel de ventana) =-600, que debe usarse para delinear tumores rodeados de tejido pulmonar, mientras que la configuración de la ventana preestablecida del mediastino es W=400 y L=20; y debe usarse para delinear los ganglios linfáticos y tumores primarios que invaden el mediastino o la pared torácica. [108]

La delineación del GTV debe basarse en una tomografía reciente y un PET-FDG (tomografía por emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa). Las regiones de atelectasia que se encuentras más allá del borde de la mayor captación de FDG pueden excluirse del GTV. [110]

Los ganglios linfáticos que han sido diagnosticados e identificados como malignos por biopsia o bien que se consideran patológicos en PET se delinean como GTV. [111] En el caso de los nódulos mediastínicos que presenten incertidumbre diagnóstica, se optará por incluirlos. [112] Las estaciones linfáticas deben delinearse usando la octava edición del Atlas del TNM. [113]

1.2.3.5.2 CTV

El CTV del tumor primario debe delinearse ampliando un margen de entre cinco y ocho milímetros desde el GTV [109,114] y debe editarse manualmente de acuerdo a la anatomía circundante. [115,116]

Existen dos opciones recomendadas por las guías internacionales para el contorneo del CTV de los ganglios linfáticos: Incluir la estación de ganglios linfáticos patológicamente afectados en donde se incluya un margen de cinco a ocho milímetros alrededor del GTV, o bien, hacer un contorneo de expansión geométrica del GTV linfático, como el

realizado en el tumor primario. Este margen puede adaptarse de acuerdo con el tamaño de los ganglios linfáticos o la histología del tumor primario. [114,116]

1.2.3.5.3 PTV

El PTV se crea expandiendo un margen alrededor del CTV considerando así las incertidumbres geométricas. De acuerdo a las recomendaciones actuales de la Comisión Internacional de Unidades y Mediciones de Radiación (ICRU) se consideran incertidumbres geométricas los errores de delineación, [117] la variación de posición del paciente inter e intra-fracción, desplazamiento del tumor y los errores relacionados con el movimiento. Las guías internacionales recomiendan no realizar la edición manual del PTV.

El PTV es una extensión de 1 cm en todas las direcciones sobre el CTV, y 1,5 cm hacia arriba o hacia abajo en el caso de aquellos tumores ubicados en el lóbulo inferior con desplazamientos importantes en la respiración.

1.2.3.6 Delineado de órganos en riesgo

Los órganos en riesgo que deben contornearse en el NSCLC son: pulmones (ambos por separado y juntos, ambos excluyendo el GTV), esófago, canal espinal y corazón; opcionalmente se puede incluir el plexo braquial si el tumor está localizado en el lóbulo superior. [107,109] (***Figura 8 y 9,*** Ejemplo de un delineado de estructuras) El delineado de los órganos de riesgo se realiza usando s*oftware* especializado (Aria® o FOCAL).

1.2.3.6.1 Delineado de pulmón

Los contornos pulmonares se limitan al parénquima pulmonar que se encuentra en inspiración, se evitará incluir líquido y/o atelectasias visibles en la imagen de la tomografía, en caso de existir. Se debe excluir el árbol bronquial proximal y se deben incluir vasos de pequeño calibre (< 1 cm o vasos más allá de la región hiliar). El pulmón derecho e izquierdo se debe contornear como una estructura o como estructuras separadas.

Se pueden utilizar herramientas de contorneo automatizado; sin embargo, se deben elegir los umbrales apropiados, específicos para cada tomografía. Siempre deberán revisarse y editarse las estructuras autocontorneadas.

Normalmente los límites de dosis pulmonar se basan en los histogramas dosis-volumen (DVH) de ambos pulmones, y con la exclusión del volumen-objetivo. Las recomendaciones actuales prefieren la exclusión del GTV y no el PTV en el delineado de esta estructura. [118]

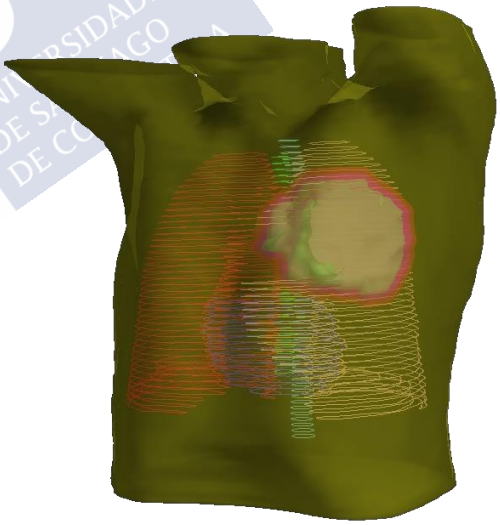


Figura 8. Reconstrucción del delineado con FOCAL. En amarillo, delineado el pulmón izquierdo; en rojo, pulmón derecho; en verde, esófago; en azul el corazón; el tumor en color sólido con el PTV en rosa.

1.2.3.6.2 Delineado de esófago

Debe contornearse utilizando una ventana mediastínica en la tomografía para corresponder a la mucosa, submucosa y todas las capas musculares hacia la adventicia grasa. El contornea comienza al nivel del cartílago cricoides y continúa hasta incluir la unión gastroesofágica.

1.2.3.6.3 Delineado de corazón

El corazón debe estar delineado junto con el saco pericárdico. El saco pericárdico rodea el corazón y se extiende hacia arriba para abarcar la arteria pulmonar principal, la aorta ascendente y la vena cava superior. El contorno debe extenderse superiormente al límite inferior del arco aórtico (la ventana aortopulmonar) y el límite superior del tronco de la arteria pulmonar.

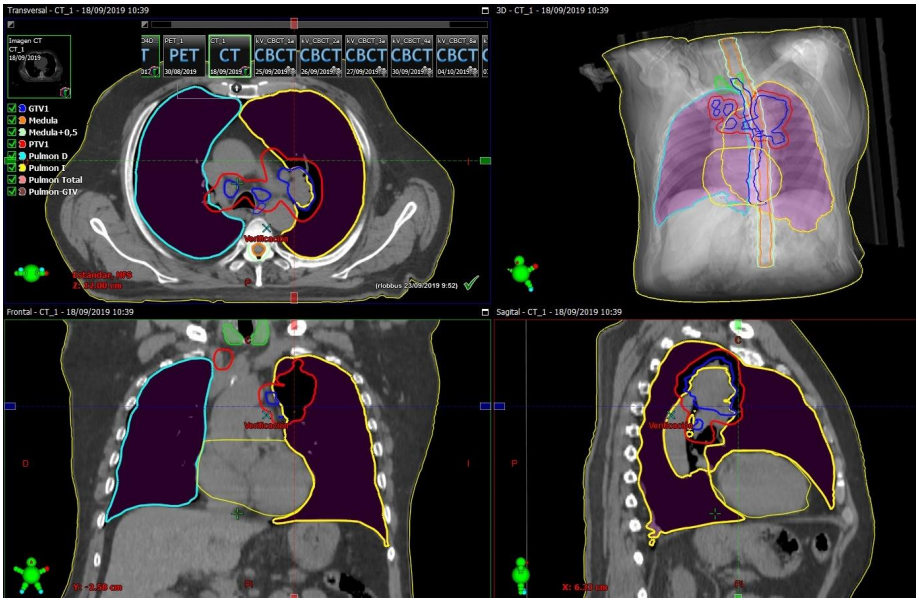


Figura 9. Delineado de estructuras.
Imagen superior izquierda, una reconstrucción transversal; superior derecha, reconstrucción en 3D; inferior izquierda, la reconstrucción frontal; e inferior derecha, una reconstrucción sagital de la tomografía. Las estructuras delineadas son: el pulmón derecho en cyan; pulmón derecho en amarillo; en azul el GTV y en rojo el PTV.

1.2.4 Planificación de la dosis

La planificación se realiza en los sistemas de tratamiento como XiO® (CMS) utilizando un algoritmo de superposición, que tiene en cuenta las correcciones de homogeneidad según el Informe de la Comisión Internacional de Unidades y Mediciones de Radiación (ICRU) o Eclipse™ 13.6 (*Varian*) que utiliza un algoritmo analítico anisotrópico que tiene en cuenta la heterogeneidad de los tejidos. (***Figura 10***)

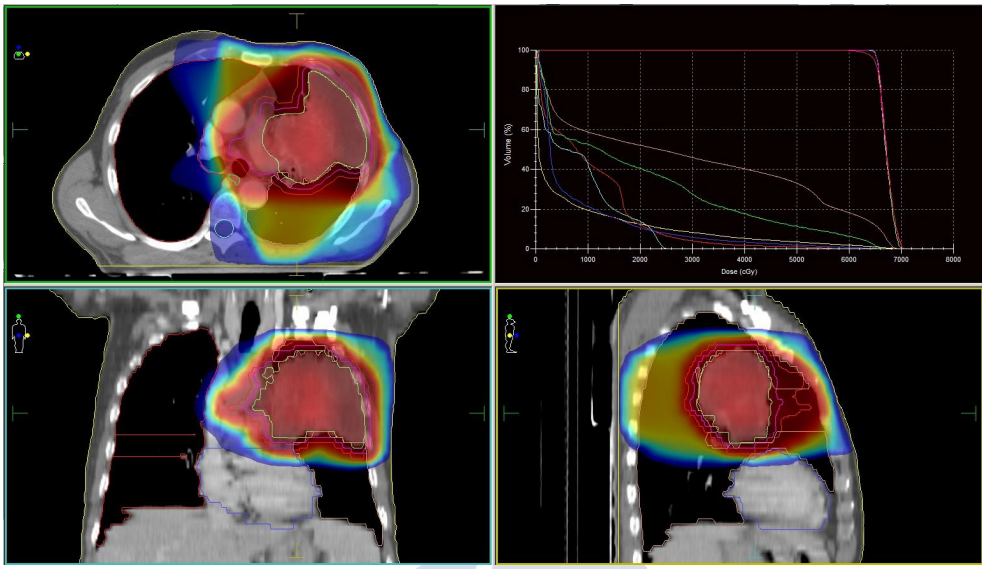


Figura 10. Planificación de la dosis.
Imagen superior izquierda, una reconstrucción transversal; inferior izquierda, la reconstrucción frontal; e inferior derecha, una reconstrucción sagital de la tomografía. La imagen superior derecha son las curvas dosis-volumen que recibe cada una de las estructuras delimitadas. Los colores en las imágenes representan la dosis recibida, de la más alta (roja) a la más baja (azul).

Se realiza el cálculo de la distribución de dosis en el volumen irradiado, que da como resultado los valores de dosis absoluta, los histogramas dosis-volumen correspondientes a PTV, CTV, GTV y los órganos en riesgo, así como el cálculo de las unidades monitor o tiempos de tratamiento para la dosis descrita. Estos datos se reportan en el informe dosimétrico, junto con la localización del isocentro respecto al sistema de referencia del paciente. [119]

1.2.5 Simulación

Una vez planificado el tratamiento radioterápico, se evalúa la técnica reconstruyendo digitalmente los haces que se requerirían en la radiación. Mediante una simulación matemática, se suman los efectos de la atenuación de haz en cada voxel de la tomografía. Se superponen los volúmenes delineados, los órganos de riesgo y los límites geométricos de los haces para tener una representación plana, la cual es utilizada como comprobación en la simulación-verificación y en el caso de coincidir se procede al tatuaje del paciente. [119]

1.2.6 Simulación-verificación

Todo el proceso de planificación del tratamiento se realiza sobre una misma tomografía, por lo que justo antes de administrar el tratamiento, se requiere la verificación sobre el propio paciente. Esta comprobación/simulación-verificación se basa en los parámetros geométricos y anatómicos.

Los parámetros geométricos que se verifican son las distancias que se propusieron durante el proceso de planificación y cálculo del tratamiento, que debieran coincidir con las distancias que existen entre la fuente de radiación y la superficie, así como la altura de las entradas de los haces, entre otras.

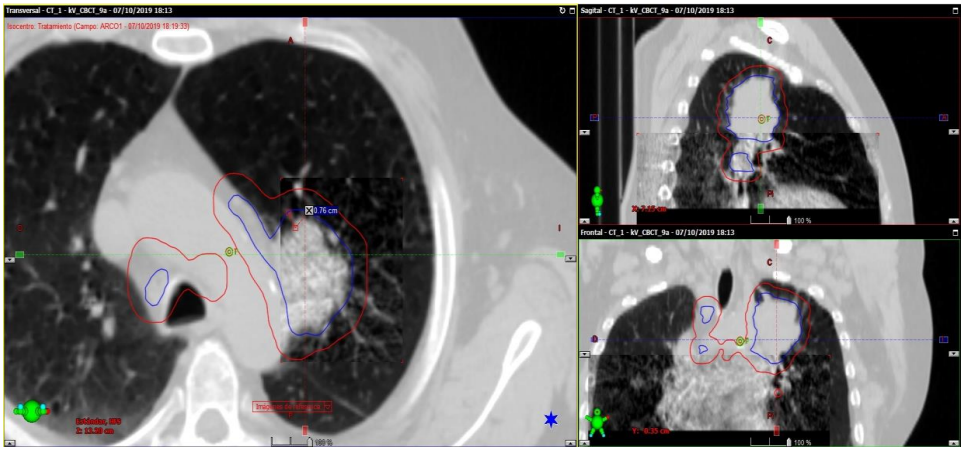


Figura 11. Comprobación de la planificación previa al tratamiento.
Imagen de la izquierda una reconstrucción transversal; superior derecha, reconstrucción sagital; e inferior derecha, reconstrucción frontal. En azul delimitado el GTV y en rojo el PTV.

Algunos de los parámetros anatómicos pueden verificarse a simple vista, por ejemplo, los límites del campo, que estuvieran delimitados sobre estructuras externas o palpables, sin embargo, algunos de estos parámetros requieren de una placa radiográfica que ayuda a verificar la posición de los volúmenes de tratamiento y los órganos de riesgo con respecto a la tomografía sobre la que se realizaron las planificaciones. Se verifica también que los adaptadores estén colocados correctamente y las multiláminas de los colimadores coincidan con lo planificado.

Si la simulación-verificación es correcta, los parámetros geométricos y anatómicos serán la referencia durante todo el tratamiento. [119]

1.2.7 Radiobiología del tumor

Los efectos antitumorales de la radioterapia se consiguen al dirigir una alta dosis de radiación para dañar las células tumorales, detener su crecimiento y división. [120] Se dividen en efectos directos e indirectos. [121] (***Figura 12)***

El efecto principal de la radiación sobre el tumor es provocar muerte celular directa, generando cambios en el ADN debido a pérdida de bases nitrogenadas o la rotura de puentes de hidrógeno entre bases complementarias, roturas simples o dobles en las hebras y muchas de las veces roturas múltiples a lo largo de las hebras del ADN.

Desde el punto de vista de la radiobiología, se considera muerte celular por radiación a la eliminación de la integridad reproductiva, la cual puede provocarse mediante apoptosis, catástrofe mitótica o por senescencia inducida. Cualquiera de estos mecanismos provoca una despoblación celular que puede llevar a la posterior deficiencia funcional. [122]

Existen diferencias de radiosensibilidad durante las fases del ciclo celular siendo la fase S tardía la más radioresistente. En el ciclo celular, los puntos de control (*checkpoints*) monitorean el proceso mediante complejos formados por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas. Estos *checkpoints* controlan la transición G2-M, mediada en este caso por la ciclina B1 y el complejo p34 CDC-2; la transición M-G1 mediada por la ciclina D1 y el complejo cdk-4; la transición de G1-S por la ciclina E y el complejo cdk-2; y la transición S-G2 por la ciclina A y el complejo

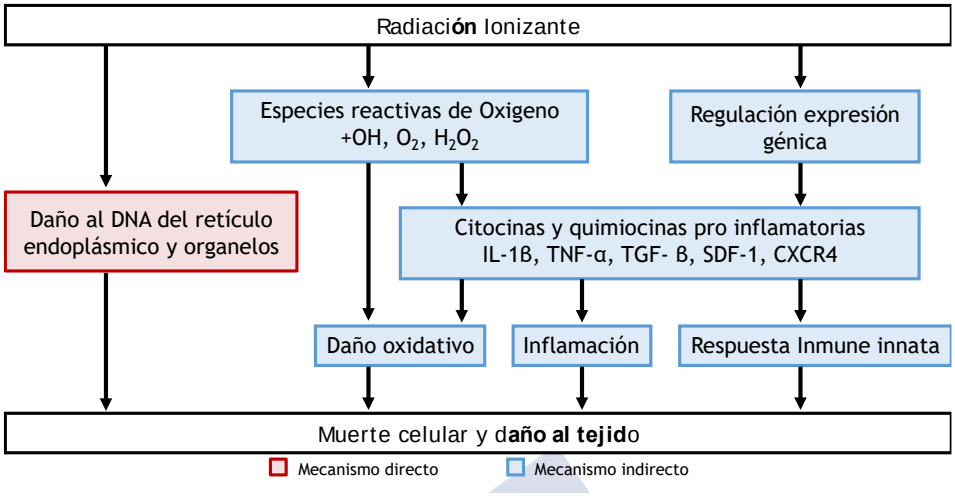


Figura 12. Mecanismos directos e indirectos de muerte celular y daño asociado con la exposición a la radiación ionizante.
Adaptada de: Hall et al. 2016. [121], con permiso de: *Creative Commons Attribution License*.

CDC-2. Las fases del ciclo celular que son más radiosensibles son G2 y M, debido probablemente a la compactación de la cromatina y la baja capacidad de reparación existente en estas fases. (***Figura 13***) La mayoría de los tumores presentan en promedio un rango de tiempo de duplicación de volumen de 2-3 meses, con una duración del ciclo celular de las células tumorales de 2-3 días, que equivale a un tiempo de duplicación potencial subyacente de entre 4-20 días. Por lo que un tumor con gran proporción de células en proliferación recibe más daño temprano y supone un retroceso rápido de su crecimiento, por lo que la tasa de respuesta directa a la radiación depende de la tasa de proliferación de sus poblaciones celulares. [122]

El efecto indirecto de la radiación se produce cuando los fotones son absorbidos en el líquido intracelular, que corresponde al 80% de la masa de una célula viva, provocando una serie de cambios químicos conocidos como radiolisis del agua. Allí, la radiación interactúa físicamente provocando un exceso de ionización y excitación en las moléculas de agua, que puede producir radicales libres OH^- e H^+, el primero tiene un electrón no pareado, por lo que es un agente oxidante altamente reactivo. Estos radicales libres interactúan con otras moléculas vecinas, desencadenando daños en los sistemas biológicos y reacciones en cadena,

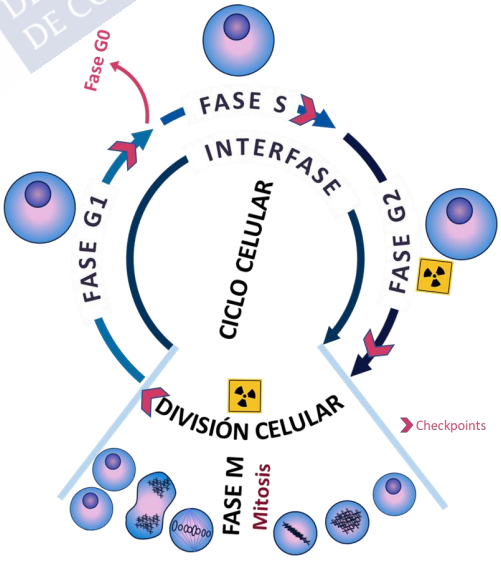


Figura 13. Radiosensibilidad en el ciclo celular.

principalmente reaccionan con otras moléculas dentro de las células, el ADN, los lípidos y otros componentes subcelulares.

Otro efecto indirecto es el que provoca la radiación sobre la expresión génica. Se ha descrito que la actividad de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico aumenta después de exponer a las células a radiación ionizante. Un estudio *in vitro* demostró que la adición del factor de crecimiento epidérmico en las células en cultivo las hace resistentes a la radiación. La radioterapia inicia cascadas inflamatorias, después del daño del ADN inducido por la RT, las vías de reparación desencadenan la expresión de los genes implicados en la inflamación, incluidas las interleucinas (IL-1α y β, IL-6, TNFα, TGF-β), moléculas de adhesión, quimiocinas (CXCR-4, CXCL12, CCL-5), así como factores antiapoptóticos (Bax y Bcl-2). [123] Esta expresión génica modula la respuesta a la radiación, desencadenando una respuesta inmunológica, con efectos en el microambiente tumoral. [124–127] La radiación, al producir diferentes tipos de muerte celular en las células tumorales, libera citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, antígenos tumorales y otras señales, lo que promueve la formación de neoantígenos tumorales que pueden iniciar las respuestas inmunológicas. Este efecto de la radiación mejora la inmunogenicidad al tumor, lo que puede significar un efecto antitumoral sistémico dentro y fuera del campo de la irradiación. [124,128]

La expresión anormal de oncogenes y genes supresores de tumores puede aumentar la radioresistencia de las células. Se ha descrito aumento en la supervivencia tras la radiación en células transfectadas con oncogenes activados como *RAS*, *SRC* o *RAF*. La radioresistencia aumenta en células con el gen *RAS* activado en combinación con mutaciones en *c-Myc* o *p53*, y en contrasentido, se ha observado que inhibidores de la función de la proteína ras mejoran la citotoxicidad inducida por la radiación en modelos celulares de cáncer de mama, pulmón, colon y vejiga humanas que expresan los genes *H-* o *K-ras* mutados. [122]

La sensibilidad a la radiación se ve afectada por las interacciones celulares con la matriz extracelular o con factores de crecimiento que pueden influir en la señalización celular como las vías EGFR/MEK/ERK. La estructura tumoral también influye de forma importante, cuando existe heterogeneidad en las poblaciones celulares dentro del tumor. Por ejemplo, se ha descrito que el aumento en el número de células madre cancerosas puede aumentar la radioresistencia tumoral.

Otro factor importante dentro de la radiobiología del tumor es la hipoxia tumoral. Mientras que en el tejido normal las concentraciones de oxígeno varían entre 10-80 mmHg, los tumores tienen regiones privadas de nutrientes, bajo pH, alta presión de fluido intersticial y concentraciones de oxígeno por debajo de los 5 mmHg. La hipoxia puede provocar la resistencia a la radiación, probablemente debida a la expresión génica asociada a la hipoxia. Se ha descrito que la expresión de hasta 1,5% del genoma puede modificarse por la exposición a la hipoxia. Aquí se incluyen genes involucrados en la respiración anaeróbica, enzimas glucolíticas, proteínas de la membrana celular transportadoras de glucosa, enzimas que controlan los niveles de carbono, genes involucrados en el transporte de oxígeno o que aumentan la vascularización, así como factores de supervivencia de las células cancerosas, como el gen de la subunidad *alpha* del factor 1 inducible por hipoxia. Las células con mutaciones en el gen *TP53* adquieren resistencia a la apoptosis mediada por hipoxia, creando una sobrepoblación de células con p53 mutado dentro del tumor, promoviendo la progresión.

1.3 EFECTOS ADVERSOS A LA RADIOTERAPIA EN PACIENTES NSCLC

El éxito de la radioterapia depende especialmente de la dosis de radiación, sin embargo, los haces dirigidos al tumor deben pasar a través de los órganos y tejidos que lo rodean, por lo que la dosis final está limitada por la tolerancia de estos tejidos circundantes. [129]

El ratio terapéutico es el equilibrio que existe entre la probabilidad de controlar el tumor y el riesgo de presentar efectos adversos en el tejido normal. [130] El ratio terapéutico es un corte vertical a través de las dos curvas a una dosis clínicamente aceptable, o bien una medida de desplazamiento horizontal entre las dos curvas. En la clínica se define como el porcentaje de control tumoral que se obtiene a cierto nivel de efectos adversos desarrollados en tejido normal (p. ej. 5% de efectos adversos después de 5 años, dando un valor de dosis de tolerancia TD=5/5). En la ***Figura 14***, se muestran curvas teóricas dosis-respuesta para el control tumoral y las complicaciones en el tejido normal en dos situaciones distintas: la ***Figura 14A***, muestra un ratio terapéutico favorable, ya que la curva de control tumoral se desplaza a la izquierda de la curva de daño al tejido normal, que da como resultado alta probabilidad de control tumoral con baja probabilidad de toxicidad, que se traduce en un tumor más radiocurable. En la ***Figura 14B***, las dos curvas se encuentran demasiado próximas o la curva de control del tumor se desplaza hacia la derecha de la curva de daño al tejido normal, este ratio terapéutico es desfavorable porque para poder lograr un nivel mínimo de control del tumor es necesario aceptar un alto nivel de efectos adversos. [122]

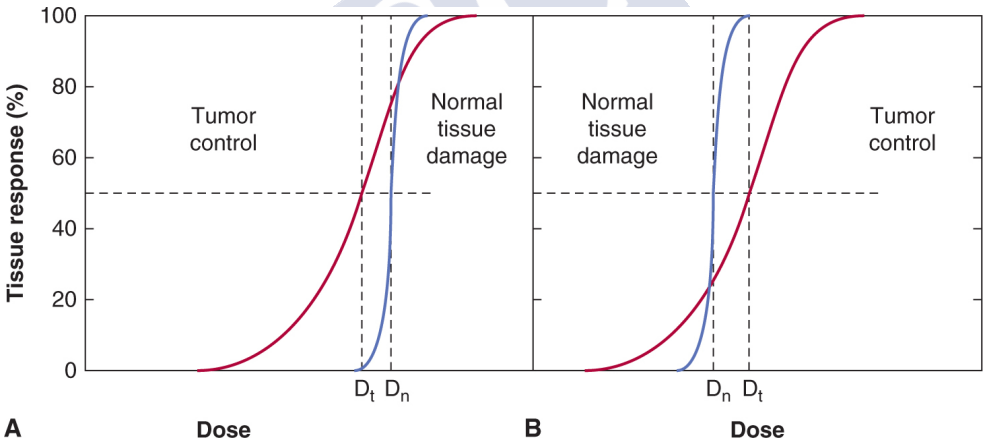


Figura 14. Curvas teóricas dosis-respuesta para el control tumoral y el daño al tejido normal.
A) con un ratio terapéutico favorable y B) con un ratio terapéutico desfavorable.
Dt, dosis con la que se obtiene un 50% de control tumoral; Dn, dosis con la que se asegura menos del 50% de daño al tejido normal; la línea roja, representa la curva dosis-respuesta de control tumoral; y la línea azul representa la curva dosis-respuesta del daño al tejido normal.
Con permiso de: *The McGraw-Hill Companies, Inc. The Basic Science of Oncology, Fifth Edition*. [332]

Una de las limitaciones en el cálculo del ratio terapéutico es que la estimación de las curvas de tolerancia del tejido normal se basa en datos provenientes de tendencias poblacionales y correlaciones estadísticas; o en enfoques de técnicas analíticas, que a su vez están basados en supuestos simplificados que reflejan observaciones experimentales. [131] Esto significa que el control tumoral está basado en datos generales, que podrían no aplicar para un caso en particular. Esto podría llevar, en algún caso, a exponer a un paciente a un control tumoral

bajo/escaso y en otro caso podría ser que algún paciente que no se adapta al modelo y al utilizarse las curvas generales podría presentar efectos adversos graves. Actualmente todos los recursos de investigación en este campo están centrados en la personalización, ya sea mediante modelos predictivos incluyendo parámetros clínicos o, como en la gran mayoría de los estudios, mediante la identificación de biomarcadores que permitan mejorar el poder predictivo de estos modelos de efectos adversos a la radioterapia.

La incidencia y el grado de afección de la toxicidad depende, en gran medida, de la forma en que se administra la terapia, sin embargo, existe gran variabilidad entre los pacientes, incluso después de un tratamiento estrictamente idéntico. [132] Por lo que, si tuviéramos la capacidad de predecir aquellos pacientes que son propensos a desarrollar efectos adversos mediante biomarcadores, personalizando la radioterapia, se podría evitar deterioros en la calidad de vida de los pacientes debido a toxicidades. De la misma manera, si pudiésemos predecir aquellos pacientes que presentasen mayor tolerancia a la radiación, podría aumentarse la dosis recibida en estos pacientes de forma que aumentaríamos el control tumoral y de esta forma su supervivencia.

1.3.1 Radiobiología en el tejido sano

El daño causado por la radioterapia a nivel celular y tisular puede provocar pérdida de la función de los tejidos normales. Se han descrito diferentes procesos, por ejemplo, en aquellos tejidos con alto índice de proliferación por renovación tisular como son el tracto gastrointestinal, la médula ósea o la capa basal de la piel, el daño puede deberse a la pérdida de la capacidad de proliferación de las células *stem*. En el caso de células linfoides, tímicas o hematopoyéticas el daño se ha asociado a la apoptosis inducida por la radiación. En el caso de los órganos con células parenquimatosas con bajo índice de proliferación, las reacciones adversas se asocian a daño al estroma y la vasculatura de soporte que conduce al deterioro progresivo de la circulación y a la muerte celular secundaria a privación de nutrientes. Otros procesos como estenosis o el desarrollo lento de fibrosis provocada por el proceso inflamatorio que conduce a la proliferación de fibroblastos y su diferenciación a fibrocitos que producen colágeno y terminan desarrollando áreas de fibrosis que limitan la función del tejido.

El daño vascular y la inducción de citoquinas inflamatorias provocadas por la radiación involucra factores pro y antiinflamatorios (TNF-α, IL-1α, IL-β, TGF-β), además de factores de crecimiento asociados con deposición de colágeno, fibrosis, inflamación y crecimiento vascular anormal, los cuales tienen severas implicaciones en la respuesta de los tejidos normales. Así, lo que resulta favorable para el tratamiento contra el tumor, como es la apoptosis inducida por la radiación en las células endoteliales microvasculares, provocan lesiones importantes en el tejido sano.

El factor determinante en la sensibilidad a la radiación es el volumen irradiado del órgano normal. Para entender el efecto real debemos considerar las subunidades funcionales del órgano que se irradia (en el caso del cáncer de pulmón la cantidad de alvéolos en el volumen irradiado), si el órgano tiene una estructura funcional paralela (todas las subunidades hacen la misma función, p. ej. alvéolos) o una estructura funcional serial (si una subunidad depende de la función de la subunidad anterior, p. ej. médula espinal). Esto determina la gran diferencia en las dosis de tolerancia permitidas en los diferentes órganos. En el caso de la piel o mucosa el volumen es importante por la posibilidad de agotar las células madre basales, necesarias para repoblar el tejido dañado.

El daño provocado y la tolerancia de los diferentes órganos dependen en gran medida del volumen irradiado y de la dosis administrada.

1.3.2 Patogénesis de los efectos adversos

Los efectos adversos se dividen para su estudio dependiendo del momento en que se producen en agudos y tardíos. Tradicionalmente se les había considerado como dos entidades separadas, debido a su fisiopatología. [132] Más tarde, se describió la posible asociación entre la aparición de reacciones tempranas y el riesgo de presentar toxicidad tardía. [133,134]

La toxicidad aguda puede manifestarse durante el tratamiento o a las pocas semanas de completar un ciclo de radioterapia fraccionada y se describe principalmente en los tejidos que se encuentran en proliferación. Esta toxicidad suele ser reversible. [132,135] La patogénesis en los tejidos normales depende de la cinética y latencia de la renovación celular, el mantenimiento de las células madre, el papel de la inflamación, las citoquinas y las especies reactivas de oxígeno, principalmente.

La toxicidad tardía se presenta después de varios meses a años de terminar la radioterapia, se caracteriza por fibrosis, atrofia, daño vascular, daño neural, efectos endócrinos, estimulación deficiente en la regeneración del tejido que puede dar lugar a daños estructurales o funcionales que provoquen diversas manifestaciones clínicas. Suele tratarse de una toxicidad irreversible o incluso progresiva. [132,136]

Para dividir los efectos adversos agudos de los tardíos se utiliza un punto de corte arbitrario de 90 días después del inicio de la radioterapia. En cáncer de pulmón, la toxicidad aguda se considera a la que ocurre en los primeros tres meses desde el inicio del tratamiento, y la toxicidad tardía se considera el máximo grado de toxicidad que presenta el paciente entre los 6 y los 12 meses.

La lesión del tejido normal es un proceso dinámico en el que se han descrito gran cantidad de genes implicados. Estos pueden agruparse según su función en las siguientes categorías:

i) los que intervienen en la reparación del daño al ADN: en la detección de daño (*MRE11A, RAD50, NBN, H2AFX, TP53BP1, BRCA1, MDC1*), proteínas mediadoras (*RB1*, ciclinas (*CCNE1, CCND1, CCNB1,* etc.), *CDKs* (*CDK7, CDK10,* etc.)), *checkpoints* del ciclo celular (*MRE11A, RAD50, NBN, H2AFX, TP53BP1, BRCA1, MDC1*), reparación no homóloga NHEJ (*XRCC6, XRCC5, PRKDC, XRCC4, LIG4*), reparación homóloga (*RAD51, BRCA1, BRCA2, XRCC3*) o reparación por escisión de base (*XRCC1, APEX, OGG1*);
ii) los que intervienen en la fibrosis producida por la radiación: apoptosis (*TP53, BCL2,* caspasas (*CASP3*), *BIRC5, RHOB, TP53INP1, TNF, IL1A, IL6*), proteínas pro-fibroticas (*TGFB1, TGFB2, TGFB3, CTGF*), vía de señalización de Smad (SMAD regulado por receptores (*SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8*)), factores de transcripción, co-reguladores y co-receptores de unión al ADN (Receptor tipo I (*SMAD4*), inhibidores sMAD (*SMAD6, SMAD7*), *NFKB1*), aumento de la deposición de colágeno en la matriz extracelular (TGF receptores transmembrana *TGFBR1* y TGFBR2);
iii) los que provocan estrés oxidativo: enzimas antioxidantes (Superoxido dismutasas (*SOD1*)), sistema renina-angiotensina (*AGT*); y
iv) los que intervienen en el daño a células endoteliales: quimiocinas que reclutan monocitos (proteínas Rho, quinasas Rho, CTGF, HSP27, ZYX), citoquinas (FGF2), factores de crecimiento (VEGF). [137]

1.3.3 Factores de riesgo relacionados con efectos adversos a la radiación

Cada una de las manifestaciones clínicas de toxicidad tiene distintos factores de riesgo asociados que dependen del órgano afectado. Para la toxicidad global los principales factores de riesgo descritos han sido enfermedades asociadas, como la diabetes; factores ambientales, como el tabaquismo; y síndromes asociados a enfermedades genéticas raras como la ataxia telangiectasia.

Para estudiar los efectos adversos de forma individual se describen factores clínicos, como la localización del tumor, el uso de quimioterapia concurrente o el tabaquismo. Entre los factores dosimétricos asociados, los más importantes son la dosis media de pulmón y los volúmenes V5 y V20 (porcentaje del volumen de pulmón que recibe al menos 5Gy y 20Gy, respectivamente); en esófago, la dosis media de esófago y el V60 (porcentaje de esófago que recibe más de 60Gy); en corazón, la máxima dosis administrada en 1cc de corazón y los volúmenes V5, V30, V40, V50 (porcentaje de corazón que recibe al menos 5, 30, 40 y 50Gy, respectivamente); la dosis total administrada al paciente y el esquema de fraccionamiento. [138]

1.3.4 Manifestaciones clínicas de los efectos adversos a la radiación en pacientes con NSCLC

Las manifestaciones clínicas de los efectos de la radiación en los órganos de riesgo dependen principalmente de la dosis administrada. De allí que se han definido las dosis máximas permitidas para los órganos en riesgo.

Los principales efectos adversos estudiados en cáncer de pulmón se dividen en varios grupos dependiendo de los órganos en riesgo:

1.3.4.1 Toxicidades pulmonares

Al tratarse del mayor órgano en riesgo, al encontrarse la lesión ubicada dentro de las vías respiratorias, existen varias toxicidades que se deben vigilar en el paciente NSCLC tratado con radioterapia. Dentro de este grupo se estudian la tos, disnea, hemorragia broncopulmonar, neumonitis, dolor de la pared torácica, fibrosis pulmonar, fístula bronquial y traqueal y estenosis bronquial y traqueal. Debido a que muchas de estas toxicidades forman parte de las manifestaciones clínicas del propio tumor, son un parámetro difícil de estimar.

La neumonitis por radiación es la complicación más importante que limita el tratamiento radioterápico, [139,140] al tratarse de una complicación en algunos casos irreversible y mortal. [138] La neumonitis es un tipo de inflamación y posterior fibrosis que es responsable de causar mala calidad de vida o síntomas potencialmente mortales en el 5 al 50% de todos los pacientes NSCLC que reciben radioterapia. [141]

La disnea es una entidad compleja debido a su fisiopatología; se caracteriza por la falta de aire y molestias al respirar. La sensación de falta de aire puede tener diferentes orígenes: a nivel del tronco encefálico, vías respiratorias superiores, los pulmones, la pared torácica o varios agentes pueden causar la sensación de disnea. [142] Es una de las toxicidades que afecta más negativamente la calidad de vida en pacientes con cáncer. [143]

El remplazo del parénquima pulmonar normal por tejido fibrótico como respuesta a la radioterapia puede provocar insuficiencia pulmonar crónica que se evalúa dentro del efecto adverso de fibrosis pulmonar.

El dolor de la pared torácica se ha descrito en pacientes NSCLC tratados con radioterapia, sin embargo, es una de las toxicidades más subjetivas que entran dentro de este grupo. El dolor se ha asociado con un índice de masa corporal por encima de 29 y en pacientes diabéticos. [144]

1.3.4.2 Toxicidades esofágicas

Otro de los órganos de riesgo en el tratamiento radioterápico del NSCLC es el esófago. La esofagitis aguda es una complicación frecuente en el tratamiento del cáncer de pulmón. [145,146] Las complicaciones tardías incluyen estenosis o ulceración, perforaciones y fístulas traqueoesofágicas, que afectan significativamente la calidad de vida y pueden afectar la supervivencia del paciente tratado. [146,147]

Dentro de las toxicidades que se evalúan en este grupo están la esofagitis, disfagia, fistula y estenosis esofágica.

Los síntomas de esofagitis se presentan normalmente dos a tres semanas después del inicio de la radioterapia, la inflamación del esófago se presenta inicialmente con dolor de garganta, disfagia y sensación de atragantamiento. Se considera que la esofagitis es una alteración reversible en la mayoría de los casos, y esto ocurre de dos a cuatro semanas después de haber terminado el tratamiento. [148,149]

El daño provocado por la radiación incluye inflamación, edema, eritema y erosión de la superficie mucosa relacionadas con el daño celular. [150] Estudios mediante endoscopía han demostrado que la esofagitis aguda presenta eritema, erosión, mucosidad, ulceraciones y hemorragia; mientras que, en la crónica, se observa fibrosis, atipia y cambios inflamatorios.

1.3.4.3 Toxicidades cardíacas

Se han descrito toxicidades relacionadas con el corazón cuando éste se encuentra incluido en el campo de la radioterapia, dichas complicaciones pueden ser pericarditis, enfermedad de las arterias coronarias, anomalías en la conducción, insuficiencia vascular, derrame pericárdico o cardiomiopatía. [151]

Las enfermedades cardiovasculares son una causa frecuente de muerte no maligna en supervivientes al cáncer tratados con radiación. [152] La pericarditis es la complicación más frecuente, aunque su presentación aguda suele ser autolimitada. Del 10 al 20% de los pacientes desarrollan pericarditis crónica o constrictiva entre cinco a 10 años después del tratamiento. [153]

Un estudio realizado en autopsias de pacientes con antecedentes de radiación torácica reportó el 70% (14 de 27 pacientes) de presencia de daño pericárdico. [154] El derrame pericárdico se caracteriza por adherencias fibrosas, alto recuento de proteínas y aumento de los marcadores inflamatorios séricos.

La fusión y engrosamiento fibrótico de las capas visceral y parietal en presencia de un derrame tenso en el espacio pericárdico libre se conoce como pericarditis efusivo-constrictiva y se ha descrito en los supervivientes de cáncer tratados con radiación. [155]

1.3.4.4 Toxicidades neurológicas

Entre las toxicidades neurológicas se encuentra la plexopatía braquial, la cual se presenta en pacientes que tienen tumores en localización apical, debido a que suelen tener el plexo braquial incluido en el campo de tratamiento. Presentan como síntomas: paresias, debilidad motora y dolor neuropático. Aunque se trata de una toxicidad poco frecuente, afecta a los pacientes de forma importante, al presentar éstos dolor crónico, disminución de la función y al no existir un tratamiento satisfactorio. [156]

1.3.4.5 Toxicidad cutánea

El 95% de los pacientes sometidos a radioterapia, presenta algún grado de dermatitis por radiación. [157–159] Aproximadamente el 85% de los pacientes experimentarán toxicidad

de moderada a grave en las áreas expuestas. [157] La radiodermatitis se considera una toxicidad aguda y reversible en la mayoría de los casos.

Los cambios que se presentan en la piel van desde el eritema leve a la descamación seca o húmeda. [159,160] El dolor que provoca este eritema es a menudo causa de interrupción prematura de la radioterapia.

Las lesiones en la piel son provocadas por el daño sobre las células que tienen rápida tasa de proliferación, como son los queratinocitos basales, las células madre del folículo piloso y los melanocitos. [158] Después se inicia una reacción inflamatoria local que conduce al daño en el tejido. Las exposiciones repetidas a la radiación no permiten la reparación celular y la regeneración tisular lo que contribuye al desarrollo de las lesiones.

1.3.5 Criterios de terminología y gradación de efectos adversos

Los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos (CTCAE, por sus siglas en inglés) son definiciones estandarizadas que describen y proporcionan una escala de clasificación de la gravedad de los eventos adversos en cada uno de los órganos de los pacientes que reciben terapia contra el cáncer. Dichos criterios fueron creados por el Instituto Nacional del Cáncer (NIC) de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) en Estados Unidos.

Los criterios están clasificados de acuerdo con la jerarquía MedDRA (Diccionario médico para la regulación de actividades, por sus siglas en inglés) por sistemas anatómicos o fisiológicos, etiología o propósito.

Se define como evento adverso a cualquier signo desfavorable e involuntario, síntoma o enfermedad asociada temporalmente con el uso de un tratamiento o procedimiento médico, que puede o no considerarse relacionado con el tratamiento o procedimiento médico. [161]

Actualmente existe la versión 5.0 (CTCAE v5.0) que entró en vigor en el año 2018. La versión anterior (CTCAE v.4.0) fue publicada en 2009. Los eventos adversos a la radioterapia en cáncer de pulmón y su grado de toxicidad dependiendo de la versión de CTCAE se encuentran detalladas en el **ANEXO 4**.

1.4 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA A LOS EFECTOS ADVERSOS PRODUCIDOS POR LA RADIACIÓN IONIZANTE

1.4.1 Cronología de estudios de susceptibilidad genética a los efectos adversos a la radiación.

La variación en las reacciones de los tejidos normales a la radiación ha sido descrita desde los inicios del uso de la radioterapia. [162] La asociación de la sensibilidad extrema con síndromes de origen genético data de la década de 1960. El primer caso documentado fue el de un niño de diez años al que se le administró 3.000 rads (rad es la unidad actualmente en desuso para referirse a la dosis absorbida de radiación ionizante; 100 rads equivalen a 1 Gy) para tratar un linfosarcoma en el paladar. Tras el tratamiento, el niño desarrolló dermatitis severa que derivó en necrosis y la muerte del paciente ocho meses más tarde. [163] El segundo caso se reportó en 1968 en un niño de siete años con enfermedad de Hodgkin en mediastino. Después de dos semanas de radiación desarrolló disfagia y a los 34 días, después de administrar 2.750 rads, el tratamiento fue suspendido por esofagitis y dermatitis severas, dos semanas más tarde fallece por complicaciones en la vía aérea. [164] El tercer caso se reporta en 1975: un niño de siete años con un linfoma maligno en pulmón el cual, tras recibir 2.000 rads presenta disfagia y eritema en los campos de radiación. Los síntomas empeoraron y se detuvo el tratamiento a los 3.000 rads, pero el paciente continuó con disfagia y debilidad y finalmente falleció tres semanas más tarde. [165] Aunque estos tres niños no estaban relacionados entre sí, tenían una enfermedad en común: la ataxia telangiectasia, por lo que, en vista de las consecuencias severas de la radioterapia se aconsejó evitar la radioterapia en pacientes con ataxia telangiectasia y algunos síndromes relacionados. [165]

Durante la década de 1980, varios estudios buscaban ensayos que permitieran predecir la toxicidad a la radiación. Los principales hallazgos reportaban asociación entre la sensibilidad celular a la radiación y la toxicidad a la radiación en tejido clínicamente normal. [166–170] Estos estudios fueron realizados principalmente en biopsias de piel y en cultivos primarios de fibroblastos. El primer estudio realizado en pacientes con cáncer de mama, demostró que la toxicidad se correlacionaba con la radiosensibilidad *in vitro*, [171] aunque este resultado no pudo replicarse. [166,172,173] Actualmente se siguen evaluando ensayos en fibroblastos de piel como pruebas predictivas de toxicidad a la radiación. [174,175]

Más tarde se investigó el rol de la apoptosis de los linfocitos T como ensayo predictivo de toxicidad tardía, [176] actualmente conocido como ensayo de apoptosis inducida por radiación en linfocitos (RILA, por sus siglas en inglés). Dicho ensayo se realiza mediante citometría de flujo y consiste en el cálculo del porcentaje los linfocitos T que se encuentran en apoptosis, comparando la muestra de sangre que se irradia a 8 Gy con la muestra sin irradiar del mismo paciente. Se realizan dos marcajes, el primero es para identificar a los linfocitos T CD8 o CD4, utilizando antígenos anti-CD8 o anti-CD4 marcados con FITC (isotiocianato de fluoresceína, por sus siglas en inglés) y el segundo marcaje se realiza con ioduro de propidio, un agente intercalante fluorescente que no es permeable a la membrana, por lo que es útil para diferenciar células necróticas, apoptóticas y sanas en función de la integridad de la membrana. En RILA se consideran linfocitos apoptóticos aquellos que presentan reducción del marcaje con ioduro de propidio. La técnica incluye un cultivo de sangre completa durante 24 horas, la radiación de mitad de la muestra cultivada, un cultivo adicional de 48 horas, el marcaje con anticuerpos y el ioduro de propidio y su análisis en el citómetro. Esta es la prueba con mejor evidencia de predicción de toxicidad hasta el momento. [177–188] En pacientes con cáncer de pulmón, el RILA en CD4 y CD8 fue estudiado en 19 pacientes incluidos dentro del análisis con varios tipos de cáncer en 2005, [176] en donde se describió el poder predictivo de las diferencias de

porcentaje de RILA y la aparición tardía de efectos adversos en pacientes tratados con radioterapia. Más recientemente, un estudio multicéntrico realizado en 724 pacientes con cáncer de mama, 471 de próstata y 52 pacientes con cáncer de pulmón (25 de Reino Unido y 27 de Francia), describió la diferencia de los puntajes de RILA dependiendo del tipo de cáncer (para cáncer de mama la media de RILA fue = 19,2 ± 11,8%, para cáncer de próstata = 22,1 ± 12,0% y en cáncer de pulmón la media fue 15,1 ± 9,5%). El estudio no encontró relación entre el valor de RILA y los efectos adversos a la radiación aguda en pacientes con cáncer de pulmón. [178]

A partir de la era genómica, el enfoque de predicción de toxicidad a la radioterapia cambia y se centra en la búsqueda de variantes genéticas/genómicas predictoras de la respuesta a la radiación [189] Los primeros trabajos en el campo fueron estudios gen-candidato, en donde se analizaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes que por su función podrían estar implicados en el desarrollo de las toxicidades (ver apartado 1.4.4).

En el año 2002, Andreassen et al. [190] proponen un modelo para explicar cómo distintas variantes genéticas pueden contribuir al riesgo de desarrollar toxicidad inducida por radiación. Los autores plantean la existencia de variantes genéticas que se asociarían a reacciones adversas concretas, en tejidos específicos, aunque también existirían variantes genéticas que afectan a la radiosensibilidad general o global del paciente. En este modelo se incluyeron a los ensayos de radiosensibilidad realizados en tejidos, los cuales se asociarían a variantes genéticas nuevas, o a las asociadas a toxicidades específicas o bien a variantes asociadas con la toxicidad global. Este modelo dará lugar, más adelante, a una de las principales hipótesis planteadas en los estudios radiogenómicos. (***Figura 15)***

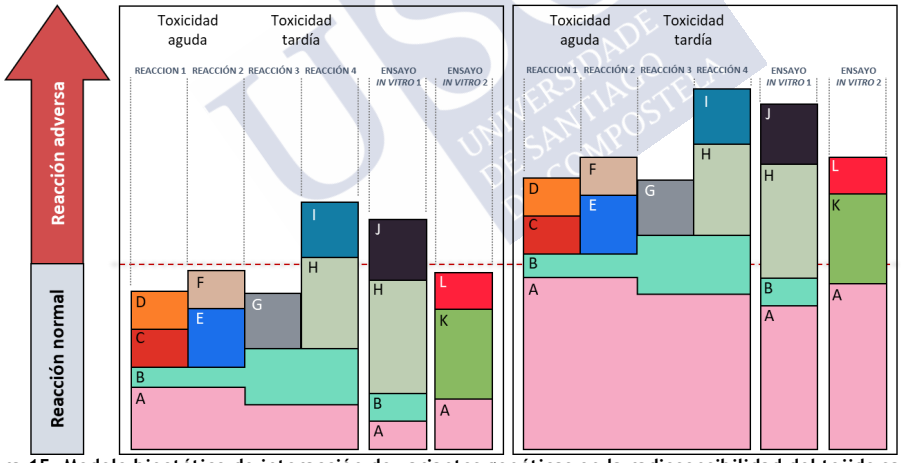


Figura 15. Modelo hipotético de interacción de variantes genéticas en la radiosensibilidad del tejido sano. Cada letra representa a un gen con variantes genéticas que afectan la radiosensibilidad. Algunos de estos genes (C-I) afectan selectivamente algún tipo de reacción adversa, mientras que los genes A y B, afectan la radiosensibilidad de forma generalizada. En el recuadro derecho se muestra el mismo modelo representando como una mutación de alta penetrancia en el gen A, que provoca un aumento en la radiosensibilidad con la posibilidad de presentar una mayor cantidad de efectos adversos.
Adaptado de: Andreassen et. al. (2002) [190], con permiso de: Elsevier.

1.4.2 Radiogenómica

El término Radiogenómica se utiliza por primera vez en el año 2002, por el grupo del Dr. Nicolaj Andreassen del departamento de Oncología Clínica Experimental de la Universidad de Aarhus, en Dinamarca, quien lo emplea por su analogía con la farmacogenómica. El término fue empleado más tarde por la profesora en biología de la radiación, Catharine West del Instituto

de Ciencias del Cáncer de la Universidad de Manchester en Reino Unido [191] y el profesor en epidemiología y salud pública y radiación oncológica Søren Bentzen de la división de bioestadística y bioinformática de la Universidad de Maryland en Estados Unidos. [132] A partir de entonces el término ha sido adoptado por la comunidad científica, que investiga en este campo.

La definición actualizada del término Radiogenómica es la siguiente:

> "El término radiogenómica se usa en dos contextos: ya sea para referirse al estudio de la variación genética asociada con la respuesta a la radiación (*Radiation Genomics*) o para referirse a la correlación entre las características de las imágenes del cáncer y la expresión génica (*Imaging Genomic*s).
> En la genómica de la radiación, la radiogenómica se utiliza para referirse al estudio de la variación genética asociada con la respuesta a la radioterapia. La variación genética, como los polimorfismos de un solo nucleótido, se estudia en relación con el riesgo de un paciente de cáncer de desarrollar toxicidad después de la radioterapia. [192–194] También se usa en el contexto del estudio de la genómica de la respuesta tumoral a la radioterapia. [195,196]" [1]

1.4.3 *RadioGenomics Consotrium* (RGC)

Los días 17 y 18 de noviembre del 2009 se estableció el *Radiogenomics Consortium* o Consorcio Internacional de Radiogenómica, en Manchester, Reino Unido. Participaron en la reunión especialistas en radiobiología, oncólogos radioterápicos, epidemiólogos y genetistas, y se anticipó que sería fundamental contar con investigadores expertos en física de la radiación, estadistas y bioinformáticos.



Figura 16. Logo de RGC.

En el momento de establecer el Consorcio Internacional de Radiogenómica se definieron dos objetivos, el primero fue desarrollar un ensayo capaz de predecir cuales pacientes con cáncer tendrán más probabilidades de presentar efectos adversos a la radioterapia. Y el segundo, obtener información que ayude a dilucidar las vías moleculares responsables de las toxicidades inducidas por la radiación en tejido normal, mediante la identificación de SNPs asociados a los efectos adversos. [197]

En noviembre de 2019, el consorcio cuenta con 230 miembros en 33 países y 135 instituciones. La coordinación del consorcio se basa en un comité dirigido por Barry Rosenstein de la Escuela de Medicina de Icahn en Mont Sinai, NY y la Profesora Catharine West de la Universidad de Manchester. Además, el comité de coordinación está integrado por Nicolaj Andreassen (Dinamarca), Behrozz Alizadeh (Países Bajos), Søren Bentzen (USA), Jenny Chang-Claude (Alemania), Alison Dunning (Reino Unido), Sarah Kerns (USA), Lindsay Morton (USA), Matthew Parliament (Canadá), Tiziana Rancati (Italia) Chris Talbot (Reino Unido) y Ana Vega (España).

Dentro del Consorcio Internacional de Radiogenómica se ha desarrollado la guía STROGAR (Fortalecimiento de los informes de estudios de asociación genética en

[1] Wikipedia contributors. (2019, September 3). Radiogenomics. In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 12:37, October 3, 2019, from https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Radiogenomics&oldid=913782936

radiogenómica, por sus siglas en inglés), en el que se definió la estructura y metodología adecuadas para reportar resultados de estudios en el contexto de la radiogenómica. La necesidad de desarrollar esta guía surgió al demostrarse que la falta de consistencia en las validaciones independientes de las asociaciones entre SNPs y efectos adversos podía deberse a deficiencias metodológicas. Estas pautas no solo sirven para reportar resultados, sino también para diseñar estudios prospectivos y pretende homogeneizar la interpretación de resultados en los estudios radiogenómicos. [198]

El primer trabajo realizado dentro del Consorcio Internacional de Radiogenómica fue un metaanálisis que no encontró asociación entre TGFB1 SNP rs1800469 y el desarrollo de toxicidad tardía en 2782 pacientes con cáncer de mama. [192] Los trabajos colaborativos han continuado desde entonces, con un total de 51 artículos publicados por los miembros del consorcio. [199]

1.4.4 Estudios de asociación gen-candidato

Los estudios de asociación gen-candidato fueron durante muchos años, la única aproximación utilizada para asociar variantes genéticas y efectos adversos a la radiación en pacientes con cáncer. Una revisión bibliográfica del 2016 identificó un total de 128 estudios publicados de genes candidatos en asociación con la radiobiología del tejido sano. [200]

El fundamento de los estudios de asociación gen-candidato establece que el componente principal de las variaciones genéticas del fenotipo estudiado se origina por mutaciones en los genes putativos. [201] Para llevar a cabo el estudio de asociación gen-candidato normalmente se realiza la selección de aquellos genes que regulan de forma directa o indirecta los mecanismos involucrados con la característica o enfermedad estudiada. Una vez seleccionados los genes, se eligen las variantes genéticas que se incluirán en el estudio, usualmente los *tag*-SNPs (se definen como aquel SNP más significativo en una región del genoma con desequilibrio de ligamiento elevado y que representa un grupo de SNP llamado haplotipo) o aquellos de los que se conoce las consecuencias funcionales y que afectan la regulación génica o la producción de la proteína. Los SNPs con alta frecuencia del alelo menor (MAF, por sus siglas en inglés) se ven favorecidos por este tipo de estudios frente a los que tienen MAF baja, esto puede provocar que la variación entre sujetos sea poca o ninguna y los resultados de asociación estén sesgados. El análisis consiste en comparar el recuento de los alelos o de los tres genotipos en un *locus* en los sujetos que presentan el rasgo estudiado (casos) con los sujetos que no lo tienen (controles). Dado que los datos se pueden organizar en tablas de contingencia estándar de Fisher (2x2 o 2x3, para alelos o genotipos respectivamente), la no-asociación con la hipótesis nula puede evaluarse usando la prueba de chi cuadrada de Pearson, siempre y cuando los SNPs no se desvíen en el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). En el caso de que HWE no se mantenga tanto en los casos como en los controles puede optarse por una prueba de tendencia de Cochran-Armitage. Los métodos de análisis estadístico más utilizados consisten en: i) modelar la probabilidad condicional de un individuo a presentar cierta característica, mediante la regresión logística u otros modelos lineales generalizados, [202] ii) modelar el riesgo proporcional mediante Cox, incluyendo el tiempo que transcurre hasta que ocurre el evento.

En radiogenómica, la selección de los genes candidatos se ha orientado a rutas de la reparación del ADN (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*), genes relacionados con la inflamación *(PRKCE*, *CD4*, *CD2*, etc.), proteínas de choque térmico (HSPB1), señalización de citoquinas (*TBFB1*) o en rutas de genes que codifican para proteínas antioxidantes (*SOD2*); [203] entre otros genes. [137]

La ausencia de validación de los resultados en estudios de genes candidatos ha sido frecuente. Por ejemplo, las variantes genéticas comunes localizados en el gen *TGFβ1* reportadas en asociación con varias toxicidades a la radiación, no han podido replicarse. [193,204] Un estudio realizado en 976 pacientes con cáncer de mama y 637 pacientes con cáncer de próstata en el año 2012, [193] estudió 92 SNPs en 46 genes previamente asociados con toxicidad a la radiación, y tampoco pudo validar ninguna de las asociaciones. En ese trabajo, los autores concluyeron que es poco probable que la variación común en los genes estudiados ayude a determinar la variación individual en la respuesta a la radioterapia. Una de las principales limitaciones de los estudios gen-candidato en radiogenómica, al igual que en la mayoría de los fenotipos estudiados con esta estrategia, es que el fenotipo de radiosensibilidad es complejo, de tipo poligénico y es probable que se estén omitiendo genes desconocidos que podrían estar involucrados. [203]

Así, los resultados obtenidos de los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han demostrado que el enfoque gen-candidato podría no ser la mejor aproximación para fases de descubrimiento, ya que la gran mayoría de los SNPs identificados en GWAS no se encontraban en los genes que se esperaba fueran de importancia para el fenotipo. [205]

1.4.4.1. Estudios gen-candidato en radiogenómica del cáncer de pulmón

La mayor parte de los estudios se han centrado en los cánceres de mama y próstata. En cáncer de pulmón, hasta finales del 2018, se han realizado 24 estudios de genes candidatos.

Los efectos adversos analizados en asociación con los genes candidatos han sido esofagitis y/o neumonitis. Las vías de señalización más frecuentemente estudiadas fueron los genes de reparación de doble cadena del ADN y los genes de inflamación.

La definición del fenotipo es variable entre los distintos estudios: así, la mayoría considera como toxicidad los grados mayores o igual a 3, mientras que otros trabajos consideran toxicidad a grados ≥ 2, o incluso en algún caso se considera toxicidad al grado ≥ 1. En relación con el tipo de tumor, cerca del 60% de los estudios analizaron exclusivamente pacientes NSCLC, mientras que el resto de los estudios incluyeron tanto NSCLC como SCLCL. También las escalas de medida de toxicidad utilizadas son diferentes: la tercera parte de los estudios utilizaron los criterios CTCAE v.4.0 mientras que el resto usaron la v.3.0. Con respecto al análisis estadístico, la mayoría usó un modelo de riesgo proporcional de Cox, seguido en frecuencia de análisis por regresión logística. Además, cada estudio definió sus covariables de forma distinta. Por el contrario, en todos los estudios gen-candidato publicados hasta la fecha el número de pacientes incluidos es relativamente bajo en comparación con otras cohortes de radiogenómica. Los 24 estudios incluyeron en promedio 192,73 pacientes (entre las cohortes de descubrimiento y las cohortes de validación), con un mínimo de 97 y un máximo de 393 pacientes. (***Tabla 4***)

La gran mayoría de los estudios coinciden en que la principal limitación de estos trabajos ha sido su bajo tamaño muestral, así como la falta de cohortes apropiadas para realizar las validaciones de los hallazgos encontrados.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Tabla 4. Estudios gen candidato de efectos adversos a la radiación en pacientes con cáncer de pulmón

Ref.	Validación	CTCAE	Cáncer Pulmón	Variante	Resultado	RT	Fenotipo	Covariables	Estadistica	Pacientes	Población
Wen (2018) [206]	No	v3.0	NSCLC	*ATG16L2* rs10898880 CC	HR = 1,80; 96% IC = 1,04–3,12; *P* = 0,037	IMRT 3DCRT Otros	Neumonitis ≥ 3	Estatus fumador, dosis media de pulmón, estadio clínico y quimioterapia	Cox	393	USA, caucasicos y afroamericanos
Yuan (2009) [207]	No	v3.0	NSCLC	*TGFβ1* rs1982073 T869C	HR = 0,489; 95% IC = 0,227–0,861; *P* = 0,013 HR = 0,390; 95% IC = 0,197–0,774; *P* = 0,007	IMRT 3DCRT	Neumonitis ≥ 2 Neumonitis ≥ 3	Karnofsky, dosis media de pulmón, FEV1, estatus fumador	Cox	164	USA, caucasicos y afroamericanos
Xian 2015 [208]	No	v4.0	SCLC & NSCLC	*TGFβ1* rs1800470 CC	OR = 0,40; 95% IC = 0,10–1,55; *P* = 0,403	NA	Neumonitis ≥ 2	Estatus fumador, COPD, dosis total, quimioterapia	Regresión logistica	97	China, Han
Yin (2012) [209]	No	v3.0	NSCLC	*VEGF* rs2010963 CC *VEGF* rs3025039 TT	HR = 2,33; 95% IC = 1,01–5,37; *P* = 0,047 HR = 28,13; 95% IC = 5,24–151,02; *P* < 0,001	IMRT 3DCRT	Neumonitis ≥ 3	Sexo, Karnofsky, estadio clínico, dosis media de pulmón	Cox	195	USA, caucasicos y afroamericanos
Yin (2011) [210]	No	v3.0	NSCLC	*RAD51* rs1801320 C	HR = 0,52; 95% IC = 0,31–0,86; *P* = 0,010	3DCRT	Neumonitis ≥ 1	Edad, Sexo, Etnicidad, Karnofsky, histología, estadio clínico, quimioterapia y dosis media de pulmón	Cox	196	USA, caucasicos y afroamericanos
Yang 2017 [211]	Si	v3.0	NSCLC	*BMP2* rs235768 AA *BMP2* rs1980499 CC *BMP2* rs3178250 CC	HR = 1,866; 95% IC = 1,221–2,820; *P* = 0,004 HR = 1,403; 95% IC = 1,014–1,941; *P* = 0,041 HR = 0,406; 95% IC = 0,175–0,942; *P* = 0,036	Fotones Protones	Neumonitis ≥ 2 Neumonitis ≥ 3	Edad, Karnofsky, dosis media de pulmón	Cox	323/340	USA, caucasicos y afroamericanos
Liu (2016) [212]	No	v4.0	SCLC & NSCLC	*MMP1* rs1144393 AG	HR = 1,858; 95% IC = 1,249–2,763; *P* = 0,010	IMRT 3DCRT	RILI	Edad, Sexo, Histología, Estadio clínico, Karnofsky, Estatus fumador, Quimioterapia, CRT, Cirugía, IMRT, dosis total, dosis media de pulmón, V20, COPD	Cox	251	China
Pu (2014) [213]	Si	v3.0	NSCLC	*OSMR* rs1239344 *TNFSF7* rs7259857 *PRKCE* rs940052 *FGF14* rs4772468 *TAP1* rs3819721 *CD4* rs2707212 *LILRP4* rs270771 *IL15RA* rs1998521 *TANK* rs7309 *AGER* rs204993	OR = 3,05; 95% IC = 1,70–5,47; P < 0,001 OR = 0,50; 95% IC = 0,34–0,74; P < 0,001 OR = 0,35; 95% IC = 0,19–0,64; P < 0,001 OR = 2,64; 95% IC = 1,48–4,72; P = 0,001 OR = 2,41; 95% IC = 1,41–4,11; P = 0,001 OR = 2,45; 95% IC = 1,42–4,23; P = 0,001 OR = 0,21; 95% IC = 0,08–0,57; P = 0,002 OR = 1,80; 95% IC = 1,21–2,68; P = 0,004 OR = 2,63; 95% IC = 1,37–5,06; P = 0,004 OR = 0,55; 95% IC = 0,36–0,83; P = 0,005	2D 3D IMRT Protones	Esofagitis ≥ 2	Edad, sexo, paquetes año, estadio clínico, quimioterapia concurrente, tipo de radioterapia, FEV1 %, DLCO %, PTV, dosis media de esófago	Regresión logistica	201/220	USA, caucasicos y afroamericanos
				CDC2 rs10711 *DDX58* rs11795343 *DDX58* rs7865082 *CDC2* rs1871445 *FGF5* rs3733336 *ETS2* rs2298560 *LIMS1* rs12469016 *GHR* rs4292454 *TFEB* rs13202921	OR = 2,47; 95% IC = 1,51–4,04; P < 0,001 OR = 1,88; 95% IC = 1,32–2,67; P < 0,001 OR = 1,89; 95% IC = 1,32–2,72; P < 0,001 OR = 2,34; 95% IC = 1,44–3,79; P < 0,001 OR = 0,42; 95% IC = 0,26–0,69; P < 0,001 OR = 0,39; 95% IC = 0,23–0,67; P < 0,001 OR = 1,77; 95% IC = 1,26–2,48; P < 0,001 OR = 1,79; 95% IC = 1,25–2,57; P = 0,002 OR = 0,56; 95% IC = 0,39–0,81; P = 0,002		Neumonitis ≥ 2	Edad, sexo, paquetes año, estadio clínico, quimioterapia concurrente, tipo de radioterapia, FEV1 %, DLCO %, PTV, dosis media de pulmón			
Tucker 2012 [214]	No	v3.0	NSCLC	*TGFβ* rs1982073 C *VEGF* rs2010963 C *TNFα* rs1800629 A *XRCC3* rs861539 T *APEX1* rs1130409 T	1,4; ≥ 1T = 55% 1,39; > 1C = 56% 1,9; ≥ 1A = 42% 1,46; ≥ 1T = 44% 1,36; ≥ 1G = 22%	IMRT 3DCRT	Neumonitis ≥ 3	Factores modificadores de dosis DMF, dosis media de pulmón, TD50 dosis correspondiente al 50% de la incidencia de neumonitis, un parámetro inversamente relacionado con la pendiente de la curva dosis-respuesta	modelo Lyman-Kutcher-Burman	141	USA, caucasicos y afroamericanos
Do (2018) [215]	No	v4.0	SCLC & NSCLC	*GSTP1* rs1695 G	HR = 3,543; 95% IC = 1,770–7,092; *P* < 0,001	IMRT	Neumonitis ≥ 2	Sexo, Edad, Karnofsky, Estatus fumador, COPD, Histología, Estadio, Cirugía, Quimioterapia, Dosis total, V5, V20, FEV1, FVC, DLCO	Cox	149	China
Yi (2012) [216]	No	v3.0	NSCLC	*LIG4* rs1805388 T	HR = 2,08; 95% IC = 1,04–4,12; *P* = 0,037	IMRT 3DCRT	Neumonitis ≥ 3	Sexo, Karnofsky, estadio clínico, dosis media de pulmón	Cox	195	USA, caucasicos y afroamericanos
Wen (2014) [217]	No	v3.0	NSCLC	*LIN28B* rs314280 AG *LIN28B* rs314276 AC	HR = 2,97; 95% IC = 1,32–6,72; *P* = 0,009 HR = 2,30; 95% IC = 1,24–4,28; *P* = 0,008	IMRT 3DCRT Protones	Neumonitis ≥ 3	Estatus fumador, estadio clínico, quimioterapia, dosis media de pulmón	Cox	362	USA, caucasicos y afroamericanos
Liu (2017) [218]	No	v4.0	SCLC & NSCLC	*PAI-1* rs7242 GG	HR = 5,20; 95% IC = 1,62–16,66; *P* = 0,006	IMRT 3DCRT	Neumonitis ≥ 3	Sexo, Edad, estatus fumador, cirugía, quimioterapia, V20	Cox	169	China
Tang (2016) [219]	No	v4.0	SCLC & NSCLC	*AKT2* rs33933140 G	HR = 0,272; 95% IC = 0,140–0,530; P < 0,001	IMRT 3DCRT	Neumonitis ≥ 3	Sexo, Edad, Histología, estadio clínico, Karnofsky, estatus fumador, cirugía, quimioterapia de inducción, CRT, IMRT, dosis total, dosis media pulmón, V20, COPD	Cox	261	China

Ref.	Validación	CTCAE	Cáncer Pulmón	Variante	Resultado	RT	Fenotipo	Covariables	Estadistica	Pacientes	Población
Hildebrandt (2010) [220]	No	v3.0	NSCLC	*PTGS2* rs20417 GG *PTGS2* rs5275 *PTGS2* rs689470	HR = 1,93; 95% IC = 1,10–3,39; P = 0,029 HR = 1,58; 95% IC = 1,09–2,27; P = 0,014 HR = 3,38; 95% IC = 1,09–10,49; P = 0,035	2D/ 3D IMRT	Esofagitis ≥ 2	Edad, sexo, paquetes año, estadio clínico, PS, regimen tratamiento, tipo de radiación, dosis total	Cox	173	USA, caucasicos
				NOS3 rs1799983 *IL13* rs20541 *IL13* rs180925	HR = 0,55; 95% IC = 0,31–0,96; P = 0,037 HR = 2,95; 95% IC = 1,14–7,63; P =0,025 HR = 3,23; 95% IC = 1,03–10,18; P = 0,045		Neumonitis ≥ 2				
Pang (2013) [221]	Si	v3.0	NSCLC	*HSPB1* rs2868371 CC	P = 0,002	IMRT 3DCRT Protones	Neumonitis ≥ 3	Sexo, edad, PS, dosis media de pulmón	X^2	146/125	USA, caucasicos y afroamericanos
Lopez-Guerra (2011) [222]	Si	v3.0	NSCLC	*HSPB1* rs2868371 CC	HR = 0,29; 95% IC = 0,09–0,97; P = 0,045	IMRT 3DCRT Protones	Esofagitis ≥ 3	Edad, Karnofsky, estadio clínico, dosis media de esófago, fraccionamiento RT, estatus fumador, V40	Cox	120/181	USA, caucasicos y afroamericanos
Lopez-Guerra (2018) [223]	No	v3.0	NSCLC	*ATM* rs189037 AA	Coeficiente = -0,102; 95% IC = -0,198–0,005; P = 0,038	IMRT 3DCRT Protones	< DLCO	NA	Regresión lineal de efecto múltiple	100	USA, caucasicos y afroamericanos
Zhang (2010) [224]	No	v3.0	SCLC & NSCLC	*ATM* rs189037 A *ATM* rs373759 A	HR = 2,49; 95% IC = 1,07–5,80; P = 0,040 HR = 2,47; 95% IC = 1,16–5,28; P = 0,021	2D/ 3D IMRT	Neumonitis ≥ 2	Edad, Sexo, estatus de fumador, tipo de tratamiento, dosis media de pulmón, V20 de pulmón	Cox	253	China
Du (2018) [225]	No	v4.0	SCLC & NSCLC	*ERCC1* rs11615 CC	HR = 0,517; 95% IC = 0,285–0,939; P = 0,030	IMRT	Neumonitis ≥ 2	Sexo, Edad, Karnofsky, Estatus fumador, COPD, Histología, Estadio, Cirugía, Quimioterapia, Dosis total, V5, V20, dosis media de pulmón	Cox	149	China
Lopez-Guerra (2012) [226]	Si	v3.0	NSCLC	*TGFβ1* rs1800470 CC	HR = 5,46; 95% IC = 1,79–16,63; P = 0,003	IMRT 3DCRT Protones	Esofagitis ≥ 3	Edad, Karnofsky, estadio clínico, dosis media de esófago, fraccionamiento RT, estatus fumador, V40	Cox	97/101	USA, caucasicos y afroamericanos
Zhao (2016) [227]	Si	v3.0	NSCLC	*BLM* rs7165790 G *BRCA1* rs8176257 A *BLM* rs2270132 C *BRCA1* rs12516 A *BRCA1* rs1799966 G *PRKDC* rs4873772 A *TOPBP1* rs1822744 G *RPA1* rs11078671 A *BLM* rs401549 G *EXO1* rs1776139 C *XCRR4* rs10514249 G	OR = 0,54; 95% IC = 0,36–0,82; P = 0,003 OR = 4,27; 95% IC = 1,62–11,24; P = 0,003 OR = 2,27; 95% IC = 1,27–4,04; P = 0,005 OR = 3,63; 95% IC = 1,42–9,28; P = 0,007 OR = 3,63; 95% IC = 1,42–9,28; P = 0,007 OR = 3,06; 95% IC = 0,56–16,62; P = 0,027 OR = 1,55; 95% IC = 1,05–2,30; P = 0,027 OR = 2,62; 95% IC = 1,08–6,36; P = 0,031 OR = 1,51; 95% IC = 0,87–2,62; P = 0,034 OR = 0,54; 95% IC = 0,3–0,97; P = 0,04 OR = 0,52; 95% IC = 0,25–1,09; P = 0,047	2D/ 3D IMRT Protones	Esofagitis ≥ 2	Edad, sexo, paquetes año, estadio clínico, quimioterapia concurrente, tipo de radioterapia, FEV1 %, DLCO %, PTV, mediana de la dosis de esófago	Regresión logistica multivariable	250/170	USA, caucasicos y afroamericanos
				TOPBP1 rs1051772 G *BLM* rs16944739 A *IRPA3* rs3735461 G *XRCC4* rs963248 G *EME1* rs3760412 G *RAD52* rs11571468 A *BRIP1* rs4986764 A *EME1* rs917029 G	OR = 0,32; 95% IC = 0,16–0,63; P = 0,001 OR = 3,51; 95% IC = 1,40–8,81; P = 0,008 OR = 2,11; 95% IC = 1,22–3,66; P = 0,008 OR = 1,95; 95% IC = 1,16–3,27; P = 0,011 OR = 0,56; 95% IC = 0,34–0,91; P = 0,019 OR = 0,43; 95% IC = 0,20–0,90; P = 0,026 OR = 2,06; 95% IC = 1,07–3,95; P = 0,03 OR = 2,12; 95% IC = 1,07–4,18; P = 0,03		Neumonitis ≥ 2	Edad, sexo, paquetes año, estadio clínico, quimioterapia concurrente, tipo de radioterapia, FEV1 %, DLCO %, PTV, mediana de ladosis de pulmón			
Mak (2012) [228]	No	v.4.0	SCLC & NSCLC	*MTHFR* rs1801131 AA *MTHFR* rs1801131 AA	HR = 0,37; 95% IC = 0,18–0,76; P = 0,018 HR = 0,21; 95% IC = 0,06–0,70; P = 0,03	IMRT 3DCRT	Neumonitis ≥ 2 Neumonitis ≥ 3	Sexo, PS, cirugía, quimioterapia concurrente, consolidación con docetaxel, dosis media de pulmón, V5 y V25 de pulmón	Cox	134	USA, caucasicos
Li (2014) [229]	No	v.3.0	NSCLC	APEX1 rs1130409 G	OR = 6,96; 95% IC = 1,36–35,77; P = 0,02	NA	Neumonitis ≥ 3	Karnofsky, quimioterapia concurrente, V30 de pulmón	Regresión logistica	126	China, Han

Ref, Estudio de referencia; CTCAE, versión de los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos; RT, tipo de récnica de radioterapia; NSCLC, cáncer de pulmón no microcítico SCLC, cáncer de pulmón microcítico; HR, hazard ratio; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza; RILI, daño pulmonar inducido por la radiación; IMRT, radioterapia de intesnsidad modulada; 3DRT, radioterapia conformacional tridimensional; 2D, radioterapia bidimensional; DLCO/VA, capacidad de difusión pulmonar corregido por el volumen alveolar; FEV1, volumen espiratorio forzado en el primer segundo; BED, dosis biológica equivalente; PTV, volumen blanco de planificación; paq, paquete de cigarrillos; Dosis Max 1cc, dosis máxima administrada en 1 centímetro cúbico del órgano de riesgo; V60%, volumen del órgano que recibe 60 Gy; v25%, volumen del órgano que recibe 25Gy; V20%, volumen del órgano que recibe 20 Gy; V5%, volumen del órgano que recibe 5% Gy; CRT, quimioradioterapia; DLCO, capacidad de difusión pulmonar; IMC, índice de masa corporal; COPD, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; NSCLC, cáncer de pulmón no-microcítico; NA, dato no disponible.

1.4.5 Estudios de asociación de genoma completo (GWAS)

El principal objetivo de los GWAS es identificar SNPs cuyas frecuencias alélicas varíen sistemáticamente en función de un fenotipo. [230] Esto se logra comparando las variantes genéticas en aquellos individuos que presentan un rasgo (casos) contra individuos que no presentan el rasgo (controles). El fundamento de estos estudios es genotipar cientos de miles de *tag*-SNPs localizados a lo largo de todo el genoma, con los cuales se puede representar esta variación. El número de SNPs estudiados depende del *array* y la tecnología empleada, pero generalmente su número oscila entre 500.000 y 1.000.000. Para cada SNP se analiza cómo varía su frecuencia entre el grupo de casos y el grupo de controles, y si esta diferencia es significativa se determina la asociación entre el SNP estudiado y la patología. Se trata de una técnica que permite hacer estudios exploratorios libres de hipótesis en el genoma. Los SNPs analizados en los *arrays* comerciales, son generalmente variantes comunes, con lo cual es poco probable identificar variantes genéticas causales. Sin embargo, lo que sí permite es identificar variantes que, aunque no sean las causales puedan estar en desequilibrio de ligamiento con éstas. Una vez obtenidos los genotipos, se puede imputar cerca de 40 millones de SNPs, utilizando los principios de desequilibrio de ligamiento de cerca de 65.000 haplotipos identificados. [231] El Proyecto Internacional HapMap [232] describió los patrones de SNP comunes dentro de la secuencia de ADN humano, mientras que el proyecto 1000 Genomes (1KG) [233] proporcionó un mapa de SNP comunes y raros. Más tarde el Consorcio de Haplotipos de Referencia (HRC, por sus siglas en inglés) ha creado una nueva base de datos con los haplotipos de 32.000 genomas de pacientes de 20 cohortes distintas (incluidos los 2495 pacientes del proyecto 1000 Genomas). Estas herramientas permiten aumentar la precisión de la imputación y aumentar el poder de los GWAS. [234] La imputación permite comparar cohortes incluso cuando hayan sido genotipadas con distintos *arrays* y plataformas.

El análisis estadístico en GWAS, nos da como resultado la probabilidad con la que una variante puede estar asociada con el rasgo en estudio. Cuando la asociación no permite la inclusión de covariables se usa una prueba de chi-cuadrada, mientras que la regresión logística se usa en el caso de incluir las covariables. La mayoría de los GWAS utilizan regresión simple, que consiste en analizar un SNP a la vez y atribuyendo a cada uno un *P*-valor. Dependiendo del fenotipo se usarán un modelo lineal, cuando los rasgos son cuantitativos, o un modelo logístico, para los rasgos binarios. Un modelo de regresión múltiple o modelo poligénico puede detectar diferencias entre correlación y acoplamiento entre SNPs, de tal forma que identifica un *loci* de riesgo, al considerar los SNPs que están correlacionados entre sí. [235] Actualmente el umbral para considerar el resultado de GWAS estadísticamente significativo en poblaciones europeas es un P valor por debajo de 5×10^{-08}. [236]

En el 2002 se publica el primer GWAS, un estudio realizado en 94 individuos japoneses en búsqueda de regiones con susceptibilidad al infarto al miocardio que incluía 92.788 SNPs. [237] A partir de entonces el uso de los GWAS se ha popularizado, tanto es así que actualmente en el catálogo GWAS en el año 2019, se registraron un total de 7.796 publicaciones y 159.202 asociaciones. [238]

El primer GWAS radiogenómico fue un pequeño estudio de 79 pacientes afroamericanos con cáncer de próstata. El fenotipo estudiado fue la disfunción eréctil, la cual se definió con base en el cuestionario Inventario de Salud Sexual para Hombres (SHIM, por sus siglas en inglés). [239] Se consideraron controles (n = 52) aquellos pacientes con puntuación SHIM ≥ 16 y los casos (n = 27) aquellos con puntuación SHIM ≤ 7 posterior al tratamiento. Los pacientes incluidos fueron aquellos que no tuvieron disfunción eréctil antes del inicio de la radioterapia, y los que tuvieron al menos un año de seguimiento. En este estudio se identificó al SNP rs2268363 localizado en el gen del receptor hormonal folículo estimulante (FSHR) asociado significativamente (P valor = 5,46 x 10^{-08}) con disfunción eréctil (***Figura 17***) así como a otros SNPs asociados pero con P valor por debajo de 1 x 10^{-5}. (***Tabla 5***)

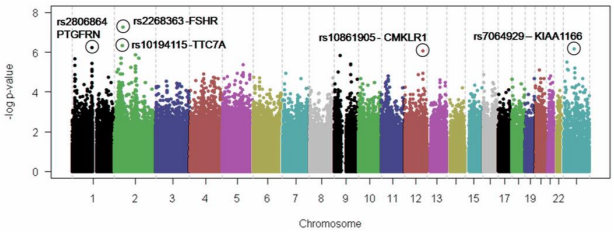


Figura 17. Manhattan plot del primer GWAS radiogenómico.
Adaptado de: Kerns et al. (2011) [239], *con permiso de:* Elsevier.

Tabla 5. Primer GWAS de disfunción eréctil como radiotoxicidad en pacientes con cáncer de próstata

SNP-ID	Chr	Posición SNP	Gen	MAF Casos	MAF Controles	p-valor	*Odds Ratio*	Bonferroni p-valor
rs2268363	2	49054832	*FSHR*	0,611	0,183	$5{,}46\times10^{-08}$	7,03	0,028
rs10194115	2	47093516	*TTC7A*	0,404	0,07	$4{,}73\times10^{-07}$	9,00	0,242
rs2806864	1	117271304	*PTGFRN*	0,537	0,153	$5{,}86\times10^{-07}$	6,42	0,300
rs7064929	23	64283744	*KIAA1166*	0,741	0,173	$6{,}88\times10^{-07}$	13,65	0,352
rs10861905	12	107291463	*CMKLR1*	0,259	0,010	$8{,}33\times10^{-07}$	33,95	0,427
rs1527243	2	123007492	*TSN*	0,167	0,57	$1{,}39\times10^{-06}$	0,15	0,713
rs12336160	9	33273582	*CHMP5*	0,407	0,087	$1{,}46\times10^{-06}$	7,26	0,746
rs2716734	2	39801225	*TMEM178*	0,482	0,135	$1{,}98\times10^{-06}$	5,97	1
rs10210358	2	141512090	*LRP1B*	0,704	0,308	$2{,}01\times10^{-06}$	5,34	1
rs16861326	1	18167074	*IGSF21*	0,259	0,019	$2{,}10\times10^{-06}$	17,85	1
rs5925696	23	22801998	*DDX53*	0,815	0,26	$3{,}08\times10^{-06}$	12,52	1
rs7552382	1	117324524	*PTGFRN*	0,611	0,235	$3{,}53\times10^{-06}$	5,11	1
rs6741148	2	38131336	*FAM82A1*	0,722	0,333	$3{,}64\times10^{-06}$	5,2	1
rs3802458	9	96781095	*C9orf3*	0,296	0,039	$3{,}78\times10^{-06}$	10,53	1
rs6862844	5	124393866	*ZNF608*	0,389	0,087	$4{,}31\times10^{-06}$	6,72	1
rs10993429	9	96779286	*C9orf3*	0,315	0,048	$4{,}36\times10^{-06}$	9,10	1
rs2901964	1	15665013	*ELA2A*	0,241	0,625	$4{,}60\times10^{-06}$	0,19	1
rs11122834	2	121417759	*GLI2*	0,667	0,289	$4{,}83\times10^{-06}$	4,93	1
rs9948	2	96864527	*CNNM3*	0,685	0,308	$5{,}69\times10^{-06}$	4,90	1
rs5965182	23	65523418	*HEPH*	0,615	0,12	$6{,}25\times10^{-06}$	11,73	1
rs17005499	2	121425911	*GLI2*	0,596	0,231	$6{,}70\times10^{-06}$	4,92	1
rs943371	1	117269213	*PTGFRN*	0,558	0,202	$7{,}17\times10^{-06}$	4,98	1
rs5944185	23	25763535	*MAGEB18*	0,667	0,16	$7{,}26\times10^{-06}$	10,50	1
rs219553	2	21431248	*APOB*	0,204	0,582	$7{,}30\times10^{-06}$	0,18	1
rs6049375	20	24006407	*GGTLC1*	0,648	0,276	$7{,}68\times10^{-06}$	4,84	1
rs5971305	23	28142974	*WDR42B*	0,407	0,02	$7{,}74\times10^{-06}$	33,69	1
rs2806863	1	117271036	*PTGFRN*	0,537	0,192	$8{,}86\times10^{-06}$	4,87	1
rs872690	23	37739671	*SYTL5*	0,259	0,029	$9{,}29\times10^{-06}$	11,78	1
rs13408245	2	122183723	*MKI67IP*	0,482	0,154	$9{,}80\times10^{-06}$	5,10	1
rs6432484	2	14944498	*FAM84A*	0,596	0,235	$9{,}88\times10^{-06}$	4,80	1

SNP-ID, polimorfismos de un solo nucleótido; Chr, cromosoma; MAF, *minor allele frequency*.
Adaptado de: Kerns et al. (2011) [239], con permiso de: Elsevier.

El siguiente GWAS también estudió el desarrollo de disfunción eréctil en pacientes con cáncer de próstata sometidos a radioterapia. [240] Este estudio se llevó a cabo en dos etapas, para lo cual la cohorte se dividió de forma aleatoria en dos grupos. En la primera fase, de descubrimiento, se realizó el estudio GWAS en 132 casos y 103 controles. Los 940 SNPs estadísticamente más significativos fueron estudiaron en el segundo grupo (128 casos *versus* 102 controles). El fenotipo estudiado fue la disfunción eréctil. En el 58% de los pacientes el fenotipo se definió usando los cuestionarios SHIM, para el resto de los pacientes se utilizó la puntuación de la Función Eréctil -Mont Sinai (MSEF). [241] En este estudio se consideraron controles aquellos pacientes con SHIM ≥ 16 o MSEF < 2 y fueron considerados casos los pacientes con puntuación SHIM ≤ 7 o ≥ 2 posterior al tratamiento. Los pacientes incluidos fueron aquellos que antes del inicio de radioterapia no presentaban síntomas de disfunción eréctil. Doce SNPs (***Tabla 6***) fueron combinados en un puntaje acumulado de alelos de riesgo, que tras ajustar por factores clínicos y de ascendencia presentó un OR = 2,2; 95% IC = 1,9-2,6; P = 2,1 x 10^{-19}.

Tabla 6. Segundo GWAS de disfunción eréctil como radiotoxicidad en pacientes con cáncer de próstata

			Fase descubrimiento		Fase replicación		p-valor
SNP-ID	Locus	Gen	OR (95%IC)	p-valor	OR (95%IC)	p-valor	Combinado
rs322895	1q32.1	NR5A2/PTPRC	4,7 (2,1-10,6)	$2{,}2\times10^{-4}$	2,2 (1,0-5,2)	$6{,}0\times10^{-2}$	$1{,}6\times10^{-4}$
rs11693002	2p25.3	MYT1L	4,2 (1,9-9,2)	$2{,}8\times10^{-4}$	2,5 (1,3-5,1)	$7{,}9\times10^{-3}$	$3{,}1\times10^{-5}$
rs3749191	3p21.31	CDCP1	3,8 (2,0-7,2)	$4{,}3\times10^{-5}$	2,0 (1,1-3,7)	$3{,}3\times10^{-2}$	$2{,}1\times10^{-5}$
rs11747037	5q22.3	KCNN2/YTHDC2	2,1 (1,4-3,3)	$6{,}9\times10^{-4}$	1,5 (0,9-2,4)	$8{,}3\times10^{-2}$	$6{,}2\times10^{-4}$
rs6557362	6q25.2	CNKSR3	2,2 (1,4-3,5)	$3{,}7\times10^{-4}$	1,5 (0,9-2,4)	$7{,}9\times10^{-2}$	$3{,}3\times10^{-4}$
rs766838	7p15.2	NFE2L3/NPVF	4,4 (1,9-10,2)	$4{,}2\times10^{-4}$	1,9 (0,9-4,1)	$9{,}4\times10^{-2}$	$4{,}4\times10^{-4}$
rs1486147	7p12.3	TNS3/IGFBP3	8,3 (2,4-28,3)	$7{,}1\times10^{-4}$	2,7 (0,9-7,8)	$7{,}3\times10^{-2}$	$5{,}7\times10^{-4}$
rs10764930	10q26.3	GLRX3	5,9 (2,7-13,1)	$9{,}3\times10^{-6}$	1,5 (0,7-3,0)	$2{,}5\times10^{-1}$	$3{,}2\times10^{-5}$
rs895255	11q14.1	SYTL2/CCDC83	5,8 (2,1-15,0)	$5{,}7\times10^{-4}$	2,8 (1,0-7,8)	$4{,}6\times10^{-2}$	$3{,}0\times10^{-4}$
rs9595967	13q14.2	CYSLTR2	5,0 (2,1-11,8)	$3{,}0\times10^{-4}$	1,9 (0,9-4,2)	$8{,}5\times10^{-2}$	$2{,}9\times10^{-4}$
rs11648233	16q23.3	HSD17B2	2,2 (1,4-3,6)	$9{,}2\times10^{-4}$	1,8 (1,2-2,8)	$7{,}7\times10^{-3}$	$9{,}1\times10^{-5}$
rs7245988	19q13.43	NLRP11	4,65 (2,1-10,5)	$2{,}2\times10^{-4}$	2,0 (0,9-4,4)	$1{,}0\times10^{-1}$	$2{,}6\times10^{-4}$

Resultados ajustados por: edad, hormonoterapia, tipo de tratamiento y componentes principales de ancestralidad.
SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza.
Adaptado de: Kerns et al. (2013) [240], con permiso de: Elsevier.

El siguiente GWAS buscaba asociación con toxicidad urinaria (aumento de la frecuencia urinaria, vaciado incompleto de la vejiga, flujo urinario débil e incontinencia, así como eventos más graves como necrosis de la vejiga o cistitis hemorrágica). El fenotipo fue definido utilizando la puntuación de síntomas de la Asociación Americana de Urología (AUASS, por sus siglas en inglés), [242] y se consideró el cambio de puntuación en los seguimientos, comparado con la puntuación previa a la radiación (*baseline*). El estudio se llevó a cabo en una cohorte dividida aleatoriamente en fase descubrimiento (346 pacientes) y fase de réplica (377 pacientes). En la segunda fase se analizaron los 1.374 SNPs más significativos de la fase descubrimiento; y finalmente ocho SNPs que forman un haplotipo, todos ellos localizados en el *locus* 9p21.2, mostraron asociación con la presencia de toxicidad urinaria en el periodo de dos a tres años post-radioterapia. En el haplotipo se encuentra localizado en el gen *IFNK* asociado con inflamación y el *tag*-SNP fue el rs17779457. [243]

Otro estudio en dos fases se llevó a cabo en pacientes con cáncer de próstata tratados con radioterapia buscando asociación con sangrado rectal tardío, definido como aquel que aparece después de 90 días posteriores a la radioterapia. [244] La fase de descubrimiento fue una cohorte de Nueva York (USA) de 79 casos y 289 controles. Los SNPs más significativos se analizaron en la segunda cohorte independiente como réplica (108 casos y 673 controles) que incluyó los

pacientes de Santiago de Compostela – RADIOGEN (España), Maastricht (Países Bajos), Edmonton (Canadá) y Florida (USA). El fenotipo fue definido en cada cohorte de forma distinta, NY y Florida usaron los esquemas de puntuación de morbilidad por radiación tardía del Grupo de Oncología Radioterápica (RTOG, por sus siglas en inglés), Canadá y España usó CTCAE v.3.0, y a los pacientes de los países bajos se les aplicó un cuestionario que se armonizó a la clasificación RTOG; los casos fueron aquellos pacientes con grado 2 o superior y los controles aquellos pacientes con grado 0 o 1. Este estudio identificó dos SNPs (rs7120482 y rs17630638) en el *locus* 11q14.3 asociado con sangrado rectal. (***Tabla 7***)

Tabla 7. GWAS de radiotoxicidad (sangrado rectal tardío) en pacientes con cáncer de próstata

			cohorte descubrimiento		cohorte replica		P-valor
SNP-ID	*Locus*	Gen	OR (95%IC)	P-valor	OR (95%IC)	P-valor	combinado
rs7120482	11q14.3	MTNR1B/ SLC36A4	6,7 (2,8-16,1)	$2,4x10^{-5}$	3,1 (1,7-5,6)	$2,1x10^{-4}$	$5,4x10^{-8}$
rs17630638	11q14.3	MTNR1B/ SLC36A4	5,1 (2,2-11,6)	$1,2x10^{-4}$	2,9 (1,6-5,2)	$6,1x10^{-4}$	$6,9x10^{-7}$
rs2706183	1p31.1	ST6GALNAC3	7,7 (2,5-24,1)	$4,7x10^{-4}$	4,5 (1,2-16,7)	$2,4x10^{-2}$	$7,8x10^{-5}$
rs6702266	1q31.3	CDC73/ KCNT2	3,5 (1,8-6,7)	$2,1x10^{-4}$	1,7 (0,9-1,4)	$7,6x10^{-2}$	$1,0x10^{-4}$
rs10519410	4q28.3	LOC646316/ PCDH18	3,7 (2,1-6,3)	$2,9x10^{-6}$	1,5 (1,0-2,3)	$4,9x10^{-2}$	$1,3x10^{-6}$
rs7698088	4q31.21	TBC1D9	2,0 (1,4-2,8)	$2,8x10^{-4}$	1,4 (1,0-1,8)	$4,6x10^{-2}$	$8,8x10^{-5}$
rs6459495	6p22.3	ATXN1/ FLJ23152	5,3 (2,0-14,3)	$9,0x10^{-4}$	1,9 (1,0-3,8)	$6,8x10^{-2}$	$4,0x10^{-4}$
rs10255878	7q21.3	ACN9/ TAC1	5,2 (2,1-12,4)	$2,5x10^{-4}$	5,2 (1,9-14,5)	$1,7x10^{-3}$	$3,6x10^{-6}$
rs327236	8p21.2	DPYSL2	2,5 (1,5-4,3)	$9,1x10^{-4}$	1,4 (0,9-2,1)	$9,0x10^{-2}$	$5,0x10^{-4}$
rs7850497	9p24.1	UHRF2/ TPD52L3	2,1 (1,4-3,2)	$4,8x10^{-4}$	1,3 (1,0-1,7)	$8,2x10^{-2}$	$2,0x10^{-4}$
rs4578268	10q21.3	ANXA2P3/ CTNNA3	2,6 (1,5-4,4)	$6,0x10^{-4}$	1,4 (1,0-2,2)	$8,1x10^{-2}$	$3,0x10^{-4}$
rs7111598	11q24.1	LOC341056/ HSPA8	3,3 (1,7-6,4)	$3,6x10^{-4}$	1,5 (1,0-2,2)	$8,2x10^{-2}$	$2,0x10^{-4}$
rs7111590	11q24.1	LOC341056/ HSPA8	3,0 (1,6-5,6)	$7,5x10^{-4}$	1,4 (0,9-2,2)	$8,7x10^{-2}$	$4,0x10^{-4}$
rs160141	13q31.3	GPC6/ GPC5	2,5 (1,4-4,2)	$9,9x10^{-4}$	1,8 (1,1-1,4)	$1,8x10^{-2}$	$1,0x10^{-4}$
rs12586912	14q13.1	NPAS3	2,1 (1,4-3,2)	$3,6x10^{-4}$	1,3 (1,0-1,7)	$9,3x10^{-2}$	$2,0x10^{-4}$
rs4904509	14q31.3	TTC8/ FOXN3	2,7 (1,5-4,6)	$4,2x10^{-4}$	1,5 (1,0-2,2)	$7,3x10^{-2}$	$2,0x10^{-4}$
rs4888901	16q23.1	WWOX	3,0 (1,6-5,4)	$4,5x10^{-4}$	1,6 (1,0-2,6)	$4,6x10^{-2}$	$1,0x10^{-4}$
rs4969040	17q25.1	SLC39A11	2,6 (1,5-4,5)	$3,9x10^{-4}$	1,7 (1,1-2,7)	$1,8x10^{-2}$	$5,0x10^{-5}$
rs16969506	17q25.2	MGAT5B	2,7 (1,6-4,7)	$2,0x10^{-4}$	1,5 (1,0-2,3)	$8,1x10^{-2}$	$1,0x10^{-4}$

SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza.
Adaptado de: Kerns et al. (2013) [244], con permiso de: Elsevier.

El primer GWAS que incluyó un gran número de pacientes y que buscó asociación compartida entre dos tipos de cáncer lo realizó el grupo RAPPER de Reino Unido. La primera fase incluyó 1.217 pacientes con cáncer de mama y 633 pacientes con cáncer de próstata. En este GWAS se observó que las variantes identificadas en las pacientes con cáncer de mama eran diferentes a las identificadas en pacientes con cáncer de próstata. La validación de los 177 SNPs más significativos se realizó en 355 pacientes con cáncer de mama de Leicester (Reino Unido) y 1.378 pacientes con cáncer de próstata (516 de Santiago de Compostela - RADIOGEN (España) y 862 de Nueva York (USA). [245] El fenotipo estudiado fue la toxicidad global (definida como toxicidad promedio total estandarizada, STAT por sus siglas en inglés [246]) a los dos años después del inicio de la radioterapia. Para cáncer de mama se incluyeron como

efectos adversos el dolor, la aparición de telangiectasias y en encogimiento de la mama. En pacientes con cáncer de próstata se incluyeron la incontinencia urinaria, la disminución del flujo de orina, la frecuencia urinaria, la frecuencia de micción nocturna, proctitis, sangrado rectal e incontinencia rectal. Distintas escalas fueron utilizadas en cada cohorte, por ejemplo, Gene-PARE recolectó los datos de toxicidad urinaria usando la escala IPSS, mientras que LENT-SOMA [247] y CTCAE se usaron en RAPPER y RADIOGEN. Los resultados obtenidos de la primera fase no pudieron replicarse (***Tabla 8***), sin embargo, dos aportaciones importantes emergieron de este estudio: que las variantes genéticas comunes son las que están asociadas con el riesgo de toxicidad y, que las asociaciones más fuertes se encontraron en el análisis de las toxicidades por separado, más que en forma de toxicidad global.

Tabla 8. SNPs asociados con toxicidad global en pacientes con cáncer de mama y próstata

			Fase descubrimiento			Fase réplica			combinado		
SNP-ID	**Gen**	**Ch**	***Beta***	**P-valor**	**RR**	***Beta***	**P-valor**	**n**	***Beta***	**P-valor**	**RR**
rs13116075	CCRN4L	4	0,28	$1{,}21\times10^{-6}$	1,71	0,05	0,48	2219	0,17	$5{,}80\times10^{-5}$	1,52
rs12243039	C10orf113	10	1,01	$2{,}30\times10^{-6}$	3,31	0,37	0,28	1518	0,81	$6{,}05\times10^{-6}$	3,39
rs218526	LINC00470	18	0,18	$4{,}99\times10^{-5}$	1,47	0,01	0,87	1515	0,15	$2{,}14\times10^{-4}$	1,47
rs718304	GABRB3	15	−0,44	$1{,}59\times10^{-4}$	1,95	−0,42	0,07	1520	−0,44	$2{,}86\times10^{-5}$	2,15
rs596917	NCR2	6	0,17	$1{,}63\times10^{-4}$	1,44	0,03	0,58	2189	0,10	0,0016	1,32
rs2881208	SATB2	2	0,16	$1{,}82\times10^{-4}$	1,43	0,05	0,55	1520	0,14	$3{,}22\times10^{-4}$	1,45
rs4496520		3	−0,20	$4{,}37\times10^{-4}$	1,48	−0,18	0,12	1520	−0,19	$1{,}13\times10^{-4}$	1,58
rs4234649		3	−0,19	$4{,}74\times10^{-4}$	1,48	−0,21	0,07	1518	−0,20	$7{,}29\times10^{-5}$	1,60
rs17798101	HRH4	18	0,20	$8{,}16\times10^{-4}$	1,49	0,02	0,81	1816	0,15	0,0036	1,42
rs4849101	SLC20A1	2	0,13	$8{,}25\times10^{-4}$	1,37	−0,004	0,96	1520	0,11	0,003	1,35
rs10060885	ANKH	5	0,55	0,0037	2,50	0,13	0,52	1933	0,39	0,0015	1,87

SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; Ch, cromosoma; RR, riesgo relativo; n, número de pacientes final.
Adaptado de: Barnett el. al (2014) [245], con permiso de: Elsevier.

Un GWAS muy importante en cáncer de próstata ha sido el nuestro, publicado en el año 2014. [248] En este estudio identificamos aumento de riesgo a desarrollar toxicidad tardía a la radiación en pacientes con cáncer de próstata, asociada con el *locus* 2q24.1 en donde se localiza el gen *TANC1* (Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1). (***Figura 18***) Este estudio fue un GWAS en tres fases; la primera fase se realizó en la cohorte RADIOGEN de Santiago de Compostela que incluyó 741 pacientes, en la segunda fase se analizó la cohorte RAPPER de Reino Unido que incluyó 633 pacientes y la tercera fase incluyó la cohorte Gene-PARE que consistió en 368 pacientes de Estados Unidos (datos finales de toxicidad tardía analizada: 417 de RADIOGEN, 579 de RAPPER y 270 pacientes de Gene-PARE). El fenotipo se definió como la toxicidad global (STAT) aguda (semana 1-20 después del inicio del tratamiento) y tardía (entre los dos y los cinco años después del inicio del tratamiento), tomando en cuenta las toxicidades: diarrea, hemorragia gastrointestinal, proctitis, incontinencia gastrointestinal, frecuencia/urgencia urinaria, cistitis, incontinencia urinaria y retención urinaria. Las escalas para graduar las toxicidades fueron homogeneizadas y las toxicidades globales se normalizaron. El GWAS detectó siete SNPs asociados con la toxicidad tardía. (***Tabla 9***) De ellos, el SNP rs264663 se localizó en un posible eQTL, y fue considerado como un SNP candidato que podría estar influenciando el nivel de expresión del gen *TANC1*. "Este GWAS mostró que se pueden encontrar nuevos *locus* de interés y validarlos de manera efectiva". [203] La importancia de este estudio radica en un cambio de sentido de la explicación biológica de la sensibilidad a la radiación; las variantes comunes asociadas a los efectos tardíos parecían estar cerca o en los genes asociados a funciones normales del tejido [203] y no solo en los procesos conocidos de la radiobiología.

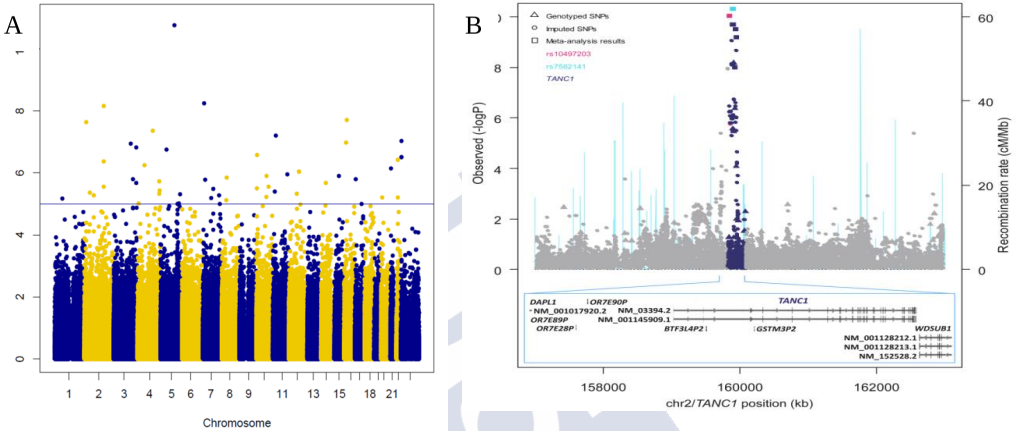


Figura 18. Manhattan plot de la toxicidad global tardía asociada a radioterapia en pacientes con cáncer de próstata en la cohorte RADIOGEN.

A) GWAS análisis univariable $STAT_{late}$, B) P valores asociados y las tasas de recombinación estimadas de acuerdo con los datos del 1000 Genomas en la región asociada en el cromosoma 2 (locus *TANC1*).
Fachal et al. (2014) [248], con permiso de: Elsevier, concedido a Ana Vega.

Tabla 9. Resultados del GWAS en tres etapas y el meta-análisis del locus *TANC1* asociado a toxicidad tardía en pacientes con cáncer de próstata tratados con radioterapia

			RADIOGEN				RAPPER				Gene-PARE				RADIOGEN + RAPPER + Gene-PARE			
					$STAT_{late}$				$STAT_{late}$				$STAT_{late}$		Meta-analisis $STAT_{late}$			
SNP-ID	Posición	Al	MAF	R^2	*Beta* (SE)	P valor	MAF	R^2	*Beta* (SE)	P valor	MAF	R^2	*Beta* (SE)	P valor	*Beta* (ef)	P valor (ef)	Q	I^2
rs10497203	159,851,423	C	0,03	0,92	0,40(0,08)	$1,78x10^{-6}$	0,02	0,9	0,42(0,11)	$2,08x10^{-4}$	0,04	1	0,31(0,14)	$2,60x10^{-2}$	0,39	$8,84x10^{-11}$	0,82	0
rs7582141	159,899,489	T	0,04	0,99	0,37(0,07)	$7,55x10^{-7}$	0,02	0,9	0,42(0,11)	$2,08x10^{-4}$	0,04	G	0,27(0,13)	$3,10x10^{-2}$	0,37	$4,64x10^{-11}$	0,76	0
rs6432512	159,899,913	T	0,04	G	0,34(0,07)	$2,83x10^{-6}$	0,02	0,9	0,42(0,11)	$2,08x10^{-4}$	0,04	1	0,27(0,13)	$3,21x10^{-2}$	0,35	$1,97x10^{-10}$	0,73	0
rs264663	159,910,206	T	0,02	G	0,61(0,10)	$6,85x10^{-9}$												
rs2646651	159,929,431	G	0,03	G	0,40(0,08)	$4,36x10^{-7}$	0,02	0,7	0,36(0,10)	$5,33x10^{-4}$								
rs264588	159,936,391	A	0,03	0,92	0,38(0,08)	$1,53x10^{-6}$	0,02	0,9	0,40(0,12)	$7,06x10^{-4}$	0,04	1	0,27(0,13)	$3,21x10^{-2}$	0,37	$3,08x10^{-10}$	0,81	0
rs264631	159,950,865	G	0,03	0,88	0,36(0,08)	$3,17x10^{-6}$	0,03	0,9	0,40(0,12)	$7,06x10^{-4}$	0,04	0,97	0,27(0,13)	$3,21x10^{-2}$	0,36	$6,40x10^{-10}$	0,83	0

SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; Al, Alelo; MAF, frecuencia del alelo menor; R^2, valor de precisión de imputación; *Beta*, coeficiente de regresión linear; SE, error estándar; (ef), modelo de efectos fijos; Q, P valor para la estadística Q de Cochrane; I^2, índice de heterogeneidad.
Adaptada de Fachal et. al (2014) [248], con permiso de: Elsevier, concedido a Ana Vega.

Un estudio reciente realizado en pacientes con cáncer de cabeza y cuello identificó una variante en el *locus* 14q31.1 (rs162171) asociada con la presencia de daño en el lóbulo temporal inducida por la radiación en pacientes con carcinoma nasofaríngeo que recibieron radioterapia como parte de su tratamiento y una segunda señal localizada en una región promotora (rs162171) y que se encuentra en moderado desequilibrio de ligamiento con la primera variante. (***Tabla 10***) Se trata de un estudio en tres etapas, la fase de descubrimiento consistió en 1.082 pacientes, una primera réplica en 1.119 pacientes y una segunda réplica en 741 pacientes. [249] El daño en el lóbulo temporal fue definido como lesiones homogéneas en la sustancia blanca, lesiones con contraste o la presencia de quistes. Este daño fue evaluado por médicos radiólogos en seguimientos seriados realizados con resonancia magnética. Las variantes se encuentran localizadas cerca del gen *CEP128*, el cual codifica para una proteína centrosomal propuesta como un regulador clave en las vías de señalización celular neuronal, que regulan la migración, diferenciación y varios comportamientos en el adulto. Comprobaron la importancia de las variantes mediante análisis de eQTL identificando una disminución de la expresión de mRNA en linfoblastos y en tejido de la materia blanca intralobar. Mediante ensayos de luciferasa demostraron el efecto de la variante localizada en la región promotora, observando una disminución en los niveles de expresión del gen *CEP128*. Y finalmente observaron un aumento en la apoptosis y muerte celular provocada por la radiación en células de glioblastoma con el gen *CEP128* noqueado. Los autores sugieren que las variantes identificadas pueden predecir el daño en el lóbulo temporal de los pacientes tratados con radioterapia para tratar un carcinoma nasofaríngeo.

Tabla 10. Resultados del GWAS en tres etapas asociados con daño en el lóbulo temporal como efecto adverso a la radiación en pacientes con cárcinoma nasofaríngeo

SNP-ID	Gen	Alelo	Fase	MAF	AA/AB/BB	% DLT	HR (95% IC)	P valor
rs162171	*CEP128*	C/A	Desc	0,171	748/297/37	19,4/29,3/29,7	1,66 (1,33-2,07)	$7,75 \times 10^{-6}$
	Intron		Rep 1	0,194	714/368/32	22,0/25,3/34,4	1,34 (1,09-1,65)	0,005
			Rep 2	0,18	491/211/25	21,0/30,3/32,0	1,43 (1,11-1,84)	0,006
			Comb	0,182	1953/876/94	20,7/27,9/31,9	1,46 (1,29-1,66)	$6,17 \times 10^{-9}$
rs17111237	*CEP128*	A/G	Desc	0,131	788/235/19	20,4/31,5/21,1	1,63 (1,27-2,08)	$1,02 \times 10^{-4}$
	Promoter		Rep 1	0,138	823/271/18	22,8/24,0/38,9	1,32 (1,05-1,66)	0,02
			Rep 2	0,143	544/180/16	21,9/28,9/37,5	1,41 (1,07-1,84)	0,01
			Comb	0,137	2155/686/53	21,7/27,8/32,1	1,45 (1,26-1,66)	$3,18 \times 10^{-7}$

SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; MAF, alelo de menor frecuencia; AA, homocigoto para el alelo de menor frecuencia; AB, heterocigoto; BB, homocigoto para el alelo de mayor frecuencia; %DLT, porcentaje de pacientes con daño en el lóbulo lateral; HR, hazzard ratio; IC, intervalo de confianza; Desc, fase de descubrimiento; Rep1, primera cohorte de réplica, Rep2, segunda cohorte de réplica; Comb, cohortes combinadas.
Adaptada de: Wang et al. (2019) [249], con permiso: *Creative Commons Attribution License*.

Hasta el momento, todos los estudios GWAS realizados en radiogenómica buscando asociación con efectos adversos son en cáncer de mama, próstata y este último realizado en cáncer de cabeza y cuello. Actualmente no hay ningún GWAS publicado buscando asociación de los efectos adversos a la radiación en cáncer de pulmón.

Otro enfoque que se ha explorado mediante GWAS dentro de la radiogenómica ha sido la asociación de variantes genéticas asociadas a la presencia de un segundo cáncer como efecto adverso a la radiación. Un primer estudio identificó dos variantes en el *locus* 6q21 (rs4946728 y rs1040411) asociadas con el aumento del riesgo de presentar una segunda neoplasia maligna en pacientes sobrevivientes del tratamiento con radioterapia de linfoma Hodgkin pediátrico.

[250] Se incluyeron 158 casos y 153 controles, con una fase de descubrimiento de 96 casos y 82 controles y una fase de réplica de 62 casos y 71 controles. El estudio reportó que las neoplasias malignas secundarias más frecuentes fueron el cáncer de mama, seguido del cáncer de tiroides, las cuales se desarrollaron en promedio 20 años después del tratamiento con radioterapia. Las variantes identificadas se encuentran localizadas en la región intergénica entre los genes *PRDM1* y *ATG5*, que se han descrito en asociación con enfermedades autoinmunes, lo que sugiere que funciones alteradas de la respuesta inmune o la inflamación puedan estar relacionadas con el desarrollo de una segunda neoplasia maligna secundaria a la radiación.

Un segundo estudio identificó una variante en el *locus* 1q41 (rs4342822) asociada con el aumento del riesgo a desarrollar cáncer de mama secundario después de una exposición torácica a radiación igual o mayor a 10 Gy en pacientes sobrevivientes de algún tipo de cáncer primario en la niñez (retinoblastoma, leucemia, linforma Hodgkin y no-Hodgkin, neuroblastoma, sarcoma de tejidos blandos, tumores en el sistema nervioso central, hueso o riñón (de Wilms), entre otros). [251] En el estudio se incluyeron dos cohortes que se analizaron de forma conjunta con un total de 207 casos, definidos como aquellas pacientes que desarrollaron cáncer de mama; y 2.774 controles, definidos como aquellas pacientes que no presentaron ningún tipo de neoplasia maligna en el periodo de seguimiento. Los casos y los controles fueron separados dependiendo de la dosis de radiación a la que fueron expuestos (< 10 y ≥ 10 Gy). La variante identificada en este estudio se encuentra localizada cerca del gen *PROX1* (*prospero homeobox 1*), un factor de transcripción que interviene en la proliferación y migración celular. Alteraciones en la expresión de este gen se han identificado en algunos tipos de tumores de mama. Los autores sugieren que variantes en genes distintos a los descritos como asociados con susceptibilidad al cáncer de mama, pueden interactuar con la radiación ionizante y modificar el riesgo de presentar un cáncer de mama en aquellos pacientes que presentaron algún tipo de cáncer infantil.

1.4.6 Post-GWAS análisis

Los resultados obtenidos con GWAS normalmente son variantes que señalan un *locus* asociado con el riesgo de desarrollar el fenotipo estudiado. Aunque en la gran mayoría de los estudios estas variantes no son causales, existe gran probabilidad de que la variante causal se encuentre en la región que contiene un conjunto independiente de variantes altamente asociadas correlacionadas (iCHAV, por sus siglas en inglés). Este hecho indicaría que realizar un estudio a mayor escala, o *finemapping* de la región, es una opción que nos permite mapear detalladamente los *loci* para reconocer aquellos SNPs clasificados como no-funcionales y distinguir los SNPs causales. [252] De esta forma se consigue priorizar las variantes dentro de las regiones asociadas al GWAS y pasar de una asociación estadística a identificar genes diana, que puedan aportar información sobre el mecanismo o la biología del fenotipo estudiado. Normalmente el *finemapping* consiste en asignar probabilidades de causalidad a los SNPs candidatos para después, mediante anotación funcional, vincularlos con posibles genes cuya modificación conduzca a un riesgo de enfermedad. Se requiere una predicción funcional bioinformática y aunque muchos estudios recurrieron a señalar el gen candidato como aquel que está más cercano al SNP con el P valor más pequeño, la distancia física de una variante a un gen no es evidencia sustancial de causalidad. [253] Actualmente se evalúa el impacto potencial del SNP en la carga de los aminoácidos, en la estructura 3D de las proteínas o en los posibles cambios en los sitios de unión al ADN o el cambio de la proteína provocado por el cambio en la lectura aminoacídica. [254] Además, estas anotaciones funcionales se complementan con estudios de expresión génica como GteX, que permite identificar si el SNP

de interés afecta el nivel de expresión de un gen en particular en un tejido específico (conocido como *loci* de rasgos cuantitativos de expresión, eQTL, por sus siglas en inglés).

La asociación estadística de una variante genética que tras una priorización de variantes tiene una predicción funcional que se asocia con una alteración de los niveles de expresión génica, puede abordarse desde un enfoque de estudios funcionales *in vitro* e *in vivo* que permita caracterizar el papel del gen en la patogénesis del fenotipo de estudio. Dentro de los múltiples estudios funcionales, un recurso disponible es la modificación genética dirigida en modelos de células somáticas para comprender los mecanismos biológicos del desarrollo de la característica de interés. Una vez identificada en el modelo *in vitro*, se puede desarrollar en el modelo *in vivo* para simular los mecanismos sistémicos como son la inflamación, la respuesta inmunológica o procesos biológicos más complejos. A nivel de expresión génica, muchos estudios pueden realizarse para detectar la variación de la respuesta con base en el silenciamiento del gen y evaluar el efecto de la disminución de la proteína en el desarrollo del fenotipo.

Una vez que los análisis y estudios funcionales han aportado resultados consistentes, el siguiente paso recomendado es la integración del grupo de los SNPs causales en modelos de predicción de riesgo clínico, en donde se pueda evaluar si la adición de las variantes genéticas mejora el valor predictivo de los modelos actuales. Los resultados deben someterse a validación en cohortes independientes, [255] y finalmente, dependiendo del tipo de variante, de los mecanismos moleculares que se alteran cuando existe una modificación en el gen, de la interacción de la proteína en su microambiente y del fenotipo estudiado, la variante puede usarse para estratificar a los pacientes, para pronóstico, supervivencia, riesgo de complicaciones o para personalizar el tratamiento.

1.4.7 Meta-análisis de GWASs

Los fenotipos complejos suelen ser poligénicos, por lo que muchos SNPs pueden estar contribuyendo con una pequeña fracción del riesgo; el bajo tamaño de los efectos hallados mediante GWAS impide detectar asociaciones estadísticamente significativas, por lo que una alternativa es el meta-análisis de GWASs. El meta-análisis es la síntesis estadística de la información de múltiples estudios independientes, que en caso de los GWAS aumenta el poder y reduce la probabilidad de obtener resultados falsos positivos. Se debe seguir una serie de pasos para realizar este tipo de estudios; siendo el principal la formulación de un plan de análisis que evite la introducción de heterogeneidad, con la definición estandarizada de fenotipos, que describa detalladamente los criterios de inclusión y exclusión y que regule los controles de calidad que se aplicarán. Una vez analizados los datos de forma individual, se recopilan las estadísticas resumidas y se buscan intencionadamente posibles fuentes de heterogeneidad; los resultados se sintetizan y se priorizan las señales, se intenta replicar los hallazgos seleccionados y finalmente se realiza el meta-análisis que incluya todos los datos disponibles. [256]

Existen distintos métodos para realizar el análisis estadístico en los meta-análisis de GWASs: i) el enfoque de Fisher, para los meta-análisis que usan P valores o puntuaciones estándar (z-scores), es el enfoque más simple y permite realizar el meta-análisis cuando los efectos no están disponibles, lo que conlleva a ciertas dificultades en la interpretación; ii) la ponderación inversa de la varianza o el enfoque Cochran-Mantel-Haenszel, para los meta-análisis de efectos fijos, que se basa en una síntesis del tamaño del efecto en donde se presupone que no existe varianza entre los estudios, existe posibilidad de sesgo en caso de que exista elevada heterogeneidad; iii) la estimación DerSimonian y Laird, Sidik-Jonkman, Hedges-Vevea o Hunter-Schmidt y Schuster son métodos para los meta-análisis de efectos aleatorios, que se basa en la síntesis del tamaño del efecto en donde se asume que los estudios individuales estiman diferentes efectos, puede dar sesgos debido a la selección de los estudios incluidos; iv)

el factor de Bayes, usado para los meta-análisis con enfoque Bayesiano, con la incorporación de una evaluación previa de los efectos genéticos, por lo que información subjetiva previa es utilizada en el análisis. [256]

Dentro del Consorcio Internacional de Radiogenómica se han llevado a cabo algunos meta-análisis de GWASs en pacientes con cáncer de próstata.

El primer metaanálisis realizado por el Consorcio Internacional de Radiogenómica incluyó los datos de cuatro GWAS de pacientes con cáncer de próstata que recibieron radioterapia (RAPPER, RADIOGEN, Gene-PARE y CIC). Se incluyeron 1.564 pacientes con al menos dos años de seguimiento post-RT, en los que se evaluaron las toxicidades tardías: frecuencia urinaria, disminución del flujo de la orina, sangrado rectal y toxicidad global. Las toxicidades fueron graduadas de distinta forma en cada cohorte, RAPPER aplicó criterios del Royal Marsden Hospital, [257] los cuestionarios RTOG y LENT-SOMA; RADIOGEN y CCI usaron los criterios CTCAE v.3.0; y Gene-PARE utilizó RTOG y el *score* internacional de síntomas prostáticos; sin embargo, todas estas clasificaciones fueron armonizadas. El fenotipo usado para el análisis de GWAS en cada cohorte fue el incremento ≥ 1 grado en la toxicidad con respecto al *baseline* en las toxicidades individuales, en donde se analizó mediante regresión logística binaria; en el caso de la toxicidad global se estandarizó usando las puntuaciones STAT, y el GWAS se analizó usando regresión logística linear. Cada toxicidad se ajustó de acuerdo a los factores de riesgo no-genéticos identificados por QUANTEC, [258] que son: i) edad, diabetes, volumen del recto y BED para sangrado rectal; ii) edad, resección prostática transuretral (TURP), síntomas previos al tratamiento y BED para el análisis de las toxicidades urinarias; y iii) todos los factores anteriores para el análisis del STAT *score*. El método de meta-análisis empleado fue de efectos fijos, en donde se utilizaron las razones de probabilidad de las toxicidades individuales o el coeficiente *beta* de la regresión del puntaje STAT. Se identificaron dos SNPs: rs17599026 en 5q31.2 asociado con frecuencia urinaria y rs7720298 en 5p15.2 con la disminución del flujo de la orina. (***Tabla 11***)

Ninguno de los SNPs previamente asociados con efectos adversos a la radiación en pacientes con cáncer de próstata se encontraron entre los *loci* identificados en este meta-análisis. Los SNPs de *TANC1* no se incluyeron en los GWAS individuales por tener una MAF < 5%, sin embargo, se analizaron intencionadamente en la cohorte CCI (la única no incluida en el estudio original). Los siete SNPs asociados previamente mantuvieron la dirección de la asociación con la toxicidad global, presentando uno de ellos (rs264651) asociación significativa. Se realizó un meta-análisis de los siete SNPs en asociación con las toxicidades evaluadas en este estudio, seis de los siete SNPs se encontraron consistentes con el sentido de la asociación, seis SNPs fueron significativos en asociación con el aumento de la frecuencia urinaria y cuatro de estos, además significativos con la disminución del flujo de la orina, lo que parece indicar que el peso de la toxicidad global que se había observado en el estudio original [248] posiblemente se deba a la toxicidad genitourinaria, más que por toxicidad gastrointestinal. Estos resultados parecen apoyar que el *locus* 2q24.1 es un *locus* de riesgo para la toxicidad tardía a la radioterapia en pacientes con cáncer de próstata.

Los nuevos SNPs identificados en este meta-análisis se encuentran en genes que se expresan en aquellos tejidos que resultan afectados por la radioterapia pélvica, y que incluye vejiga, riñones, recto e intestino delgado. [259]

Tabla 11. Primer meta-análisis de GWASs en asociación con radiotoxicidad en pacientes con cáncer de próstata

Toxicidad	Estudio	tox/no-tox	Peso del estudio	OR	95% IC
Frecuencia urinaria (rs17599026)	RAPPER	45/482	33,5	2,57	(1,28-5,16)
	RADIOGEN	54/423	33,4	3,19	(1,57-6,46)
	GenePARE	81/170	17,1	8,16	(3,04-21,9)
	CCI	30/120	15,9	1,63	(0,59-4,54)
	Meta-análisis			3,12	(2,08-4,69)
Disminución del flujo de la orina (rs7720298)	RAPPER	29/483	39,1	2,13	(1,21-3,74)
	RADIOGEN	6/472	8,6	3,63	(1,08-12,16)
	GenePARE	65/186	52,3	3,09	(1,90-5,04)
	Meta-análisis			2,71	(1,90-3,86)
Toxicidad	**Estudio**	**STAT disponibles**	**Peso del estudio**	***Beta***	**95% IC**
Toxicidad global (rs11230328)	RAPPER	527	33,8	0,23	(0,05-0,40)
	RADIOGEN	597	37,8	0,45	(0,29-0,61)
	GenePARE	209	18,4	0,20	(-0,03-0,43)
	CCI	136	10,0	0,22	(-0,09-0,53)
	Meta-análisis			0,31	(0,21-0,41)

tox, número de pacientes con toxicidad; no-tox, número de pacientes sin toxicidad; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza; STAT, Toxicidad promedio total estandarizada (Siglas en inglés).
Adaptado de: Kerns et al. (2016) [259], con permiso de: *Creative Commons Attribution License*.

El segundo meta-análisis y primer *fine-mapping* realizado en el RGC incluyó seis GWAS de 3.871 pacientes con cáncer de próstata de ascendencia europea, que recibieron radioterapia como parte de su tratamiento. [260] Las cohortes fueron RAPPER, RADIGEN, GenePARE, UGhent, CCI-BT, CCI-EBRT. Los hallazgos en el meta-análisis se analizaron en tres cohortes japonesas con 962 pacientes, las cohortes PRRG-fotón, PRRG-ion carbón y la cohorte del Centro Médico Nacional de Tokio (NTMC). Las toxicidades fueron armonizadas con respecto a los criterios de CTCAE. Los tiempos de evaluación se transformaron en intervalos de tiempo hasta la aparición del evento (cada seis meses, excepto para RAPPER donde se consideraron intervalos de 12 meses). Cuatro toxicidades fueron evaluadas: el aumento de la frecuencia urinaria, la disminución del flujo de la orina, hematuria y sangrado rectal; además se calculó la toxicidad global usando el STAT *score*. Para el análisis de los GWASs individuales en asociación con las toxicidades se usó un modo de riesgo relativo agrupado (GRRM) ajustado por terapia de deprivación androgénica, prostatectomía previa al tratamiento, edad y BED, el fenotipo se definió como el tiempo transcurrido desde el inicio de la radioterapia hasta la primera vez que el paciente desarrolla alguna toxicidad con grado mayor o igual a 2. El método de meta-análisis usado fue de efectos fijos utilizando la inversa de la varianza ponderada. Se identificaron tres nuevas regiones genómicas independientes (***Figura 19***): rs17055178 asociada con sangrado rectal, rs10969913 asociada con disminución del flujo de la orina y rs11122573 con hematuria (con P valor del meta-análisis menor que 5×10^{-08}, una P valor de heterogeneidad > 0,05 y con una probabilidad bayesiana de falso descubrimiento, BFDR < 2%). (***Tabla 12***) Estas tres regiones se ampliaron 1Mb y se mapearon (*fine-mapping*) mediante análisis condicional en cada cohorte independiente, para después meta-analizarlos. Las variantes fueron anotadas con *Variant Effect Predictor* [261] para determinar el efecto en los genes, en la transcripción o en la secuencia proteica, y después para identificar solapamiento con regiones

promotoras o potenciadoras de la expresión génica se usó ENCODE. [262,263] Dos variantes causales creíbles (CCV por sus siglas en inglés) fueron identificadas asociadas con hematuria: la primera señal incluyó 47 CCV asociados al SNP rs11122573 cuyos alelos de riesgo disminuyen la expresión de los genes *AGT* y *COG2* que tienen actividad en varios tejidos entre ellos las arterias; y la segunda señal incluyó diez CCV asociadas al SNP rs147121532, cuyos alelos disminuyen la expresión de los genes *CAPN9* y *ARV1* que tienen actividad en tejidos gastrointestinales. Ninguno de estos cuatro nuevos SNPs replicó significativamente en las cohortes de pacientes japoneses, aunque mantuvieron la dirección del efecto.

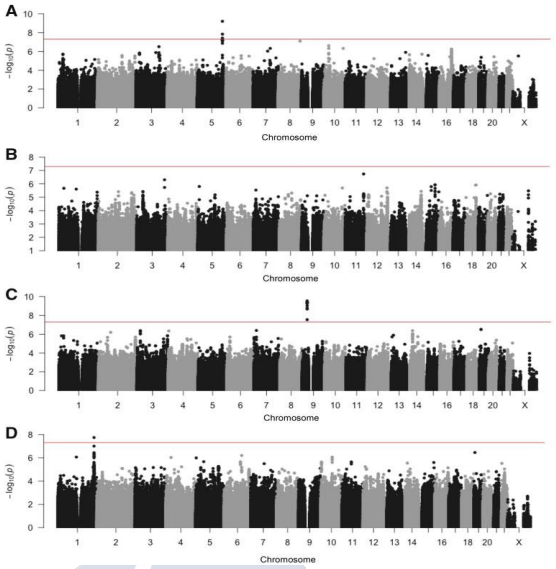


Figura 19. Manhattan plot del meta-análisis de toxicidades asociadas a la radiación en pacientes con cáncer de próstata. Para A) Sangrado rectal, B) aumento de la frecuencia urinaria, C) Disminución del flujo de la orina y D) Hematuria
Kerns et al. (2019) [260] Con permiso: *Creative Commons Attribution License*.

Tabla 12. Segundo meta-análisis de GWASs en asociación con radiotoxicidad en pacientes con cáncer de próstata

SNP-ID	Toxicidad	Estudio	Info	HR (95% IC)	P_{meta}	P_{het}	BFDP
rs17055178	Tiempo del	**Meta-analysis**	-	**1,95 (1,58-2,40)**	**$6,2x10^{-10}$**	**0,61**	**0,09%**
chr5:157,403,410	primer	RAPPER	0,81; 0,99	1,78 (1,37-2,32)			
Alelo menor G	sangrado	RADIOGEN	0,99	2,58 (1,69-3,95)			
MAF 0,09	rectal	GenePARE	NA	NA			
	grado 2 o	UGhent[i]	0,99	1,38 (0,18-10,4)			
	mayor	CCI-BT	0,99	2,01 (0,97-4,20)			
		CCI-EBRT	0,98	1,27 (0,38-4,25)			
rs10969913	Tiempo de	**Meta-analysis**	-	**3,92 (2,57-6,00)**	**$2,9x10^{-10}$**	**0,08**	**1,07%**
chr9:30,866,808	la primera	RAPPER	0,61; 0,95	1,86 (0,76-4,54)			
Alelo menor G	disminución	RADIOGEN	0,95	2,03 (0,27-15,4)			
MAF 0,05	del flujo	GenePARE	0,99; 0,95	4,36 (2,55-7,46)			
	de la orina	UGhent	NA	NA			
	grado 2 o	CCI-BT	NA	NA			
	mayor	CCI-EBRT	0,95	14,3 (3,78-54,4)			
rs11122573	Tiempo de	**Meta-analysis**	-	**1,92 (1,53-2,42)**	**$1,8x10^{-8}$**	**0,14**	**1,96%**
chr1:230,837,180	la primer	RAPPER	0,99	1,42 (0,99-2,04)			
Alelo menor T	hematuria	RADIOGEN	0,99	2,40 (1,54-3,73)			
MAF 0,06	grado 2 o	GenePARE	0,99; 0,99	2,01 (1,25-3,22)			
	mayor	UGhent	0,99	3,59 (1,72-7,49)			
		CCI-BT	NA	NA			
		CCI-EBRT	1,000	0,99 (0,13-7,58)			

SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; Info, valor de precisión de imputación; HR, Hazard ratio; P_{meta}, P valor del meta-análisis; P_{het}, P valor de la prueba de heterogeneidad X^2; chr, cromosóma; MAF, frecuencia de alelo menor; BFDP, probabilidad bayesiana de falsos descubrimientos; NA, no alalizado.
Adaptado de: Kerns et al. (2019) [260], con permiso de: *Creative Commons Attribution License*.

1.4.8 Otras aproximaciones: *Machine Learning* en Radiogenómica

Machine learning es un desarrollo bioinformático que surgió a partir de la informática, la inteligencia artificial y la inferencia estadística para descubrir patrones en los datos, que permitan hacer predicciones. [264]

Investigadores dentro del RGC han señalado que el campo de la oncología radioterápica es particularmente adecuado para usar *machine learning* ya que hay una gran cantidad de datos relacionados con el diagnóstico, que se pueden usar como datos de entrada y muchos datos terapéuticos generados, que se usan como datos de salida. [264]

El primer estudio de radiogenómica que utilizó *machine learning*, se realizó en 368 pacientes con cáncer de próstata tratados con radioterapia, en los que se estudiaron las toxicidades de sangrado rectal y disfunción eréctil. Un nuevo concepto de modelo predictivo fue descrito en este estudio, al cual se le llamó regresión *random forest* pre-condicionada (PRFR, por sus siglas en inglés), el cual permite construir modelos de riesgo poligénico utilizando cientos de SNPs. Se seleccionaron los SNPs con mayor asociación a las toxicidades estudiadas mediante análisis univariable, 749 y 367 SNPs asociados con sangrado rectal y disfunción eréctil respectivamente. Para el análisis de ontología génica y redes de interacción proteína-proteína se seleccionaron los genes próximos a los SNPs incluidos, con lo que se estudiaron 198 y 90 genes para sangrado rectal y disfunción eréctil respectivamente. Ambas toxicidades no compartieron ningún SNP en común, sin embargo, al seleccionar los genes se identificaron 11 genes en común. De estos genes, dos (*CACNA1D* y *CXCR5*) se encuentran implicados en los diez procesos biológicos asociados para sangrado rectal y a los diez procesos biológicos asociados con disfunción eréctil. Las conclusiones de este trabajo confirman el uso de *machine learning* puede producir grandes modelos predictivos con áreas bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de 0,70 y 0,62 para sangrado rectal y disfunción eréctil respectivamente, que podrían estratificar a los pacientes de acuerdo al riesgo de presentar toxicidades, además este método permite identificar procesos biológicos involucrados en el daño producido por la radiación y en la reparación de estos tejidos. [265]

Un nuevo estudio analizó la toxicidad tardía genitourinaria después de radioterapia en 324 pacientes con cáncer de próstata utilizando el método de PRFP. En este estudio la precisión predictiva varió entre los diferentes síntomas estudiados, la disminución del flujo de orina presentó un AUC de 0,70 y el análisis de ontología genética identificó la neurogénesis y el transporte de iones como los procesos biológicos claves en esta toxicidad. [266]

Estas nuevas estrategias para la identificación de modelos de predicción del riesgo de presentar efectos adversos a la radiación se están explorando cada vez más, lo cual permitirá identificar nuevos biomarcadores o validar los ya existentes, así como identificar procesos biológicos asociados con la toxicidad a la radiación.

1.4.9 Riesgo poligénico

El *score* de riesgo poligénico (PRS por sus siglas en inglés) refleja un agregado matemático de riesgo conferido por muchas variantes genéticas para estimar la probabilidad de un resultado específico. [267] (ver apartado: 3.5.4.1 Puntuaciones de riesgo poligénico no ponderado y 3.5.4.2 Puntuaciones de riesgo poligénico ponderado)

Mientras se están identificando variantes asociadas con el riesgo a la toxicidad originada por la radiación, dentro del RGC el PRS ha sido utilizado para conocer si las variantes genéticas asociadas a cáncer se asocian a su vez al riesgo de tener efectos adversos a la radiación.

El primer estudio se realizó en 1.560 pacientes con cáncer de próstata tratados con radioterapia. Se analizaron 75 SNPs conocidos asociados con la susceptibilidad a cáncer de próstata. Las toxicidades estudiadas fueron la frecuencia urinaria, la disminución del flujo de la

orina y el sangrado rectal. El PRS se calculó de dos formas distintas, no-ponderado, el cual suma los alelos de riesgo que tiene cada paciente; y el PRS ponderado, en donde a cada alelo de riesgo se le toma en cuenta el *odds ratio* con el que fue asociado en el estudio de referencia. Ninguno de los PRS ponderado y no ponderado de los estudios individuales, ni en meta-análisis se asoció con ninguna de las toxicidades incluidas. (***Tabla 13***) Los autores concluyen que los pacientes con alta susceptibilidad poligénica al cáncer de próstata no tienen mayor riesgo de desarrollar toxicidad tardía por la radioterapia. [268]

Tabla 13. Resultados PRS de susceptibilidad a cáncer de próstata en asociación con efectos adversos a la radiación

	RAPPER		RADIOGEN		GenePARE		CCI		Meta-análisis		
	Beta (95% IC)	*P*	*Beta* (95% IC)	*P*	*Beta* (95% IC)	*P*	*Beta* (95% IC)	*P*	*Beta* (95% IC)	*P*	Q, Phet
STAT score											
PRS	0,003 (−0,006; 0,01)	0,49	0,003 (−0,008; 0,01)	0,61	−0,01 (−0,03; 0,01)	0,15	−0,01 (−0,04; 0,01)	0,25	0,00002 (−0,01; 0,01)	0,99	3,88; 0,28
PRS-p	0,04 (−0,02; 0,10)	0,19	0,03 (−0,05; 0,10)	0,44	−0,06 (−0,17; 0,05)	0,28	−0,09 (−0,26; 0,08)	0,29	0,01 (−0,03; 0,06)	0,49	4,15; 0,25
Disminución flujo orina											
PRS	0,01 (−0,06; 0,08)	0,78	0001 (−0,001; 0,003)	0,36	0,004 (−0,06; 0,06)	0,91	NA	NA	0,001 (−0,001; 0,003)	0,35	0,08; 0,96
PRS-p	0,34 (−0,15; 0,83)	0,17	0,01 (−0,01; 0,02)	0,36	0,04 (−0,35; 0,43)	0,86	NA	NA	0,01 (−0,01; 0,02)	0,33	1,84; 0,40
Frecuencia Urinaria											
PRS	−0,004 (−0,06; 0,06)	0,90	−0,001 (−0,01; 0,004)	0,66	−0,04 (−0,10; 0,02)	0,18	−0,03 (−0,12; 0,05)	0,45	−0,002 (−0,007; 0,004)	0,54	2,19; 0,53
PRS-p	−0,003 (−0,40; 0,40)	0,99	−0,01 (−0,05; 0,02)	0,5	−0,31 (−0,72; 0,08)	0,12	0,04 (−0,56; 0,62)	0,89	−0,01 (−0,05; 0,02)	0,42	2,18; 0,54
Sangrado rectal											
PRS	0,04 (−0,009; 0,08)	0,11	−0,002 (−0,01; 0,003)	0,47	−0,02 (−0,08; 0,04)	0,48	−0,0003 (−0,07; 0,07)	0,99	−0,002 (−0,01; 0,003)	0,55	3,22; 0,36
PRS-p	0,28 (−0,03; 0,59)	0,08	−0,01 (−0,04; 0,03)	0,78	−0,06 (−0,45; 0,32)	0,75	−0,05 (−0,57; 0,47)	0,86	−0,002 (−0,04; 0,03)	0,9	3,32; 0,34

Beta, Estimación *beta*; IC, intervalo de confianza; PRS, puntaje de riesgo poligénico; PRS-p, puntaje de riesgo poligénico ponderado por el *odds ratio*; Q, P valor para la estadística Q de Cochrane; Phet, P valor de la prueba de heterogeneidad.
Adaptada de: Ahmed, et al. (2016) [268], con permiso de: *Creative Commons Attribution License*.

El segundo estudio se realizó en 1.160 pacientes con cáncer de mama que recibieron radioterapia. Se incluyeron 90 SNPs de susceptibilidad al cáncer de mama conocidos en el PRS ponderado y sin ponderar. Las toxicidades agudas y tardías que se estudiaron fueron telangiectasia, edema, disminución del tamaño de la mama evaluado por fotografía, induración, pigmentación, dolor en la mama, sensibilidad mamaria y toxicidad global. No se encontró asociación con ninguna de las toxicidades estudiadas. (***Tabla 14***) Los autores concluyen, al igual que en el estudio realizado en cáncer de próstata, que los pacientes con predisposición poligénica al cáncer de mama no tienen incremento de riesgo a desarrollar toxicidad a la radiación. [269]

Tabla 14. Resultados PRS de susceptibilidad a cáncer de mama en asociación con efectos adversos a la radiación

	PRS	PRS ponderado
Toxicidad	***Beta*** (95% IC) P valor	*Beta* (95% IC) P valor
Toxicidad aguda		
grado RTOG	−0,01 (−0,02-0,01) p=0,39	−0,08 (−0,23-0,07) p=0,30
Toxicidad a 2 años		
Telangiectasia	−0,01 (−0,02-0,01) p=0,40	−0,05 (−0,20-0,10) p=0,54
Edema en mama	0,001 (−0,01-0,01) p=0,80	0,02 (−0,13-0,17) p=0,80
Encogimiento por fotografía	−0,01 (−0,02-0,01) p=0,41	−0,08 (−0,22-0,07) p=0,30
Induración	−0,003 (−0,01-0,01) p=0,64	−0,05 (−0,20-0,10) p=0,51
Pigmentación	0,01 (−0,004-0,02) p=0,17	0,13 (−0,04-0,29) p=0,13
Dolor en mamas	0,003 (−0,01-0,01) p=0,67	0,01 (−0,14-0,17) p=0,85
Hipersensibilidad	−0,001 (−0,01-0,01) p=0,85	−0,05 (−0,21-0,10) p=0,49
Toxicidad global (STAT)	0,002 (−0,01-0,01) p=0,72	0,02 (−0,13-0,16) p=0,81
Toxicidad a 5 años		
Telangiectasia	−0,0004 (−0,02-0,01) p=0,96	−0,05 (−0,24-0,14) p=0,61
Edema en mama	−0,003 (−0,02-0,01) p=0,72	−0,05 (−0,23-0,13) p=0,58
Encogimiento por fotografía	0,001 (−0,01-0,02) p=0,92	0,05 (−0,14-0,25) p=0,58
Induración	−0,01 (−0,03-0,01) p=0,19	−0,09 (−0,28-0,11) p=0,39
Toxicidad global (STAT)	−0,01 (−0,02-0,01) p=0,47	−0,07 (−0,26-0,12) p=0,48

Beta, estimación *beta*; IC, intervalo de confianza; PRS, puntaje del riesgo poligénico; RTOG, puntuación de morbilidad por radiación tardía del Grupo de Oncología Radioterápica; STAT, toxicidad promedio total estandarizada.
Modificado de: Dorling et al. (2016) [269], con permiso de: *American Association for Cancer Research*.

Hasta la fecha el PRS no ha sido evaluado en pacientes con cáncer de pulmón.

1.4.10 Estudio REQUITE

La falta de validaciones independientes ha impedido que muchos de los estudios realizados hasta ahora puedan ser trasladados a la clínica. Modelos y potenciales biomarcadores han sido propuestos, sin embargo, se requiere de cohortes adecuadas para validar estos resultados, cohortes grandes, homogéneas, que empleen escalas estandarizadas para determinar el grado de severidad de los efectos adversos, que además tengan la misma información epidemiológica, clínica, patológica y dosimétrica de los pacientes tratados con radioterapia, a los que además se les haga un seguimiento prolongado de las toxicidades en los mismos intervalos de tiempo.



Figura 20. Logo del estudio REQUITE

Para cubrir todas estas necesidades en el área de la radiogenómica se estableció el estudio REQUITE (validating pREdictive models and biomarkers of radiotherapy toxicity to reduce side effects and improve QUalITy of lifE in cancer survivors) [270] con la financiación del séptimo programa marco de la Unión Europea para investigación, desarrollo tecnológico y demostración, bajo el acuerdo de subvención número 601826. Con el objetivo principal de

validar modelos y biomarcadores que predigan el riesgo de presentar efectos adversos a la radiación en pacientes con cáncer de mama, próstata y pulmón. Se trata de un estudio observacional prospectivo, longitudinal, internacional multicéntrico en el que participamos 12 centros principales localizados en Bélgica, Francia, Alemania, Italia, Países Bajos, Reino Unido, Estados Unidos y España. En España el centro principal fue la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX, IP Ana Vega) coordinando el reclutamiento en Santiago de Compostela (CHUS, Servicio de Oncología Radioterápica) y en colaboración con el Instituto de Oncología Vall d'Hebron (Sara Gutiérrez Enríquez), como subcentro asociado.

En REQUITE se crearon formularios de registro de casos para recopilar datos de forma estandarizada que incluyen información demográfica, comorbilidades previas y actuales, tratamientos farmacológicos de uso común, datos clínicos del cáncer, clasificación y estadiaje del tumor, datos de anatomía patológica, tratamiento oncológico previo, datos dosimétricos de la radioterapia, la evaluación de las manifestaciones clínicas de los efectos adversos para cada tipo de cáncer (25 toxicidades para próstata, 21 para pulmón y 14 para mama, además de los análisis cosméticos que se estudian en fotos) y datos sobre la calidad de vida. Los cuestionarios para recopilar las toxicidades reportadas por los pacientes basándose en los criterios CTCAE se tradujeron a múltiples idiomas y fueron validados antes de su utilización. La recopilación de los datos se llevó a cabo antes del inicio de la radioterapia, a la finalización de esta y en seguimientos anuales. Se estableció un biobanco centralizado que almacena las muestras de sangre (ADN extraído y tubos PAXgene). (**Figura 21**) Las muestras fueron genotipadas y los datos se agregaron a la base de datos central. También se realizó un ensayo de apoptosis inducida por la radiación en linfocitos (RILA) en un subconjunto de pacientes en los centros de Francia Alemania y Reino Unido.

Se reclutaron 4.347 pacientes a los que se sumaron 383 casos adicionales de pulmón para obtener un total de 4.730 pacientes (89 % de los 5.300 planificados). El reclutamiento más alto fue en pacientes con cáncer de mama (2.057 de 2.100 planeados), seguido de próstata (1.760 de 2.100 planeados) y pulmón (530 de 1.100 planeados). (***Tabla 15***) La base de datos incluye 47.025 formularios informados por los médicos y 54.901 formularios completados por los pacientes; 11.563 fotos de pacientes con cáncer de mama para evaluar el efecto adverso estético; 17.107 archivos DICOM (imagen digital y comunicación sobre medicina, por sus siglas en inglés, es un formato de archivos para transferencia de imágenes médicas) y 12.684 archivos DVH (histogramas dosis-volumen, por sus siglas en inglés) que incluye los histogramas de las estructuras relevantes para cada tipo de cáncer y volúmenes de tratamiento para cada paciente. Los datos de genotipos imputados están disponibles para 4.223 pacientes con ascendencia europea (1.948 mama, 1.728 próstata y 547 pulmón). Los datos del ensayo RILA están disponibles para 1.319 pacientes. Los tubos con ADN (4.409) y PAXgene (3.039) se almacenan en el biobanco central.

En REQUITE se consideró importante recolectar los datos de las manifestaciones clínicas previas al tratamiento, las más frecuentes fueron la disfunción eréctil en pacientes con cáncer de próstata (27% con grado ≥2) y disnea en pacientes con cáncer de pulmón (23% con grado ≥2). El estado de salud general de los pacientes se calculó utilizando el cuestionario EORTC C30, [271] y reportó al comienzo de la radioterapia puntajes que van de 61 a 74. Los datos preliminares de toxicidad tardía (24 meses para próstata y mama, y 12 meses para pulmón) reportaron una tasa del 5 al 13% de toxicidades grado ≥2 en las pacientes con cáncer de mama; para los pacientes con cáncer de próstata se han reportado tasas por debajo del 5% para toxicidades gastrointestinales, del 3 al 8% para genitourinarias y del 20 al 31% para problemas sexuales; en cuanto a los pacientes con cáncer de pulmón las toxicidades pulmonares al año se reportaron en aproximadamente 4-7% y tasa de disnea de 27%.

Tabla 15. Resumen de las características iniciales de los pacientes de REQUITE

Características	Definición	Mama	Próstata	Pulmón
No. de Pacientes		2.057	1.760	530
Edad	Media (rango), años	58 (23-90)	70 (42-88)	69 (39-91)
Índice de masa corporal	Media±DE kg/m^2	26,5±5.6	27,6±4.5	26,6±4.8
Estatus de fumador	Fumadores	365 (18%)	249 (14%)	213 (40%)
	Exfumadores	514 (25%)	821 (48%)	290 (55%)
	Nunca fumadores	1156 (56%)	683 (39%)	23 (5%)
Comorbilidades	Diabetes	127 (6%)	236 (13%)	88 (17%)
	Cardiopatías	143 (7%)	372 (21%)	161 (30%)
Historia familiar	Familiares 1º grado	410 (20)	230 (20%)	94 (18)
Tamaño de tumor	*in situ*	252 (12%)	0	0
	T1-T2	1728 (84%)	113 (64%)	319 (60%)
	T3, T4	16 (1%)	467 (27%)	193 (36%)
Estatus de nódulos	Negativo	1488 (72%)	1308 (74%)	235 (44%)
	Positivo	394 (19%)	134 (8%)	289 (55%)
Quimioterapia		652 (32%)	0	271 (51%)
Hormonoterapia		1574 (77%)	1221 (69%)	0
Radioterapia	IMRT	1018 (49%)	246 (14%)	140 (26%)
	Arc Therapy	0	1161 (66%)	70 (13%)

No., número; DE, desviación estándar; kg, peso en kilogramos; m^2, altura en metros al cuadrado; IMRT, Radioterapia de intensidad modulada; *Arc Therapy*, Arcoterapia de Modulación Volumetrica; Adaptada de: Seibold et al. 2019 [272], permitido por: Elsevier.

El reclutamiento de los pacientes se realizó del primero de abril del 2014 al 30 de septiembre de 2016 para próstata y mama, y 31 de marzo de 2017 para pulmón.

En la cohorte de REQUITE se buscará identificar variantes genéticas asociadas a los efectos adversos a la radiación mediante estudios GWAS, el análisis en la cohorte REQUITE de mama la coordina la Universidad de Cambridge en Reino Unido, la cohorte REQUITE de próstata la coordina la Universidad de Rochester en Estados Unidos de Norteamérica y la cohorte REQUITE de pulmón la coordinamos nosotros desde la FPGMX.

Las toxicidades principales que se estudiarán en la cohorte REQUITE de mama es el cambio de apariencia de la mama a los 24 meses post-radioterapia y los secundarios son fibrosis, induración y cambios de vascularización; en próstata, el sangrado rectal a los 24 meses post-radioterapia y los secundarios son incontinencia rectal, toxicidad urinaria y disfunción eréctil; y en pulmón disnea a los 12 meses post-RT y los secundarios son disfagia y esofagitis. En los tres tipos de cáncer se analizarán también los cambios en la calidad de vida.

Este estudio es un hito en el campo de la radiogenómica, la creación de una cohorte internacional bajo estándares bien definidos definirá el futuro de los estudios en este campo.

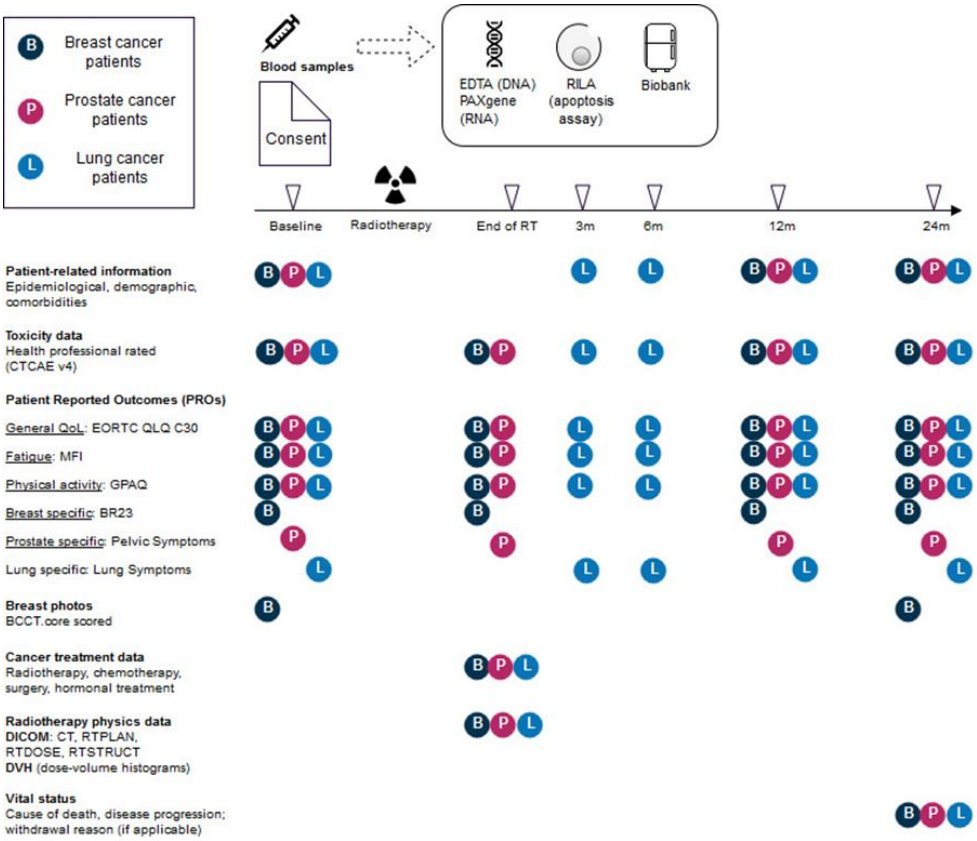


Figura 21. Esquema del protocolo de REQUITE.
Seibold et al. 2019 [272], permitido por: Elsevier.

1.5 *TANC1* Y SU ASOCIACIÓN CON TOXICIDAD A LA RADIACIÓN

El locus 2q24.1 fue identificado por nuestro grupo en asociación con la presencia de toxicidad global tardía en pacientes con cáncer de próstata sometidos a radioterapia. [248] En este locus se encuentra el gen *TANC1*, (*Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1*) en las coordenadas genómicas 2:158,968,599-159,232,658 de acuerdo con GRCH38. (***Figura 22***)

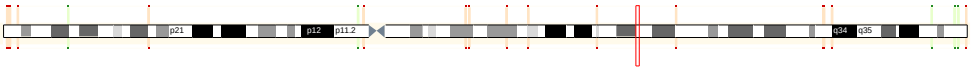


Figura 22. ***Locus*** **2q24.1**

Se ha descrito que la proteína TANC1 a nivel molecular actúa como una proteína de unión que se relaciona con tres procesos biológicos: i) el mantenimiento de las dendritas en la columna vertebral; ii) el aprendizaje visual, y iii) la fusión de los mioblastos. La fusión de los mioblastos es un evento necesario para el desarrollo y la regeneración adecuada del músculo. [273] Cuando ocurre un daño local en la fibra muscular (miofibra), las células miogénicas indiferenciadas (células satélite) se activan y comienzan a proliferar para dar lugar a mioblastos, que son los encargados de regenerar la fibra dañada. Los mioblastos migran a la zona de la lesión y mediante el proceso de fusión ocurre la regeneración del miotubo.

Se cree que el efecto de la radiación sobre las células satélite provoca la inhibición de la mitosis que termina por impedir la correcta regeneración muscular. Se ha demostrado que la radiación ionizante produce cambios significativos en la proliferación de los miblastos. [274] La proliferación y la diferenciación se describen como etapas clave en la regeneración del tejido muscular.

La hipótesis planteada a partir de la asociación entre los efectos adversos tardíos a la radioterapia y las variantes en el gen *TANC1*, se basa en la participación de este gen en la fusión de los mioblastos. Dicho proceso tiene una gran relevancia en la reparación del músculo dañado. Por un lado, sabemos que la regeneración muscular se ve alterada por la radiación; y por otro lado, que una variación en el gen *TANC1* podría desencadenar deficiencias en la regeneración del músculo dañado por la radiación. Esto podría explicar que aquellos pacientes que tienen alteraciones en el gen *TANC1* hayan resultado más susceptibles a desarrollar algún efecto adverso posterior al tratamiento radioterápico.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Aproximadamente dos tercios de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico requieren radioterapia al menos una vez durante el curso de su enfermedad. La efectividad de la radioterapia depende de la dosis, la cual se ve limitada por los tejidos sanos que rodean al tumor. Aunque los avances en las tecnologías radioterapéuticas han sido significativos en los últimos años, logrando alto control local del tumor, sigue siendo inevitable con las técnicas convencionales que el tejido normal no reciba cierta dosis de radiación, lo que origina en algunos casos el desarrollo de efectos adversos.

La variabilidad en el desarrollo de efectos adversos producidos por la radiación en los pacientes es un hecho conocido. Si bien se han identificado algunos factores clínicos que influyen en dicha variabilidad, un alto porcentaje de la misma no llega a explicarse por estos factores. Esto ha llevado a proponer al componente genético del paciente como participante de esta variabilidad.

Los límites establecidos actualmente para las dosis administradas podrían modificarse si se personalizase la radioterapia. Para ello podrían considerarse, previamente al tratamiento radioterápico, modelos de predicción de riesgo incluyendo variantes genéticas. Es por ello necesario identificar estas variantes a incluir en el modelo. Podrían utilizarse distintas aproximaciones para identificar estas variantes entre las que se incluyen: i) la validación de variantes descritas previamente tanto para el mismo fenotipo, en este caso radiotoxicidad en cáncer de pulmón; como variantes identificadas en fenotipos asociados, considerando aquí variantes identificadas en otras localizaciones tumorales, o incluso en fenotipos diferentes a la toxicidad, como sería las variantes asociadas a riesgo poligénico en cáncer de pulmón ii) la identificación de nuevas variantes mediante estudios de asociación de genoma completo. También es importante conocer, siempre que sea posible, cómo actúa la variante, para lo cual es importante caracterizar la función de los genes asociados y de esta forma determinar su influencia o sus mecanismos de acción en respuesta a la radiación.

El objetivo general de este trabajo es identificar factores genéticos implicados en los efectos adversos a la radioterapia en pacientes con cáncer de pulmón, así como ahondar en los mecanismos de acción de genes candidatos. Para ello se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una validación independiente de variantes genéticas asociadas con efectos adversos a la radioterapia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en nuestra cohorte RADIOGEN.
- Identificar nuevas variantes asociadas a efectos adversos a la radioterapia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, mediante el estudio de asociación de genoma completo (GWAS).
- Evaluar la estimación poligénica del riesgo de cáncer de pulmón no microcítico como predictor de riesgo de presentar efectos adversos a la radioterapia.
- Explorar las variantes en *TANC1* y su asociación con efectos adversos a la radiación en pacientes con cáncer de pulmón.
- Identificar un modelo celular para estudiar funcionalmente al gen *TANC1*; estudiar el efecto de la radiación ionizante en dicho modelo.
- Localizar la proteína TANC1 en el modelo *in vitro* y estudiar el efecto de su silenciamiento génico en la miogénesis.
- Estudiar el efecto de la radiación ionizante en el modelo con el gen *TANC1* silenciado.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón que reciben radioterapia como parte de su tratamiento, estudiados en esta tesis, pertenecen al estudio RADIOGEN (Estudio de la Influencia Genómica en Pacientes Sometidos a Radioterapia), cuyos protocolos fueron revisados y cuentan con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia, con el código: 2016/597 (**ANEXO 5**) se adecúan a los principios éticos de la Declaración de Helsinki y de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (BOE-A-2007-12945). Todos los pacientes incluidos en este estudio han otorgado su consentimiento informado por escrito. Los datos personales han sido recabados con el único fin de realizar investigación biomédica, por lo que han sido seudonimizados. Estos datos carecen de identificación en el proceso de análisis, procediendo según la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

3.2 COHORTE RADIOGEN-PULMÓN

3.2.1 Población de estudio

Los pacientes fueron seleccionados a partir de la cohorte de pulmón del estudio RADIOGEN, la cual está integrada por 514 pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón, que recibieron radioterapia. La inclusión se realizó de forma prospectiva y en orden consecutivo por el Servicio de Oncología Radioterápica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela entre marzo del 2008 y agosto del 2018. Los pacientes con diagnóstico de NSCLC con estadios clínicos I-III, que cumplieron los criterios establecidos para los estudios realizados en esta tesis fueron 227, sin embargo, cada uno de los análisis se realizó con un número distinto de pacientes, dependiendo de los datos disponibles.

3.2.1.1 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión de los pacientes que se siguieron en este estudio fueron: i) diagnóstico confirmado de NSCLC primario, ii) ser apto/a para recibir radioterapia radical, secuencial o concurrente con quimioterapia o radioterapia corporal estereotáxica, iii) no haber tenido ningún otro tipo de cáncer en los últimos 5 años, excepto cánceres de células basales y de células escamosas de piel, iv) no haber evidencia de metástasis a distancia, v) ser capaz de proveer una muestra de sangre venosa, vi) tener la disponibilidad y capacidad para cumplir con las visitas programadas de seguimientos (al menos el primer año), vii) ser mayor de 18 años de edad, y viii) tener la capacidad de comprender la hoja de información al paciente y de proporcionar su consentimiento informado por escrito.

3.2.1.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos pacientes que presentaron alguno de los siguientes criterios: i) enfermedad metastásica, ii) previa irradiación del pulmón, iii) discapacidad mental u otra condición que impida que el paciente de su consentimiento informado, iv) esperanza de vida muy limitada, v) paciente embarazada, y vi) pacientes con infección conocida por VIH o hepatitis.

3.2.2 Cálculo del poder estadístico

El poder estadístico se calculó usando el lenguaje de programación de código abierto R, [275] con el paquete genpwr [276] que permite realizar el cálculo de potencia y tamaño de muestra para estudios de asociación genética ajustando por el tipo de modelo de susceptibilidad, el modelo de regresión logística, el MAF y a diferentes niveles de significancia. Hemos

realizado los cálculos de potencia y tamaño de muestra para los diferentes enfoques estudiados en este trabajo, utilizando la incidencia de la toxicidad más frecuente, el rango de MAF y *odds ratios* del conjunto de SNPs estudiados. (***Figura 23-28***)

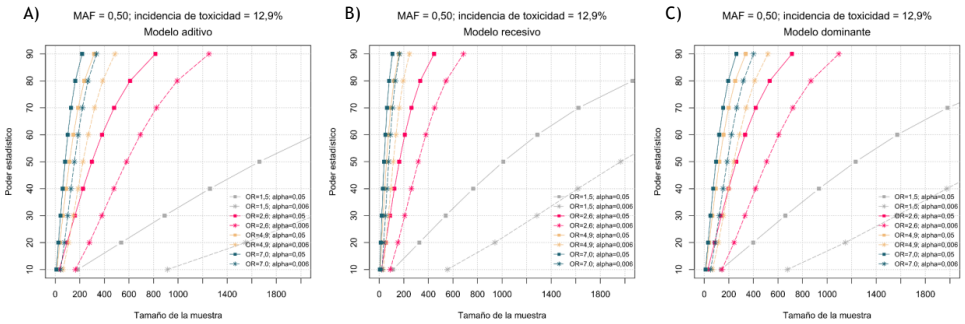


Figura 24. Cálculo de poder y tamaño de muestra para un MAF=0,50 dependiendo del OR. Para modelos: A) aditivo, B) recesivo y C) dominante; una toxicidad con incidencia de 12,9%; *odds ratio* de 1,5 a 7,0; y un *alpha* de 0,05 (para 1 SNP) o 0,006 (P valor ajustado).

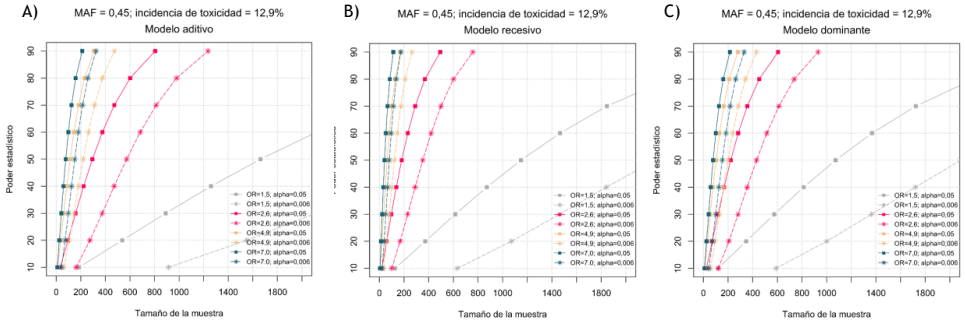


Figura 23. Cálculo de poder y tamaño de muestra para un MAF=0,45 dependiendo del OR. Para modelos: A) aditivo, B) recesivo y C) dominante; una toxicidad con incidencia de 12,9%; *odds ratio* de 1,5 a 7,0; y un *alpha* de 0,05 (para 1 SNP) o 0,006 (P valor ajustado).

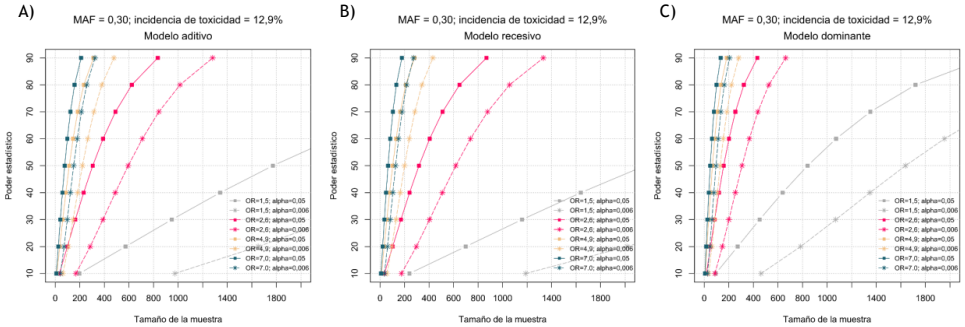


Figura 25. Cálculo de poder y tamaño de muestra para un MAF=0,30 dependiendo del OR. Para modelos: A) aditivo, B) recesivo y C) dominante; una toxicidad con incidencia de 12,9%; *odds ratio* de 1,5 a 7,0; y un *alpha* de 0,05 (para 1 SNP) o 0,006 (P valor ajustado).

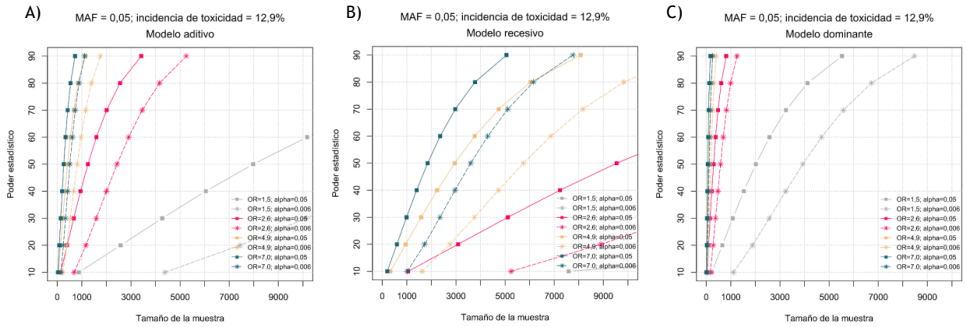


Figura 26. Cálculo de poder y tamaño de muestra para un MAF=0,05 dependiendo del OR.
Para modelos: A) aditivo, B) recesivo y C) dominante; una toxicidad con incidencia de 12,9%; *odds ratio* de 1,5 a 7,0; y un *alpha* de 0,05 (para 1 SNP) o 0,006 (P valor ajustado).

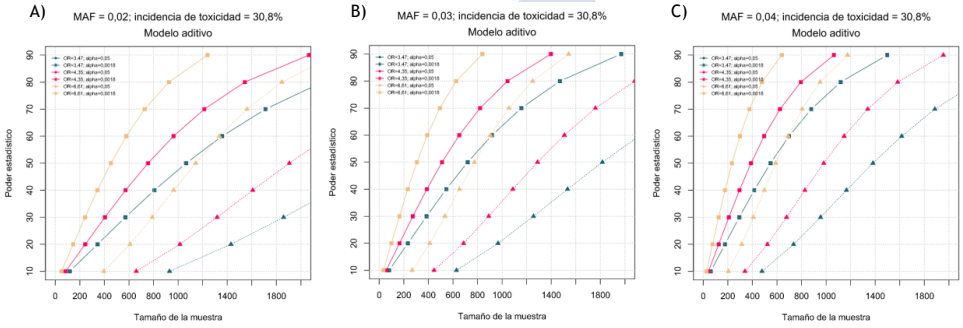


Figura 27. Cálculo de poder y tamaño de muestra para modelo aditivo dependiendo del MAF.
Para una MAF de A) 0,02; B) 0,03 y C) 0,04, una toxicidad con incidencia de 30,8%; *odds ratio* de 3,47 a 6,61; y un *alpha* de 0,05 (para 1 SNP) o 0,0018 (P valor ajustado).

El cálculo de poder para el estudio GWAS se calculó utilizando el lenguaje de programación R y el código *gwas-power* (kaustubhad/gwas-power *is licensed under the MIT License*) (***Figura 28***) calculado para un rango de MAF de 0,1 a 0,5, para identificar un efecto *beta* de 0,1 a 0,3, calculado para un tamaño de muestra de 2000 pacientes.

Poder estadístico para 2000 pacientes y un P valor = 5 x 10^{-08}

Beta \ MAF	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
0,1	0,000	0,002	0,005	0,010	0,011
0,12	0,001	0,008	0,025	0,043	0,050
0,14	0,003	0,029	0,084	0,137	0,158
0,16	0,008	0,083	0,215	0,322	0,360
0,18	0,021	0,191	0,421	0,567	0,613
0,2	0,050	0,360	0,653	0,790	0,826
0,22	0,104	0,563	0,839	0,926	0,944
0,24	0,191	0,751	0,944	0,982	0,988
0,26	0,313	0,885	0,986	0,997	0,998
0,28	0,460	0,958	0,997	1,000	1,000
0,3	0,613	0,988	1,000	1,000	1,000

Figura 28. Cálculo de poder dependiendo del MAF y el coeficiente *Beta*.
Calculado para un P valor significativo (P valor = 5 x 10^{-08}) en una cohorte de 2000 pacientes.

3.2.3 Obtención de muestra

Los pacientes incluidos en el estudio donan una muestra de sangre periférica, la cual es extraída por personal de enfermería en el Servicio de Oncología Radioterápica durante la cita previa al inicio del tratamiento. La toma de muestra se realiza utilizando una palomilla de seguridad por retracción automática para extracción de sangre venosa por sistema de vacío, recolectando 10 ml de sangre en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las muestras se almacenan a 4 ºC, para después ser colectadas y transportadas a la FPGMX (https://xenomica.sergas.gal/), donde continúa su almacenamiento a 4 ºC hasta el momento de la extracción del ADN. El tiempo que transcurre desde la obtención de la muestra hasta la extracción del ADN se estima en un máximo de 2 a 3 días.

3.2.4 Extracción y cuantificación del ADN

La extracción de ADN genómico se lleva a cabo en la FPGMX en el área de extracción, utilizando la tecnología de perlas magnéticas con el robot *Chemagic™ Magnetic Separation Module (MSM) I* (*Chemagen Biopolymer-Technologie* AG) y el kit *Chemagic DNA Blood 200 Kit* (PerkinElmer Inc.). Se emplea el protocolo indicado por el fabricante.

La cuantificación del ADN se realiza por dos métodos distintos, usando el equipo *NanoDrop® 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher *Scientific*) o el *Qubit™ fluorometer* (Thermo Fisher *Scientific*). Para el primero se usa la tecnología de espectrofotometría, que obtiene los resultados utilizando la absorbancia de la luz, la concentración se calcula mediante la absorbancia a 260 nm y la pureza usando los ratios 260/280 (se considera una pureza aceptable un ratio de ~ 1,8) y 260/230 (idealmente debe estar en un rango de 2,0-2,2). El *Qubit* utiliza la tecnología de fluorimetría, que se basa en el uso de moléculas que emiten fluorescencia al unirse con el objetivo, por lo que es necesario un kit específico para cada tipo de muestra a cuantificar. Para cuantificar el ADN usamos el *Qubit dsDNA Assay Kit* (Thermo Fisher *Scientific*). La fluorimetría es un método de cuantificación directo, ya que la cantidad de fluorescencia depende directamente de la cantidad de ADN.

3.3 VALIDACIÓN DE SNPS

En este estudio se incluyeron 177 pacientes de la cohorte de pulmón del estudio RADIOGEN.

3.3.1 Preparación de las muestras

El ADN cuantificado se normaliza y prepara de acuerdo a las especificaciones del protocolo envío de muestras del nodo Santiago Agena Bioscience, para el Servicio Genotipado iPLEX GOLD-Agena Bioscience (disponible en: http://www.usc.es/cegen/).

3.3.2 Selección de estudios para la validación de SNPs

Se realizó una búsqueda exhaustiva de estudios publicados en las bases de datos de PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, fecha de consulta: dic/2016), utilizando las palabras clave "*radiotherapy*", "*radiation*", "*toxicity*", "*adverse effects*", "*genetic variation*", "*polymorphism*", "*SNP*", "*NSCLC*", "*lung cancer*", para identificar aquellos que buscaron asociaciones entre SNPs y los efectos adversos a la radioterapia en pacientes con NSCLC.

De los estudios identificados, fueron seleccionados únicamente aquellos que confirmaron los resultados de sus asociaciones en cohortes de validación. Cinco publicaciones cumplieron estos criterios: López-Guerra et al. [222], [226], Pang et al. [221], Pu et al. [213] y Zhao et al. [227] Un total de 39 SNPs tuvieron resultados validados y asociaciones significativas con esofagitis y/o neumonitis. Los SNPs fueron estudiados en genes asociados con proteínas de choque térmico, inflamación y genes de la vía de reparación de rotura de doble cadena del ADN.

3.3.3 Genotipado y controles de calidad

El genotipado se llevó a cabo usando la plataforma de *Agena Bioscience MassARRRAY*® (Agena Bioscience) (***Figura 29***) en el nodo de Santiago de Compostela del Centro Nacional de Genotipado (CeGen; http://www.cegen.org/). La tecnología usada en el sistema *MassARRAY* se basa en un ensayo PCR *multiplex* que incluye una amplificación inicial de las regiones de interés, una desfosforilación de los deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs, por sus siglas en inglés) que no se incorporaron, una segunda amplificación para hibridar los *primers* de extensión y los productos finales se desalan usando una resina de limpieza y se transfiere a una matriz en donde se cristalizan. La detección se realiza mediante la tecnología de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), se dirige un láser a los cristales de la matriz, produciendo una desorción con ionización. Las moléculas cargadas positivamente se aceleran hacia el detector a través de un tubo de vuelo.



Figura 29. Agena Bioscience MassARRAY®.
Con permiso de: Agena Bioscience.

Los *primers* de PCR para el ensayo *multiplex* (iPLEX) fueron diseñados utilizando el *software Assay Design Suite* v2.0 (Agena Bioscience). El diseño consiste en i) identificar la secuencia alrededor de cada uno de los SNPs que se incluirán en el estudio, considerando 100 pares de bases (pb) hacia arriba y 100 pb hacia abajo del SNP, ii) identificar los SNPs secundarios que estén presentes con frecuencia superior a 0,01 en la población *HapMap*-CEU, para evitar diseñar los *primers* sobre ellos, iii) seleccionar las

regiones donde hibridarán los *primers*, para intentar obtener amplicones de entre 80-120 pb, y que los *primers* tengan una longitud de entre 18-24 pb, iv) se diseñan los *primers* de extensión y el *software* se encarga de intentar incluir la mayor cantidad de *primers* de extensión en una misma reacción. Pueden diseñarse los *primers* sobre la hebra *forward* o en la *reverse*, para optimizar el número de reacciones. La longitud de los *primers* de extensión varía de 17 a 30 pb, lo que permite obtener productos de extensión entre los 4500 y 8500 daltons, que es la ventana de lectura de *Agena Bioscience MassARRAY®*. Las secuencias de los *primers* se incluyen en el **ANEXO 6**. Se diseñaron dos paneles, uno incluyendo 24 SNPs y el segundo 14 SNPs.

Los controles de calidad se realizaron incluyendo en cada placa un control negativo que consiste en un pocillo sin muestra, ni *primers*, ni reactivos, completado únicamente con agua libre de ADNasas y ARNasas. Se incluyó en cada placa una réplica técnica con una muestra duplicada y tres controles positivos del Instituto Coriell del Repositorio genético de células humanas (NA10860, NA10861 y NA11984).

El *genotype-calling* se realizó utilizando el *software MassARRAY Typer* v4.0. (Agena Bioscience), (***Figura 30***) el cual utiliza la masa detectada en el equipo de acuerdo con el tiempo de vuelo, y lo traduce en el genotipo del SNP. Para ello, debemos conocer la masa del *primer* de extensión. El incremento de masa de este fragmento depende del nucleótido que se agrega en la posición del SNP, este aumento en la masa nos indica el genotipo del SNP.

Los SNPs con un *call rate* de genotipado por encima de 95% fueron incluidos en el estudio.

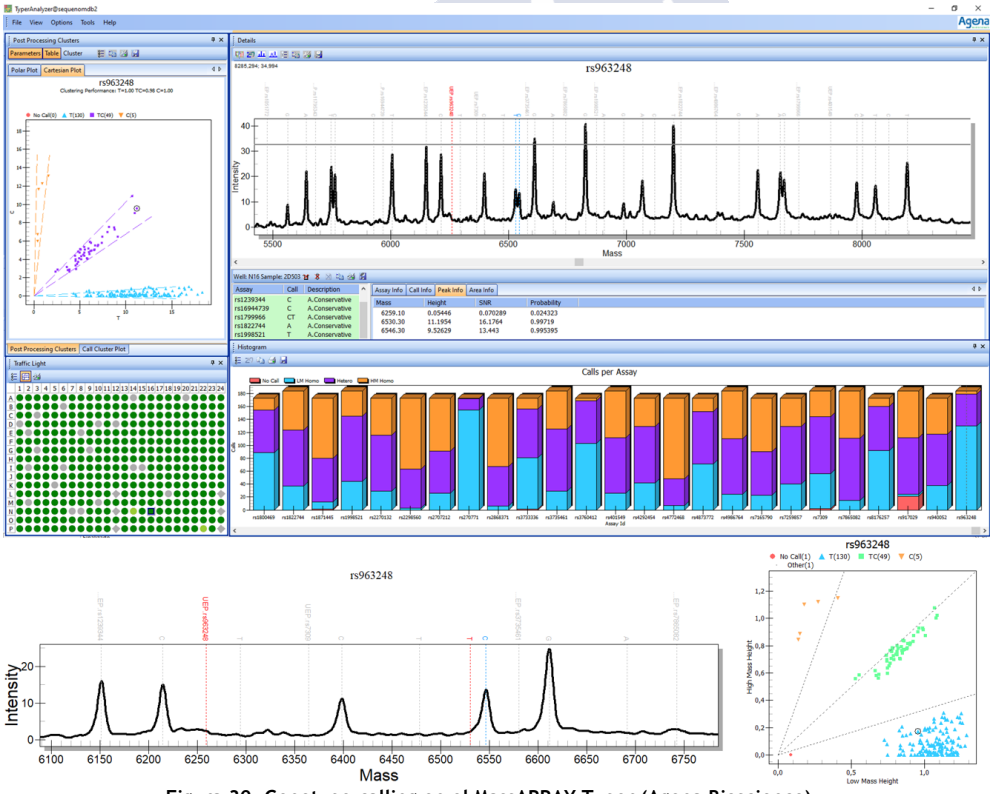


Figura 30. Genotype-calling en el MassARRAY Typer (Agena Bioscience).

3.3.4 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se replicaron de forma estricta los análisis realizados en los estudios de referencia, utilizando la paquetería de R (https://www.r-project.org/). [277]

En los estudios de López-Guerra et al. (2011)[222], (2012)[226] el fenotipo principal se definió como la presencia de toxicidad esofágica inducida por radiación (RIET, por sus siglas en inglés) grado ≥ 3 CTCAE v3.0. La toxicidad fue registrada a partir del inicio de la radioterapia, se consideró el tiempo hasta la presencia de toxicidad, el fallecimiento y en aquellos pacientes que no presentaron toxicidad se censuraron a 15 semanas después del inicio de la radioterapia. Se realizó un análisis de supervivencia usando regresión multivariable de Cox para calcular la razón de riesgo (HR, por sus siglas en inglés), el intervalo de confianza (IC) y evaluar la influencia del genotipo en el riesgo de presentar RIET. Las variables continúas empleadas en el análisis multivariable se dividieron en dos grupos tomando en cuenta la mediana. Se utilizó el análisis de Kaplan-Meier para estimar el riesgo acumulado de probabilidad de desarrollar RIET.

En el estudio de Pang et al. (2013)[221] el fenotipo estudiado fue neumonitis inducida por la radiación grado ≥ 2 y ≥ 3 en la escala CTCAE v3.0. Se usó el análisis de Kaplan-Meier para estimar la probabilidad de neumonitis a lo largo del tiempo. Un modelo de supervivencia paramétrica sin un supuesto de riesgo proporcional se usó para analizar la supervivencia. El análisis log-logístico es útil para aquellos fenotipos que son frecuentes al inicio y con el tiempo son menos frecuentes, ya que estima el factor de aceleración en el tiempo hasta el evento asociado, y toma en cuenta las covariables. El poder discriminatorio del modelo de supervivencia log-logístico multivariable se validó usando la estadística de C de Harrel.

En los estudios de Pu et al. (2015)[213] y Zhao et al. (2016)[227] se estudiaron como fenotipos la esofagitis y neumonitis grado ≥ 2 en la escala CTCAE v3.0. Se utilizó la regresión logística multivariada, donde el efecto de los SNPs individuales sobre el riesgo a desarrollar toxicidad se evaluó en los modelos de herencia aditivo, recesito o dominante de acuerdo con los resultados publicados para cada SNP en el estudio de referencia.

Los resultados obtenidos de esta validación se ajustaron mediante la corrección de Bonferroni.

3.4 GWAS – EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN EN PACIENTES CON CÁNCER NSCLC

En este estudio se incluyeron 227 pacientes de la cohorte de pulmón del estudio RADIOGEN.

3.4.1 Controles de calidad del ADN y genotipado

El ADN genómico extraído y cuantificado de los pacientes de la cohorte de pulmón del estudio RADIOGEN, se normalizó y preparó de acuerdo a las especificaciones del protocolo envío de muestras del nodo Santiago de Compostela del CeGen, para el Servicio genotipado *Affymetrix Axiom™ Array Plates* (disponible en: http://www.usc.es/cegen/).

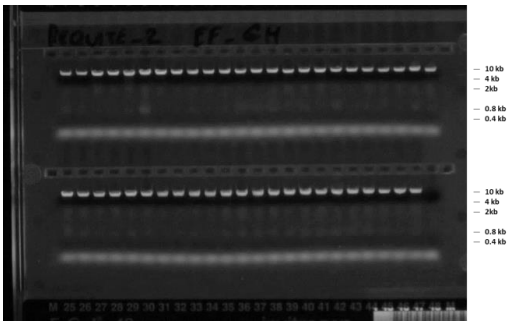


Figura 31. Comprobación de integridad del ADN. E-Gel® de agarosa 1%.

El control de calidad del ADN incluyó una verificación de la concentración de las muestras, usando el método de fluorometría *Qubit™ fluorometer* (Thermo Fisher *Scientific*), en donde se considera aceptable una pureza del ratio de densidad óptica OD_{260}/OD_{280} entre 1,8 y 2,0, y un ratio OD_{260}/OD_{230} por arriba de 1,5. Se realiza una verificación de la integridad del ADN, comprobando en un E-Gel® de agarosa al 1% de 48 pozos (Invitrogen) (***Figura 31***), en donde el tamaño de ~90% del ADN debe ser superior a 10 Kb, para considerarlo como ADN no degradado.

El genotipado se realizó utilizando el panel prediseñado para análisis de genoma completo *Axiom Genome-Wide CEU 1 array* (Thermo Fisher *Scientific*), el cual permite maximizar la cobertura de variantes raras (MAF > 1%) para poblaciones europeas, incluyendo SNPs comunes y raros e *indels* del proyecto HapMap, el proyecto 1000 genomas y de estudios de asociaciones con enfermedades que hayan sido publicadas. Con este *array* es posible genotipar 587.352 SNPs. En forma general, los pasos del genotipado incluyen, amplificación del ADN genómico, fragmentación de entre 25-125 pb comprobada en un E-Gel® de agarosa al 1% (Invitrogen), purificación y resuspención del ADN fragmentado en el cóctel de hibridación del ADN y transferidos al equipo *GeneTitan™ Multi-Channel (MC) Instrument* (Thermo Fisher *Scientific*) (***Figura 32***), en donde se procesa de forma automática, realizando hibridación, tinción, lavado y escaneado.

El *genotype-calling* se realizó utilizando el algoritmo Axiom GT1 del *software* Affymetrix *Genotyping Console™* (GTC v4.1.2, Thermo Fisher *Scientific*) que interpreta las imágenes escaneadas en genotipos.



Figura 32. GeneTitan™ Multi-Chanel (MC) Instrument. Con permiso de: ThermoFisher.

Se verifican los valores de *DishQC* (DQC) que es una medida generada a partir del *software* de Affymetrix *Genotyping Console™*, se basa en una verificación de la señal en una colección de posiciones no polimórficas del genoma, del cual se conoce la presencia o ausencia de señal. El umbral predeterminado debe ser mayor o igual a 0,82 para cada muestra.

3.4.2 Control de calidad GWAS

Los *softwares* utilizados en el control de calidad son PLINK v1.9 (https://www.cog-genomics.org/plink/1.9) [278] y el lenguaje de programación R. [275]

El control de calidad es un paso crucial en GWAS para poder generar resultados confiables y consiste en una serie de pasos [230] descritos a continuación: (***Figura 33***)

El primer paso en el control de calidad consiste en excluir los SNPs que tengan gran proporción de sujetos con datos faltantes para cada SNP individualmente (--geno), el parámetro utilizado en nuestros estudios fue del 1%, por lo que todos aquellos SNPs con *call rate* > 99% se incluyeron en el análisis.

El segundo paso consiste en excluir a los individuos que tienen alta proporción de genotipos faltantes (--mind), el parámetro utilizado en nuestros estudios fue de 0,025; con lo que se incluyó todo aquel paciente que tuviera más del 97,5% de los SNPs genotipados.

El siguiente paso es comprobar discrepancias sexuales con base en las tasas de heterocigosidad/homocigosidad del cromosoma X (--check-sex). Para el sexo masculino se consideró una estimación de homocigosidad del cromosoma X > 0,8 y para el sexo femenino un valor de X < 0,2. Estos datos deben comprobarse cuidadosamente para poder identificar contaminación entre muestras, o errores en el etiquetado de las muestras.

Después continuamos con la selección de los cromosomas autosómicos, filtrando los marcadores localizados en los cromosomas sexuales.

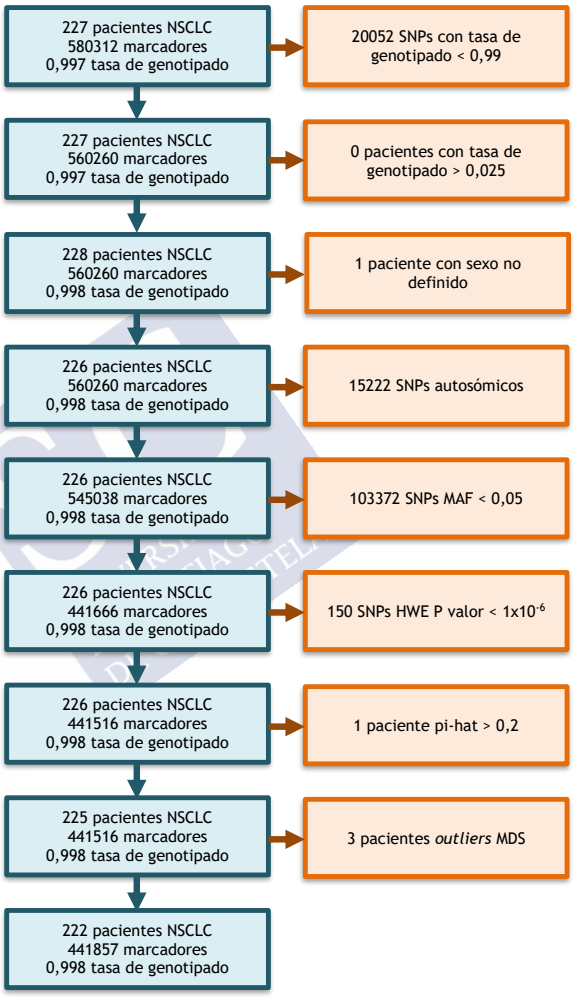


Figura 33. Diagrama de flujo del control de calidad del genotipo en la cohorte RADIOGEN-pulmón.

A continuación, se filtran los datos de acuerdo con el MAF, en donde se incluyen sólo aquellos SNPs por encima del umbral de MAF establecido (--maf). Debido a que el tamaño muestral de nuestro estudio es pequeño, se consideraron aquellos SNPs con MAF ≥ 0,05.

Se excluyen aquellos SNPs que se desvían del HWE (--hwe), incluyendo aquellos con errores en el genotipado o los que puedan indicar selección evolutiva. El umbral utilizado en nuestros análisis fue un P valor de HWE < 1×10^{-06}.

Se continúa con la exclusión de individuos con tasas de heterocigosidad tanto altas como bajas. Por lo que se excluyen aquellos individuos que se desvían ± 3 desviaciones estándar (DE) de la media de la tasa de heterocigosidad de la cohorte completa.

El grado de parentesco se considera dentro de los controles de calidad, para lo cual se calcula la identidad por descendencia (IBD, por sus siglas en inglés) de todas las muestras en pares (--genome), este análisis se realiza en SNPs independientes (*prunning*) y se limita a cromosomas autosómicos. Se establece el umbral y se crea una lista de individuos con relación familiar por encima del umbral elegido (--min). En nuestro estudio el umbral de pi-hat fue de 0,2.

Finalmente es necesario probar y controlar la presencia de estratificación de la población. En nuestro estudio utilizamos el enfoque de escalamiento multidimensional (MDS, por sus siglas en inglés). El método incorporado en PLINK calcula la proporción promedio compartida de alelos de todo el genoma entre cada par de individuos y generar índices cuantitativos (componentes) de la variación genética para cada individuo, los cuales se comparan con los puntajes de una población de estructura étnica conocida, lo que nos permitirá conocer aquellos individuos que se separan de la población objetivo de nuestra cohorte. En nuestro GWAS utilizamos como referencia los datos de HapMap v3. Y se eliminaron aquellos individuos con valores atípicos ± 3 desviaciones estándar (DE) en el análisis de componentes principales.

3.4.3 Imputación

Los métodos de genotipado actuales están basados en una captura de SNPs independientes que dependen del desequilibrio de ligamiento y la imputación para interpolar las posiciones faltantes, para ir de unos cientos de miles de SNPs a millones.

Los datos genéticos se imputaron con el servidor de imputación de Michigan, que proporciona un servicio gratuito que utiliza Minimac3. [270] El primer paso es asegurarnos que nuestros alelos de referencia y alternativo son los mismos que el panel de referencia que vamos a usar para la imputación (en nuestro caso el panel HRC versión r1.1 2016). Para ello usamos un *script* de Perl que nos permite hacer el chequeo con los archivos de frecuencia para cada cromosoma y el archivo de información proporcionado en el sitio *web* del panel de referencia HRC. Una vez comprobado que los alelos están alineados correctamente convertimos los archivos binarios plink a *variant calling format* (vcf) y fueron cargados en el Servidor de Imputación de Michigan. Como hemos comentado anteriormente, seleccionamos el panel HRC como referencia y el método de *phasing* el Eagle v2.4.1. La utilización de servidores de imputación cómo Michigan permite llevar a cabo una tarea computacional intensiva sin tener los recursos necesarios o sin utilizar ordenadores personales.

3.4.4 Controles de calidad de la imputación

Usando Minimac, obtenemos tres datos estadísticos que evalúan la calidad de la imputación. Minimac oculta los datos de cada SNP genotipado y calcula el -looRSQ, que es la R2 estimada para cada SNP, como si el SNP no hubiera sido anotado, también nos reporta el -empR que es una correlación empírica entre los genotipos verdaderos y los imputados para el SNP, y por último nos proporciona el -empRSQ, que es el valor real de R2, que compara genotipos imputados y verdaderos.

Todos estos datos se encuentran en el archivo .info.gz. El umbral de control de calidad tomando en cuenta el R^2 en nuestro estudio fue de 0,30; de acuerdo con la descripción de la

herramienta MaCH. [272] Además de filtrar por calidad de imputación también realizamos un filtrado por MAF, reteniendo sólo aquellos SNPs con una MAF > 0,05. Estos pasos se llevaron a cabo con el *software* bcftools v1.9, que permite la manipulación y filtrado de archivos vcf.

3.4.5 Definición de fenotipos

Los fenotipos estudiados fueron las manifestaciones clínicas de los efectos adversos a la radiación en pacientes con cáncer de pulmón NSCLC, entre las que se incluyó: hemorragia broncopulmonar, estenosis bronquial, dolor en la pared del pecho, tos, disfagia, disnea, estenosis esofágica, esofagitis, infarto al miocardio, neumonitis, fibrosis pulmonar y radiodermatitis.

Se dividieron los fenotipos en dos grandes grupos dependiendo del momento en el que se presenta la toxicidad. Se consideró toxicidad aguda cuando ocurre en los primeros tres meses después del inicio de la radioterapia; y tardía, cuando se desarrolla entre los 12 y los 24 meses después del inicio de la radioterapia.

Los efectos adversos están clasificados de acuerdo con la escala del CTCAE v4.0 que divide la gravedad en seis categorías que van del 0 al 5. Para los análisis hemos seguido el criterio utilizado por el RGC, y hemos dicotomizado la toxicidad. Así, consideramos pacientes sin toxicidad o con toxicidad leve los que presentaron grados CTCAE 0 y 1; y pacientes con toxicidad de moderada a grave, aquellos que presentaron grados CTCAE ≥ 2.

Se incluyeron también las toxicidades globales, calculadas como la toxicidad promedio total estandarizada (STAT, por sus siglas en inglés), en su presentación aguda y tardía.

3.4.6 STAT score

El cálculo del STAT, requiere en primer lugar, seleccionar el grado más alto de toxicidad para cada efecto adverso de cada paciente en el periodo de estudio. Posteriormente se normalizan los valores absolutos, transformando el grado máximo de toxicidad en Z-Scores. De esta forma se obtiene un valor que representa el número de desviaciones estándar en que se encuentra el máximo valor de toxicidad del paciente con respecto a la media de los grados máximos de toxicidad de la población estudiada. La fórmula es:

$$ZScore = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

En donde:

x = máximo grado de toxicidad,
μ = media del máximo grado de toxicidad en toda la cohorte,
σ = desviación estándar del máximo grado de toxicidad en toda la cohorte.

Una vez determinado el ZScore de cada una de las toxicidades para cada individuo, se calcula el STAT, que es el promedio de los ZScore de las toxicidades disponibles por paciente.

3.4.7 Selección de covariables

Las variables que influyen en cada una de las manifestaciones clínicas se seleccionaron mediante regresión logística univariable. Para ello se consideraron las 70 variables estudiadas dentro de la cohorte de pulmón del estudio RADIOGEN, entre las que se encuentran las comorbilidades del paciente, el uso de algunos medicamentos, los resultados de las pruebas de función respiratoria, datos clínicos del tumor, información de anatomía patológica del tumor, el estadio de la enfermedad así como datos dosimétricos. En el caso de la toxicidad global,

además de las seleccionadas por regresión logística univariable, se incluyeron variables de relevancia clínica descritas para la toxicidad a la radioterapia en pacientes NSCLC.

El análisis univariable se realizó de forma independiente para la toxicidad aguda (tres meses) y para la toxicidad tardía (12-24 meses). Se consideró, para cada una de las covariables, el máximo grado CTCAE en el periodo evaluado. Además, para comprobar si las asociaciones encontradas se mantenían en el tiempo, se exploraron varios intervalos adicionales de tiempo de seguimiento: periodos de 3-6, 3-12, 3-24, 6-12 y 6-24. Consideramos covariables asociadas aquellas que tuvieron un P valor por debajo de 0,05 que se mantuvo constante a través de diferentes seguimientos. En el caso de la toxicidad global evaluada mediante el STAT, se incluyó como covariable la evaluación global de los síntomas previos a la radioterapia mediante el cálculo del $STAT_{baseline}$.

3.4.8 Análisis GWAS

El análisis GWAS comienza creando los archivos .ped de cada uno de los fenotipos estudiados. Se incluyeron los códigos de identificación de los pacientes, el sexo, el valor asignado de acuerdo a la definición de cada fenotipo así como las covariables asociadas a éste, la información del *pedigree* se completa con códigos cero.

El análisis se realizó utilizando el *pipeline* EPACTS v3.3.0 (*Efficient and Parallelizable Association Container Toolbox*, http://genome.sph.umich.edu/wiki/EPACTS), una herramienta bioinformática que permite realizar varias pruebas estadísticas para identificar asociaciones de todo el genoma. Cargamos en el *software* el archivo con los genotipados de nuestros pacientes en formato .vcf y el archivo .ped generado de cada uno de los fenotipos. Indicamos la columna que corresponde al fenotipo y las columnas que corresponden a las covariables; indicamos además, el límite impuesto para las variantes que se incluirán en el análisis dependiendo de su MAF y finalmente el tipo de análisis que se realizará. Para el análisis de las toxicidades de forma individual, en donde el fenotipo era de tipo binario, dividido como no toxicidad (CTCAE < 2) y con toxicidad (CTCAE ≥ 2), utilizamos la prueba de variante única *b.wald*, que emplea la prueba logística Wald (implementada por Hyun Min Kang, usando el comando *glm* en R). Y cuando analizamos los puntajes STAT que el fenotipo es de tipo cuantitativo, utilizamos la prueba de variante única *q.lm*, que emplea una prueba lineal de Wald (implementada por Hyun Min Kang, usando el comando *lm* en R). Los resultados del análisis se comprimen en un archivo .gz, que incluye los datos del cromosoma; inicio y final de la posición genómica del SNP; la identificación del marcador, que incluye el cromosoma, la posición genómica, el alelo de referencia y el alelo alternativo, seguido del número rs del SNP de acuerdo a la base de datos *dbSNP rs number*; el número total de pacientes incluidos en el análisis; el conteo alélico; el MAF; seguido de los resultados estadísticos: P valor, *Beta*, error estándar del *Beta*, ZSTAT y el número total y frecuencia alélica de los casos y controles.

Se reportaron aquellos SNPs con P valor $\leq 10^{-05}$, sin embargo, para estudios GWAS se ha establecido que una asociación es estadísticamente significativa siempre y cuanto tenga un P valor menor que 5×10^{-08}.

La representación visual de los resultados obtenidos en los distintos GWAS se presentan mediante los siguientes diagramas:

Manhattan *plot*. Es la representación gráfica de los P valores obtenidos del GWAS, llamada así por asemejarse a un tramado de rascacielos de Manhattan, NY. En el eje de las abscisas se representa las coordenadas genómicas en donde está localizado cada uno de los SNPs, separados por cromosomas; mientras que en el eje de las ordenadas se representa el logaritmo negativo del P valor de asociación de cada uno de los SNPs. En esta gráfica cada uno de los puntos representa a un SNP y entre más significativo sea el P valor asociado, más arriba se

ubicará en punto en el eje de las ordenadas, los cromosomas se identifican con cambios de color.

Para realizar los Manhattan *plot* hemos utilizado el lenguaje de programación R [275] y varios paquetes, entre ellos *ggrepel*, [279] *ggplot2*, [280] *dplyr*, [281] *RColorBrewer*, [282] *CMplot*, [283] entre otros. También hemos realizado la variante del Manhattan plot circular, que une los extremos del eje de las abscisas de tal forma que el eje se localiza en la circunferencia y el eje de las ordenadas se localizan en dirección al centro del círculo. La interpretación es similar, entre más significativo sea el P valor asociado a un SNP, más hacia el centro del círculo se graficará el punto.

Q-Q *plot* o gráficas cuantil-cuantil. Es una representación gráfica de la distribución de la probabilidad comparando los P valores esperados contra los observados. Se trata de una comparación entre dos cuantiles que se usa para saber si los conjuntos de probabilidades provienen de la misma distribución, los cuantiles son valores que dividen una distribución de probabilidad en intervalos iguales. [284] Se incluye un ángulo de 45 grados en el gráfico; de tal forma que si los dos conjuntos de datos provienen de la misma distribución, los puntos se mantendrán en esta línea de referencia. Se trata de una simple verificación visual, por lo que es una valoración subjetiva. El factor de inflación genómica *lambda* se define como la relación entre la mediana de la distribución empíricamente observada y la mediana esperada, con lo que se puede cuantificar el grado de inflación y el exceso de una tasa de falsos positivos. Unos valores elevados de inflación o la presencia de desviaciones residuales en la gráfica puede apuntar a duplicaciones de muestras no detectadas, relaciones familiares desconocidas, una prueba estadística mal calibrada, algún sesgo técnico o bien por una estratificación poblacional bruta.

En nuestro estudio los Q-Q *plot* y el cálculo del factor de inflación *lambda* se realizó con el lenguaje de programación R, el paquete qqMan [285] y basándonos en las funciones y fórmulas del repositorio GitHub. [286,287]

PCA (Análisis de Componentes Principales, por sus siglas en inglés) es un método estadístico que permite dimensionar de forma espacial la complejidad de los datos incluidos en el análisis. Pertenece a los métodos de *supervised learning* en donde se pretende simplificar los datos para predecir una respuesta con base en una serie de predictores y usando estos predictores se pueden identificar subgrupos. El fundamento del PCA es transformar un vector de covariables en ejes ortogonales conocidos como componentes principales, los cuales se ordenan en forma descendente de acuerdo con su contribución a la variación total. [288]

En el caso de los GWAS, se ha reportado que una dispersión amplia o un exceso de varianza del primer componente principal en un panel de marcadores del genoma permite detectar subestructuras en una población. Es por ello que los PCAs se utilizan de rutina para corregir la subestructuración poblacional, ya sea en el momento del control de calidad de los genotipos, o para realizar un control genómico después de obtener los primeros resultados del GWAS, en caso de ser necesario.

Para realizar el PCA hemos usado PLINK v1.9 calculando los valores de IBS (identidad por estado, por sus síglas en inglés) usando los comandos *–cluster* y *-genome*, para identificar los segmentos de secuencias de nucleótidos idénticas en el genotipado de nuestra cohorte que representen los segmentos heredados de un ancestro común. La visualización de los resultados obtenidos del análisis PCA lo hemos graficado usando el lenguaje de programación R, con el paquete ggplot2. [280]

3.4.9 Comparación de resultados GWAS

3.4.9.1 Comparación de resultados GWAS entre los diferentes fenotipos estudiados en los pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN

Una vez que obtuvimos las variantes asociadas a cada uno de los fenotipos, usamos la herramienta Haploreg v4.1 [289] para explorar si existían entre ellas, variantes en común o si estas compartían bloques de haplotipos. Este *software* utiliza la información de desequilibrio de ligamiento de los datos del proyecto 1000 genomas. [290] Complementamos este análisis utilizando la herramienta Haploview v4.2 para comprobar si existían *loci* compartidos, analizando los haplotipos con el método de Gabriel et al (2002) [291] y visualizamos los datos con Haploview. [292]

3.4.9.2 Comparación entre los resultados GWAS en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN y resultados previos en RGC

Identificamos los genes en los que se encuentran o con los que se asocian los SNPs descritos en nuestros estudios, utilizando la opción de conversión de identificadores de la herramienta bioDBnet (la red de bases de datos biológicas, por sus siglas en inglés). [293] Estos genes y los reportados hasta ahora en los resultados de los estudios radiogenómicos se incluyeron en un análisis de enriquecimientos de ontología de genes (GO, por sus siglas en inglés) usando el *software* libre Metascape [294], utilizamos los términos de enriquecimiento basándonos en GO, KEGG y vías canónicas; los resultados se graficaron usando una superposición de genes.

Analizamos la sobrerrepresentación de los procesos biológicos en los que intervienen los términos GO usando el software PANTHER. [295,296] El análisis consiste en determinar si el número de genes identificados en nuestros estudios representan de forma suficiente o insuficiente a los genes de una GO en particular. En el análisis de sobrerrepresentación de términos GO, se consideraron significativos aquellos con P valor < 0,05 ajustado por tasa de falsos descubrimientos (FDR).

Utilizamos, además, la herramienta bioinformática Reactome [297,298] para el análisis de rutas de genes [299] la cual permite la visualización, interpretación y análisis de los genes mediante un algoritmo de modelado que se obtiene de una referencia cruzada a más de 100 diferentes recursos bioinformáticos, incluidos NCBI Gene, Ensembl y UniPRot, el navegador de genomas UCSC, base de datos de moléculas pequeñas de ChEBI y la base de datos de literatura PubMed. Los resultados del análisis de rutas de genes se incluyen en la prueba estadística de sobrerrepresentación de las moléculas estudiadas para cada una de las rutas de genes y se consideraron significativas aquellas con P valor < 0,05 ajustado por tasa de falsos descubrimientos (FDR).

3.5 RIESGO POLIGÉNICO DE SUSCEPTIBILIDAD A CÁNCER DE PULMÓN ASOCIADO CON LOS EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN

3.5.1 Selección de estudios y selección de SNPs

Se realizó una búsqueda de artículos publicados en la base de datos de PubMed que estudiaron variantes genéticas asociadas al riesgo de presentar cáncer de pulmón, mediante GWAS, la búsqueda incluyó las palabras claves "*risk of lung cancer/lung cancer risk*/*lung cancer susceptibility*", "*GWAS/Genome-wide association study*", con lo que identificamos un total de 19 estudios. Se extrajo la información publicada de los SNPs identificados como asociados con el riesgo de cáncer de pulmón y se descartó la información duplicada, 65 SNPs únicos fueron analizados utilizando la herramienta HaploReg (v4.1) [289] para identificar SNPs que estuvieran en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento, el punto de corte fue una $R^2 < 0,4$. Un total de 25 SNPs fueron seleccionados. (***ANEXO 7***)

3.5.2 Selección de pacientes y extracción de la información de los SNPs

Se incluyeron los pacientes de la cohorte de pulmón del estudio RADIOGEN que contaban con la información recabada de los efectos adversos a la radiación, con seguimientos hasta los 12 meses posteriores al inicio de la radioterapia, un total de 177 pacientes. Y los genotipos de los 25 SNPs seleccionados se extrajeron del genotipado *Axiom Genome-Wide CEU 1 array* (Thermo Fisher *Scientific*).

3.5.3 Definición de fenotipo y selección de covariables

Para este estudio el fenotipo se definió, dividiendo el grado de toxicidad en dos grupos, Así, consideramos pacientes sin toxicidad o con toxicidad leve los que presentaron grados CTCAE 0 y 1; y pacientes con toxicidad de moderada a grave, aquellos que presentaron grados CTCAE ≥ 2. Además, se incluyó la toxicidad global, calculada con el puntaje STAT.

La selección de las covariables se realizó tomando en cuenta aquellas características que resultaron asociadas ($P \leq 0,05$) en el análisis de regresión lineal univariable con la toxicidad global evaluada mediante el $STAT_{tardío}$.

3.5.4 Análisis estadístico

3.5.4.1 Puntuaciones de riesgo poligénico no ponderado

Los genotipos de cada SNP se transforman en valores, dependiendo de la cantidad de alelos de riesgo que presente cada paciente. Así, los pacientes que no tiene ningún alelo de riesgo tiene puntuación cero, los pacientes con genotipo heterocigoto tienen puntuación de uno y los pacientes con genotipo homocigoto mutado tienen puntuación dos. Es importante que todos los alelos correspondan al riesgo, de tal manera que, si el SNP está asociado a la disminución del riesgo, el alelo que se toma en cuenta será el de mayor frecuencia. La puntuación de riesgo poligénico (PRS) se calcula sumando el número de alelos de riesgo presentes en los SNPs analizados en cada paciente.

3.5.4.2 Puntuaciones de riesgo poligénico ponderado

El PRS ponderado le asigna un peso distinto al alelo de riesgo de los SNP, el valor atribuido al genotipo del alelo de riesgo dependerá del *odds ratio* (OR) descrito para ese SNP. Es necesario tomar en cuenta la dirección del riesgo, en caso de que el SNP se haya reportado asociado con disminución del riesgo, además de considerar el alelo contrario como el alelo de

riesgo al momento de calcular la puntuación, el OR debe transformarse calculando el $OR_{inverso}$, utilizando la siguiente fórmula:

$$OR_{inverso} = \frac{1}{OR}$$

EL PRS ponderado se calcula sumando el número de alelos de riesgo, multiplicado por el logaritmo del OR, de cada uno de los SNPs estudiados.

$$PRS_{ponderado} = \sum_{i=1}^{l} \log(OR_i) G_i$$

En donde $i = \{1,\ldots, l\}$ para l número de SNPs.

G es el genotipo expresado en 0, 1 o 2 dependiendo de la frecuencia de alelos de riesgo para cada i SNP.

El $\log(OR_i)$ se calcula tomando en cuenta el OR del i SNP con el que fue publicado, pero siempre tomando en cuenta que se refiere a la dirección del aumento de riesgo, por lo que si el SNP está asociado con disminución del riesgo se debe transformar con la fórmula anterior para calular el $OR_{inverso}$.

3.5.4.3 Análisis estadístico

Tenemos dos clases distintas de fenotipos a estudiar, por un lado, el STAT que son datos continuos y, por otro lado, los efectos adversos evaluados de forma individual, que se clasificaron para este estudio en dos categorías (< 2 y ≥ 2 en la escala CTCAE v4.0). Los análisis estadísticos realizados incluyen análisis univariable y multivariable.

Se realizó un modelo de regresión linear univariable para el STAT y un modelo de regresión logística para las toxicidades individuales para analizar los PRS (tanto el ponderado como el no ponderado) y para cada uno de los SNPs en forma individual.

El análisis multivariable toma en cuenta los factores clínicos asociados significativamente con el STAT como covariables de ajuste (género, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, volumen de espiración forzada en 1 minuto, porcentaje de volumen del esófago que recibe más de 60 Gy, dosis media de esófago, dosis media de pulmón, y porcentaje de volumen del pulmón que recibe más de 20 Gy) y usa los residuos del análisis univariable (lineal para STAT y logística para toxicidades individuales) para realizar la regresión logística multivariable. Los resultados obtenidos se ajustaron mediante la corrección de Bonferroni.

3.6 SNAPSHOT-PCR PARA ANÁLISIS DE VARIANTES *TANC1*

La técnica de SNaPshot™ es un método sensible que utiliza las tecnologías PCR, minisecuenciación y electroforesis capilar, el cual permite detectar hasta diez SNPs en un mismo ensayo múltiplex, independientemente de la posición en la que se encuentren cada uno de los SNPs.

3.6.1 Diseño

Las consideraciones generales del diseño de los *primers* para el SNaPshot incluyen: i) el tamaño de los amplicones debe tener un rango de 60-150 pb, ii) los *primers* deben estar diseñados de forma que todos tengan una temperatura de *melting* muy aproximada, iii) los *primers* deben ser específicos de la región de interés, iv) no deben existir interacciones entre los *primers* o formación de horquillas, v) los *primers* de extensión que se usen para la detección deben tener diferentes tamaños para poder diferenciar los alelos durante la electroforesis capilar.

El diseño de *primers* y sondas se realizó con el *software* Primer 3. [300–302] Las condiciones de diseño incluyeron: i) longitud de 20 a 28 pb con una longitud optima de 22, ii) temperatura *melting* de 68 a 73ºC con una temperatura optima de 71ºC, iii) se indicó la región de interés, en la que se incluye el SNP con un margen de 30 pares de bases hacia ambos lados, iv) se considera una proporción G/C ~ 65%, y por último, v) se selecciona la biblioteca de corrección de errores: *Human + simple*.

Una vez seleccionados los *primers forward y reverse*, se diseñan los *primers* de extensión que se localizan inmediatamente antes de la posición de cada uno de los SNPs. Estos *primers* pueden diseñarse en la hebra *forward* o en la *reverse*, dependiendo de las necesidades del diseño.

Se corroboró que los *primers* amplificaran la zona deseada haciendo el análisis mediante la herramienta UCSC *In-Silico* PCR (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr). Verificamos que no hubiera presencia de interacciones entre *primers*, ni que se formaran horquillas usando las secuencias en el software *Auto Dimer Check*. [303] Finalmente se diseñaron 6 *primers* forward, 6 *primers* reverse y 7 *primers* de extensión. (***Tabla 16 y 17***)

Tabla 16. *Primers* diseñados para SNaPshot-PCR de *TANC1*

	Primers	Secuencia
1F	rs10497203F	ACCGCACCTGCCTAGGGTGA
1R	rs10497203R	**CCCCAGCCAGCCACCTTCAA**
2F	rs7582141/rs6432512 F	TCCTGAGGGGTGAGGCAGGA
2R	rs7582141/rs6432512 R	TCCAAAATTCTAAAATGGGCACAAGTCA
3F	rs264663F	CCAGAGGAGAGCGCAGTGATGC
3R	rs264663R	GGGGGAGAACCCTGGGAGGT
4F	rs264651F	TTCTTTCCATGACTTCCTATTCCCAAA
4R	rs264651R	GGGGACAAGGGCCCTCCATA
5F	rs264588F	CCCACCCCCAAGTGCATGTC
5R	rs264588R	GCCCAGATGCCCTGGGACTT
6F	rs264631F	GGCCATCCCACAGCCATTTG
6R	rs264631R	GGATGCCCTCTGACCCGACA

Tabla 17. Primers de extensión diseñados para SNaPshot-PCR de *TANC1*

	Primer extensión	Secuencia
S1	**rs10497203 (T/G) ***	**CAGTCAGTCAGTAACCTCAAAACAGGCTTAAATACACC**
S2	**rs7582141 (C/A)**	**CAGTCAGTCACCACTATCTCAGGTTTT**
S2a	**rs6432512 (G/A)**	**GGATTCCCTATGAGCAC**
S3	**rs264663 (C/T) ***	**CAGTAGCTTTATACAATTTATTCACAAGAAATGAGGCAGTTTTC**
S4	**rs264651 (C/T)**	**GGGAAAGGCTGAAGC**
S5	**rs264588 (A/C)**	**CAGTTGAAAATATCCTTTTGCC**
S6	**rs264631 (C/G)**	**CAGTCAGTCAGTAAGAGACAGATCAGAACTTG**

* Purificación por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia)

3.6.2 Condiciones de SNaPshot-PCR para análisis de SNPs de *TANC1*

El primer paso consiste en la amplificación de los fragmentos en los que se encuentran los SNPs de interés, para ello es necesario preparar la mezcla de *primers* a una concentración de 0,2 µM. La *Master Mix* se prepara siguiendo las indicaciones del Kit (*5Prime, Master Mix*). Debido a la diferencia de tamaños de los fragmentos es necesario amplificar los fragmentos usando una Touchdown-PCR {68 – 65 – 61ºC}, que permite aumentar la especificidad de las reacciones. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador *Veriti*™ (Applied Biosystems), con un ciclo inicial de activación de 15 minutos a 95ºC, seguido de una desnaturalización de 30 segundos a 94ºC, el alineamiento de primers de 90 segundos, en donde los primeros 3 ciclos se realiza a 68ºC, otros tres ciclos de 65ºC y 30 ciclos más de 61ºC, seguido de una extensión a 72ºC por 90 segundos y una extensión final de 10 minutos a 72ºC y un mantenimiento de 4ºC.

La amplificación se verificó en un E-Gel® de agarosa al 2% (Invitrogen), antes de continuar.

Se realizó una limpieza enzimática del ADN amplificado usando ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific), este reactivo hidroliza el exceso de *primers* y nucleótidos en un solo paso, lo cual ayuda a conservar los productos de PCR con una recuperación de hasta el 100%. La reacción se realizó agregando dos partes de producto amplificado y una parte de Exo-SAP-IT en el termociclador *Veriti*™ (Applied Biosystems), con una primera incubación a 37ºC por 60 minutos, seguido de una incubación a 80ºC por 15 minutos y un mantenimiento a 4ºC.

El SNaPshot PCR se realiza agregando la mezcla de *primers* de extensión y el producto amplificado a la *Master Mix* SNaPshot (*ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit*). La enzima utilizada es la AmpliTaq® FS, que se caracteriza por carecer de actividad exonucleasa 3'-5', además de ser termoestable, la *Master Mix* tiene incorporados dideoxinucleótidos (ddNTPs) en lugar de dNTPs, los cuales carecen de un grupo 3' en el grupo hidróxilo de la desoxirribosa, por lo que una vez que la polimerasa incorpora el ddNTP se termina la reacción. Cada ddNTP está marcado con un fluoróforo distinto, por lo que la detección del alelo en el electroferograma depende del pico, el color y la posición; la adenina está marcada con d6G (verde), la citosina está marcada con dTAMRA™ (negro), guanina marcada con dR110 (azul) y timina marcada con dROX™ (rojo). Es necesario añadir en la placa los controles positivos y negativos de acuerdo con las especificaciones del *kit*. Las condiciones usadas en el termociclador *Veriti*™ (Applied Biosystems) son 25 ciclos con una desnaturalización de 96ºC por 10 segundos, un alineamiento a 50ºC por 5 segundos y una extensión a 60ºC por 30 segundos por cada ciclo, seguidos de un mantenimiento a 4ºC.

El protocolo continúa con el tratamiento post-extensión que consiste en la purificación con 0,25 unidades de SAP (Amersham Biosciences) para remover el grupo fosforilo de los ddNTPs, lo cual se realiza en el termociclador *Veriti*™ (Applied Biosystems), con una primera

incubación a 37ºC por 60 minutos, seguido de una incubación a 80ºC por 15 minutos y un mantenimiento a 4ºC.

La preparación de la muestra para la electroforesis capilar en el ABI-PRISM 3730xl, consiste en agregar el marcador interno de peso molecular GeneScan™ -120 LIZ® *Size Standard* (Thermo Fisher Scientific) y la formamida Hi-Di® (Thermo Fisher Scientific) al producto de minisecuenciación, desnaturalizarlos a 95ºC por 5 minutos y analizados cuanto antes en el ABI-PRISM 3730xl, inyectados electrocinéticamente por 10 segundos a 15 kV y 9 mA, corriendo a 60ºC en el capilar de 36 cm. Los resultados de la detección del secuenciador se analizaron con el *software* GeneMapper™ v4.0 (Applied Biosystems) para obtener el genotipado de los siete SNPs incluidos en el ensayo.

3.6.3 Validación

La validación se realizó verificando el genotipado del SNP rs24663 mediante la secuenciación del fragmento que contiene el SNP. Se usó el protocolo Tochdown-PCR (68 - 65 - 61ºC) descrito anteriormente, incluyendo únicamente los *primers* 3F y 3R, para amplificar el fragmento de nuestro interés. El siguiente paso fue una purificación con ExoSAP-IT, en las condiciones descritas en el apartado anterior. El ciclo de secuenciación se realizó utilizando el kit *BigDye™ Terminator v3.1* (Thermo Fisher Scientific) con los *primers* 3F y 3R, seguido de una purificación realizada en las placas de 96 pozos PERFORMA® DTR V3 (EdgeBio), las cuales tienen una columna de 400 µl de un gel de filtración que permite remover los restos del BigDye™, los dNTPs, sales y otros materiales de bajo peso molecular de las reacciones de secuenciación como son *primers* de ADN y cualquier otro fragmento de ~15 pares de bases. Una vez purificados se secuenciaron los fragmentos en el ABI-PRISM 3730xl *DNA Analyzer* (Thermo Fisher Scientific).

3.6.4 Análisis estadístico

Se estimó la incidencia acumulada de presentar alguna de las toxicidades empleando el método de supervivencia de Kaplan-Meier censurado a 12 meses de seguimiento de los pacientes. Se compararon las curvas de Kaplan-Meier para cada uno de los SNPs de *TANC1* en asociación con la toxicidad evaluada.

El momento del evento se definió como la fecha en la que el paciente presenta una toxicidad grado ≥ 2 de la escala CTCAE v4.0. Los datos fueron censurados dependiendo de la fecha de fin de seguimiento. El fin de seguimiento pudo originarse por distintos motivos entre los que se encuentran: desplazamiento del paciente fuera de la jurisdicción del servicio médico, decisión del paciente de abandonar el estudio, fallecimiento del paciente.

La comparación entre las curvas de Kaplan-Meier se analizó utilizando la prueba de Chi cuadrada, en donde se compara las distribuciones de la presencia de toxicidades dependiendo del genotipo de cada SNP a través del tiempo.

3.7 GENÓMICA FUNCIONAL DE *TANC1*

3.7.1 Generalidades de cultivos celulares

Esta descripción de las generalidades aplica para una gran variedad de líneas celulares, sin embargo, aquí se describen los métodos utilizados en la línea celular C2C12 (ATCC® CRL-1772™).

3.7.1.1 Descongelación celular

La descongelación celular debe realizarse lo más rápido posible, llevando el vial del sitio de almacenamiento, ya sea el ultracongelador (–80ºC) o el tanque de nitrógeno líquido (por debajo de –130°C) al baño María a 37ºC. El sembrado también debe realizarse a la mayor brevedad posible. Para lo cual es necesario preparar con anterioridad: i) la campana de cultivo, que debe estar limpia e irradiada durante 15 minutos con luz ultravioleta (UV), ii) el medio de cultivo, que debe estar atemperado a 37ºC en el baño María, iii) la placa o frasco de cultivo y iv) los consumibles necesarios para realizar todo el proceso, desinfectados con etanol al 70% y dentro de la campana.

La solución de criopreservación contiene dimetilsulfóxido (DMSO) que ayuda a mantener a proteger las células durante el proceso de congelación reduciendo el estrés osmótico. Sin embargo, debido a que cuando se descongela el DMSO es tóxico para las células, debe diluirse lo suficiente para evitar el daño celular.

Dentro de la campana se prepara un tubo cónico estéril para centrífuga de 15 ml, al que se le agregan 8 ml de medio de cultivo atemperado. El vial que contiene las células congeladas se coloca en el baño María a 37ºC. Cuando los cristales de hielo se derriten (aproximadamente 2 minutos), se retira del baño María y se descontamina sumergiéndolo o pulverizándolo con etanol al 70%. El contenido del vial se transfiere al tubo cónico con el medio de cultivo. Después de una mezcla suave, los 9 ml se transfieren a la placa o frasco de cultivo correspondiente.

La viabilidad de la mayoría de las células disminuye y alcanza su punto más bajo a las 24 horas después del descongelamiento. La disminución de viabilidad parece deberse mayoritariamente a la apoptosis inducida por el estrés del proceso de criopreservación. Pasadas las primeras 24 horas, las células comienzan a recuperarse y entran en un crecimiento exponencial.

3.7.1.2 Preparación de medios de cultivo complementado

La preparación de los medios de cultivo debe realizarse dentro de la campana previamente irradiada con luz UV, los reactivos deben atemperarse en el baño María a 37ºC y desinfectarse pulverizando etanol al 70% antes de introducirlos a la campana.

El medio de cultivo utilizado en nuestros ensayos es *Dulbecco's Modified Eagle's Medicum – high glucose* (DMEM; 4500mg/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio) el cual se complementa con 10% de suero bovino fetal (Gibco®) y 1% de antibiótico (Sigma-Aldrich; penicilina 10,000 unidades y estreptomicina 10mg/ml).

3.7.1.3 Contaje celular

Para la mayor parte de los experimentos es necesario conocer la cantidad de células. Esto permite establecer y monitorear el crecimiento celular. Además, conocer la tasa de crecimiento permite calcular la cantidad de células que se deben sembrar para conseguir las condiciones óptimas para cada experimento.

El instrumento usado para contar las células es la cámara Neubauer (Marienfeld). Esta cámara se asemeja a un portaobjetos grueso con dos zonas ligeramente deprimidas, cada una con una cuadrícula de nueve zonas marcadas para conteo. Los bordes de la cámara tienen una zona elevada que mantiene un cubreobjetos elevado a 0,1 mm por encima del piso de la cámara. Ello permite que dentro cada uno de los nueve cuadros de conteo haya un volumen exacto de 0,0001 ml.

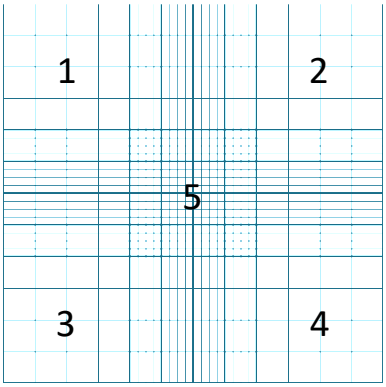


Figura 34. Esquema de un recuadro de la cámara de Neubauer.

Para su uso, la cámara de Neubauer se limpia y seca completamente, se coloca el cubreobjetos y se agrega 10µL de suspensión celular en cada una de las zonas permitiendo que se introduzca en la cámara de recuento por capilaridad. La cámara se coloca en un microscopio invertido con aumento de 100x y se cuentan las células localizadas en los cinco cuadrados marcados en la ***Figura 34***. Se calcula el promedio de células por cuadrado y éste se multiplica por el factor de dilución. Si la muestra no ha sido diluida previamente el factor de dilución es 10^4 células/ml. Toda dilución hecha después de obtener la suspensión celular (incluyendo la tinción de viabilidad), debe incluirse en este cálculo.

3.7.1.4 Viabilidad celular

El conteo celular se complementa normalmente con el ensayo de viabilidad, ya que es necesario conocer no solo el número de células, sino cuántas de estas células se encuentran viables.

Para conocer la viabilidad celular, se toma una alícuota de la suspensión celular y se mezcla en una proporción 1:1 con la tinción de azul de tripano (Sigma) al 0,4% diluido en PBS-1x (Sigma). La tinción se deja incubar de tres a cinco minutos antes de su utilización y se cuantifica. Las células no viables se teñirán de azul oscuro. Y la viabilidad se calcula como el número de células sin teñir dividida entre el total de células contadas y se expresa en porcentaje.

3.7.1.5 Subcultivo celular

El subcultivo celular se realiza rompiendo los enlaces de superficie que existen entre las células y entre las células con las placas de cultivo, utilizando enzimas proteolíticas que digieren los enlaces de unión, en la mayoría de nuestros ensayos utilizamos tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich). El objetivo final es tener a las células disgregadas y en suspensión celular.

Para obtener la suspensión celular se deben seguir los siguientes pasos: i) atemperar en el baño María a 37ºC el medio de cultivo complementado, la tripsina-EDTA, el PBS-1x sin calcio o magnesio (Sigma-Aldrich) estéril; se introducen junto con el material consumible a la campana, teniendo cuidado de desinfectar todo pulverizando con etanol al 70% antes de introducirlos, ii) sacar la placa de cultivo de la incubadora, y trabajar en la campana en condiciones de esterilidad, eliminar el medio de cultivo en el que se encuentran las células, iii) hacer un lavado con PBS-1x estéril atemperado, iv) agregar de 2 a 3 ml de solución de tripsina-EDTA e incubar dentro de la incubadora por 5 a 15 minutos (dependiendo de la confluencia), es necesario verificar el proceso usando el microscopio y evitar golpear o agitar la placa para evitar aglomeraciones, vi) una vez que las células se desprenden completamente, agregar el medio de cultivo complementado y atemperado en una proporción 2:1 con la solución de tripsina-EDTA para inactivarla, vii) lavar suavemente la superficie de la placa para intentar

quedarse con la mayor cantidad de células posibles, verificar en el microscopio que la mayoría (> 95%) de las células son células individuales, en caso de encontrar conglomerados, se continúa dispersando con pipeteo suave. Posteriormente se transfiere a un tubo cónico estéril para centrífuga del volumen necesario y se cuentan las células viables en esta suspensión celular, viii) hacer las diluciones adecuadas y transferir la nueva suspensión celular a las placas de cultivo necesarias.

3.7.1.6 Criopreservación

Las células pueden almacenarse por muchos años e incluso indefinidamente a temperaturas por debajo de –130ºC (Nitrógeno líquido). Sin embargo, la viabilidad de estas células depende del proceso de criopreservación, pero también de la correcta descongelación de las células.

El procedimiento de la criopreservación requiere los pasos i-vii del apartado: 3.7.1.5 de subcultivo celular, hasta el punto en el que se tiene la suspensión celular en el tubo cónico estéril de centrifugación. Para la criopreservación se requiere: i) preparar el medio de congelación, agregando DMSO (ATCC) al 5% en medio de cultivo complementado, ii) centrifugar la suspensión celular (125 x g por 10 minutos), eliminar el medio cuidando de conservar el pelet, iii) resuspender el pelet con el medio de congelación, manteniendo una concentración final de entre 1 y 5 millones de células por ml, iv) etiquetar los crioviales detalladamente, v) transferir 1 a 1,8 ml de suspensión celular con medio de congelación a los crioviales, cerrarlos verificando que estén correctamente cerrados, vi) colocar los viales en una cámara de congelación controlada Mr. Frosty™ (Thermo Fisher Scientific) previamente refrigerada a –4ºC, vii) almacenar el Mr. Frosty™ en el ultracongelador a –80ºC por al menos 24 horas, y finalmente viii) transferir los viales al tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

3.7.2 Proliferación celular

Para obtener la curva de proliferación celular, utilizamos el equipo xCELLigence System® (Roche), que emplea un método de monitorización en tiempo real de la impedancia eléctrica en una placa que contiene microelectrodos de oro en el fondo. La proliferación celular aumenta el contacto de las células con los electrodos, creando una variación en la carga iónica que provoca un incremento en la impedancia, esta variación se integra en un algoritmo interno del equipo y se traduce en el índice celular.

Se calculó el número de células para sembrar en los pocillos de acuerdo con la recomendación de la casa comercial (5×10^3 células viables/cm^2), el área de los pocillos es de 5 mm^2 con una posible variación de ± 0,75 mm^2. Se realizó un concentrado celular como se describió anteriormente (apartado 3.6.1.5) en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo complementado por cada pocillo de la línea celular a testar.

Las especificaciones del ensayo se registran con el *software* RTCA 2.1.0. Para realizar la curva de proliferación celular se registra un paso inicial de una sola medición, que será el *background*; y después agregamos pasos que monitoricen la impedancia a intervalos de 10 minutos durante ciclos de 72 horas hasta completar ocho días. El equipo se coloca dentro de la incubadora de cultivo celular de CO_2, que se encuentra conectada al ordenador portátil que se ubica fuera de la incubadora.

Bajo esterilidad y dentro de la campana, se retiran de su empaque a las placas *E-Plate 16* (ACEA), se les agrega a cada pocillo 50 µl de medio de cultivo sin células y se introducen en el equipo dentro de la incubadora, se hace la medición del *background* y se retiran del equipo para llevarlas a la campana y agregar 150 µl de suspensión celular preparada anteriormente.

Las placas se cierran dentro de la campana y se transportan nuevamente al equipo dentro de la incubadora, y se inicia la monitorización. Durante el transcurso del experimento, el *software* permite la visualización y análisis de datos en tiempo real. Se genera la curva con el tiempo en el eje (x) y el índice celular en el eje (y). Al final los datos se exportan para su posterior análisis.

3.7.3 Diferenciación celular

La línea celular C2C12, son mioblastos que tienen la capacidad de transformarse a miotubos, mediante un proceso de diferenciación celular.

3.7.3.1 Preparación de medios de diferenciación

El medio de diferenciación se prepara al igual que el resto de los medios de cultivo, dentro de la campana previamente irradiada con luz UV, los reactivos deben atemperarse en el baño María a 37ºC y desinfectarse pulverizando etanol al 70% antes de introducirlos a la campana.

El medio DMEM-*high glucose*, se complementa con 2% de suero de caballo (Sigma Aldrich), 1mM de Insulina (Sigma) y 1% de antibiótico (Sigma-Aldrich, penicilina 10,000 unidades y estreptomicina 10mg/ml).

3.7.3.2 Procedimiento de diferenciación celular

Se debe calcular el número de células que se siembran, de acuerdo con el tamaño de la placa de cultivo. Además, se debe asegurar que la placa nunca se encuentre a una confluencia por encima del 80%. Toda manipulación debe realizarse dentro de la campana de cultivos y en condiciones de esterilidad.

El protocolo de diferenciación celular es el siguiente: i) Sembrar el número apropiado de células en las placas de cultivo con el medio de cultivo complementado (DMEM + 10% FBS + 1% Penicilina/estreptomicina), ii) 48 horas después se observa la placa al microscopio para determinar la confluencia y si esta está por encima de 70%, pero por debajo de 90% se puede iniciar la diferenciación celular, iii) se elimina el medio de cultivo complementado, iv) se realiza un lavado con PBS-1x estéril atemperado a 37 ºC y se elimina el PBS, v) se reemplaza el medio por medio de diferenciación y se mantiene en vigilancia cada día durante todo el proceso de diferenciación, vi) el medio de cultivo se cambia cada 24 horas por nuevo medio de diferenciación.

3.7.4 Silenciamiento génico

Existen varios métodos de silenciamiento de genes, el que se utilizó en este trabajo fue el silenciamiento por transfección usando partículas lentivirales, debido a que permiten el silenciamiento estable del gen, con inactivación a largo plazo.

3.7.4.1 Selección de las partículas lentivirales para la transfección.

Se seleccionaron dos partículas lentivirales de transducción MISSION® shRNA (Sigma, ahora Merk) para el gen *Tanc1* (SHCLNV-HM_198294) teniendo en consideración: i) que la secuencia estuviera localizada en regiones codificantes del gen, ii) que el vector usado fuera pLKO.1-puro, iii) que los clones hubiesen sido validados y iv) que tuvieran diferente nivel de *KnockDown*. Seleccionamos dos niveles distintos de *KnockDown*, uno a 70% y el otro al 91%.

Como control de transfección, se seleccionaron las partículas lentivirales MISSION® pLKO.1-puro Control, que contiene el vector en las mismas condiciones que los shRNA para *Tanc1*, pero sin el inserto del shRNA.

El vector pLKO.1-puro permite una transfección estable a largo plazo, gracias a la selección mediada por la resistencia a puromicina. El vector se origina a pratir de una bacteria ColE1 (tipo pUC). En la ***Figura 35***, se muestra el mapa vectorial, que incluye entre otras cosas, el gen de resistencia a la puromicina (puroR), la resistencia a ampicilina (ampR) útil para selección de bacterias, el promotor constitutivo *hPGK*, y la secuencia de nucleótidos 3' y 5' del retroviral, que está implicado en el proceso de integración al genoma de la célula transfectada.

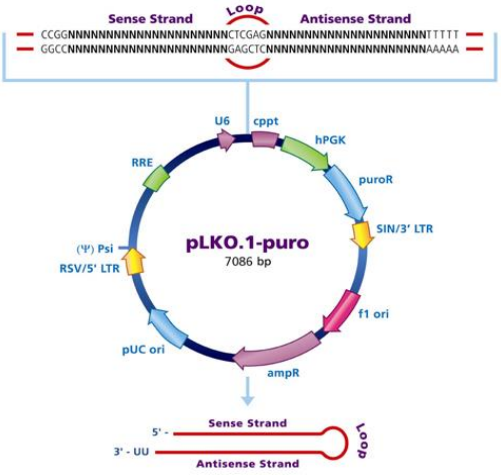


Figura 35. Vector pLKO.1-puro.
Con permiso de: Merk KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates.

3.7.4.2 Silenciamiento por transfección de partículas lentivirales

El proceso de transfección se llevó a cabo en placas de 12 pozos (Corning). Se calculó el número de células basándose en la tasa de proliferación celular y el tamaño del pozo. El pozo de la placa mide 3,83cm^2, y la recomendación de cultivo de acuerdo con la casa comercial ATCC es de 5 x 10^3 células viables/cm^2. Se siembran un total de 19.150 células por pozo en 500 µl de medio de cultivo complementado, se incuban a 37ºC, a 5% de CO_2 por 24 horas.

El segundo día, se cambia el medio de cultivo, y se le adiciona Polibreno (*Hexadimethrinebromide*, Sigma Aldrich) a concentración de 8 µg/ml y se deja incubar cuatro horas. El polibreno es un polímero catiónico que neutraliza el rechazo entre los viriones y el ácido siálico de la superficie celular neutralizando las cargas eléctricas, lo que aumenta la eficiencia de la transducción. Se adicionan las partículas lentivirales, para lo cual es necesario calcular la cantidad requerida, se probaron distintas ratios de multiplicidad de infección (MOI), aquí se describe la versión optimizada que es con un MOI de 20. Las unidades de transducción (TU) de las diferentes partículas se calcularon usando la siguiente fórmula:

$$TU = (\#\ de\ células)(MOI)$$

Y para conocer la cantidad de volumen que se requiere agregar de las partículas lentivirales enviadas por el fabricante se usa la siguiente fórmula:

$$Volumen_p = \frac{[(TU_m)(Volumen_m)}{TU_p}$$

En donde:

p = se refiere al volumen y al TU de las partículas enviadas por el fabricante

m = se refiere a los datos calculados para nuestro ensayo, el TU corresponde a 387.000 TU y el volumen de medio que se usará es de 0,5 ml.

Sustituyendo los valores de acuerdo con los TU de las partículas lentivirales que se usan en nuestros estudios obtenemos los siguientes resultados:

$$\frac{(383.000\,TU)(0{,}500\,ml)}{1{,}2x\ 10^7\ (shControl)} = 0{,}015\,ml = 15{,}98\,\mu l\ (shControl)$$

$$\frac{(383.000\,TU)(0{,}500\,ml)}{1{,}8x\ 10^7\ (TANC1_{[70\%]})} = 0{,}010\,ml = 10{,}63\,\mu l\ (shTANC1_{[70\%]})$$

$$\frac{(383.000\,TU)(0{,}500\,ml)}{1{,}6\,x\ 10^7\ (TANC1_{[90\%]})} = 0{,}011\,ml = 11{,}86\,\mu l\ (shTANC1_{[90\%]})$$

Una vez añadida la cantidad de partículas correspondiente, se mezcla gentilmente y se incuba por 24 horas a 37ºC, en 5% CO_2.

El tercer día, se comprueba la confluencia en el pocillo. Si está por debajo del 50%, se remueve el medio comprometido con las partículas lentivirales y se añade medio fresco complementado atemperado a 37ºC. Si la confluencia es por encima de 70%, (lo más frecuente) se realiza un subcultivo en una placa P90 (Corning).

El cuarto día, se elimina el medio de cultivo y se agrega medio fresco adicionado con Puromicina (Sigma Aldrich) a 5µg/ml. Luego se incuba 24 horas a 37ºC en 5% CO_2.

El quinto día, se observa al microscopio la efectividad de la transfección. Las células que no hayan sido transfectadas, mueren al contacto con la puromicina, mientras que las células transfectadas, tendrán resistencia a la puromicina conferida por el plásmido, lo que las mantendrá con vida.

Una vez conseguidas las nuevas líneas celulares con la transfección, se subcultivan y se va congelando, dando prioridad de conegelación a los primeros pases. A partir de este momento, todos los medios de cultivo que se usen para estas células deberán contener puromicina para intentar conservar el silenciamiento.

3.7.5 Radiación celular

Todos los ensayos que incluyen radiación en células requieren la planificación del tratamiento previo, el cual fue realizado por el Departamento de Física Médica de la sección del Servicio de Oncología Radioterápica. Todas las irradiaciones fueron realizadas dentro de los protocolos de seguridad propios del servicio y por el personal encargado de los equipos.

3.7.5.1 Planificación de tratamiento

Para la planificación del tratamiento fue necesario realizar una tomografía axial computarizada a las diferentes placas de cultivo que se usarían en los ensayos. Sobre estas placas, se calculó la dosis necesaria para que la base interna de las placas de cultivo (donde se encuentran las células adheridas) recibiera la dosis prescrita mediante el *software* Xio®. Para homogeneizar la radiación fue necesario agregar bloques de polimetilmetacrilato (PMMA). (***Figura 36***)

El maniquí quedó formado por 5 cm de PMMA por encima y por debajo de la placa de cultivo celular. La distancia al isocentro fue de 100 cm y la distancia a la superficie del maniquí de 93,1 cm. El tamaño del campo se delimitó a 16 x 13 cm, sobre los que se proyectaron dos campos de fotones (RX) opuestos de 6MV de energía, uno a 0º y el otro a 180º, para asegurar que la dosis sobre toda la placa sea uniforme. Las unidades monitor (UM) usadas

fueron 103 UM por cada campo, un total de 206 UM para la dosis 2 Gy, 412, 618, 824 y 1030 UM para 4, 6, 8 y 10 Gy respectivamente.

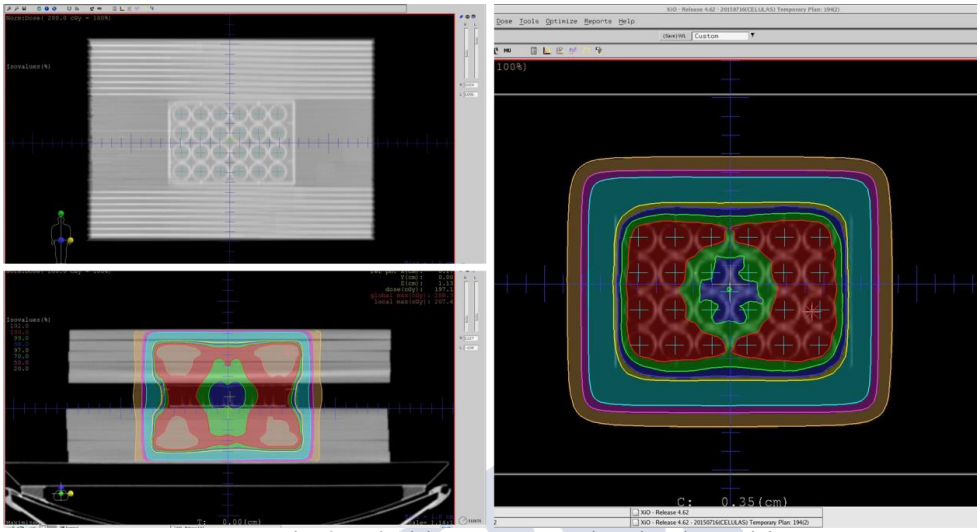


Figura 36. Planificación del tratamiento en placa de cultivo celular.

3.7.5.2 Procedimiento para la radiación de cultivos celulares

El protocolo de radiación inicia con i) calcular el número de células necesarias para tener confluencia en las placas de ~70-80% al día siguiente, ii) sembrar las células en la placa o frasco correspondiente y dejar 24 horas en la incubadora, iii) antes de irradiar, se elimina el medio de cultivo para eliminar las células que se hayan desprendido o que hayan muerto durante el proceso de subcultivo celular y se agrega medio complementado previamente atemperado, iv) se transportan las placas de cultivo al Servicio de Oncología Radioterápica y se coloca sobre el sillón movible de tratamiento en la posición definida para la placa y antes de irradiar se verifica con rayos láser la posición adecuada con respecto a los puntos de referencia definidos para el tipo de placa, v) todo el personal abandona el bunker y se radian las células, vi) una vez finalizada las diferentes radiaciones, se transportan todas las placas de vuelta al cuarto de cultivo celular, en donde se elimina el medio comprometido (radiado) y se sustituye por nuevo medio complementado previamente atemperado a 37ºC y se mantiene en la incubadora el tiempo necesario dependiendo del experimento.

3.7.6 Western Blot

3.7.6.1 Extracción de proteínas a partir de placas de cultivo celular

Varios protocolos de extracción de proteína fueron probados durante el proceso de estandarización, aquí describimos el método optimizado, este procedimiento se realiza fuera de la campana de cultivos.

Los pasos de la extracción de proteínas son: i) se prepara el *buffer* de lisis RIPA (*Thermo Scientific*) adicionando el cóctel de inhibidores de fosfatasas y proteasas (*Cell Signaling Technology*), para lo cual el cóctel debe vortearse antes de usar y se agrega al *buffer* RIPA en una dilución 1:100, ii) se quita la placa de la incubadora y se coloca sobre hielo, para evitar la degradación de las proteínas, ii) se elimina el medio de cultivo, iii) se realiza un lavado con PBS-1x no-estéril retirado directamente de la nevera (4 ºC) para eliminar todo resto de FBS del medio complementado, iv) se elimina el PBS, v) se agrega 1 ml del *buffer* de lisis RIPA adicionado con el cóctel de inhibidores de fosfatasas y proteasas por cada ~ 5 x 10^6 células, vi) se deja actuar 5 minutos el *buffer* de lisis, manteniendo las placas en hielo, y agitando de vez en cuando para asegurarse de que el *buffer* cubre la superficie, vii) el lisado se colecta usando un raspador de células, se recoge y se transfiere a un tubo de microcentrífuga, viii) se centrifugan las muestras a ~14.000 x g durante 15 minutos, ix) se recoge el sobrenadante, se transfiere a un tubo de microcentrífuga etiquetado previamente y se congela a –80ºC. Deben evitarse los ciclos de congelación/ descongelación.

3.7.6.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realiza para homogeneizar las muestras antes de procesarlas, en nuestro caso utilizamos un método colorimétrico (Bio Rad, *protein assay*) adaptado del método de Bradford. Para lo cual es necesario preparar los estándares que se usarán en la curva de calibración.

Los estándares se preparan con concentraciones conocidas de gammaglobulina bovina o albúmina de suero bovino (BSA). Se preparan alícuotas con diferentes concentraciones, realizando diluciones seriadas a cuatro puntos (5; 2,5; 1,25; 0,625 µg/µl).

Por otra parte, se prepara el reactivo de tinción diluyendo una parte del *Dye Reagent Concentrate* (Bio Rad) y cuatro partes de agua Milli-Q, y una vez mezclado se dispensa en cada uno de los pocillos que se usarán en el ensayo. Todas las muestras, controles y estándares se analizan por triplicado. La primera fila será siempre el control negativo, seguido de los estándares de menor a mayor concentración y finalmente las muestras a analizar. Cuando las muestras hayan sido añadidas, la tinción se deja incubando a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos. La absorbancia incrementa con el tiempo, por lo que las muestras deben analizarse durante la primera hora en el lector de placas *Triad Multi Mode Microplate Reader* (Dynex Technologies)) a una absorbancia de 595 nm.

Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia del control negativo, los estándares y las muestras, se analizan de la siguiente forma: i) el primer paso consiste en calcular la media de los datos obtenidos en los triplicados, ii) se resta el control negativo a los valores de absorbancia de los estándares y de las muestras analizadas, iii) con los estándares se grafican los valores de absorbancia (eje y) y la cantidad de proteína de los estándares (eje x), iii) se calcula la pendiente y se determina por mínimos cuadrados la ecuación de la recta, ($y = mx + b$), es necesario tomar en cuenta el coeficiente de determinación (R^2), el cual debe estar lo más cercano al 1, permitiendo valores por encima de 0,90, iv) conociendo los valores de absorbancia equivalentes a la proteína de los estándares, usando la ecuación de la recta se determina la

cantidad de proteína en cada muestra analizada y por último v) en caso de haber diluido la muestra antes de la cuantificación, se corrige por el factor de dilución.

3.7.6.3 Preparación de la muestra

Las muestras cuya concentración conocemos, se normalizan y alicuotan para asegurarnos de agregar 30µg de proteína total del lisado celular. A estas alícuotas se les agrega el *buffer* Laemmli 4x (Bio Rad) al que se le añade 2-mercaptoetanol (Bio Rad) a una concentración de 10% al momento de preparar la muestra.

El *buffer* Laemmli contiene detergente dodecilsufato sódico (SDS), azul de bromofenol y glicerol. El SDS ayuda a desnaturalizar las proteínas y las subunidades mediante el rompimiento de los puentes de hidrógeno responsables de la estructura terciaria, y confiere una carga negativa que permite que las proteínas se separen de acuerdo a su masa. El azul de bromofenol es un tinte que sirve como marcador, ya que desciende antes que las proteínas más pequeñas y se utiliza como frente de la electroforesis. El glicerol aumenta la densidad de la muestra, lo que permite facilitar el depósito en las celdillas del gel. Finalmente, el 2-mercaptoetanol se agrega para reducir los enlaces disulfuro.

Una vez mezclada la muestra con el *buffer*, se transfieren los tubos al Thermomixer® (Eppendorf) y se calientan las muestras cinco minutos a 95ºC, lo cual permite que la proteína se desnaturalice y se una al detergente SDS, previamente a la realización de la electroforesis.

3.7.6.4 Electroforesis en gel de Poliacrilamida

La electroforesis se realiza en el gel pre-hecho de poliacrilamida con gradiente de 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels de 15 pocillos (Bio Rad), el cual permite una separación de polipéptdos de ~2 a 400 kD.

Se elimina el protector plástico de los pocillos y el adhesivo plástico del borde inferior del gel. Se agrega la muestra desnaturalizada a los pocillos y en el primer carril agregamos 5 µl del *lader Precision Plus Protein™ All Blue prestained Protein Standards* (Bio Rad). El gel se coloca dentro del sistema vertical de electroforesis Mini-PROTEAN® (Bio Rad), se cubre con *buffer* de electroforesis (Tris HCl 25mM, Glycine 0,19 M, SDS 0,01%) y se conectan el electrodo positivo y negativo a la fuente de alimentación de alto voltaje PowerPac™ HC (BioRad).

Las condiciones de la electroforesis son: Voltaje = 200 voltios (V) [constantes], Intensidad de corriente = 3,0 amperios (A), Potencia: 300 watts (W), por 35 minutos.

3.7.6.5 Transferencia

La transferencia es el proceso en el que las proteínas migran desde gel hacia la membrana, gracias a la aplicación de corriente eléctrica, que dirige las proteínas al ánodo (+) y gracias a la porosidad de la membrana, se quedan 'atrapadas' en ella. Probamos distintos tipos de membrana en diferentes condiciones, aquí se describe la versión optimizada de las membranas de baja fluorescencia de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

Para este proceso utilizamos el equipo sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ (Bio Rad) y el kit de transferencia *Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini LF PVDF* (Bio Rad), i) preparamos el *buffer* de transferencia 1x (200 ml 5x *buffer* Transferencia (Bio Rad), 600 ml de agua nano pura, 200 ml de etanol grado biología molecular 98% (Millipore)), ii) colocamos la membrana LF-PVDF en 100% metanol (Supelco) hasta que queda traslúcida, iii) colocamos dos paquetes de *mini-size transfer stacks* en 50 ml de *buffer* de transferencia 1x, iv) equilibramos la membrana, colocándola en 30 ml del *buffer* de transferencia 1x durante 2-3 minutos, v) retiramos el cassette del Trans-Blot Turbo y colocamos un paquete de *stacks*

húmedo y pasamos el rodillo para eliminar burbujas, vi) colocamos la membrana, vii) quitamos el gel del sistema vertical de electroforesis y lo colocamos encima de la membrana y pasamos cuidadosamente el rodillo para eliminar burbujas, viii) colocamos un paquete de *stacks* húmedo y pasamos el rodillo para eliminar burbujas, ix) colocamos la tapa del cassette y aseguramos el cierre girando la perilla exterior. Para la transferencia se utilizó un voltaje de 25 V y una intensidad de corriente de 2,5 A, durante 10 minutos.

Existen dos métodos para verificar la transferencia de las proteínas, uno de ellos es mediante la utilización del colorante Bio-Safe™ Coomassie (Bio Rad) en el gel, que nos ayuda ver la cantidad de proteína que queda en el gel y que, por lo tanto, no se ha transferido a la membrana. El segundo método se realiza sobre la membrana, mediante la tinción de rojo Ponceau, que permite detectar las bandas de proteínas en las membranas. Es un método rápido y reversible.

3.7.6.6 Bloqueo

Las características de la membrana permiten la unión inespecífica de cualquier proteína durante la transferencia. Existen sitios en la membrana donde no habrá ninguna proteína, por lo que es necesario bloquear todos estos sitios libres para evitar que los anticuerpos (que son de naturaleza proteica) queden unidos a la membrana. El bloqueo se realiza usando soluciones con proteínas disueltas para que se unan a todos estos sitios libres.

Para realizar el bloqueo utilizamos una solución basada en 1% de caseína (Sigma) disuelta en *buffer* Tris-salino TBS (Bio Rad) a una concentración 1x. Inmediatamente después de sacar la membrana del equipo de transferencia, se bloquea la membrana en 15 ml de la solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Es importante evitar que la membrana se seque, si se detectan zonas en las que la membrana se ha secado, es necesario reactivar la membrana antes de bloquear. Esta reactivación consiste en poner a la membrana en metanol durante 2-3 minutos.

3.7.6.7 Detección

La detección específica de las proteínas se realiza utilizando anticuerpos primarios contra las proteínas de interés. Los anticuerpos que hemos usado son:

- Anticuerpo policlonal TANC1 aa1-50 – LSC289722 (LSBio); reactivo en: humano y ratón; hospedador: conejo; clonalidad: IgG; no-conjugado; sin modificaciones; epitope: aa1-50; concentración recomendada para WB: 1:2.000 – 1:10.000.
- Anticuerpo monoclonal anti-α-Tubulina clon DM1A (Sigma Aldrich); reactivo en: humano, ratón, gallina, rata, bovino, hongo, anfibio, levadura; hospedador: ratón; clonalidad: IgG1; no-conjugado; sin modificaciones; epitope: en la parte carboxi terminal de la α-Tubulina; concentración recomendada para WB: 1:500.
- Anticuerpo monoclonal anti-Miosina clon MY-32 (Sigma Aldrich); reactivo en: humano, ratón, rata, felino, bovino, cobayo, gallina; hospedador: ratón; clonalidad: IgG1; no conjugado; sin modificaciones; epitope: ubicada en la porción pesada de la meromiosina del músculo; concentración recomendada para WB: 1:1.000.

El anticuerpo primario se diluye en TBS + 1% caseína y se incuba en agitación durante dos horas a temperatura ambiente o a 4ºC toda la noche (volumen ~10ml por mini gel). Una

vez terminada la incubación, se realizan cinco lavados de cinco minutos cada uno a temperatura ambiente en *buffer* TBST (TBS + 0,05% Tween 20) en agitación.

La detección se realiza con los anticuerpos secundarios correspondientes al hospedador en el que se generó el anticuerpo primario. Hemos utilizado diferentes tipos de anticuerpos, para detección con quimioluminiscencia y de fluorescencia, aquí se describe únicamente la versión optimizada de la detección por fluorescencia, para lo cual usamos los anticuerpos secundarios: StarBright™ Blue 700 Goat Anti-Mouse IgG (Bio Rad) y StarBright™ Blue 520 Goat Anti-Rabbit IgG (Bio Rad). Anteriormente incluíamos a la proteína α-Tubulina como control de carga de los experimentos, ahora usamos hFAB™ Rhodamine Anti-GAPDH Primary Antibody (BioRad), que detecta la proteína *housekeeping* GAPDH sin necesidad de agregar un anticuerpo secundario, ya que se encuentra marcado con rodamina.

Para la incubación de los anticuerpos secundarios se diluye el anticuerpo en TBS + 1% caseína + 0,02% SDS a una proporción 1:2.500 – 1:5.000, el anticuerpo primario anti GAPDH marcado con rodamina se diluye a 1:1.000 – 1:10.000. Se incuban los anticuerpos durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, se realizan seis lavados en TBST de cinco minutos a temperatura ambiente en agitación.

La captura de imagen se realiza en el sistema de documentación ChemiDoc™MP (Bio Rad) usando la opción de Wester blot de fluorescencia *multiplex*, que nos permite ver los anticuerpos detectados por diferentes fluoróforos de forma independiente y después mezclarlos en una sola imagen. Además, nos permite normalizar las proteínas usando la proteína de control de carga en una misma membrana.

El análisis de las imágenes obtenidas en el ChemiDoc™ MP se realiza con el *software* Image Lab™ (v6.0.1, Bio Rad) para Windows. Para realizar el análisis semicuantitativo de nuestras proteínas, utilizamos los volúmenes ajustados proporcionados por el *software*, y realizamos la normalización de las proteínas con el *housekeeping* GADPH, en las condiciones estándar proporcionadas con el equipo ChemiDoc. Normalizamos los datos para presentarlos en la gráfica como el cambio de proporción con respecto a una de las proteínas de referencia. En el caso de TANC1 consideramos la cantidad de proteína en la fase de mioblastos como el valor con el que se normaliza y en el caso de Miosina de cadena pesada, al séptimo día post diferenciación.

3.7.7 Inmunofluorescencia

3.7.7.1 Adhesión celular al cubreobjetos con fibronectina

Las células C2C12 al diferenciarse y formar los miotubos, se desprenden de los cubreobjetos. Por lo que es necesario agregar una capa de fibronectina para mejorar la adhesión celular a los cubreobjetos.

El procedimiento consiste en: i) preparar una dilución de fibronectina de plasma bovino (Sigma) a una concentración final de 1 µg/ml en PBS-1x, ii) colocar los cubreobjetos redondos dentro de los pocillos de una placa de cultivo celular de 24 pozos, iii) irradiar con luz UV, durante 15 minutos los cubreobjetos, iv) enjuagar dos veces con PBS-1x estéril y eliminar el exceso de PBS, v) agregar 300-500 µl de fibronectina [1µg/ml] en cada pocillo y con una punta estéril presionar el cubreobjetos para evitar que flote, vi) dejar a temperatura ambiente, dentro de la campana durante 45 minutos, y vii) eliminar el resto de la fibronectina.

3.7.7.2 Cultivo y diferenciación celular

Se evaluó mediante una curva de crecimiento realizada sobre los cubreobjetos redondos con un rango de 1.000 a 100.000 células con incrementos de 5.000 células y se identificó que tras siete días post-diferenciación, sembrar por encima de 55.000 células permite observar miotubos maduros. La cantidad óptima son 85.000 células para diferenciar en 24 horas, en caso de requerir más tiempo, como en el caso de las células irradiadas, debe calcularse con base en la duplicación que tienen las células.

El proceso de diferenciación celular se realiza siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.7.3 Diferenciación celular.

3.7.7.3 Fijación y permeabilización celular

Para conservar la estructura y evitar la actividad autolítica de las células, se realiza una fijación química, no coagulante del tipo reticular, para lo cual se usa el formaldehido al 4% (Merck) La fijación se lleva a cabo en las células a diferentes tiempos de la diferenciación celular, en la etapa de mioblastos (24 horas después de sembrarlas y cuando se encuentran en una confluencia ~80-90%), 24, 48, 72 horas post-diferenciación, 5 y 7 días post diferenciación.

Dependiendo del tipo de experimento, las células pueden requerir una permeabilización, para lo cual se utiliza el detergente Triton-X100 (Sigma), el cual conserva el citoesqueleto y permite la entrada de los anticuerpos a través de la membrana.

El procedimiento para la fijación y permeabilización es el siguiente: i) lavar dos veces las células con PBS-1x frio, ii) agregar ~300-500 µl de paraformaldehido al 4% por 15 minutos a temperatura ambiente, iii) lavar tres veces con PBS-1x frio, iv) agregar ~300-500 µl de Triton-X100 al 0,2% en PBS-1x por 10 minutos, v) lavar dos veces con PBS-1x frio y vi) mantener en PBS-1x a 4 ºC hasta la inmunofluorescencia.

3.7.7.4 Inmunomarcaje

Para el inmunomarcaje se tomaron en cuenta las especificaciones técnicas de cada uno de los anticuerpos usados; las concentraciones, así como el tiempo de incubación y las características del bloqueo fueron estandarizadas en nuestro laboratorio.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anticuerpo policlonal TANC1 (Sigma Aldrich); reactivo en: humano; hospedador: conejo; clonalidad: IgG; no-conjugado; sin modificaciones; concentración recomendada para IF: 1:20 – 1:50.
- Anticuerpo monoclonal anti-α-Tubulina clon DM1A (Sigma Aldrich); concentración recomendada para IF: 1:500.
- Anticuerpo monoclonal anti-Miosina clon MY-32 (Sigma Aldrich); concentración recomendada para IF: 1:4.000.
- Anticuerpos secundarios: Goat anti-Rabbit IgG (H+L) conjugado rojo Texas (Thermo Fisher); concentración recomendada 4 µg/mL. Goat anti-Mouse IgG (H+L) conjugado Alexa Flour® 680 (Thermo Fisher); concentración recomendada 4 µg/mL.

De forma general el proceso de inmunomarcaje contempla: i) incubación del anticuerpo primario por una hora a temperatura ambiente, a la concentración determinada por el fabricante, diluido en 50µl de BSA al 2% o FBS 4% en PBS-1x (se mantiene en una cámara húmeda), ii) lavado con PBS-1x en agitación, tres veces durante cinco minutos cada una, iii) incubación del anticuerpo secundario ~60-90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, a la concentración determinada por el fabricante, diluido en 50 µl de BSA al 2% en PBS-1x o FBS 4% en PBS-1x (se mantiene nuevamente en una cámara húmeda), se agrega también el Hoechst (Sigma, un colorante fluorescente que tiñe de forma específica el ADN, con lo que muestra contorneado el núcleo de las células) a una concentración de 0,5 µg/ml diluida a partir del stock usando agua destilada estéril, iv) lavado con PBS-1x en agitación, tres veces durante cinco minutos cada una, v) traspaso del cubreobjetos a un portaobjetos agregando 8 µl del medio de montaje acuoso Mowiol (Sigma-Aldrich) o en glicerol con 10% PBS-10x, vi) secado del cubreobjetos durante toda la noche en la oscuridad, vii) cubrir la orilla de los cubreobjetos con laca, dejar secar y almacenar en oscuridad a -20ºC hasta verlos al microscopio.



Figura 37. Microscopio invertido de fluorescencia Axio Vert A1 (Carl Zeiss).
Con permiso de: Carl Zeiss™.

3.7.7.5 Captura y análisis de imágenes

Las imágenes de las inmunofluorescencias fueron adquiridas usando el microscopio invertido de fluorescencia Axio Vert.A1 (Carl Zeiss) (***Figura 37***) o el microscopio laser confocal Leica TCS-SP8 (Leica Microsystems), de la plataforma de microscopía confocal del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS).

3.7.7.6 Análisis morfométricos de los miotubos C2C12

El análisis de imagen se realizó utilizando los *softwares* propios de cada microscopio, en el caso de Axio Vert.A1, se usó el *software* ZEN v2.3 lite – blue edition (© Carl Zeiss Microscopy GmBH, 2011) y para las imágenes del Leica TCS-SP8, utilizamos el *software* Leica Application Suite (LAS) X v2.0.0.14332 (© Leica Microsystems CMS GmbH). Se obtuvieron al menos dos fotos por campo en cada una de las réplicas, se seleccionó la zona más representativa y siempre en tres objetivos distintos 10x, 20x y 62x en el caso del confocal, 10x, 20x y 100x en el de fluorescencia.

De las fotos obtenidas se calcula el número de miotubos por campo, de los miotubos se calcula el diámetro, la longitud y el área de los miotubos, además cuantificamos el número de núcleos por miotubo. La diferencia entre los grupos se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

4. RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1 CAPÍTULO 1. VALIDACIÓN INDEPENDIENTE DE VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN

4.1.1 Características de los pacientes

Se incluyeron 177 pacientes, de los cuales el 85% de los pacientes fueron hombres; el rango de edad al inicio de la radioterapia fue de 41 a 89 años, con una media de 64 años; el 93,78% tuvo un buen *estatus* funcional (ECOG ≤ 1); el 10% de los pacientes nunca fumaron, mientras que el 31% fueron fumadores activos durante el tratamiento. (***Tabla 18***)

Tabla 18. Características de los pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177)

Variable	Descripción	n (%)	Media	Min	Max	DE	NA, n (%)
Sexo							
	masculino	152 (85,88)					
	femenino	25 (14,12)					
Edad*							
	(años)		64,01	41	89	10,28	
Altura							
	(cm)		165,74	145	187	7,32	21 (11,86)
Peso							
	(kg)		74,16	45	134	14,66	18 (10,17)
IMC							
	([peso(kg)]/[talla(m)]^2)		26,90	16,18	43,42	4,73	21 (11,86)
	Bajo peso	6 (3,39)					
	Peso normal	135 (76,27)					
	Sobrepeso	71 (40,11)					
	Obesidad	31 (17,51)					
Estatus funcional ECOG							
	ECOG 0	31 (17,51)					
	ECOG 1	135 (76,27)					
	ECOG 2	9 (5,08)					
	ECOG 3	2 (1,12)					
	ECOG 4	0					
Tabaquismo							2 (1,13)
	No fumadores	18 (10,17)					
	Ex, antes del diagnóstico	77 (43,50)					
	Ex, al diagnóstico	25 (14,12)					
	Fumadores activos	55 (31,07)					
Consumo de tabaco							
	(paquete tabaco/año)		48,79	0	159	33,96	1 (0,56)
Consumo de Alcohol							50 (28,25)
	No tomadores	68 (38,42)					
	Ex, antes del diagnóstico	26 (14,69)					
	Ex, al diagnóstico	2 (1,13)					
	Consumo actual	31 (17,51)					

Estadística descriptiva (n, conteo numérico; Media, promedio; Min, mínimo; Max, máximo; DE, desviación estándar), NA, no disponible; * Edad al inicio de la radioterapia; ECOG, *Eastern Cooperative Oncology Group*; IMC, índice de masa corporal.

La localización más habitual del tumor fue en el lóbulo superior derecho, seguido del lóbulo superior izquierdo (28 y 24% respectivamente). El tipo histológico más frecuente de los tumores NSCLC diagnosticado por estudio anatomopatológico fue de tipo epidermoide (50,8%), seguido de adenocarcinoma (41,8%), el 91% de los pacientes se encontraban en un estadio clínico III (56% IIIa y 35% IIIb). (***Tabla 19***)

Tabla 19. Parámetros clínicos y patológicos en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177)

Variable	Descripción	n	%
Sitio tumor			
	lóbulo superior der.	51	28,81%
	lóbulo medio der.	17	9,60%
	lóbulo inferior der.	20	11,29%
	pulmón der.	8	4,51%
	lóbulo superior izq.	43	24,29%
	língula	9	5,08%
	lóbulo inferior izq.	19	10,73%
	pulmón izq.	10	5,64%
Histología			
	epidermoide	90	50,84%
	adenocarcinoma	74	41,80%
	células grandes	7	3,95%
	indiferenciado	2	1,12%
	no especificado	2	1,12%
	otro	2	1,12%
Estadio clínico tumor *			
	T1	6	3,38%
	T2	68	38,41%
	T3	42	23,72%
	T4	61	34,46%
Estadio clínico nodular *			
	N0	27	15,25%
	N1	13	7,34%
	N2	107	60,45%
	N3	30	16,94%
Estadio pronóstico ‡			
	I	5	2,82%
	II	10	5,64%
	IIIa	100	56,49%
	IIIb	62	35,02%

der., derecho; izq., izquierdo.
* Estadiaje con respecto al TNM (**ANEXO 1**); ‡ Estadiaje calculado de acuerdo con el TNM (**ANEXO 2**).

El 19,2% de los pacientes tuvieron algún tipo de intervención quirúrgica como parte del tratamiento, el abordaje quirúrgico que se usó con más frecuencia fue lobectomía (14,12%); como parte del tratamiento oncológico el 91% de los pacientes recibieron quimioterapia bajo un esquema basado en cisplatino administrando en un plan de inducción seguida de concurrencia con a radioterapia (44,63%). (***Tabla 20***)

Tabla 20. Descripción de tratamiento oncológico en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177)

Variable	Descripción	n (%)	Media	Min	Max	DE
Intervención quirúrgica						
	no	143 (80,79)				
	neumonectomía	6 (3,38)				
	lobectomía	25 (14,12)				
	Segmentectomía	3 (1,69)				
Tiempo cirugía-radioterapia						
	(meses)		6,64	1,37	30,03	7,22
Quimioterapia						
	si	162 (91,52)				
	No	15 (8,47)				
Esquema de quimioterapia						
	secuencial	30 (16,94)				
	concurrente	47 (26,55)				
	inducción + concurrente	79 (44,63)				
	concurrente + consolidación	4 (2,25)				
	ind. + concurr. + consol.	2 (1,12)				

n, conteo numérico; Media, promedio; Min, mínimo; Max, máximo; DE, desviación estándar; +, la adición de dos o más planes; ind., inducción; concurr., concurrente; consol., consolidación.

El tiempo transcurrido promedio entre que el paciente es diagnosticado y recibe el tratamiento con radioterapia fue de 4,26 meses. La dosis total prescrita fue de 66,6 Gy administrada en 37 fracciones, a una tasa de una fracción de 1,8 Gy por día en el 64,9% de los pacientes. Los datos dosimétricos se describen en la ***Tabla 21***.

Tabla 21. Datos del tratamiento radiooncológico en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177)

Variable	Descripción	n (%)	Media	Min	Max	DE	NA, n (%)
Tiempo Dx-RT	(meses)		4,26	0,53	30,03	4,28	
Dosis Total RT	(Gy)		62,80	27,00	74,00	6,94	1 (0,56)
Número de fracciones	(n)		34,33	15,00	37,00	4,31	1 (0,56)
doses/fracción	(n)		1,84	1,80	3,00	0,12	1 (0,56)
BED	(n)		122,48	52,18	150,68	13,28	1 (0,56)
GTV	(cm3)		147,86	3,50	1094,61	150,80	54 (30,5)
PTV	(cm3)		400,72	27,60	1894,56	273,15	10 (5,64)
CTV	(cm3)		299,80	53,00	691,00	221,61	169 (95,48)
V35 esófago	(%)		32,54	0,00	83,49	16,88	11 (6,21)
V50 esófago	(%)		19,73	0,00	74,76	15,99	10 (5,64)
V60 esófago	(%)		11,23	0,00	66,42	13,76	11 (6,21)
Max dosis 1cc esófago	(Gy)		56,59	10,41	69,85	12,30	11 (6,21)
Dosis media esófago	(Gy)		22,91	3,21	54,49	8,98	13 (7,34)
V5 pulmón*	(%)		55,32	7,74	95,39	16,09	7 (3,95)
V20 pulmón*	(%)		21,18	0,00	47,00	8,36	7 (3,95)
Dosis media pulmón**	(Gy)		12,48	0,00	27,99	7,24	10 (5,64)
V5 Corazón	(%)		41,45	0,00	100,00	32,08	14 (7,9)
V30 Corazón	(%)		12,65	0,00	69,45	14,83	15 (8,47)
V40 Corazón	(%)		7,87	0,00	59,78	10,42	13 (7,34)
V50 Corazón	(%)		4,17	0,00	49,49	6,29	14 (7,9)
Max dosis 1cc Corazón	(Gy)		49,10	0,16	100,40	24,15	14 (7,9)
Dosis media Corazón	(Gy)		10,63	0,10	42,25	9,06	15 (8,47)
Interrupción de la RT	no	153 (86,44)					
	si	24 (13,55)					

n, conteo numérico; Media, promedio; Min, mínimo; Max, máximo; DE, desviación estándar; NA, no disponible; Dx, diagnóstico; RT, radioterapia; BED, dosis biológica equivalente; GTV, volumen tumoral macroscópico; PTV, volumen blanco de planificación; CTV, volumen blanco clínico; V35, V50 y V60 de esófago, porcentaje del esófago que recibe 35, 50 y 60 Gy respectivamente; * pulmón definido como la suma de los volúmenes de ambos pulmones menos el PTV; **pulmón definido como la suma de los volúmenes de ambos pulmones menos el GTV; V5 y V20 de pulmón, porcentaje de volumen de los pulmones que recibe 5 y 20 Gy; V5, V30, V40 y V50 de corazón, porcentaje del volumen del corazón que recibe 5, 30, 40 y 50 Gy.

Previo al inicio del tratamiento, los pacientes fueron sometidos a una prueba de función respiratoria mediante espirometría forzada y en aquellos pacientes en los que fue posible, se realizó también una prueba de difusión de monóxido de carbono. La media del valor FEV1 (Volumen espiratorio forzado en el primer segundo) se encontró justo debajo de los valores normales y sin datos de obstrucción (2,21 litros y 78,37% del valor de referencia), en cuanto a la media del DLCO (Capacidad de Difusión del monóxido de carbono) en el estudio de difusión pulmonar, fue de 78,06% con respecto al valor de referencia, que se considera una alteración leve; y la media del valor DLCO/VA (Capacidad de Difusión del monóxido de carbono dividida por el volumen alveolar) se encontró en valores normales (88,86% del valor de referencia). (***Tabla 22)***

Tabla 22. Pruebas de función respiratoria previa al tratamiento en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177)

Variables	Descripción	Media	Min	Max	DE	NA, n (%)
FEV1 (% predicho)	(%)	78,37	21,10	142,00	20,10	21 (11,86)
FEV1	(L)	2,21	0,42	4,85	0,76	21 (11,86)
DLCO (% predicho)	(%)	78,06	30,80	176,00	21,63	58 (32,76)
DLCO/VA (% predicho)	(%)	88,86	31,30	161,60	21,90	61 (34,46)

n, conteo numérico; Media, promedio; Min, mínimo; Max, máximo; DE, desviación estándar; NA, no disponible; FEV1, Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; % predicho, porcentaje con respecto al valor de referencia; L, litros; DLCO, capacidad de difusión pulmonar; DLCO/VA, capacidad de difusión pulmonar corregido por el volumen alveolar.

Algunas de las variables descritas fueron utilizadas como covariables dentro de los modelos utilizados en los estudios de referencia. Cada estudio define la forma en que incluye cada una de estas variables, ya sea utilizando los valores absolutos, categorizando o dicotomizando con base en la media del valor en la población de estudio. La categorización de las variables y la forma en que se incluyeron en los análisis se describe en la ***Tabla 23***.

Tabla 23. Categorización de variables incluidas en el estudio de validación de variantes genéticas previamente descritas en asociación con radiotoxicidad en pacientes NSCLC

	Estudios de referencia				
Covariables	**López-Guerra [2011]**	**Pang [2012]**	**López-Guerra [2012]**	**Pu [2014]**	**Zhao [2016]**
Sexo	masculino femenino	masculino femenino	masculino femenino	masculino femenino	masculino femenino
Edad	≤ 65 años > 65 años	< 70 años ≥ 70 años	≤ 63 años > 63 años	n (años)	n (años)
Población	europea otro	europea otro	europea otro	-	-
Estadio	I, II III, IV	I, II III, IV	I, II, IIIA IIIB, IV	I II IIIA IIIB	I II IIIA IIIB
Histología	epidermoide adenocarcinoma NSCLC, NOS	epidermoide adenocarcinoma NSCLC, NOS	epidermoide adenocarcinoma NSCLC, NOS	-	epidermoide adenocarcinoma células grandes otros
Estatus funcional	KPS ≥ 80 † KPS < 80 ø	KPS ≥ 80 † KPS < 80 ø	KPS ≥ 80 † KPS < 80 ø	ECOG = 0 ECOG = 1 ECOG = 2-4	ECOG = 0 ECOG = 1 ECOG = 2-4

Covariables	Estudios de referencia				
	López-Guerra [2011]	**Pang [2012]**	**López-Guerra [2012]**	**Pu [2014]**	**Zhao [2016]**
Tabaquismo	nunca + ex actualmente	nunca ex actualmente	nunca ex actualmente	-	-
Consumo tabaco (paq/año)	≤ 45 > 45	-	≤ 44 > 44	n	n
Quimioterapia concurrente	no si	no si	no si	no si	no si
Técnica radioterapia	3D IMRT Protón	3D IMRT o Protón	3D IMRT	3D 2D IMRT Protón	3D 2D IMRT Protón
Dosis total de radiación	≤ 63 Gy > 63 Gy	< 63 Gy ≥ 63 Gy	≤ 69 Gy > 69 Gy	-	-
Número de fracciones	uno al día dos al día	- -	uno al día dos al día	-	-
FEV1	-	< 1,9 L ≥ 1,9 L	-	(%)	(%)
DLCO	-	≤ 14 % > 14 %	-	(%)	(%)
PTV	-	-	-	cm^3	cm^3
GTV	-	< 120 cm^3 ≥ 120 cm^3	-	-	-
Dosis media esófago	≤ 31 Gy > 31 Gy	-	≤ 33 Gy > 33 Gy	-	Gy
Mediana dosis esófago	-	-	-	Gy	-
Dmax esófago	≤ 68 Gy > 68 Gy	-	≤ 69 Gy > 69 Gy	-	-
V40% esófago	≤ 44 % > 44 %	-	-	-	-
V50% esófago	≤ 38 % > 38 %	-	≤ 41 % > 41 %	-	-
V60% esófago	-	-	≤ 29 % > 29 %	-	-
Dosis media pulmón	-	< 19 Gy ≥ 19 Gy	-	-	Gy
Mediana dosis pulmón	-	-	-	Gy	-
V20% pulmón	-	≤ 32 % > 32 %	-	-	-
Esofagitis *	grado < 3 vs ≥ 3 grado < 2 vs ≥ 2	-	grado < 3 vs ≥ 3 grado < 2 vs ≥ 2	grado < 2 vs ≥ 2	grado < 2 vs ≥ 2
Neumonitis *	-	grado < 3 vs ≥ 3 grado < 2 vs ≥ 2	-	grado < 2 vs ≥ 2	grado < 2 vs ≥ 2

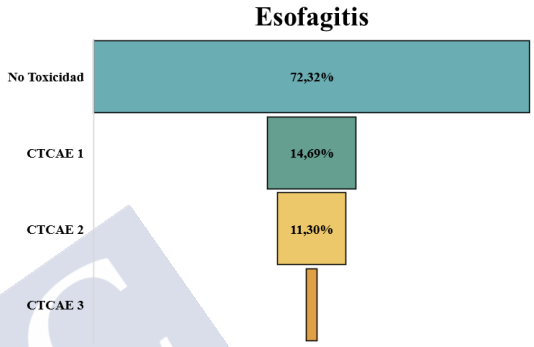
† equivalencia de KPS ≥ 80 = ECOG ≤ 1.
Ø equivalencia de KPS < 80 = ECOG ≥ 2.
* Grados toxicidad de acuerdo con el CTCAE.
- Variable no considerada en el estudio.
NSCLC, cáncer de pulmón no microcítico ; NOS, NSCLC sin otra especificación; KPS, escala Karnofsky de estatus funcional; ECOG, escala ECOG de estatus funcional; paq/año, calculado como: (paquetes de cigarros fumados por día)/(años como fumador); 3D, radioterapia conformada tridimensional; 2D, radioterapia bidimensional; IMRT, radioterapia de intensidad modulada; Dmax: dosis máxima; V40, V50 y V60 esófago volumen porcentaje de esófago que recibe 40, 50 y 60 Gy respectivamente en términos de porcentaje del volumen completo de esófago; V20 pulmón, porcentaje de pulmón que recibe 20 Gy en términos de porcentaje de la suma de los dos pulmones menos el PTV (volumen blanco de planificación).

4.1.2. SNPs asociados con esofagitis

La búsqueda bibliográfica de SNPs asociados con esofagitis llevó a la identificación de 21 SNPs en 17 genes distintos. (***Tabla 24***)

El fenotipo esofagitis fue descrito de distinta forma dependiendo del estudio, en el caso de Pu et al. (2014) [213] y Zhao et al. (2016) [227] se consideraron pacientes con toxicidad aquellos que tuvieran un grado ≥ 2 (CTCAE). Los estudios de López Guerra et al. (2011) [222] y (2012) [226], analizaron los pacientes en dos grupos, aquellos con grado de toxicidad ≥ 2 (CTCAE) y con grado ≥ 3.

El número de pacientes incluidos en cada uno de los análisis varió dependiendo de la disponibilidad de los datos usados como covariables, en la réplica de Pu et al. (2014) se inluyeron 111 pacientes, en la réplica de Zhao et al. (2016) se incluyeron 112 pacientes y en las réplicas de los estudios de López-Guerra et al. (2011) y (2012) se incluyeron un total de 162 pacientes.



	Grado	N	(%)
Esofagitis	No Toxicidad	128	72,31 %
	CTCAE 1	26	14,68 %
	CTCAE 2	20	11,29 %
	CTCAE 3	3	1,69 %

Figura 38. Esofagitis a los 3 meses post-RT en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177).

En nuestra cohorte, el 72,31% de los pacientes no presentaron esofagitis durante los 3 meses posteriores a la radioterapia; 14,68% presentó esofagitis grado 1 según la escala CTCAE v 4.0, que corresponde a presentar una esofagitis asintomática en donde la intervención médica no está indicada; 11,29% tuvo grado 2, presentando síntomas, con alteración al comer o tragar para los que están indicados los suplementos orales; y únicamente 1,69% (3 pacientes) tuvieron toxicidad grado 3, en donde comer o tragar están severamente alterados y está indicada la hospitalización, la alimentación por sonda o la nutrición parenteral. (***Figura 38***)

Los SNPs candidatos identificados en la literatura se analizaron en nuestra cohorte, presentando dos de ellos (rs7165790 y rs4772468) asociación nominal con esofagitis ($p < 0,05$), que no se mantuvo después de la corrección por test múltiple de Bonferroni. El SNP intrónico rs7165790, localizado en el gen *BLM* se asoció con esofagitis ≥ 2 (CTCAE) a los 3 meses después de la radioterapia (OR = 0,16; 95% IC, 0,04-0,66; P = 0,010) al igual que el SNP rs4772468 en la región flanqueante 5' del gen *FGF14* (OR = 4,36; 95% IC, 1,15-16,47; P = 0,029). Además, un tercer SNP, rs2868371 en el gen *HSPB1* se asoció con esofagitis grado ≥ 2 (CTCAE) a los 15 meses de seguimiento (OR = 3,72; IC del 95%: 1,49-9,25; P = 0,004) que se mantiene significativo después de la corrección de Bonferoni ($Pc \leq 6.25 \times 10^{-03}$), pero en una dirección de efecto opuesta a la descrita en su estudio de referencia. Tres SNPs del estudio de Zhao et al. (2016) [227] no pudieron ser analizados por presentar una frecuencia del alelo menor demasiado baja para analizar el modelo genético recesivo, con el que fue asociado en el estudio de referencia.

Tabla 24. Validación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN de los SNPs previamente replicados en asociación con esofagitis

Estudio de referencia	SNP-ID	Gen	Modelo	Alelo riesgo	OR	95% IC	P-valor
Zhao et al. (2016) §	rs10514249	*XRCC4*	REC	C	1,58	0,37-6,63	0,532
	rs11078671	*RPA1*	REC	T	3,82	0,87-16,71	0,075
	rs12516	*BRCA1*	REC	A	NA	NA	NA
	rs1776139	*EXO1*	DOM	G	8,03	0,78-82,15	0,079
	rs1799966	*BRCA1*	REC	C	NA	NA	NA
	rs1822744	*TOPBP1*	ADD	G	1,81	0,77-4,24	0,170
	rs2270132	*BLM*	DOM	C	0,90	0,25-3,22	0,871
	rs401549	*BLM*	ADD	C	1,94	0,73-5,08	0,179
	rs4873772	*PRKDC*	REC	A	0,53	0,05-5,34	0,590
	rs7165790	***BLM***	**ADD**	**G**	**0,16**	**0,04-0,65**	**0,010 ***
	rs8176257	*BRCA1*	REC	T	NA	NA	NA
Pu et al. (2014) ǂ	rs1239344	*OSMR*	DOM	T	0,42	0,11-1,56	0,198
	rs1998521	*IL15RA*	ADD	T	0,75	0,28-1,93	0,550
	rs2707212	*CD4*	DOM	T	1,45	0,4-5,27	0,569
	rs270771	*LILRP2*	DOM	C	0,02	0,00-1,20	0,062
	rs4772468	***FGF14***	**DOM**	**G**	**4,36**	**1,15-16,46**	**0,029 ***
	rs7259857	*TNFSF7*	ADD	C	0,80	0,32-1,96	0,629
	rs7309	*TANK*	DOM	A	1,61	0,34-7,43	0,543
	rs940052	*PRKCE*	DOM	G	1,29	0,29-5,73	0,74

	SNPs	Gen	Genotipo	HR	95% IC	P-valor
López-Guerra et al. (2011) ≠	**rs2868371**	***HSPB1***	**CG/GG vs. CC**	**3,72**	**1,49-9,25**	**0,004 ****
López-Guerra et al. (2012) ø	rs1800469	*TGFB1*	AG/AA vs. GG	1,47	0,28-1,63	0,676

SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; Modelo, modelo genético; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza; REC, modelo genético recesivo; DOM, modelo genético dominante; ADD, modelo genético aditivo; HR, hazard ratio.

§ Ajustado por las covariables: edad, sexo, consumo de tabaco (paq/año), estadio clínico, estatus funcional, quimio-radioterapia concurrente, % volumen respiratorio forzado en el primer segundo (FEV1), % capacidad de difusión pulmonar (DLCO), volumen blanco de planificación (PTV), dosis media de esófago.

ǂ Ajustado por las covariables: edad, sexo, consume de tabaco (paq/año), estadio clínico, estatus funcional, quimio-radioterapia concurrente, % FEV1, % DLCO, PTV, mediana de la dosis de esófago.

≠ Ajustado por las covariables: escala Karnofsky de estatus funcional (KPS), estadio clínico, fraccionamiento de la radioterapia, estatus de tabaquismo, dosis media de esófago, porcentaje del volúmen de esófago que recibe 40 Gy (V40)

ø Ajustado por las covariables: edad, estatus de tabaquismo, KPS, estadio del tumor, quimio-radioterapia concurrente, dosis total de radiación.

* P valor significativo nominal (P ≤ 0,05). ** P valor significativo después de la corrección de Bonferroni (Pc ≤ $6{,}25 \times 10^{-03}$)

En cuanto al SNP rs2868371, publicado por López-Guerra et al. (2011) [222], al haber encontrado una asociación que permaneció significativa después de aplicar la corrección por test múltiple, decidimos seguir adelante con el estudio de este SNP, a pesar de que la dirección de la asociación encontrada en nuestra cohorte fue opuesta a la descrita en el estudio original. El genotipo CG/GG fue identificado originalmente con un efecto protector para esofagitis grado ≥ 3 (HR = 0,29; IC 95%, 0,09-0,97; P = 0,045) y ninguna asociación con esofagitis grado ≥ 2. En nuestro estudio los resultados fueron contradictorios, no se encontró ninguna asociación entre el genotipo CG/GG y esofagitis grado ≥ 3, pero se identificó una asociación con el aumento de riesgo de esofagitis grado ≥ 2 (HR = 3,72; IC 95%, 1,49-9,25; P = 0,004). (***Tabla 24, Figura 39***)

Los análisis de regresión de Cox y Kaplan Meier fueron también contradictorios cuando se incluyen los parámetros dosimétricos combinados con el genotipo sobre la incidencia acumulada de esofagitis grado ≥ 2. Nuestros resultados son opuestos a lo descrito en el estudio de referencia; nosotros encontramos que los pacientes con genotipos CG/GG que recibieron una dosis media de esófago igual o menor que 31 Gy presentaban mayor riesgo de presentar esofagitis que aquellos pacientes que reciben esta misma dosis, pero que presentan el genotipo CC (P = 0,02, ***Figura 40A***).

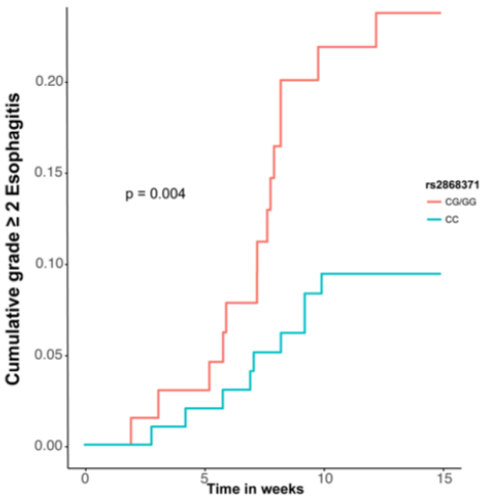


Figura 39. Curva de Kaplan-Meier para el grado CTCAE ≥ 2 de esofagitis en función del tiempo, en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN para los genotipos *HSPB1* rs2868371.

Cuando tomamos en cuenta el porcentaje de volumen de esófago que recibió más de 40 Gy (V40), los pacientes con genotipo CG/GG tuvieron mayor riesgo de presentar esofagitis que los que paciente con genotipo CC, independientemente del volumen (V40 ≤ 44%, P = 0,03 y V40 > 44%, P = 0,03, ***Figura 40B***).

Finalmente, la probabilidad de supervivencia de esofagitis grado ≥ 2 en función del tiempo, mantiene la misma tendencia, existe un aumento del riesgo de desarrollar esofagitis al portar genotipos CG/GG (P = 0,01, ***Figura 40C***), en comparación con la disminución del riesgo de portadores de CG/GG informada por López-Guerra et al. [222]

En las ***figuras 23-26*** del apartado 3.2.2 de Material y Métodos, se representa el poder estadístico necesario para los distintos escenarios de este análisis.

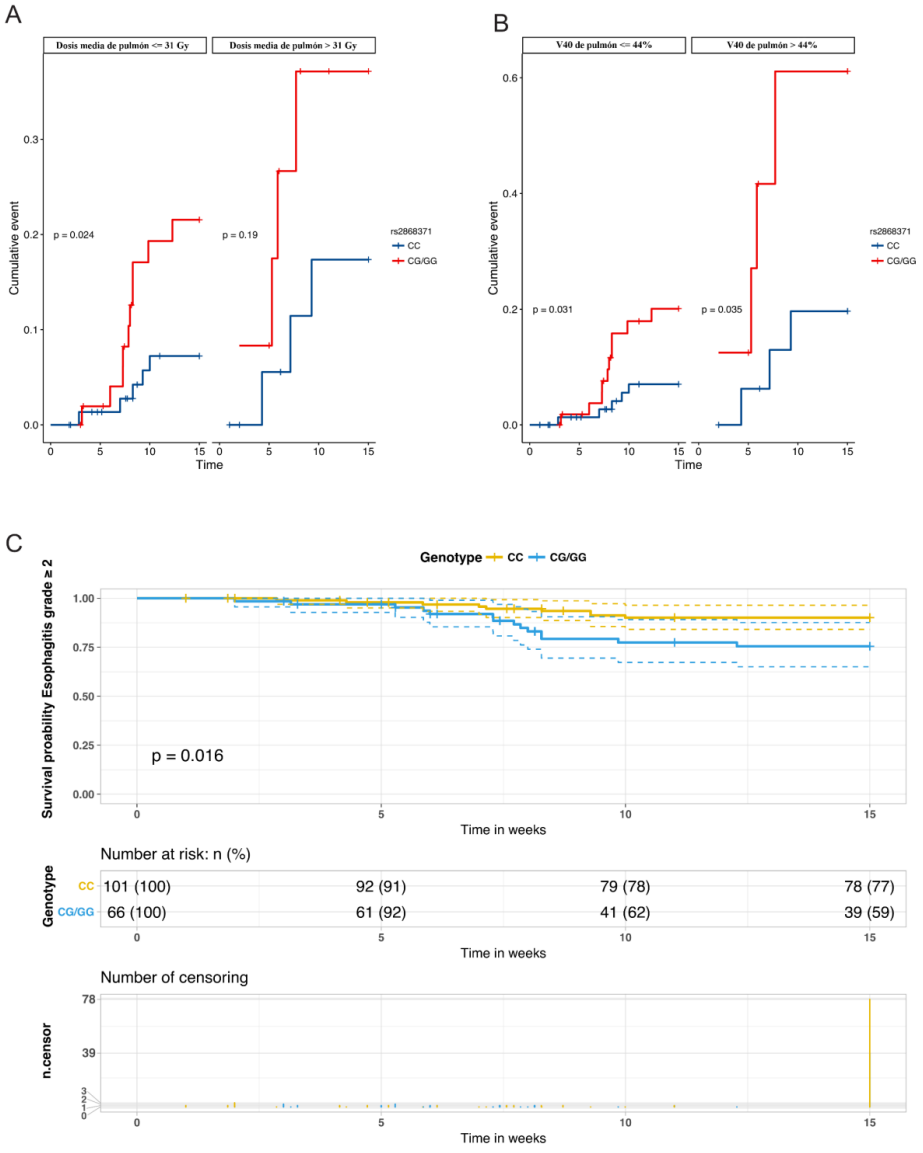


Figura 40. Probabilidad acumulada de grado CTCAE ≥ 2 de esofagitis en función del tiempo, en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN de acuerdo con los genotipos *HSPB1* rs2868371.
En comparación con los parámetros dosimétricos: dosis media de esófago ≤ 31 Gy vs > 31 Gy (A) y V%40 de esófago ≤ 44% vs > 44% (B). Probabilidad de supervivencia grado CTCAE ≥ 2 de esofagitis en función del tiempo, desde el inicio de RT hasta la semana 15 por genotipos *HSPB1* rs2868371 (C)

4.1.3. SNPs asociados con neumonitis

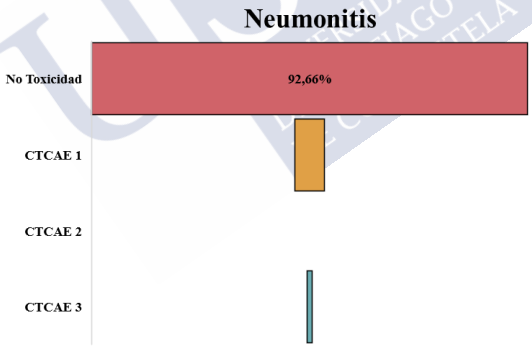
Se analizaron 16 SNPs de 15 genes asociados previamente con la presencia de neumonitis.

Al igual que para esofagitis, el fenotipo neumonitis se definió de forma distinta dependiendo del estudio. En el trabajo de Pu et al. (2014) [213] y en el de Zhao et al. (2016) [227] se consideraron pacientes con toxicidad aquellos que tuvieron un grado ≥ 2 (CTCAE). En el estudio de Pang et al. (2013), [221] se consideraron dos análisis por separado, uno con aquellos pacientes con neumonitis grado ≥ 2 y otro análisis con los pacientes que presentaron neumonitis grado ≥ 3 (CTCAE). (***Figura 41***)

Los pacientes que se incluyeron para la réplica de Pu et al. (2014) fueron 110, para la réplica de Zhao et al. (2016) 112 pacientes y para la réplica de Pang et al. (2013) se incluyeron 162 pacientes.

En nuestra cohorte, el 92,65% de los pacientes no presentaron ningún grado de neumonitis durante los primeros 3 meses posteriores a la radioterapia. Once pacientes (6,21%) presentaron grado 1 (CTCAE), que corresponde a neumonitis asintomática en donde no está indicada la intervención médica; ningún paciente presentó grado = 2, correspondiente a neumonitis sintomática, con intervención médica indicada y que limita las actividades instrumentales de la vida diaria. Únicamente dos pacientes (1,12%) presentaron síntomas de neumonitis severa, con limitación de las actividades de la vida diaria, en los que está indicada la administración de oxígeno (grado 3, CTCAE). Debido a esta muy baja incidencia de neumonitis con el fenotipo descrito (dos pacientes con grado ≥ 2) en nuestra cohorte, no fue posible evaluar este fenotipo.

En las ***figuras 23-26*** del apartado 3.2.2 de Material y Métodos, se representa el poder estadístico necesario para los distintos escenarios de este análisis.



	Grado	N	(%)
Neumonitis	No Toxicidad	164	92,65 %
	CTCAE 1	11	6,21 %
	CTCAE 2	0	
	CTCAE 3	2	1,12 %

Figura 41. Neumonitis a los 3 meses post-RT en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 177).

4.2 CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS VARIANTES ASOCIADAS A EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN MEDIANTE ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO

4.2.1 Inclusión de pacientes, toxicidades evaluadas y selección de covariables

En este capítulo se incluyeron a 155 pacientes de la cohorte RADIOGEN-pulmón. Se estudiaron los siguientes efectos adversos en su presentación aguda y tardía: i) hemorragia broncopulmonar, ii) fístula bronquial, iii) estenosis bronquial, iv) dolor en la pared del tórax, v) tos, vi) disfagia, vii) disnea, viii) estenosis esofágica, ix) esofagitis, x) infarto agudo al miocardio, xi) derrame pericárdico, xii) neumonitis, xiii) fibrosis pulmonar, xiv) radiodermatitis, y xv) estenosis traqueal (fibrosis). Se evaluó además la toxicidad global aguda y la tardía usando la puntuación STAT. (***Figura 42***) El fenotipo en las toxicidades individuales se definió dividiendo a la cohorte en casos (CTCAE < 2) y controles (CTCAE ≥ 2). El número de pacientes incluidos en cada análisis de los fenotipos varía dependiendo de la información disponible de cada una de las covariables incluidas. (***Tabla 25***)

Tabla 25. Frecuencia de efectos adversos agudos y tardíos estudiados en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN

Toxicidades	Aguda			Tardía		
	CTCAE < 2 n (%)	CTCAE ≥ 2 n (%)	TOTAL	CTCAE < 2 n (%)	CTCAE ≥ 2 n (%)	TOTAL
Hemorragia Broncopulmonar	150 (98,03)	3 (1,96)	153	117 (92,12)	10 (7,87)	127
Fistula bronquial	--	--	--	85 (98,83)	1 (1,16)	86
Estenosis bronquial	--	--	--	107 (97,27)	3 (2,72)	110
Dolor en la pared del tórax	134 (95,03)	7 (4,96)	141	94 (80,34)	23 (19,65)	117
Tos	111 (85,38)	19 (14,61)	130	91 (82,72)	19 (17,27)	110
Disfagia	85 (89,47)	10 (10,52)	95	81 (96,42)	3 (3,57)	84
Disnea	100 (87,71)	14 (12,28)	114	57 (59,37)	39 (40,62)	96
Estenosis esofágica	--	--	--	83 (97,64)	2 (2,35)	85
Esofagitis	124 (84,93)	22 (15,06)	146	111 (91,73)	10 (8,26)	121
Infarto agudo al miocardio	154 (99,35)	1 (0,64)	155	126 (99,21)	1 (0,78)	127
Derrame pericárdico	144 (98,63)	2 (1,36)	146	112 (92,56)	9 (7,43)	121
Neumonitis	147 (98,65)	2 (1,34)	149	112 (91,80)	10 (8,19)	122
Fibrosis pulmonar	--	--	---	124 (99,20)	1 (0,80)	125
Radiodermatitis	152 (98,70)	2 (1,29)	154	125 (99,20)	1 (0,79)	126
Estenosis traqueal	--	--	---	85 (98,83)	1 (1,16)	86

NSCLC, cáncer no microcítico; CTCAE, Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos; n, conteo de pacientes; --, sin datos.

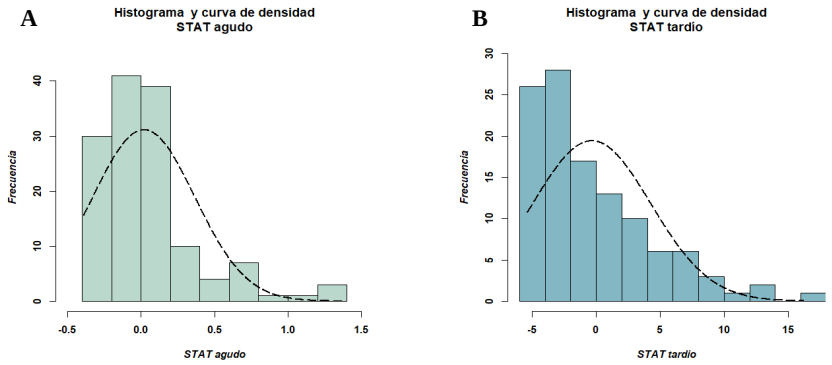


Figura 42. Histogramas y curvas de densidad del STAT agudo (A) y tardío (B) en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN.

En la ***Tabla 26*** se describen las covariables utilizadas en cada uno de los GWAS. Así como su asociación con la toxicidad; evaluada como el máximo grado CTCAE presentado durante todo el seguimiento (regresión logística univariable, se consideró significativos aquellos P valores < 0,05).

Tabla 26. Variables clínicas asociadas a los efectos adversos usadas como covariables en los GWAS en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN

Toxicidad	Covariable	OR (95% IC)	P valor
Hemorragia broncopulmonar	Dosis total RT	1,028 (1,006-1,050)	$1,09x10^{-02}$
	BED	1,014 (1,002-1,026)	$1,39x10^{-02}$
	Número de fracciones	1,043 (1,009-1,079)	$1,48x10^{-02}$
Fistula bronquial	Interrupción de la RT	1,907 (1,206-3,018)	$6,34x10^{-03}$
	DLCO/VA	1,012 (1,002-1,022)	$1,95x10^{-02}$
	Estadio clínico de nódulos	0,845 (0,717-0,996)	$4,76x10^{-02}$
Estenosis bronquial	Estadio pronóstico	1,414 (1,113-1,797)	$4,95x10^{-03}$
	Tx. inmunosupresores	9,124 (3,05-27,293)	$1,12x10^{-04}$
	FEV1 (%)	1,360 (1,094-1,691)	$6,31x10^{-03}$
	Dosis media de esófago	1,019 (1,001-1,037)	$3,75x10^{-02}$
Dolor de la pared del tórax	PTV	0,999 (0,999-0,999)	$1,26x10^{-02}$
	Dosis Max 1cc Corazón	0,993 (0,987-0,998)	$3,87x10^{-02}$
	Estatus funcional	0,685 (0,496-0,947)	$2,40x10^{-02}$
	Consumo tabaco (paq/año)	0,994 (0,990-0,997)	$5,11x10^{-03}$
	Edad	0,979 (0,963-0,994)	$1,43x10^{-02}$
Tos	V60% Esófago	1,017 (1,005-1,029)	$2,60x10^{-03}$
	Sexo	0,467 (0,308-0,709)	$4,60x10^{-04}$
	Estatus funcional	0,650 (0,479-0,883)	$6,39x10^{-03}$
	Dosis media de esófago	1,023 (1,007-1,039)	$6,37x10^{-03}$
	Cirugía	0,786 (0,651-0,949)	$1,34x10^{-02}$
	FEV1 (%)	0,990 (0,982-0,997)	$6,92x10^{-03}$
	V20% Pulmón	1,022 (1,004-1,040)	$1,89x10^{-02}$
	Estadio pronóstico	1,351 (1,087-1,679)	$7,28x10^{-03}$
Disfagia	V60% Esófago	1,017 (1,005-1,029)	$3,73x10^{-03}$
	Dosis media de pulmón	1,020 (1,010-1,030)	$9,60x10^{-05}$
	Quimioterapia	2,066 (1,229-3,474)	$6,84x10^{-03}$
	Número de fracciones	1,044 (1,010-1,080)	$1,15x10^{-02}$
	Edad	1,040 (1,006-1,076)	$2,17x10^{-02}$
	Cardiopatías	0,582 (0,380-0,890)	$1,35x10^{-02}$
	Estadio pronóstico	1,344 (1,081-1,671)	$8,22x10^{-03}$
	DLCO (%)	1,013 (1,005-1,021)	$9,27x10^{-04}$
Disnea	FEV1 (%)	0,988 (0,980-0,995)	$1,78x10^{-03}$
	V60% Esófago	1,016 (1,004-1,028)	$4,24x10^{-03}$
	Dosis media de Pulmón	1,052 (1,013-1,092)	$8,16x10^{-03}$
	IMC	1,044 (1,012-1,078)	$6,88x10^{-03}$
	PTV	1,001 (1,001-1,001)	$7,26x10^{-03}$
	Dosis total RT	1,031 (1,009-1,053)	$3,87x10^{-03}$
	Número de fracciones	1,048 (1,013-1,083)	$7,32x10^{-03}$
	Histología del tumor	0,816 (0,704-0,945)	$7,28x10^{-03}$
	BED	1,016 (1,004-1,028)	$4,80x10^{-03}$
	Cirugía	0,771 (0,638-0,930)	$7,37x10^{-03}$
Estenosis esofágica	DLCO (%)	1,021 (1,011-1,031)	$5,98x10^{-05}$
	Tx. Esteroides orales	2,491 (1,367-4,539)	$3,35x10^{-03}$
	V20% Pulmón	0,979 (0,960-0,998)	$2,86x10^{-02}$
	Estadio tumoral	0,830 (0,705-0,976)	$2,64x10^{-02}$

Toxicidad	Covariable	OR (95% IC)	P valor
Esofagitis	Lupus eritematoso sistémico	28,731 (4,275-193,082)	$6,99x10^{-04}$
	Dosis Max 1cc Esófago	1,017 (1,005-1,029)	$6,44x10^{-03}$
	EPOC	0,612 (0,425-0,882)	$9,30x10^{-03}$
	V60% Esófago	1,016 (1,004-1,028)	$6,81x10^{-03}$
Infarto agudo al miocardio	EPOC	1,909 (1,334-2,733)	$5,33x10^{-04}$
	Tx. IECA	2,309 (1,500-3,554)	$1,95x10^{-04}$
	Tx. antidiabético	2,286 (1,287-4,060)	$5,37x10^{-03}$
	Hipertensión	1,434 (1,038-1,982)	$3,02x10^{-02}$
Derrame pericárdico	V60% Esófago	1,014 (1,004-1,024)	$1,17x10^{-02}$
Neumonitis	Estadio pronóstico	1,355 (1,090-1,684)	$6,61x10^{-03}$
	Sitio del tumor	0,936 (0,877-0,998)	$4,30x10^{-02}$
	V40% Pulmón	1,029 (1,007-1,051)	$8,12x10^{-03}$
Fibrosis pulmonar	Cirugía	1,332 (1,106-1,605)	$2,90x10^{-03}$
	Artritis reumatoide	21,01 (7,362-59,955)	$5,52x10^{-08}$
	BED	0,985 (0,973-0,996)	$8,19x10^{-03}$
	Dosis total RT	0,973 (0,952-0,994)	$1,47x10^{-02}$
Radiodermatitis	Tx. amiodarona	11,45 (1,651-79,398)	$1,46x10^{-02}$
	Historia familiar de NSCLC	2,897 (1,600-5,248)	$6,12x10^{-04}$
Estenosis traqueal	Cirugía	1,494 (1,248-1,790)	$2,39x10^{-05}$
	V20% Pulmón	0,970 (0,953-0,987)	$1,86x10^{-03}$
	Dosis media de Pulmón	0,954 (0,922-0,986)	$7,23x10^{-03}$
	Consumo de alcohol	1,143 (1,002-1,303)	$4,62x10^{-02}$

RT, radioterapia; DLCO/VA, capacidad de difusión pulmonar corregido por el volumen alveolar; Tx, tratamiento; FEV1, volumen espiratorio forzado en el primer segundo; BED, dosis biológica equivalente; PTV, volumen blanco de planificación; paq, paquete de cigarrillos; Dosis Max 1cc, dosis máxima administrada en 1 centímetro cúbico del órgano de riesgo; V60%, volumen del órgano que recibe 60 Gy; V20% volumen del órgano que recibe 20 Gy; DLCO, capacidad de difusión pulmonar; IMC, índice de masa corporal; IECA, antihipertensivo del grupo de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; NSCLC, cáncer de pulmón no-microcítico.

En el GWAS en que se analizaron las puntuaciones STAT se incluyeron como covariables: sexo, dosis media de esófago y dosis media de pulmón por estar asociadas con $STAT_{tardío}$ (P valor = $3,21x10^{-02}$, $4,28x10^{-02}$ y $3,75x10^{-05}$ respectivamente). Se incluyeron también como covariables el uso de quimioterapia, el estatus de fumador y el porcentaje del volumen espiratorio forzado en el primer minuto por considerarse variables de relevancia clínica. [304,305] Además, se incluyó la graduación de síntomas iniciales antes de la radioterapia ($STAT_{baseline}$) dentro del análisis.

4.2.2 GWAS en toxicidad aguda a la radioterapia en pacientes NSCLC

La toxicidad global aguda se evaluó con todas las toxicidades disponibles mediante el cálculo de la puntuación $STAT_{agudo}$ en 135 pacientes. En cuanto a las toxicidades agudas analizadas de forma individual, hubo en general baja incidencia y el número de pacientes varió dependiendo de la toxicidad y las covariables utilizadas para cada GWAS (***Tabla 26***), las tres toxicidades con más casos, definidos como toxicidad grado CTCAE ≥ 2, fueron: i) tos, que presentó 19 casos de los 130 pacientes incluidos en el análisis de esta toxicidad, ii) disnea, con 14 casos de los 114 pacientes incluidos; y iii) esofagitis, con 22 casos de los 146 pacientes incluidos.

4.2.2.1 GWAS en $STAT_{agudo}$ para evaluar la toxicidad global inducida por la radioterapia en pacientes NSCLC

Se realizó un GWAS con un modelo de regresión lineal multivariable. Ninguno de los SNPs se asoció de forma estadísticamente significativa con el fenotipo (P valor $\leq 5 \times 10^{-8}$). Con el GWAS se identificaron nueve *loci* asociados con el $STAT_{agudo}$ con un umbral de P valor $\leq 10^{-7}$, (***Figura 43***) que componen 12 señales independientes de acuerdo al análisis de haplotipos. (***Figura 44***) El SNP con el P valor más significativo se encuentra en el *locus* 3q25.1 (P valor = $1{,}52 \times 10^{-7}$, con un coeficiente lineal de regresión *Beta* de -0,410 y un error estándar de 0,073), estas asociaciones mejoran cuando se excluye la covariable $STAT_{baseline}$, obteniendo en el caso del *locus* 3q25.1, un P valor = $6{,}19 \times 10^{-8}$. Otros dos SNPs se localizan en el mismo *locus*, sin embargo, no pertenecen al mismo haplotipo y representan tres señales distintas. (***Figura 44B***) El resto de los SNPs identificados se encuentran en los *loci*: 2p24.1, 3q25.1, 6q22.31, 8q12.3, 9q.32, 12p12.2, 12p14.1, 16p.13.2 y 22q12.1. **(*Tabla 27*)** En el análisis de componentes principales, no identificamos subestructuras en la población de acuerdo a la distribución de los puntajes $STAT_{agudo}$. (***Figura 45***)

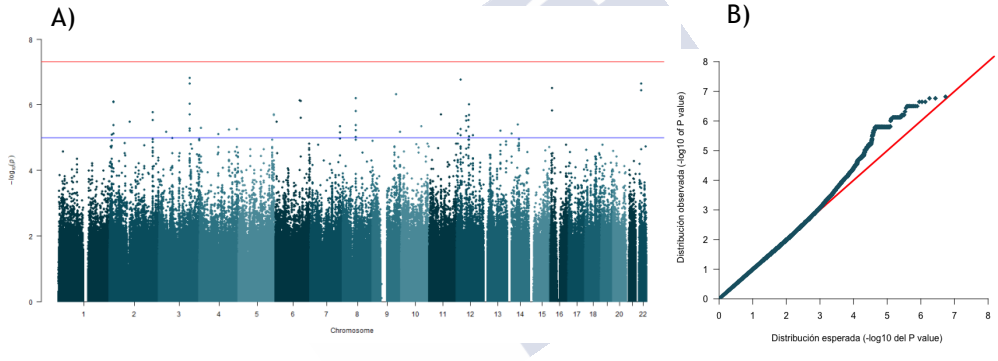


Figura 43. Visualización de los resultados del GWAS $STAT_{agudo}$ en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN.

Los P valores obtenidos de los análisis se grafican mediante: A) Manhattan plot, en el eje de ordenadas se encuentra el -log del P valor de cada uno de los SNPs, en el eje de abscisas se encuentran las posiciones de los SNPs, cada tono representa a un cromosoma distinto, la línea azul señala el P valor 10^{-05}, la línea roja señala el P valor 10^{-08}; y B) Q-Q plot, en el eje de ordenadas se presenta la distribución observada de los P valores en logaritmo negativo (-log); en el eje de abscisas, la distribución esperada de los P valores en -log, y la línea roja señala el ángulo de referencia a 45°. El factor de inflación genétia *lambda* = 0,99.

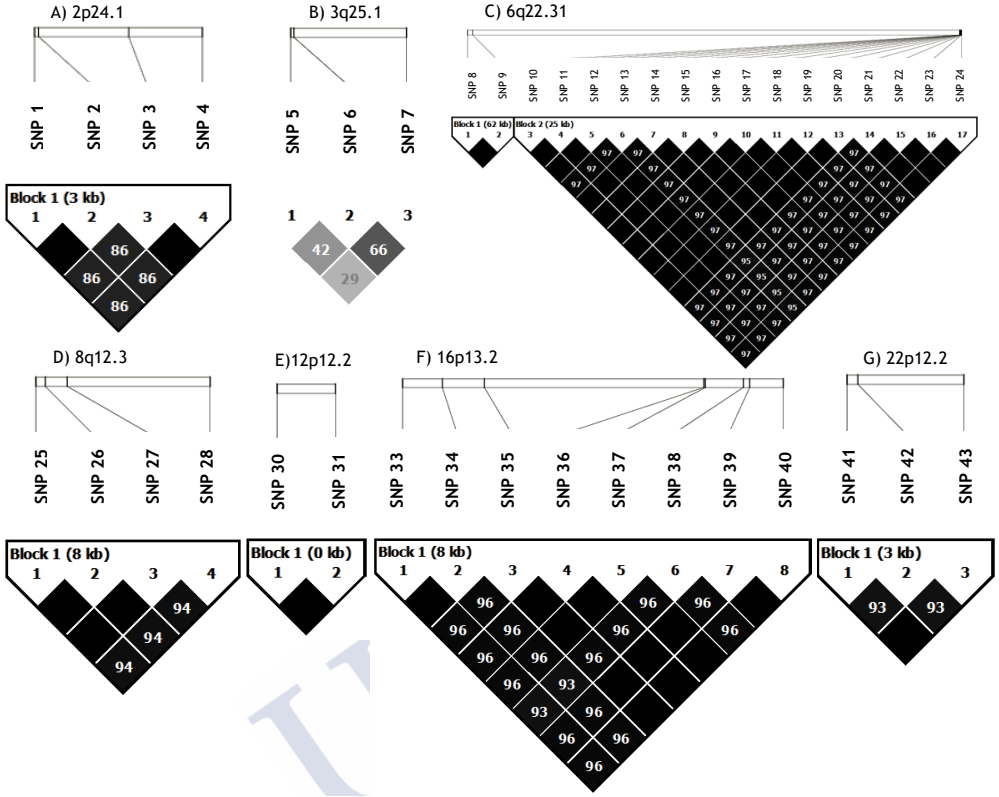


Figura 45. Análisis de haplotipos de los SNPs más significativos identificadas en asociación con el $STAT_{agudo}$ en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN.

Desequilibrio de ligamiento por pares entre los SNPs (r^2). Los valores de r^2 se indican dentro de los cuadrados, y el tono más oscuro indica valores de r^2 más alto. A) 2p24.1, B) 3q25.1, C) 6q22.31, D) 8q12.3, E)12p12.2, F)16p13.2 y G) 22p12.2.

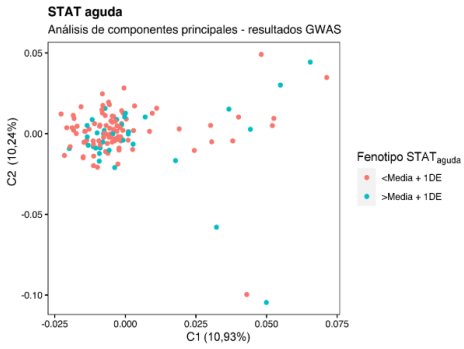


Figura 44. Análisis de componentes principales de los resultados de GWAS-$STAT_{agudo}$ en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN.

El color rosa representa a los pacientes con un puntaje $STAT_{agudo}$ menor que la media + 1 desviación estándar (DE) y en verde los pacientes con puntaje $STAT_{agudo}$ mayor que la media + 1DE.

Tabla 27. ***Loci*** **asociados con toxicidad global aguda evaluado como** $STAT_{agudo}$ **en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN**

Locus	SNP	Bloque haplotipo	Geno / imp	Al Ref/Alt	*Beta*	SE	P valor
2p24.1	SNP1	1	imp	C/T	0,435	0,084	$8,34x10^{-07}$
	SNP2	1	geno	A/G	0,435	0,084	$8,34x10^{-07}$
	SNP3	1	imp	A/T	0,468	0,090	$8,06x10^{-07}$
	SNP4	1	imp	G/A	0,468	0,090	$8,06x10^{-07}$
3q25.1	SNP5	2	imp	T/C	-0,227	0,044	$9,30x10^{-07}$
	SNP6	3	imp	G/A	-0,338	0,062	$2,28x10^{-07}$
	SNP7	4	geno	G/T	-0,411	0,074	$1,52x10^{-07}$
6q22.31	SNP8	5	imp	G/C	-0,358	0,069	$7,48x10^{-07}$
	SNP9	5	geno	A/G	-0,358	0,069	$7,48x10^{-07}$
	SNP10	6	imp	C/A	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP11	6	imp	G/A	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP12	6	imp	T/A	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP13	6	imp	C/T	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP14	6	imp	C/T	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP15	6	imp	A/G	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP16	6	imp	G/A	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP17	6	geno	G/A	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP18	6	imp	C/G	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP19	6	imp	C/G	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP20	6	imp	C/G	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP21	6	imp	C/T	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP22	6	imp	A/G	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP23	6	imp	A/C	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
	SNP24	6	imp	T/C	0,329	0,063	$7,67x10^{-07}$
8q12.3	SNP25	7	imp	G/A	0,406	0,077	$6,28x10^{-07}$
	SNP26	7	imp	T/G	0,406	0,077	$6,28x10^{-07}$
	SNP27	7	imp	A/T	0,406	0,077	$6,28x10^{-07}$
	SNP28	7	imp	T/C	0,406	0,077	$6,28x10^{-07}$
9q31.3	SNP29	8	imp	C/G	0,321	0,060	$4,84x10^{-07}$
12p12.2	SNP30	9	imp	A/T	0,264	0,048	$1,73x10^{-07}$
	SNP31	9	imp	A/G	0,264	0,048	$1,73x10^{-07}$
12q14.1	SNP32	10	imp	C/A	0,377	0,073	$9,96x10^{-07}$
16p13.2	SNP33	11	imp	T/C	0,360	0,067	$3,17x10^{-07}$
	SNP34	11	imp	T/G	0,360	0,067	$3,17x10^{-07}$
	SNP35	11	imp	C/T	0,360	0,067	$3,17x10^{-07}$
	SNP36	11	imp	A/G	0,360	0,067	$3,17x10^{-07}$
	SNP37	11	imp	G/A	0,360	0,067	$3,17x10^{-07}$
	SNP38	11	imp	C/A	0,360	0,067	$3,17x10^{-07}$
	SNP39	11	imp	T/C	0,360	0,067	$3,17x10^{-07}$
	SNP40	11	imp	C/T	0,360	0,067	$3,17x10^{-07}$
22q12.1	SNP41	12	imp	C/T	0,628	0,115	$2,27x10^{-07}$
	SNP42	12	imp	T/A	0,650	0,121	$3,66x10^{-07}$
	SNP43	12	imp	C/T	0,628	0,115	$2,27x10^{-07}$

SNP, polimorfismo de un nucleótido; Geno, genotipado; Imp, imputado; Al, alelo; Ref, alelo de referencia; Alt, alelo alterado; SE, error estándar; en rojo, el P valor más singificativo identificado en el GWAS.

4.2.2.2 GWAS en toxicidades agudas inducidas por la radioterapia en pacientes NSCLC.

Se analizó la presentación aguda de las toxicidades: esofagitis, tos y disnea mediante GWAS usando un modelo de regresión logística multivariable (***ANEXO 8***), incluyendo como fenotipo el grado de toxicidad CTCAE < 2 comparado con aquellos pacientes con grado de toxicidad CTCAE ≥ 2. Se incluyeron como covariables aquellas determinadas en el análisis de regresión univariable para cada una de las toxicidades. (***Tabla 26***)

La toxicidad que tuvo el P valor más bajo fue esofagitis, un SNP en el *locus* 1p22.2 con P valor = 9,66 x 10^{-07}. La señal identificada junto con este SNP está compuesta por otros 21 SNPs con un P valor ≤ 10^{-06}. (***Tabla 28, ANEXO 8***)

Tabla 28. SNPs del *locus* 1q22.1 en el GWAS de esofagitis aguda inducida por la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN

SNP-ID	SNP Posición	Geno / imp	Al Ref/Alt	MAF	P valor	Casos (FA)	Ctrl (FA)
rs12126957	90553637	Geno	C/T	0,09	3,00X10^{-06}	22 (0,29)	124 (0,05)
rs12127077	90554040	Imp	C/T	0,09	3,00X10^{-06}	22 (0,29)	124 (0,05)
1:90561739	90561739	Imp	C/T	0,09	2,99X10^{-06}	22 (0,29)	124 (0,05)
rs11577754	90562488	Imp	A/T	0,09	2,99X10^{-06}	22 (0,29)	124 (0,05)
rs12122038	90565326	Imp	A/G	0,09	2,99X10^{-06}	22 (0,29)	124 (0,05)
rs12122986	90568148	Imp	G/A	0,09	9,66X10^{-07}	22 (0,31)	124 (0,05)
rs10922762	90571911	Imp	A/T	0,08	1,92X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs6681320	90573274	Imp	G/A	0,08	2,04X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs10493836	90574778	Imp	A/G	0,08	2,21X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs10922763	90574943	Imp	T/C	0,08	2,23X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs55804804	90575447	Imp	C/G	0,08	2,28X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs72718309	90575849	Imp	A/G	0,08	2,36X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs61773062	90575898	Imp	A/G	0,08	2,38X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs10922765	90579427	Imp	C/T	0,08	3,18X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs10922766	90579999	Geno	G/A	0,08	3,38X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs12128620	90581678	Imp	A/T	0,08	2,31X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs61773064	90582180	Imp	T/C	0,08	2,34X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs61688256	90582188	Imp	T/G	0,08	3,49X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs12130539	90582761	Imp	T/C	0,08	3,53X10^{-06}	22 (0,27)	124 (0,04)
rs4658352	90585109	Imp	C/T	0,08	4,20X10^{-06}	22 (0,26)	124 (0,04)
rs56179114	90586116	Imp	A/G	0,08	5,77X10^{-06}	22 (0,25)	124 (0,04)

SNP-ID, polimorfismo de un nucleótido; Geno, genotipado; Imp, imputado; Al, alelo; Ref, alelo de referencia; Alt, alelo alterado; MAF, frecuencia del alelo menor; FA, frecuencia alélica; Ctrl, controles. En rojo, el P valor más singificativo identificado en el GWAS.

Identificamos, además, otros 18 *loci* asociados con la esofagitis aguda con un P valor ≤ 10^{-05}, el SNP con el P valor más bajo de cada uno de estos *loci* se describe en la ***Tabla 29***.

Tabla 29. *Loci* identificados por medio de GWAS asociados con esofagitis aguda en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN con P valor ≤ 10^{-05}

SNP-ID	*Locus*	SNP posición	Geno / imp	Al Ref/Alt	MAF	P valor	Casos (FA)	Ctrl (FA)
rs4078261	1p34.3	36980623	Geno	A/T	0,095	$4,35X10^{-05}$	22 (0,28)	124 (0,06)
rs56236159	2p25.3	3636478	Imp	T/G	0,144	$3,82X10^{-05}$	22 (0,31)	124 (0,11)
rs16845011	2q32.3	196970132	Geno	T/C	0,188	$5,56X10^{-05}$	22 (0,43)	124 (0,14)
rs4686973	3q28	188268934	Imp	T/A	0,485	$5,50X10^{-05}$	22 (0,81)	124 (0,46)
rs2913474	5q35.2	173753932	Imp	C/A	0,120	$4,56X10^{-05}$	22 (0,29)	124 (0,08)
rs6597358	6p24.3	8855105	Geno	A/G	0,229	$6,96X10^{-05}$	22 (0,50)	124 (0,81)
rs77581947	6q14.1	89428343	Imp	A/G	0,068	$2,03X10^{-05}$	22 (0,22)	124 (0,04)
rs143319035	7q32.3	131598900	Imp	A/G	0,073	$1,84X10^{-05}$	22 (0,22)	124 (0,04)
rs1108845	7q36.1	151522715	Imp	C/T	0,070	$7,86X10^{-05}$	22 (0,17)	124 (0,05)
rs2976573	8q24.22	134388905	Imp	C/T	0,333	$8,88X10^{-05}$	22 (0,59)	124 (0,28)
rs6474805	9p23	14029188	Imp	A/C	0,175	$2,03X10^{-05}$	22 (0,57)	124 (0,86)
rs112116012	12p13.1	12922049	Imp	T/A	0,102	$9,44X10^{-05}$	22 (0,27)	124 (0,07)
rs7305202	12q24.33	132058804	Imp	C/T	0,370	$6,86X10^{-05}$	22 (0,65)	124 (0,32)
rs9564715	13q21.33	71128858	Imp	C/T	0,134	$8,35X10^{-05}$	22 (0,31)	124 (0,10)
rs11081643	18q23	76424290	Imp	T/G	0,104	$8,94X10^{-05}$	22 (0,25)	124 (0,07)
rs274164	19q13.43	56686024	Imp	C/T	0,136	$2,19X10^{-05}$	22 (0,36)	124 (0,09)
rs73105013	20q11.22	33144812	Imp	T/C	0,095	$5,12X10^{-05}$	22 (0,29)	124 (0,06)
rs1328758	20q13.33	60042250	Imp	C/T	0,236	$4,81X10^{-05}$	22 (0,52)	124 (0,18)

SNP-ID, polimorfismo de un nucleótido; Geno, genotipado; Imp, imputado; Al, alelo; Ref, alelo de referencia; Alt, alelo alterado; MAF, frecuencia del alelo menor; FA, frecuencia alélica; Ctrl, controles.

Identificamos mediante el GWAS para la tos como complicación aguda el *locus* 21q22.12 con el P valor más bajo, (***ANEXO 8***) en este *locus* se encuentran 17 SNPs con P valor ≤ 10^{-05}. (***Tabla 30***)

Tabla 30. SNPs del *locus* 21q22.12 en el GWAS de tos aguda inducida por la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN

SNP-ID	SNP posición	Geno / imp	Al Ref/Alt	MAF	P valor	Casos (FA)	Ctrl (FA)
rs28626094	36472918	Imp	G/A	0,24	$2,17X10^{-05}$	19 (0,60)	111 (0,18)
rs9983374	36474453	Imp	C/T	0,24	$1,03X10^{-05}$	19 (0,63)	111 (0,17)
rs2834767	36475678	Geno	C/T	0,25	$1,01X10^{-05}$	19 (0,63)	111 (0,18)
rs9984968	36477967	Imp	T/A	0,24	$9,95X10^{-06}$	19 (0,63)	111 (0,18)
rs2834769	36478973	Imp	C/T	0,24	$1,86X10^{-05}$	19 (0,60)	111 (0,18)
rs9976395	36479077	Imp	C/A	0,23	$2,47X10^{-05}$	19 (0,57)	111 (0,17)
rs9984842	36479722	Imp	C/T	0,24	$1,85X10^{-05}$	19 (0,60)	111 (0,18)
rs2834773	36486190	Geno	A/G	0,29	$9,10X10^{-05}$	19 (0,60)	111 (0,23)
rs2834775	36487426	Imp	A/G	0,29	$9,27X10^{-05}$	19 (0,60)	111 (0,23)
rs34328777	36489438	Imp	C/T	0,26	$3,50X10^{-05}$	19 (0,60)	111 (0,20)
rs2834778	36489487	Imp	G/A	0,28	$9,35X10^{-05}$	19 (0,60)	111 (0,23)
rs9977375	36489811	Imp	A/G	0,29	$9,55X10^{-05}$	19 (0,60)	111 (0,23)
rs2834780	36491484	Imp	A/C	0,29	$9,90X10^{-05}$	19 (0,60)	111 (0,23)
rs9982749	36494739	Imp	T/C	0,26	$3,89X10^{-05}$	19 (0,59)	111 (0,20)
rs9980702	36512443	Imp	C/T	0,32	$6,05X10^{-05}$	19 (0,65)	111 (0,27)
rs2834797	36514216	Imp	C/T	0,32	$7,37X10^{-05}$	19 (0,65)	111 (0,27)
rs9975836	36514505	Imp	C/T	0,32	$7,45X10^{-05}$	19 (0,65)	111 (0,27)
rs2834799	36514680	imp	T/C	0,32	$7,46X10^{-05}$	19 (0,65)	111 (0,27)

SNP-ID, polimorfismo de un nucleótido; Geno, genotipado; Imp, imputado; Al, alelo; Ref, alelo de referencia; Alt, alelo alterado; MAF, frecuencia del alelo menor; FA, frecuencia alélica; Ctrl, controles. En rojo, el P valor más singificativo identificado en el GWAS.

Identificamos, además, otros 10 *loci* asociados con la presencia de tos como complicación aguda con P valor ≤ 10^{-05}, el SNP con el P valor más bajo de cada uno de estos *loci* se describe en la ***Tabla 31***.

Tabla 31. *Loci* identificados por medio de GWAS asociados con la presencia de tos aguda en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN con P valor ≤ 10^{-05}

SNP-ID	*Locus*	SNP posición	Geno / imp	Al Ref/Alt	MAF	P valor	Casos (FA)	Ctrl (FA)
rs79520137	1q24.3	171602376	imp	G/A	0,10	8,07X10^{-05}	19 (0,31)	111 (0,06)
rs62167968	2q21.2	135050956	imp	C/T	0,07	3,70X10^{-05}	19 (0,24)	111 (0,04)
rs1250033	2q35	216507136	Geno	G/A	0,36	7,69X10^{-05}	19 (0,36)	111 (0,68)
rs55792911	4p15.2	24508303	imp	T/C	0,35	9,46X10^{-05}	19 (0,57)	111 (0,30)
rs35366900	6p22.3	20161944	imp	G/C	0,16	5,51X10^{-05}	19 (0,35)	111 (0,12)
rs56345650	6q23.2	133830320	imp	T/A	0,10	5,15X10^{-05}	19 (0,31)	111 (0,06)
rs2072424	7p14.3	31829213	imp	T/C	0,07	4,19X10^{-05}	19 (0,25)	111 (0,04)
rs61674463	14q12	24462673	imp	C/G	0,15	3,04X10^{-05}	19 (0,35)	111 (0,11)
rs9889220	16q24.1	84233934	imp	T/G	0,27	5,36X10^{-05}	19 (0,41)	111 (0,78)
rs10411831	19q13.42	55158063	imp	C/T	0,08	2,72X10^{-05}	19 (0,26)	111 (0,04)

SNP-ID, polimorfismo de un nucleótido; Geno, genotipado; Imp, imputado; Al, alelo; Ref, alelo de referencia; Alt, alelo alterado; MAF, frecuencia del alelo menor; FA, frecuencia alélica; Ctrl, controles.

El P valor más bajo identificado en el GWAS para disnea fue de 4,94 x 10^{-05} para el SNP rs79440489 en el *locus* 13q14.3; (***ANEXO 8***) en éste mismo *locus* también se identificó el SNP rs9596242 (P valor = 5,31 x 10^{-05}).

Identificamos, además, otros cuatro *loci* con P valor ≤ 10^{-05} asociados con disnea aguda, el SNP con el P valor más bajo de cada uno de estos *loci* se describe en la ***Tabla 32.***

Tabla 32. *Loci* identificados por medio de GWAS asociados con disnea aguda en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN con P valor ≤ 10^{-05}

SNP-ID	*Locus*	SNP posición	Geno / imp	Al Ref/Alt	MAF	P valor	Casos (FA)	Ctrl (FA)
rs62204076	215816829	2q35	imp	G/A	0,05	6,93x10^{-05}	14 (0,23)	100 (0,02)
rs62310625	89100336	4q22.1	imp	C/T	0,10	8,58x10^{-05}	14 (0,40)	100 (0,05)
rs79440489	50738924	13q14.3	imp	A/G	0,05	4,94x10^{-05}	14 (0,24)	100 (0,02)
rs113382624	27719254	14q12	imp	C/A	0,08	9,30x10^{-05}	14 (0,28)	100 (0,05)
rs12926610	68548709	14q22.1	imp	G/A	0,05	8,45x10^{-05}	14 (0,26)	100 (0,02)

SNP-ID, polimorfismo de un nucleótido; Geno, genotipado; Imp, imputado; Al, alelo; Ref, alelo de referencia; Alt, alelo alterado; MAF, frecuencia del alelo menor; FA, frecuencia alélica; Ctrl, controles.

Comparamos los *loci* identificados en cada uno de los análisis para saber si existen *loci* compartidos entre las diferentes toxicidades. La disnea y la tos agudas comparten dos *loci*, el *locus* 2q35 y el 14q12. Analizamos los SNPs con el P valor más bajo de las toxicidades que comparten *locus* utilizando HaploReg v4.1 y comprobamos que en cada uno de los locus compartidos, los SNPs pertenecen a señales independientes, relacionadas con genes distintos. Analizamos todos los SNPs que integran la señal que se identificó en asociación con los fenotipos, para saber si pertenecían a bloques de haplotipos compartidos utilizando Haploview y confirmamos que las variantes se comportan como bloques de haplotipos distintos, por lo que no existen *loci* compartidos entre los fenotipos estudiados de toxicidad a la radiación aguda. (***Figura 46***)

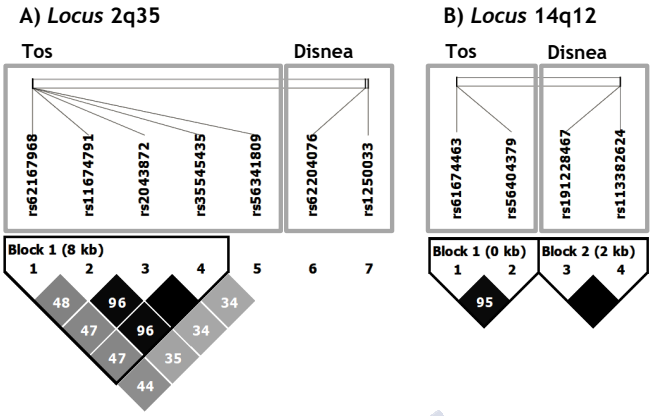


Figura 46. Análisis de haplotipos de *loci* compartidos en toxicidades agudas.
Los valores de r^2 (desequilibrio de ligamiento por pares entre los SNPs) se indican dentro de los cuadrados, y el tono más oscuro indica valores de r^2 más alto. A) *Locus* 2q35 identificado en asociación con las toxicidades: Tos aguda y Disnea aguda; B) *Locus* 14q12 en asociación con las toxicidades: Tos aguda y Disnea aguda.

4.2.3 GWAS en toxicidad tardía a la radioterapia en pacientes NSCLC

El cálculo de la toxicidad global tardía incluyó todas las toxicidades disponibles para obtener la puntuación $STAT_{tardío}$ en 113 pacientes. Se incluyó como covariable la graduación de los síntomas iniciales antes de la radioterapia ($STAT_{baseline}$). En cuanto a las toxicidades evaluadas de forma individual, hubo mayor incidencia que en las toxicidades agudas (***Tabla 25***), sin embargo, el número de casos sigue siendo bajo, cada toxicidad tiene un número de pacientes distinto dependiendo de las covariables disponibles para realizar cada GWAS. Las toxicidades con más casos, definidos como aquellos pacientes con una toxicidad con grado CTCAE ≥ 2, fueron disnea, neumonitis, hemorragia broncopulmonar y derrame pericárdico; con una incidencia de 40,62%; 8,19%; 87% y 7,43% respectivamente.

4.2.3.1 GWAS en $STAT_{tardío}$ para evaluar la toxicidad global inducida por la radioterapia en pacientes NSCLC

Se realizó un GWAS con un modelo de regresión lineal multivariable. Dos *locus* se encuentran asociados significativamente con el $STAT_{tardío}$, el primero es el *locus* 1p21.2 con P valor = $3,47 \times 10^{-08}$ con un coeficiente lineal de regresión *Beta* de 0,332 y un error estándar de 0,055; el segundo *locus* es el 12p13.31 con P valor = $5,98 \times 10^{-08}$ con un coeficiente *Beta* de 0,512 y un error estándar de 0,087. (***Figura 47***) Al igual que en el caso de la toxicidad global aguda, la asociación con la toxicidad global tardía mejora cuando se excluye del modelo como covariable el $STAT_{baseline}$, así el *locus* 1p21.2 tiene un P valor = $2,87 \times 10^{-08}$, y el *locus* 12.13.31 tiene un P valor = $4,92 \times 10^{-08}$. En el análisis de componentes principales, no identificamos subestructuras en la población de acuerdo a la distribución de los puntajes $STAT_{tardío}$. (***Figura 48***)

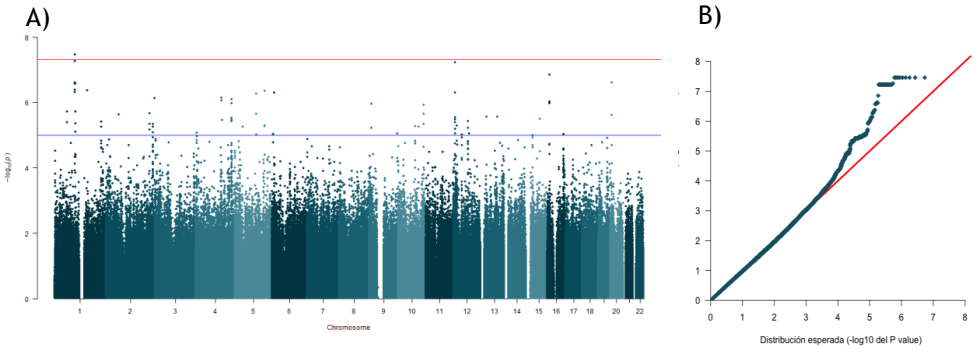


Figura 48. Visualización de los resultados del GWAS $STAT_{tardío}$ en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN.

Los P valores obtenidos de los análisis se grafican mediante: A) Manhattan plot, en el eje de ordenadas se encuentra el logaritmo negativo (-log) del P valor de cada uno de los SNPs, en el eje de abscisas se encuentran las posiciones de los SNPs, cada tono representa a un cromosoma distinto, la línea azul señala el P valor 10^{-05}, la línea roja señala el P valor 10^{-08}; y B) Q-Q plot, en el eje de ordenadas se presenta la distribución observada de los P valores en -log; en el eje de abscisas, la distribución esperada de los P valores en -log, y la línea roja señala el ángulo de referencia a 45°. El factor de inflación genética *lambda* = 0,974.

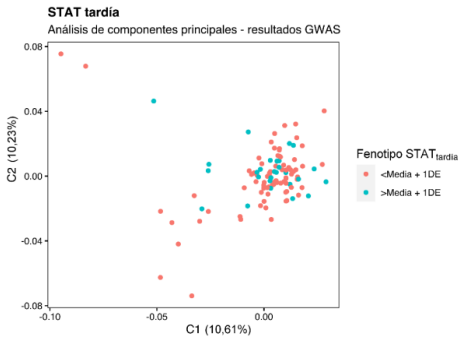


Figura 47. Análisis de componentes principales de los resultados de GWAS-$STAT_{tardío}$ en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN.

El color rosa representa a los pacientes con un puntaje $STAT_{agudo}$ menor que la media + 1 desviación estándar (DE) y en verde los pacientes con puntaje $STAT_{agudo}$ mayor que la media + 1DE.

Además, se identificaron otros nueve *loci* asociados con el $STAT_{tardío}$ con P valor ≤ 10^{-07}. Los *loci* son 1p23.1, 2q37.3, 4q28.1, 4q34.2, 5q21.3, 5q32, 6p24.1, 16p13.13 y 20p12.3. (***Tabla 33***)

Tabla 33. *Loci* asociados con toxicidad global tardia evaluado como $STAT_{tardio}$ en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN

Locus	SNP	Geno / imp	Al Ref/Alt	*Beta*	SE	P valor
1p21.2	SNP1	imp	G/A	0,305	0,057	$4,75x10^{-07}$
	SNP2	imp	C/G	0,332	0,056	$3,47x10^{-08}$
	SNP3	imp	C/A	0,349	0,063	$2,43x10^{-07}$
	SNP4	imp	T/C	0,349	0,063	$2,43x10^{-07}$
	SNP5	imp	G/C	0,349	0,063	$2,43x10^{-07}$
	SNP6	imp	T/C	0,332	0,056	$3,47x10^{-08}$
	SNP7	imp	A/G	0,332	0,056	$3,47x10^{-08}$
	SNP8	imp	A/T	0,332	0,056	$3,47x10^{-08}$
	SNP9	imp	C/T	0,332	0,056	$3,47x10^{-08}$
	SNP10	imp	A/G	0,334	0,061	$2,63x10^{-07}$
	SNP11	imp	A/C	0,334	0,061	$2,63x10^{-07}$
	SNP12	imp	T/A	0,332	0,056	$3,47x10^{-08}$
	SNP13	geno	C/T	0,332	0,056	$3,47x10^{-08}$
	SNP14	imp	T/A	0,332	0,056	$3,47x10^{-08}$
	SNP15	imp	A/G	0,297	0,055	$4,20x10^{-07}$
	SNP16	imp	A/G	0,332	0,056	$3,47x10^{-08}$
	SNP17	imp	T/C	0,404	0,069	$5,47x10^{-08}$
	SNP18	imp	T/C	0,675	0,123	$2,66x10^{-07}$
1q23.1	SNP19	imp	A/G	0,441	0,082	$4,33x10^{-07}$
2q37.3	SNP20	imp	A/G	0,795	0,151	$7,36x10^{-07}$
	SNP21	imp	G/A	0,795	0,151	$7,36x10^{-07}$
	SNP22	imp	G/A	0,795	0,151	$7,36x10^{-07}$
4q28.1	SNP23	imp	C/T	0,216	0,041	$7,29x10^{-07}$
	SNP24	imp	A/T	0,279	0,053	$8,88x10^{-07}$
4q34.1	SNP25	imp	C/T	0,215	0,041	$8,21x10^{-07}$
	SNP26	imp	C/T	0,215	0,041	$8,21x10^{-07}$
5q21.3	SNP27	imp	G/T	0,365	0,068	$5,51x10^{-07}$
	SNP28	imp	T/C	0,365	0,068	$5,51x10^{-07}$
5q32	SNP29	geno	C/T	-0,357	0,066	$4,42x10^{-07}$
6p24.1	SNP30	geno	G/A	0,245	0,046	$5,01x10^{-07}$
12p13.31	SNP31	imp	T/C	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP32	imp	G/T	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP33	imp	A/G	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP34	imp	T/C	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP35	imp	G/A	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP36	geno	G/A	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP37	imp	A/G	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP38	imp	C/T	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP39	imp	C/T	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP40	imp	C/T	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP41	imp	C/A	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP42	imp	A/C	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP43	geno	C/T	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP44	imp	C/A	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP45	geno	C/T	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP46	imp	A/G	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP47	imp	A/G	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP48	imp	A/C	0,512	0,088	$5,98x10^{-08}$
	SNP49	imp	G/C	0,456	0,085	$5,03x10^{-07}$
16p13.13	SNP50	imp	G/A	0,372	0,066	$1,40x10^{-07}$
	SNP51	imp	G/T	0,365	0,070	$9,92x10^{-07}$
	SNP52	imp	G/A	0,378	0,073	$9,37x10^{-07}$
	SNP53	imp	C/A	0,378	0,073	$9,37x10^{-07}$
20p12.3	SNP54	imp	A/T	0,512	0,093	$2,44x10^{-07}$

SNP, polimorfismo de un nucleótido; Geno, genotipado; Imp, imputado; Al, alelo; Ref, alelo de referencia; Alt, alelo alterado; SE, error estándar.
En rojo, el P valor más singificativo identificado en el GWAS.

Llevamos a cabo un análisis de haplotipos de las regiones con los SNPs significativos e identificamos que 16 de los 18 SNPs del *locus* 1p21.2 asociados con toxicidad global tardía, pertenecen al mismo bloque de desequilibrio de ligamiento. (***Figura 49A***) El segundo grupo de 19 SNPs del *locus* 12p13.31 también conforman un bloque de desequilibrio de ligamiento. (**Figura 49B**)

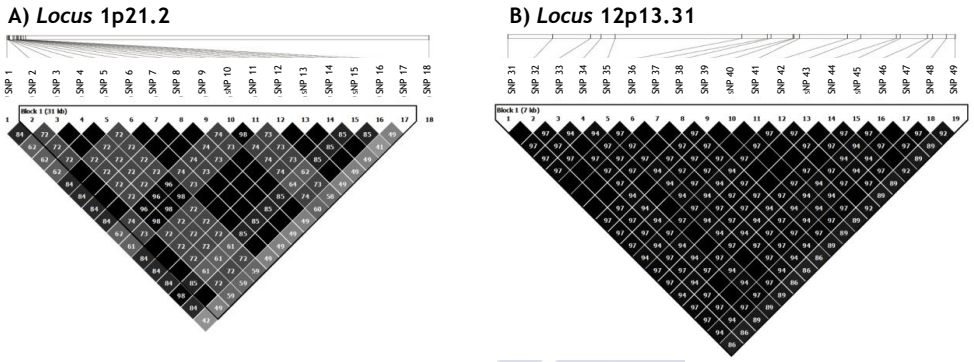


Figura 49. Análisis de haplotipos de los SNPs más significativos identificadas en asociación con el $STAT_{tardio}$ en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN.
Desequilibrio de ligamiento por pares entre los SNPs (r^2). Los valores de r^2 se indican dentro de los cuadrados, y el tono más oscuro indica valores de r^2 más alto. A) *Locus* 2q35, bloque de desequilibrio de ligamiento de 16 SNPs de 18; B) *locus* 12p13.31, bloque de desequilibrio de ligamiento de los 19 SNPs.

Ninguno de los *loci* asociados con $STAT_{tardío}$ coinciden con los *loci* identificados en el GWAS para el $STAT_{agudo}$. (***Figura 50***)

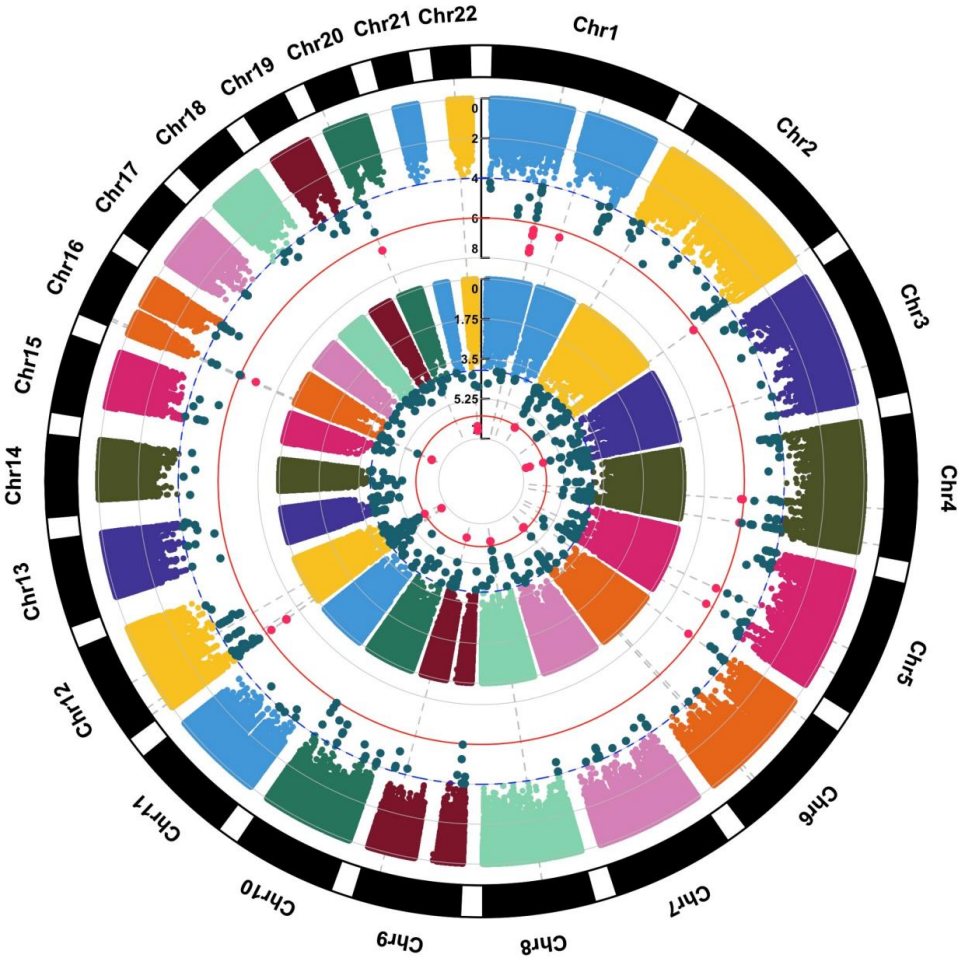


Figura 50. Manhattan *plot* circular de los resultados de los GWAS del $STAT_{agudo}$ y $STAT_{tardío}$ en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN.

Plot interno ($STAT_{agudo}$); *plot* externo ($STAT_{tardío}$); la línea roja marca el P valor $\leq 10^{-07}$ y los SNPs que superan esta línea se encuentran en color rosa; la línea azul marca el P valor $\leq 10^{-05}$ y los SNPs que la superan están señalados en cian oscuro. La línea punteada gris señala el *locus* de aquellos SNPs con P valor $\leq 10^{-07}$ a través de los dos Manhattan *plots*.

4.2.3.2 GWAS en toxicidades tardías inducidas por la radioterapia en pacientes NSCLC

Estudiamos de forma independiente las toxicidades tardías utilizando un modelo de regresión logística multivariable. Se analizaron la hemorragia broncopulmonar, derrame pericárdico, disnea y neumonitis y las covariables que se encontraron en asociación con cada uno de los fenotipos. (***Tabla 26***) Ninguna de las toxicidades superó el P valor de 10^{-05}. ***(ANEXO 9***) Para la hemorragia broncopulmonar identificamos cuatro *loci*, el P valor más bajo se identificó en el *loci* 6p25.3 (P = $3{,}85 \times 10^{-05}$), para derrame pericárdico seis *loci*, para disnea encontramos diez *loci* y para neumonitis un *locus*. (***Tabla 34, ANEXO 9***)

Tabla 34. *Loci* identificados por GWAS en asociación con las toxicidades tardías individuales en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN

Toxicidad	SNP-ID	Locus	SNP posición	Geno / imp	Al Ref/Alt	MAF	P valor	Casos (FA)	Ctrl (FA)
Hemorragia b.pulmonar	rs74195719	6p25.3	695026	imp	G/A	0,07	$3{,}85X10^{-05}$	10 (0,35)	117 (0,05)
	rs9321181	6q23.1	130105128	imp	G/A	0,07	$9{,}08X10^{-05}$	10 (0,32)	117 (0,04)
	rs140048707	14q32.2	99446042	imp	C/T	0,07	$3{,}59X10^{-05}$	10 (0,31)	117 (0,04)
	rs139012432	16p13.2	9033796	imp	A/T	0,07	$7{,}35X10^{-05}$	10 (0,40)	117 (0,04)
Derrame pericárdico	rs116742745	2p16.1	57459668	imp	C/T	0,06	$3{,}56X10^{-05}$	9 (0,31)	112 (0,03)
	rs75696774	3p24.3	16397921	imp	C/T	0,08	$5{,}51X10^{-05}$	9 (0,38)	112 (0,05)
	rs113247540	4q12	55507396	imp	A/G	0,06	$4{,}49X10^{-05}$	9 (0,33)	112 (0,03)
	rs522839	7p11.2	54724224	imp	G/A	0,07	$4{,}23X10^{-05}$	9 (0,61)	112 (0,95)
	rs71476479	11q14.1	80642409	imp	C/T	0,06	$7{,}85X10^{-05}$	9 (0,33)	112 (0,04)
	rs113207786	18p11.31	4064930	imp	C/T	0,06	$4{,}56X10^{-05}$	9 (0,33)	112 (0,03)
Disnea	rs45223	1p36.21	13844562	geno	A/G	0,50	$8{,}60X10^{-05}$	39 (0,66)	57 (0,37)
	rs10029761	4q22.1	88749845	geno	G/A	0,45	$6{,}30X10^{-05}$	39 (0,26)	57 (0,57)
	rs6992383	8q24.22	134223764	geno	C/T	0,39	$2{,}59X10^{-05}$	39 (0,79)	57 (0,49)
	rs17832702	10p15.3	2374315	imp	C/T	0,27	$4{,}38X10^{-05}$	39 (0,11)	57 (0,37)
	rs1361711	10q21.1	56094610	imp	G/T	0,26	$9{,}12X10^{-05}$	39 (0,87)	57 (0,65)
	rs10136162	14q11.2	21619002	imp	T/C	0,19	$9{,}21X10^{-05}$	39 (0,31)	57 (0,11)
	17:35253613	17q12	35253613	imp	C/G	0,19	$3{,}93X10^{-05}$	39 (0,70)	57 (0,88)
	rs12449835	17q22	55216804	imp	T/C	0,23	$9{,}37X10^{-05}$	39 (0,35)	57 (0,13)
	rs6603092	19p13.2	8665676	imp	C/A	0,26	$6{,}39X10^{-05}$	39 (0,36)	57 (0,19)
	rs6085673	20p13	727331	geno	A/G	0,42	$8{,}29X10^{-05}$	39 (0,57)	57 (0,30)
Neumonitis	rs56051501	14q32.2	100607595	imp	C/T	0,08	$9{,}38X10^{-05}$	10 (0,34)	112 (0,05)

SNP-ID, polimorfismo de un nucleótido; Geno, genotipado; Imp, imputado; Al, alelo; Ref, alelo de referencia; Alt, alelo alterado; MAF, frecuencia del alelo menor; FA, frecuencia alélica; Ctrl, controles; b.pulmonar, broncopulmonar.

Comparamos los *loci* identificados para saber si éstos se comparten entre las diferentes toxicidades. La neumonitis y la hemorragia broncopulmonar comparten asociación en el *locus* 14q32.2, por lo que realizamos el análisis de las variantes más significativas asociadas con estas toxicidades utilizando la herramienta *Haploview* y confirmamos que las variantes se comportan como señales independientes y no forman parte de un bloque de haplotipo en común. (***Figura 50***) Por lo que, en nuestra cohorte, no existen *loci* compartidos asociados con las toxicidades tardías inducidas por la radiación en NSCLC.

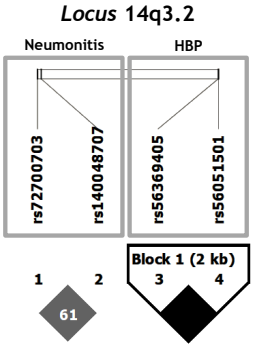


Figura 51. Análisis de haplotipos de *loci* compartidos en toxicidades tardías. Desequilibrio de ligamiento por pares entre los SNPs (r^2). Los valores de r^2 se indican dentro de los cuadrados, y el tono más oscuro indica valores de r^2 más alto. HBP: hemorragia broncopulmonar.

Analizamos los *loci* identificados en los GWAS de la toxicidad tardía comparándolos con los identificados en asociación con la toxicidad aguda. Encontramos que la disnea tardía comparte *loci* tanto con la disnea aguda (*locus* 4q22.1) como con la esofagitis aguda (*locus* 8q24.22). Al realizar el análisis de los SNPs usando HaploReg v4.1 y Haploview v3.30, encontramos que los grupos de SNPs que están en asociación con las toxicidades pertenecen a señales independientes y no forman parte de un bloque común de haplotipo. (***Figura 51***)

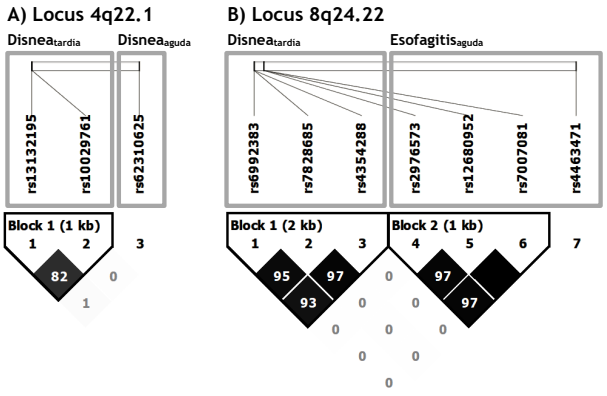


Figura 52. Análisis de haplotipos de *loci* compartidos entre toxicidades agudas y tardías.
Desequilibrio de ligamiento por pares entre los SNPs (r^2). Los valores de r^2 se indican dentro de los cuadrados, y el tono más oscuro indica valores de r^2 más alto.
A) *Locus* 4q22.1 asociado con disnea aguda y disnea tardía; B) *locus* 8q24.22 asociado con esofagitis aguda y disnea tardía.

4.2. 4 Comparación de nuestros resultados con los GWAS previos del RGC

Analizamos los SNPs identificados en asociación con las toxicidades a la radiación en sus presentaciones agudas y tardías obtenidos mediante nuestros GWAS y los comparamos con los identificados previamente en estudios radiogenómicos siempre que hayan sido validados en por lo menos una cohorte independiente. (***Tabla 35***) No encontramos coincidencias entre los SNPs previamente reportados y los identificados en nuestro análisis.

Tabla 35. SNPs identificados en GWAS previos en asociación con efectos adversos a la radiación dentro del RGC con al menos una cohorte de validación

SNP-ID	EntrezID	Gen	P valor	Referencia
rs11693002	23040	MYT1L	$3{,}1\times10^{-05}$	[240]
rs3749191	64866	CDCP1	$2{,}1\times10^{-05}$	[240]
rs10764930	10539	GLRX3	$3{,}2\times10^{-05}$	[240]
rs11648233	3294	HSD17B2	$9{,}1\times10^{-05}$	[240]
rs17779457	79817	IFNK	$6{,}5\times10^{-07}$	[243]
rs7120482	4544/120103	MTNR1B/SLC36A4	$5{,}4\times10^{-08}$	[244]
rs17630638	4544/120103	MTNR1B/SLC36A4	$6{,}9\times10^{-07}$	[244]
rs2706183	256435	ST6GALNAC3	$7{,}8\times10^{-05}$	[244]
rs10519410	105377441/54510	LOC646316/PCDH18	$1{,}3\times10^{-06}$	[244]
rs7698088	23158	TBC1D9	$8{,}8\times10^{-05}$	[244]
rs10255878	105375416 /6863	ACN9/TAC1	$3{,}6\times10^{-06}$	[244]
rs4969040	201266	SLC39A11	$5{,}0\times10^{-05}$	[244]
rs13116075	105377448	CCRN4L	$5{,}8\times10^{-05}$	[245]
rs12243039	10529	C10orf113	$6{,}0\times10^{-06}$	[245]
rs718304	2562	GABRB3	$2{,}8\times10^{-05}$	[245]
rs4234649	105374057	-	$7{,}2\times10^{-05}$	[245]
rs10497203	85461	TANC1	$8{,}8\times10^{-11}$	[248]
rs7582141	85461	TANC1	$4{,}6\times10^{-11}$	[248]
rs6432512	85461	TANC1	$1{,}9\times10^{-10}$	[248]
rs264663	85461	TANC1	$6{,}8\times10^{-09}$	[248]
rs2646651	85461	TANC1	$4{,}3\times10^{-07}$	[248]
rs264588	85461	TANC1	$3{,}0\times10^{-10}$	[248]
rs264631	85461	TANC1	$6{,}4\times10^{-10}$	[248]

SNP-ID	EntrezID	Gen	P valor	Referencia
rs17599026	51780	KDM3B	$4,1x10^{-08}$	[259]
rs7720298	1767	DNAH5	$3,2x10^{-08}$	[259]
rs11230328	64232	MS4A5	$6,2x10^{-10}$	[259]
rs12497518	6092	ROBO2	$1,4x10^{-06}$	[259]
rs141044160	-	-	$2,2x10^{-06}$	[259]
rs7432328	-	-	$3,2x10^{-06}$	[259]
rs6999859	101927067/101927040	LINC01607/LOC101927040	$3,4x10^{-06}$	[259]
rs4804134	5141	PDE4A	$3,4x10^{-06}$	[259]
rs360071	-	-	$3,6x10^{-06}$	[259]
rs11574532	3695	ITGB7	$2,1x10^{-07}$	[259]
rs342442	-	-	$3,8x10^{-07}$	[259]
rs4534636	338339	CLEC4D	$1,6x10^{-06}$	[259]
rs8098701	-	-	$2,1x10^{-06}$	[259]
rs7366282	-	-	$2,0x10^{-06}$	[259]
rs10209697	105373899	LOC105373899	$2,2x10^{-06}$	[259]
rs4997823	-	-	$2,3x10^{-06}$	[259]
rs7356945	-	-	$3,7x10^{-06}$	[259]
rs6003982	100652871	LOC100652871	$4,2x10^{-06}$	[259]
rs10101158	-	-	$4,3x10^{-06}$	[259]
rs17362923	-	-	$6,7x10^{-07}$	[259]
rs76273496	-	-	$2,7x10^{-06}$	[259]
rs2203205	254065	BRWD3	$2,8x10^{-06}$	[259]
rs144596911	107986170	-	$2,9x10^{-06}$	[259]
rs62091368	105376854	LINC01925	$3,9x10^{-06}$	[259]
rs141342719	105379168	LOC105379168	$3,9x10^{-06}$	[259]
rs673783	-	-	$4,3x10^{-06}$	[259]
rs147596965	-	-	$6,1x10^{-08}$	[259]
rs77530448	-	-	$7,3x10^{-08}$	[259]
rs4906759	57194	ATP10A	$1,5x10^{-07}$	[259]
rs71610881	-	-	$5,4x10^{-07}$	[259]
rs141799618	9253	NUMBL	$1,2x10^{-06}$	[259]
rs2842169	118611	C10orf90	$1,4x10^{-06}$	[259]
rs11219068	105369540	LOC105369540	$1,7x10^{-06}$	[259]
rs8075565	-	-	$2,2x10^{-06}$	[259]
rs6535028	105377436	LOC105377436	$2,7x10^{-06}$	[259]
rs4775602	-	-	$3,0x10^{-06}$	[259]
rs60481745	-	-	$3,5x10^{-06}$	[259]
rs7829759	64478	CSMD1	$3,8x10^{-06}$	[259]
rs79604958	-	-	$4,3x10^{-06}$	[259]
rs10770857	-	-	$4,9x10^{-06}$	[259]
rs12591436	-	-	$5,6x10^{-06}$	[259]
rs17055178	-	-	$6,2x10^{-10}$	[260]
rs10969913	-	-	$2,9x10^{-10}$	[260]
rs11122573	-	-	$1,8x10^{-08}$	[260]
rs9644474	-	-	$7,9x10^{-08}$	[260]
rs75759941	6103	RPGR	$9,3x10^{-08}$	[260]
rs11122572	-	-	$9,8x10^{-08}$	[260]
rs368141164	-	-	$1,8x10^{-07}$	[260]
rs35623600	-	-	$1,6x10^{-07}$	[260]
rs2031925	-	-	$2,4x10^{-07}$	[260]
rs17190422	101927213	LOC101927213	$3,1x10^{-07}$	[260]
rs74346764	-	-	$3,1x10^{-07}$	[260]
rs72993079	-	-	$3,5x10^{-07}$	[260]
rs9832989	6578	SLCO2A1	$3,8x10^{-07}$	[260]
rs60424486	392636	AGMO	$4,0x10^{-07}$	[260]
rs11624322	-	-	$4,2x10^{-07}$	[260]
rs61871726	196051	PLPP4	$4,8x10^{-07}$	[260]
rs2237706	3912	LAMB1	$4,8x10^{-07}$	[260]
rs6791846	-	-	$5,0x10^{-07}$	[260]
rs1111668	4604	MYBPC1	$1,4x10^{-09}$	[260]
rs180958289	-	-	$4,6x10^{-09}$	[260]
rs13403657	25992	SNED1	$1,4x10^{-08}$	[260]
rs139239158	2272	FHIT	$3,4x10^{-08}$	[260]
rs191705561	-	-	$3,7x10^{-08}$	[260]
rs148048756	-	-	$4,0x10^{-08}$	[260]
rs75988504	53353	LRP1B	$4,9x10^{-08}$	[260]
rs139288166	619343	-	$6,9x10^{-08}$	[260]
rs139882217	55799	CACNA2D3	$6,9x10^{-08}$	[260]
rs12303019	441631	TSPAN11	$1,1x10^{-07}$	[260]

SNP-ID	EntrezID	Gen	P valor	Referencia
rs151242180	-	-	$1,1x10^{-07}$	[260]
rs112193369	-	-	$1,2x10^{-07}$	[260]
rs4688181	100507062/6314	PSMD6-AS2/ATXN7	$1,3x10^{-07}$	[260]
rs149176864	2936	GSR	$1,4x10^{-07}$	[260]
rs3739643	55064	SPATA6L	$1,7x10^{-07}$	[260]
rs73539559	-	-	$2,0x10^{-07}$	[260]
rs190601686	105376113	-	$2,3x10^{-07}$	[260]
rs149927798	-	-	$2,3x10^{-07}$	[260]
rs490393	285759	LINC02880	$2,4x10^{-07}$	[260]
rs73712257	-	-	$2,4x10^{-07}$	[260]
rs144214859	5341	PLEK	$2,5x10^{-07}$	[260]
rs61415111	6833	ABCC8	$3,0x10^{-07}$	[260]
rs77581414	1785	DNM2	$3,1x10^{-07}$	[260]
rs76661052	-	-	$3,3x10^{-07}$	[260]
rs78166464	-	-	$3,4x10^{-07}$	[260]
rs186353960	166378	SPATA5	$3,4x10^{-07}$	[260]
rs11687040	-	-	$4,2x10^{-07}$	[260]
rs73046248	79750	ZNF385D	$4,2x10^{-07}$	[260]
rs192744896	2567	GABRG3	$4,3x10^{-07}$	[260]
rs141203061	-	-	$4,3x10^{-07}$	[260]
rs113370662	-	-	$4,5x10^{-07}$	[260]
rs138731641	-	-	$4,8x10^{-07}$	[260]
rs72915971	105369309	LOC105369309	$5,0x10^{-07}$	[260]

SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; EntrezID, identifiador del gen.

Identificamos los genes en los que se encuentran los SNPs de nuestros resultados y los comparamos con los genes identificados mediante GWASs en los estudios previos de radiogenomica. 47 SNP descritos en los estudios del RGC y un SNP identificado en nuestros GWAS no están asociadas a genes, por lo que no fueron incluidos en este análisis. Ninguno de los genes identificados en nuestra cohorte de pacientes con NSCLC coinciden con los genes identificados en los otros estudios radiogenómicos realizados en otros tipos de cáncer.

El siguiente paso consistió en analizar los términos GO en los que intervienen genes de los SNPs identificados en nuestro estudio en comparación con los ya identificados previamente en los estudios radiogenómicos. Para ello realizamos un análisis de enriquecimientos de GO usando Metascape. No identificamos genes en común que compartan al mismo tiempo múltiples listas de genes. Sin embargo, algunos genes participan en las mismas funciones biológicas. (***Figura 53***) Los procesos biológicos compartidos que fueron identificados mediante el enriquecimiento de GO son: la adhesión celular (GO:0007155), la transmisión química sináptica (GO:0007268), la regulación negativa del proceso proteosomal catabólico de proteínas dependiente de ubiquitina (GO:0032435) y la señalización trans-sináptica anterógrada (GO:0098916). En nuestros resultados, las clasificaciones de los términos GO de los procesos biológicos más importantes por sobrerrepresentación fueron: la regulación negativa de la vía de sealización extrínseca de apoptosis (GO:2001237), la

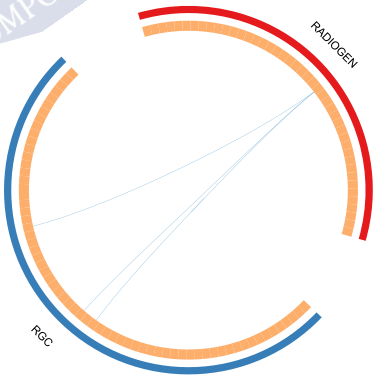


Figura 53. Comparación del análisis de enriquecimiento de ontología de genes entre los resultados identificados en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN y estudios previos del RGC.
El semicírculo rojo representa los genes identificados por GWAS en la cohorte RADIOGEN; el semicírculo azul, los genes identificados en GWAS previos del RGC; en naranja los genes no-compartidos; las líneas azules representan aquellos genes que están incluidos en funciones biológicas en común.

regulación positiva de la reparación del ADN (GO:0045739), la regulación de la estabilidad de las proteínas (GO:0031647), la regulación de la respuesta inflamatoria (GO:0050727), la adhesión celular (GO:0007155), entre otras. Ninguna de ellas fue significativa al ajustar el P valor por FDR como corrección de pruebas múltiples.

Realizamos el análisis de rutas de genes comparando los identificados por nosotros en comparación con los descritos en estudios previos del RGC. Para ello usamos la herramienta bioinformática Reactome. No existen rutas de genes compartidas. (***Figura 53***) Ninguna de las rutas identificadas en los estudios previos del RGC fueron significativas en el análisis de sobrerrepresentación. En cuanto a las rutas identificadas en nuestros estudios, cinco fueron significativas: la ruta de reparación de escisión de base defectuosa asociada con MUTYH (P valor = $2{,}41 \times 10^{-05}$, P valor ajustado = 0,002), el procesamiento de sustrato MUTYH defectuoso (P valor = $2{,}41 \times 10^{-05}$, P valor ajustado = 0,002), enfermedades de reparación de escisión de base (P valor = $3{,}80 \times 10^{-04}$, P valor ajustado = 0,022), desplazamiento de DNA glicosilasa por APEX1 (P valor = $5{,}92 \times 10^{-04}$, P valor ajustado = 0,026) y enfermedades de la reparación del DNA (P valor = $9{,}93 \times 10^{-04}$, P valor ajustado = 0,034).

A) *Pathways* identificados en GWASs realizados por el RGC

B) *Pathways* identificados en GWASs realizados pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN

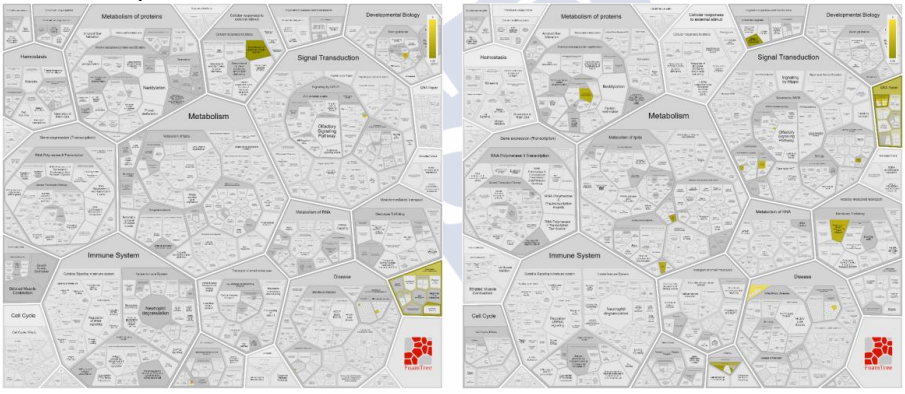


Figura 54. Comparación del análisis de *pathways* entre los genes identificados por GWAS en estudios previos del RGC y en los pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN.
En amarillo se marcan las rutas en las que se encuentran ubicados los genes identificados en los estudios previos del RGC (A) y nuestros resultados en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (B).

4.3 CAPÍTULO 3. RIESGO POLIGÉNICO DE CÁNCER DE PULMÓN COMO PREDICTOR DE RIESGO DE PRESENTAR EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN

4.3.1 Inclusión de pacientes, toxicidades evaluadas y covariables seleccionadas

Para el estudio del riesgo poligénico de cáncer de pulmón y su asociación con el riesgo de presentar toxicidad a la radiación se incluyeron a 155 pacientes de la cohorte RADIOGEN-pulmón. Se estudiaron los siguientes efectos adversos en su presentación tardía: i) tos, ii) disnea, iii) neumonitis, iv) fibrosis pulmonar, v) esofagitis, vi) disfagia y vii) estenosis esofágica. Se incluyó también las toxicidades esofágicas agrupadas, pulmonares agrupadas y la toxicidad global tardía evaluada mediante el puntaje STAT. El fenotipo para las toxicidades individuales se categorizó en dos grupos, por lo que se definió como controles a aquellos pacientes con un grado CTCAE < 2, y como casos los que tuvieron un grado CTCAE ≥ 2, en el caso de las toxicidades agrupadas y global, el fenotipo es la variable cuantitativa de la puntuación STAT. (***Tabla 36, Figura 54***)

Tabla 36. Presencia de efectos adversos tardíos a la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 155)

		Escala en grados				Controles	Casos	
Toxicidad	Sin toxicidad N (%)	CTCAE = 1 N (%)	CTCAE = 2 N (%)	CTCAE = 3 N (%)	CTCAE = 4 N (%)	CTCAE < 2 N (%)	CTCAE ≥ 2 N (%)	NA N (%)
Tos	74 (47,74)	50 (32,25)	24 (15,48)	2 (1,29)		124 (80)	26 (16,77)	5 (3,22)
Disnea	71 (45,80)	32 (20,64)	20 (12,9)	11 (7,09)	16 (10,32)	103 (66,45)	47 (30,32)	5 (3,22)
Neumonitis	112 (72,25)	24 (15,48)	9 (5,8)	5 (3,22)		136 (87,74)	14 (9,03)	5 (3,22)
Fibrosis pulmonar	142 (91,61)	7 (4,51)	1 (0,64)			149 (96,12)	1 (0,64)	5 (3,22)
Esofagitis	132 (85,16)	11 (7,09)	5 (3,22)	2 (1,29)		143 (92,25)	7 (4,51)	5 (3,22)
Disfagia	130 (83,87)	11 (7,09)	6 (3,87)	3 (1,93)		141 (90,96)	9 (5,8)	5 (3,22)
Estenosis esofágica	149 (96,12)	0	0	1 (0,64)		149 (96,12)	1 (0,64)	5 (3,22)
Radiodermatitis	149 (96,12)	1 (0,64)				150 (96,77)	0	5 (3,22)

NSCLC, cáncer de pulmón no microcítico; CTCAE, Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos; n, conteo de pacientes; NA, datos no disponibles.

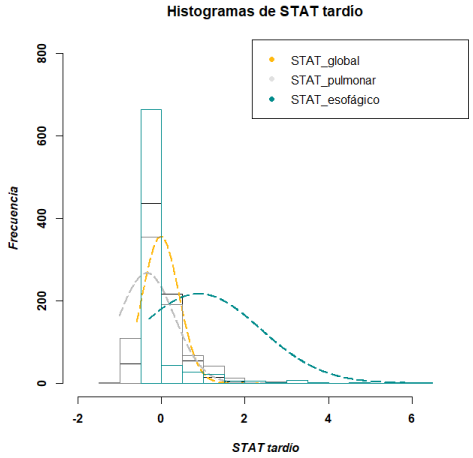


Figura 55. Histogramas del $STAT_{tardio}$ global, $STAT_{tardio}$ esofágico y $STAT_{tardio}$ pulmonar en la cohorte de pacientes NSCLC

La cohorte de pacientes incluida en este análisis tenía disponible 75 variables clínicas que se analizaron mediante regresión logística univariable para identificar aquellas que estuvieran relacionadas ($P < 0,05$) con la toxicidad global tardía. Las variables asociadas estadísticamente son las que se incluyeron en el análisis multivariable. Las covariables utilizadas son: i) dosis media de pulmón, ii) porcentaje del volumen de pulmón que recibe al menos 20 Gy, iii) porcentaje del volumen de esófago que recibe al menos 60 Gy, iv) sexo, v) dosis media de esófago. (***Tabla 37***) Además, se incluyeron dos variables clínicas que, aunque no se encontraron estadísticamente asociadas con el STAT global en nuestra cohorte, consideramos relevantes: vi) volumen de espiración forzada en el primer minuto, y vii) el diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Tabla 37. Variables clínicas asociadas a STAT global en los pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN

Variables	OR (95% IC)	P valor
Dosis media de pulmón	1,018 (1,008-1,029)	$4,66x10^{-04}$
V20% pulmón	1,013 (1,004-1,022)	$4,28x10^{-03}$
V60% esófago	1,007 (1,001-1,013)	$9,80x10^{-03}$
Sexo (femenino)	0,788 (0,636-0,976)	$3,09x10^{-02}$
Dosis media de esófago	1,008 (1,000-1,017)	$4,38x10^{-02}$

STAT, toxicidad promedio total estandarizada; NSCLS, cáncer de pulmón no microcítico; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza; V20%, porcentaje del volumen del pulmón que recibió más de 20 Gy; V60%, porcentaje del volumen del esófago que recibió más de 60 Gy.

4.3.2 Análisis univariable del PRS y su asociación con los efectos adversos a la radiación en NSCLC

Se estudió el riesgo poligénico considerando los 24 SNPs asociados con el desarrollo de cáncer de pulmón de los 25 identificados. Se excluyó el SNP rs6920364 por ser un SNP trialélico del cual no fue posible recuperar los datos de genotipado. El riesgo poligénico no ponderado en los pacientes estudiados tuvo una puntuación media de 19,9 con una desviación estándar de 3,31; la puntuación más baja fue de 12 y la más alta de 30. La distribución de los PRS se representa en la ***Figura 55A***. El riesgo poligénico ponderado con los *odds ratio*s

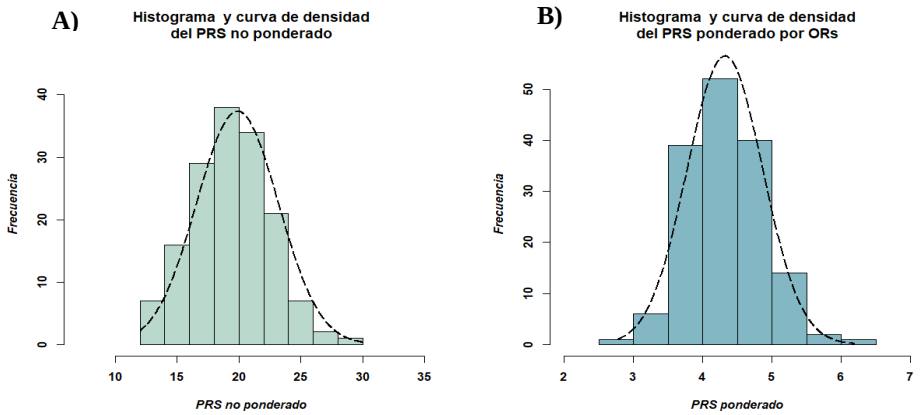


Figura 56. Distribución de los puntajes de riesgo poligénico en los pacientes con NSCLC de la cohorte RADIOGEN.
A) histograma y curva de densidad de los puntajes no ponderados y B) ponderados por el OR descrito en el estudio de referencia.

identificados en asociación con el cáncer de pulmón de acuerdo con los estudios de referencia, calculados en los pacientes incluidos en este estudio tiene una media de puntuación PRS de 4,32 con una desviación estándar de 0,55; la puntuación más baja en nuestra cohorte fue de 3,95 y la puntuación más alta 6,19. (***Figura 55B***)

Tres toxicidades no pudieron evaluarse debido al muy bajo número de casos: fibrosis pulmonar (un caso), estenosis esofágica (un caso), radiodermatitis (ningún caso). El resto de los efectos adversos se incluyeron en el análisis univariable. Tos y disfagia fueron nominalmente significativas (P < 0,05) en asociación con el PRS no ponderado, sin embargo, la asociación no se mantuvo tras la corrección de Bonferroni. Ninguna de las toxicidades individuales, ni los STAT de toxicidades agrupadas, ni la toxicidad global evaluada con el STAT estuvieron asociados con el riesgo poligénico no ponderado, (***Tabla 38***) ni con el ponderado de cáncer de pulmón en el análisis univariable. (***Tabla 39***)

Tabla 38. Análisis univariable de las puntuaciones de riesgo poligénico no ponderado para cáncer de pulmón con la radiotoxicidad en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n=127)

	PRS no ponderado			
Toxicidad	***Beta*[#]**	**OR[##]**	**95% IC**	**P valor**
STAT global	-0,0157	--	(-0,040;0,010)	0,166
STAT pulmonar	-0,0137	--	(-0,040;0,020)	0,373
STAT esofágico	-0,0141	--	(-0,050;0,030)	0,488
Tos (108/19)	--	0,84	(0,72-1,00)	0,044*
Disnea (90/37)	--	0,97	(0,86-1,09)	0,623
Neumonitis (116/11)	--	1,04	(0,86-1,26)	0,677
Fibrosis pulmonar (126/1)	--	--	--	--
Esofagitis (122/5)	--	1,02	(0,78-1,35)	0,874
Disfagia (121/6)	--	0,73	(0,54-0,98)	0,033*
Estenosis esofágica (126/1)	--	--	--	--
Radiodermatitis (127/0)	--	--	--	--

[#] regresión lineal; [##] regresión logística; STAT, toxicidad pro4medio total estandarizada; NSCLS, cáncer de pulmón no microcítico; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza.
* P valor < 0,05, no significativa después de la corrección de Bonferroni (Pc = 3,13 x 10^{-03})

Tabla 39. Análisis univariable de las puntuaciones de riesgo poligénico ponderado por OR para cáncer de pulmón, con la radiotoxicidad en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n=127)

	PRS ponderado			
Toxicidad	***Beta*[#]**	**OR[##]**	**95% IC**	**P valor**
STAT global	-0,0524		(-0,180;0,080)	0,438
STAT pulmonar	-0,0488		(-0,230;0,130)	0,595
STAT esofágico	-0,0365		(-0,270;0,200)	0,763
Tos (108/19)	--	0,51	(0,20-1,33)	0,168
Disnea (90/37)	--	0,88	(0,43-1,79)	0,724
Neumonitis (116/11)	--	1,07	(0,34-3,33)	0,904
Fibrosis pulmonar (126/1)	--	--	--	--
Esofagitis (122/5)	--	1,35	(0,27-6,73)	0,711
Disfagia (121/6)	--	0,29	(0,06-1,47)	0,134
Estenosis esofágica (126/1)	--	--	--	--
Radiodermatitis (127/0)	--	--	--	--

[#] regresión lineal; [##] regresión logística; STAT, toxicidad promedio total estandarizada; NSCLS, cáncer de pulmón no microcítico; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza.
* P valor < 0,05, no significativa después de la corrección de Bonferroni (Pc = 3,13 x 10^{-03})

4.3.3 Análisis univariable de los SNPs individuales incluidos en el PRS y su asociación con los efectos adversos a la radiación en NSCLC

Ninguno de los SNPs asociados con el aumento de riesgo a desarrollar cáncer de pulmón estuvieron asociados de forma individual con las toxicidades incluidas en nuestro análisis después de la corrección de Bonferroni. Hubo toxicidades que no pudieron analizarse debido al bajo número de casos. Las toxicidades que se incluyeron fueron disfagia, disnea, esofagitis, estenosis esofágica, fibrosis pulmonar, neumonitis, y $STAT_{tardío}$. Los genotipos de cada SNP se clasificaron de acuerdo con su alelo de riesgo, de tal forma que si un SNP no tiene ningún alelo de riesgo tiene un valor igual a cero, cuando es heterocigoto se le asigna un valor de uno, y cuando es homocigoto para el alelo de riesgo un valor de dos; el alelo de riesgo se definió dependiendo del sentido del OR de cada asociación identificada en los estudios de referencia. Los SNPs nominalmente significativos (P < 0,05) asociados con alguna de las toxicidades se detallan en la ***Tabla 40***.

Tabla 40. Análisis univariable de los SNPs incluidos en el PRS y su asociación con los efectos adversos a la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n= 127)

SNP-ID	Tos		Disfagia		Disnea		Esofagitis		$STAT_{tardío}$	
	P valor	MOD*	P valor	MOD*	P valor	MOD*	P valor	MOD*	P valor	MOD*
rs71658797	0,970	DOMr	0,589	DOMr	0,954	DOMr	0,020#	DOMr	0,413	ADDr
rs4635969	0,001#	ADDr	0,104	RECr	0,535	DOMr	0,925	DOMr	0,247	ADDr
rs31489	0,033#	DOMr	0,833	DOMr	0,240	DOMr	0,624	DOMr	0,391	RECr
rs1333040	0,416	RECr	0,502	DOMr	0,025#	ADDr	0,765	DOMr	0,050	ADDr
rs7953330	0,356	RECr	0,032#	DOMr	0,234	ADDr	0,406	DOMr	0,424	DOMr
rs66759488	0,002#	DOMr	0,038#	DOMr	0,002#	CODr	0,234	RECr	0,039#	DOMr
rs77468143	0,491	ADDr	0,623	DOMr	0,006#	ADDr	0,068	CODr	0,668	DOMr
rs1996371	0,204	DOMr	0,589	RECr	0,044	ADDr	0,501	DOMr	0,231	DOMr

SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; STAT, toxicidad promedio total estandarizada; MOD*, modelo genético transformado en función del alelo de riesgo; DOMr = 0 vs ≥ 1 variantes de riesgo; RECr = 2 vs ≤ 1 variante de riesgo; CODr = 0 vs 1 vs 2 variantes de riesgo; ADDr = log aditivo considerando la cantidad de variantes de riesgo,

#, P valor < 0,05, no significativa después de la corrección de Bonferroni ($Pc \leq 2{,}52 \times 10^{-05}$)

4.3.4 Análisis multivariable del PRS y su asociación con los efectos adversos a la radiación en NSCLC

Ninguno de los fenotipos estudiados estuvo asociado a los PRS no ponderado y ponderado de cáncer de pulmón. Tos tuvo una asociación nominalmente significativa (P< 0,05) con el PRS no ponderado, nuevamente, no fue significativo después de la corrección de Bonferroni. (***Tabla 41***)

Tabla 41. Análisis multivariable de los puntajes de riesgo poligénico para cáncer de pulmón con los efectos adversos a la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n = 127)

	PRS no ponderado			PRS ponderado		
Toxicidad	***Beta*** [#]	**95% IC**	**P valor**	***Beta*** [#]	**95% IC**	**P valor**
STAT_global	-0,019	(-0,040;0,000)	0,078	-0,074	(-0,200, 0,050)	0,249
STAT_pulmonar	-0,014	(-0,040;0,010)	0,328	-0,058	(-0,230, 0,110)	0,503
STAT_esofágico	-0,019	(-0,060;0,020)	0,315	-0,069	(-0,300, 0,160)	0,552
Tos (108/19)	-0,187	(-0,343;-0,032)	0,020*	-0,776	(-1,711, 0,158)	0,106
Disnea (90/37)	-0,059	(-0,195;0,076)	0,394	-0,331	(-1,137, 0,474)	0,421
Neumonitis (116/11)	0,057	(-0,116;0,230)	0,519	0,185	(-0,843, 1,214)	0,724
Fibrosis pulmonar 126/1)	--	--	--	--	--	--
Esofagitis (122/5)	0,090	(-0,200;0,382)	0,541	0,671	(-1,056, 2,399)	0,448
Disfagia (121/6)	-0,125	(-0,257;0,006)	0,064	-0,494	(-1,282, 0,293)	0,221
Estenosis esofágica (126/1)	--	--	--	--	--	--
Radiodermatitis (127/0)	--	--	--	--	--	--

Análisis ajustado por: Dosis media de pulmón, dosis media de esófago, V20% pulmón, V60% esófago, sexo, FEV1 y EPOC,

[#] regresión logística multivariable; STAT, toxicidad promedio total estandarizada; NSCLS, cáncer de pulmón no microcítico; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza,

* P valor < 0,05, no significativa después de la corrección de Bonferroni (Pc = 3,13 x 10^{-03})

4.4 CAPÍTULO 4. SNPS EN *TANC1* Y SU ASOCIACIÓN CON EFECTOS ADVERSOS A LA RADIACIÓN EN PACIENTES NSCLC

4.4.1 Inclusión de pacientes, toxicidades evaluadas y genotipado

Exploramos la existencia de una susceptibilidad genética global a la toxicidad. Para ello nos centramos en SNPs identificados en el estudio realizado en pacientes con cáncer de próstata. Diseñamos y estandarizamos un ensayo basado en el método de minisecuenciación SNaPshot-PCR para los siete SNPs localizados en el gen *TANC1* asociados con toxicidad global tardía en pacientes con cáncer de próstata.

Se incluyeron un total de 177 pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN-Pulmón, el cálculo del poder estadístico para los diferentes *odds ratios* y los MAF de los SNPs incluídos en este análisis se describen la ***Figura 27*** en las el apartado 3.2.2, las toxicidades evaluadas fueron: i) hemorragia broncopulmonar, ii) Fistula bronquial, iii) estenosis bronquial, iv) dolor en la pared del tórax, v) tos, vi) disfagia, vii) disnea, viii) estenosis esofágica, ix) esofagitis, x) infarto agudo al miocardio, xi) derrame pericárdico, xii) neumonitis, xiii) fibrosis pulmonar, xiv) radiodermatitis, y xv) estenosis traqueal (fibrosis), en su presentación aguda, tardía y para el estudio Cox, se incluyó la fecha exacta en que presentó la toxicidad el paciente.

Las siete variantes estudiadas tienen baja frecuencia (~0,04). De los siete SNPs analizados, cuatro de ellos presentaron un genotipo idéntico en todos los pacientes (rs264588, rs264631, rs643512 y rs7582141), además el SNP rs264663 únicamente se encontró con la variante en forma heterocigota en dos pacientes, por lo que no fue incluido en el análisis. La baja frecuencia de toxicidades también nos llevó a disminuir el número de eventos adversos estudiados, con lo que finalmente se incluyeron tos, disnea, hemorragia broncopulmonar, dolor torácico, neumonitis, fibrosis pulmonar, esofagitis, disfagia y derrame pericárdico.

4.4.2 Estimación Kaplan-Meier para las toxicidades inducidas por la radiación en pacientes NSCLC y las variantes del gen *TANC1*

El SNP rs10497203 y el conjunto de los SNPs rs264588, rs264631, rs643512 y rs7582141 fueron nominalmente significativos en asociación con disnea (P = 0,023 y 0,04;, respectivamente). Sin embargo, ninguno de estos SNPs permaneció significativo tras la corrección de Bonferroni. (***Tabla 42***)

La curva de Kaplan-Meier, que muestra los eventos acumulados de disnea a lo largo del primer año posterior al inicio de la radioterapia, indica ligero incremento en la presencia de un aumento de disnea mayor o igual a 2 grados en la escala CTCAE con respecto al inicio de la radioterapia en los pacientes con genotipo heterocigoto para el SNP rs10497203 en nuestra población. Al final del año de seguimiento, los pacientes con el genotipo heterocigoto presentan un riesgo de ~60%, mientras que los pacientes sin variantes en el SNP se mantienen por debajo del 50%. (***Figura 56***) Comportamientos similares se observan para los SNPs rs264588, rs264631, rs643512 y rs7582141. (***Figura 57***)

Tabla 42. Asociación entre SNPs del locus 2q24.1 y los efectos adversos a la radiación en pacientes NSCLC de la cohorte RADIOGEN (n=159)

		rs10497203		rs264588/rs264631 rs643512/rs7582141		rs264651	
Toxicidades	**CTCAE**	**Geno**	**P valor**	**Geno**	**P valor**	**Geno**	**P valor**
Tos	CTCAE < 2	138/8	0,452	137/9	0,418	139/7	0,490
	CTCAE ≥ 2	13/0		13/0		13/0	
Disnea	CTCAE < 2	110/3	0,023‡	109/4	0,047‡	110/3	0,056
	CTCAE ≥ 2	41/5		41/5		42/4	
Hemorragia broncopulmonar	CTCAE < 2	146/7	0,091	145/8	0,129	147/6	0,057
	CTCAE ≥ 2	5/1		5/1		5/1	
Dolor torácico	CTCAE < 2	141/8	0,526	140/9	0,494	142/7	0,562
	CTCAE ≥ 2	10/0		10/0		10/0	
Neumonitis	CTCAE < 2	138/7	0,628	137/8	0,730	139/6	0,518
	CTCAE ≥ 2	13/1		13/1		13/1	
Fibrosis pulmonar	CTCAE < 2	146/8	0,670	145/9	0,644	147/7	0,698
	CTCAE ≥ 2	5/0		5/0		5/0	
Esofagitis	CTCAE < 2	129/7	0,898	128/8	0,792	130/6	0,979
	CTCAE ≥ 2	22/1		22/1		22/1	
Disfagia	CTCAE < 2	126/7	0,779	127/6	0,124	128/5	0,311
	CTCAE ≥ 2	25/1		23/3		24/2	
Derrame pericárdico	CTCAE < 2	139/7	0,573	139/7	0,072	140/6	0,456
	CTCAE ≥ 2	12/1		11/2		12/1	

CTCAE, Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos; Geno, frecuencia alélica del genotipo dividido en alelo de referencia/alelo de riesgo

‡ P valor < 0,05, no significativo después de la corrección de Bonferroni

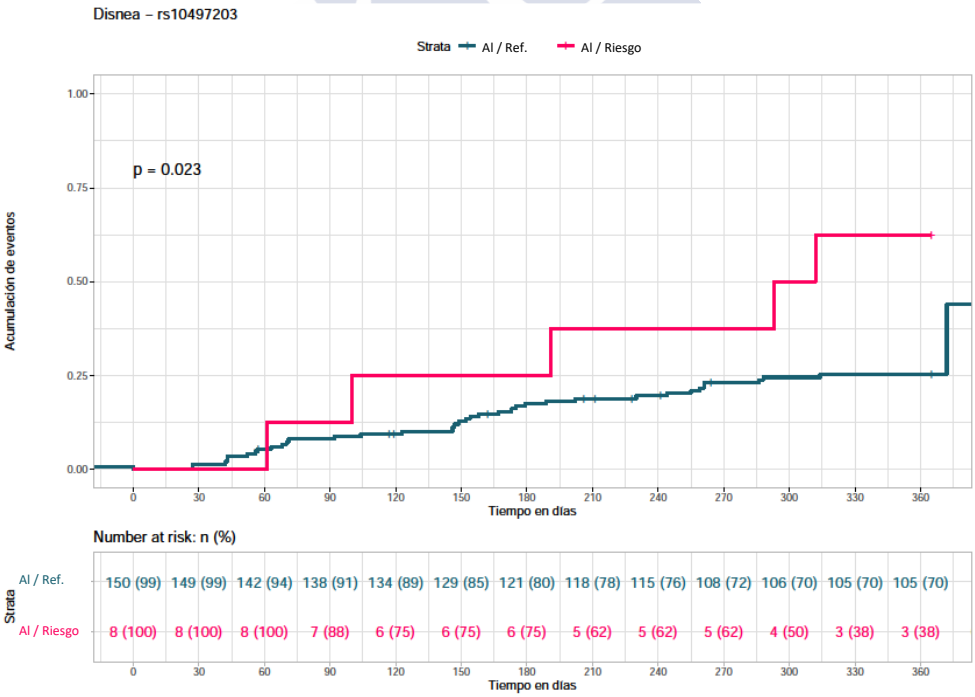


Figura 57. Análisis de Kaplan-Meier de la asociación del SNPs rs10497203 con el desarrollo de disnea como efecto adverso a la radioterapia en pacientes NSCLC en la cohorte RADIOGEN.

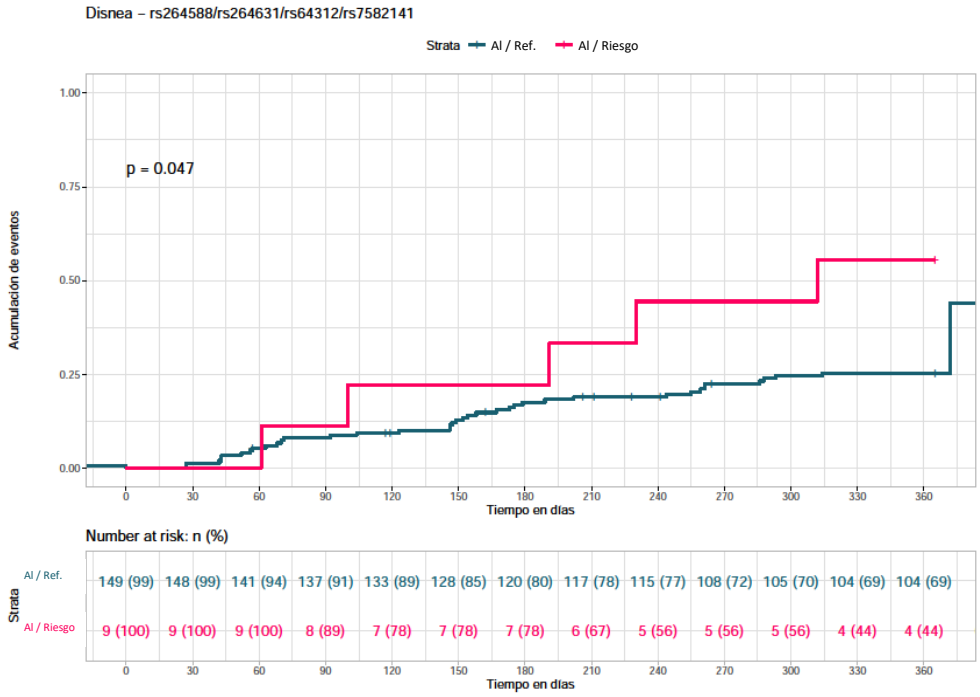


Figura 58. Análisis de Kaplan-Meier de la asociación de los SNPs rs264588, rs264631, rs64312 y rs7582141 con el desarrollo de disnea como efecto adverso a la radioterapia en pacientes NSCLC en la cohorte RADIOGEN.

4.5 Capítulo 5. Propiedades del gen *TANC1* y su caracterización funcional en respuesta a la radiación

4.5.1 Selección de la línea celular

Una de las funciones descritas la proteína TANC1 es la fusión de los mioblastos, que en mamíferos se describió como un proceso necesario en la reparación del músculo en respuesta al daño local. Por lo que, para realizar los estudios funcionales *in vitro* que nos permitan conocer la participación de TANC1 en la respuesta a la radiación, seleccionamos, a falta de un modelo celular humano comercial, las células C2C12. Estas constituyen un modelo murino de mioblastos inmortalizado que nos permite ver el proceso de miogénesis. Son células que en condiciones de suero elevado proliferan rápidamente, mientras que en condiciones de suero bajo se diferencian. Este proceso de diferenciación celular nos permite estudiar las etapas que van desde la proliferación, la fusión de mioblastos mononucleados, la formación de miotubos multinucleados y la formación de miotubos maduros con capacidad contráctil.

4.5.2 Diferenciación de las células C2C12 en condiciones normales

Antes de iniciar el proceso de diferenciación, realizamos ensayos de proliferación celular, para conocer la velocidad a la que las células se replican, tomando en cuenta la división y la pérdida celular provocada por la muerte o la diferenciación. Calculamos el número de células que es necesario sembrar para cada uno de los experimentos en los diferentes frascos y placas de cultivo. Y determinamos la velocidad de replicación al usar el medio de cultivo alto en glucosa con alta concentración de suero bovino fetal.

Las células C2C12 en nuestras condiciones de cultivo, sembrando a una densidad de $5{,}0x10^3$ células viables/cm^2, tienen una fase de latencia de 10 ± 2 horas, un crecimiento exponencial de 60 ± 6 horas, la fase estacionaria o de diferenciación inicial en el caso de nuestras células C2C12 tiene una duración de 48 ± 6 horas que se continúa con la fase de muerte celular o la fase de formación de miotubos maduros en nuestro caso. (***Figura 58***)

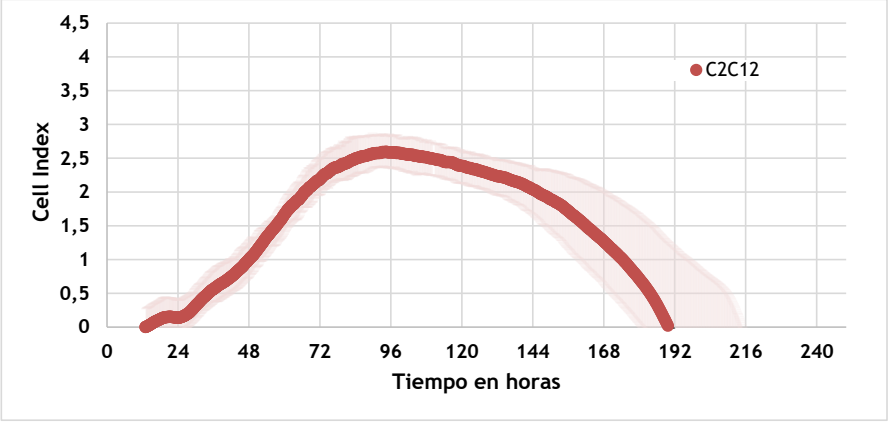


Figura 59. Curva de proliferación/diferenciación del análisis celular en tiempo real en células C2C12. En (rojo) la cuantificación media de ocho replicas y en (rojo claro) la variación mínima y máxima entre replicas.

Determinamos que una confluencia de ~ 80% se consigue sembrando 5,0x10^3 células viables/cm^2 que se mantienen en cultivo 48 horas, con el cambio de medio de cultivo a las 24 horas.

Para estudiar el proceso de miogénesis induciendo la diferenciación en las células C2C12 (***Figura 59***), estandarizamos el protocolo para que entre las 24 y las 48 horas posteriores a la adición del medio de diferenciación se observen las primeras fusiones entre mioblastos mononucleares, a partir del quinto día observamos la formación de miotubos cada vez más grandes, con mayor número de núcleos dentro, y es durante el séptimo día cuando observamos la contracción de los miotubos maduros. (***Figura 60***)

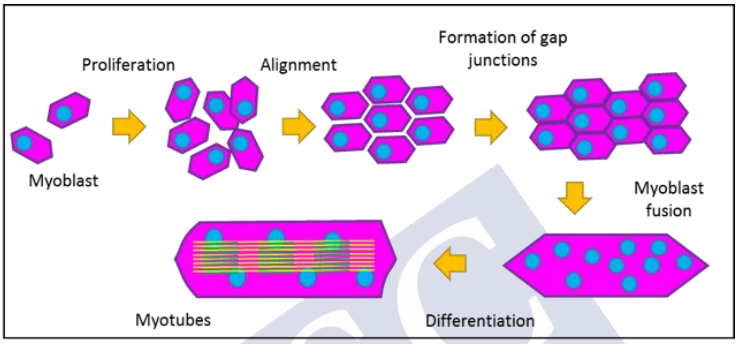


Figura 60. Esquema de la diferenciación celular de mioblastos maduros en las células C2C12.

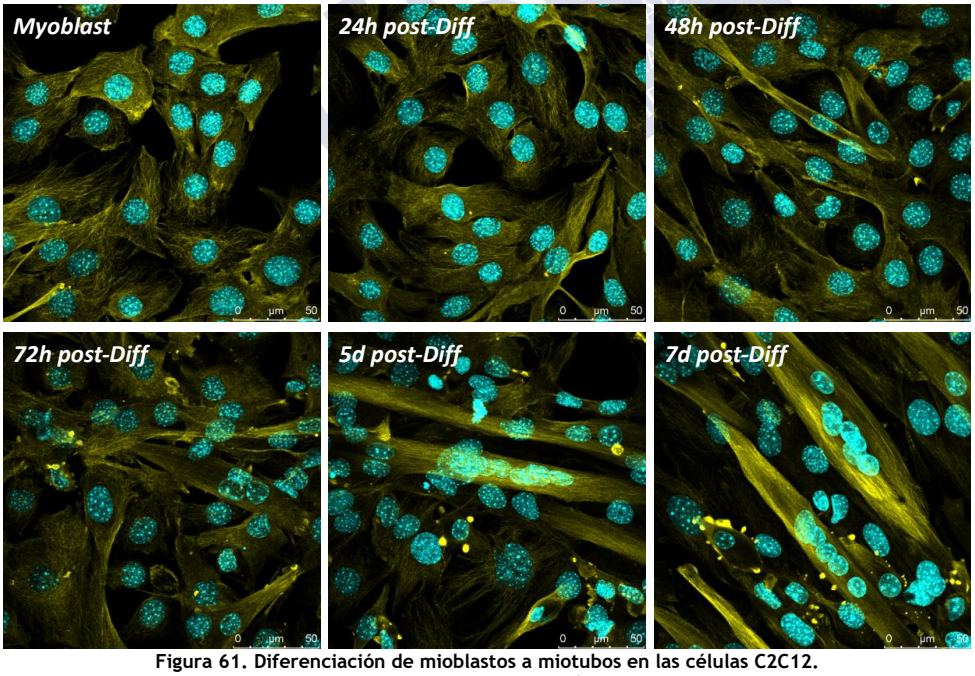


Figura 61. Diferenciación de mioblastos a miotubos en las células C2C12.
Marcaje en (amarillo) α-tubulina y en (cyan) los núcleos marcados con Hoechst.

4.5.3 Localización de la proteína TANC1 durante el proceso de diferenciación celular

Durante la fase de mioblastos la presencia de TANC1 es casi nula, la logramos identificar en algunas células aisladas. Una vez que inducimos la diferenciación y tras las primeras 24 horas, comienza a aumentar la presencia bien localizada de TANC1 y se observa la migración de la proteína desde el núcleo a una posición cercana a la membrana celular. Durante las 24-48 horas posteriores a la diferenciación, es el momento en que más localizado se observa la proteína, tras las 72 horas y una vez formados los miotubos maduros, tiene un patrón más difuso. (***Figura 61***)

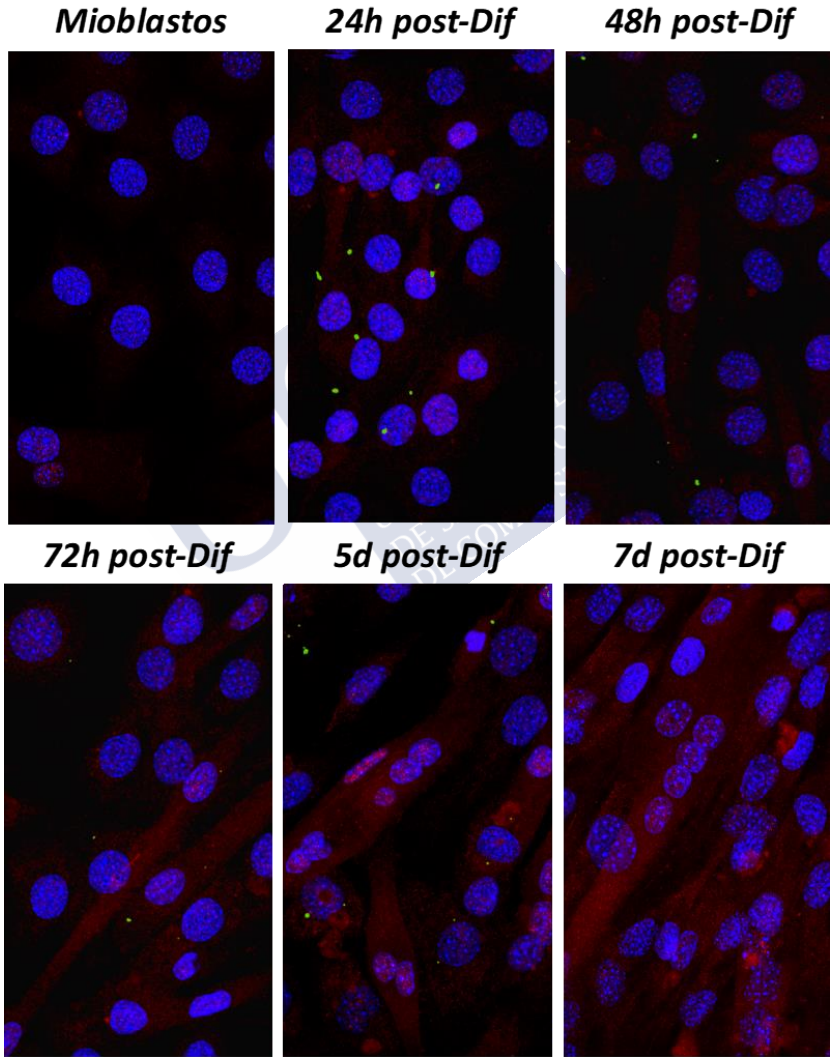


Figura 62. Localización de la proteína TANC1 durante la diferenciación celular de mioblastos a miotubos maduros en las células C2C12.
Marcaje de TANC1 en (verde), marcaje inespecífico/autofluorescencia (rojo) y los núcleos marcados en (azul) con Hoechst.

Para estudiar la localización tan específica que encontramos de TANC1, sobre todo en las 24/48 horas, momento en que ocurre la fusión de los mioblastos, realizamos un ensayo adicional agregando un marcador de α-Tubulina, que nos permite observar la estructura de la célula y al mismo tiempo la localización de TANC1. La participación de TANC1 en la fusión de los mioblastos se describió porque la falta de la proteína producía una falta de desarrollo de miotubos maduros, pero se mantenía la capacidad de diferenciación, haciendo que las células produjeran Miosina, un marcador del miotubo maduro. Por lo que se dedujo que TANC1 participaría en el complejo de proteínas pre-fusión. El esquema descrito en drosófila se describe en la ***Figura 62***, en donde Rols, el ortólogo de TANC1 se localiza en la célula pre-formada que permite la fusión de los mioblastos competentes.

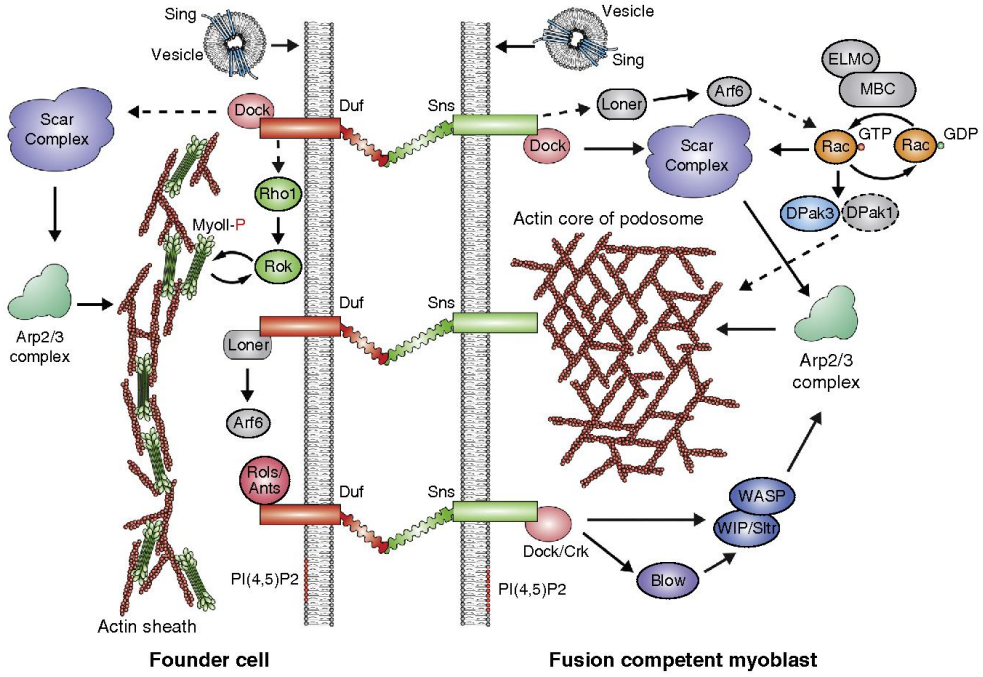


Figura 63. Esquema de la fusión de los mioblastos, con la participación de Rols (ortólogo de TANC1). Adaptada de: Kim et al. (2015). [306], con permiso de: Elsevier.

Hemos identificado el momento en que ocurre la fusión de los mioblastos entre las 24 y las 48 horas, y gracias a la técnica utilizada, hemos localizado a TANC1 en la formación del poro entre las membranas celulares de dos mioblastos, lo que confirma su participación en el complejo de proteínas que intervienen en la fusión de los mioblastos, para la formación de los miotubos. (***Figura 63***)

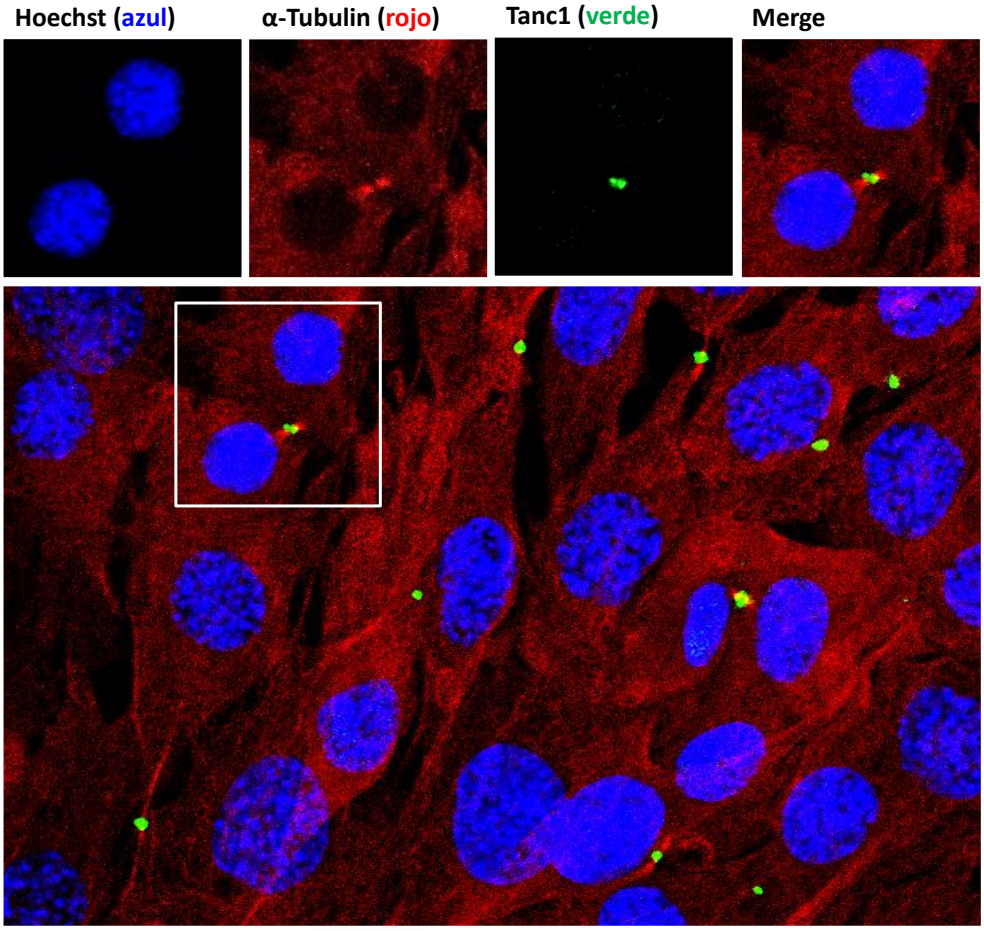


Figura 64. Localización de TANC1 durante el momento de la fusión de los mioblastos en las células C2C12. Marcaje en de los núcleos en (azul) con Hoechst, en (rojo) la proteína α-tubulina y en (verde) TANC1.

4.5.4 Efecto de la radiación de los mioblastos C2C12 en la miogénesis

Una vez que estudiamos el proceso de diferenciación en las células C2C12 en las condiciones normales, quisimos conocer el efecto producido tras radiar los mioblastos así como su capacidad para formar miotubos maduros. Sometimos a las células C2C12 en su fase de mioblastos a diferentes dosis de radiación ionizante, 2Gy, 4Gy, 6Gy, 8Gy y 10Gy, como control utilizamos unas células C2C12 sin radiar (0Gy), pero que fueron transportadas en las mismas condiciones que las células radiadas.

Tras la radiación, damos 24 horas de estabilización y las sometemos al cambio de medio para diferenciación. Después de siete días de diferenciación observamos que las células radiadas con 2Gy, mantuvieron su capacidad de formar miotubos, aunque ésta va disminuyendo conforme aumenta la dosis de radiación, hasta que los mioblastos radiados a 8 y 10 Gy prácticamente pierden la capacidad de formar miotubos maduros. (***Figura 64)***

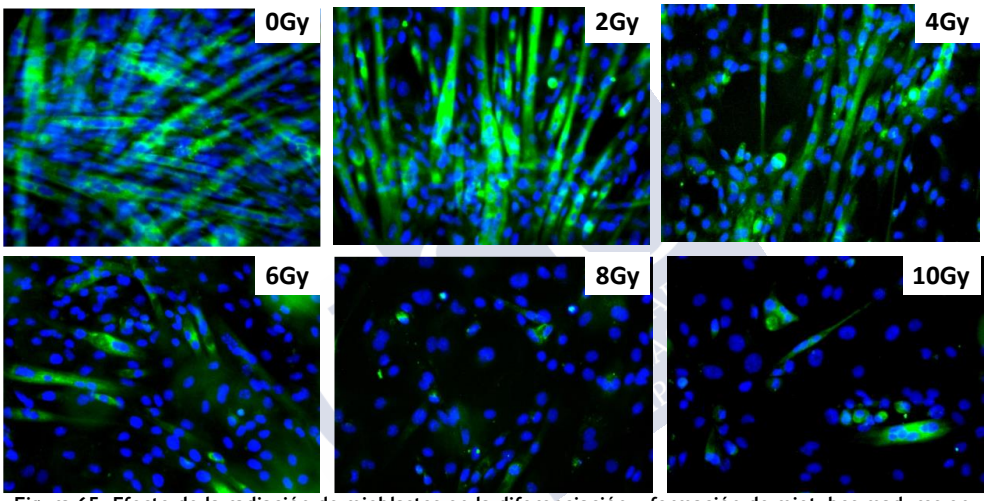


Figura 65. Efecto de la radiación de mioblastos en la diferenciación y formación de miotubos maduros en células C2C12.

4.5.5 Efecto del silenciamiento del gen *Tanc1* en la miogénesis en las células C2C12

Llevamos a cabo el silenciamiento del gen *Tanc1* mediante la transfección de partículas lentivirales, para lo cual usamos dos vectores comerciales con ratios de transfección distintas, uno con un ratio de 70% de silenciamiento y el otro con un ratio de 90%. La eficiencia del silenciamiento la comprobamos mediante Western blot (***Figura 65***), en comparación con las células control transfectadas con el vector usado para el silenciamiento, pero sin la secuencia diana.

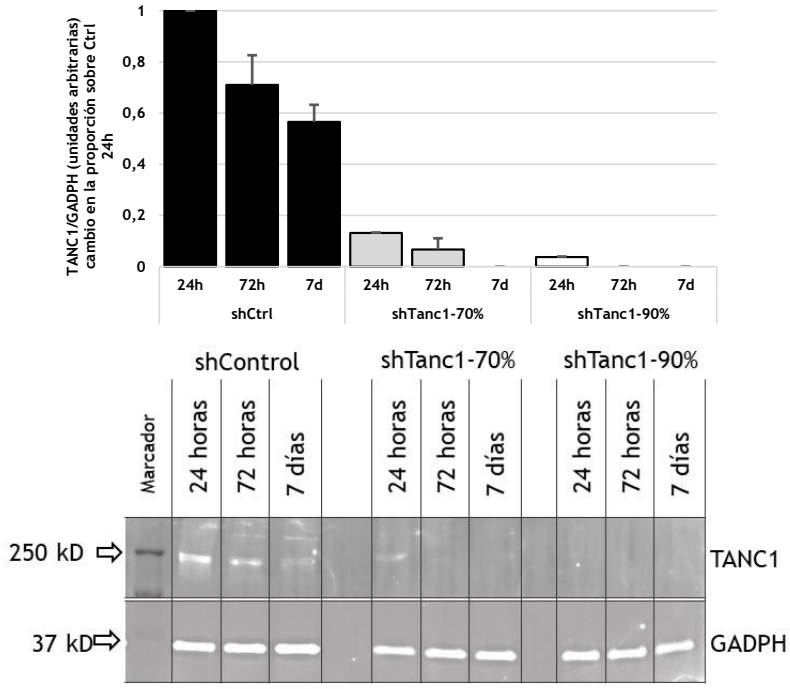


Figura 66. Western Blot de la comprobación del silenciamiento de *Tanc1* en las células C2C12. shControl (izquierda), sh*Tanc1*-70% (centro) y sh*Tanc1*-90% (izquierda).

Los periodos de la curva de proliferación tuvieron ligeros cambios con respecto a las células C2C12 sin transfectar, sin embargo, conservan una fase de latencia de 10 ± 2 horas. Las células transfectadas presentan un crecimiento exponencial con una pendiente distinta en cada una de las líneas celulares, que llegan a su máxima confluencia a las 48 ± 6 horas con una fase estacionaria distinta para cada una de las líneas, lo cual depende del grado de diferenciación. (***Figura 66***) Las células que se diferencian más rápido son las C2C12 shControl, seguidas de las sh*Tanc1*-70% y por último las sh*Tanc1*-90%.

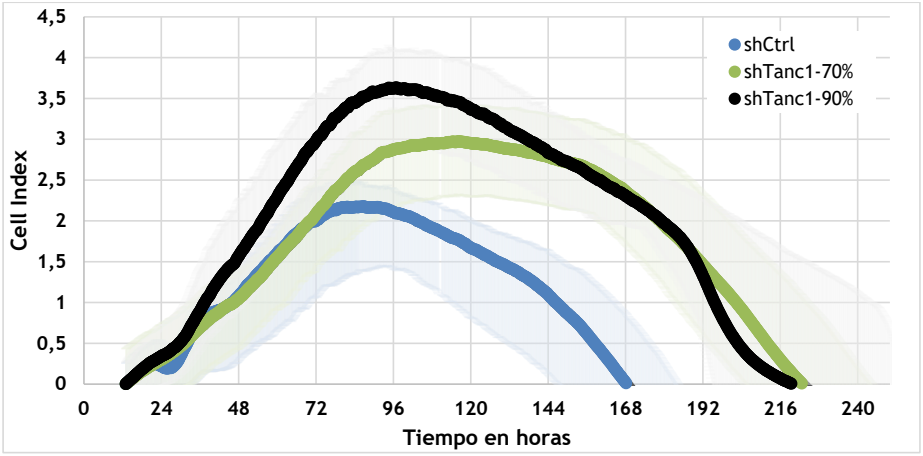


Figura 67. Curva de proliferación/diferenciación del análisis celular en tiempo real en las células transfectadas.
C2C12shControl (azul), C2C12sh*Tanc1*-70% (verde) y C2C12sh*Tanc1*-90% (negro), (línea de color intensa) representa la media de ocho réplicas y el (color claro) la variación minima y máxima entre réplicas.

Una vez confirmado que la fase de proliferación ocurre al mismo tiempo en las tres líneas transfectadas de C2C12, y que el tratamiento no afecta su capacidad de división celular, realizamos la diferenciación a los siete días, para conocer si el silenciamiento del gen *Tanc1*, provoca alguna alteración en la diferenciación y formación de los miotubos maduros.

Durante las primeras 24 horas, las células se comportan de forma similar, a las 48 horas, comienza a verse la fusión de los mioblastos en la línea C2C12shControl, y aunque en menor frecuencia, alguna fusión en las C2C12sh*Tanc1*-70%. No identificamos fusiones en las células C2C12sh*Tanc1*-90%. (***Figura 67***) Al continuar el estudio de las células durante los siete días posteriores a la diferenciación, esta diferencia se hace más evidente. (***Figura 68***)

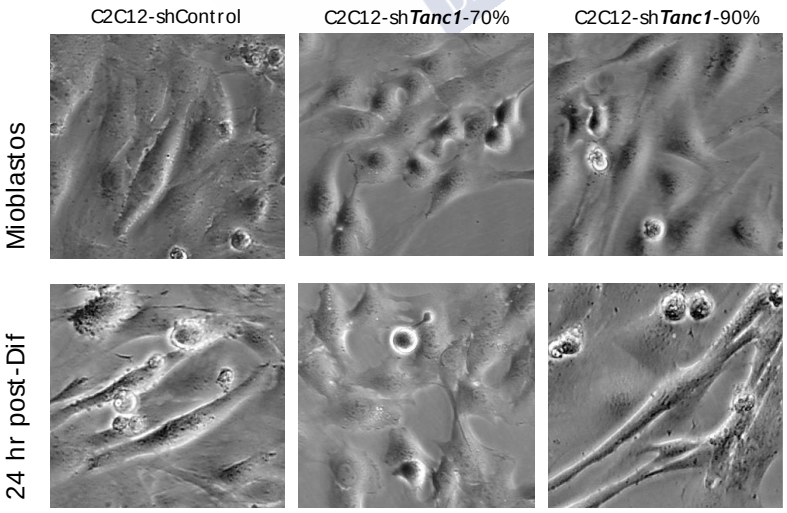


Figura 68. Primeras fases de la diferenciación en las células transfectadas.
C2C12 shControl, sh*Tanc1*-70% y sh*Tanc1*-90%.

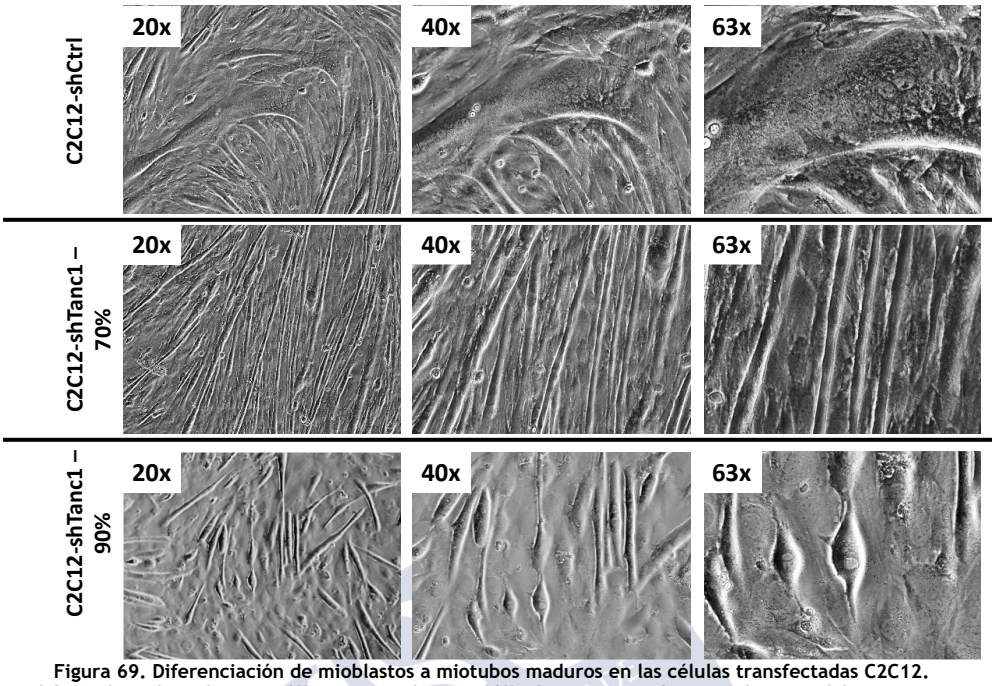
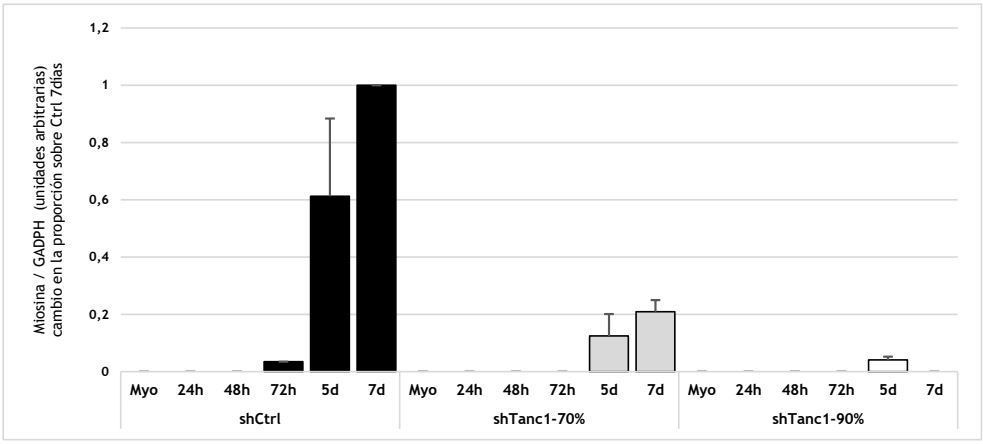


Figura 69. Diferenciación de mioblastos a miotubos maduros en las células transfectadas C2C12. shControl (arriba), sh*Tanc1*-70% (centro) y sh*Tanc1*-90% (abajo) en tres distintos objetivos del microscopio [20x(izquierda), 40x(centro) y 63x(derecha)]

Para saber si los miotubos formados son miotubos maduros, detectamos mediante Western blot la presencia de la proteína Miosina de cadena pesada (***Figura 69***) en donde pudimos observar que la presencia de Miosina en el día siete posterior a la inducción de la diferenciación en las tres líneas transfectadas de C2C12. Además, realizamos inmunofluorescencias marcando la Miosina de cadena pesada y vemos que la capacidad de diferenciación de los mioblastos a pesar del silenciamiento del gen *Tanc1* se conserva. Observamos que la principal diferencia entre el grado de silenciamiento consiste en la cantidad de núcleos que forman cada miotubo, la longitud, así como el grosor de los miotubos. (***Figura 70***)

Durante el séptimo día, cuando los miotubos maduros se encuentran formados y las fibras se contraen, observamos que las células transfectadas con el plásmido control conservan una contracción similar a la que presentan las células C2C12 sin transfectar. La habilidad de contraerse disminuye notablemente en las células silenciadas al 70% y en todas las repeticiones del ensayo no hemos logrado identificar contracción en las fibras monocelulares diferenciadas de las C2C12-sh*Tanc1*-90%.



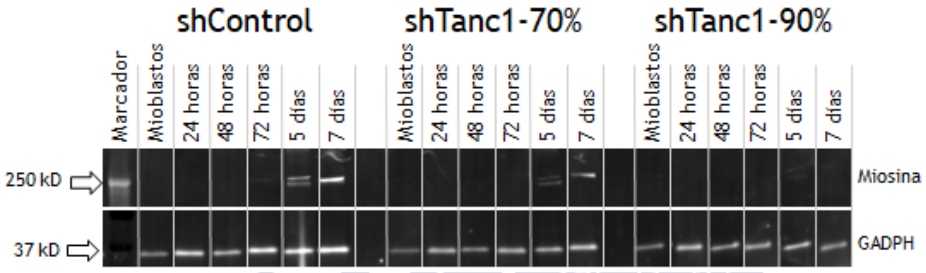


Figura 70. Western Blot de la proteína Miosina de cadena pesada en la diferenciación en las células transfectadas.
shControl (izquierda), sh*Tanc1*-70% (centro) y sh*Tanc1*-90% (derecha)

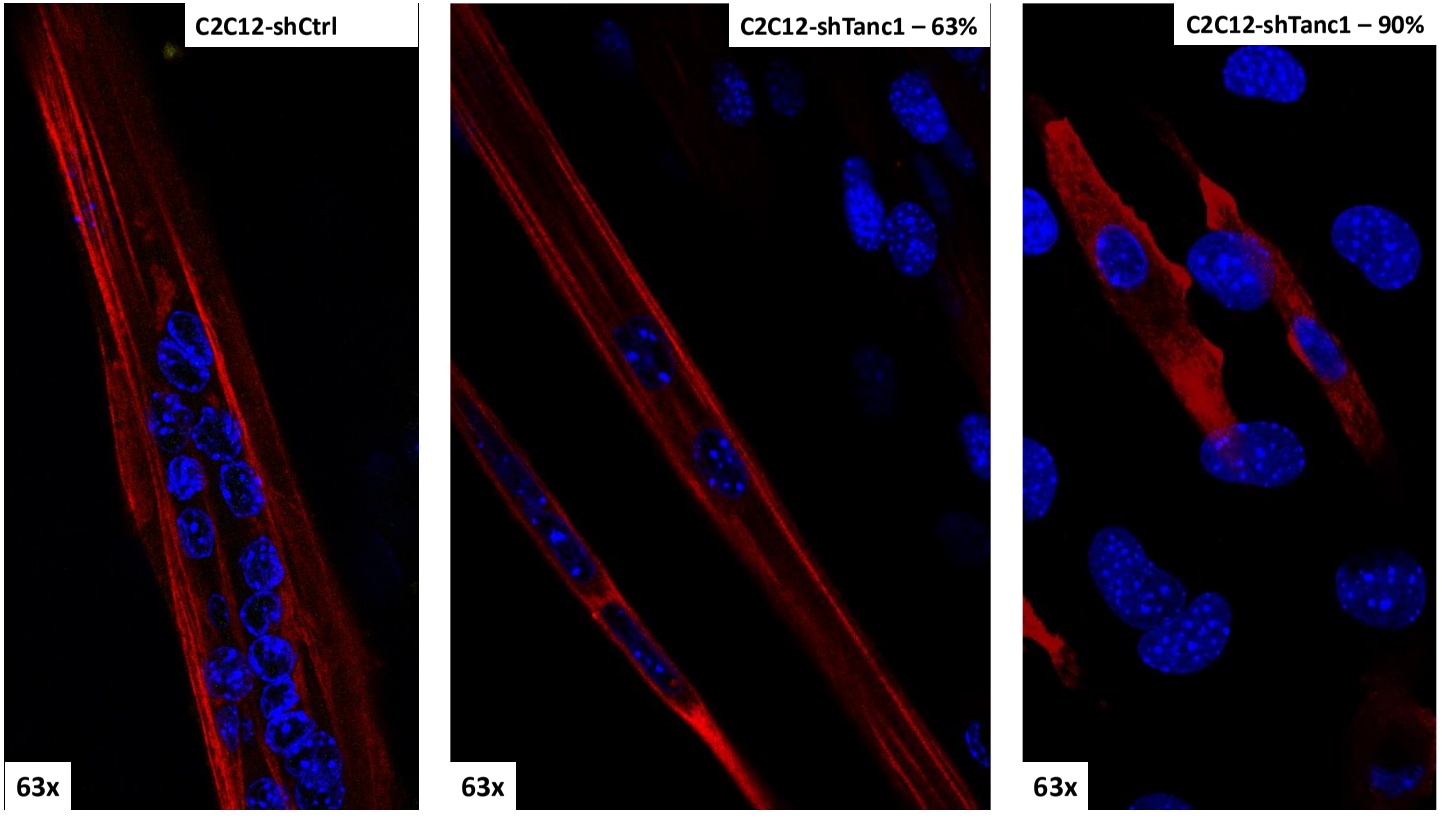


Figura 71. Efecto del silenciamiento del gen *Tanc1* en la diferenciación de mioblastos a miotubos en las células C2C12.
Marcaje en (rojo) Miosina de cadena pesada y en (azul) los núcleos con Hoechst

4.5.6 Efecto de la radiación en la miogénesis en células C2C12 con silenciamiento del gen *Tanc1*

Conocemos en condiciones normales la formación de los miotubos a través de la diferenciación de las células C2C12, conocemos el efecto provocado por la radiación de las células y su interferencia con la miogénesis en las células C2C12, y también conocemos el efecto durante el proceso de formación de miotubos maduros al silenciar el gen *Tanc1* en las células C2C12. Por lo que quisimos conocer el efecto de la radiación en las células con el gen *Tanc1* silenciado durante el proceso de diferenciación y la formación de los miotubos.

Radiamos las tres líneas celulares (shControl, sh*Tanc1*-70% y sh*Tanc1*-90%) a diferentes dosis, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy, con un control de radiación marcado como 0 Gy que realizó el desplazamiento junto con las otras placas de cultivo hasta el acelerador, allí se mantuvo en las mismas condiciones de temperatura y tiempo fuera de la incubadora de CO_2.

Detectamos una pérdida de la capacidad de fusión de los mioblastos en las células relacionada con la dosis de radiación recibida. Esta dificultad para formar miotubos fue mayor en las células silenciadas, que en las células control. Y entre las células silenciadas, la formación de miotubos fue notoriamente menor en las células silenciadas al 90%. (***Figura 71***)

Morfológicamente, las células sh*Tanc1*-70% que no recibieron radiación, fueron similares a las células shControl que recibieron 2 Gy. Las células sh*Tanc1*-70% que recibieron 2 Gy, presentaron una apariencia y morfología similar a las células shControl que reciberon 4 Gy, de igual forma las que recibieron 4Gy fueron similares a las shControl que recibieron 6 Gy.

Las células sh*Tanc1*-90% que no recibieron radiación presentaron morfología similar a las sh*Tanc1*-70% que recibieron 4 Gy y a las shControl que recibieron 6 Gy. Este patrón se observa al comparar las distintas líneas celulares y dosis de radicación: las células sh*Tanc1*-90% que recibieron 2 Gy son similares a las sh*Tanc1*-70% que recibieron 6Gy y las shControl que recibieron 8 Gy. (***Figura 72)***

Estas características se cuantificaron mediante el estudio morfológico de los miotubos, en donde encontramos una diferencia significativa entre la longitud de los miotubos formados por las células shControl en comparación con los formados por las líneas sh*Tanc1*-70% y sh*Tanc1*-90% sin radiación. A los 2Gy la longitud de los miotubos fue significativa únicamente comparando los shControl contra los sh*Tanc1*-90% y nuevamente la diferencia fue significativa ($P< 0,05$) en las células radiadas a 4Gy en las tres líneas celulares. La longitud de los miotubos sh*Tanc1*-90% se mantuvo constante, debido a que la mayoría de los miotubos encontrados eran mononucleados. (***Figura 73***)

En cuanto al número de núcleos por miotubo, la diferencia fue significativa a los 0Gy, 2Gy y 4 Gy comparando los shControl frente a las líneas sh*Tanc1*-70 y sh*Tanc1*-90%. Nuevamente la cantidad de núcleos en las sh-*Tanc1*-90% independientemente de la dosis siempre fue mayoritariamente de 1 núcleo por miotubo.

En el análisis del diámetro de los miotubos, la diferencia fue más significativa se observa cuando comparamos las células shControl y los diámetros de los miotubos de las células silenciadas. En las shControl podemos observar una disminución del diámetro de los tubos uniforme dependiente de la dosis de radiación, mientras que en las células silenciadas, el diámetro es inferior independientemente de la dosis.

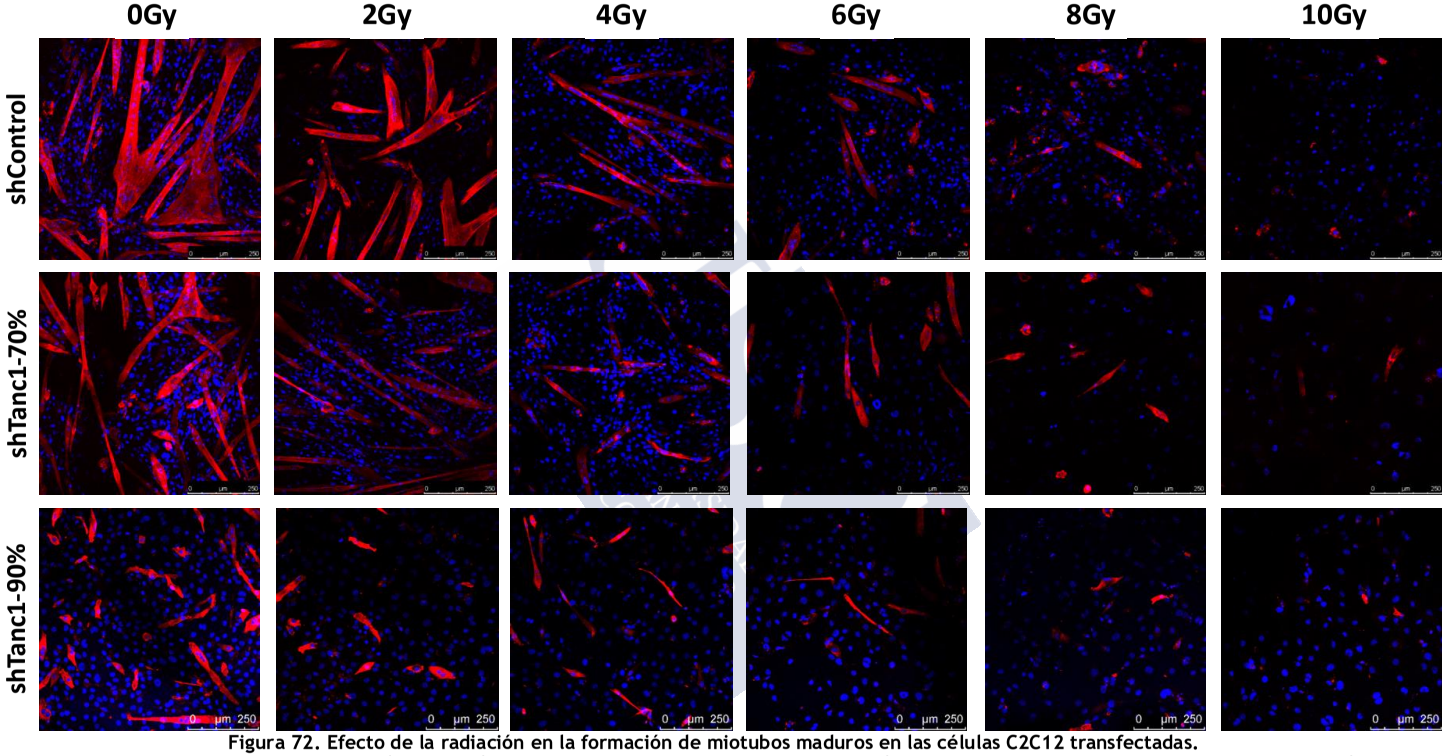


Figura 72. Efecto de la radiación en la formación de miotubos maduros en las células C2C12 transfectadas.
shControl (arriba), sh*Tanc1*-70% (segunda línea de imágenes) y sh*Tanc1*-90% (abajo). Las filas de imágenes representan el aumento de la dosis de radiación (0Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy, 8Gy y 10Gy; de izquierda a derecha). Miosina de cadena pesada se encuentra marcada en (rojo) y los núcleos en (azul) con Hoechst.

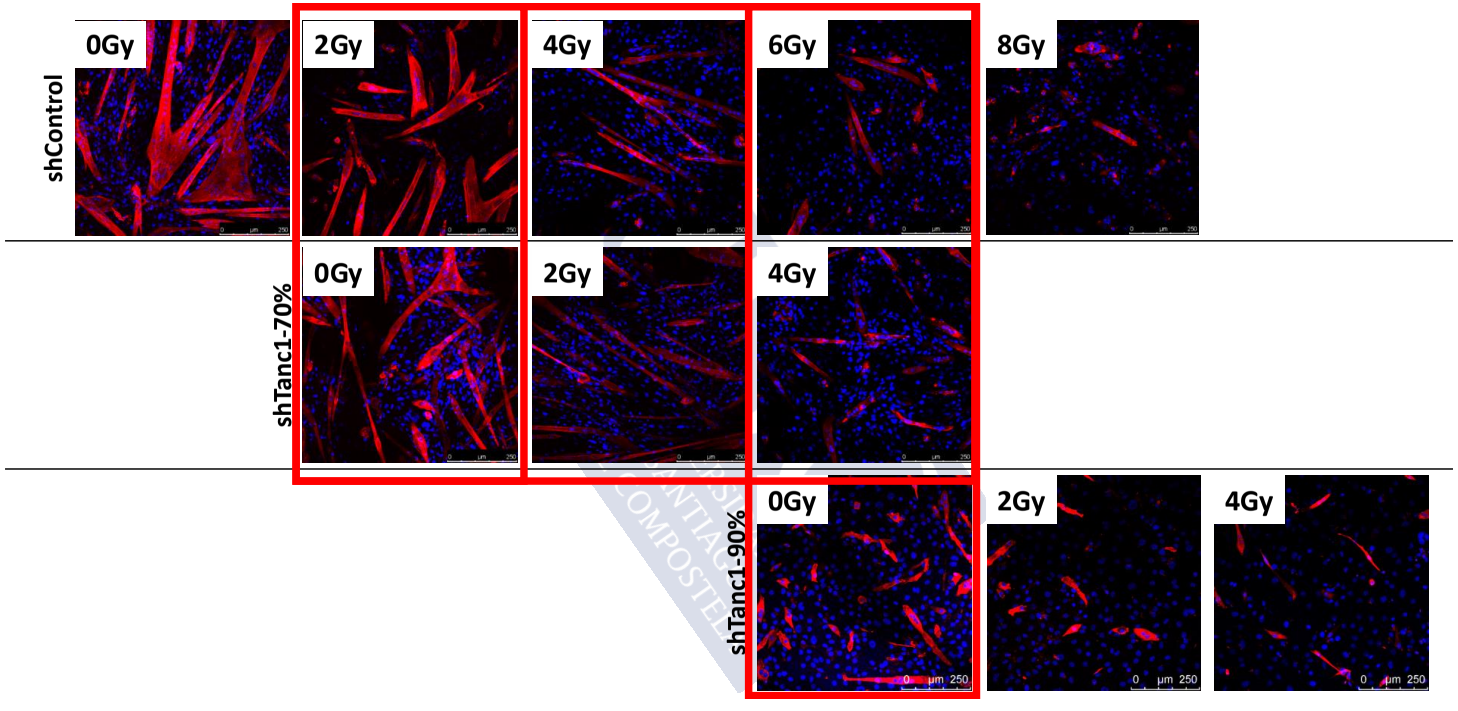


Figura 73. Diferencias en la morfología de los miotubos dependiendo del grado de silenciamiento del gen *Tanc1* y la radiación recibida.
Marcado en (rojo) la Miosina de cadena pesada y en (azul) los núcleos con Hoechst

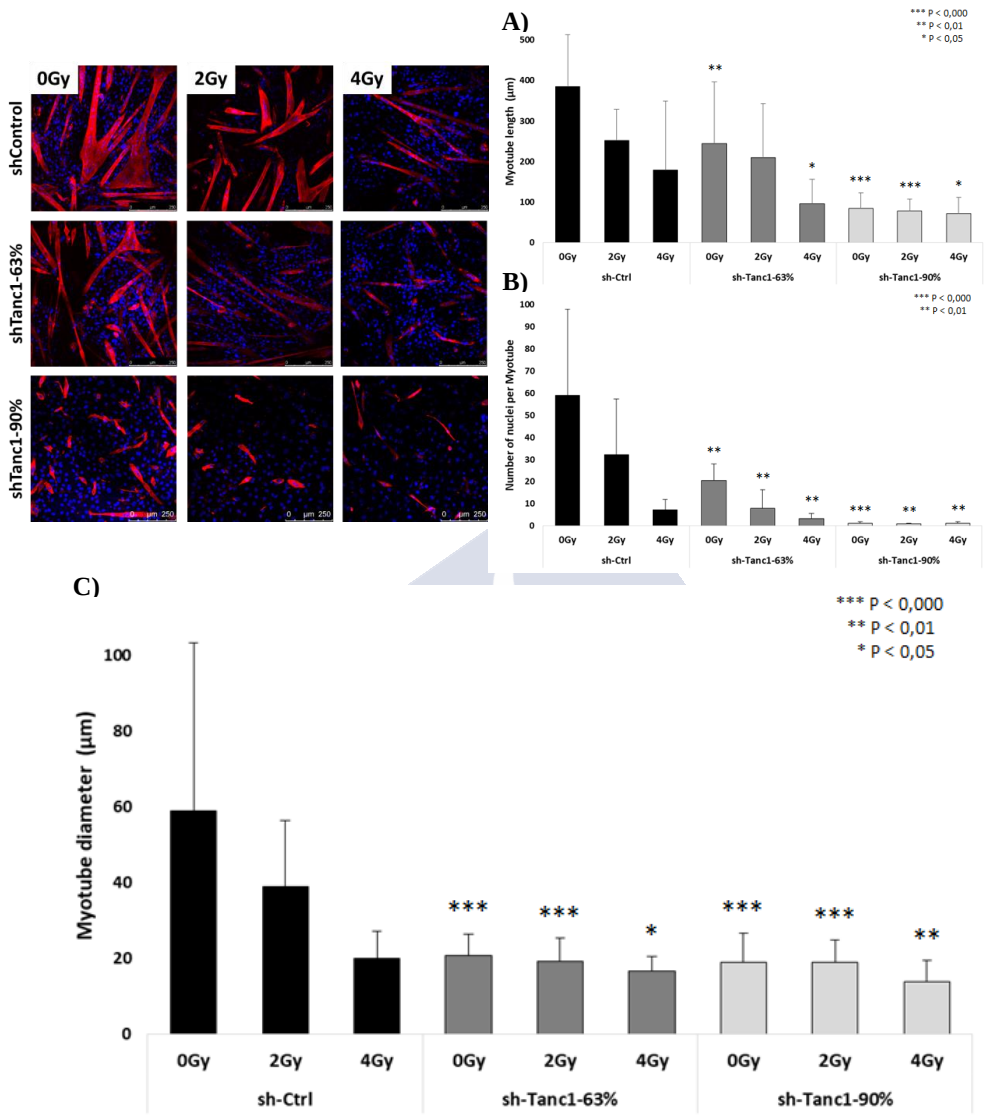


Figura 74. Estudio morfológico de los miotubos maduros después de siete días de diferenciación en las células transfectadas.

shControl (izquierda), sh*Tanc1*-70% (centro) y sh*Tanc1*-90% (derecha), cuyos mioblastos fueron radiados a 0Gy, 2Gy y 4Gy. A) longitud de los miotubos; B) número de núcleos por miotubo; y C) diámetro de los miotubos. *P valor < 0,05, ** P valor < 0,01 y ** P valor < 0,001.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los factores genéticos implicados en los efectos adversos a la radiación en pacientes con cáncer han sido estudiados desde diferentes perspectivas y adecuándose a las nuevas tecnologías a lo largo de la última década. Los estudios de asociación gen candidato y GWAS han llevado a la identificación de posibles marcadores genómicos asociados al desarrollo de estos efectos adversos. La gran mayoría de los estudios se han enfocado principalmente en pacientes con cáncer de próstata y mama, debido posiblemente a que estos tumores presentan alta incidencia, relativamente larga supervivencia, y a que los efectos adversos de la radioterapia son en su gran mayoría independientes de los efectos producidos por la evolución de la enfermedad. Esto permite obtener cohortes con cientos o miles de pacientes y con seguimientos largos, en las cuales se facilita la búsqueda de toxicidades asociadas al tratamiento. En el caso del cáncer de pulmón, los estudios realizados hasta el momento para identificar factores genéticos asociados a las reacciones adversas de los pacientes tratados con radioterapia se han limitado a estudios de asociación gen candidato. En éstos se han incluido aquellos genes participantes en rutas descritas en los procesos que intervienen en la capacidad de los tejidos de tolerar la radiación, como son las rutas de inflamación, reparación de ADN, proteínas de choque térmico, señalización de citoquinas, o de genes que codifican para proteínas antioxidantes.

En general, la radiogenómica en cáncer de pulmón es un gran reto. Comenzamos enfrentándonos a la complejidad de definir correctamente el fenotipo, ya que habría que distinguir entre los síntomas propios del cáncer, las complicaciones de los tratamientos concurrentes y la toxicidad real provocada por la radiación. Para intentar minimizar este problema, nuestros estudios contemplan un análisis multivariable, en donde la selección de las covariables, tales como tratamientos médicos, comorbilidades, síntomas previos al inicio de la radiación e incluso características propias del tumor, histología, tratamientos concomitantes y por supuesto la dosimetría de la radioterapia, se analizaron utilizando modelos de regresión en asociación con cada uno de los fenotipos estudiados, de tal forma que si alguna de estas variables estuviera condicionando la evaluación de la toxicidad, sería considerada dentro del análisis final.

Sin duda otro gran desafío es el de disponer de cohortes de tamaño adecuado para fenotipos muy específicos. De hecho, las cohortes de pacientes NSCLC que estudian la asociación de variantes genéticas desde un enfoque gen candidato, presentan menos de 400 pacientes, con una media de 192 pacientes incluidos. A pesar de este pequeño número de pacientes, algunos de los estudios gen candidato tuvieron poder estadístico adecuado, y obtuvieron grandes efectos de asociación. En nuestro caso, la cohorte RADIOGEN de pulmón original está formada por más de 500 pacientes. Sin embargo, si excluimos a aquellos pacientes con estadios metastásicos, los que reciben radioterapia holocraneal profiláctica, los pacientes con diagnóstico de carcinoma microcítico, los que han tenido un cáncer previo, los que presentan una esperanza corta de vida debido a comorbilidades, la cohorte se reduce en un 65%, lo cual disminuye notoriamente el tamaño muestral, tan importante en estudios genómicos.

Un rasgo característico del cáncer de pulmón, que podría estar afectando al estudio de los efectos adversos a la radiación, es la tasa de supervivencia. Debido a la baja tasa de supervivencia en comparación con otros tumores, el período de seguimiento también es menor. Esto lleva a que, por ejemplo, en el caso de los pacientes de cáncer de pulmón tratados con radioterapia, la toxicidad tardía se evalúa a los 12 meses, mientras que en otros tipos de cáncer como son próstata y mama, la toxicidad tardía se considera aquella que ocurre después de los 24 meses del final del tratamiento radioterápico. Por ejemplo, nuestra cohorte RADIOGEN-

próstata tiene pacientes que rondan los 10 años de seguimiento. Acortar los tiempos a 12 meses podría estar detrás de una incidencia de toxicidad demasiado baja, que complica la realización de estudios con un adecuado poder estadístico. Considerar 12 meses como toxicidad tardía podría estar dificultando la observación de manifestaciones clínicas asociadas a la pérdida de la función de algún tejido o la aparición de fibrosis y sus consecuencias clínicas. No obstante, el abordaje multidisciplinar y sobre todo el gran avance tecnológico vivodo por la radioterapia en los últimos años, está llevando a un aumento en la tasa de supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón, por lo es posible que futuras cohortes incluyan seguimientos más extensos. Sin embargo, a día de hoy, la única posibilidad que tenemos para aumentar los eventos de toxicidad en los pacientes NSCLC es incluir la mayor cantidad de pacientes en cada cohorte, así como trabajar colaborativamente con otros investigadores, e incrementar de esta forma el número de cohortes a analizar.

Otro reto importante es determinar aquellos factores ambientales que están directamente relacionados con el cáncer de pulmón, y que a su vez pueden repercutir en los síntomas evaluados como toxicidad, para así considerarlos adecuadamente en los estudios realizados. Por ejemplo, el tabaquismo o el índice de masa corporal son dos factores que van a influir enormemente en la evaluación de toxicidades como la disnea o la tos. Estas variables deben incluirse en modelos de regresión para identificar aquellas que están relacionados con cada fenotipo estudiado, de tal forma que se consideren como covariables en los análisis y de esta forma disminuir el sesgo que puedan provocar en los resultados obtenidos.

Comenzamos este trabajo proponiéndonos validar en nuestra cohorte las variantes genéticas previamente descritas en asociación con el desarrollo de toxicidad a la radiación en pacientes NSCLC. (**Capítulo 1**) Para ello, seleccionamos estudios que habían replicado sus hallazgos en una cohorte de validación. Los SNPs incluidos pertenecen a genes de la ruta de reparación de roturas de doble cadena del ADN, genes involucrados en el proceso inflamatorio, así como genes de proteínas de choque térmico. Las toxicidades evaluadas por estos estudios fueron la esofagitis y la neumonitis. De los SNPs estudiados, el SNP rs7165790, una variante intrónica en el gen *BLM* en el *locus* 15q26.13 previamente descrita por Zhao et al. (2016), [227] se asoció nominalmente con la disminución del riesgo de presentar esofagitis como complicación a la radioterapia. El gen *BLM* codifica para una proteína recQ helicasa, una enzima que restaura errores en la replicación del ADN, descrita en la resección de la cadena sencilla del ADN en las etapas iniciales de la recombinación homóloga, actuando directamente en el inicio de la reparación de las roturas de doble cadena. Mutaciones en este gen son causales del síndrome de Bloom, un trastorno caracterizado por inestabilidad del genoma con aumento en la susceptibilidad al cáncer. En modelos celulares de cáncer de mama se ha demostrado que el silenciamiento del gen *BLM* disminuye la proliferación celular y sensibiliza a las células ante agentes quimioterapéuticos. [307] Sin embargo, los mecanismos moleculares y biológicos en los que interviene el gen aún no están del todo claros. Se ha descrito que la proteína puede desempeñar distintas funciones en distintas etapas dentro del proceso de recombinación homóloga, y que incluso tiene más de una actividad anti-recombinasa. [308]

El segundo SNP asociado nominalmente con esofagitis fue el rs4772468, localizado en la región flanqueante 5' del gen *FGF14* en el *locus* 13q33.1, previamente descrito por Pu et al. (2014). [213] El gen *FGF14* codifica una proteína miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos los cuales han sido descritos en varios procesos biológicos como el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis, la reparación de tejidos, así como el

crecimiento y la invasión tumoral. Esta variante fue estudiada en asociación con esofagitis y neumonitis en el estudio de referencia por su asociación con el proceso inflamatorio.

El SNP rs2868371 estuvo asociado significativamente con esofagitis grado CTCAE ≥ 2 (HR = 3,72; 95% IC = 1,49-9,25; p = 0,004) el cual se mantiene significativo después de la corrección de Bonferroni ($Pc \leq 6{,}25x10^{-03}$). El genotipo CG/GG del SNP rs2868371 localizado en el *locus* 7q11.23 en la región intergénica del gen *HSPB1* fue descrito por López-Guerra et al. [222] asociado a espfagitis grado CTCAE ≥ 3. El gen *HSPB1* codifica para la proteína de choque térmico *beta* 1, que actúa en respuesta al estrés como chaperona molecular asociada con procesos de diferenciación celular. Su actividad se considera de mal pronóstico clínico en distintos cánceres, ya que promueve la proliferación y la metástasis de células cancerosas, a las que protege del proceso de apoptosis. [309] Nuestros resultados contradicen el efecto de los hallazgos del estudio de referencia, en el cual se reportó que el genotipo CG/GG tenía un efecto protector de desarrollar esofagitis grado CTCAE ≥ 3 (HR = 0,29; 95% IC = 0,09-0,97; P = 0,045). [222] Esta contradicción ha sido descrita anteriormente y fue atribuida a la variación en la distribución del genotipo entre poblaciones. [310] Sin embargo, la distribución de frecuecia del SNP en nuestra cohorte fue similar a la del estudio de referencia: nuestra cohorte presenta 60,8% de frecuencia para el genotipo CC, y 39,20% para CG/GG; mientras que el estudio de referencia reportó 60% CC, 40% CG/GG en su cohorte de la fase de descubrimiento y 61% CC y 39% CG/GG para su cohorte de validación. Los análisis de regresión de Cox y Kaplan-Meier en donde evaluamos la incidencia acumulada de presentar esofagitis dependiendo del genotipo, mantienen la diferencia entre el estudio de referencia y nuestros resultados. Las curvas y la acumulación de eventos son muy similares, sin embargo, los genotipos son opuestos. Lo mismo sucede cuando se incorporan datos dosimétricos en estos análisis: las curvas muestran que el genotipo CG/GG está asociado significativamente al aumento de la incidencia de esofagitis cuando se compara la dosis media de esófago o el porcentaje de volumen de esófago que recibe 40 Gy o más, mientras que el estudio de referencia detecta una disminución de la incidencia de esofagitis dependiendo del genotipo CG/GG *vs* CC. El origen de esta discrepancia podría tener distintas causas. Por un lado existen cambios en la clasificación de la toxicidad ya que las definiciones del puntaje para la esofagitis son ligeramente diferentes entre los criterios de la CTCAE v3.0 utilizada en el estudio de referencia y la CTCAE v4.0 utilizado en nuestro estudio. La CTCAE v3.0 considera como grado = 2 la indicación de fluidos intravenosos y grado = 3 si esta indicación se mantiene más de 24 horas; la v4.0 excluye los fluidos intravenosos de la clasificación; además la hospitalización es considerada grado = 3 en la v4.0, mientras que no se incluía en la v3.0. Esto podría explicar el hecho que menos del 2% de los pacientes de nuestra cohorte presentaron esofagitis ≥ 3, en comparación con el 16 y 14% que presentaron las cohortes de descubrimiento y de validación en el estudio de referencia. Las distintas técnicas de administración de radioterapia utilizadas podría también estar detrás de estas discrepancias: en nuestra cohorte los pacientes recibieron el tratamiento con radioterapia conformacional 3D, mientras que en el estudio de referencia utilizaron IMRT, 3DRT y algunos pacientes recibieron tratamiento con protones. Por otro lado, no podemos descartar que al ser el SNP un cambio de nucleótido C a G, se hayan genotipado distintas hebras de ADN en cada uno de los estudios. Debido a no conocer la hebra de ADN que se genotipó en el estudio de referencia no podemos descartar esta posibilidad.

No fue posible realizar el estudio de las variantes genéticas previamente descritas en asociación con neumonitis como efecto adverso a la radiación en pacientes NSCLC, debido a la incidencia menor al 2% de neumonitis grado ≥ 2 (según CTCAE) en el periodo de tiempo analizado en

nuestra cohorte. Esta baja incidencia podría explicarse por varios motivos, entre los que se encuentra las distintas técnicas de administración de radioterapia previamente comentada. Además, en el caso de la neumonitis, una posible explicación podría ser el cambio en la versión de las escalas CTCAE. Así, mientras el estudio de referencia consideró como neumonitis grado = 2 (CTCAE versión 3.0) a pacientes sintomáticos, cuyos síntomas no interfieren con actividades de la vida diaria, la versión 4.03 considera CTCAE grado = 2 a los pacientes sintomáticos en donde está indicada una intervención médica y que limita las actividades instrumentales de la vida diaria. El estadio CTCAE grado = 3 en la v3.0 hace referencia a pacientes cuyos síntomas interfieren con sus actividades de la vida diaria o que tienen indicado oxígeno domiciliario mientras que el estadio CTCAE grado = 3 en la v4.03 considera a los pacientes con síntomas severos, en los que está limitado su autocuidado e interfiere con sus actividades de la vida diaria o aquellos que tengan indicado el uso de oxígeno. (***ANEXO 4***)

Hemos llevado a cabo una réplica exacta de los análisis que se describieron en cada uno de los estudios de referencia y hemos replicado dos asociaciones nominalmente significativas entre la esofagitis y dos SNPs, uno de ellos localizado en un gen relacionado con la reparación de rotura de doble cadena del ADN y el otro localizado en un gen de la ruta de inflamación; estas rutas fueron elegidas en los estudios de referencia por haber sido descritas dentro de los procesos radiobiológicos. Sin embargo, la asociación de estos dos SNPs no se mantuvo estadísticamente significativa después de aplicar métodos de corrección para comparaciones múltiples, por lo que no hemos confirmado en nuestra cohorte ninguna de las asociaciones previamente publicadas.

El hecho de no haber conseguido replicar ninguna de las señales no significa necesariamente que estos SNPs no estén asociados con el fenotipo. Se conocen muchas razones que podrían estar detrás de la ausencia de replicación. De hecho, se ha descrito que el factor determinante en la baja reproducibilidad en las pruebas de significación de hipótesis nulas es el bajo poder estadístico. [311–313] Este poder estadístico se relaciona directamente con la magnitud del efecto de la asociación y el tamaño de la cohorte de réplica. Cuando la cohorte de réplica es pequeña (como en nuestro caso), el poder para detectar una asociación a un nivel apropiado de confianza, es bajo. Sin embargo, los estudios de referencia considerados en nuestro trabajo, identificaron asociaciones con un efecto alto: por ejemplo, el estudio de variantes en la ruta de genes de reparación de rotura de doble cadena del DNA identificó un SNP con *odds ratio* de 7,17 (IC 95% 1,77-29) en asociación con esofagitis; en el estudio de variantes en los genes relacionados con la inflamación, el SNP de mayor riesgo presentó un *odds ratio* de 4,15 (IC 95% 1,60-10,28) encontrado en la cohorte de validación en asociación con esofagitis. Si tenemos en cuenta estos valores para calcular el poder de nuestro estudio, observamos que por ejemplo, para un SNP con MAF = 0,50 y *odds ratio* de 7,17 y para un modelo genético recesivo; son necesarios 165 pacientes para tener un poder estadístico de 90% con un P valor de 0,00625 (P valor corregido por Bonferroni para nuestro estudio). El rango de *odds ratio*, así como los diferentes MAF de los SNPs estudiados se analizaron con detalle en el apartado 3.2.2.

También es cierto que nosotros hemos usado la corrección conservadora de Bonferroni la cual podría llevar a obtener resultados falsos negativos, es decir, no identificar asociaciones verdaderas de SNPs con efectos pequeños, al no alcanzar un nivel adecuado de poder estadístico. La corrección para las pruebas múltiples puede ser innecesariamente estricta cuando intentamos confirmar directamente un reporte previo, como sería nuestro caso. [193] Nosotros no hemos incluido nuevas variantes, modelos, ni toxicidades a las reportadas, por lo cual,

podríamos considerar que nuestro estudio tiene poder estadístico suficiente para detectar la magnitud del efecto de los SNPs asociados en los estudios de referencia. De hecho dos variantes han replicado en nuestra cohorte de forma nominal. Esperamos que en un futuro próximo, estudios de mayor tamaño muestral ayuden a validar o descartar definitivamente estas asociaciones.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos en varios intentos previos de validación de variantes genéticas asociadas con efectos adversos a la radiación. [193,314] El estudio de Barnett et al. (2012) [193] no consiguió replicar la asociación de 92 SNPs en 46 genes, los cuales fueron seleccionados por estar previamente asociados con toxicidad a la radioterapia, ya fuera en estudios clínicos o en ensayos *in vitro*; además de incluir 28 SNPs seleccionados por representar las variantes genéticas en los genes relacionados funcionalmente con la radiobiología. Incluyeron en este estudio un total de 976 pacientes con cáncer de mama a las que se les analizaron cuatro toxicidades y el STAT; y 637 con cáncer de próstata a quienes se les estudiaron nueve toxicidades y el STAT. Los investigadores concluyen que cualquier asociación que pudiera identificarse con los SNPs elegidos en su estudio, tendrían la misma probabilidad de resultar asociados, que un conjunto de SNPs seleccionados aleatoriamente en el genoma. Consideran que los resultados previos que usan el enfoque de estudios gen candidato podrían tratarse de asociaciones falsas positivas, por lo que esta aproximación limita el poder determinar la variación individual en respuesta a la radioterapia. Otros estudios se han centrado en el SNP rs1801516 en el gen *ATM* en asociación con el riesgo de fibrosis tardía como efecto adverso a la radiación, los cuales han presentado resultados inconsistentes, como se describe en el estudio de Zhang et al. (2016), [315] en donde muestra los resultados de nueve estudios realizados en cohortes de cáncer de mama, próstata y cáncer de cabeza y cuello.

Son conocidas las limitaciones de los estudios gen-candidato. Por un lado, al tratarse de un estudio de variantes en genes seleccionados por su relevancia en los mecanismos biológicos del fenotipo, cada gen tiene una pequeña probabilidad *a priori* de estar involucrado en la característica estudiada, además, en este tipo de estudios no es posible evaluar simultáneamente la estructura de la población, lo que puede favorecer que existan reportes falsos positivos. [316] Varios estudios gen candidato no tuvieron un soporte estadístico adecuado, como lo han demostrado numerosos estudios con resultados no concluyentes realizados anteriormente en el campo de la radiogenómica [317] pero también en otros entornos fuera de éste. [316] Aún así, el enfoque gen candidato realizado en estudios con un tamaño muestral grande, pruebas múltiples y criterios estadísticos rigurosos podría ayudarnos en la validación independiente de estas variantes. Un ejemplo de ello, es el estudio que realizamos dentro del RGC, un metaanálisis incluyendo 5.456 total pacientes de 17 cohortes, 2.759 pacientes con cáncer de mama y 2.697 con cáncer de próstata en el cual identificamos un incremento en el riesgo de toxicidad a la radiación asociada con el SNP de *ATM* rs1801516. [318] Por otro lado, un estudio reciente llevado a cabo en 285 pacientes con cáncer de mama no encontró asociación del SNP *ATM* rs1801516 con fibrosis o telangiectasia. Tampoco encontraron asociación al realizar un metaanálisis con 12 cohortes independientes. [319]

Las cohortes utilizadas en estudios gen-candidato de radiogenómica en cáncer de pulmón, tienen varias características en común. En general son cohortes con bajo número de pacientes, con datos recolectados de forma discordante, con definición heterogénea de los fenotipos y con una compleja y variada selección de covariables. Para hacer frente a esta realidad los investigadores del área establecieron el RGC, y han intentado minimizar estas deficiencias a

través del proyecto europeo REQUITE, en el cual se han protocolizado los seguimientos y la recogida de datos, se han estandarizado los criterios de selección de pacientes, la toma de muestras y la gradación de las toxicidades, considerando además largos periodos de seguimiento, que se han extendido aún más con la obtención de nuevos proyectos de investigación. REQUITE es un proyecto multinacional, multicéntrico, con el que se ha creado una cohorte con un tamaño muestral mayor al que se lograría en estudios independientes. Por otro lado, en el contexto del RGC, cada vez se están estableciendo más cohortes, recogidas según las recomendaciones establecidas por el RGC y REQUITE. La disponibilidad de las mismas permitirá una mejor replicación de las variantes analizadas en nuestro estudio.

Una de las herramientas que nos permite analizar miles de variantes genéticas en los genomas de los individuos para identificar asociaciones genotipo-fenotipo y que no está asociada a una hipótesis de partida, lo cual podría permitir el descubrimiento de nuevos *loci* de susceptibilidad en enfermedades complejas, es el GWAS. [320] Por lo que, en una segunda aproximación decidimos investigar mediante GWAS la susceptibilidad genética en los efectos adversos a la radiación en los tejidos sanos del paciente NSCLC tratado con radioterapia, (**Capítulo 2**) para intentar determinar nuevos mecanismos biológicos o bien, comprender un poco mejor la arquitectura de dicha susceptibilidad.

Los efectos adversos a la radiación se analizaron en su presentación aguda y tardía. El fenotipo para el análisis de las toxicidades individuales se definió dividiendo en casos (grado ≥ 2, CTCAE v4.0) y controles (grado < 2, CTCAE v4.0). Para el análisis de la toxicidad global se calculó el STAT utilizando la gradación CTCAE v4.0 de la hemorragia broncopulmonar, dolor en la pared del tórax, tos, disfagia, disnea, esofagitis, infarto agudo al miocardio, derrame pericárdico, neumonitis y radiodermatitis.

Se analizaron los datos clínicos, epidemiológicos, dosimétricos, anatomopatológicos, comorbilidades y tratamientos médicos de uso frecuente, mediante regresión logística univariable, para identificar su asociación con cada uno de los fenotipos estudiados e incluirlos como covariables en los modelos de análisis GWAS. Las covariables más frecuentemente asociadas con las toxicidades fueron V60% de esófago, que se asoció con tos, disfagia, disnea, esofagitis y derrame pericárdico; seguido del tratamiento quirúrgico previo a la radioterapia, que se asoció con tos, disnea, fibrosis pulmonar y estenosis traqueal; el estadio clínico del tumor se asoció con estenosis bronquial, tos, disfagia y neumonitis; los siguientes más frecuentes fueron BED, dosis media de pulmón, dosis total de radioterapia, FEV1(%), número de fracciones y el V20% de pulmón. La mayoría de los estudios realizados previamente en pacientes con cáncer de pulmón en asociación con efectos adversos a la radiación habían seleccionado las covariables de acuerdo a su relevancia clínica, la gran mayoría incluía: estatus de fumador, dosis media de pulmón, estadio clínico, el uso de quimioterapia concomitante, V20% de pulmón, dosis total de radioterapia, la presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y las pruebas de función respiratoria FEV1 o DLCO. Es decir que, con nuestro análisis, hemos comprobado de forma estadística la importancia de considerar en el modelo el estadio clínico del tumor, así como las variables relacionadas con las pruebas de función respiratoria o la dosis de radiación. De estas últimas hemos podido seleccionar aquellas más significativas dentro de un grupo de numerosas variables relacionadas, lo que permite un mejor ajuste del modelo. En el análisis de la toxicidad global calculada mediante el puntaje STAT, las variables que estuvieron asociadas significativamente ($P < 0,05$) fueron el sexo, la dosis media de esófago y la dosis media de pulmón. Debido a que el fenotipo (STAT) no había sido explorado

previamente en cáncer de pulmón decidimos considerar también en el modelo las variables con relevancia clínica, como son la quimioterapia, el estatus de fumador y el FEV1(%), además de considerar el puntaje $STAT_{baseline}$, calculado con la evaluación previa al tratamiento de las manifestaciones clínicas evaluadas como toxicidad.

Nuestro estudio es el primer GWAS que busca una asociación con el desarrollo de efectos adversos a la radiación en pacientes con cáncer de pulmón. Identificamos el *locus* 1p21.2 asociado significativamente con el $STAT_{tardío}$ (P valor = $3{,}47x10^{-08}$), con un coeficiente de regresión lineal *Beta* de 0,332 y un error estándar de 0,055; 18 SNPs integran la señal en éste locus (P valores en el rango de $4{,}74x10^{-07}$ a $3{,}47x10^{-08}$). Un segundo *locus* fue identificado en asociación con el $STAT_{tardío}$, el *locus* 12p13.31 (P valor = $4.92x10^{-08}$), sin embargo, cuando incluimos el $STAT_{baseline}$ como covariable se pierde la significancia estadística (P valor = $5{,}98x10^{-08}$); esta señal está integrada por 19 SNPs (P valores en el rango de $5{,}03x10^{-07}$ a $5{,}98x10^{-08}$). Adicionalmente, diez *loci* se encuentran asociados con $STAT_{agudo}$ y nueve *loci* más de los descritos anteriormente se encuentran asociados con $STAT_{tardío}$ con P valores $\leq$ de 10^{-05}.

Para analizar las toxicidades globales aguda y tardía construimos los fenotipos empleando una estrategia de estandarización de los datos con el puntaje STAT, el cual nos permite armonizar las gradaciones de las diferentes toxicidades y nos habilita para en un futuro realizar las réplicas en cohortes independientes que cuenten con datos disponibles. El puntaje STAT ha sido desarrollado exclusivamente para radiogenómica [246] por lo que su uso es común en la mayoría de los estudios realizados en este campo. [192,194,248,259,268,269,318,321]

En el análisis individual de las toxicidades agudas, identificamos 19 *loci* asociados con esofagitis, 11 *loci* con tos y cinco *loci* asociados con disnea con P valor $\leq 10^{-05}$. En las toxicidades tardías, cuatro *loci* asociados con la hemorragia broncopulmonar, seis *loci* con derrame pericárdico, diez *loci* asociados con disnea y uno con neumonitis que tuvieron un P valor de 10^{-05}. Sin embargo, los qq-plot muestran una deflación en la distribución de los P valores, esto puede deberse a las características de nuestra cohorte, con un tamaño de muestra pequeño y con un desequilibrio en los grupos que comparamos (pocos casos en comparación con la cantidad de controles). Realizamos un análisis de componentes principales y logramos identificar que dentro de los fenotipos estudiados, los genotipos se distribuyen de forma homogénea.

Las variantes identificadas en los diferentes fenotipos no coinciden entre sí, tampoco la toxicidad global en comparación las toxicidades analizadas en forma individual. Al analizar los principales hallazgos de las toxicidades agudas en comparación con los encontrados en las toxicidades tardías, no hemos encontrado variantes, ni *loci* coincidentes. Aunque estos resultados necesitan ser validados, apoyarían la hipótesis de una toxicidad a la radiación localizada, con mecanismos biológicos propios en cada órgano de riesgo.

Mediante el análisis de ontología de genes, no logramos identificar términos GO en común entre los genes descritos anteriormente en los estudios del RGC y los identificados en nuestro estudio. Empleando la herramienta Reactome, comparamos también nuestros resultados para saber si forman parte de las rutas de genes conocidas de radiotoxicidad. Los genes asociados a las variantes identificadas en nuestros análisis no pertenecen a ninguna ruta descrita anteriormente. Quince SNPs identificados en estudios del RGC se han identificado en regiones de ARN no codificante, cinco de ellos localizados en cadenas largas de ARN no codificante y

nueve más que no han sido caracterizadas. En nuestros resultados hemos identificado once SNPs localizados en regiones de ARN no codificante y siete que no han sido caracterizados. En resumen, hemos identificado nuevas variantes localizadas en genes, términos GO y rutas que no han sido descritas hasta el momento. Estos resultados podrían aportar nueva información sobre mecanismos involucrados en la radiotoxicidad.

Debemos tener en cuenta que, dado que el tamaño de muestra que usamos en cada uno de los GWAS es relativamente pequeño para estos estudios, los resultados obtenidos podrían estar sufriendo sesgos, por lo que no son definitivos y necesitan ser validados. Por un lado, el bajo tamaño muestral de nuestra cohorte podría llevarnos a no detectar SNPs verdaderamente asociados con la toxicidad, debido a la baja potencia estadística. Por otro lado, aquellos resultados que identificamos como efectos verdaderos, podrían presentar una magnitud del efecto exagerada, provocando un efecto de inflación. [312] Es por ello que consideramos estos hallazgos como resultados preliminares que requieren ser validados en cohortes independientes. El principal objetivo de esas réplicas será evaluar de manera sistemática si los SNPs identificados en nuestros GWAS son o no una señal espuria.

La cohorte internacional de pacientes con cáncer de pulmón del proyecto REQUITE estará disponible en los próximos meses, y la utilizaremos para hacer la validación de nuestros hallazgos. REQUITE pulmón cuenta con más de 800 pacientes, con genotipos imputados, de los que se tiene, además, seguimientos estandarizados de toxicidad, así como los datos clínicos, dosimétricos y epidemiológicos, todos ellos compatibles con nuestra cohorte de pacientes RADIOGEN. Nuestro grupo es el encargado de realizar la búsqueda de marcadores genéticos asociados con la toxicidad en pacientes con cáncer de pulmón mediante GWAS, un proyecto que actualmente está en marcha. Por lo que los resultados obtenidos en nuestra cohorte RADIOGEN podrán contrastarse con los resultados de la cohorte REQUITE. Además, exploraremos la inclusión de otras cohortes de pacientes con cáncer de pulmón que tengan datos adecuados para la réplica de nuestros resultados, tanto entre los miembros del *Radiogenomics Consortium* como fuera de él.

Después de la validación nos centraremos en la realización de estudios post-GWAS a través de la anotación y priorización de variantes, la identificación de posibles genes candidatos o el análisis en búsqueda de la función biológica para explicar los mecanismos involucrados en los efectos adversos a la radiación.

Otra de las hipótesis planteadas en los estudios radiogenómicos ha sido estudiar si la predisposición genética al cáncer puede aumentar el riesgo de efectos adversos a la radiación. El método elegido para abordar esta hipótesis ha sido el uso del puntaje de riesgo poligénico. Partiendo de que la predisposición genética al cáncer suele tener tamaño de efecto generalmente pequeño en cada *locus* individual, considerar los alelos de riesgo como un "perfil genético" permite identificar individuos con riesgo alto. [322] Por ello hemos investigado las variantes genéticas asociadas con el desarrollo de cáncer de pulmón de forma individual y como puntuación del riesgo poligénico y su asociación con el riesgo de desarrollar toxicidades tardías a la radiación. (**Capítulo 3**)

Exploramos las toxicidades tardías de forma individual y también como toxicidad global calculada con el puntaje STAT, en asociación con el riesgo poligénico no ponderado y ponderado con el *odds ratio* de los estudios de referencia. Identificamos asociaciones

nominalmente significativas (P < 0,05) de las toxicidades disnea y tos con riesgo poligénico no ponderado en el análisis univariable y la tos también en el análisis multivariable. Sin embargo, estas asociaciones no se mantuvieron significativas tras hacer la corrección de comparaciones múltiples. Ninguna toxicidad se encontró asociada con el riesgo poligénico ponderado, ni en el análisis univariable, ni en el multivariable.

Adicionalmente analizamos cada uno de los SNPs incluidos en el puntaje de riesgo poligénico de forma individual con las toxicidades y con los STAT. Tres SNPs se asociaron nominalmente con la presencia de tos como complicación después de la radioterapia; dos de estos SNPs se localizan entre los genes *TERT*/*CLPTM1L* dos oncogenes que regulan elementos funcionales del ADN. Se ha descrito que *TERT* interviene en las actividades de la telomerasa y acelera la transformación maligna. *CLPTM1L* codifica para la proteína transmembrana 1 asociada al paladar hendido. Tiene un rol importante como protumorigénico y es una proteína crítica en los cánceres de pulmón provocados por Ras. [323] El tercer SNP se encuentra en el *locus* 15q21.1 asociado con el gen *SEMA6D* descrito en el proceso de diferenciación celular y la regulación de la migración de células de músculo liso. También se ha descrito que este SNP regula la activación de las células T y tiene la capacidad de desencadenar una señalización inversa en las células inmunes interviniendo de esta forma en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune. [324] Tres SNPs se asociaron nominalmente con la disnea, el primero de ellos localizado en el gen *CDKN2B-AS1*, cuyo producto es una molécula de ARN funcional que interactúa con los complejos PRC1 y PRC2, provocando el silenciamiento epigenético de los genes en este grupo. El *locus* ha sido descrito con susceptibilidad genética a varias patologías como son varios tipos de enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad de Alzheimer, endometriosis, glaucoma, fragilidad de los ancianos, entre otros. [325] El segundo SNP se localiza en el gen *SECISBP2L*, que presenta como función la incorporación de la selenocisteína. Este SNP se ha asociado además de al cáncer de pulmón, al peso corporal [326] y al aumento del consumo de alcohol. [327] El tercer SNP es el ya reportado anteriormente asociado con tos, localizado en el gen *SEMA6D*. En el caso de la disfagia, encontramos asociación con dos SNPs, el primero localizado en el gen *RAD52*, un gen importante para la reparación de roturas de doble cadena del ADN y la recombinación homóloga, que regula la interacción ADN-ADN necsaria para el reconocimiento de cadenas de ADN complementarias. Este SNP se ha descrito asociado, además de a cáncer de pulmón a los siguientes fenotipos: pseudohipoaldosteronismo tipo 2, presión sistólica, alcoholismo, índice de masa corporal; [325] el segundo SNP es el ya reportado asociado con tos y con disnea, el rs66759488 (*SEMA6D*). Un SNP, localizado en el gen *FUBP1*, se encontró asociado nominalmente con esofagitis. Se ha descrito que este SNP interviene en la unión ADN-ARN y en el proceso de transcripción. El gen *FUBP1* es un gen importante en el desarrollo del pulmón y cuya expresión aberrante se ha encontrado en tejido tumoral. [328] Finalmente encontramos asociación nominal entre el SNP rs66759488 (SEMA6D) y el $STAT_{tardío}$. Este SNP se había descrito previamente asociado a tos, disfagia y disnea. Sin embargo, ninguno de estos SNPs mantuvo la asociación significativa después de la corrección de Bonferroni.

Nuestros resultados son similares a los reportados en los estudios previos que buscaron asociación entre el riesgo poligénico de susceptibilidad al cáncer con el desarrollo de toxicidad a la radiación en pacientes con cáncer de mama [269] y próstata. [268] No encontramos evidencias que nos permitan asociar el riesgo poligénico de predisposición al cáncer de pulmón con un riesgo aumentado de desarrollar toxicidad a la radiación. Los dos estudios previos realizados en mama y próstata concluyeron que los pacientes que tienen una carga genética

aumentada para desarrollar cáncer pueden ser tratados de forma segura con radioterapia estándar ya que no presentan mayor riesgo de presentar efectos adversos a la radiación.

Actualmente participamos junto con otros miembros del *Radiogenomics Consortium*, en un proyecto para conocer si el riesgo poligénico de susceptibilidad al cáncer está asociado con el aumento en el riesgo de presentar toxicidad a la radioterapia. En este trabajo, además de nuestra cohorte de pacientes incluiremos dos cohortes adicionales: la cohorte internacional de pacientes con cáncer de pulmón del proyecto REQUITE y la cohorte de pacientes del estudio CONVERT (*Concurrent ONce-daily VErsus twice-daily RadioTherapy study*) de Reino Unido.

En cuanto al riesgo poligénico, el objetivo último que perseguimos los investigadores del RGC es poder contruir un PRS a partir de SNPs asociados al desarrollo de toxicidad para incluir en los modelos de prediccion de riesgo de toxicidad, y es a hacia allí a donde van dirigidos nuestros actuales estudios.

Dentro de los múltiples enfoques que se han explorado dentro del campo de la radiogenómica, nos planteamos investigar la existencia de variantes genéticas de susceptibilidad global a la radiación; es decir, variantes que predicen la toxicidad independientemente del sitio de la radiación y de los órganos de riesgo. Lo que supondría que la variante identificada se vincula a la alteración de una función biológica del gen, y que dicho gen debería ser clave en la tolerancia del organismo a la radiación. Un ejemplo de esta susceptibilidad general a la radiación lo presentan los pacientes con ataxia telangiectasia u otros síndromes relacionados. De este modo, decidimos investigar si las variantes genéticas del locus 2q24.1 asociadas con la toxicidad global a la radiación en pacientes con cáncer de próstata identificadas previamente por nuestro grupo, se encuentran relacionadas con la toxicidad a la radiación en pacientes NSCLC. (**Capítulo 4**)

Este análisis estuvo limitado principalmente por la baja frecuencia alélica de las variantes estudiadas del gen *TANC1* en la cohorte NSCLC y la baja incidencia de toxicidades grado CTCAE ≥ 2 en nuestra cohorte de pulmón, lo que nos llevó a un limitado poder estadístico. (***Figura 27)*** Debido a que únicamente 7 pacientes presentaron un genotipo heterocigoto para la variante más frecuente, nos planteamos la realización de un análisis alternativo que se ha explorado en los últimos estudios del *Radiogenomics Consortium.* Realizamos una estimación de Kaplan Meier para las toxicidades individuales lo que nos permitió identificar una asociación (P valor < 0,05) entre la presencia de disnea y cinco de los SNPs estudiados. En las curvas de acumulación de eventos, pudimos observar que hay un ligero aumento de la incidencia de disnea en los pacientes que presentan las variantes en los SNPs de *TANC1*, en comparación con aquellos pacientes que no tienen variantes en estos SNPs.

Hasta el momento los SNPs del *locus* 2q24.1 previamente asociado con radiotoxicidadn, han sido excluidos de la mayor parte de los análisis radiogenómicos debido a que los SNPs tienen una MAF menor que 5% y los umbrales establecidos en los GWAS o los meta-análisis se mantienen por encima de éste para maximizar el poder estadístico del estudio. El meta-análisis realizado en radiogenómica de cáncer de próstata [259] incorporó una nueva cohorte, el estudio canadiense del *Cross Cancer Institute*, en la que se analizaron los SNPs de TANC1 y se observó que los siete SNPs reportados por Fachal et. al (2014) [248] mostraron una dirección consistente de asociación con la toxicidad global siendo el SNP rs264651 el que mantuvo el P valor más significativo. Además se analizaron las toxicidades en forma individual y se observó una

asociación predominante con la toxicidad genitourinaria, con asociaciones nominalmente significativas con mayor riesgo de disminución del flujo urinario y aumento de la frecuencia urinaria. Más tarde publicamos un nuevo meta-análisis [260] en donde se incorporaron cinco cohortes y se analizó el SNP rs7582141 del *locus* 2q24.1 en asociación de la toxicidad global, obteniendo resultados inconsistentes en el análisis individual de las cohortes y en el meta-análisis.

Nuestro interés en profundizar en la implicación del gen *TANC1* así como en los otros genes involucrados en el proceso de la fusión de los mioblastos, un mecanismo necesario para la reparación del tejido muscular dañado, nos ha llevado a plantearnos la realización de un estudio global con las cohortes de pacientes de cáncer de mama, próstata y pulmón del consorcio REQUITE, así como los genotipos tanto de las variantes en el gen *TANC1*, como de los otros genes. La disponibilidad de estos datos será de gran utilidad para ayudarnos a conocer mejor la implicación de este mecanismo en el desarrollo de toxicidades inducidas por la radiación independientemente del sitio del tumor y el órgano de riesgo radiado.

Todas las aproximaciones usadas en los capítulos anteriores están enfocadas a estudiar o identificar SNPs que se relacionen con los efectos adversos producidos por la radiación ionizante. En el siguiente capítulo intentamos ir más allá de los estudios de asociación genómica y ahondamos en el estudio de los mecanismos por los que un gen candidato podría estar implicado en el desarrollo de esta toxicidad, así como en la evaluación de su respuesta a la radiación. Así, nos planteamos la realización del primer estudio funcional de Radiogenómica, para identificar las propiedades de la proteína TANC1 y su caracterización en respuesta a la radiación. (**Capitulo 5**) Para ello estudiamos las funciones de TANC1, los procesos biológicos en los que interviene y establecimos la metodología para realizar los estudios funcionales, así como la selección del modelo *in vitro* que usaríamos para la caracterización.

Estandarizamos y establecimos los protocolos de diferenciación celular para la línea celular C2C12. Demostramos la localización de TANC1 en el momento de la formación del poro en la fusión de las membranas de los mioblastos durante la miogénesis. Observamos el efecto de la radiación en la formación de miotubos maduros, con una pérdida de la capacidad de formación de miotubos dependiente del aumento de la dosis de radiación de los mioblastos.

El silenciamiento del gen *Tanc1* en la línea celular C2C12 mostró la disminución de su capacidad de diferenciación dependiente de la tasa de silenciamiento de la transfección con partículas lentivirales.

Cuando sometemos a las células con el gen *Tanc1* silenciado a diferentes dosis de radiación, observamos un aumento en la pérdida de la capacidad de formar miotubos, por un lado, dependiente de la dosis y por otro lado dependiendo de la tasa de silenciamiento. Demostramos que la pérdida o disminución de la función del gen *Tanc1* es un rasgo desfavorable en la tolerancia a la radiación en las células C2C12, lo que impide la correcta formación de miotubos maduros, provocada por una incorrecta fusión de los mioblastos. Es importante separar dos procesos que intervienen en la formación de los miotubos maduros, por un lado el proceso de diferenciación celular que se refiere al proceso de transformación de las células satélite a mioblastos a miocitos y de allí a la formación de los miotubos primarios y a miotubos maduros; y un segundo proceso, que requiere la fusión de los mioblastos para aumentar el tamaño de los miotubos y que los transforme en miotubos maduros y funcionales. La diferenciación no se ve

afectada cuando el gen *Tanc1* está silenciado, en el caso de las células silenciadas al 90% hemos identificado miotubos uninucleados que producen la proteína marcador de diferenciación. En el caso de las células silenciadas al 70% vemos una disminución en el número de núcleos que forman los miotubos, dichos miotubos tienen menor diámetro y longitud, además de presentar contracción deficiente al final del proceso de diferenciación.

La función biológica propuesta como hipótesis de la asociación de *TANC1* con la toxicidad tardía global a la radiación ha sido la fusión de los mioblastos, considerado, en mamíferos, un evento crucial en la reparación del músculo en respuesta al daño local. Se han descrito tres etapas de la vida en las que se requiere la miogénesis: en el desarrollo embrionario, en el crecimiento y en la regeneración muscular. En cualquiera de estas tres etapas, se requiere la fusión de los mioblastos, creando nuevos miotubos, o bien fusionando mioblastos a miotubos existentes. [273] La fusión de los mioblastos es uno de los mecanismos necesarios para la regeneración del tejido muscular, en respuesta a un daño local, para lo cual se requiere que las células satélite salgan de su estado de quiescencia, que proliferen y se fusionen, lo que conducirá a la reparación o bien a la formación de nuevas miofibras. [329] Nosotros hemos demostrado con nuestros resultados que en el modelo *in vitro* de mioblastos, i) la radiación provoca una disminución en la capacidad de formación de miotubos maduros, ii) que el silenciamiento del gen *Tanc1* altera la miogénesis en el modelo *in vitro* debido a una falta de fusión de mioblastos y iii) que la radiación en el modelo *in vitro* que tiene alterada la función del gen *Tanc1*, limita la formación de miotubos maduros a menores dosis de radiación en comparación con las células control transfectadas, las cuales tienen una mejor tolerancia a la radiación.

En este estudio hemos observado el efecto de la radiación en un modelo murino *in vitro* al que se le ha inducido una alteración en el gen *Tanc1*. Sin embargo, las limitaciones intrínsecas del sistema *in vitro* nos impide capturar las interacciones entre diferentes tipos celulares, la intervención metabólica, así como la dificultad de extrapolar las dosis de radiación *in vivo* a dosis *in vitro* y viceversa; además, nos impide simular las consecuencias a mediano y largo plazo e imposibilita extrapolar un silenciamiento génico como el que realizamos en las líneas celulares. A pesar de que el mecanismo de formación de miotubos es un proceso complejo, la simplicidad del sistema *in vitro* nos permite observar tanto de forma individual como en conjunto la inducción de efectos en un sistema controlado, en este caso fue posible producir el silenciamiento génico y evaluar el efecto de la radiación celular. Nuestra intención es explorar modelos *in vivo*, como sería un *knockout* para *Tanc1* en donde podamos evaluar el efecto a la radiación en un modelo dinámico que nos permita simular y observar una reacción sistémica.

6. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PRIMERA
Los SNPs previamente asociados al desarrollo de toxicidad en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico no se han validado en nuestra cohorte RADIOGEN.

SEGUNDA
Realizamos el primer GWAS para identificar *loci* asociados con los efectos adversos a la radioterapia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Los hallazgos más importantes fueron un *locus* estadísticamente significativo (P valor < 5 x 10^{-08}) asociado con la toxicidad a la radiación global tardía ($STAT_{tardío}$), dos *loci* asociados con la toxicidad global uno agudo ($STAT_{agudo}$) y otro tardío ($STAT_{tardío}$), y un *locus* asociado con la esofagitis aguda. Estos resultados son preliminares y deben validarse en, al menos, una cohorte independiente.

TERCERA
Las variantes de susceptibilidad genética al cáncer de pulmón no son predictoras del riesgo de presentar efectos adversos a la radioterapia en nuestra cohorte. Aún así, identificamos algunas variantes nominalmente significativas, lo que justificaría volver a explorar estas variantes en cohortes de mayor tamaño.

CUARTA
El estudio de las variantes genéticas de *TANC1* reportadas previamente por nuestro grupo como asociadas al desarrollo de efectos adversos globales tardíos en pacientes con cáncer de próstata, y analizadas en el presente estudio en la cohorte de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, no fue concluyente. Pudimos identificar que los pacientes con variantes en el gen *TANC1* presentan disnea como complicación a la radiación ligeramente antes que aquellos pacientes sin las variantes en los SNPs. Estos resultados deben explorarse en cohortes de mayor tamaño.

QUINTA
Hemos seleccionado un modelo murino de mioblastos inmortalizado, la línea celular C2C12 para estudiar funcionalmente al gen *Tanc1*. Hemos observado una disminución en la formación de miotubos maduros en respuesta a la dosis de radiación.

SEXTA
Hemos localizado a la proteína TANC1 participando en el momento de la fusión de los mioblastos. Además, el silenciamiento del gen *Tanc1* provoca la disminución de la fusión de los mioblastos y aunque se mantiene la capacidad de diferenciación, los miotubos maduros que se forman presentan menor número de mioblastos. Este efecto es mayor para las células con silenciamiento de *Tanc1* del 90%, en comparación con las células silenciadas al 70%. En el silenciamiento del 90% se observan miotubos de un solo núcleo.

SÉPTIMA
En relación con la radiación de los mioblastos con *Tanc1* silenciado se observa una disminución de la capacidad de formar miotubos maduros, en comparación con las células no silenciadas. Además, la tasa de silenciamiento del 90% origina mayor pérdida de esta capacidad que la tasa de silenciamiento del 70%. Por otro lado, a medida que aumentamos la dosis de radiación disminuye la formación de miotubos maduros.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[1] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Https://GcoIarcFr/Today 2018. https://doi.org/10.1002/ijc.31937.

[2] The Global Cancer Observatory. Cancer fact sheet. World Heal Organ 2019. https://doi.org/L11\n10.1051/0004-6361/201016331.

[3] Organización Mundial de la Salud. Factores de riesgo (Definición). Organ Mund La Salud 2011. https://www.who.int/topics/risk_factors/es/ (accessed September 24, 2019).

[4] de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. Transl Lung Cancer Res 2018. https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.05.06.

[5] Debakey M. Carcinoma of the lung and tobacco smoking: a historical perspective. Ochsner J 1999;1:106–8.

[6] Tylecote F. CANCER OF THE LUNG. Lancet 1927;210:256–7. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)30802-4.

[7] Schönherr E. Beitrag zur Statistik und Klinik der Lungentumoren. Z Krebsforsch 1928;27:436–50. https://doi.org/10.1007/BF02125480.

[8] Hoffman FL. CANCER AND SMOKING HABITS. Ann Surg 1931;93:50–67. https://doi.org/10.1097/00000658-193101000-00009.

[9] Morabia A. Quality, originality, and significance of the 1939 "Tobacco consumption and lung carcinoma" article by Mueller, including translation of a section of the paper. Prev Med (Baltim) 2012;55:171–7. https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2012.05.008.

[10] DOLL R, HILL AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. Br Med J 1950;2:739–48. https://doi.org/10.1136/bmj.2.4682.739.

[11] EL W, EA G. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma: A study of six hundred and eighty-four proved cases. J Am Med Assoc 1950.

[12] United States Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress A Report of the Surgeon General. A Rep Surg Gen 2014.

[13] Robertson A, Allen J, Laney R, Curnow A. The cellular and molecular carcinogenic effects of radon exposure: A review. Int J Mol Sci 2013. https://doi.org/10.3390/ijms140714024.

[14] Pavia M, Bianco A, Pileggi C, Angelillo IF. Meta-analysis of residential exposure to radon gas and lung cancer. Bull World Health Organ 2003.

[15] Lubin JH, Boice JD. Lung cancer risk from residential radon: Meta-analysis of eight epidemiologic studies. J Natl Cancer Inst 1997. https://doi.org/10.1093/jnci/89.1.49.

[16] Sethi TK, El-Ghamry MN, Kloecker GH. Radon and lung cancer. Clin Adv Hematol Oncol 2012.

[17] Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: Collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. Br Med J 2005. https://doi.org/10.1136/bmj.38308.477650.63.

[18] Health Effects of Exposure to Radon. 1999. https://doi.org/10.17226/5499.

[19] Al-Zoughool M, Krewski D. Health effects of radon: A review of the literature. Int J Radiat Biol 2009. https://doi.org/10.1080/09553000802635054.

[20] Daniel K, Lubin JH, Zielinski JM, Alavanja M, Catalan VS, William Field R, et al. Residential Radon and Risk of Lung Cancer: A Combined Analysis of 7 North American Case-Control Studies. Epidemiology 2005.

[21] Samet JM. Diseases of uranium miners and other underground miners exposed to radon. Occup Med 1991.

[22] Doll R, Peto R. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the united states today. J Natl Cancer Inst 1981. https://doi.org/10.1093/jnci/66.6.1192.

[23] De Matteis S, Consonni D, Bertazzi PA. Exposure to occupational carcinogens and lung cancer risk. Evolution of epidemiological estimates of attributable fraction. Acta Biomed l'Ateneo Parm 2008.

[24] Consonni D, De Matteis S, Lubin JH, Wacholder S, Tucker M, Pesatori AC, et al. Lung cancer and occupation in a population-based case-control study. Am J Epidemiol 2010. https://doi.org/10.1093/aje/kwp391.

[25] Alberg AJ, Brock M V, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest 2013;143:e1S-e29S. https://doi.org/10.1378/chest.12-2345.

[26] Huang SXL, Jaurand MC, Kamp DW, Whysner J, Hei TK. Role of mutagenicity in asbestos fiber-induced carcinogenicity and other diseases. J Toxicol Environ Heal - Part B Crit Rev 2011. https://doi.org/10.1080/10937404.2011.556051.

[27] Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. Free Radic Biol Med 1992. https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90117-Y.

[28] Liu G, Cheresh P, Kamp DW. Molecular Basis of Asbestos-Induced Lung Disease. Annu Rev Pathol Mech Dis 2013. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-163942.

[29] Okayasu R, Takahashi S, Yamada S, Hei TK, Ullrich RL. Asbestos and DNA Double Strand Breaks. Cancer Res 1999;59:298–300.

[30] Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Clin Chest Med 2011. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001.

[31] Hamra GB, Guha N, Cohen A, Laden F, Raaschou-Nielsen O, Samet JM, et al. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: A systematic review and meta-analysis. Environ Health Perspect 2014. https://doi.org/10.1289/ehp.1408092.

[32] Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F El, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. Lancet Oncol 2013. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70487-X.

[33] Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: Prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). Lancet Oncol 2013. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70279-1.

[34] Krewski D, Jerrett M, Burnett RT, Ma R, Hughes E, Shi Y, et al. Extended follow-up and spatial analysis of the American Cancer Society study linking particulate air pollution and mortality. Res Rep Health Eff Inst 2009.

[35] IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Monogr Eval Carcinog Risks to Humans 2010.

[36] U.S. Deprtment of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention (US), U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke. Publ Reports Surg Gen 2006. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2007.02.026.

[37] Hackshaw AK. Lung cancer and passive smoking. Stat Methods Med Res 1998. https://doi.org/10.1191/096228098675091404.

[38] Öberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: A retrospective analysis of data from 192 countries. Lancet 2011. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61388-8.

[39] Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. Br Med J 1997.

[40] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ionizing Radiation, Part 1: X- and Gamma (γ)-Radiation, and Neutrons. 2000.

[41] Doll R. Hazards of ionising radiation: 100 years of observations on man. Br J Cancer 1995. https://doi.org/10.1038/bjc.1995.513.

[42] Abe O, Abe R, Enomoto K, Kikuchi K, Koyama H, Masuda H, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. Lancet 2005. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67887-7.

[43] Henson KE, McGale P, Taylor C, Darby SC. Radiation-related mortality from heart disease and lung cancer more than 20 years after radiotherapy for breast cancer. Br J Cancer 2013. https://doi.org/10.1038/bjc.2012.575.

[44] Grantzau T, Overgaard J. Risk of second non-breast cancer after radiotherapy for breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 762,468 patients. Radiother Oncol 2015. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.10.004.

[45] Taylor C, Duane FK, Dodwell D, Gray R, Wang Z, Wang Y, et al. Estimating the Risks of Breast cancer radiotherapy: Evidence from modern radiation doses to the lungs and Heart and From previous randomized trials. J Clin Oncol 2017. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.72.0722.

[46] Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. Eur Respir J 2016. https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016.

[47] Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Choice Rev Online 2008. https://doi.org/10.5860/choice.45-5024.

[48] Tram KL, Gallicchio L, Lindsley K, Shiels M, Hammond E, Tao X, et al. Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk: A systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0710.

[49] Albanes D. β-Carotene and lung cancer: A case study. Am. J. Clin. Nutr., 1999.

[50] Clark J, You M. Chemoprevention of lung cancer by tea. Mol Nutr Food Res 2006. https://doi.org/10.1002/mnfr.200500135.

[51] Sinha R, Kulldorff M, Curtin J, Brown CC, Alavanja MCR, Swanson CA. Fried, well-done red meat and risk of lung cancer in women (United States). Cancer Causes Control 1998. https://doi.org/10.1023/A:1008805525525.

[52] Guertin KA, Freedman ND, Loftfield E, Graubard BI, Caporaso NE, Sinha R. Coffee consumption and incidence of lung cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. Int J Epidemiol 2016. https://doi.org/10.1093/ije/dyv104.

[53] Korte JE, Brennan P, Henley SJ, Boffetta P. Dose-specific meta-analysis and sensitivity analysis of the relation between alcohol consumption and lung cancer risk. Am J Epidemiol 2002. https://doi.org/10.1093/aje/155.6.496.

[54] Bandera E V., Freudenheim JL, Vena JE. Alcohol consumption and lung cancer: A review of the epidemiologic evidence. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001.

[55] Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA, Albanes D, Bandera E V., Van Den Brandt PA, et al. Alcohol consumption and risk of lung cancer: A pooled analysis of cohort studies. Am J Clin Nutr 2005.

[56] Schabath MB, Wu X, Vassilopoulou-Sellin R, Vaporciyan AA, Spitz MR. Hormone Replacement Therapy and Lung Cancer Risk: A Case-Control Analysis. Clin Cancer Res 2004. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0911-3.

[57] Kreuzer M, Gerken M, Heinrich J, Kreienbrock L, Wichmann HE. Hormonal factors and risk of lung cancer among women? Int J Epidemiol 2003. https://doi.org/10.1093/ije/dyg064.

[58] Blackman JA, Coogan PF, Rosenberg L, Strom BL, Zauber AG, Palmer JR, et al. Estrogen replacement therapy and risk of lung cancer. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2002. https://doi.org/10.1002/pds.733.

[59] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. Adults. N Engl J Med 2003. https://doi.org/10.1056/NEJMoa021423.

[60] Aoki K. Excess incidence of lung cancer among pulmonary tuberculosis patients. Jpn J Clin Oncol 1993. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jjco.a039636.

[61] Zheng W, Blot WJ, Liao ML, Wang ZX, Levin LI, Zhao JJ, et al. Lung cancer and prior tuberculosis infection in Shanghai. Br J Cancer 1987. https://doi.org/10.1038/bjc.1987.233.

[62] Littman AJ, Jackson LA, Vaughan TL. Chlamydia pneumoniae and lung cancer: Epidemiologic evidence. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0599.

[63] Lissowska J, Foretova L, Dąbek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Family history and lung cancer risk: International multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. Cancer Causes Control 2010. https://doi.org/10.1007/s10552-010-9537-2.

[64] Schwartz AG, Ruckdeschel JC. Familial lung cancer: Genetic susceptibility and relationship to chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2006. https://doi.org/10.1164/rccm.200502-235PP.

[65] Coté ML, Kardia SLR, Wenzlaff AS, Ruckdeschel JC, Schwartz AG. Risk of lung cancer among white and black relatives of individuals with early-onset lung cancer. J Am Med Assoc 2005. https://doi.org/10.1001/jama.293.24.3036.

[66] Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. Nature 2008. https://doi.org/10.1038/nature06885.

[67] Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. Nature 2008. https://doi.org/10.1038/nature06846.

[68] Brennan P, McKay J, Moore L, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, et al. Uncommon CHEK2 mis-sense variant and reduced risk of tobacco-related cancers: Case - Control study. Hum Mol

Genet 2007. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm127.

[69] McKay JD, Hung RJ, Han Y, Zong X, Carreras-Torres R, Christiani DC, et al. Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic susceptibility across histological subtypes. Nat Genet 2017. https://doi.org/10.1038/ng.3892.

[70] Jiang X, Finucane HK, Schumacher FR, Schmit SL, Tyrer JP, Han Y, et al. Shared heritability and functional enrichment across six solid cancers. Nat Commun 2019;10:431. https://doi.org/10.1038/s41467-018-08054-4.

[71] Yoon KA, Park JH, Han JY, Park S, Lee GK, Han JY, et al. A genome-wide association study reveals susceptibility variants for non-small cell lung cancer in the Korean population. Hum Mol Genet 2010. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq421.

[72] Miki D, Kubo M, Takahashi A, Yoon KA, Kim J, Lee GK, et al. Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations. Nat Genet 2010. https://doi.org/10.1038/ng.667.

[73] Li Y, Sheu CC, Ye Y, de Andrade M, Wang L, Chang SC, et al. Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: A genome-wide association study. Lancet Oncol 2010. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70042-5.

[74] Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. Nat Genet 2008;40:616–22. https://doi.org/10.1038/ng.109.

[75] Liu P, Vikis HG, Wang D, Lu Y, Wang Y, Schwartz AG, et al. Familial aggregation of common sequence variants on 15q24-25.1 in lung cancer. J Natl Cancer Inst 2008. https://doi.org/10.1093/jnci/djn268.

[76] Wang Y, Broderick P, Webb E, Wu X, Vijayakrishnan J, Matakidou A, et al. Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. Nat Genet 2008. https://doi.org/10.1038/ng.273.

[77] McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, Boffetta P, Chabrier A, Byrnes G, et al. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. Nat Genet 2008. https://doi.org/10.1038/ng.254.

[78] Broderick P, Wang Y, Vijayakrishnan J, Matakidou A, Spitz MR, Eisen T, et al. Deciphering the impact of common genetic variation on lung cancer risk: A genome-wide association study. Cancer Res 2009. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0680.

[79] Landi MT, Chatterjee N, Yu K, Goldin LR, Goldstein AM, Rotunno M, et al. A Genome-wide Association Study of Lung Cancer Identifies a Region of Chromosome 5p15 Associated with Risk for Adenocarcinoma. Am J Hum Genet 2009. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.09.012.

[80] Timofeeva MN, Hung RJ, Rafnar T, Christiani DC, Field JK, Bickeböller H, et al. Influence of common genetic variation on lung cancer risk: Meta-analysis of 14 900 cases and 29 485 controls. Hum Mol Genet 2012. https://doi.org/10.1093/hmg/dds334.

[81] Wang Y, McKay JD, Rafnar T, Wang Z, Timofeeva MN, Broderick P, et al. Rare variants of large effect in BRCA2 and CHEK2 affect risk of lung cancer. Nat Genet 2014. https://doi.org/10.1038/ng.3002.

[82] Saccone NL, Culverhouse RC, Schwantes-An TH, Cannon DS, Chen X, Cichon S, et al. Multiple independent loci at chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: A meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. PLoS Genet 2010. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001053.

[83] Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, Pillai SG, Muglia P, Middleton L, et al. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. Nat Genet 2010. https://doi.org/10.1038/ng.572.

[84] Yokota J, Shiraishi K, Kohno T. Genetic Basis for Susceptibility to Lung Cancer. Recent Progress and Future Directions. Adv. Cancer Res., 2010. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380890-5.00002-8.

[85] Sasaki T, Gan EC, Wakeham A, Kornbluth S, Mak TW, Okada H. HLA-B-associated transcript 3 (Bat3)/Scythe is essential for p300-mediated acetylation of p53. Genes Dev 2007. https://doi.org/10.1101/gad.1534107.

[86] Xu L, Chow J, Bonacum J, Eisenberger C, Ahrendt SA, Spafford M, et al. Microsatellite instability at AAAG repeat sequences in respiratory tract cancers. Int J Cancer 2001. https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::AID-IJC1031>3.0.CO;2-0.

[87] Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2017. https://doi.org/10.1093/annonc/mdx222.

[88] Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World

Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. J Thorac Oncol 2015. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630.

[89] Maconachie R, Mercer T, Navani N, Mcveigh G. Lung cancer: Diagnosis and management: Summary of updated NICE guidance. BMJ 2019. https://doi.org/10.1136/bmj.l1049.

[90] Babakoohi S, Fu P, Yang M, Linden PA, Dowlati A. Combined SCLC clinical and pathologic characteristics. Clin Lung Cancer 2013. https://doi.org/10.1016/j.cllc.2012.07.002.

[91] Warth A, Muley T, Meister M, Stenzinger A, Thomas M, Schirmacher P, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. J Clin Oncol 2012. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.2185.

[92] Hung JJ, Yeh YC, Jeng WJ, Wu KJ, Huang BS, Wu YC, et al. Predictive value of the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification of lung adenocarcinoma in tumor recurrence and patient survival. J Clin Oncol 2014. https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.1049.

[93] Tsao MS, Marguet S, Le Teuff G, Lantuejoul S, Shepherd FA, Seymour L, et al. Subtype classification of lung adenocarcinoma predicts benefit from adjuvant chemotherapy in patients undergoing complete resection. J Clin Oncol 2015. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.8335.

[94] Rami-Porta R, Bolejack V, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, et al. The IASLC lung cancer staging project: The new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. J Thorac Oncol 2014. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000334.

[95] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. - PubMed - NCBI. CA Cancer J Clin 2016. https://doi.org/10.3322/caac.21332.

[96] Thunnissen E, Van Der Oord K, Den Bakker M. Prognostic and predictive biomarkers in lung cancer. A review. Virchows Arch 2014. https://doi.org/10.1007/s00428-014-1535-4.

[97] Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. Surg Oncol Clin N Am 2016. https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003.

[98] Herbst RS, Heymach J V, Lippman SM. Lung cancer types. N Engl J Med 2008. https://doi.org/10.1056/NEJMra0802714.

[99] Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer 1998. https://doi.org/10.1016/S0304-419X(98)00010-9.

[100] Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol 2019. https://doi.org/10.1093/annonc/mdy474.

[101] Früh M, De Ruysscher D, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2013. https://doi.org/10.1093/annonc/mdt178.

[102] Cortés ÁA, Urquizu LC, Cubero JH. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: State-ofthe-art. Transl Lung Cancer Res 2015. https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.06.01.

[103] Verstegen NE, Lagerwaard FJ, Hashemi SMS, Dahele M, Slotman BJ, Senan S. Patterns of Disease Recurrence after SABR for Early Stage Non–Small-Cell Lung Cancer: Optimizing Follow-Up Schedules for Salvage Therapy. J Thorac Oncol 2015. https://doi.org/10.1097/jto.0000000000000576.

[104] Lindberg K, Nyman J, Riesenfeld Källskog V, Hoyer M, Lund JA, Lax I, et al. Long-term results of a prospective phase II trial of medically inoperable stage i NSCLC treated with SBRT - The Nordic experience. Acta Oncol (Madr) 2015. https://doi.org/10.3109/0284186X.2015.1020966.

[105] Cheung P, Faria S, Ahmed S, Chabot P, Greenland J, Kurien E, et al. Phase II study of accelerated hypofractionated three-dimensional conformal radiotherapy for stage T1-3 N0 M0 non-small cell lung cancer: NCIC CTG BR.25. J Natl Cancer Inst 2014. https://doi.org/10.1093/jnci/dju164.

[106] Mauguen A, Le Péchoux C, Saunders MI, Schild SE, Turrisi AT, Baumann M, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in lung cancer: An individual patient data meta-analysis. J Clin Oncol 2012. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.41.6677.

[107] E. Puertas-Calvo AG-C. Carcinoma no microcítico de pulmón. In: Angel Montero MM, editor. Guias prácticas Oncol. Radioterápica, SEOR (Sociedad Española de Oncología Radioterápica); 2013, p. 361–71.

[108] De Ruysscher D, Faivre-Finn C, Moeller D, Nestle U, Hurkmans CW, Le Péchoux C, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) recommendations for planning and delivery of high-dose, high precision radiotherapy for lung cancer. Radiother Oncol 2017. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.06.003.

[109] Nestle U, De Ruysscher D, Ricardi U, Geets X, Belderbos J, Pöttgen C, et al. ESTRO ACROP guidelines for target volume definition in the treatment of locally advanced non-small cell lung cancer. Radiother Oncol 2018. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2018.02.023.

[110] Konert T, Vogel W, MacManus MP, Nestle U, Belderbos J, Grégoire V, et al. PET/CT imaging for target volume delineation in curative intent radiotherapy of non-small cell lung cancer: IAEA consensus report 2014. Radiother Oncol 2015. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.03.014.

[111] Schaefer A, Vermandel M, Baillet C, Dewalle-Vignion AS, Modzelewski R, Vera P, et al. Impact of consensus contours from multiple PET segmentation methods on the accuracy of functional volume delineation. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2016. https://doi.org/10.1007/s00259-015-3239-7.

[112] Peeters ST, Dooms C, Van Baardwijk A, Dingemans AMC, Martinussen H, Vansteenkiste J, et al. Selective mediastinal node irradiation in non-small cell lung cancer in the IMRT/VMAT era: How to use E(B)US-NA information in addition to PET–CT for delineation? Radiother Oncol 2016. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.05.023.

[113] Lynch R, Pitson G, Ball D, Claude L, Sarrut D. Computed tomographic atlas for the new international lymph node map for lung cancer: A radiation oncologist perspective. Pract Radiat Oncol 2013. https://doi.org/10.1016/j.prro.2012.01.007.

[114] Giraud P, Antoine M, Larrouy A, Milleron B, Callard P, De Rycke Y, et al. Evaluation of microscopic tumor extension in non-small-cell lung cancer for three-dimensional conformal radiotherapy planning. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000. https://doi.org/10.1016/S0360-3016(00)00750-1.

[115] Van Diessen JNA, Chen C, Van Den Heuvel MM, Belderbos JSA, Sonke JJ. Differential analysis of local and regional failure in locally advanced non-small cell lung cancer patients treated with concurrent chemoradiotherapy. Radiother Oncol 2016. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.02.008.

[116] Yuan S, Meng X, Yu J, Mu D, Chao KSC, Zhang J, et al. Determining optimal clinical target volume margins on the basis of microscopic extracapsular extension of metastatic nodes in patients with non-small-cell lung cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.08.057.

[117] Peulen H, Belderbos J, Guckenberger M, Hope A, Grills I, Van Herk M, et al. Target delineation variability and corresponding margins of peripheral early stage NSCLC treated with stereotactic body radiotherapy. Radiother Oncol 2015. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.02.011.

[118] Kong FM, Ritter T, Quint DJ, Senan S, Gaspar LE, Komaki RU, et al. Consideration of dose limits for organs at risk of thoracic radiotherapy: Atlas for lung, proximal bronchial tree, esophagus, spinal cord, ribs, and brachial plexus. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2011. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.07.1977.

[119] Lago AI, Cameán MP, Comesaña JG, Patiño EG, Raviña AR. Planificadores 3D y simulación virtual del tratamiento. Situación en España. Supervivencia asociada a su aplicación. Avalia-T 2003:1–94.

[120] Gianfaldoni S, Gianfaldoni R, Wollina U, Lotti J, Tchernev G, Lotti T. An overview on radiotherapy: From its history to its current applications in dermatology. Open Access Maced J Med Sci 2017. https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.122.

[121] Hall S, Rudrawar S, Zunk M, Bernaitis N, Arora D, McDermott CM, et al. Protection against radiotherapy-induced toxicity. Antioxidants 2016. https://doi.org/10.3390/antiox5030022.

[122] IAEA. Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students. 2010.

[123] Leroi N, Lallemand F, Coucke P, Noel A, Martinive P. Impacts of ionizing radiation on the different compartments of the tumor microenvironment. Front Pharmacol 2016. https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00078.

[124] Carvalho H de A, Villar RC. Radiotherapy and immune response: the systemic effects of a local treatment. Clinics (Sao Paulo) 2018. https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e557s.

[125] Manda K, Glasow A, Paape D, Hildebrandt G. Effects of ionizing radiation on the immune system with special emphasis on the interaction of dendritic and T cells. Front Oncol 2012. https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00102.

[126] Bauer M, Goldstein M, Christmann M, Becker H, Heylmann D, Kaina B. Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. Proc Natl Acad Sci U S A 2011. https://doi.org/10.1073/pnas.1111919109.

[127] Wunderlich R, Ernst A, Rödel F, Fietkau R, Ott O, Lauber K, et al. Low and moderate doses of ionizing radiation up to 2 Gy modulate transmigration and chemotaxis of activated macrophages, provoke an anti-inflammatory cytokine milieu, but do not impact upon viability and phagocytic function. Clin Exp Immunol 2015. https://doi.org/10.1111/cei.12344.

[128] Kaminski JM, Shinohara E, Summers JB, Niermann KJ, Morimoto A, Brousal J. The controversial abscopal effect. Cancer Treat Rev 2005. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2005.03.004.

[129] Barnett GC, Kerns SL, Noble DJ, Dunning AM, West CML, Burnet NG. Incorporating Genetic Biomarkers into Predictive Models of Normal Tissue Toxicity. Clin Oncol 2015. https://doi.org/10.1016/j.clon.2015.06.013.

[130] Beasley M, Driver D, Dobbs HJ. Complications of radiotherapy: Improving the therapeutic index. Cancer Imaging 2005. https://doi.org/10.1102/1470-7330.2005.0012.

[131] Kang J, Coates JT, Strawderman RL, Rosenstein BS, Kerns SL. Genomics models in radiotherapy: from mechanistic to machine learning. ArXiv E-Prints 2019:arXiv:1904.09662.

[132] Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. Nat Rev Cancer 2006. https://doi.org/10.1038/nrc1950.

[133] Dörr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. Radiother Oncol 2001. https://doi.org/10.1016/S0167-8140(01)00429-7.

[134] Bentzen SM, Dörr W, Anscher MS, Denham JW, Hauer-Jensen M, Marks LB, et al. Normal tissue effects: Reporting and analysis. Semin. Radiat. Oncol., 2003. https://doi.org/10.1016/S1053-4296(03)00036-5.

[135] Bentzen SM, Saunders MI, Dische S, Bond SJ. Radiotherapy-related early morbidity in head and neck cancer: Quantitative clinical radiobiology as deduced from the CHART trial. Radiother Oncol 2001. https://doi.org/10.1016/S0167-8140(01)00358-9.

[136] Bentzen SM, Thames HD, Overgaard M. Latent-time estimation for late cutaneous and subcutaneous radiation reactions in a single-follow-up clinical study. Radiother Oncol 1989. https://doi.org/10.1016/0167-8140(89)90095-9.

[137] Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PDP, et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: Towards tailoring treatment dose by genotype. Nat Rev Cancer 2009. https://doi.org/10.1038/nrc2587.

[138] Zhou Z, Song X, Wu A, Liu H, Wu H, Wu Q, et al. Pulmonary emphysema is a risk factor for radiation pneumonitis in NSCLC patients with squamous cell carcinoma after thoracic radiation therapy. Sci Rep 2017. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02739-4.

[139] Dang J, Li G, Lu X, Yao L, Zhang S, Yu Z. Analysis of related factors associated with radiation pneumonitis in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer treated with three-dimensional conformal radiotherapy. J Cancer Res Clin Oncol 2010. https://doi.org/10.1007/s00432-010-0764-4.

[140] Kelsey CR, Rosenstein BS, Marks LB. Predicting toxicity from radiation therapy-It's genetic, right? Cancer 2012. https://doi.org/10.1002/cncr.26670.

[141] Marks LB, Bentzen SM, Deasy JO, Kong F-M (Spring), Bradley JD, Vogelius IS, et al. Radiation Dose–Volume Effects in the Lung. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2015. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.06.091.

[142] Manning HL, Schwartzstein RM. Mechanisms of disease: Pathophysiology of Dyspnea. N Engl J Med 1995.

[143] Gupta D, Lis CG, Grutsch JF. The relationship between dyspnea and patient satisfaction with quality of life in advanced cancer. Support Care Cancer 2007. https://doi.org/10.1007/s00520-006-0178-7.

[144] Welsh J, Thomas J, Shah D, Allen PK, Wei X, Mitchell K, et al. Obesity increases the risk of chest wall pain from thoracic stereotactic body radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2011. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.04.022.

[145] Werner-Wasik M, Paulus R, Curran W, Byhardt R. Acute esophagitis and late lung toxicity in concurrent chemoradiotherapy trials in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer: Analysis of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) database. Clin Lung Cancer 2011. https://doi.org/10.1016/j.cllc.2011.03.026.

[146] Bar-Ad V, Ohri N, Werner-Wasik M. Esophagitis, Treatment-Related Toxicity in Non-Small Cell Lung Cancer. Rev Recent Clin Trials 2012. https://doi.org/10.2174/157488712799363235.

[147] Cox JD, Pajak TF, Asbell S, Russell AH, Pederson J, Byhardt RW, et al. Interruptions of high-dose

radiation therapy decrease longterm survival of favorable patients with unresectable nonsmall cell carcinoma of the lung: analysis of 1244 cases from 3 radiation therapy oncology group (RTOG) trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1993. https://doi.org/10.1016/0360-3016(93)90371-2.

[148] Verma V, Simone CB, Werner-Wasik M. Acute and late toxicities of concurrent chemoradiotherapy for locally-advanced non-small cell lung cancer. Cancers (Basel) 2017. https://doi.org/10.3390/cancers9090120.

[149] Simone CB. Thoracic Radiation Normal Tissue Injury. Semin Radiat Oncol 2017. https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.009.

[150] Nesheiwat, Z; Mahajan K. Radiation Esophagitis. StatPearls [Internet] 2019. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499920 (accessed October 24, 2019).

[151] Hull MC, Morris CG, Pepine CJ, Mendenhall NP. Valvular Dysfunction and Carotid, Subclavian, and Coronary Artery Disease in Survivors of Hodgkin Lymphoma Treated with Radiation Therapy. J Am Med Assoc 2003. https://doi.org/10.1001/jama.290.21.2831.

[152] Jaworski C, Mariani JA, Wheeler G, Kaye DM. Cardiac complications of thoracic irradiation. J Am Coll Cardiol 2013. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.01.090.

[153] Martinou M, Gaya A. Cardiac complications after radical radiotherapy. Semin Oncol 2013. https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2013.01.007.

[154] Veinot JP, Edwards WD. Pathology of radiation-induced heart disease: A surgical and autopsy study of 27 cases. Hum Pathol 1996. https://doi.org/10.1016/S0046-8177(96)90447-5.

[155] Sagristà-Sauleda J. Pericardial constriction: Uncommon patterns. Heart, 2004.

[156] Schierle C, Winograd JM. Radiation-Induced Brachial Plexopathy: Review. Complication Without a Cure. J Reconstr Microsurg 2004. https://doi.org/10.1055/s-2004-820771.

[157] Salvo N, Barnes E, van Draanen J, Stacey E, Mitera G, Breen D, et al. Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin reactions: A systematic review of the literature. Curr Oncol 2010. https://doi.org/10.3747/co.v17i4.493.

[158] McQuestion M. Evidence-Based Skin Care Management in Radiation Therapy: Clinical Update. Semin Oncol Nurs 2011. https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.02.009.

[159] Ryan JL. Ionizing radiation: The good, the bad, and the ugly. J Invest Dermatol 2012. https://doi.org/10.1038/jid.2011.411.

[160] Bolderston A, Lloyd NS, Wong RKS, Holden L, Robb-Blenderman L. The prevention and management of acute skin reactions related to radiation therapy: A systematic review and practice guideline. Support Care Cancer 2006. https://doi.org/10.1007/s00520-006-0063-4.

[161] National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0. NIH Publ 2009. https://doi.org/10.1080/00140139.2010.489653.

[162] Holthusen H. Erfahrungen über die Verträglichkeitsgrenze für Röntgenstrahlen und deren Nutzanwendung zur Verhütung von Schäden. Strahlentherapie 1936.

[163] Gotoff SP, Amirmokri E, Liebner EJ. Ataxia telangiectasia: Neoplasia, untoward response to x - irradiation, and tuberous sclerosis. Am J Dis Child 1967. https://doi.org/10.1001/archpedi.1967.02090270073006.

[164] Morgan JL, Holcomb TM, Morrissey RW. Radiation Reaction in Ataxia Telangiectasia. Am J Dis Child 1968. https://doi.org/10.1001/archpedi.1968.02100020561022.

[165] Cunliffe PN, Mann JR, Cameron AH, Roberts KD, Ward HWC. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia. Br J Radiol 1975. https://doi.org/10.1259/0007-1285-48-569-374.

[166] Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PDP, et al. Normal tissue reactions to radiotherapy. Nat Rev Cancer 2009. https://doi.org/10.1038/nrc2587.Normal.

[167] Woods WG, Byrne TD, Kim TH. Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity. Cancer 1988. https://doi.org/10.1002/1097-0142(19881201)62:11<2341::AID-CNCR2820621114>3.0.CO;2-W.

[168] Little JB, Nove J. Sensitivity of Human Diploid Fibroblast Cell Strains from Various Genetic Disorders to Acute and Protracted Radiation Exposure. Radiat Res 1990. https://doi.org/10.2307/3577662.

[169] Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK, Little JB. In Vitro Radiosensitivity of Human Diploid Fibroblasts Derived from Women with Unusually Sensitive Clinical Responses to Definitive Radiation Therapy for Breast Cancer. Radiat Res 1990. https://doi.org/10.2307/3577508.

[170] Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF, Hinney A, Kingston JE. An instance of clinical radiation

morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. Br J Radiol 1990. https://doi.org/10.1259/0007-1285-63-752-624.

[171] Burnet NG, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH, Nyman J, Turesson I. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. Lancet 1992. https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91833-T.

[172] Russell NS, Grummels A, Hart AAM, Smolders IJH, Borger J, Bartelink H, et al. Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. Int J Radiat Biol 1998. https://doi.org/10.1080/095530098141915.

[173] Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, et al. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. Radiother Oncol 2000. https://doi.org/10.1016/S0167-8140(00)00173-0.

[174] Herskind C, Talbot CJ, Kerns SL, Veldwijk MR, Rosenstein BS, West CML. Radiogenomics: A systems biology approach to understanding genetic risk factors for radiotherapy toxicity? Cancer Lett 2016. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.035.

[175] Nuta O, Somaiah N, Boyle S, Chua MLK, Gothard L, Yarnold J, et al. Correlation between the radiation responses of fibroblasts cultured from individual patients and the risk of late reaction after breast radiotherapy. Cancer Lett 2016. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.036.

[176] Ozsahin M, Crompton NEA, Gourgou S, Kramar A, Li L, Shi YQ, et al. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: A prospective study in 399 patients. Clin Cancer Res 2005. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2634.

[177] Mirjolet C, Merlin JL, Dalban C, Maingon P, Azria D. Correlation between radio-induced lymphocyte apoptosis measurements obtained from two French centres. Cancer/Radiothérapie 2016. https://doi.org/10.1016/j.canrad.2016.03.007.

[178] Talbot CJ, Veldwijk MR, Azria D, Batini C, Bierbaum M, Brengues M, et al. Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity. Clin Transl Radiat Oncol 2019. https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.06.001.

[179] Schnarr K, Boreham D, Sathya J, Julian J, Dayes IS. Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis to Predict Radiation Therapy Late Toxicity in Prostate Cancer Patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2009. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.10.039.

[180] Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C, et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. EBioMedicine 2015. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.024.

[181] Veldwijk M, Botma A, Helmbold I, Gürth N, Kirchner A, Behrens S, et al. Association of T lymphocyte Apoptosis after In Vitro Irradiation with Normal Tissue Late Toxicity after Radiation Therapy in 252 Breast Cancer Patients with 10-Year Clinical Follow-up. Int J Radiat Oncol 2016. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.06.165.

[182] Azria D, Belkacemi Y, Romieu G, Gourgou S, Gutowski M, Zaman K, et al. Concurrent or sequential adjuvant letrozole and radiotherapy after conservative surgery for early-stage breast cancer (CO-HO-RT): a phase 2 randomised trial. Lancet Oncol 2010. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70013-9.

[183] Bordón E, Henríquez Hernández LA, Lara PC, Pinar B, Fontes F, Rodríguez Gallego C, et al. Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs). Radiat Oncol 2009. https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-58.

[184] Bordón E, Henríaquez-Hernández LA, Lara PC, Pinar B, Rodríaguez-Gallego C, Lloret M. Role of CD4 and CD8 T-lymphocytes, B-lymphocytes and Natural Killer cells in the prediction of radiation-induced late toxicity in cervical cancer patients. Int J Radiat Biol 2011. https://doi.org/10.3109/09553002.2010.537433.

[185] Bordón E, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, Ruíz A, Pinar B, Rodríguez-Gallego C, et al. Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs). Radiat Oncol 2010. https://doi.org/10.1186/1748-717X-5-4.

[186] Foro P, Algara M, Lozano J, Rodriguez N, Sanz X, Torres E, et al. Relationship between radiation-induced apoptosis of T lymphocytes and chronic toxicity in patients with prostate cancer treated by radiation therapy: A prospective study. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2014. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.01.002.

[187] Fuentes-Raspall MJ, Caragol I, Alonso C, Ramón Y Cajal T, Fisas D, Seoane A, et al. Apoptosis for prediction of radiotherapy late toxicity: Lymphocyte subset sensitivity and potential effect of TP53

Arg72Pro polymorphism. Apoptosis 2015. https://doi.org/10.1007/s10495-014-1056-2.

[188] Henríquez-Hernández LA, Carmona-Vigo R, Pinar B, Bordón E, Lloret M, Núñez MI, et al. Combined low initial DNA damage and high radiation-induced apoptosis confers clinical resistance to long-term toxicity in breast cancer patients treated with high-dose radiotherapy. Radiat Oncol 2011. https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-60.

[189] West CML, Elliott RM, Burnet NG. The Genomics Revolution and Radiotherapy. Clin Oncol 2007. https://doi.org/10.1016/j.clon.2007.02.016.

[190] Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis - Where and how to look for it? Radiother Oncol 2002. https://doi.org/10.1016/S0167-8140(02)00154-8.

[191] West CML, McKay MJ, Hölscher T, Baumann M, Stratford IJ, Bristow RG, et al. Molecular markers predicting radiotherapy response: Report and recommendations from an International Atomic Energy Agency technical meeting. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.05.001.

[192] Barnett GC, Elliott RM, Alsner J, Andreassen CN, Abdelhay O, Burnet NG, et al. Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity. Radiother Oncol 2012. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.10.017.

[193] Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, Baynes C, Luccarini C, Conroy D, et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: A prospective analysis study. Lancet Oncol 2012. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70302-3.

[194] Talbot CJ, Tanteles GA, Barnett GC, Burnet NG, Chang-Claude J, Coles CE, et al. A replicated association between polymorphisms near TNFα and risk for adverse reactions to radiotherapy. Br J Cancer 2012. https://doi.org/10.1038/bjc.2012.290.

[195] Das AK, Bell MH, Nirodi CS, Story MD, Minna JD. Radiogenomics predicting tumor responses to radiotherapy in lung cancer. Semin Radiat Oncol 2010. https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2010.01.002.

[196] Yard BD, Adams DJ, Chie EK, Tamayo P, Battaglia JS, Gopal P, et al. A genetic basis for the variation in the vulnerability of cancer to DNA damage. Nat Commun 2016. https://doi.org/10.1038/ncomms11428.

[197] West C, Rosenstein BS. Establishment of a Radiogenomics Consortium. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010;76:1295–6. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.12.017.

[198] Kerns SL, Ruysscher D De, Andreassen CN, Azria D, Barnett GC, Chang-Claude J, et al. STROGAR - STrengthening the Reporting of Genetic Association studies in Radiogenomics. Radiother Oncol 2014. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.07.011.

[199] National Cancer Institute. Radiogenomics Consortium (RGC). Epidemiol Genomics Res Progr 2019. https://epi.grants.cancer.gov/radiogenomics/ (accessed November 15, 2019).

[200] Andreassen CN, Schack LMH, Laursen LV, Alsner J. Radiogenomics – current status, challenges and future directions. Cancer Lett 2016. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.035.

[201] Zhu M, Zhao S. Candidate gene identification approach: Progress and challenges. Int J Biol Sci 2007. https://doi.org/10.7150/ijbs.3.420.

[202] Montana G. Statistical methods in genetics. Brief Bioinform 2006;7:297–308. https://doi.org/10.1093/bib/bbl028.

[203] Brothwell MRS, West CM, Dunning AM, Burnet NG, Barnett GC. Radiogenomics in the Era of Advanced Radiotherapy. Clin Oncol 2019. https://doi.org/10.1016/j.clon.2019.02.006.

[204] Alsner J, Andreassen CN, Overgaard J. Genetic Markers for Prediction of Normal Tissue Toxicity After Radiotherapy. Semin Radiat Oncol 2008. https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2007.10.004.

[205] Albert FW, Kruglyak L. The role of regulatory variation in complex traits and disease. Nat Rev Genet 2015. https://doi.org/10.1038/nrg3891.

[206] Wen J, Liu H, Wang L, Wang X, Gu N, Liu Z, et al. Potentially Functional Variants of ATG16L2 Predict Radiation Pneumonitis and Outcomes in Patients with Non–Small Cell Lung Cancer after Definitive Radiotherapy. J Thorac Oncol 2018. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.01.028.

[207] Yuan X, Liao Z, Liu Z, Wang LE, Tucker SL, Mao L, et al. Single nucleotide polymorphism at rs1982073:T869c of the TGFβ1 gene is associated with the risk of radiation pneumonitis in patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiotherapy. J Clin Oncol 2009. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6763.

[208] Xiao Y, Yuan X, Qiu H, Li Q. Single-nucleotide polymorphisms of TGFβ1 and ATM associated with radiation-induced pneumonitis: A prospective cohort study of thoracic cancer patients in China. Int J Clin Exp Med 2015.

[209] Yin M, Liao Z, Yuan X, Guan X, O'Reilly MS, Welsh J, et al. Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene and severe radiation pneumonitis in non-small cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy. Cancer Sci 2012. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02229.x.

[210] Yin M, Liao Z, Huang YJ, Liu Z, Yuan X, Gomez D, et al. Polymorphisms of homologous recombination genes and clinical outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy. PLoS One 2011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020055.

[211] Yang J, Xu T, Gomez DR, Yuan X, Nguyen QN, Jeter M, et al. Polymorphisms in BMP2/BMP4, with estimates of mean lung dose, predict radiation pneumonitis among patients receiving definitive radiotherapy for non-small cell lung cancer. Oncotarget 2017. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17904.

[212] Liu B, Yi M, Tang Y, Liu Q, Qiu H, Zou Y, et al. MMP-1 promoter polymorphism is associated with risk of radiation-induced lung injury in lung cancer patients treated with radiotherapy. Oncotarget 2016. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12164.

[213] Pu X, Wang L, Chang JY, Hildebrandt MAT, Ye Y, Lu C, et al. Inflammation-related genetic variants predict toxicity following definitive radiotherapy for lung cancer. Clin Pharmacol Ther 2014. https://doi.org/10.1038/clpt.2014.154.

[214] Tucker SL, Li M, Xu T, Gomez D, Yuan X, Yu J, et al. Incorporating single-nucleotide polymorphisms into the lyman model to improve prediction of radiation pneumonitis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2013. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.02.021.

[215] Du L, Yu W, Huang X, Zhao N, Liu F, Tong F, et al. GSTP1 Ile105Val polymorphism might be associated with the risk of radiation pneumonitis among lung cancer patients in Chinese population: A prospective study. J Cancer 2018. https://doi.org/10.7150/jca.20643.

[216] Yin M, Liao Z, Liu Z, Wang LE, O'Reilly M, Gomez D, et al. Genetic variants of the nonhomologous end joining gene LIG4 and severe radiation pneumonitis in nonsmall cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy. Cancer 2012. https://doi.org/10.1002/cncr.26214.

[217] Wen J, Liu H, Wang Q, Liu Z, Li Y, Xiong H, et al. Genetic variants of the LIN28B gene predict severe radiation pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. Eur J Cancer 2014. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.03.008.

[218] Liu B, Tang Y, Yi M, Liu Q, Xiong H, Hu G, et al. Genetic variants in the plasminogen activator inhibitor-1 gene are associated with an increased risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients. Cancer Med 2017. https://doi.org/10.1002/cam4.1011.

[219] Tang Y, Liu B, Li J, Wu H, Yang J, Zhou X, et al. Genetic variants in PI3K/AKT pathway are associated with severe radiation pneumonitis in lung cancer patients treated with radiation therapy. Cancer Med 2016. https://doi.org/10.1002/cam4.564.

[220] Hildebrandt MAT, Komaki R, Liao Z, Gu J, Chang JY, Ye Y, et al. Genetic variants in inflammation-related genes are associated with radiation-induced toxicity following treatment for non-small cell lung cancer. PLoS One 2010. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012402.

[221] Pang Q, Wei Q, Xu T, Yuan X, Lopez Guerra JL, Levy LB, et al. Functional promoter variant rs2868371 of HSPB1 is associated with risk of radiation pneumonitis after chemoradiation for non-small cell lung cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2013. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.10.011.

[222] Lopez Guerra JL, Wei Q, Yuan X, Gomez D, Liu Z, Zhuang Y, et al. Functional promoter rs2868371 variant of HSPB1 associates with radiation-induced esophageal toxicity in patients with non-small-cell lung cancer treated with radio(chemo)therapy. Radiother Oncol 2011. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.08.039.

[223] Lopez Guerra JL, Song Y-P, Nguyen Q-N, Gomez DR, Liao Z, Xu T. Functional promoter rs189037 variant of ATM is associated with decrease in lung diffusing capacity after irradiation for non–small-cell lung cancer. Chronic Dis Transl Med 2018. https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2018.02.006.

[224] Zhang L, Yang M, Bi N, Fang M, Sun T, Ji W, et al. ATM polymorphisms are associated with risk of radiation-induced pneumonitis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.07.1675.

[225] Du L, Yu W, Dai X, Zhao N, Huang X, Tong F, et al. Association of DNA repair gene polymorphisms with the risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients. Oncotarget 2018. https://doi.org/10.18632/oncotarget.22982.

[226] Guerra JLL, Gomez D, Wei Q, Liu Z, Wang LE, Yuan X, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor β1 gene and the risk of severe radiation esophagitis in patients with lung cancer. Radiother Oncol 2012. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.08.014.

[227] Zhao L, Pu X, Ye Y, Lu C, Chang JY, Wu X. Association between genetic variants in DNA double-strand break repair pathways and risk of radiation therapy-induced pneumonitis and esophagitis in non-small cell lung cancer. Cancers (Basel) 2016. https://doi.org/10.3390/cancers8020023.

[228] Mak RH, Alexander BM, Asomaning K, Heist RS, Liu CY, Su L, et al. A single-nucleotide polymorphism in the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene is associated with risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients treated with thoracic radiation therapy. Cancer 2012. https://doi.org/10.1002/cncr.26667.

[229] Li H, Liu G, Xia L, Zhou Q, Xiong J, Xian J, et al. A polymorphism in the DNA repair domain of APEX1 is associated with the radiation-induced pneumonitis risk among lung cancer patients after radiotherapy. Br J Radiol 2014. https://doi.org/10.1259/bjr.20140093.

[230] Marees AT, de Kluiver H, Stringer S, Vorspan F, Curis E, Marie-Claire C, et al. A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis. Int J Methods Psychiatr Res 2018. https://doi.org/10.1002/mpr.1608.

[231] Consortium the HR, McCarthy S, Das S, Kretzschmar W, Delaneau O, Wood AR, et al. A reference panel of 64,976 haplotypes for genotype imputation. Nat Genet 2016. https://doi.org/10.1038/ng.3643.

[232] Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang H, et al. The international HapMap project. Nature 2003.

[233] Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature 2012. https://doi.org/10.1038/nature11632.

[234] Consortium the HR. The Haplotype Reference Consortium. Particip Cohorts 2019. http://www.haplotype-reference-consortium.org/participating-cohorts (accessed October 4, 2019).

[235] Banerjee S, Zeng L, Schunkert H, Söding J. Bayesian multiple logistic regression for case-control GWAS. PLoS Genet 2018. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007856.

[236] Dudbridge F, Gusnanto A. Estimation of significance thresholds for genomewide association scans. Genet Epidemiol 2008. https://doi.org/10.1002/gepi.20297.

[237] Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-α gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. Nat Genet 2002. https://doi.org/10.1038/ng1047.

[238] Buniello A, Macarthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. Nucleic Acids Res 2019. https://doi.org/10.1093/nar/gky1120.

[239] Kerns SL, Ostrer H, Stock R, Li W, Moore J, Pearlman A, et al. Genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the development of erectile dysfunction in African-American men after radiotherapy for prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.07.036.

[240] Kerns SL, Stock R, Stone N, Buckstein M, Shao Y, Campbell C, et al. A 2-stage genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms associated with development of erectile dysfunction following radiation therapy for prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2013. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.08.003.

[241] Zagar TM, Stock RG, Cesaretti JA, Stone NN. Assessment of postbrachytherapy sexual function: A comparison of the IIEF-5 and the MSEFS. Brachytherapy 2007. https://doi.org/10.1016/j.brachy.2006.11.003.

[242] Barry MJ, Fowler FJ, O'Leary MP, Bruskewitz RC, Holtgrewe HL, Mebust WK, et al. The American Urological Association symptom index for benign prostatic hyperplasia. The Measurement Committee of the American Urological Association. J Urol 1992.

[243] Kerns SL, Stone NN, Stock RG, Rath L, Ostrer H, Rosenstein BS. A 2-stage genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms associated with development of urinary symptoms after radiotherapy for prostate cancer. J Urol 2013. https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.01.096.

[244] Kerns SL, Stock RG, Stone NN, Blacksburg SR, Rath L, Vega A, et al. Genome-wide association study identifies a region on chromosome 11q14.3 associated with late rectal bleeding following radiation therapy for prostate cancer. Radiother Oncol 2013. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.05.001.

[245] Barnett GC, Thompson D, Fachal L, Kerns S, Talbot C, Elliott RM, et al. A genome wide association

study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. Radiother Oncol 2014. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.02.012.

[246] Barnett GC, West CML, Coles CE, Pharoah PDP, Talbot CJ, Elliott RM, et al. Standardized total average toxicity score: A scale- and grade-independent measure of late radiotherapy toxicity to facilitate pooling of data from different studies. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2012. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.03.015.

[247] LENT SOMA scales for all anatomic sites. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995. https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)90159-0.

[248] Fachal L, Gómez-Caamaño A, Barnett GC, Peleteiro P, Carballo AM, Calvo-Crespo P, et al. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1. Nat Genet 2014. https://doi.org/10.1038/ng.3020.

[249] Wang TM, Shen GP, Chen MY, Zhang JB, Sun Y, He J, et al. Genome-Wide Association Study of Susceptibility Loci for Radiation-Induced Brain Injury. J Natl Cancer Inst 2019. https://doi.org/10.1093/jnci/djy150.

[250] Best T, Li D, Skol AD, Kirchhoff T, Jackson SA, Yasui Y, et al. Variants at 6q21 implicate PRDM1 in the etiology of therapy-induced second malignancies after Hodgkin's lymphoma. Nat Med 2011. https://doi.org/10.1038/nm.2407.

[251] Morton LM, Sampson JN, Armstrong GT, Chen TH, Hudson MM, Karlins E, et al. Genome-Wide Association Study to Identify Susceptibility Loci That Modify Radiation-Related Risk for Breast Cancer after Childhood Cancer. J Natl Cancer Inst 2017. https://doi.org/10.1093/jnci/djx058.

[252] Rivandi M, Martens JWM, Hollestelle A. Elucidating the underlying functional mechanisms of breast cancer susceptibility through post-GWAS analyses. Front Genet 2018. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00280.

[253] Tang H, Thomas PD. Tools for predicting the functional impact of nonsynonymous genetic variation. Genetics 2016. https://doi.org/10.1534/genetics.116.190033.

[254] Farashi S, Kryza T, Clements J, Batra J. Post-GWAS in prostate cancer: from genetic association to biological contribution. Nat Rev Cancer 2019. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0087-3.

[255] Fachal L, Dunning AM. From candidate gene studies to GWAS and post-GWAS analyses in breast cancer. Curr Opin Genet Dev 2015. https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.01.004.

[256] Evangelou E, Ioannidis JPA. Meta-analysis methods for genome-wide association studies and beyond. Nat Rev Genet 2013. https://doi.org/10.1038/nrg3472.

[257] Dearnaley DP, Hall E, Lawrence D, Huddart RA, Eeles R, Nutting CM, et al. Phase III pilot study of dose escalation using conformal radiotherapy in prostate cancer: PSA control and side effects. Br J Cancer 2005. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602301.

[258] Michalski JM, Gay H, Jackson A, Tucker SL, Deasy JO. Radiation Dose-Volume Effects in Radiation-Induced Rectal Injury. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.03.078.

[259] Kerns SL, Dorling L, Fachal L, Bentzen S, Pharoah PDP, Barnes DR, et al. Meta-analysis of Genome Wide Association Studies Identifies Genetic Markers of Late Toxicity Following Radiotherapy for Prostate Cancer. EBioMedicine 2016. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.07.022.

[260] Kerns SL, Fachal L, Dorling L, Barnett GC, Baran A, Peterson DR, et al. Radiogenomics Consortium Genome-Wide Association Study Meta-analysis of Late Toxicity after Prostate Cancer Radiotherapy. JNCI J Natl Cancer Inst 2019. https://doi.org/10.1093/jnci/djz075.

[261] McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. Genome Biol 2016. https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4.

[262] Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature 2012. https://doi.org/10.1038/nature11247.

[263] Sloan CA, Chan ET, Davidson JM, Malladi VS, Strattan JS, Hitz BC, et al. ENCODE data at the ENCODE portal. Nucleic Acids Res 2016. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1160.

[264] Kang J, Rancati T, Lee S, Oh JH, Kerns SL, Scott JG, et al. Machine learning and radiogenomics: Lessons learned and future directions. Front Oncol 2018. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00228.

[265] Oh JH, Kerns S, Ostrer H, Powell SN, Rosenstein B, Deasy JO. Computational methods using genome-wide association studies to predict radiotherapy complications and to identify correlative molecular processes. Sci Rep 2017. https://doi.org/10.1038/srep43381.

[266] Lee S, Oh J, Kerns S, Ostrer H, Rosenstein B, Deasy J. Machine learning-based modeling to predict

radiotherapy-induced genitourinary toxicity in prostate cancer using genome-wide association study. Med Phys 2017. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1002/mp.12304.

[267] Sugrue LP, Desikan RS. What Are Polygenic Scores and Why Are They Important? JAMA - J Am Med Assoc 2019. https://doi.org/10.1001/jama.2019.3893.

[268] Ahmed M, Dorling L, Kerns S, Fachal L, Elliott R, Partliament M, et al. Common genetic variation associated with increased susceptibility to prostate cancer does not increase risk of radiotherapy toxicity. Br J Cancer 2016. https://doi.org/10.1038/bjc.2016.94.

[269] Dorling L, Barnett GC, Michailidou K, Coles CE, Burnet NG, Yarnold J, et al. Patients with a High Polygenic Risk of Breast Cancer do not have An Increased Risk of Radiotherapy Toxicity. Clin Cancer Res 2016. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1080.

[270] West C, Azria D, Chang-Claude J, Davidson S, Lambin P, Rosenstein B, et al. The REQUITE Project: Validating Predictive Models and Biomarkers of Radiotherapy Toxicity to Reduce Side-effects and Improve Quality of Life in Cancer Survivors. Clin Oncol 2014. https://doi.org/10.1016/j.clon.2014.09.008.

[271] Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, Bullinger M, Cull A, Duez NJ, et al. The European organization for research and treatment of cancer QLQ-C30: A quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. J Natl Cancer Inst 1993. https://doi.org/10.1093/jnci/85.5.365.

[272] Seibold P, Webb A, Aguado-Barrera ME, Azria D, Bourgier C, Brengues M, et al. REQUITE: A prospective multicentre cohort study of patients undergoing radiotherapy for breast, lung or prostate cancer. Radiother Oncol 2019;138:59–67. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.04.034.

[273] Sampath SCSC, Sampath SCSC, Millay DP. Myoblast fusion confusion: The resolution begins. Skelet Muscle 2018. https://doi.org/10.1186/s13395-017-0149-3.

[274] Jurdana M, Cemazar M, Pegan K, Mars T. Effect of ionizing radiation on human skeletal muscle precursor cells. Radiol. Oncol., 2013. https://doi.org/10.2478/raon-2013-0058.

[275] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing 2019.

[276] Moore C, Jacobson S. genpwr: Power Calculations Under Genetic Model Misspecification 2019.

[277] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing 2019.

[278] Chang CC, Chow CC, Tellier LCAM, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. Gigascience 2015. https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8.

[279] Slowikowski K. ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with "ggplot2" 2019.

[280] Ginestet C. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. J R Stat Soc Ser A (Statistics Soc 2011. https://doi.org/10.1111/j.1467-985x.2010.00676_9.x.

[281] Wickham H, François R, Henry L, Müller K. dplyr: A Grammar of Data Manipulation 2020.

[282] Neuwirth E. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes 2014.

[283] LiLin-Yin. CMplot: Circle Manhattan Plot 2019.

[284] Q-Q Plot (Quantile to Quantile Plot). Concise Encycl. Stat., 2008. https://doi.org/10.1007/978-0-387-32833-1_331.

[285] Turner S. qqman: Q-Q and Manhattan Plots for GWAS Data 2017.

[286] Bouquin DR. GitHub. J Med Libr Assoc 2015;103:166–7. https://doi.org/10.3163/1536-5050.103.3.019.

[287] Pulit L. Sara. gwas-scripts/qqplot.R. GitHub 2017. https://github.com/saralpulit/gwas-scripts/blob/master/qqplot.R (accessed February 27, 2020).

[288] Bhattacharjee S, Wang Z, Ciampa J, Kraft P, Chanock S, Yu K, et al. Using Principal Components of Genetic Variation for Robust and Powerful Detection of Gene-Gene Interactions in Case-Control and Case-Only Studies. Am J Hum Genet 2010. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.01.026.

[289] Ward LD, Kellis M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. Nucleic Acids Res 2012. https://doi.org/10.1093/nar/gkr917.

[290] Auton A, Abecasis G, Altshuler D, Durbin R, Abecasis G, Bentley D, et al. A global reference for human genetic variation: The 1000 Genomes Project Consortium. Nature 2015. https://doi.org/10.1038/nature15393.

[291] Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. Science (80-) 2002. https://doi.org/10.1126/science.1069424.

[292] Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics 2005. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457.

[293] Mudunuri U, Che A, Yi M, Stephens RM. bioDBnet: The biological database network. Bioinformatics 2009. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn654.

[294] Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. Nat Commun 2019. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09234-6.

[295] Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, Thomas PD. PANTHER version 7: Improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. Nucleic Acids Res 2009. https://doi.org/10.1093/nar/gkp1019.

[296] Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. Genome Res 2003. https://doi.org/10.1101/gr.772403.

[297] Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. Nucleic Acids Res 2020. https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031.

[298] Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. Nucleic Acids Res 2018. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1132.

[299] Fabregat A, Sidiropoulos K, Viteri G, Forner O, Marin-Garcia P, Arnau V, et al. Reactome pathway analysis: A high-performance in-memory approach. BMC Bioinformatics 2017. https://doi.org/10.1186/s12859-017-1559-2.

[300] Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 2012. https://doi.org/10.1093/nar/gks596.

[301] Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics 2007. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091.

[302] Kõressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raime K, Andreson R, Remm M. Primer3-masker: Integrating masking of template sequence with primer design software. Bioinformatics 2018. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty036.

[303] Vallone PM, Butler JM. AutoDimer: A screening tool for primer-dimer and hairpin structures. Biotechniques 2004.

[304] Kim M, Lee J, Ha B, Lee R, Lee K-J, Suh HS. Factors predicting radiation pneumonitis in locally advanced non-small cell lung cancer. Radiat Oncol J 2011. https://doi.org/10.3857/roj.2011.29.3.181.

[305] Kong FM (Spring), Wang S. Nondosimetric Risk Factors for Radiation-Induced Lung Toxicity. Semin Radiat Oncol 2015. https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2014.12.003.

[306] Kim JH, Jin P, Duan R, Chen EH. Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. Curr Opin Genet Dev 2015. https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.03.006.

[307] Arora A, Abdel-Fatah TMA, Agarwal D, Doherty R, Moseley PM, Aleskandarany MA, et al. Transcriptomic and protein expression analysis reveals clinicopathological significance of bloom syndrome helicase (BLM) in breast cancer. Mol Cancer Ther 2015. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0939.

[308] Her J, Ray C, Bunting SF. The BLM Helicase: Keeping recombination honest? Cell Cycle 2018. https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1421045.

[309] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. Curr Protoc Bioinforma 2016. https://doi.org/10.1002/cpbi.5.

[310] Li X, Xu S, Cheng Y, Shu J. HSPB1 polymorphisms might be associated with radiation-induced damage risk in lung cancer patients treated with radiotherapy. Tumor Biol 2016. https://doi.org/10.1007/s13277-016-4959-4.

[311] Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, et al. Empirical evidence for low reproducibility indicates low pre-study odds. Nat Rev Neurosci 2013. https://doi.org/10.1038/nrn3475-c6.

[312] Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, et al. Power failure: Why small sample size undermines the reliability of neuroscience. Nat Rev Neurosci 2013. https://doi.org/10.1038/nrn3475.

[313] Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, et al. Confidence and precision

increase with high statistical power. Nat Rev Neurosci 2013. https://doi.org/10.1038/nrn3475-c4.

[314] Schack LMH, Petersen SE, Nielsen S, Lundby L, Høyer M, Bentzen L, et al. Validation of genetic predictors of late radiation-induced morbidity in prostate cancer patients. Acta Oncol (Madr) 2017. https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1348626.

[315] Zhang Y, Liu Z, Wang M, Tian H, Su K, Cui J, et al. Single Nucleotide Polymorphism rs1801516 in Ataxia Telangiectasia-Mutated Gene Predicts Late Fibrosis in Cancer Patients after Radiotherapy. Med (United States) 2016. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003267.

[316] Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. Science (80-) 2008. https://doi.org/10.1126/science.1156409.

[317] Andreassen CN. Editorial: Searching for genetic determinants of normal tissue radiosensitivity - Are we on the right track? Radiother Oncol 2010. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.07.018.

[318] Andreassen CN, Rosenstein BS, Kerns SL, Ostrer H, De Ruysscher D, Cesaretti JA, et al. Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. Radiother Oncol 2016. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.06.017.

[319] Terrazzino S, Cargnin S, Deantonio L, Pisani C, Masini L, Canonico PL, et al. Impact of ATM rs1801516 on late skin reactions of radiotherapy for breast cancer: Evidences from a cohort study and a trial sequential meta-analysis. PLoS One 2019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225685.

[320] Tam V, Patel N, Turcotte M, Bossé Y, Paré G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. Nat Rev Genet 2019. https://doi.org/10.1038/s41576-019-0127-1.

[321] CHEUK IWY, YIP SP, KWONG DLW, WU VWC. Association of XRCC1 and XRCC3 gene haplotypes with the development of radiation-induced fibrosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. Mol Clin Oncol 2014. https://doi.org/10.3892/mco.2014.276.

[322] Wray NR, Goddard ME, Visscher PM. Prediction of individual genetic risk to disease from genome-wide association studies. Genome Res 2007. https://doi.org/10.1101/gr.6665407.

[323] Ge M, Shi M, An C, Yang W, Nie X, Zhang J, et al. Functional evaluation of TERT-CLPTM1L genetic variants associated with susceptibility of papillary thyroid carcinoma. Sci Rep 2016. https://doi.org/10.1038/srep26037.

[324] Chapoval SP. Neuroimmune semaphorins as costimulatory molecules and beyond. Mol Med 2018. https://doi.org/10.1186/s10020-018-0014-9.

[325] Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2019. Nucleic Acids Res 2019. https://doi.org/10.1093/nar/gky1113.

[326] Tachmazidou I, Süveges D, Min JL, Ritchie GRS, Steinberg J, Walter K, et al. Whole-Genome Sequencing Coupled to Imputation Discovers Genetic Signals for Anthropometric Traits. Am J Hum Genet 2017. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.04.014.

[327] Karlsson Linnér R, Biroli P, Kong E, Meddens SFW, Wedow R, Fontana MA, et al. Genome-wide association analyses of risk tolerance and risky behaviors in over 1 million individuals identify hundreds of loci and shared genetic influences. Nat Genet 2019. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0309-3.

[328] Pruitt K, Brown G, Tatusova T, Maglott D. The Reference Sequence (RefSeq) Database. NCBI Handb 2002.

[329] Almeida CF, Fernandes SA, Ribeiro Junior AF, Keith Okamoto O, Vainzof M. Muscle satellite cells: Exploring the basic biology to rule them. Stem Cells Int 2016. https://doi.org/10.1155/2016/1078686.

[330] Society AC. Quick References, American Joint Committee on Cancer. Lung Cancer Staging, AJCC 7th Ed Staging Posters 2013. https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/LungMedium.pdf (accessed September 23, 2019).

[331] Shim HS, Choi Y La, Kim L, Chang S, Kim WS, Roh MS, et al. Molecular testing of lung cancers. J Pathol Transl Med 2017. https://doi.org/10.4132/jptm.2017.04.10.

[332] Hill, Richard P; Bristow RG. Tumor and Normal Tissue Response to Radiotherapy. In: Tannock, Ian F.; Hill, Richard P.; Bristow, Robert G.; Harrington L, editor. Basic Sci. Oncol. 5e. 5th ed., The McGraw-Hill Companies; 2005.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8. ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 1. Séptima edición de la clasificación TNM

	Estadio	Descripción
Tamaño de tumor (T)	Tx	El tumor primario no se puede evaluar, o el tumor se confirma por la presencia de células malignas en el esputo o los lavados bronquiales, pero no se visualiza por imagen o broncoscopia
	T0	No hay evidencia de tumor primario
	Tis	Carcinoma *in situ*
	T1	Tumor de 3 cm o menos en su mayor dimensión, rodeado de pleura pulmonar o visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobular
	T1a	Tumor de 2 cm o menos en su mayor dimensión
	T1b	Tumor de más de 2 cm pero menor o igual a 3 cm en su mayor dimensión
	T2	Tumor de más de 3 cm pero menor o igual a 7 cm en su mayor dimensión, con cualquiera de las siguientes características (los tumores T2 con estas características se clasifican T2a si tienen 5 cm o menos): involucra el bronquio principal, 2 cm o más distal a la carina; invade la pleura visceral (PL1 o PL2); si está asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar pero no afecta a todo el pulmón
	T2a	Tumor de más de 3 cm pero menor o igual a 5 cm en su mayor dimensión
	T2b	Tumor de más de 5 cm pero menor o igual a 7 cm en su mayor dimensión
	T3	Tumor de más de 7 cm o uno que invade directamente cualquiera de los siguientes: pleural parietal (PL3), pared torácica (incluidos los tumores del surco superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal de menos de 2 cm distal a la carina pero sin afectación de la carina; o atelectasia asociada o neumonitis obstructiva de todo el pulmón o nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo
	T4	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina, nódulos tumorales separados en un lóbulo ipsilateral diferente
Clasificación regional de los ganglios linfáticos (N)	Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
	N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales
	N1	Metástasis en los ganglios linfáticos ipsilaterales peribronquiales y/o ipsilaterales hiliares e intrapulmonares, incluida la afectación por extensión directa
	N2	Metastasis en ganglios linfáticos del mediastino y/o subcarinales ipsilaterales
	N3	Metástasis en mediastino contralateral, hilar contralateral, escaleno ipsilateral o contralateral, o ganglios linfáticos supraclaviculares
Clasificación de metástasis a distancia (M)	M0	Sin metástasis a distancia
	M1	Metástasis a distancia
	M1a	Nódulos tumorales separados en un lóbulo contralateral, tumor con nódulos pleurales o derrame pleural maligno (o pericárdico)
	M1b	Metástasis a distancia (en órganos extratorácicos)

Tabla adaptada de AJCC 7ª edición. [330]

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 2. Estadio pronóstico basado en TNM 7ª edición

	Tumor (T)	Nódulos (N)	Metástasis (M)
Carcinoma oculto	Tx	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T2b	N0	M0
	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
Estadio IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1a	N2	M0
	T1b	N2	M0
	T2a	N2	M0
	T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Estadio IIIB	T1a	N3	M0
	T1b	N3	M0
	T2b	N3	M0
	T3	N3	M0
	T4	N2	M0
	T4	N3	M0
Estadio IV	Any T	Any N	M1a
	Any T	Any N	M1b

Tabla adaptada de AJCC 7ª edición. [330]

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 3. Alteraciones genéticas contra las que existe una terapia dirigida NSCLC

Gen	Representación subtipo o variantes	Frecuencia	Agentes dirigidos
Mutaciones			
EGFR	Exón 19 deleción, Exón 21 L858R, Exón 20 T790M	40-50% en ADC	Gefitinib, erlotinib afatinib osimetinib
KRAS	G12X, G13X, G61X	5-10$ en ADC	Inhibidores MEK
BRAF	V600E	1-4% en ADC	Vemurafenib, dabrafenib
HER2	p.A775 G776insYVMA en Exón 20	1-2% en ADC	Trastuzumab, afatinib
MET	Mutación con splicing cerca o en el Exón 14	3-4% en ADC	Crizotinib, cabozantinib
Fusión de genes			
ALK	EML4-ALK, TGF-ALK, KIF5B-ALF	5% en ADC	Crizotinib, certinib, alectinib
ROS1	CD74-ROS1, EZR-ROS1, SLC34A2-ROS1, SDC4-ROS1	1% en ADC	Crizotinib, ceritinib
RET	KIF5B-RET, CCDC6-RET	1% en ADC	Cabozantinib, vandetanib, alectinib
NTRK1	MRPIP-NTRK1, CD74-NTRK1, TPM3-NTRK1	< 1% en ADC	Entrectinib
FGFR1/3	FGFR3-TACC3, BAG4-FGFR1	1% en NSCLC	Inhibidor FGFR
NRG1	CD74-NRG1, SLC3A2-NRG1, VAMP2-NRG1	7% en ADC mucinoso	NA
Amplificación			
FGFR1	Amplificación del gen	13-22% en SQC	Inhibidor FGFR
EGFR	Amplificación del gen	8-9% en SQC	Inhibidor EGFR
MET	Amplificación del gen	2-4% en ADC	Crizotinib
HER2	Amplificaciónd el gen	1-2% en ADC	Trastuzumab, afatinib

ADC, adenocarcinoma; NCLC, carcinoma de pulmón de células no pequeñas; FGFR, receptor del factor de crecimiento fibroblastos; SQC, carcinoma de células escamosas; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico.
Tabla adaptada de Shim et al. 2017 [331]

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 4. Eventos adversos a la radioterapia en pacientes con NSCLC según las versiones del CTCAE

Adverse Event	Version	Grade				
		1	2	3	4	5
Cough	v.3.0	Symptomatic, non-narcotic medication only indicated	Symptomatic and narcotic medication indicated	Symptomatic and significantly interfering with sleep or ADL		
	v.4.0 & v.5.0	Mild symptoms; nonprescription intervention indicated	Moderate symptoms, medical intervention indicated; limiting instrumental ADL	Severe symptoms; limiting self care ADL		
Dyspnea	v.3.0	Dyspnea on exertion, but can walk 1 flight of stairs without stopping	Dyspnea on exertion but unable to walk 1 flight of stairs or 1 city block (0.1km) without stopping	Dyspnea with ADL	Dyspnea at rest; intubation/ventilator indicated	Death
	v.4.0 & v.5.0	Shortness of breath with moderate exertion	Shortness of breath with minimal exertion; limiting instrumental ADL	Shortness of breath at rest; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Broncho pulmonary hemorrhage	v.3.0	Mild, intervention not indicated	Symptomatic and medical intervention indicated	Transfusion, interventional radiology, endoscopic, or operative intervention indicated; radiation therapy (i.e., hemostasis of bleeding site)	Life-threatening consequences; major urgent intervention indicated	Death
	v.4.0	Mild symptoms; intervention not indicated	Moderate symptoms; medical intervention indicated	Transfusion, radiologic, endoscopic, or operative intervention indicated (e.g., hemostasis of bleeding site)	Life-threatening respiratory or hemodynamic compromise; intubation or urgent intervention indicated	Death
	v.5.0	Mild symptoms; intervention not indicated	Moderate symptoms; invasive intervention not indicated	Transfusion indicated; invasive intervention indicated; hospitalization	Life-threatening consequences; intubation or urgent intervention indicated	Death
Chest wall pain	v.3.0	Mild pain not interfering with function	Moderate pain; pain or analgesics interfering with function, but not interfering with ADL	Severe pain; pain or analgesics severely interfering with ADL	Disabling	
	v.4.0 & v.5.0	Mild pain	Moderate pain; limiting instrumental ADL	Severe pain; limiting self care ADL		

Adverse Event	Version	Grade				
		1	2	3	4	5
Pneumonitis	v.3.0	Asymptomatic, radiographic findings only	Symptomatic, not interfering with ADL	Symptomatic, interfering with ADL; O_2 indicated	Life-threatening; ventilatory support indicated	Death
	v.4.0 & v.5.0	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; medical intervention indicated; limiting instrumental ADL	Severe symptoms; limiting self care ADL; oxygen indicated	Life-threatening respiratory compromise; urgent intervention indicated (e.g., tracheotomy or intubation)	Death
Pulmonary fibrosis	v.3.0	Minimal radiographic findings (or patchy or bi-basilar changes) with estimated radiographic proportion of total lung volume that is fibrotic of <25%	Patchy or bi-basilar changes with estimated radiographic proportion of total lung volume that is fibrotic of 25 - <50%	Dense or widespread infiltrates/consolidation with estimated radiographic proportion of total lung volume that is fibrotic of 50 - <75%	Estimated radiographic proportion of total lung volume that is fibrotic is >=75%; honeycombing	Death
	v.4.0 & v.5.0	Mild hypoxemia; radiologic pulmonary fibrosis < 25% of lung volume	Moderate hypoxemia; evidence of pulmonary hypertension; radiographic pulmonary fibrosis 25-50%	Severe hypoxemia; evidence of right-sided heart failure; radiographic pulmonary fibrosis >50 - 75%	Life-threatening consequences (e.g., hemodynamic/pulmonary complications); intubation with ventilatory support indicated; radiographic pulmonary fibrosis >75% with severe honeycombing	Death
Bronchial fistula	v.3.0	Asymptomatic, radiographic findings only	Symptomatic, tube thoracostomy or medical management indicated; associated with altered respiratory function but not interfering with ADL	Symptomatic and associated with altered respiratory function interfering with ADL; or endoscopic (e.g., stent) or primary closure by operative intervention indicated	Life-threatening consequences; operative intervention with thoracoplasty, chronic open drainage or multiple thoracotomies indicated	Death
	v.4.0	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; tube thoracostomy or medical management indicated; limiting instrumental ADL	Severe symptoms; limiting self care ADL; endoscopic or operative intervention indicated (e.g., stent or primary closure)	Life-threatening consequences; urgent operative intervention with thoracoplasty, chronic open drainage or multiple thoracotomies indicated	Death
	v.5.0	Asymptomatic	Symptomatic, invasive intervention not indicated	Invasive intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

Adverse Event	Version	Grade				
		1	2	3	4	5
Bronchial stricture	v.3.0	Asymptomatic obstruction or stenosis on exam, endoscopy, or radiograph	Symptomatic (e.g., noisy airway breathing), but causing no respiratory distress; medical management indicated (e.g., steroids)	Interfering with ADL; stridor or endoscopic intervention indicated (e.g., stent, laser)	Life-threatening airway compromise; tracheotomy or intubation indicated	Death
	v.4.0 & v.5.0	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic (e.g., rhonchi or wheezing) but without respiratory distress; medical intervention indicated (e.g., steroids, bronchodilators)	Shortness of breath with stridor; endoscopic intervention indicated (e.g., laser, stent placement)	Life-threatening respiratory or hemodynamic compromise; intubation or urgent intervention indicated	Death
Tracheal fistular	v.3.0	Asymptomatic, radiographic findings only	Symptomatic, tube thoracostomy or medical management indicated; associated with altered respiratory function but not interfering with ADL	Symptomatic and associated with altered respiratory function interfering with ADL; or endoscopic (e.g., stent) or primary closure by operative intervention indicated	Life-threatening consequences; operative intervention with thoracoplasty, chronic open drainage or multiple thoracotomies indicated	Death
	v.4.0	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; tube thoracostomy or medical intervention indicated; limiting instrumental ADL	Severe symptoms; limiting self care ADL; endoscopic or operative intervention indicated (e.g., stent or primary closure)	Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated (e.g., thoracoplasty, chronic open drainage or multiple thoracotomies)	Death
	v.5.0	Asymptomatic	Symptomatic, invasive intervention not indicated	Invasive intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Tracheal stenosis	v.3.0	Asymptomatic obstruction or stenosis on exam, endoscopy, or radiograph	Symptomatic (e.g., noisy airway breathing), but causing no respiratory distress; medical management indicated (e.g., steroids)	Interfering with ADL; stridor or endoscopic intervention indicated (e.g., stent, laser)	Life-threatening airway compromise; tracheotomy or intubation indicated	Death

Adverse Event	Version	Grade				
		1	2	3	4	5
	v.4.0	Partial asymptomatic obstruction on ePartial asymptomatic obstruction on examination (e.g., visual, radiologic or endoscopic)	Symptomatic (e.g., noisy airway breathing), no respiratory distress; medical intervention indicated (e.g., steroids); limiting instrumental ADL	Stridor; radiologic or endoscopic intervention indicated (e.g., stent, laser); limiting self care ADL	Life-threatening airway compromise; urgent intervention indicated (e.g., tracheotomy or intubation)	Death
	v.5.0	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic (e.g., noisy airway breathing), no respiratory distress; medical intervention indicated (e.g., steroids); limiting instrumental ADL	Stridor or respiratory distress limiting self care ADL; invasive intervention indicated (e.g., stent, laser)	Life-threatening airway compromise; urgent intervention indicated (e.g., tracheotomy or intubation)	Death
Brachial plexopathy	v.3.0	Asymptomatic	Symptomatic, not interfering with ADL	Symptomatic, interfering with ADL	Disabling	Death
	v.4.0 & v.5.0	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Moderate symptoms; limiting instrumental ADL	Severe symptoms; limiting self care ADL		Death
Myelitis	v.3.0	Asymptomatic, mild signs (e.g., Babinski's or Lhermitte's sign)	Weakness or sensory loss not interfering with ADL	Weakness or sensory loss interfering with ADL	Disabling	Death
	v.4.0 & v.5.0	Asymptomatic; mild signs (e.g., Babinski's reflex or Lhermitte's sign)	Moderate weakness or sensory loss; limiting instrumental ADL	Severe weakness or sensory loss; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Esophagitis	v.3.0	Asymptomatic pathologic, radiographic, or endoscopic findings only	Symptomatic; altered eating/swallowing (e.g., altered dietary habits, oral supplements); IV fluids indicated <24 hrs	Symptomatic and severely altered eating/swallowing (e.g., inadequate oral caloric or fluid intake); IV fluids, tube feedings, or TPN indicated >=24 hrs	Life-threatening consequences	Death
	v.4.0 & v.5.0	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; altered eating/swallowing; oral supplements indicated	Severely altered eating/swallowing; tube feeding, TPN, or hospitalization indicated	Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated	Death

Adverse Event	Version	Grade				
		1	2	3	4	5
Dysphagia	v.3.0	Symptomatic, able to eat regular diet	Symptomatic and altered eating/swallowing (e.g., altered dietary habits, oral supplements); IV fluids indicated <24 hrs	Symptomatic and severely altered eating/swallowing (e.g., inadequate oral caloric or fluid intake); IV fluids, tube feedings, or TPN indicated >=24 hrs	Life-threatening consequences (e.g., obstruction, perforation)	Death
	v.4.0 & v.5.0	Symptomatic, able to eat regular diet	Symptomatic and altered eating/swallowing	Severely altered eating/swallowing; tube feeding or TPN or hospitalization indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Esophageal fistula	v.3.0	Asymptomatic, radiographic findings only	Symptomatic; altered GI function (e.g., altered dietary habits, diarrhea, or GI fluid loss); IV fluids indicated <24 hrs	Symptomatic and severely altered GI function (e.g., altered dietary habits, diarrhea, or GI fluid loss); IV fluids, tube feedings, or TPN indicated >=24 hrs	Life-threatening consequences	Death
	v.4.0	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; altered GI function	Severely altered GI function; tube feeding, TPN or hospitalization indicated; elective operative intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
	v.5.0	Asymptomatic	Symptomatic, invasive intervention not indicated	Invasive intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Esophageal stenosis	v.3.0	Asymptomatic radiographic findings only	Symptomatic; altered GI function (e.g., altered dietary habits, vomiting, bleeding, diarrhea); IV fluids indicated <24 hrs	Symptomatic and severely altered GI function (e.g., altered dietary habits, diarrhea, or GI fluid loss); IV fluids, tube feedings, or TPN indicated >=24 hrs; operative intervention indicated	Life-threatening consequences; operative intervention requiring complete organ resection (e.g., total colectomy)	Death
	v.4.0 & v.5.0	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; altered GI function	Severely altered GI function; tube feeding; hospitalization indicated; elective operative intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated	Death
Myocardial infarction	v.3.0	Asymptomatic arterial narrowing without ischemia	Asymptomatic and testing suggesting ischemia; stable angina	Symptomatic and testing consistent with ischemia; unstable angina; intervention indicated	Acute myocardial infarction	Death

Adverse Event	Version	Grade				
		1	2	3	4	5
	v.4.0 & v.5.0		Asymptomatic and cardiac enzymes minimally abnormal and no evidence of ischemic ECG changes	Severe symptoms; cardiac enzymes abnormal; hemodynamically stable; ECG changes consistent with infarction	Life-threatening consequences; hemodynamically unstable	Death
Myocarditis	v.3.0			CHF responsive to intervention	Severe or refractory CHF	Death
	v.4.0			Severe with symptoms at rest or with minimal activity or exertion; intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated (e.g., continuous IV therapy or mechanical hemodynamic support)	Death
	v.5.0	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptoms with moderate activity or exertion	Severe with symptoms at rest or with minimal activity or exertion; intervention indicated; new onset of symptoms	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated (e.g., continuous IV therapy or mechanical hemodynamic support)	Death
Pericardial effusion	v.3.0	Asymptomatic effusion		Effusion with physiologic consequences	Life-threatening consequences (e.g., tamponade); emergency intervention indicated	Death
	v.4.0 & v.5.0		Asymptomatic effusion size small to moderate	Effusion with physiologic consequences	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Pericarditis	v.3.0	Asymptomatic, ECG or physical exam (rub) changes consistent with pericarditis	Symptomatic pericarditis (e.g., chest pain)	Pericarditis with physiologic consequences (e.g., pericardial constriction)	Life-threatening consequences; emergency intervention indicated	Death
	v.4.0 & v.5.0	Asymptomatic, ECG or physical findings (e.g., rub) consistent with pericarditis	Symptomatic pericarditis (e.g., chest pain)	Pericarditis with physiologic consequences (e.g., pericardial constriction)	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Radiation dermatitis	v.3.0	Faint erythema or dry desquamation	Moderate to brisk erythema; patchy moist desquamation, mostly confined to skin folds and creases; moderate edema	Moist desquamation other than skin folds and creases; bleeding induced by minor trauma or abrasion	Skin necrosis or ulceration of full thickness dermis; spontaneous bleeding from involved site	Death

Adverse Event	Version	Grade				
		1	2	3	4	5
	v.4.0 & v.5.0	Faint erythema or dry desquamation	Moderate to brisk erythema; patchy moist desquamation, mostly confined to skin folds and creases; moderate edema	Moist desquamation in areas other than skin folds and creases; bleeding induced by minor trauma or abrasion	Life-threatening consequences; skin necrosis or ulceration of full thickness dermis; spontaneous bleeding from involved site; skin graft indicated	Death

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 5. Dictamen del comité de ética de investigación de Santiago-Lugo

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es

galicia

DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 19/12/2016 o estudo:

Título: Radiogenómica: identificación de biomarcadores mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y secuenciación de exomas (WES) en fenotipos extremos.
Promotor: Ana Vega
Tipo de estudo: Outros
Código de Rexistro: 2016/597

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así coma os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e o RD 1090/2015, de 4 de decembro, polo que se regulan os ensaios clínicos con medicamentos, os Comités de Ética da Investigación con medicamentos e Rexistro Español de Estudos Clínicos
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así coma os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo **polo/a investigador/a do centro**:

Centros	Investigadores Principais
Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica	Ana Vega

En Santiago de Compostela, a 19 de decembro de 2016
O secretario

VAZQUEZ LAGO JUAN MANUEL - 44829259M

Juan M. Vázquez Lago

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es

galicia

Juan M. Vázquez Lago, Secretario do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo,

FAI CONSTAR QUE:

1. O Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo cumpre tanto na súa composición coma nos seus PNTs os requisitos legais vixentes (R.D 1090/2015 de ensaios clínicos, e a Lei 14/2007 de Investigación Biomédica).

2. A composición actual do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo é:

Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta). Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.
Juan M. Vázquez Lago (Secretario). Médico especialista en Medicina Preventiva e Saúde Pública. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.
Francisco Campos Pérez. Investigador. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
Rosana Castelo Domínguez. Farmacéutica Atención Primaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Daniel De La Iglesia García. Médico especialista en Dixestivo. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Ricardo García Martínez. Licenciado en Dereito. Área de Xestión Integrada de Lugo.
Victor Herrán Carreira. Paciente, ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
María Jesús Lamas Díaz. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.
María Isabel Loza García. Licenciada en Farmacia. Universidade de Santiago de Compostela.
Guillermo José Prada Ramallal. Médico especialista en Farmacoloxía clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago. Fundación "Ramón Domínguez". Santiago
Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacoloxía clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago.
María Jesús Wandosell Picatoste. Diplomada en Enfermería. Área de Xestión Integrada de Santiago.

Para que conste onde proceda, e a petición do promotor / investigador, en Santiago de Compostela, a 19 de decembro de 2016.

O Secretario do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago Lugo,

VÁZQUEZ LAGO JUAN MANUEL - 44892292M

Juan M. Vázquez Lago

ANEXO 6. Diseño de *primers* para genotipar los SNPs validados asociados con efectos adversos a la radiación en pacientes NSCLC mediante la tecnología Agena Bioscience MassARRRAY®

SNP_ID	Segundo *primer* para PCR	Primer *primer* para PCR	Sentido de la hebra	*Primer* de extensión	Nucleótido 1	Masa de extension y nucleótido 1	Nucleótido 2	Masa de extension y nucleótido 2	Nucleótido 3	Masa de extension y nucleótido 3
rs12469016	ACGTTGGATGTGTTTTCCCATCCAGTCTCG	ACGTTGGATGTCCTGTCCCTATGATAATGG	F	CAGTCTCGTGTCTTTCC	A	5374,5	G	5390,5		
rs1239344	ACGTTGGATGTTAACACTCCCCATTGGAGC	ACGTTGGATGAGCAGAAGGTAAGCATGCTC	F	CAAGCTTGCCCTAGAGA	C	5426,6	T	5506,5		
rs4772468	ACGTTGGATGACAAGAGATTTGGGTGGCAG	ACGTTGGATGTGTGCCAAGAATTGACTGCG	F	TGAAGGCAGTTGTCAGG	A	5561,7	G	5577,7		
rs2270132	ACGTTGGATGTCCTCCAGCACAAACTTTTC	ACGTTGGATGGATATGCGACCTCTATGCAG	R	CTCCACTCTTTCCCCATG	C	5608,7	A	5648,6		
rs16944739	ACGTTGGATGAAAGTGTGGTTTTCCAGGAC	ACGTTGGATGTGTCATCAGTCAGTCGCTTC	R	cAAAACTCAGTCGCAGCA	T	5732,8	C	5748,8		
rs11795343	ACGTTGGATGTCCTGGCATCATTGCATCTG	ACGTTGGATGGACTTTGACTTCAGTTTGAGG	F	CTCCCTGTCTTGTACCTAT	C	5927,9	T	6007,8		
rs8176257	ACGTTGGATGGGATATTTGGAAGTCTAGGG	ACGTTGGATGCGTCTAGAAGATGGGTGTTG	F	AAGACCAGAGGAAATATCT	G	6141,1	T	6180,9		
rs12516	ACGTTGGATGCAATCAAGTCTTCACTGCCC	ACGTTGGATGTAGCTGTTGGAAGGACTAGG	F	CTTCACTGCCCTTGCACACT	A	6235,1	G	6251,1		
rs3733336	ACGTTGGATGATTCCAGTTTCCTTCCTATC	ACGTTGGATGCACTGTATTGAAGTCACGTC	R	cACATTTTGTTTCAGTCACA	G	6289,1	A	6369,0		
rs270771	ACGTTGGATGAGTGTCCTCTTACCTGTCAC	ACGTTGGATGTGCAGGGAGATACCACTGTC	R	tctaTGCGCTCTGACCAGCCT	T	6604,3	C	6620,3		
rs940052	ACGTTGGATGCCCAGTTGCTCAAAAAGGTC	ACGTTGGATGGGTAGCTAGCAATCAAAGG	F	TCAAAAAGGTCTTTGCAGTTG	A	6731,4	G	6747,4		
rs10711	ACGTTGGATGGCCTTGGTCAGAGTAATAAC	ACGTTGGATGGGCTGCTAATAAACACTATG	F	TCAGAGTAATAACTGAAGGAG	G	6814,5	T	6854,4		
rs1871445	ACGTTGGATGGTCTTGGCTGCTTGTTAGTC	ACGTTGGATGGAGGTCAATAGCATTTGTTT	F	GCTTGTTAGTCTTTATCATTTT	C	6934,5	T	7014,5		
rs401549	ACGTTGGATGCCAGATGATGCTGCAAAGTG	ACGTTGGATGCCATATTGCTATTGGCTCCC	R	agGCAAAGTGCTTCACTCTTAC	T	6965,6	C	6981,6		
rs2707212	ACGTTGGATGCTCTTCTTCGCCTCAGACAC	ACGTTGGATGGCTCTGAGTTTGAGCTCTG	R	gagaCTTCCCTCATCCCCTCAAA	T	7159,7	C	7175,7		
rs7865082	ACGTTGGATGCTCTGGACTTTGGGTGAATC	ACGTTGGATGACCCCACAATAATCTGAGGC	R	TTGGGTGAATCTATTTTTTTTTT	G	7293,8	A	7373,7		
rs7165790	ACGTTGGATGAATGACATGAGATTAGAAC	ACGTTGGATGCAGTTAGTTACCCACAGTCC	R	TTAGAACATAAAGTTGTAGATCA	G	7341,8	A	7421,8		
rs7309	ACGTTGGATGGATCACAACATAAGTACCTC	ACGTTGGATGTTTTAAATAATATACATGGCT	R	ttcTTCATCATGTAGCTATACACA	G	7508,9	A	7588,8		
rs1799966	ACGTTGGATGATCAGTAGTATGAGCAGCAG	ACGTTGGATGCGTGTTGGCAACATACCATC	F	aaggAGTATGAGCAGCAGCTGGAC	C	7723,1	A	7747,1	T	7803,0
rs2298560	ACGTTGGATGGTGACGCTTTGCAAAATAG	ACGTTGGATGCTTTTCTGACTATAATTGAG	F	CGCTTTGCAAAATAGAATCAAATCT	A	7904,2	G	7920,2		
rs4873772	ACGTTGGATGGAAGTGGAGGCCATTTGTAG	ACGTTGGATGTCTCTTACCCCCACATCTCC	R	gggaAAATCTTGTAATGGAAGAGAG	G	8090,3	A	8170,2		
rs1051772	ACGTTGGATGGAGGCCACACATCTTTTTTC	ACGTTGGATGTCAAGCAGTACACGTTCTGG	R	TTGAATAAACTGAAACCAGATGACTC	T	8242,4	C	8258,4		
rs4986764	ACGTTGGATGTCTGGTGATAGATGACTTGC	ACGTTGGATGACAGGACAATGAGTCTACAC	F	gctgGCTGCTTCCAGTAAATAAGGTG	A	8297,4	G	8313,4		
rs4292454	ACGTTGGATGTAAATCAGTTAGTACATGC	ACGTTGGATGATATAACACTTACTTATCAC	R	cccaAGTTAGTACATGCAAATCATTTC	T	8473,6	C	8489,6		
rs13202921	ACGTTGGATGATAAGGGCCGAATAAATGGG	ACGTTGGATGAGGAGACTGAGACCTAGGAG	R	AATAAATGGGACCTGCC	T	5474,6	C	5490,6		
rs3760412	ACGTTGGATGCAAGCAGTCCTTCTATCTCG	ACGTTGGATGAAGAGTTAGGCTGAATGTGG	R	TGTTGGGGTTACAGGCG	G	5544,6	A	5624,5		
rs2868371	ACGTTGGATGAATCTGGTGTGGTTGTTAGG	ACGTTGGATGGCACAAGTTCATCTGCTTAG	R	GCCTGAATTCACATCTTT	G	5671,7	C	5711,8		
rs963248	ACGTTGGATGAATTAGCCCAGTACTGCCTC	ACGTTGGATGAGAGTGCATTTGTAGCAGGG	F	CTCAAACTTCTGGGTTCAG	C	6026,0	T	6105,9		
rs3735461	ACGTTGGATGTAGTTTTGTCTGCGTCCGTC	ACGTTGGATGTAGCCGTGCTTACGTAAGGG	F	CGTCACGTCTGAGTAAACT	A	6059,0	G	6075,0		
rs1998521	ACGTTGGATGCTTCCCTGCCCTACACATTT	ACGTTGGATGTGATCAAGAAAAATCAAGGC	R	GCCTTGAAGAAAAAGGATT	T	6156,1	C	6172,1		
rs917029	ACGTTGGATGAACTGAAAACCCCCCCCACTG	ACGTTGGATGCAAAGGCACAAAAAGGCCAG	R	CTGACCTTGGAAGAGGTGGG	G	6485,2	A	6565,1		
rs11571468	ACGTTGGATGTCCACTCTCTGAGTAAGGAC	ACGTTGGATGGGAATAGTGATACAGATGCC	F	CTCTGAGTAAGGACTACCTAC	C	6637,4	T	6717,3		
rs10514249	ACGTTGGATGGGATCACTTTCACCCCTATC	ACGTTGGATGAGGAGGAGTCCAGACTAAGC	F	GTTGGTATTAAGTACTTGTGGC	C	7058,6	T	7138,5		
rs11078671	ACGTTGGATGTCTGATGAAATCCTGAGGAC	ACGTTGGATGCAATGCAGTGTTGATCGTGG	R	AAACCTGCACCTGGTAAACTGCG	G	7264,8	T	7288,8		
rs7259857	ACGTTGGATGCCTGTGAACAGTTTTAATCC	ACGTTGGATGGAAATAAGCCAGTCAAAAAGG	F	gggGTTTTAATCCTATGTGGTAGA	C	7701,0	T	7780,9		
rs1776139	ACGTTGGATGCAGAAGTTACCACCATGAGG	ACGTTGGATGTCTTCCGCTCTCTGTAACTG	R	GAGGGAGAAAATATCAACACAGGAAA	G	8350,5	T	8374,5		
rs1800469	ACGTTGGATGTACAGGTGTCTGCCTCCTGA	ACGTTGGATGAAGAGGGTCTGTCAACATGG	R	TCCTGACCCTTCCATCC	G	5264,5	A	5344,4		
rs1822744	ACGTTGGATGAGCAGACCCAAACATGAACC	ACGTTGGATGGTACTTACTAGGACTCTAGG	F	GAACCTTTTCTGGGGTA	A	5487,6	G	5503,6		

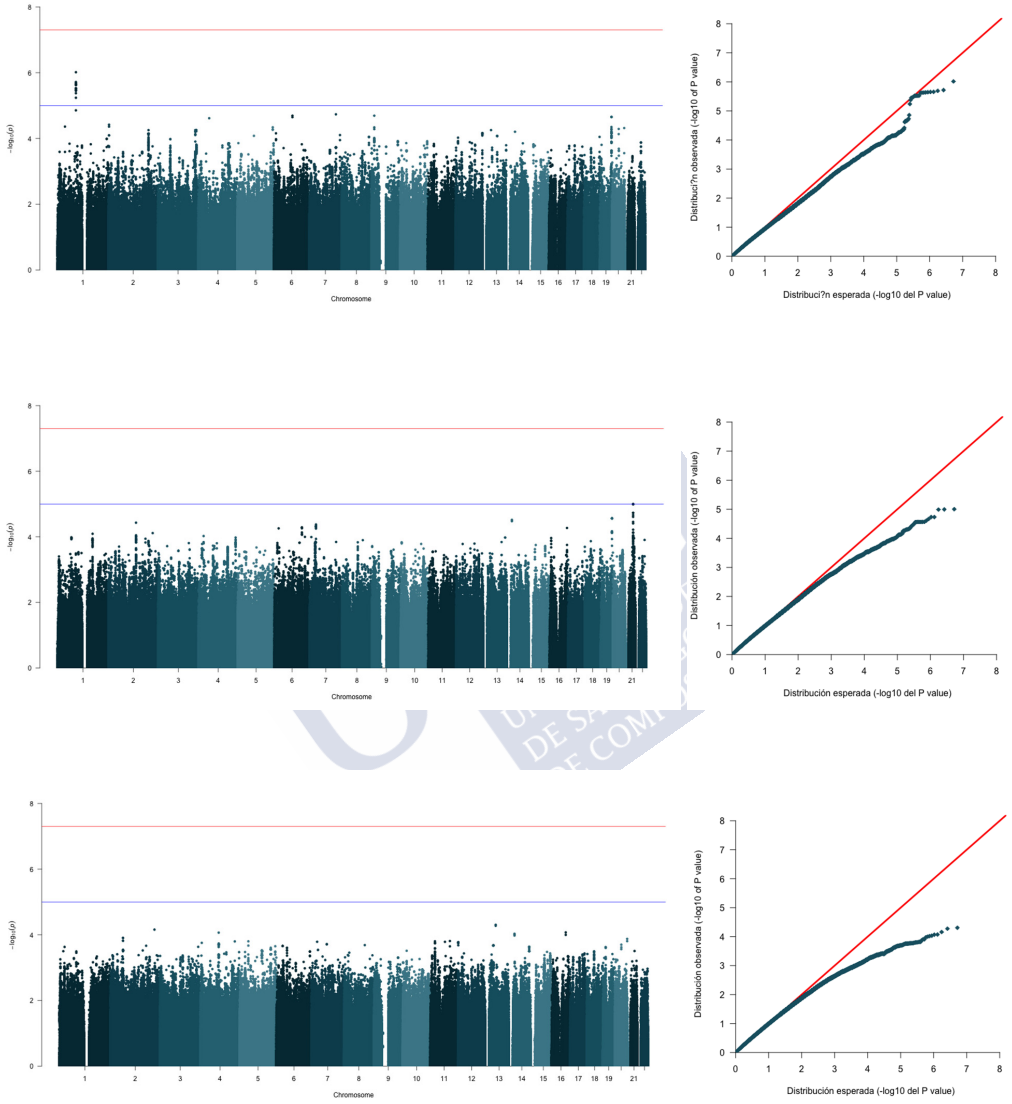
ANEXO 7. Variantes genéticas y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón identificado por GWAS en población europea

SNP-ID	Gen	Alelo de riesgo	OR	Referencias
rs8042374	*CHRNA3*	G	0,89	Hung (2008),[66] Wang (2008),[76]
rs3117582	*BAT3/APOM*	C	1,3	Landi (2009),[79] Wang (2008),[76]
rs31489	*CLPTM1L*	A	0,89	Landi (2009),[79]
rs4635969	*TERT/CLPTM1L*	T	0,88	Landi (2009),[79]
rs1996371	*CHRNB4*	C	1,21	McKay (2008),[77]
rs1056562	*MPZL3/AMICA1*	T	1,11	McKay (2017),[69]
rs11571833	*BRCA2*	T	1,6	McKay (2017),[69] Wang (2014),[81]
rs11591710	*OBFC1*	C	1,16	McKay (2017),[69]
rs116822326	*MHC*	G	1,25	McKay (2017),[69]
rs11780471	*CHRNA2*	A	0,87	McKay (2017),[69]
rs13080835	*TP63*	T	0,9	McKay (2017),[69]
rs17879961	*CHEK2*	G	0,41	McKay (2017),[69] Wang (2014),[81]
rs41309931	*RTEL1*	T	1,17	McKay (2017),[69]
rs4236709	*NRG1*	G	1,13	McKay (2017),[69]
rs55781567	*CHRNA5*	G	1,3	McKay (2017),[69]
rs56113850	*CYP2A6*	T	0,88	McKay (2017),[69]
rs66759488	*SEMA6D*	A	1,07	McKay (2017),[69]
rs6920364	*RNASET2*	C	1,07	McKay (2017),[69]
rs71658797	*FUBP1*	A	1,13	McKay (2017),[69]
rs7705526	*TERT*	A	1,25	McKay (2017),[69]
rs77468143	*SECISBP2L*	G	0,86	McKay (2017),[69]
rs7953330	*RAD52*	C	0,86	McKay (2017),[69]
rs885518	*CDNK2A*	G	1,17	McKay (2017),[69]
rs4324798	*TRNAA/UGC*	A	1,16	Landi (2009),[79]
rs1333040	*CDKN2B-AS1*	C	1,14	Timofeeva (2012),[80]

SNP-ID, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, *odds ratio*.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

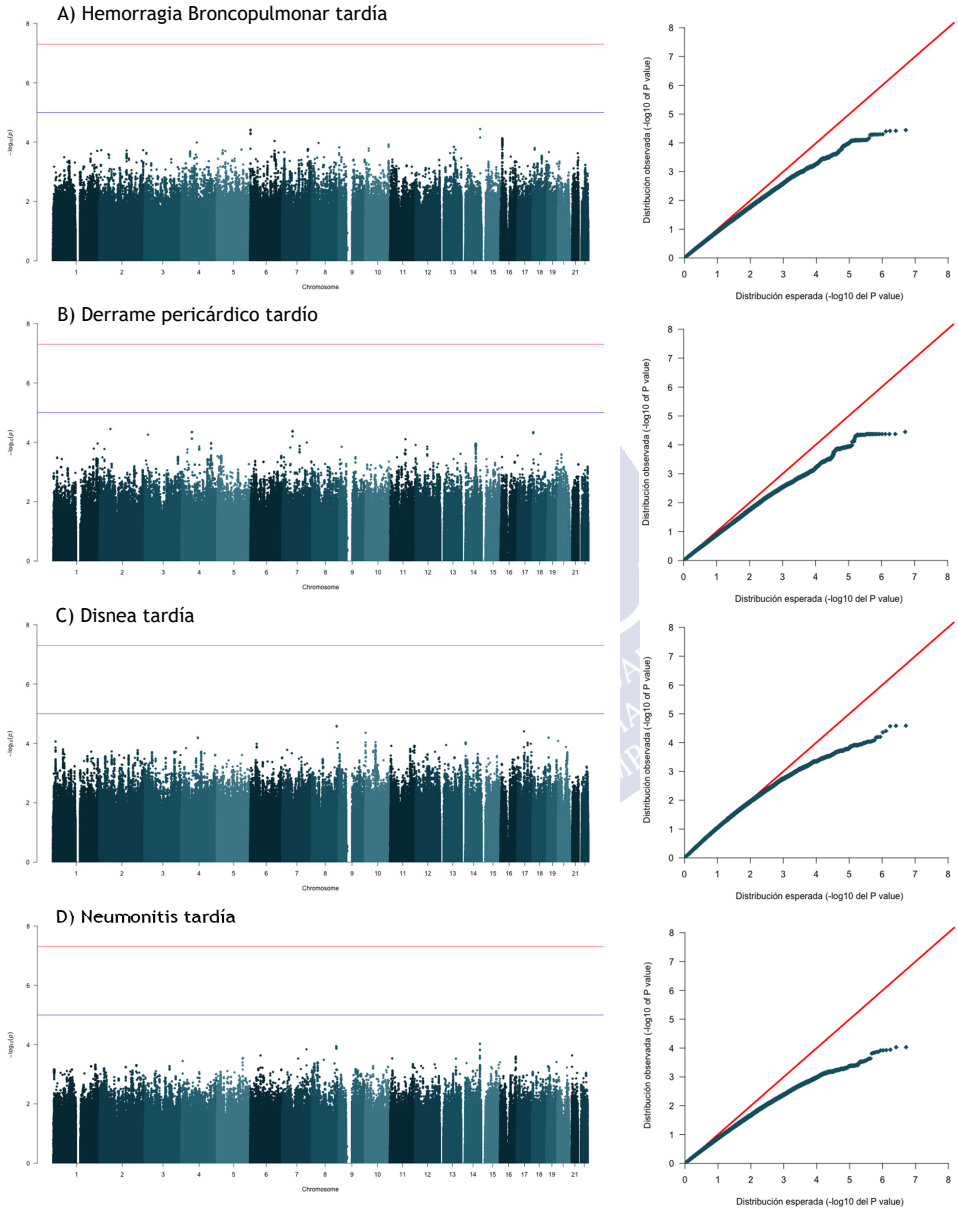
ANEXO 8. Visualización de resultados GWAS de toxicidades agudas individuales



Visualización de los resultados de GWAS de A) esofagitis aguda; B) tos aguda; y C) disnea aguda.
Los P valores obtenidos de los análisis se grafican mediante: Manhattan plot, en el eje de ordenadas se encuentra el logaritmo negativo (-log) del P valor de cada uno de los SNPs, en el eje de abscisas se encuentran las posiciones de los SNPs, cada tono representa a un cromosoma distinto, la línea azul señala el P valor 10^{-05}, la línea roja señala el P valor 10^{-08}; y Q-Q plot, en el eje de ordenadas se presenta la distribución observada de los P valores en -log; en el eje de abscisas, la distribución esperada de los P valores en -log, y la línea roja señala el ángulo de referencia a 45. El factor de inflación genómica *lambda* para esofagitis = 1,008; para tos = 1,074; y disnea = 1,04.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 9. Visualización de resultados GWAS de toxicidades tardías individuales



Visualización de los resultados de GWAS de A) hemorragia broncopulmonar tardía; B) derrame pericárdico tardío; C) disnea tardía; y D) neumonitis tardía.

Los P valores obtenidos de los análisis se grafican mediante: Manhattan plot, en el eje de ordenadas se encuentra el -log del P valor de cada uno de los SNPs, en el eje de abscisas se encuentran las posiciones de los SNPs, cada tono representa a un cromosoma distinto, la línea azul señala el P valor 10^{-05}, la línea roja señala el P valor 10^{-08}; y Q-Q plot, en el eje de ordenadas se presenta la distribución observada de los P valores en -log y en el eje de abscisas, la distribución esperada de los P valores en -log, la línea roja señala el ángulo de referencia a 45. El factor de inflación genómica *lambda* para hemorragia = 0,936; para derrame pericárdico = 0,872; disnea = 1,115; y neumonitis = 0,863

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 10. Publicación relacionada 1. "REQUITE_ A prospective multicentre cohort study of patients undergoing radiotherapy for breast, lung or prostate cancer"

Radiotherapy and Oncology 138 (2019) 59–67

Contents lists available at ScienceDirect

Radiotherapy and Oncology

journal homepage: www.thegreenjournal.com

Original Article

REQUITE: A prospective multicentre cohort study of patients undergoing radiotherapy for breast, lung or prostate cancer

Petra Seibold [a,1,*], Adam Webb [b,1], Miguel E. Aguado-Barrera [c,d], David Azria [e], Celine Bourgier [e], Muriel Brengues [f], Erik Briers [g], Renée Bultijnck [h], Patricia Calvo-Crespo [i], Ana Carballo [i], Ananya Choudhury [j], Alessandro Cicchetti [k], Johannes Claßen [l], Elena Delmastro [m], Alison M. Dunning [n], Rebecca M. Elliott [j], Laura Fachal [n], Marie-Pierre Farcy-Jacquet [o], Pietro Gabriele [m], Elisabetta Garibaldi [m], Antonio Gómez-Caamaño [d,i], Sara Gutiérrez-Enríquez [p], Daniel S. Higginson [q], Kerstie Johnson [r], Ramón Lobato-Busto [s], Meritxell Mollà [t,2], Anusha Müller [a], Debbie Payne [u], Paula Peleteiro [i], Giselle Post [h], Tiziana Rancati [k], Tim Rattay [r], Victoria Reyes [t], Barry S. Rosenstein [v], Dirk De Ruysscher [w,x], Maria Carmen De Santis [y], Jörg Schäfer [z], Thomas Schnabel [aa], Elena Sperk [ab], R. Paul Symonds [r], Hilary Stobart [ac], Begoña Taboada-Valladares [i], Christopher J. Talbot [r], Riccardo Valdagni [k,y,ad], Ana Vega [c,d,ae], Liv Veldeman [h,af], Tim Ward [ag], Christian Weißenberger [ah], Catharine M.L. West [j,3], Jenny Chang-Claude [a,ai,3], REQUITE consortium [4]

[a] *Division of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany;* [b] *Department of Genetics and Genome Biology, University of Leicester, UK;* [c] *Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Grupo de Medicina Xenómica (USC), Santiago de Compostela;* [d] *Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Spain;* [e] *Department of Radiation Oncology, Montpellier Cancer Institute, Université Montpellier, Inserm U1194;* [f] *Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier Cancer Institute, Inserm U1194, France;* [g] *Patient advocat, Hasselt, Belgium;* [h] *Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Belgium;* [i] *Department of Radiation Oncology, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago, SERGAS, Santiago de Compostela, Spain;* [j] *Translational Radiobiology Group, Division of Cancer Sciences, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Christie Hospital, UK;* [k] *Prostate Cancer Program, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy;* [l] *Klinik für Strahlentherapie, Radiologische Onkologie und Palliativmedizin, ViDia Christliche Kliniken Karlsruhe, Germany;* [m] *Department of Radiation Oncology, Candiolo Cancer Institute – FPO, IRCCS, TO, Italy;* [n] *Centre for Cancer Genetic Epidemiology, Department of Oncology, University of Cambridge, Strangeways Research Labs, UK;* [o] *Department of Radiation Oncology, CHU Nîmes, France;* [p] *Oncogenetics Group, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Barcelona, Spain;* [q] *Department of Radiation Oncology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA;* [r] *Leicester Cancer Research Centre, University of Leicester, UK;* [s] *Department of Medical Physics, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago, SERGAS, Santiago de Compostela;* [t] *Radiation Oncology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain;* [u] *Centre for Integrated Genomic Medical Research (CIGMR), University of Manchester, UK;* [v] *Department of Radiation Oncology, Department of Genetics and Genomic Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA;* [w] *Maastricht University Medical Center, Department of Radiation Oncology (Maastro Clinic), GROW School for Oncology and Developmental Biology, Maastricht, the Netherlands;* [x] *KU Leuven, Radiation Oncology, Leuven, Belgium;* [y] *Department of Radiation Oncology 1, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy;* [z] *Strahlentherapie Speyer;* [aa] *Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, Klinikum der Stadt Ludwigshafen gGmbH;* [ab] *Department of Radiation Oncology, Universitätsklinikum Mannheim, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany;* [ac] *Independent Cancer Patients' Voice, UK;* [ad] *Department of Oncology and Haematology-Oncology, University of Milan, Italy;* [ae] *Biomedical Network on Rare Diseases (CIBERER), Spain;* [af] *Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital, Belgium;* [ag] *Trustee Pelvic Radiation Disease Association, NCRI CTRad Consumer, UK;* [ah] *Zentrum für Strahlentherapie Freiburg; and* [ai] *University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany*

Abbreviations: B, breast cancer patients; BCCT.core, Breast Cancer Conservation Treatment.cosmetic results; BMI, body mass index; BR23, breast module of EORTC QLQ; CTCAE, common terminology criteria for adverse effects; DICOM, Digital Imaging and Communications in Medicine; DVH, dose–volume histogram; EBRT, External beam radiotherapy; EORTC, European Organisation for Research and Treatment of Cancer; GI, gastrointestinal; GPAQ, Global Physical Activity Questionnaire; GTV, gross tumour volume; GU, genito-urinary; HDR, high dose rate brachytherapy; IMRT, intensity modulated radiotherapy; L, lung cancer patients; LDR, low dose rate brachytherapy; LiH, Lithium Heparin; MD, medical doctor; MFI, Multidimensional Fatigue Inventory; QoL, quality-of-life; P, prostate cancer patients; PSA, prostate specific antigen; RILA, radiation-induced lymphocyte assay; RR, relative risk; RT, radiotherapy; SNP, single nucleotide polymorphism; TURP, transurethral resection of the prostate; VMAT, Volumetric Arc Therapy.

* Corresponding author at: German Cancer Research Center (DKFZ), Division of Cancer Epidemiology, Im Neuenheimer Feld 581, 69120 Heidelberg, Germany.
E-mail address: p.seibold@dkfz-heidelberg.de (P. Seibold).

[1] Contributed equally.

[2] Present address: Radiation Oncology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Spain.

[3] Shared senior authorship.

[4] Collaborating authors listed at the end of this Section (REQUITE consortium members).

https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.04.034
0167-8140/© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 November 2018
Received in revised form 25 April 2019
Accepted 29 April 2019
Available online 27 May 2019

Keywords:
Late radiotherapy side effects
Biomarkers
Prediction models
Breast cancer
Prostate cancer
Lung cancer

ABSTRACT

Purpose: REQUITE aimed to establish a resource for multi-national validation of models and biomarkers that predict risk of late toxicity following radiotherapy. The purpose of this article is to provide summary descriptive data.

Methods: An international, prospective cohort study recruited cancer patients in 26 hospitals in eight countries between April 2014 and March 2017. Target recruitment was 5300 patients. Eligible patients had breast, prostate or lung cancer and planned potentially curable radiotherapy. Radiotherapy was prescribed according to local regimens, but centres used standardised data collection forms. Pre-treatment blood samples were collected. Patients were followed for a minimum of 12 (lung) or 24 (breast/prostate) months and summary descriptive statistics were generated.

Results: The study recruited 2069 breast (99% of target), 1808 prostate (86%) and 561 lung (51%) cancer patients. The centralised, accessible database includes: physician- (47,025 forms) and patient- (54,901) reported outcomes; 11,563 breast photos; 17,107 DICOMs and 12,684 DVHs. Imputed genotype data are available for 4223 patients with European ancestry (1948 breast, 1728 prostate, 547 lung). Radiation-induced lymphocyte apoptosis (RILA) assay data are available for 1319 patients. DNA (n = 4409) and PAXgene tubes (n = 3039) are stored in the centralised biobank. Example prevalences of 2-year (1-year for lung) grade $\geq$2 CTCAE toxicities are 13% atrophy (breast), 3% rectal bleeding (prostate) and 27% dyspnoea (lung).

Conclusion: The comprehensive centralised database and linked biobank is a valuable resource for the radiotherapy community for validating predictive models and biomarkers.

Patient summary: Up to half of cancer patients undergo radiation therapy and irradiation of surrounding healthy tissue is unavoidable. Damage to healthy tissue can affect short- and long-term quality-of-life. Not all patients are equally sensitive to radiation "damage" but it is not possible at the moment to identify those who are. REQUITE was established with the aim of trying to understand more about how we could predict radiation sensitivity. The purpose of this paper is to provide an overview and summary of the data and material available.

In the REQUITE study 4400 breast, prostate and lung cancer patients filled out questionnaires and donated blood. A large amount of data was collected in the same way. With all these data and samples a database and biobank were created that showed it is possible to collect this kind of information in a standardised way across countries.

In the future, our database and linked biobank will be a resource for research and validation of clinical predictors and models of radiation sensitivity. REQUITE will also enable a better understanding of how many people suffer with radiotherapy toxicity.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. Radiotherapy and Oncology 138 (2019) 59–67 This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Up to half of cancer patients undergo radiotherapy [1] and irradiation of surrounding healthy tissue is unavoidable. Patients vary in sensitivity to ionising radiation with 5–10% suffering from severe long-term effects that impact on their health-related quality-of-life [2,3] and limit the potentially curative doses prescribed to the majority.

The ability to predict those patients likely to develop adverse effects could potentially enable individualised treatments, which could decrease morbidity and/or increase survival. Models including clinical/treatment data and biomarkers have been developed to try identifying radiosensitive patients, e.g. [4–6]. However, the developed models and biomarkers have failed to progress to routine clinical use due to the lack of thorough independent validation. The ability to validate findings has been hampered by the lack of cohorts available. Cohorts are often small and heterogeneous [7–10]. Use of different toxicity scoring systems and the lack of standardised data collection reduces the ability to pool data [11], which is essential for collaborative research exemplified by Radiogenomics Consortium studies [12–19].

REQUITE (validating pREdictive models and biomarkers of radiotherapy toxicity to reduce side effects and improve QUalITy of lifE in cancer survivors) was established with the aim of validating models and biomarkers that predict a cancer patient's risk of adverse effects following radiotherapy [20]. In order to address previous limitations in pooling data and validating models and biomarkers, REQUITE carried out an international, multi-centre, prospective observational study. To reflect the real-life situation required for application of predictive models, there was no stipulation of the radiotherapy regimens to be delivered. However, all centres collected the same data housed in a central easily accessible database: demographics, previous and present co-morbidity, treatment and dosimetric information, longitudinal standardised radiotherapy toxicity (health professional and patient reported), and quality-of-life. A centralised biobank was established to store blood samples (extracted DNA, PAXgene tubes). Genome-wide genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was carried out and the data added to the centralised database. A radiation-induced lymphocyte apoptosis (RILA) assay was carried out on a sub-set of patients.

The comprehensive centralised database and linked biobank will be a resource for the prospective evaluation and validation of clinical predictors and models. REQUITE will also enable a better understanding of the scale of radiotherapy toxicity in a multi-national setting. As REQUITE is a resource for dissemination and exploitation to the radiotherapy community, the purpose of this paper is to provide a comprehensive overview and summary of the data and material available.

Study design and methods

Study design and recruitment

A multi-centre, prospective observational cohort study was designed to recruit 5300 patients with breast, lung or prostate cancer undergoing radiotherapy with curative intent. The study aim was validating predictive models and biomarkers of radiotherapy

toxicity. Eligible patients were identified in the multi-disciplinary meetings and out-patient clinics of 26 hospitals (Supplementary Table S1) in eight countries (Belgium, France, Germany, Italy, the Netherlands, Spain, UK, the USA). Adult breast and prostate cancer patients were recruited prior to radiotherapy between 04/2014 and 10/2016 and lung cancer patients until 03/2017 (Supplementary Table S2 with inclusion and exclusion criteria). Conventional and hypofractionated radiotherapy was prescribed according to local standard-of-care regimens. The patients were followed prospectively for a minimum of 12 (lung) or 24 (breast and prostate) months, with longer follow-up encouraged where possible. The primary study endpoints were change in breast appearance (breast cancer patients), rectal bleeding (prostate) at 24 months and dyspnoea/breathlessness at 12 months (lung). Toxicity evaluation beyond these time points was encouraged. Primary and secondary endpoints are summarised in Supplementary Table S3. All patients gave written informed consent. The study was approved by local ethics committees and is registered at www.controlled-trials.com ISRCTN98496463.

Data and sample collection

Patients were recruited prior to radiotherapy (baseline) and followed as previously described (Fig. 1). The following standardised data were collected prospectively by case report forms (CRFs): demographics, co-morbidity, treatment (with comprehensive information on radiotherapy regimens and dose to organs at risk), physics, longitudinal standardised radiotherapy toxicity (CTCAE v4.0 healthcare professional and patient reported), quality-of-life, and treatment outcome (including physician reported death). Both acute (at end of radiotherapy or at 3 months) and late toxicity data at 12 and 24 months are available for all three cancer types. Patient reported outcome (PRO) data collected were: quality-of-life including fatigue (EORTC QLQ C30 [21]; BR23 [22]; MFI [23] and physical activity (GPAQ [24])). CTCAE v4.0 based questionnaires developed to collect PRO data were adapted from those published elsewhere for the male pelvis [25] and lung [26]. The patient questionnaires were translated into local languages by two native speakers, merged, back translated by native English speakers, and validated for usability in ten patients per country.

DICOM and DVH files were collected for central storage using a standardised operating procedure (SOP). For the breast cancer patients, breast photos were taken using a SOP before radiotherapy and at the 24-month time point, and scored using BCCT.core software [27] according to a SOP, with 5% of photographs re-scored for quality assurance. A SOP was also produced for collecting blood samples. All patients donated at least two blood samples prior to

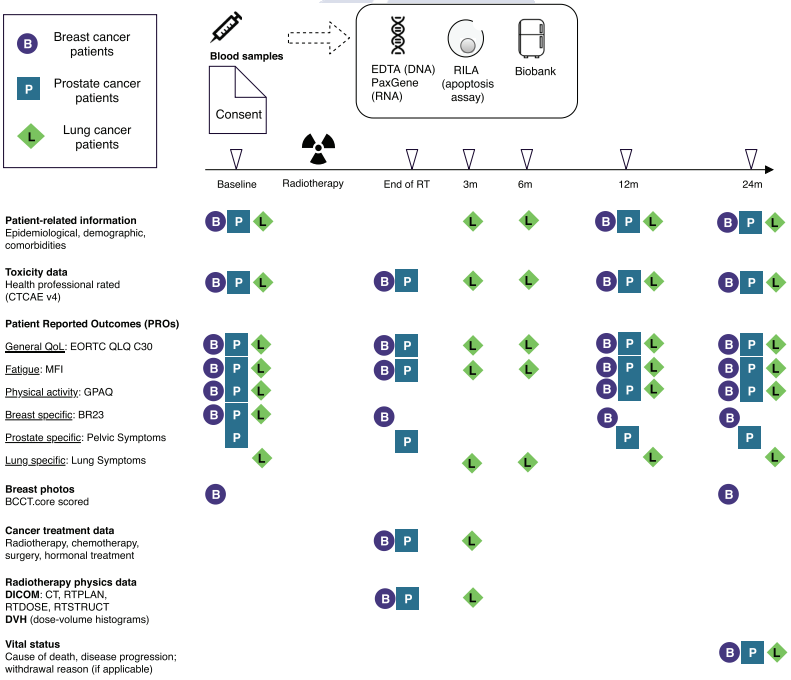


Fig. 1. Study Schema. Breast (B), prostate (P) and lung (L) cancer patients were recruited prior to radiotherapy and blood samples taken pre-radiotherapy (baseline). Toxicity was assessed prospectively by healthcare professionals (CTCAE v4.0, common terminology criteria for adverse effects) and patients (patient reported outcomes, PRO) at the end of radiotherapy (B, P), 3 and 6 months (L), 12 months and 24 months. Data collected included comprehensive cancer treatment data including radiotherapy physics data (DICOMs: Digital Imaging and Communications in Medicine, DVHs: dose–volume histograms), comorbid and other patient-related information. Quality-of-life (QoL) was assessed using the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) QLQ C30 and the breast specific module BR23 (breast cancer patients only), the Multidimensional Fatigue Inventory (MFI) and the Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ). For breast cancer patients, photos of the breasts were taken at baseline and 24 months. BCCT.core: (Breast Cancer Conservation Treatment.cosmetic results).

the start of radiotherapy: an EDTA sample for SNP genotyping plus a PAXgene (RNA) and/or a Lithium Heparin (LiH) sample. Blood samples were dispatched according to a SOP under temperature-controlled conditions to the CIGMR Biobank in Manchester, UK, where extracted DNA from blood and PAXgene samples for future RNA analysis are stored. A subset of patients from France, Germany and the UK gave LiH blood samples for prospective radiation-induced lymphocyte apoptosis (RILA) assays using an established method [7] and standardization across laboratories [28]. Genotyping data were generated using the Illumina Infinium OncoArray-500K beadchip. Following standard quality control procedures [29], genotype data were imputed using the 1000 Genomes Project (version 3) as a reference panel. The REQUITE CRFs, questionnaires and SOPs are available on request via www.requite.eu.

Data management and quality control

Each patient was assigned a unique study identifier, which links sample, health and genetic data. The ID includes a check digit to minimise errors. Data were uploaded by each recruitment site to a secure, online centralised database system (OpenClinica (https://openclinica.com), LimeSurvey (https://limesurvey.org) and a bespoke 'Manager' application based on Drupal 7 (https://drupal.org)) with personal logins. Quality assurance and control procedures involved site initiation visits prior to the start of the study, monitoring visits during the study, transcribing error checks, source data verification and plausibility checks including a query system. Blood and DNA samples were 2D labelled. The study is overseen by a Steering Committee that includes a Patient Advisory Board.

Analytical considerations and statistical analysis

It was initially estimated that 2-year toxicity data would be available for 75% of enroled patients, i.e. 1575 of the original target of 2100 breast or prostate cancer patients. Based on effect sizes observed for genetic associations with radiation toxicity (e.g. [17]), a power calculation for the genetic assay showed that 1575 breast or prostate cancer patients has 80% power to detect a relative risk (RR) of >1.56 for grade ≥2 toxicity ($\alpha = 5 \times 10^{-5}$ for 1000 SNPs, allele frequency = 0.25, toxicity rate = 20%). For 825 patients with lung cancer the detectable RR would be 1.78. A Kruskal–Wallis test was used for comparisons between the three cancer types using SAS 9.4. Graphs were generated using R 3.5.1, ggplot 3.0.0 or SAS 9.4.

Results

Cohort characteristics

Within the time-period available, 4438 patients were enroled: 2069 breast (99% of the original target), 1808 prostate (86%) and 561 lung (51%) cancer patients. Comprehensive cancer treatment data were available for 2057 breast, 1760 prostate and 530 lung cancer patients. The baseline characteristics and treatment information are summarised for each cancer type in Tables 1–3. Patients were aged between 23 and 91 years. The breast cancer patients were younger (median 58 years) at enrolment than the prostate (70 years) and lung (69 years) cancer patients. Most patients (>94%) identified as being of European ancestry (data not shown). As expected, there were significantly more lung cancer patients who were current smokers at the time of diagnosis (43%) compared with breast (18%) and prostate (14%) patients ($p < 0.001$). Patients with lung (17%) and prostate (13%) cancer were also more likely than breast patients (6%) to have diabetes ($p = 0.049$).

The age distribution did not vary substantially by country, but per-centre analyses highlight some heterogeneity in patients and treatments across centres/countries that might pose a challenge when attempting to validate predictive models and biomarkers. For example, cancer patients tended to have a higher BMI in Spain and the UK than in the other countries (Supplementary Fig. S1a), and the proportion of *in situ* breast tumours ranged from <10% (Italy, Spain, UK) to 25% in the US centre. About one third of the breast cancer patients received adjuvant or neoadjuvant chemotherapy, with rates varying from ~20% (France, UK, US) to >40% (Italy, Spain). Half of the breast cancer patients were treated with intensity-modulated radiotherapy (IMRT), with a lower proportion in France and no IMRT in Italy and the US. Breast cancer patients who received IMRT ranged from <20% (France, Italy, Spain, US) to >80% (Belgium, UK). Most patients received an additional boost (68%), with lower proportions in the US (40%) and UK (10%). Hypofractionation rates were highest in Belgium and UK.

For the prostate cancer patients, 27% had a prostatectomy prior to radiotherapy (Table 2). As patients with and without previous prostatectomy differ, their characteristics are reported separately. Post-prostatectomy patients were younger, reported fewer comorbidities (e.g. hypertension: $p < 0.001$), had a higher risk class and received lower radiotherapy doses than those who underwent radical radiotherapy. The proportion of patients having a prostatectomy prior to radiotherapy varied from 7% in the UK to 55% in Belgium (Supplementary Fig. S1b). In terms of their treatment, most prostate cancer patients received 74–81 Gy with 1.8–2.0 Gy per fraction (68% of the radically irradiated patients) or 66–72 Gy with 1.8–2.0 Gy per fraction (66% of the post-prostatectomy patients). About one third of the radically treated patients and 10% of the post-prostatectomy patients received hypofractionation regimens. Most patients received Rapid arc/VMAT radiotherapy, except in Spain where 3D-conformal radiotherapy and brachytherapy were used (Supplementary Fig. S1c). In the US centre, about half of patients underwent brachytherapy. The proportion receiving hormone treatment varied from 13% (Germany) to about 80% (Belgium, UK). About 26% of the patients received hypofractionation with highest rates in Belgium, the Netherlands and UK (Supplementary Fig. S1d).

For the lung cancer patients (Table 3), 9% had surgery prior to radiotherapy with the highest proportion in Spain (19%, Supplementary Fig. S1e). About half of the patients received chemotherapy, mostly applied concurrently. Radiotherapy techniques varied widely across countries with the highest IMRT rates in Belgium and the US (Supplementary Fig. S1f). Most French patients were treated with stereotactic radiotherapy. Tomotherapy was only used at the Italian site. Moderate hypofractionation rates were highest in Belgium, Italy, the Netherlands and UK (Supplementary Fig. S1g).

Baseline levels of toxicity and quality-of-life scores

The pre-radiotherapy baseline level of adverse effects for both healthcare professional rated CTCAE v4.0 scoring as well as patient reported outcomes are presented in Supplementary Figs. S2a–2d by cancer type. They highlight that across all cancers and toxicities healthcare professional graded scores are lower than patients' grades, in particular for breast pain, certain genitourinary prostate symptoms and lung toxicities. Healthcare professional rated baseline toxicity data were available for >99.8% of the patients with radiotherapy data: 2056 breast, 1758 prostate and 529 lung. PROs were filled in by 2000 breast (97.2%), 1681 prostate (95.5%) and 462 lung (87.2%) cancer patients. In general, adverse effects grade ≥2 evaluated by a physician were low at baseline (particularly for gastrointestinal related toxicities in prostate cancer patients) and

Table 1
Baseline characteristics of the REQUITE breast cancer patients.

Characteristics		Breast cancer patients ($N = 2057$)
Age at enrolment	Median (range), years	58 years (23–90)
BMI	Mean (standard deviation), kg/m^2	26.5 kg/m^2 (±5.6)
Smoking status at diagnosis	Current	365 (18%)
	Former	514 (25%)
	Never	1156 (56%)
Selected comorbidities	Diabetes, antidiabetics	127 (6%)
	Heart disease	143 (7%)
	Delayed healing >3 weeks post-surgery	52 (3%)
	Post-operative haematoma	260 (13%)
	Post-operative oedema	145 (7%)
	Post-operative infection	91 (4%)
Family history of breast cancer	First degree relatives	410 (20%)
Tumour size (pre-radiotherapy)	*in situ*	252 (12%)
	T1-T2	1728 (84%)
	T3, T4	16 (<1%)
Nodal status (pre-radiotherapy)	Negative	1488 (72%)
	Positive	394 (19%)
Tumour histology	Infiltrating ductal	1318 (64%)
	Other (including lobular, in situ, mixed)	739 (36%)
Oestrogen receptor positive		1667 (81%)
HER2 positive		1581 (10%)
Additional cancer treatment	Chemotherapy	638 (31%)
	Tamoxifen, aromatase inhibitors	1574 (77%)
	Anti-HER2, targeted therapy	170 (8%)
Radiotherapy	IMRT	1018 (49%)
Patients without boost*		662 (32%)
	50–56 Gy/≤ 2.0 Gy*2	203 (31%)
	39.9–45 Gy/2.5–3.2 Gy	452 (68%)
	28.5–32.5 Gy/5.7–6.5 Gy	7 (1%)
Patients with simultaneous boost**		257 (12%)
	50–52 Gy/≤ 2.0 Gy + 6–15.6 Gy/0.2–0.5 Gy (partly plus 2 Gy)*3	179 (70%)
	40.05 Gy/2.67 Gy + 6.75–10.95 Gy/0.45–0.73 Gy	35 (14%)
	28.5 Gy/5.7 Gy + 4–6 Gy/0.8–1.2 Gy	43 (17%)
Patients with sequential boost**		1138 (55%)
	50 Gy/≤2.0 Gy + 9–20 Gy/2–3 Gy*4	641 (56%)
	39.6–49.5 Gy/2.25–3.6 Gy + 10–16 Gy/2.0–3.99)*5	380 (33%)
Brachytherapy boost**		117 (10%)
	50.0 Gy/2.0 Gy + 8.5–10 Gy/8.5–10 Gy	40 (34%)
	39.9–42.56/2.66 Gy + 8.5–10 Gy/5–10 Gy	77 (66%)

BMI: Body mass index. IMRT: Intensity modulated radiation therapy.
*RT regimens: Total whole breast irradiation dose (WBI)/fraction dose.
**RT regimens: Total whole breast irradiation (WBI)/fraction dose + total boost dose/fraction dose.
*2Including 6 patients with WBI dose <50 Gy.
*3Including 24 patients with 4 Gy or 10 Gy from sequential boost in 2 Gy fractions; 1 patient with WBI dose <50 Gy.
*4Including 24 patients with WBI dose <50 Gy; 3 patients with boost dose <9 Gy or boost fraction dose >3 Gy.
*5Including 4 patients with boost dose <10 Gy; 2 patients with boost dose 18.6 Gy.
BMI: Body mass index. IMRT: intensity-modulated radiotherapy. WBI: Whole breast irradiation dose. Numbers might not add up due to missing data.

usually <10%. Notable exceptions were the high frequencies of sexual dysfunctions among prostate cancer patients (e.g. 27% erectile dysfunction) and dyspnoea in lung cancer patients (23%).

A total of 2000 breast (97.2%), 1665 prostate (94.6%) and 457 lung cancer patients (86.2%) filled in the EORTC QLQ C30 quality-of-life baseline questionnaire (Supplementary Table S4, transformed into a scale of 0–100). Supplementary Table S5 shows the differences in baseline toxicities and quality-of-life data by country.

Summary of data available

Supplementary Table S6 provides an overview of the REQUITE resource and summarises the comprehensive data and samples available at the end of the funding period (October 2018). More than 45,000 physician and over 50,000 patient forms (including quality-of-life, fatigue and physical activity) were collected. Breast photos at baseline and 24-month of over 1500 breast cancer patients were scored to assess changes in breast appearance. More than 17,000 DVHs and 12,000 DICOMs for organs at risk were uploaded. Imputed genotype data are available for >4200 REQUITE patients with European ancestry (55.2 billion genotypes). About 1300 patients also have data on the radiation-induced lymphocyte assay. A PAXgene tube was collected from >3000 patients for future RNA analysis.

As of October 2018, follow-up CTCAE v4.0 toxicity data are available for about 1700 breast (82% of recruited patients) and 1430 prostate (79%) at 24 months and for 330 lung cancer patients (59%) at 12 months. For breast, common toxicity rates with grade ≥2 at 2 years were ~5–13%, for prostate below 5% for GI toxicities, ~3–8% for GU toxicities and ~20–31% for sexual problems. Common lung toxicity rates at one year were ~4–7% and dyspnoea rates at 27%.

Discussion

REQUITE is one of the largest radiotherapy patient cohorts with standardised longitudinal data and sample collection from multiple hospitals and countries. To overcome issues of heterogeneity encountered in previous cohorts, considerable efforts were made to ensure standardisation of data collection, which include quality assurance and quality control measures. It is hoped that other studies will use the CRFs and multi-lingual CTCAE v4.0 PRO questionnaires to further improve data collection and our ability to validate models and biomarkers of radiosensitivity [20]. Although established as a resource to validate predictive models, we anticipate its use also in discovery science, e.g., in contributing data to radiogenomics studies identifying common genetic variants associated with risk of radiotherapy toxicities [13].

Table 2
Baseline characteristics of the REQUITE prostate cancer patients.

Characteristics	Radical radiotherapy (*N* = 1277)	Post-prostatectomy patients (*N* = 483)[#]
Age at enrolment (median, range)	71 years (42–88)	66 years (46–85)
BMI (mean, standard deviation)	27.7 kg/m² (±4.5)	27.3 kg/m² (±3.6)
Smoking status at diagnosis		
Current	165 (13%)	84 (17%)
Former	600 (47%)	221 (46%)
Never	508 (40%)	175 (36%)
Selected comorbidities + pre-radiotherapy surgery		
Diabetes, antidiabetics	185 (14%)	51 (11%)
Hypertension, hypertensive medication	750 (59%)	237 (49%)
Use of statins, cholesterol lowering drugs	486 (38%)	163 (34%)
History of heart disease	289 (23%)	83 (17%)
Previous abdominal surgery	675 (53%)	175 (36%)
TURP	104 (8%)	10 (2%)
Family history of prostate cancer (1st degree)	220 (17%)	100 (21%)
Tumour size (pre-radiotherapy)[*]		
T1	377 (30%)	–
T2	554 (43%)	202 (42%)
T3, T4	220 (16%)	247 (51%)
Nodal status (pre-radiotherapy)[*]		
Negative	1093 (86%)	215 (45%)
Positive	59 (5%)	75 (16%)
Gleason's score		
Gleason < 7	244 (19%)	70 (14%)
Gleason 7	709 (56%)	296 (61%)
Gleason 8–10	320 (25%)	119 (24%)
Pre-diagnostic biopsy PSA (median, range)	9.6 ng/ml (0.35–300)	8.0 ng/ml (0.1–270)
≤10 ng/ml	681 (53%)	283 (59%)
10–20 ng/ml	337 (26%)	94 (19%)
>20 ng/ml	246 (19%)	53 (11%)
Risk class (National Comprehensive Cancer Network version1.2018)		
Low (T1-T2a + Gleason ≤ 6 + PSA < 10 ng/ml)	110 (9%)	(<1%)
Intermediate (favourable plus unfavourable) (T2b-T2c OR Gleason = 7 OR PSA 10–20)	618 (48%)	180 (37%)
High plus very high (T3-T4 OR Gleason 8–10 OR PSA > 20 ng/ml)	543 (44%)	287 (59%)
Hormonal treatment		
None	291 (23%)	248 (51%)
Yes	986 (77%)	235 (49%)
Radiotherapy		
EBRT		
3D conformal radiotherapy	187 (16%)	101 (21%)
IMRT	145 (12%)	87 (18%)
VMAT	866 (72%)	295 (61%)
Pelvic radiotherapy	363 (28%)	161 (33%)
Total EBRT dose (Gy), without brachytherapy	54.4–81.0 Gy	51.2–77.0 Gy
EBRT regimens without brachytherapy (*N* = 1578, 90%)		
1.6 Gy fraction dose; 59.2 Gy total dose	2 (<1%)	–
1.8–2.0 Gy fraction dose; 66–72 Gy total dose	10 (<1%)	317 (66%)
1.8–2.0 Gy fraction dose; 74–81 Gy total dose	745 (68%)	116 (24%)
2.1–2.5 Gy fraction dose; 63–77 Gy total dose	106 (10%)	20 (4%)
>2.5–3.4 Gy fraction dose; 51.2–69.25 Gy total dose	231 (21%)	30 (6%)
EBRT regimens with brachytherapy (*N* = 103, 6%)		
1.8–2.0 Gy fraction dose; 45–50.4 Gy[§]	24 (23%)	–
2.45–2.54 Gy fraction dose; 36.8–38.1 Gy	79 (77%)	–
Brachytherapy	182 (14%)	–
Brachytherapy alone	79 (43%)	–
HDR	8 (10%)	–
LDR	71 (90%)	–
HDR dose (Iridium; median, range)	19 Gy (19–25)	–
LDR dose (mostly iodine; median, range)	145 Gy (124–160)	–
Brachytherapy + EBRT	103 (57%)	–
HDR	84 (82%)	–
LDR	19 (18%)	–
HDR dose (Iridium, Cobalt-60; median, range)	15 Gy (13–21)	–
LDR dose (mostly palladium; median, range)	100 Gy (85–108)	–

BMI: Body mass index. EBRT: External beam radiation therapy. HDR: High dose rate. IMRT: Intensity-modulated radiation therapy. LDR: Low dose rate. PSA: Prostate specific antigen. TURP: transurethral resection of the prostate. VMAT: Volumetric Arc Therapy.
[#]salvage (prostatectomy ≥12 months prior to RT) 56% and adjuvant (prostatectomy <12 months prior to RT) 44%. [*]Clinical T/N stages for radical radiotherapy patients and pathological T/N stages for post-prostatectomy patients. [§]Including 1 patient with incomplete dosage. Data might not add up to 100% due to missing data.

We successfully showed that it is possible to collect standardised clinical data prospectively from multiple hospitals across countries, given adequate funding to perform the labour intensive work. The actual accrual of 84% of target (4438 versus 5300) was reduced due to some centres being slow to open and the constraints due to funding limited the possibility of extending the recruitment period. There was a high return rate for questionnaires, e.g. 76% for 24 months PRO data and 81% healthcare professional reported toxicity in prostate cancer patients. In comparison single centre studies in prostate cancer patients carried out up to two years following radiotherapy reported overall questionnaire completion rates of 50% [30], 85% in ProtecT [31], and 69% in CHHiP [32]. The REQUITE study also aimed at a low level of missing data, e.g. only 2% of the 1665 prostate cancer patients with EORTC C30 forms had ≥10% missing quality-of-life items at baseline. In a review of randomised control trials on the extent of missing quality-of-life data, 36% of the studies had >10% missing items and for 21% the level of missing data was unclear [33].

The REQUITE baseline toxicity rates and quality-of-life scores were comparable with other studies. For example, 27% of the prostate cancer patients recruited reported grade ≥2 erectile dysfunction at baseline compared with 32% in the radiotherapy group of

Table 3
Baseline characteristics of the REQUITE lung cancer patients.

Characteristics		Lung cancer patients ($N = 530$)
Sex	Female	158 (30%)
	Male	370 (70%)
Age at enrolment	Median (range), years	69 years (39–91)
BMI	Mean (standard deviation), kg/m^2	F: 25.8 (±6.2)
		M: 26.6 (±4.8)
Smoking status at diagnosis	Current	F: 65 (41%) M: 148 (40%)
	Former	F: 78 (49%) M: 212 (57%)
	Never	F: 15 (9%) M: 8 (2%)
Selected comorbidities	COPD	F: 65 (41%) M: 150 (41%)
	Tuberculosis of the lung	F: 3 (2%) M: 10 (3%)
	Diabetes, antidiabetics	F: 19 (12%) M: 69 (19%)
	Hypertension, hypertensive medication	F: 78 (49%) M: 222 (60%)
	Heart disease	F: 32 (20%) M: 129 (35%)
Family history of lung cancer	First degree relatives	94 (18%)
Tumour histology	Squamous	176 (33%)
	Adenocarcinoma	194 (37%)
	Small cell	20 (4%)
	Other, undifferentiated	51 (10%)
	Radiological diagnosis, unknown	89 (17%)
Clinical tumour size stage (pre-radiotherapy)	0	11 (2%)
	1a, 1b	180 (34%)
	2a, 2b	139 (26%)
	3 or 4	193 (36%)
Clinical nodal stage (pre-radiotherapy)	Negative	235 (44%)
	Positive	289 (55%)
Tumour stage at diagnosis	I-II	232 (44%)
	IIIa, IIIb	287 (54%)
Additional cancer treatment	Chemotherapy	271 (51%)
	– Sequential chemotherapy	62 (23%)
	– Concurrent chemotherapy	203 (75%)
	– Consolidation chemotherapy	6 (2%)
	Surgery	48 (9%)
Radiotherapy technique	3D conformal radiotherapy	161 (30%)
	ARC therapy (VMAT, RapidARC)	70 (13%)
	IMRT	140 (26%)
	Tomotherapy	12 (2%)
	Stereotactic body radiotherapy	147 (28%)
Radiotherapy regimens		
Conventional fractionation/moderate hypofractionation		383 (72%)
	1.5 Gy fraction dose, 30–42 fractions	48 (13%)
	1.8–1.99 Gy fraction dose, 25–39 fractions	31 (8%)
	2.0 Gy fraction dose, 21–40 fractions	179 (47%)
	>2.0–3.0 Gy fraction dose, 20–33 fractions[#1]	109 (28%)
	4.0–5.0 Gy fraction dose, 12–24 fractions[#2]	16 (4%)
SABR		147 (28%)
	3 fractions à 18–20 Gy, total of 45–60 Gy	30 (20%)
	4 fractions à 8.75–15 Gy, total of 35–60 Gy	64 (44%)
	5 fractions à 10–15.27 Gy, total of 50–76.39 Gy	30 (20%)
	8 fractions à 7.5–9.18 Gy, total of 60–73.44 Gy	23 (16%)

BMI: Body mass index. COPD: Chronic obstructive pulmonary disease. F: Female. IMRT: Intensity-modulated radiation therapy. M: Male. SABR: Stereotactic ablative radiotherapy. VMAT: Volumetric Arc Therapy.
[#1]Including 5 patients with incomplete dosage. [#2]Including 1 patient with incomplete dosage.
Numbers may not add up to 100% due to missing data.

the ProtecT randomised trial [34]. In lung cancer patients the rate of physician reported grade ≥2 dyspnoea at baseline in REQUITE was 23% compared with 15% reported elsewhere [35]. A systematic review of toxicity reporting in clinical trials identified that only 43% reported baseline data [36], highlighting the lack of reporting standards for adverse events and the need to improve the collection of baseline data. A study with 367 cancer patients [37] reported an EORTC C30 general health status/quality-of-life score of 67 at start of radiotherapy which is comparable with the REQUITE scores ranging from 61 to 74 at baseline.

We found that healthcare professional grading of adverse effects was lower than patient reported scores across three cancer types (Supplementary Figs. 2a–2d). These findings in a multinational setting confirm a previous report [36]. Although the collection of PRO data has become established in clinical trials, challenges remain to increase understanding of clinical relevance, and to increase use in routine clinical practice [38]. Definition of treatment-induced clinically meaningful changes requires standardisation and is currently subjective [39]. The REQUITE resource will be useful for future studies developing standards that are applicable across countries.

Randomised controlled trials comparing the efficacy of different treatments provide a route for collecting multi-centre data, but are limited by restricted inclusion and exclusion criteria. Our study cohort reflects "real world" clinical radiotherapy practice across countries and will form the basis for further projects to improve prediction before treatment of those with a higher risk of long-term adverse effects after radiotherapy. The database can also be used to study various clinical questions regarding the determinants of long-term adverse effects and the longitudinal effect on quality-of-life. REQUITE will also enable a better understanding of the scale of radiotherapy toxicity in a multi-national setting and can be used to compare similarities and differences between countries. Country-specific analyses are possible. For example, fewer US lung cancer patients smoked at time of diagnosis compared to the other countries; male patients from one Spanish recruitment centre came from rural areas with lower education levels compared to other recruitment centres; and breast cancer patients in Germany were more reluctant to answer questions on sexual activity than in other countries (Supplementary Fig. S3).

The strengths of the REQUITE study are the scale of data collected, use of standardised CRFs, the centralised database and bio-

bank, the quality control methods used to maximise data quality, and the availability of genotyping data. The majority of cancer patients consented to share their data and samples with other researchers outside the REQUITE project. A data and sample access committee has been established to maximise dissemination of the resource and a cost-recovery model implemented to ensure sustainability contact. External researchers can contact requite@manchester.ac.uk for further information on how to apply for access to the data (fees apply). The www.requite.eu website provides an overview of the project and a summary of the patient characteristics. Limitations of the study include poor recruitment of lung cancer patients, follow-up currently limited to 2 years (with extension planned) and the small number of cancer types studied.

As several toxicities such as breast fibrosis may emerge many years after completion of radiotherapy, follow-up beyond two years is desirable. A longer follow-up would also allow assessment of fluctuations in symptoms over time. Funding for an extension of the follow-up to five years in some centres was secured through an ERA PERMED grant.

In summary, we successfully established an international cohort of more than 4400 cancer patients with radiotherapy and longitudinal data for future epidemiological studies. The comprehensive centralised database and linked biobank is a valuable resource for the radiotherapy community for validating predictive models and biomarkers.

Acknowledgements

REQUITE received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development, and demonstration under grant agreement no. 601826. We sincerely thank all patients that participated in the REQUITE study and all REQUITE staff involved at the following sites: Belgium: Ghent University Hospital; KU Leuven. France: ICM Montpellier, CHU Nîmes (Department of Radiation Oncology, CHU Nîmes, Nîmes, France). Germany: Praxis für Strahlentherapie an der Stadtklinik Baden-Baden; Klinikum Darmstadt GmbH; Zentrum für Strahlentherapie Freiburg; Städtisches Klinikum Karlsruhe; St. Vincentius-Kliniken gAG Karlsruhe; Klinikum der Stadt Ludwigshafen GmbH; Universitätsklinikum Mannheim: Anke Keller and Christiane Zimmermann; Strahlentherapie Speyer. The researchers at DKFZ also thank Dr Sabine Behrens and Kerstin Pieper. Italy: Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano; Candiolo Cancer Institute – FPO, IRCCS. The Netherlands: Sylvie Canisius at Maastro Clinics, Maastricht. Spain: Santiago: Complexo Hospitalario Universitario de Santiago. Ana Vega is supported by Spanish Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) funding, an initiative of the Spanish Ministry of Economy and Innovation partially supported by European Regional Development FEDER Funds (INT15/00070, INT16/00154, INT17/00133; PI16/00046; PI13/02030; PI10/00164), and through the Autonomous Government of Galicia (Consolidation and structuring program: IN607B); Barcelona: The authors acknowledge the Cellex Foundation for providing research facilities and equipment. S. Gutiérrez-Enríquez is supported by the Miguel Servet Program from ISCIII (CPII16/00034). UK: University Hospitals of Leicester NHS Trust, Dr Tim Rattay was funded by a National Institute of Health Research (NIHR) Doctoral Research Fellowship (DRF-2014-07-079); Manchester: Jacki Routledge at Christie NHS Foundation Trust, Manchester. Catharine West, Ananya Choudhury and Rebecca Elliott are supported by NIHR Manchester Biomedical Research Centre and Catharine West is supported by Cancer Research UK (C1094/A18504, C147/A25254); University Hospitals Birmingham NHS Foundation Trust; Derby Hospitals NHS Foundation Trust; Nottingham University Hospitals NHS Trust; Salford Royal NHS Trust. USA: Mount Sinai Hospital, New York; Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York.

Conflict of interest

D. Azria is involved in the creation of the start-up NovaGray in 2015. D. De Ruysscher: none related to the current manuscript. Outside the current manuscript: advisory board of Astra Zeneca, Bristol-Myers-Squibb, Roche/Genentech, Merck/Pfizer, Celgene, Noxxon, Mologen and has received investigator initiated grants from Bristol-Myers-Squibb, Boehringer Ingelheim and Astra-Zeneca. E. Sperk: none related to the current manuscript. Outside the current manuscript: General speakers bureau Zeiss Meditec, travel support Zeiss Meditec.

The other authors have no conflict of interest to declare.

REQUITE consortium members

Yolande Lievens[ab], Marc van Eijkeren[ab], Katrien Vandecasteele[ab], Elhaseen Elhamin[ab], Piet Ost[ab], Valérie Fonteyne[ab], Martijn Swimberghe[ab], Pieter Deseyne[ab], Wilfried De Neve[ab], Fréderic Duprez[ab], Marcus Mareel[ab], Chris Monten[ab], Annick Van Greveling[a], Tom Vercauteren[ab], Leen Paelinck[a], Gilles Defraene[c], Rita Aerts[c], Soumia Arredouani[c], Maarten Lambrecht[c], Ben Vanneste[d], Roxana Draghici[e], Frank Giordano[f], Carsten Herskind[f], Marlon Veldwijk[f], Irmgard Helmbold[g], Ulrich Giesche[h], Petra Stegmaier[i], Christian Weiß[j], Thomas Blaschke[k], Burkhard Neu[l], Laura Lozza[m], Barbara Avuzzi[m], Sara Morlino[m], Claudia Sangalli[m], Marzia Franceschini[m], Belina Rodriguez-Lage[no], Juan Fernández-Tajes[no], Olivia Fuentes-Rios[no], Isabel Domínguez-Rios[p], Irene Fajardo-Paneque[p], Paloma Sosa-Fajardo[p], Laura Torrado-Moya[p], Mónica Ramos-Albiac[q], Alexandra Giraldo[q], Manolo Altabas[q], Bibiana Piqué-Leiva[q], David García-Relancio[q], Alejandro Seoane-Ramallo Samuel Lavers[s], Simon Wright[t], Hannah Dobbelaere[u], Donna Appleton[tv], Monika Kaushik[t], Frances Kenny[t], Hazem Khout[tw], Jaroslaw Krupa[t], Kelly V. Lambert[t], Simon Pilgrim[t], Sheila Shokuhi[t], Kalliope Valassiadou[t], Luis Aznar-Garcia[tw], Ion Boiangui[tx], Kiran Kancherla[t], Christopher Kent[t], Kufre Sampson[t], Ahmed Osman[t], Thiagarajan Sridhar[t], Subramaniam Vasanthan[t], Corinne Faivre-Finn[yz], Victoria Harrop[aa], Manjusha Keni[ab], Karen Foweraker[w], Abigail Pascoe[w], Claire Esler[w], Richard Stock[ac], Sheryl Green[ac], Ava Golchin[ac], William Li[ad]

[a]Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital, Belgium; [b]Department of Human Structure and Repair, Ghent University; [c]University Hospitals Leuven, Belgium; [d]Maastricht University Medical Center, Department of Radiation Oncology (Maastro clinic), Maastricht, The Netherlands; [e]Department of Radiation Oncology, Montpellier Cancer Institute, Université Montpellier, Montpellier, France; [f]Department of Radiation Oncology, Universitätsklinikum Mannheim, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim; [g]Division of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg; [h]Klinik für Strahlentherapie, St. Vincentius-Kliniken gAG, Karlsruhe; [i]Zentrum für Strahlentherapie Freiburg; [j]Klinikum Darmstadt, Institut für Radionkologie und Strahlentherapie, Darmstadt; [k]Strahlentherapie Baden-Baden; [l]Städt. Klinikum Karlsruhe, Germany; [m]Department of Radiation Oncology 1, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy; [n]Fundación Pública Galega Medicina Xenómica, Santiago de Compostela; [o]Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela; [p]Department of Radiation Oncology, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago, SERGAS, Santiago de Compostela;

[q]Radiation Oncology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona; [r]Medical Physics Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain; [s]Leicester Cancer Research Centre, University of Leicester; [t]University Hospitals of Leicester NHS Trust; [u]Department of Genetics and Genome Biology, University of Leicester; [v]Shrewsbury and Telford Hospital NHS Trust; [w]Nottingham University Hospitals NHS Trust; [x]University Hospitals of Coventry and Warwickshire NHS Trust; [y]University of Manchester; [z]The Christie NHS Foundation Trust; [aa]Queen Elizabeth Hospital Birmingham; [ab]Derby Teaching Hospitals NHS Foundation Trust, UK; [ac]Icahn School of Medicine at Mount Sinai; [ad]Queens Hospital Center, USA

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.04.034.

References

[1] Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. Cancer 2005;104:1129–37.
[2] Barker CL, Routledge JA, Farnell DJ, Swindell R, Davidson SE. The impact of radiotherapy late effects on quality of life in gynaecological cancer patients. Br J Cancer 2009;100:1558–65.
[3] Schaake W, Wiegman EM, de Groot M, van der Laan HP, van der Schans CP, van den Bergh AC, et al. The impact of gastrointestinal and genitourinary toxicity on health related quality of life among irradiated prostate cancer patients. Radiother Oncol 2014;110:284–90.
[4] Barnett GC, Kerns SL, Noble DJ, Dunning AM, West CM, Burnet NG. Incorporating genetic biomarkers into predictive models of normal tissue toxicity. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2015;27:579–87.
[5] Kerns SL, de Ruysscher D, Andreassen CN, Azria D, Barnett GC, Chang-Claude J, et al. STROGAR – strengthening the reporting of genetic association studies in radiogenomics. Radiother Oncol 2014;110:182–8.
[6] Rancati T, Fiorino C, Fellin G, Vavassori V, Cagna E, Casanova Borca V, et al. Inclusion of clinical risk factors into NTCP modelling of late rectal toxicity after high dose radiotherapy for prostate cancer. Radiother Oncol 2011;100:124–30.
[7] Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C, et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte apoptosis as a predictor of breast fibrosis after radiotherapy: results of the prospective multicenter french trial. EBioMedicine 2015;2:1965–73.
[8] Mbah C, Thierens H, Thas O, De Neve J, Chang-Claude J, Seibold P, et al. Pitfalls in prediction modeling for normal tissue toxicity in radiation therapy: an illustration with the individual radiation sensitivity and mammary carcinoma risk factor investigation cohorts. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2016;95:1466–76.
[9] Seibold P, Behrens S, Schmezer P, Helmbold I, Barnett G, Coles C, et al. XRCC1 polymorphism associated with late toxicity after radiation therapy in breast cancer patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2015;92:1084–92.
[10] Talbot CJ, Tanteles GA, Barnett GC, Burnet NG, Chang-Claude J, Coles CE, et al. A replicated association between polymorphisms near TNFalpha and risk for adverse reactions to radiotherapy. Br J Cancer 2012;107:748–53.
[11] Deasy JO, Bentzen SM, Jackson A, Ten Haken RK, Yorke ED, Constine LS, et al. Improving normal tissue complication probability models: the need to adopt a "data-pooling" culture. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010;76:S151–4.
[12] Andreassen CN, Rosenstein BS, Kerns SL, Ostrer H, De Ruysscher D, Cesaretti JA, et al. Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. Radiother Oncol 2016;121:431–9.
[13] Kerns SL, Dorling L, Fachal L, Bentzen S, Pharoah PD, Barnes DR, et al. Meta-analysis of genome wide association studies identifies genetic markers of late toxicity following radiotherapy for prostate cancer. EBioMedicine 2016;10:150–63.
[14] Barnett GC, Thompson D, Fachal L, Kerns S, Talbot C, Elliott RM, et al. A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. Radiother Oncol 2014;111:178–85.
[15] Fachal L, Gomez-Caamano A, Barnett GC, Peleteiro P, Carballo AM, Calvo-Crespo P, et al. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1. Nat Genet 2014;46:891–4.
[16] Rosenstein BS, West CM, Bentzen SM, Alsner J, Andreassen CN, Azria D, et al. Radiogenomics: radiobiology enters the era of big data and team science. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2014;89:709–13.
[17] Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, Baynes C, Luccarini C, Conroy D, et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. Lancet Oncol 2012;13:65–77.
[18] Barnett GC, Elliott RM, Alsner J, Andreassen CN, Abdelhay O, Burnet NG, et al. Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity. Radiother Oncol 2012;105:289–95.
[19] West C, Rosenstein BS, Alsner J, Azria D, Barnett G, Begg A, et al. Establishment of a radiogenomics consortium. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010;76:1295–6.
[20] West C, Azria D, Chang-Claude J, Davidson S, Lambin P, Rosenstein B, et al. The REQUITE project: validating predictive models and biomarkers of radiotherapy toxicity to reduce side-effects and improve quality of life in cancer survivors. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2014;26:739–42.
[21] Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, Bullinger M, Cull A, Duez NJ, et al. The european organization for research and treatment of cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. J Natl Cancer Inst 1993;85:365–76.
[22] Sprangers MA, Groenvold M, Arraras JI, Franklin J, te Velde A, Muller M, et al. The European Organization for Research and Treatment of Cancer breast cancer-specific quality-of-life questionnaire module: first results from a three-country field study. J Clin Oncol 1996;14:2756–68.
[23] Smets EM, Garssen B, Cull A, de Haes JC. Application of the multidimensional fatigue inventory (MFI-20) in cancer patients receiving radiotherapy. Br J Cancer 1996;73:241–5.
[24] Bull FC, Maslin TS, Armstrong T. Global physical activity questionnaire (GPAQ): nine country reliability and validity study. J Phys Act Health 2009;6:790–804.
[25] Farnell DJ, Mandall P, Anandadas C, Routledge J, Burns MP, Logue JP, et al. Development of a patient-reported questionnaire for collecting toxicity data following prostate brachytherapy. Radiother Oncol 2010;97:136–42.
[26] Christodoulou M, McCloskey P, Stones N, Bayman N, Burt P, Chittalia A, et al. Investigation of a patient reported outcome tool to assess radiotherapy-related toxicity prospectively in patients with lung cancer. Radiother Oncol 2014;112:244–9.
[27] Cardoso MJ, Cardoso J, Amaral N, Azevedo I, Barreau L, Bernardo M, et al. Turning subjective into objective: the BCCT.core software for evaluation of cosmetic results in breast cancer conservative treatment. Breast 2007;16:456–61.
[28] Talbot CJV, M. R.; Azria, D.; Batini, D.; Bierbaum, M.; Brengues, M.; Chang-Claude, J.; Johnson, K.; Keller, A.; Smith, S.; Sperk, E.; Symonds, R. P.; Wenz, F.; West, C.; Herskind, C.; Bourgier, C. Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity. Submitted.
[29] Michailidou K, Lindstrom S, Dennis J, Beesley J, Hui S, Kar S, et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. Nature 2017;551:92–4.
[30] Choudhury A, Arthur C, Malik J, Mandall P, Taylor C, Alam N, et al. Patient-reported outcomes and health-related quality of life in prostate cancer treated with a single fraction of high dose rate brachytherapy combined with hypofractionated external beam radiotherapy. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2014;26:661–7.
[31] Donovan JL, Hamdy FC, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Walsh E, et al. Patient-reported outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for prostate cancer. N Engl J Med 2016;375:1425–37.
[32] Wilkins A, Mossop H, Syndikus I, Khoo V, Bloomfield D, Parker C, et al. Hypofractionated radiotherapy versus conventionally fractionated radiotherapy for patients with intermediate-risk localised prostate cancer: 2-year patient-reported outcomes of the randomised, non-inferiority, phase 3 CHHiP trial. Lancet Oncol 2015;16:1605–16.
[33] Fielding S, Maclennan G, Cook JA, Ramsay CR. A review of RCTs in four medical journals to assess the use of imputation to overcome missing data in quality of life outcomes. Trials 2008;9:51.
[34] Lane A, Metcalfe C, Young GJ, Peters TJ, Blazeby J, Avery KN, et al. Patient-reported outcomes in the ProtecT randomized trial of clinically localized prostate cancer treatments: study design, and baseline urinary, bowel and sexual function and quality of life. BJU Int 2016;118:869–79.
[35] Voets AM, Oberije C, Struijk RB, Reymen B, De Ruyck K, Thierens H, et al. No association between TGF-beta1 polymorphisms and radiation-induced lung toxicity in a European cohort of lung cancer patients. Radiother Oncol 2012;105:296–8.
[36] Gilbert A, Ziegler L, Martland M, Davidson S, Efficace F, Sebag-Montefiore D, et al. Systematic review of radiation therapy toxicity reporting in randomized controlled trials of rectal cancer: a comparison of patient-reported outcomes and clinician toxicity reporting. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2015;92:555–67.
[37] Yucel B, Akkas EA, Okur Y, Eren AA, Eren MF, Karapinar H, et al. The impact of radiotherapy on quality of life for cancer patients: a longitudinal study. Support Care Cancer 2014;22:2479–87.
[38] Siddiqui F, Liu AK, Watkins-Bruner D, Movsas B. Patient-reported outcomes and survivorship in radiation oncology: overcoming the cons. J Clin Oncol 2014;32:2920–7.
[39] Wyrwich KW, Bullinger M, Aaronson N, Hays RD, Patrick DL, Symonds T, et al. Estimating clinically significant differences in quality of life outcomes. Qual Life Res 2005;14:285–95.

Supplement

Supplementary Table S1. Number of patients by main recruitment site and country.

Country	Belgium		France	GER	Italy	NL	Spain		UK		USA	Total
Main site	Gent	Leuven	Montpellier	Heidelberg/ Manheim area	Milan	Maastricht	Barcelona	Santiago	Leicester	Manchester	New York	
Breast	298	253	458	216	102	--	215	101	350	--	76	**2,069**
Prostate	199	127	264	82	206	74	--	294	250	263	49	**1,808**
Lung	53	90	53	--	55	61	36	88	42	51	32	**561**

Supplementary Table S2: Inclusion/exclusion criteria.

Inclusion criteria	Exclusion criteria
▪ Confirmed diagnosis of the specified tumour types, for lung cancer confirmation either by histology or based on radiological findings ▪ Patients suitable for adjuvant radiotherapy (RT)* for cancer of the breast (invasive or *in situ*) including breast patients receiving neo-adjuvant chemotherapy ▪ Patients suitable for radical RT or brachytherapy for prostate cancer; including post-prostatectomy patients ▪ Patients suitable for radical RT, sequential or concurrent chemoradiotherapy or stereotactic body radiation therapy (SBRT) for lung cancer ▪ No other malignancy in the last 5 years prior to treatment for the specified tumour types except basal cell or squamous cell carcinoma of the skin ▪ No evidence of distant metastases ▪ Patients able to provide a venous blood sample ▪ Breast patients consent to have photos taken of both breasts ▪ Willingness and ability to comply with scheduled visits, treatment plans and available for follow up within country of origin ▪ Greater than 18 years of age; no upper age limit ▪ The capacity to understand the patient information sheet and the ability to provide written informed consent **Breast patients receiving chemotherapy should have completed their course of chemotherapy (anthracyclines) at least two weeks prior to RT commencing.*	▪ Patients with metastatic disease ▪ Prior irradiation at the same site ▪ Planned use of protons ▪ High Intensity Focal Ultrasound (HIFU) ▪ Breast patients receiving concomitant chemo-radiation ▪ Male breast cancer patients ▪ Mastectomy patients ▪ Bilateral breast cancer ▪ Mental disability or patient otherwise unable to give informed consent and/or complete patient questionnaires ▪ Limited life expectancy due to co-morbidity ▪ Pregnant patients ▪ Partial breast irradiation ▪ Patients with breast implants if not removed during surgery ▪ Patients with known HIV infection/infectious hepatitis

Supplementary Table S3: Study endpoints by cancer type.

Cancer type	Primary endpoints	Secondary endpoints
Breast	Change in breast appearance at 24 months following start of radiotherapy	▪ Other toxicity endpoints such as fibrosis, induration and vascular changes ▪ Quality-of-life ▪ Maximum grade of toxicity during follow-up
Prostate	Rectal bleeding at 24 months following start of radiotherapy	▪ Other toxicity endpoints such as rectal incontinence, urinary toxicity and erectile dysfunction ▪ Quality-of-life ▪ Maximum grade of toxicity during follow-up
Lung	Dyspnoea/breathlessness at 12 months following start of RT	▪ Other toxicity endpoints such as dysphagia and oesophagitis ▪ Quality-of-life ▪ Maximum grade of toxicity during follow-up

Supplementary Table S4. Standardised baseline (pre-radiotherapy) quality-of-life measures (0-100) by cancer type according to EORTC QLQ C30 domains. A higher score reflects better quality-of-life for the general health status/quality of life and the functional scales and a worse quality-of-life for the symptoms scale.

	Breast	**Prostate**	**Lung**
Number of patients with EORTC QLQ C30 data	N=2,025	N=1,716	N=480
General health status / quality-of-life	68.3 (± 19.8)	74.9 (± 18.9)	61.4 (± 21.0)
Functional scales			
Physical functioning	85.5 (± 16.9)	91.9 (± 13.4)	72.1 (± 22.8)
Role functioning	78.0 (± 25.9)	91.4 (± 19.4)	70.5 (± 30.9)
Emotional functioning	73.5 (± 23.0)	82.9 (± 16.3)	75.1 (± 23.4)
Cognitive functioning	83.7 (± 21.1)	89.4 (± 16.3)	83.2 (± 22.0)
Social functioning	80.4 (± 24.6)	91.2 (± 17.6)	79.6 (± 26.0)
Symptoms scales			
Fatigue	29.7 (± 24.3)	17.3 (± 19.5)	34.4 (± 26.5)
Nausea and vomiting	3.5 (± 10.4)	1.6 (± 6.4)	8.1 (± 17.1)
Pain	20.0 (± 23.2)	7.3 (± 16.9)	16.7 (± 24.4)
Dyspnoea	14.2 (± 23.3)	9.7 (± 19.7)	35.1 (± 32.1)
Insomnia	33.0 (± 31.2)	19.9 (± 25.9)	27.3 (± 31.1)
Appetite loss	8.2 (± 18.9)	3.2 (± 11.4)	20.7 (± 30.0)
Constipation	11.6 (± 23.1)	6.4 (± 16.3)	18.0 (± 27.5)
Diarrhoea	5.8 (± 16.2)	4.0 (± 12.4)	7.0 (± 18.1)
Financial difficulties	12.7 (± 25.2)	5.0 (± 16.0)	10.6 (± 21.9)

Mean (standard deviation) if not otherwise stated.

Supplementary Table S5. Selected common CTCAE v4.0-based baseline toxicities with grade 2 and higher and quality-of-life according to EORTC QLQ C30 (mean, standard deviation) by country.

	Belgium	**France**	**GER**	**Italy**	**NL**	**Spain**	**UK**	**USA**
Breast atrophy	7/550 (1%)	45/453 (10%)	4/212 (2%)	0/102 (0%)	--	28/315 (9%)	8/348 (2%)	0/76 (0%)
Breast GSH/QoL	67.2 (±19.3)	69.2 (±20.3)	63.1 (±19.4)	69.4 (±21.4)	--	64.4 (±21.0)	73.1 (±18.7)	78.6 (±16.4)
Prostate urinary incontinence	41/326 (13%)	8/249 (3%)	8/77 (10%)	14/195 (7%)	1/74 (1%)	17/284 (6%)	12/509 (2%)	5/44 (11%)
Prostate erectile dysfunction	134/326 (41%)	113/249 (45%)	7/77 (9%)	101/195 (52%)	13/74 (18%)	76/284 (27%)	23/509 (5%)	11/44 (25%)
Prostate GSH/QoL	71.8 (±18.9)	72.6 (±20.6)	69.3 (±22.2)	75.0 (±18.5)	75.8 (±16.2)	74.2 (±18.8)	79.3 (±17.3)	75.8 (±18.2)
Lung dyspnoea	36/139 (26%)	20/52 (38%)	--	4/46 (9%)	22/61 (36%)	11/111 (10%)	23/91 (25%)	7/29 (24%)
Lung GSH/QoL	60.6 (±21.4)	57.2 (±18.7)	--	69.4 (±18.5)	63.0 (±21.4)	59.5 (±20.8)	61.6 (±21.5)	67.0 (±21.9)

GSH/QoL: Global health status/Quality-of-life according to EORTC QLQ C30, questions 29 and 30.

Supplementary Table S6. Summary statistics of the REQUITE resource as of October 2018.

(a) Selected questionnaire data by time points and cancer type.

	Baseline	**End of RT /3mo**	**12mo**	**24mo**
Physician forms (N=47,000)				
Toxicity Breast	2,057	2,057	1,870	1,707
Toxicity Prostate	1,760	1,760	1,627	1,463
Toxicity Lung	530	495	332	95
Patient-reported outcome forms (N=54,900)				
EORTC QLQ C30 Breast	2,000	1,855	1,730	1,535
EORTC QLQ C30 Prostate	1,665	1,640	1,492	1,352
EORTC QLQ C30 Lung	457	339	267	95
Multidimensional Fatigue Inventory Breast	1,443	1,302	1,202	1,055
Multidimensional Fatigue Inventory Prostate	1,037	1,011	905	787
Multidimensional Fatigue Inventory Lung	246	203	129	35
EORTC BR23	2,000	1,852	1,726	1,519
Hopwood Body Image Scale (HBIS)	260	255	218	151
Prostate Symptoms	1,681	1,644	1,501	1,359
Lung Symptoms	462	396	269	95
General Physical Activity Questionnaire Breast	1,148	1,072	962	825
General Physical Activity Questionnaire Prostate	1,029	987	884	762
General Physical Activity Questionnaire Lung	225	191	119	31

(b) Breast photos, radiotherapy physics data, blood samples and genotype data.

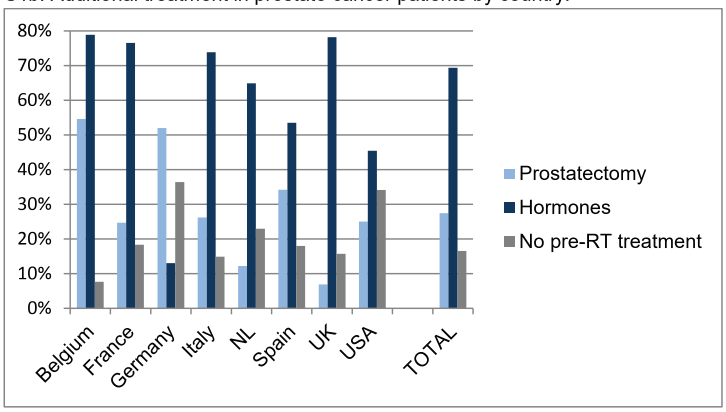
	Number of files
Breast photos	11,563
Dose-volume-histograms (DVHs)	17,107
Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOMs)	12,684
Imputed genotype data (European ancestry)	4,223
DNA samples	4,409
PAXgene samples	3,039
Radiation-induced lymphocyte assay (RILA) data	1,319

Supplementary Figures S1. Characteristics of the study population by country.

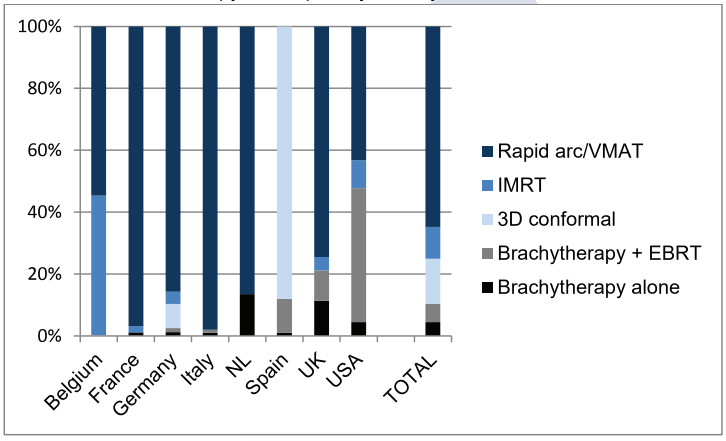
S1a. Age and body mass index at baseline by country.



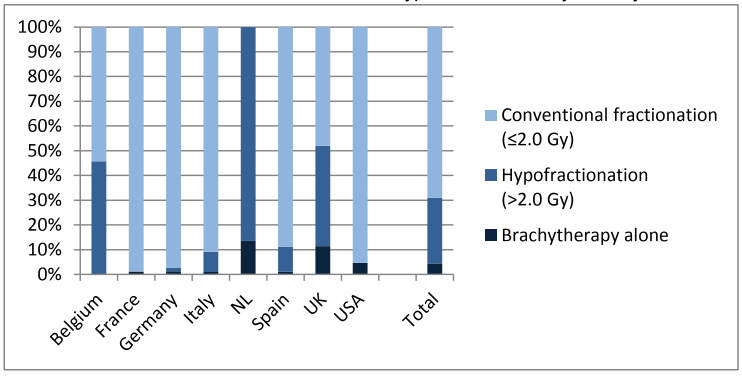
S1b. Additional treatment in prostate cancer patients by country.



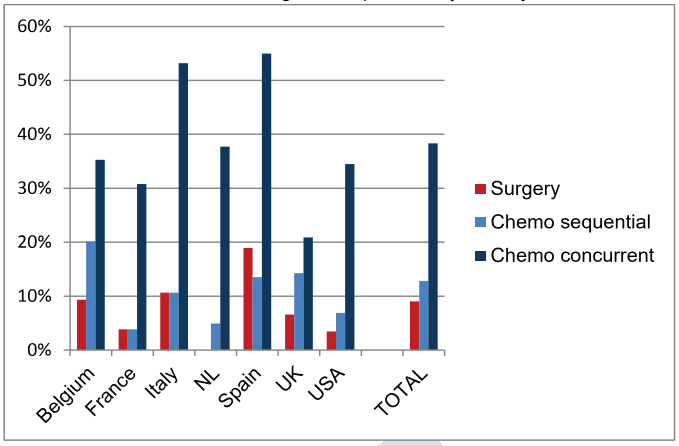
S1c. Prostate radiotherapy techniques by country.



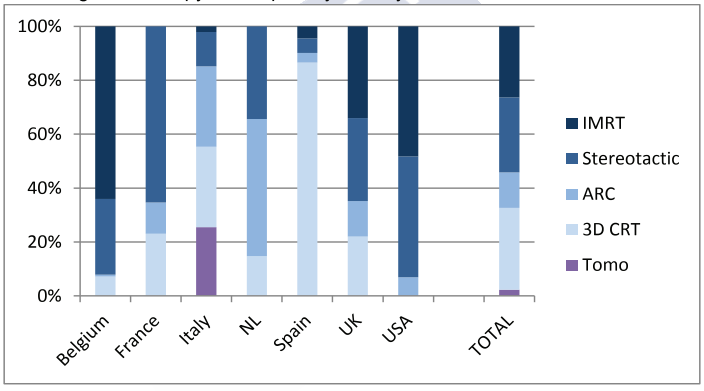
S1d. Prostate conventional fractionation vs. hypofractionation by country



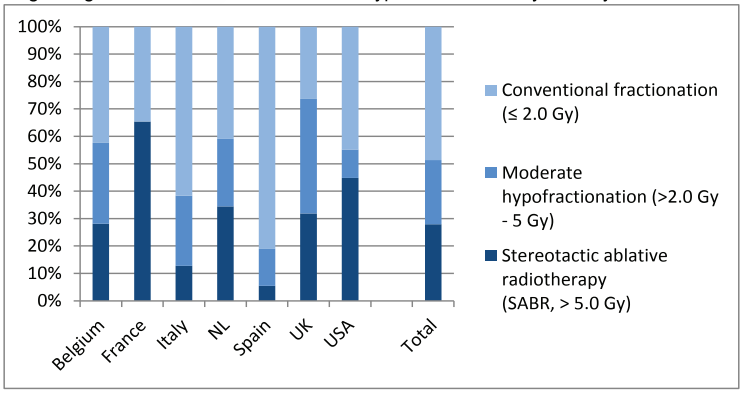
S1e. Additional treatment in lung cancer patients by country.



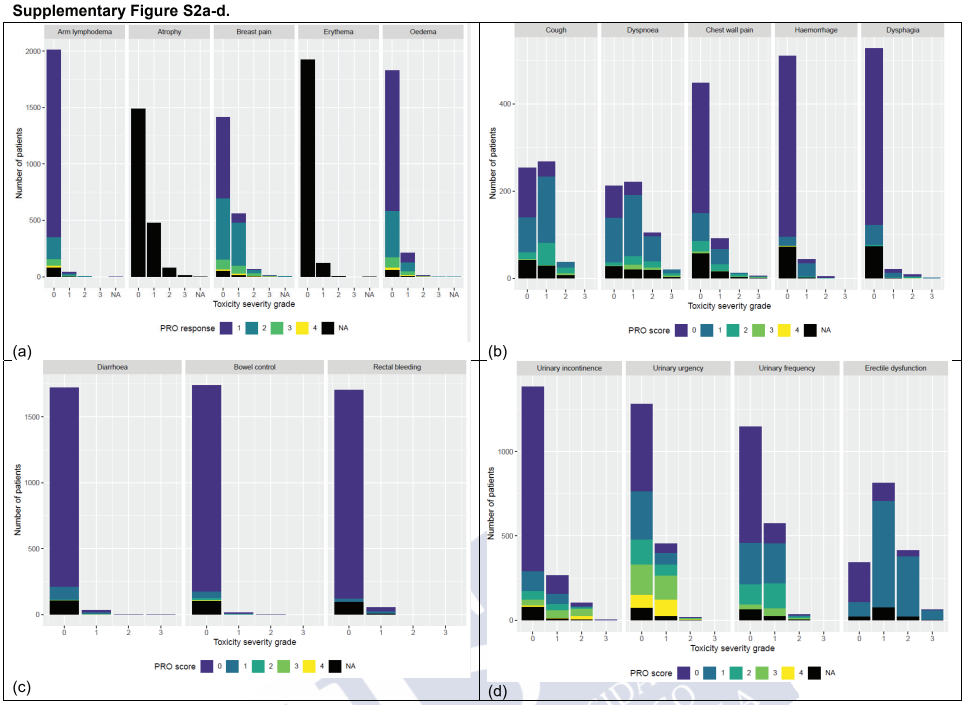
S1f. Lung radiotherapy techniques by country.



S1g. Lung conventional fractionation vs. hypofractionation by country.

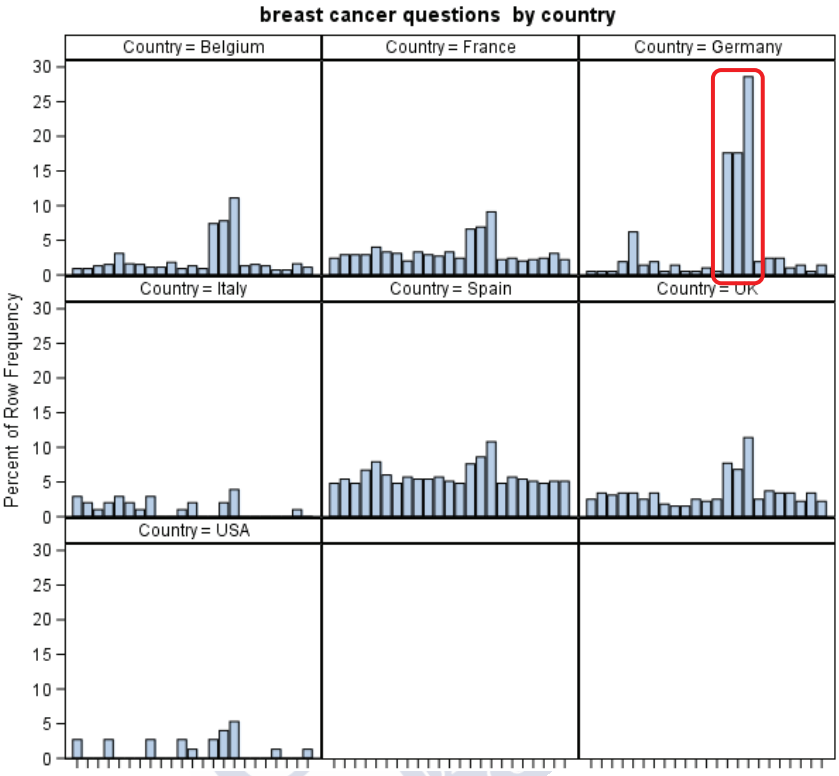


Supplementary Figure S2a-d.



Legend to Supplementary Figure S2a-d. Selected baseline toxicities according to healthcare professional rated CTCAE v4.0 grades on the x-axis with overlap of the following patient-reported outcomes (PRO, in colour) among the REQUITE patients: (a) Breast cancer patients: Breast symptoms from the EORTC BR23. *Note: Patient reported outcomes were not available for the healthcare professional rated toxicities atrophy and erythema (black).* (b) Lung cancer patients: Lung symptoms from the REQUITE lung PRO. (c) Prostate cancer patients: Gastrointestinal (GI) symptoms from the REQUITE prostate PRO. (d) Prostate cancer patients: Genitourinary (GU) symptoms from the REQUITE prostate PRO. For lung, PRO and CTCAE scale match, for prostate and breast, PRO and CTCAE partly differ.

Supplementary Figure S3. Missing pattern in EORTC BR23 by country.



Legend to Supplementary Figure S3. The frequency of missing values is displayed on the y-axis for the BR23 questions 31 to 53 (from left to right) on the x-axis. The peak (red mark) is related to missing answers to three questions on sexual activity (questions 44 to 46). Compared to other countries, women in Germany were more likely not to answers these questions. No breast cancer patients were recruited in the Netherlands.

REQUITE Collaborators

First name	Last name	Affiliation1	Affiliation2	Country
Yolande	Lievens	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Marc	van Eijkeren	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Katrien	Vandecasteele	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Elhaseen	Elhamin	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Piet	Ost	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Valérie	Fonteyne	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Martijn	Swimberghe	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Pieter	Deseyne	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Wilfried	De Neve	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Fréderic	Duprez	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Marcus	Mareel	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Chris	Monten	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Annick	Van Greveling	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital		Belgium
Tom	Vercauteren	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital	Department of Human Structure and Repair, Ghent University, Ghent, Belgium	Belgium
Leen	Paelinck	Department of Radiation Oncology, Ghent University Hospital		Belgium
Gilles	Defraene	University Hospitals Leuven		Belgium
Rita	Aerts	University Hospitals Leuven		Belgium
Soumia	Arredouani	University Hospitals Leuven		Belgium
Maarten	Lambrecht	University Hospitals Leuven		Belgium
Ben	Vanneste	Maastricht University Medical Center, Department of Radiation Oncology (Maastro clinic), Maastricht, The Netherlands		Netherlands
Roxana	Draghici	Department of Radiation Oncology, Montpellier Cancer Institute, Université Montpellier, Montpellier, France		France

First name	Last name	Affiliation1	Affiliation2	Country
Frank	Giordano	Department of Radiation Oncology, Universitätsklinikum Mannheim, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany		Germany
Carsten	Herskind	Department of Radiation Oncology, Universitätsklinikum Mannheim, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany		Germany
Marlon	Veldwijk	Department of Radiation Oncology, Universitätsklinikum Mannheim, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany		Germany
Irmgard	Helmbold	Division of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany		Germany
Ulrich	Giesche	Klinik für Strahlentherapie, St. Vincentius-Kliniken gAG, Karlsruhe, Germany		Germany
Petra	Stegmaier	Zentrum für Strahlentherapie Freiburg, Germany		Germany
Christian	Weiß	Klinikum Darmstadt, Institut für Radionkologie und Strahlentherapie, Darmstadt, Germany		Germany
Thomas	Blaschke	Strahlentherapie Baden-Baden, Germany		Germany
Burkhard	Neu	Städt. Klinikum Karlsruhe, Germany		Germany
Laura	Lozza	Department of Radiation Oncology 1, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy		Italy
Barbara	Avuzzi	Department of Radiation Oncology 1, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy		Italy
Sara	Morlino	Department of Radiation Oncology 1, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy		Italy
Claudia	Sangalli	Department of Radiation Oncology 1, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy		Italy
Marzia	Franceschini	Department of Radiation Oncology 1, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy		Italy
Belina	Rodriguez-Lage	Fundación Pública Galega Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain	Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Spain	Spain
Juan	Fernández-Tajes	Fundación Pública Galega Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain	Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Spain	Spain

First name	Last name	Affiliation1	Affiliation2	Country
Olivia	Fuentes-Rios	Fundación Pública Galega Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain	Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Spain	Spain
Isabel	Domínguez-Rios	Department of Radiation Oncology, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago, SERGAS, Santiago de Compostela, Spain		Spain
Irene	Fajardo-Paneque	Department of Radiation Oncology, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago, SERGAS, Santiago de Compostela, Spain		Spain
Paloma	Sosa-Fajardo	Department of Radiation Oncology, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago, SERGAS, Santiago de Compostela, Spain		Spain
Laura	Torrado-Moya	Department of Radiation Oncology, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago, SERGAS, Santiago de Compostela, Spain		Spain
Mónica	Ramos-Albiac	Radiation Oncology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain		Spain
Alexandra	Giraldo	Radiation Oncology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain		Spain
Manolo	Altabas	Radiation Oncology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain		Spain
Bibiana	Piqué-Leiva	Radiation Oncology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain		Spain
David	García-Relancio	Radiation Oncology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain		Spain
Alejandro	Seoane-Ramallo	Medical Physics Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain		Spain
Samuel	Lavers	Leicester Cancer Research Centre, University of Leicester, Leicester, UK		UK
Simon	Wright	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Hannah	Dobbelaere	Department of Genetics and Genome Biology, University of Leicester, Leicester, UK		UK
Donna	Appleton	University Hospitals of Leicester NHS Trust	Shrewsbury and Telford Hospital NHS Trust	UK
Monika	Kaushik	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Frances	Kenny	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Hazem	Khout	University Hospitals of Leicester NHS Trust	Nottingham University Hospitals NHS Trust	UK

First name	Last name	Affiliation1	Affiliation2	Country
Jaroslaw	Krupa	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Kelly V.	Lambert	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Simon	Pilgrim	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Sheila	Shokuhi	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Kalliope	Valassiadou	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Luis	Aznar-Garcia	University Hospitals of Leicester NHS Trust	Nottingham University Hospitals NHS Trust	UK
Ion	Boiangui	University Hospitals of Leicester NHS Trust	University Hospitals of Coventry and Warwickshire NHS Trust	UK
Kiran	Kancherla	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Christopher	Kent	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Kufre	Sampson	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Ahmed	Osman	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Thiagarajan	Sridhar	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Subramaniam	Vasanthan	University Hospitals of Leicester NHS Trust		UK
Corinne	Faivre-Finn	University of Manchester	The Christie NHS Foundation Trust	UK
Victoria	Harrop	Queen Elizabeth Hospital Birmingham		UK
Manjusha	Keni	Derby Teaching Hospitals NHS Foundation Trust		UK
Karen	Foweraker	Nottingham University Hospitals NHS Trust		UK
Abigail	Pascoe	Nottingham University Hospitals NHS Trust		UK
Claire	Esler	Nottingham University Hospitals NHS Trust		UK
Richard	Stock	Icahn School of Medicine at Mount Sinai		USA
Sheryl	Green	Icahn School of Medicine at Mount Sinai		USA
Ava	Golchin	Icahn School of Medicine at Mount Sinai		USA
William	Li	Queens Hospital Center, NY, USA		USA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO 11. Publicación relacionada 2. "Radiogenomics Consortium Genome-Wide Association Study Meta-analysis of Late Toxicity after Prostate Cancer Radiotherapy"

OXFORD

JNCI J Natl Cancer Inst (2020) 112(2): djz075

doi: 10.1093/jnci/djz075
First published online May 16, 2019
Article

ARTICLE

Radiogenomics Consortium Genome-Wide Association Study Meta-Analysis of Late Toxicity After Prostate Cancer Radiotherapy

Sarah L. Kerns*, Laura Fachal*, Leila Dorling*, Gillian C. Barnett, Andrea Baran, Derick R. Peterson, Michelle Hollenberg, Ke Hao, Antonio Di Narzo, Mehmet Eren Ahsen, Gaurav Pandey, Søren M. Bentzen, Michelle Janelsins, Rebecca M. Elliott, Paul D. P. Pharoah, Neil G. Burnet, David P. Dearnaley, Sarah L. Gulliford, Emma Hall, Matthew R. Sydes, Miguel E. Aguado-Barrera, Antonio Gómez-Caamaño, Ana M. Carballo, Paula Peleteiro, Ramón Lobato-Busto, Richard Stock, Nelson N. Stone, Harry Ostrer, Nawaid Usmani, Sandeep Singhal, Hiroshi Tsuji, Takashi Imai, Shiro Saito, Rosalind Eeles, Kim DeRuyck, Matthew Parliament, Alison M. Dunning**, Ana Vega**, Barry S. Rosenstein**, Catharine M. L. West**; on behalf of the Radiogenomics Consortium

See the Notes section for the full list of authors' affiliations.
*These authors contributed equally to this work.
**These authors are co-senior authors who jointly directed this work.
Correspondence to: Catharine M. L. West, PhD, Institute of Cancer Sciences, the University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Christie Hospital, Manchester, M20 4BX, UK (e-mail: Catharine.West@manchester.ac.uk).

Abstract

Background: A total of 10%–20% of patients develop long-term toxicity following radiotherapy for prostate cancer. Identification of common genetic variants associated with susceptibility to radiotoxicity might improve risk prediction and inform functional mechanistic studies.
Methods: We conducted an individual patient data meta-analysis of six genome-wide association studies (n = 3871) in men of European ancestry who underwent radiotherapy for prostate cancer. Radiotoxicities (increased urinary frequency, decreased urinary stream, hematuria, rectal bleeding) were graded prospectively. We used grouped relative risk models to test associations with approximately 6 million genotyped or imputed variants (time to first grade 2 or higher toxicity event). Variants with two-sided P_{meta} less than 5×10^{-8} were considered statistically significant. Bayesian false discovery probability provided an additional measure of confidence. Statistically significant variants were evaluated in three Japanese cohorts (n = 962). All statistical tests were two-sided.
Results: Meta-analysis of the European ancestry cohorts identified three genomic signals: single nucleotide polymorphism rs17055178 with rectal bleeding ($P_{meta} = 6.2 \times 10^{-10}$), rs10969913 with decreased urinary stream ($P_{meta} = 2.9 \times 10^{-10}$), and rs11122573 with hematuria ($P_{meta} = 1.8 \times 10^{-8}$). Fine-scale mapping of these three regions was used to identify another independent signal (rs147121532) associated with hematuria ($P_{conditional} = 4.7 \times 10^{-6}$). Credible causal variants at these four signals lie in gene-regulatory regions, some modulating expression of nearby genes. Previously identified variants showed consistent

Received: November 30, 2018; **Revised:** March 20, 2019; **Accepted:** April 29, 2019

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

180 | JNCI J Natl Cancer Inst, 2020, Vol. 112, No. 2

associations (rs17599026 with increased urinary frequency, rs7720298 with decreased urinary stream, rs1801516 with overall toxicity) in new cohorts. rs10969913 and rs17599026 had similar effects in the photon-treated Japanese cohorts.
Conclusions: This study increases the understanding of the architecture of common genetic variants affecting radiotoxicity, points to novel radio-pathogenic mechanisms, and develops risk models for testing in clinical studies. Further multinational radiogenomics studies in larger cohorts are worthwhile.

Long-term side effects following radiotherapy affect the health-related quality of life for cancer survivors (1). Radiation dose and irradiated volume are the most important factors affecting toxicity risk but are broadly similar within patient populations. Known modifiers of the relationship between radiation exposure and risk of radiotoxicity include patient age, smoking history, concurrent treatments, and comorbidities. However, considerable interindividual variation in radiotoxicity remains unexplained after allowing for dosimetric and patient-level factors. An individual's response to radiation is a heritable trait as evidenced by the similar cellular radiosensitivity of related individuals (2), intraindividual correlation in tissue response to therapeutic radiation (3), and the observation that rare mutations in some genes increase risk of radiotoxicity (4). Evidence suggests common variants may explain some of the remaining interindividual variation in radiotoxicity susceptibility (2,5). Simulation shows that the accuracy of models to predict radiotoxicity is improved when genetic risk variants are combined with clinical and dosimetric parameters (6).

Genetic predisposition to radiotoxicity in nonsyndromic individuals is poorly understood. Preclinical studies suggest that the biologic mechanisms are complex, involving cell death, premature senescence, inflammation, tissue remodeling with development of fibrosis, and vascular damage. Large genetic studies are difficult because it is challenging to build cohorts associated with a phenotype that takes months to years to develop. In addition, the radiosensitivity phenotype varies by tumor site and means of assessment.

In prostate cancer patients, common radiotoxicities include increased urinary frequency, radiation cystitis (characterized by urinary bleeding, pain, and inflammation), urinary retention, and rectal bleeding (7,8). Radiotoxicity prevalence in prostate cancer survivors varies by radiation delivery modality, time of follow-up, and method of symptom assessment (particularly for clinician vs patient scores). A large (n = 1571) prospective cohort study assessing clinician-assigned toxicity using the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events reported the actuarial likelihood at 10 years of 15% and 9% for grade 2 or higher urinary and rectal toxicities, respectively (9).

Despite approximately 50% of cancer patients undergoing radiotherapy, the collection of radiotoxicity data is sporadic and inconsistent. Most centers do not collect data routinely with the detail and standardization required to conduct radiogenomic studies. There is also a clear potential for clinical impact, for example, with an option for modified radiotherapy planning as increasingly conformal dose delivery techniques become available. The Radiogenomics Consortium was established to facilitate data sharing and develop methods for meta-analyses. Our first pooled genome-wide association study (GWAS) performed in prostate cancer survivors demonstrated that it was possible to meta-analyze data and identify genomic risk regions despite the heterogeneity inherent in radiotherapy cohorts (11).

As part of a long-term goal to identify sufficient variants to develop a polygenic risk model for radiotoxicity, we undertook a larger meta-analysis on six cohorts comprising 3871 prostate cancer survivors. Secondary aims were to validate previously published single nucleotide polymorphisms (SNPs) and evaluate risk SNPs in Japanese cohorts. STROGAR guidelines (12) for reporting radiogenomic studies, which build on the STREGA and STROBE guidelines (13,14), were followed throughout.

Methods

Study Participants

The study included individuals with prostate adenocarcinoma, treated with radiotherapy with curative intent, and followed prospectively for development of toxicity. All participants gave written informed consent, and cohorts were collected following standards indicated by the Declaration of Helsinki. Participants were from either hospital-based cohorts or clinical trials (Supplementary Methods, available online). Supplementary Figure 1 (available online) summarizes the six mainly European-ancestry cohorts (Radiogenomics: Assessment of Polymorphisms for Predicting the Effects of Radiotherapy [RAPPER], RADIOGEN, Genetic Predictors of Adverse Radiotherapy Effects [GenePARE], University of Ghent [UGhent], Cross Cancer Institute–Brachytherapy [CCI-BT], Cross Cancer Institute–External Beam Radiotherapy [CCI-EBRT]) included in the meta-analysis and three Japanese cohorts (PRRG-photon, n = 170; PRRG-Cion, n = 538; and National Tokyo Medical Center (NTMC), n = 254; total n = 962) analyzed as a separate replication set. Individuals were excluded if DNA samples or genotyping failed quality control measures; they had non-European (or non-Japanese) ancestry determined using a preselected panel of ancestry informative markers (15); and/or data were unavailable on androgen-deprivation therapy, prior prostatectomy, age at treatment, and total biological effective dose (BED). A previously published GWAS meta-analysis (11) included a subset of RAPPER (RAPPER-I), RADIOGEN, GenePARE (GenePARE-I), and CCI-EBRT. RAPPER-II, GenePARE-II, UGhent, CCI-BT, and the Japanese cohorts were not analyzed previously.

Assessment of Late Radiotherapy Toxicity

Toxicity was assessed from 6 months up to 5 years after the start of radiotherapy, with the exception of the UGhent cohort (follow-up from 18 to 30 months only). Different toxicity assessments were used (Supplementary Table 1, available online). Toxicity grades were harmonized to the Common Terminology Criteria for Adverse Events scale (Supplementary Table 1, available online). Assessment times were coarsened into discrete intervals for time-to-event analysis. Six-month intervals were used except for RAPPER, which used 12-month intervals after the first 2 years. Four toxicity outcomes were analyzed: increased urinary frequency, decreased urinary stream, hematuria, and rectal bleeding. We also tested a measure of overall toxicity using STAT score (21).

Table 1. Patient characteristics by cohort for the 3871 individuals included in the GWAS meta-analysis

Characteristics	All cohorts (n = 3871)	RAPPER (n = 2010)	RADIOGEN (n = 658)	GenePARE (n = 492)	UGhent (n = 311)	CCI-BT (n = 252)	CCI-EBRT (n = 148)
Age at treatment, median (range), y*	68 (43–86)	68 (48–84)	72 (47–86)	65 (43–85)	65 (49–81)	65 (45–79)	68 (45–82)
NCCN risk group, No. (%)							
Very low	545 (14.1)	133 (6.6)	100 (15.2)	172 (35.0)	43 (13.8)†	89 (35.3)	8 (5.4)
Low	258 (6.7)	82 (4.1)	23 (3.5)	61 (12.4)	21 (6.8)	68 (27.0)	3 (2.0)
Intermediate	2635 (68.1)	1566 (77.9)	447 (67.9)	232 (47.2)	173 (55.6)	95 (37.7)	122 (82.4)
High or very high	410 (10.6)	229 (11.4)	82 (12.5)	27 (5.5)	57 (18.4)	0	15 (10.1)
Not available	23 (0.6)	0	6 (0.9)	0	17 (5.5)	0	0
Stage at diagnosis, No. (%)							
T1a–c, T1x	1443 (37.3)	709 (35.3)	226 (34.3)	249 (50.6)	101 (32.5)	119 (47.2)	38 (25.7)
T2a–c, T2x	2020 (52.2)	1084 (53.9)	362 (55.0)	227 (46.1)	126 (40.5)	132 (52.4)	89 (60.1)
T3a–c, T3x	305 (7.9)	182 (9.1)	54 (2.7)	16 (3.3)	37 (11.9)	0	16 (10.8)
T4	14 (0.4)	0	7 (1.1)	0	6 (1.9)	0	1 (0.7)
Not available	89 (2.3)	35 (1.7)	9 (1.4)	0	41 (13.2)	1 (0.4)	4 (2.7)
Gleason at diagnosis, No. (%)							
≤6	1702 (44.0)	605 (30.1)	403 (61.2)	310 (63.0)	142 (45.7)	212 (84.1)	30 (20.3)
7	1653 (42.7)	1109 (55.2)	176 (26.8)	124 (25.2)	107 (34.4)	40 (15.9)	97 (65.5)
≥8	265 (6.8)	56 (2.8)	70 (10.6)	58 (11.8)	60 (19.3)	0	21 (14.2)
Not available	251 (6.5)	240 (11.9)	9 (1.4)	0	2 (0.6)	0	0
Pretreatment PSA, median (range)	8.9 (0–236.0)	10.1 (0.6–33.5)	9.7 (0.6–236.0)	6.2 (0.6–124.0)	6.6 (0–150.0)‡	6.3 (0.5–16.0)	10.9 (1.4–80.0)
Radical prostatectomy, No. (%)*							
Yes	225 (5.8)	0	128 (29.5)	0	97 (31.2)	0	0
No	3646 (94.2)	2010 (100)	530 (80.5)	492 (100)	214 (68.8)	252 (100)	148 (100)
Androgen-deprivation therapy, No. (%)*							
Yes	3047 (78.7)	2010 (100)	463 (70.4)	248 (50.4)	198 (63.7)	55 (21.8)	73 (49.3)
No	824 (21.3)	0	195 (29.6)	244 (49.6)	113 (36.3)	197 (78.2)	75 (50.7)
Type of radiotherapy, No. (%)							
3D-CRT	895 (25.4)	237 (11.8)	658 (100)	0	0	0	0
IMRT	2239 (57.8)	1773 (88.2)	0	7 (1.4)	311 (100)	0	148 (100)
Brachytherapy	534 (13.8)	0	0	282 (57.3)	0	252 (100)	0
Brachytherapy + EBRT	203 (5.2)	0	0	203 (41.3)	0	0	0
Total BED§, median (range)*	123 (52–292)	120 (107–123)	123 (57–127)	192 (52–269)	136 (124–136)	158 (80–292)	121 (112–134)
No. (%) with grade 2 or worse toxicity							
Increased urinary frequency‖	436 (11.5)	219 (10.9)	60 (9.1)	113 (24.6)	8 (2.6)¶	NA#	15 (10.1)
Decreased urinary stream**	345 (9.9)	159 (7.9)	27 (4.1)	125 (27.2)	NA††	NA#	12 (8.1)
Hematuria‡‡	333 (9.2)	182 (9.1)	66 (10.0)	62 (12.6)	17 (5.5)¶	NA§§	6 (4.1)
Rectal bleeding‖‖	423 (12.5)	273 (13.6)	79 (12.0)	NA¶¶	6 (1.9)¶	40 (15.9)	25 (16.9)

*Age at treatment, radical prostatectomy, androgen-deprivation therapy, and total BED were included as covariates in the GWAS meta-analysis. BED = biological effective dose; CCI-BT = Cross Cancer Institute–Brachytherapy; CC-EBRT = Cross Cancer Institute–External Beam Radiotherapy; 3D-CRT = three-dimensional conformal radiotherapy; EBRT = external beam radiotherapy (either 3D-CRT or IMRT); GenePARE = Genetic Predictors of Adverse Radiotherapy Effects; GWAS = genome-wide association study; IMRT = intensity-modulated radiotherapy; NCCN = National Comprehensive Cancer Network; PSA = prostate specific antigen; RAPPER = Radiogenomics: Assessment of Polymorphisms for Predicting the Effects of Radiotherapy; UGhent = University of Ghent.

†NCCN risk group in the UGhent cohort was defined using preradiotherapy PSA rather than PSA at diagnosis.

‡PSA measurement is pre-radiotherapy but postprostatectomy in patients who received prior prostatectomy.

§Total BED was calculated using an α to β ratio of 3 following Ho et al. (27).

‖Increased urinary frequency was evaluable in 3782 participants with available baseline and follow-up data (2010 in RAPPER, 658 in RADIOGEN, 459 in GenePARE, 303 in UGhent, and 148 in CCI-EBRT).

¶Follow-up in UGhent was from 18 months to 30 months as opposed to 6 months to 5 years in all other studies.

#Increased urinary frequency and decreased urinary stream were not analyzed in CCI-BT because assessments were not conducted at regular intervals.

**Decreased urinary stream was evaluable in 3470 participants with available baseline and follow-up data (2010 in RAPPER, 658 in RADIOGEN, 459 in GenePARE, and 148 in CCI-EBRT).

††Decreased urinary stream was not assessed in UGhent.

‡‡Hematuria was evaluable in 3619 participants with available baseline and follow-up data (2010 in RAPPER, 658 in RADIOGEN, 492 in GenePARE, 311 in UGhent, and 148 in CCI-EBRT).

§§Hematuria was not assessed in CCI-BT.

‖‖Rectal bleeding was evaluable in 3379 participants with available baseline and follow-up data (2010 in RAPPER, 658 in RADIOGEN, 311 in UGhent, 252 in CCI-BT, and 148 in CCI-EBRT).

¶¶Rectal bleeding was assigned a single grade in GenePARE using information across all follow-up assessments, so this outcome was not available for analysis.

Genotyping, Quality Control, and Imputation

Germline DNA from whole blood was genotyped for published GWASs (5,10,22–25) using Affymetrix SNP6.0 arrays (Affymetrix, Inc; CCI-EBRT and GenePARE-I) or Illumina CytoSNP12 arrays (Illumina, Inc; RAPPER-1). Everything else was genotyped using Illumina OncoArray-500K BeadChips (Illumina, Inc). Methods used by PRACTICAL were followed (15). Datasets were processed

and imputed using reference haplotypes from the 1000 Genomes Project (see Supplementary Methods, available online).

Statistical Analysis: GWAS Meta-Analysis

Genetic variants were tested for associations with toxicity using a grouped relative risk model adjusting for androgen-deprivation therapy, prior prostatectomy, age at treatment, and total BED. Covariables were selected a priori to reduce heterogeneity. A per-allele additive genetic model was assumed. In RAPPER (26) and GenePARE (23,27), where samples were genotyped in two batches using different arrays, batch was included as a binary adjustment variable. Outcomes were defined as time from the start of radiation to onset of first occurrence of grade 2 or higher toxicity (see Supplementary Table 1, available online) with time coarsened into discrete intervals. Efron method was used to handle ties.

A fixed-effects meta-analysis using inverse variance weighting combined genetic variant-toxicity associations across studies. Variants were considered statistically significant if the two-sided meta-analysis P value (P_{meta}) was less than 5×10^{-8} and the chi-squared test of heterogeneity P value was greater than .05. The likelihood that an association is nominally statistically significant at a given threshold depends not only on the P value but also on the power to detect a given association. We therefore assessed the likelihood that our statistically significant associations represent false positives using the Bayes false discovery probability (28). Supplementary Table 2 (available online) reports power analysis for a range of minor allele frequencies and per-allele effect sizes. All statistical tests were two-sided.

Fine-Scale Mapping and Credible Causal Variants (CCV) Annotation

Genomic regions surrounding each statistically significant association were fine-mapped using conditional analysis (details in Supplementary Materials, available online). CCVs were annotated with Variant Effect Predictor (31) to determine their effect on genes, transcripts, and protein sequences and overlapped with Encode enhancer-like and promoter-like regions (31–33). Potential expression Quantitative Trait Loci were identified using the Genotype Tissue Expression Portal.

Statistical Analysis: Multivariable Modeling

Clinical and genetic variables were combined using cohort-stratified grouped relative risk models. Stepwise model selection was used to identify parsimonious multivariable models for each toxicity outcome. Confidence intervals and P values were likelihood based and two-sided, with P values of .05 or less considered statistically significant. The proportional hazards assumption for each predictor was tested at the nominal two-sided .05 level, one at a time, by extending the model to allow separate hazard ratios before and after 1095 days via an interaction of each predictor with I(time > 1095 days); all P values were greater than .05. Additional details are in the Supplementary Methods (available online).

Results

Table 1 summarizes the characteristics of the 3871 participants included in the meta-analysis. The cumulative probability of

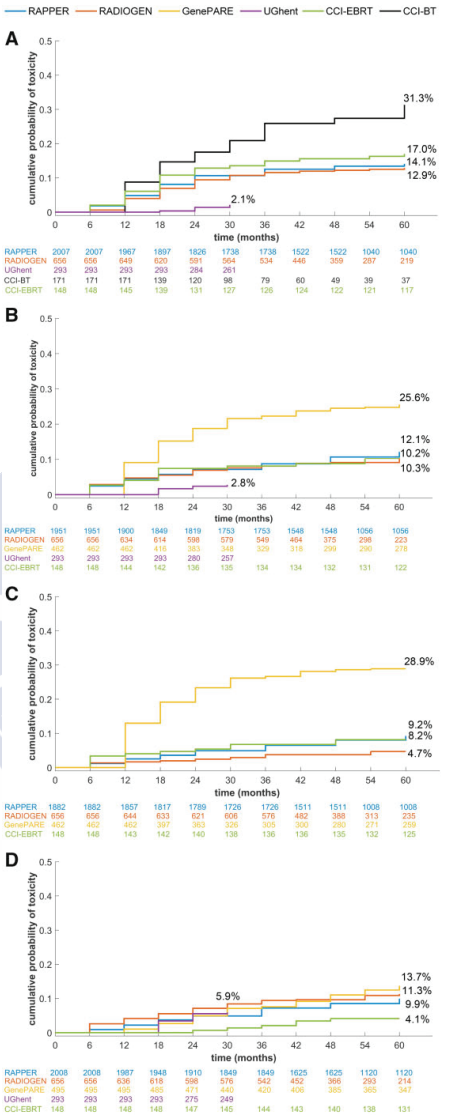


Figure 1. Cumulative probability of radiotoxicity. Each graph shows the cumulative probability of developing grade 2 or worse radiotoxicity for each individual outcome within each study included in the genome-wide association study meta-analysis. These outcomes include (**A**) rectal bleeding, (**B**) increased urinary frequency, (**C**) decreased urinary stream, and (**D**) hematuria. **Numbers** listed below the x-axis for each graph represent the numbers of patients at risk.

ARTICLE

Table 2. Study-specific and overall results for new risk SNPs identified via GWAS meta-analysis* of six European ancestry cohorts

Genetic variant	Chr†	Minor allele	MAF‡	Toxicity outcome	Study	Info§	Mean minor allele dosage		HR (95% CI)‖	P_{meta}¶	P_{het}#	BFDP**, %
							Toxicity	No toxicity				
rs17055178	chr5: 157, 403, 410	G	0.09	Time to first grade 2+ rectal bleeding	Meta-analysis	–			1.95 (1.58 to 2.40)	6.2×10^{-10}	.61	0.09
					RAPPER	0.81, 0.99	0.22	0.13	1.78 (1.37 to 2.32)			
					RADIOGEN	0.99	0.33	0.14	2.58 (1.69 to 3.95)			
					GenePARE	NA††	NA††	NA††	NA††			
					UGhent‡‡	0.99	0.17	0.14	1.38 (0.18 to 10.4)			
					CCI-BT	0.99	0.25	0.14	2.01 (0.97 to 4.20)			
					CCI-EBRT	0.98	0.12	0.13	1.27 (0.38 to 4.25)			
rs10969913	chr9: 30, 866, 808	G	0.05	Time to first grade 2+ decreased urinary stream	Meta-analysis	–			3.92 (2.57 to 6.00)	2.9×10^{-10}	.08	1.07
					RAPPER	0.61, 0.95	0.04	0.02	1.86 (0.76 to 4.54)			
					RADIOGEN	0.95	0.04	0.02	2.03 (0.27 to 15.4)			
					GenePARE	0.99, 0.95	0.11	0.04	4.36 (2.55 to 7.46)			
					UGhent	NA§§	NA§§	NA§§	NA§§			
					CCI-BT	NA‖‖	NA‖‖	NA‖‖	NA‖‖			
					CCI-EBRT	0.95	0.27	0.02	14.3 (3.78 to 54.4)			
rs11122573	chr1: 230, 837, 180	T	0.06	Time to first grade 2+ hematuria	Meta-analysis	–			1.92 (1.53 to 2.42)	1.8×10^{-8}	.14	1.96
					RAPPER	0.99	0.19	0.14	1.42 (0.99 to 2.04)			
					RADIOGEN	0.99	0.34	0.15	2.40 (1.54 to 3.73)			
					GenePARE	0.99, 0.99	0.18	0.11	2.01 (1.25 to 3.22)			
					Ughent	0.99	0.47	0.14	3.59 (1.72 to 7.49)			
					CCI-BT	NA¶¶	NA¶¶	NA¶¶	NA¶¶			
					CCI-EBRT	1.000	0.17	0.16	0.99 (0.13 to 7.58)			

*Within each cohort, SNP-toxicity associations were adjusted for age at treatment, prior prostatectomy, adjuvant hormonal therapy, and total BED. Associations in RAPPER and GenePARE were also adjusted for genotyping batch. Bold values correspond to results from meta-analysis. BED = biological effective dose; BFDP = Bayesian false discovery probability; CCI-BT = Cross Cancer Institute–Brachytherapy; CC-EBRT = Cross Cancer Institute–External Beam Radiotherapy; Chr = chromosome; CI = confidence interval; GenePARE = Genetic Predictors of Adverse Radiotherapy Effects; GWAS = genome-wide association study; HR = hazard ratio; MAF = minor allele frequency; NA = not analyzed; P_{meta} = meta-analysis *P* value; P = heterogeneity *p* value; RAPPER = Radiogenomics: Assessment of Polymorphisms for Predicting the Effects of Radiotherapy; SNP = single nucleotide polymorphism; UGhent = University of Ghent.

†Base position is according to Genome Reference Consortium Human Build 37 (hg19).

‡Minor allele frequency for each is from PRACTICAL Oncoarray samples of European ancestry.

§Imputation info score values in RAPPER are from the cytoSNP12 Array and Oncoarray, respectively; values in Gene-PARE are from the AffySNP6.0 array and OncoArray, respectively; values in all other studies are from the OncoArray.

‖Hazard ratio corresponds to the minor allele with the major allele treated as the reference group.

¶Two-sided P_{meta} was calculated using a Wald test.

#Two-sided heterogeneity *P* value was calculated using a χ^2 test.

**BFPD estimated assuming a prior variance, $W = 0.32^2$, and prior probability of a non-null association .0001.

††Rectal bleeding was assigned a single grade in GenePARE using information across all follow-up assessments, so this outcome was not available for analysis using time-to-event analysis.

‡‡There were only six rectal bleeding events in UGhent. Exclusion of this cohort from meta-analysis had minimal impact on the results: HR = 1.95, 95% CI = 1.58 to 2.41, P_{meta} 6.1×10^{-10}.

§§Decreased urinary stream was not assessed in UGhent.

‖‖Increased urinary frequency and decreased urinary stream were not analyzed in CCI-BT because assessments were not conducted at regular intervals.

¶¶Hematuria was not assessed in CCI-BT.

184 | JNCI J Natl Cancer Inst, 2020, Vol. 112, No. 2

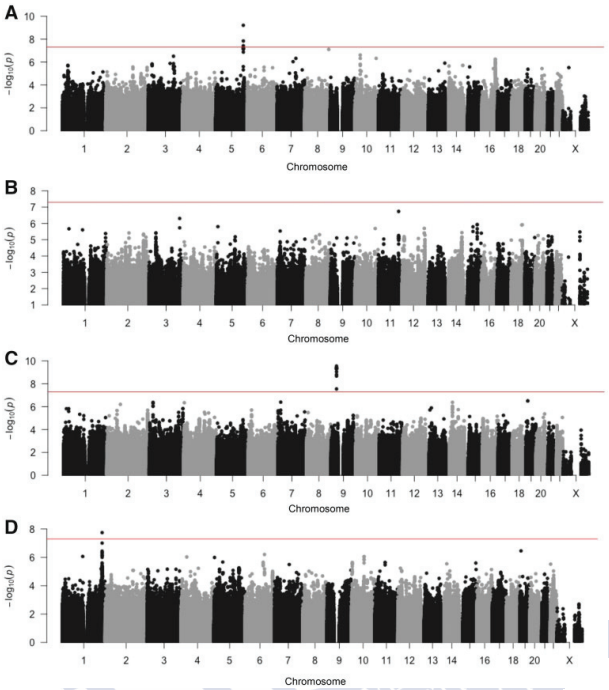


Figure 2. Manhattan plots. The graphs show association results for (**A**) rectal bleeding, (**B**) increased urinary frequency, (**C**) decreased urinary stream, and (**D**) hematuria. The **red line** denotes -log *P* value = 5×10^{-8}. Each **point** represents a single nucleotide polymorphism, with **numbers** on the *x*-axis denoting chromosome number.

ARTICLE

developing radiotoxicity varied by cohort and outcome (Figure 1; Table 1) and agreed with prior reports (9,37–40). As expected, radiotoxicity was higher in patients receiving brachytherapy (1). Lower toxicities were observed in UGhent, possibly due to differences in grading and/or shorter follow-up time. Bivariate Cox models provide evidence that the three urinary toxicities were associated with each other (eg, hazard ratio [HR] = 6.01, 95% confidence interval [CI] = 4.70 to 7.62 for association of decreased urinary stream with increased urinary frequency), whereas no urinary toxicity was associated with rectal bleeding (eg, HR = 0.96, 95% CI = 0.52 to 1.60 for association of decreased urinary stream with rectal bleeding). Meta-analysis Q-Q plots (Supplementary Figure 2, available online) showed no genomic inflation, suggesting population structure was adequately controlled using principal components analysis to restrict the study to European-ancestry individuals. Three independent SNPs reached statistical significance with a BFDP less than 2% (Table 2; Figure 2): rs17055178 with rectal bleeding ($P_{meta} = 6.2 \times 10^{-10}$), rs10969913 with decreased urinary stream ($P_{meta} = 2.9 \times 10^{-10}$), and rs11122573 with hematuria ($P_{meta} = 1.8 \times 10^{-8}$). Variants with minor allele frequency 1%–4% and SNPs falling just short of our criteria, including several variants associated with a secondary endpoint of overall toxicity measured using STAT score (21), are listed in Supplementary Table 3 (available online).

Fine-scale mapping identified CCVs (Figure 3; Supplementary Tables 4 and 5, available online). A second independent signal (tagged by rs147121532, $P_{conditional} = 4.7 \times 10^{-6}$) at chromosome (chr)1: 230337180–231337180 was associated with hematuria. The first signal (tagged by rs11122573, Supplementary Tables 4 and 5, available online) includes 47 CCVs (together explaining 93% of the posterior probability of risk). These CCVs lie in active enhancer- or promoter-like gene-regulatory regions (Supplementary Figure 3A; Supplementary Table 6, available online). Their risk alleles decrease expression of *AGT* (encoding angiotensinogen; ENSG00000135744.7) and *COG2* (encoding conserved oligomeric Golgi complex subunit 2; ENSG00000135775.9) in multiple tissues including arteries (Supplementary Figure 3B, available online). The second signal with 10 CCVs (tagged by rs147121532, explaining 54% of the posterior probability; Figure 3; Supplementary Tables 4 and 5, available online) has risk alleles that decrease expression of *CAPN9* (encoding the intestinal protease, calpain-9; ENSG00000135773.8) and *ARV1* (encoding ARE2 required for viability [ARV1] homolog, fatty acid homeostasis modulator; ENSG00000173409.9). The risk alleles in the second signal were also associated with differential expression of two noncoding (nc) RNAs: decreased expression of ncRNA AL512328.1 (ENSG00000244137.1), which overlaps partially with *AGT* and *CAPN9*, and increased expression of ncRNA LOC101927604

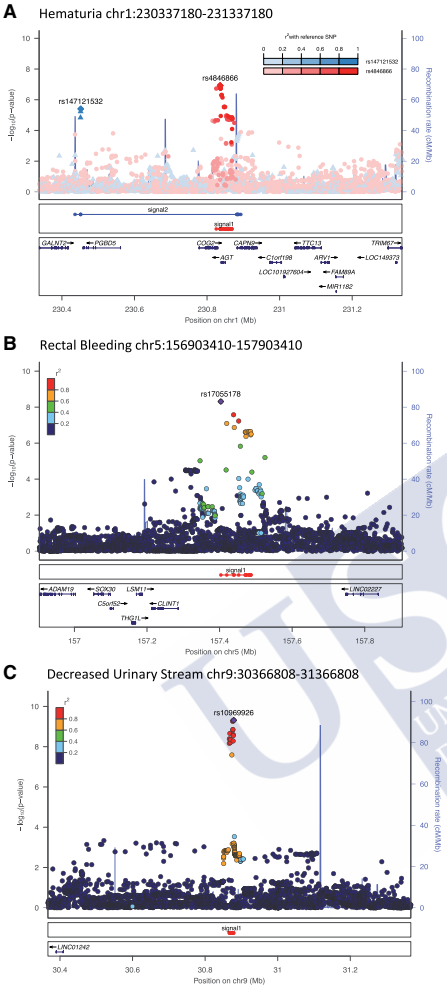


Figure 3. Regional Manhattan plots. The graphs show signals defined by fine-mapping of the (**A**) hematuria risk region chromosome (chr): 230337180–231337180, (**B**) rectal bleeding risk region chr5: 156903410–157903410, and (**C**) decreased urinary stream risk region chr9: 30366808–31366808.

(ENSG00000223393.1). At the chr5: 156903410–157903410 region associated with rectal bleeding, a 15 CCV signal accounts for 98% posterior probability at the region (Figure 3; Supplementary Tables 4 and 5, available online). CCVs in this region overlap active enhancer-like regions in gastrointestinal tissues (Supplementary Figure 3A; Supplementary Table 6, available online), but none were statistically significantly associated with differential gene expression in GTEx (all $P > .05$). At the chr9: 30366808–31366808 region, associated with decreased urinary stream, a single 15 CCV signal accounts for 99% of the posterior probability (Figure 3; Supplementary Tables 4 and 5, available online). None were statistically significantly associated with differential gene expression in the tissues evaluated by GTEx (all $P > .05$).

To explore biological mechanisms underpinning radiotoxicity, we computed gene and pathway scores from the meta-analysis results (Supplementary Tables 7 and 8, available online). Nine pathways were associated ($P < .05$) with multiple toxicities (Supplementary Table 8, available online), suggesting a common biological mechanism. For example, the extracellular matrix pathway from the Biocarta database was associated with increased urinary frequency as well as hematuria; "cytokine signaling in immune system" from the Reactome database was associated both with decreased urinary stream and hematuria.

SNPs previously associated with radiotoxicity were evaluated for replication in the new cohorts (Table 3). Three SNPs showed a consistent association signal (rs17599026 with increased urinary frequency, rs7720298 with decreased urinary stream, and rs1801516 with overall toxicity), although the effect size was attenuated. SNPs in *TANC1* (22) showed inconsistent results.

The new and previously published variants were evaluated in Japanese ancestry cohorts (Supplementary Table 9, available online). In NTMC, the minor alleles of four SNPs (rs10969913, rs17599026, rs7720298, rs7582141) were associated with a non-statistically significantly increased risk of toxicity, with the effect direction consistent with observations in Europeans. The PRRG photon cohort also showed consistent, though nonstatistically significant, association signals for rs10969913 and rs17599026. Associations were not replicated in the PRRG carbon-ion cohort.

Multivariable grouped relative risk models identified independent clinical, dosimetric, and/or comorbidity factors associated with an increased hazard ratio for each toxicity outcome (Table 4). Importantly, SNPs remained independently associated with toxicity and with similar effect sizes in every model. The effect sizes for SNPs were similar to those of established dosimetric or patient-related risk factors. Adjustment for the first seven principal components derived from analysis of European ancestry samples had minimal impact on model parameters. C-statistics show that although model performance was modest, all four models improved slightly with the addition of SNPs (Supplementary Table 10, available online).

Discussion

Our study identified three new genomic regions associated with radiotoxicity. By performing the first radiogenomics fine-mapping study, we identified CCVs in each region and demonstrated two independent signals in the region associated with hematuria. The CCVs in this region were associated with differential expression of local protein coding genes (*AGT*, *COG2*, *CAPN9*, *ARV1*) and nc RNAs (AL512328.1, LOC101927604), pointing toward possible functional mechanisms. For example, *AGT* encoding angiotensinogen is converted to the active enzyme angiotensin II by angiotensin-converting enzyme (ACE). Prior studies suggest angiotensin signaling may influence radiation-induced blood vessel wall injury and interstitial fibrosis (41), and animal and human studies suggest that ACE inhibitors could be radioprotective (42–46). The regions associated with rectal bleeding and decreased urinary stream did not contain CCVs associated with differential expression of nearby genes in

ARTICLE

Table 3. Association results for risk loci identified in prior genetic association studies

Genetic variant and gene symbol	Chr†	Minor allele	MAF‡	Toxicity outcome	Results from prior publication			Meta-analysis of new studies not included in prior publication			
					OR (95% CI)	P_{meta}§	No.	Study, No.	Info*	OR (95% CI)	P_{meta}§
rs17599026 KDM3B	chr5: 137,763, 798	T	0.07	Presence of grade 1+ increased urinary frequency at 2 years after radiotherapy	3.12 (2.08 to 4.69)	4.2×10^{-8}	1564	Meta-analysis	–	1.23 (0.91 to 1.67)	.19
								RAPPER-II, n = 1255	0.96	1.27 (0.90 to 1.80)	
								GenePARE-II, n = 161	0.96	1.10 (0.45 to 2.69)	
								UGhent, n = 281	0.96	1.08 (0.44 to 2.64)	
rs7720298 DNAH5	chr5: 13, 858, 328	G	0.30	Presence of grade 1+ decreased urine stream at 2 years after radiotherapy	2.71 (1.90 to 3.86)	3.2×10^{-8}	1564	Meta-analysis	–	1.37 (1.01 to 1.86)	.05
								RAPPER-II, n = 1255	0.98	1.27 (0.88 to 1.83)	
								GenePARE-II, n = 161	0.98	1.61 (0.92 to 2.82)	
rs1801516 ATM	chr11: 108, 175, 462	A	0.22	Overall toxicity‖¶	1.21 (0.98 to 1.49)	NR	2697	Meta-analysis	–	1.37 (1.05 to 1.78)	.02
								RAPPER-II, n = 859	NA#	1.36 (1.03 to 1.80)	
								GenePARE-II, n = 101	NA#	1.45 (0.63 to 3.34)	
								CCI-BT, n = 82	NA#	1.18 (0.21 to 6.55)	
rs7582141 TANC1	chr2: 159, 899, 489	T	0.02 to 0.05††	Overall toxicity¶	6.17 (2.25 to 16.9)	4.2×10^{-10}	1742	Meta-analysis	–	0.98 (0.52 to 1.86)	.95
								RAPPER-II, n = 1340	0.96	0.56 (0.20 to 1.59)	
								GenePARE-II, n = 220	0.96	0.85 (0.20 to 3.67)	
								UGhent, n = 285	0.96	2.16 (0.71 to 6.53)	
								CCI-BT, n = 114	0.96	NA**	
								CCI-EBRT, n = 148	NA#	0.73 (0.08 to 6.38)	

*Imputation info score values in CCI-EBRT are from the AffySNP6.0 array; values in all other studies are from the OncoArray. CCI-BT = Cross Cancer Institute–Brachytherapy; CC-EBRT = Cross Cancer Institute–External Beam Radiotherapy; Chr = chromosome; CI = confidence interval; GenePARE = Genetic Predictors of Adverse Radiotherapy Effects; MAF = minor allele frequency; NA = not analyzed; NR = not reported; OR = odds ratio; RAPPER – Radiogenomics: Assessment of Polymorphisms for Predicting the Effects of Radiotherapy; SNP = single nucleotide polymorphism; UGhent = University of Ghent.

†Base position according to Genome Reference Consortium Human Build 37 (hg19).

‡Minor allele frequency is from PRACTICAL OncoArray samples of European ancestry.

§Two-sided P_{meta} was calculated using a Wald test.

‖The previously published study included acute as well as late toxicity whereas the current study includes only late toxicity.

¶Overall toxicity was measured using STAT score (21) based on the worst toxicity grade from 2 years to 5 years after the start of radiotherapy. Analysis is adjusted for preradiotherapy STAT score, age, androgen-deprivation therapy, prostatectomy, and total biological effective dose. Analysis in RADIOGEN used genotype data from the Illumina OncoArray whereas the previously published results used genotype data from the Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1 array (22). Additional toxicity follow-up data were available in the current analysis that were not available in the earlier analysis.

#SNP was directly genotyped.

**STAT score was not assessed in CCI-BT because it correlated perfectly with rs7582141 genotype.

††The minor allele frequency for rs7582141 and other SNPs in this locus vary across European subpopulations. The frequency of the C allele is 0.024 in RAPPER-I, 0.022 in RAPPER-II, 0.039 in RADIOGEN, 0.042 in GenePARE-I, 0.046 in GenePARE-II, 0.029 in UGhent, and 0.033 in CCI-EBRT.

Table 4. Multivariable models including SNPs and clinical risk factors. All models are stratified by study

Model	HR (95% CI)	P*
Rectal bleeding†		
rs17055178	1.84 (1.49 to 2.24)	<.001
Rectum volume (cm^3) receiving 65 Gy‡	1.33 (1.08 to 1.63)	.007
Rectum volume (percent) receiving 70 Gy§	1.44 (1.18 to 1.77)	<.001
Arthritis	2.06 (1.12 to 3.48)	.02
Inflammatory bowel diverticular disease	1.80 (1.07 to 2.83)	.03
Rectal dose standard deviation§	1.10 (1.03 to 1.18)	.008
Intestinal volume (percent) receiving 15 Gy¶	1.26 (1.03 to 1.52)	.03
Gleason score ≥7#	1.25 (1.00 to 1.57)	.05
Cardiovascular disease	1.44 (1.01 to 2.02)	.05
Increased urinary frequency**		
rs17599026	1.37 (1.08 to 1.71)	.01
Age at treatment >75††	1.50 (1.16 to 1.92)	.002
Diabetes	1.53 (1.15 to 2.00)	.005
Cardiovascular disease	1.57 (1.04 to 2.31)	.04
Prior pelvic surgery	1.57 (1.06 to 2.24)	.02
Presence of hemorrhoids	1.56 (1.02 to 2.27)	.04
Decreased urinary stream‡‡		
rs10969913	2.23 (1.36 to 3.44)	.002
rs7720298	1.25 (1.05 to 1.48)	.01
Presence of hemorrhoids	2.06 (1.29 to 3.13)	.004
Prior TURP	1.67 (1.13 to 2.39)	.01
Bladder volume (cm^3) receiving 70 Gy§§	1.35 (1.09 to 1.87)	.002
Hematuria‖‖		
rs11122573	1.77 (1.39 to 2.23)	<.001
rs75991123¶¶	1.61 (1.22 to 2.09)	<.001
Prior TURP	2.33 (1.70 to 3.12)	<.001
Bladder volume (%) receiving 74 Gy##	1.29 (1.09 to 1.51)	.003
Receipt of EBRT***	1.92 (1.17 to 3.20)	.01
Age at treatment†††	2.80 (1.21 to 5.91)	.02

*Two-sided P value was calculated using a Wald test. EBRT = external beam radiotherapy; HR = hazard ratio; TURP = transurethral resection of the prostate.

†There were only six rectal bleeding events in UGhent so this cohort was excluded from the model.

‡Variable was log2 transformed and includes a spline knot at 3.0 cm^3, the 25th percentile value. Hazard ratio is per doubling of volume above the 25th percentile value, with reference being values below the 25th percentile.

§Variable was log2 transformed and includes a spline knot at 1.7%, the 75th percentile value. Hazard ratio is per doubling of percent above the 75th percentile, with reference being values below the 75th percentile.

‖This variable is defined as the SD from the mean rectal dose for the standardized rectal volume defined as a solid organ, for each individual patient's dosimetry. It includes a spline knot at 19.7 Gy, the median value. Hazard ratio is per unit above the median value, with reference being values below the median.

¶Variable was log2 transformed and includes a spline knot at 3.3%, the 75th percentile value. Hazard ratio is per doubling of percent above the 75th percentile, with reference being values below the 75th percentile.

#Reference group is Gleason less than 7.

**There were only eight increased urinary frequency events in UGhent so this cohort was excluded from the model.

††Reference group are men 75 years or younger at time of treatment.

‡‡There were only 12 decreased urinary stream events in CCI-EBRT so this cohort was excluded from the model.

§§Variable was log2 transformed. Hazard ratio is per doubling of volume.

‖‖There were only six hematuria events in CCI-EBRT so this cohort was excluded from the model.

¶¶The top SNPs in the second region associated with hematuria, rs147121532, has a minor allele frequency less than 4% and so the next most strongly associated SNP was used in the multivariable model (minor allele frequency 6%).

##Variable was log2 transformed and includes a spline knot at 1.9 cm^3, the median value. Hazard ratio is per doubling of volume above the median value, with reference being values below the median. In UGhent, bladder volume (percentage) receiving 75 Gy was used instead of bladder volume (percentage) receiving 74 Gy.

***Reference group received brachytherapy alone.

†††Age is treated as a continuous variable if older than 75 years. Hazard ratio is per year of age older than 75 years, with reference being men age 75 years or younger.

the available tissue databases and may associate with long-distance gene regulation. The rectal bleeding locus overlaps with active enhancer-like regions in gastrointestinal tissues, and further studies are needed to uncover the functional effects.

Pathway analysis might also identify new mechanisms involved in the pathogenesis of radiotoxicity. For example, the top-ranking pathway associated with hematuria was platelet adhesion to exposed collagen. Platelet adhesion is the first step in the formation of a platelet plug during hemostasis in response to blood vessel wall injury (47). Collagens are involved in the process and some are abundant in vascular epithelia (48). Several collagen-binding proteins are expressed on platelets including integrins (47). Interestingly, the integrin pathway ranked eighth for an association with rectal bleeding.

Our analysis is the largest GWAS of late radiotoxicity. Although heterogeneity across cohorts adds noise and masks statistically significant SNP-toxicity associations, our analysis plan addressed heterogeneity. Use of individual patient data meta-analysis maximizes statistical power when combining information across multiple studies (49,50). In addition, we stratified our multivariable models by study to account for differences in toxicity incidence and other unmeasured covariates that may differ across study populations. Analysis of previously identified risk SNPs provides support for the original discovery because the odds ratios, the best estimate of association, are in the same direction in the new studies. As is commonly observed, the initial effect size estimates for the prior GWAS-identified SNPs were upwardly biased (so-called "winner's curse"), and evaluation here enabled estimation of effect sizes that more likely reflect their true contribution to risk of toxicity. Although unable to replicate the association at 2q24.1 within *TANC1*, it is challenging because of the rarity of minor alleles within Europeans (30). However, ongoing laboratory studies support a role of *TANC1* in radiation response (personal communication from Ana Vega, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain), highlighting the importance of functional studies as complementary to association studies.

The multivariable risk models demonstrate that genetic variants, treatment variables, and other clinical factors are independent predictors for radiotoxicity, supporting the suggestion that common variants can improve traditional normal tissue complication probability models (51,52). Although the c-statistics for our models are modest, SNPs improved model performance. As cohort and sample sizes increase, further GWAS should uncover additional risk SNPs and sequencing studies will uncover rare, possibly high-penetrance, variants. We foresee the eventual incorporation of polygenic scores or gene panel information into integrative models of radiotoxicity that also include clinical risk factors. Although important to continue efforts to identify additional risk SNPs and rare variants, our models are ready for validation, a critical next step toward clinical testing. The REQUITE prospective cohort study (53) of late radiotoxicity will provide an excellent opportunity to test these risk models. In addition, investigators are actively developing novel clinical trial approaches for testing the ability of risk models to personalize treatment and improve outcomes (54). We foresee these models being used, for example, to identify the small proportion of individuals with the highest risk for toxicity who might choose to avoid radiotherapy if watchful waiting or surgery are alternatives; for dose escalation in patients with a low risk of toxicity; and to evaluate how model-directed

188 | JNCI J Natl Cancer Inst, 2020, Vol. 112, No. 2

modification of planned doses to normal tissues affects risk for developing toxicity.

A strength of our study is the prospective longitudinal assessment of toxicity enabling use of time-to-event analysis to maximize information across multiple toxicity assessments. Long-term follow-up is clearly important for radiogenomic studies, and future work should use longitudinal analysis when possible. A second strength of our work is the inclusion of Japanese ancestry cohorts. Most GWAS to date focused on populations of European ancestry, because ethnicity inflates type I error rates and reduces statistical power because of population heterogeneity in allelic effects on a trait (55). It is important to understand how knowledge gained from European populations transfers to other ethnicities. Methods are being developed to detect genetic variants associated with complex traits allowing for population heterogeneity (56). Transethnic studies suggest susceptibility loci for traits are generally shared between European and East Asians (57), and, because of the larger sample size, cross-population meta-analyses increase statistical power to detect novel loci (58). Our cohort sizes are still too small to identify heterogeneity in allelic effects between ethnic groups. However, we performed the first analysis exploring transferability of SNP-radiotherapy toxicity associations across ethnicities.

Limitations include the lack of detailed dosimetry and comorbidity data for all cohorts, although our stratified analysis maximized use of data across all studies for multivariable models. In addition, although this is the largest GWAS of its kind to date, the sample size is modest compared with disease susceptibility GWAS and was powered only to detect SNP-toxicity associations with relatively large effect sizes. Our study was too small for multi-SNP modeling, such as polygenic risk score and machine learning-based methods. The latter were successful for other polygenic traits and diseases (59) and should be reevaluated as larger radiotoxicity cohorts become available. In addition, this study was not designed to identify rare variants associated with radiotherapy toxicity, which requires next-generation sequencing of large cohorts or case-control studies.

In summary, by performing the largest GWAS meta-analysis and first fine-mapping study in radiogenomics, to our knowledge, we identified four new regions associated with radiotoxicity in prostate cancer. We showed the signals affect gene regulation rather than gene coding sequences. This study increases our understanding of the architecture of common genetic variants affecting radiotoxicity and demonstrates that further multinational radiogenomics studies in larger cohorts are worthwhile.

Funding

This work was supported by the US National Institutes of Health (NIH; K07 CA187546 to SLK; SBIR HHSN261201500043C to BSR), the United States Department of Defense (PC140371 to BSR and HO), and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Sklodowska-Curie grant agreement No. 656144. Genotyping via the OncoArray was funded by the NIH (U19 CA 148537 for ELucidating Loci Involved in Prostate cancer SuscEptibility [ELLIPSE] project and X01HG007492 to the Center for Inherited Disease Research [CIDR] under contract number HHSN268201200008I) as well as C8197/A16565. Additional analytic support was provided by NIH NCI U01 CA188392 (PI: Schumacher). RAPPER was supported by Cancer Research UK grants C1094/A18504, C147/A25254, and C147/A25254 and NIHR Manchester Biomedical Research Centre funding. The PRACTICAL consortium was supported by Cancer Research UK Grants C5047/A7357, C1287/A10118, C1287/A16563, C5047/A3354, C5047/A10692, and C16913/A6135; European Commission's Seventh Framework Programme grant agreement No. 223175 (HEALTH-F2-2009–223175); and the NIH Cancer Post-Cancer GWAS initiative grant: 1U19 CA 148537–01 (the GAME-ON initiative). CMLW is supported by the NIHR Manchester Biomedical Research Centre and the EU's 7th Framework Programme Grant Agreement No 601826. GP and MEA's work was also partially supported by NIH grant R01GM114434. RADIOGEN research was supported by Spanish Instituto de Salud Carlos III funding, an initiative of the Spanish Ministry of Economy and Innovation partially supported by European Regional Development FEDER Funds (INT15/00070, INT16/00154, INT17/00133; PI16/00046; PI13/02030; PI10/00164), and through the Autonomous Government of Galicia (Consolidation and structuring program: IN607B) given to AV. DPD was supported by the NIHR Royal Marsden Hospital and Institute of Cancer Research Biomedical Research Centre.

Notes

Affiliations of authors: Departments of Radiation Oncology and Surgery, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY (SLK, MJ); Department of Oncology (LF), and Department of Public Health and Primary Care (LD, GCB, AMD), Centre for Cancer Genetic Epidemiology, Strangeways Research Laboratory, University of Cambridge, Cambridge, UK; Department of Oncology, Cambridge University Hospitals NHS Foundation Trust, Cambridge, UK (GCB, PDPP); Department of Biostatistics and Computational Biology, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY (AB, DRP); Department of Computational Biology, University of Rochester, Rochester, NY (MH); Department of Genetics and Genomic Sciences and Icahn Institute for Data Science and Genomic Technology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY (KH, ADN, MEA, GP); Division of Biostatistics and Bioinformatics, Department of Epidemiology and Public Health, University of Maryland Greenebaum Cancer Center, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore (SMB); Division of Cancer Sciences, the University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Christie Hospital, Manchester, UK (RME, NGB, CMLW); Academic Urooncology Unit, The Institute of Cancer Research and Royal Marsden NHS Foundation Trust, London, UK (DPD, SLG); Clinical Trials and Statistics Unit, The Institute of Cancer Research, London, UK (EH); MRC Clinical Trials Unit at UCL, Institute of Clinical Trials and Methodology, University College London, London, UK (MRS); Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica-Servizo Galego de Saude (SERGAS & Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela, Spain (MEA-B, AV); Department of Radiation Oncology (AG-C, AMC, PP), and Department of Medical Physics (RL-B), Complexo Hospitalario Universitario de Santiago, SERGAS, Santiago de Compostela, Spain; Department of Radiation Oncology (RS), and Department of Urology (NNS), Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY; Departments of Pathology and Genetics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY (HO); Division of

Radiation Oncology, Department of Oncology, Cross Cancer Institute, University of Alberta, Edmonton, Canada (NU, MP); Department of Pathology and Cell Biology, Columbia University, New York, NY (SS); National Institute of Radiological Science, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, Chiba, Japan (HT, TI); Department of Urology, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan (SS); Division of Genetics and Epidemiology, Institute of Cancer Research and Royal Marsden NHS Foundation Trust, London, UK (RE); Departments of Basic Medical Sciences and Radiotherapy, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium (KDR); Grupo de Medicina Xenómica, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain (AV); Departments of Radiation Oncology & Genetics and Genomic Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY (BSR).

The funders had no involvement in the study design, data collection, analysis and interpretation, writing of the report, or the decision to submit the paper for publication. The authors have no conflicts of interest directly related to this study to disclose.

The authors thank the Prostate Cancer Association Group to Investigate Cancer Associated Alterations in the Genome (PRACTICAL) Consortium (http://practical.icr.ac.uk/) for providing genotyping data for studies genotyped using the Oncoarray. We are grateful to the collaborating clinicians for participation in the PRRG study. This work was enabled by the computational resources and staff expertise provided by Scientific Computing at the Icahn School of Medicine at Mount Sinai and the University of Rochester Center for Integrated Research Computing (CIRC).

References

1. Sanda MG, Dunn RL, Michalski J, et al. Quality of life and satisfaction with outcome among prostate-cancer survivors. *N Engl J Med*. 2008;358(12):1250–1261.
2. Wu X, Spitz MR, Amos CI, et al. Mutagen sensitivity has high heritability: evidence from a twin study. *Cancer Res*. 2006;66(12):5993–5996.
3. Safwat A, Bentzen SM, Turesson I, et al. Deterministic rather than stochastic factors explain most of the variation in the expression of skin telangiectasia after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;52(1):198–204.
4. Barnett GC, West CM, Dunning AM, et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(2):134–142.
5. Barnett GC, Thompson D, Fachal L, et al. A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. *Radiother Oncol*. 2014;111(2):178–185.
6. Kerns SL, Kundu S, Oh JH, et al. The prediction of radiotherapy toxicity using single nucleotide polymorphism-based models: a step toward prevention. *Semin Radiat Oncol*. 2015;25(4):281–291.
7. Hauer-Jensen M, Denham JW, Andreyev HJ. Radiation enteropathy–pathogenesis, treatment and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):470–479.
8. Marks LB, Carroll PR, Dugan TC, et al. The response of the urinary bladder, urethra, and ureter to radiation and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31(5):1257–1280.
9. Zelefsky MJ, Levin EJ, Hunt M, et al. Incidence of late rectal and urinary toxicities after three-dimensional conformal radiotherapy and intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;70(4):1124–1129.
10. Schumacher FR, Al Olama AA, Berndt SI, et al. Association analyses of more than 140, 000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. *Nat Genet*. 2018;50(7):928–936.
11. Kerns SL, Dorling L, Fachal L, et al. Meta-analysis of genome wide association studies identifies genetic markers of late toxicity following radiotherapy for prostate cancer. *EBioMedicine*. 2016;10:150–163.
12. Kerns SL, de Ruysscher D, Andreassen CN, et al. STROGAR - STrengthening the reporting of Genetic Association studies in radiogenomics. *Radiother Oncol*. 2014;110(1):182–188.
13. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, et al. Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the STROBE Statement. *Hum Genet*. 2009;125(2):131–151.
14. von Elm E, Altman DG, Egger M, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: Guidelines for reporting observational studies. *Ann Intern Med*. 2007;147(8):573–577.
15. Amos CI, Dennis J, Wang Z, et al. The OncoArray consortium: a network for understanding the genetic architecture of common cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(1):126–135.
16. LENT SOMA scales for all anatomic sites. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31(5):1049–1091.
17. Dearnaley DP, Hall E, Lawrence D, et al. Phase III pilot study of dose escalation using conformal radiotherapy in prostate cancer: PSA control and side effects. *Br J Cancer*. 2005;92(3):488–498.
18. RTOG/EORTC Late Radiation Morbidity Scoring Schema. https://www.rtog.org/ResearchAssociates/AdverseEventReporting/RTOGEORTCLateRadiationMorbidityScoringSchema.aspx. Accessed October 2018.
19. National Cancer Institute. *Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0*. In. *NIH publication # 09-7473*; NCI, NIH, DHHS. May 29, 2009.
20. Barry MJ, Fowler FJ, O'Leary MP, et al. The American Urological Association symptom index for benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1992;148(5 Part 1):1549–1557; discussion 1564.
21. Barnett GC, West CM, Coles CE, et al. Standardized Total Average Toxicity score: a scale- and grade-independent measure of late radiotherapy toxicity to facilitate pooling of data from different studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82(3):1065–1074.
22. Fachal L, Gomez-Caamano A, Barnett GC, et al. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1. *Nat Genet*. 2014;46(8):891–894.
23. Kerns SL, Stock R, Stone N, et al. A 2-stage genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms associated with development of erectile dysfunction following radiation therapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;85(1):e21–e28.
24. Kerns SL, Stock RG, Stone NN, et al. Genome-wide association study identifies a region on chromosome 11q14.3 associated with late rectal bleeding following radiation therapy for prostate cancer. *Radiother Oncol*. 2013;107(3):372–376.
25. Kerns SL, Stone NN, Stock RG, et al. A 2-stage genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms associated with development of urinary symptoms after radiotherapy for prostate cancer. *J Urol*. 2013;190(1):102–108.
26. Burnet NG, Elliott RM, Dunning A, et al. Radiosensitivity, radiogenomics and RAPPER. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2006;18(7):525–528.
27. Ho AY, Atencio DP, Peters S, et al. Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the Gene-PARE project. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;65(3):646–655.
28. Wakefield J. A Bayesian measure of the probability of false discovery in genetic epidemiology studies. *Am J Hum Genet*. 2007;81(2):208–227.
29. Marchini J, Howie B, Myers S, et al. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet*. 2007;39(7):906–913.
30. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68–74.
31. McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol*. 2016;17(1):122.
32. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57–74.
33. Sloan CA, Chan ET, Davidson JM, et al. ENCODE data at the ENCODE portal. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D726–D732.
34. Pruim RJ, Welch RP, Sanna S, et al. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics*. 2010;26(18):2336–2337.
35. Aulchenko YS, Struchalin MV, van Duijn CM. ProbABEL package for genome-wide association analysis of imputed data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:134.
36. Lamparter D, Marbach D, Rueedi R, et al. Fast and rigorous computation of gene and pathway scores from SNP-based summary statistics. *PLoS Comput Biol*. 2016;12(1):e1004714.
37. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, et al. 10-year outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for localized prostate cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(15):1415–1424.
38. Odrazka K, Dolezel M, Vanasek J, et al. Late toxicity after conformal and intensity-modulated radiation therapy for prostate cancer: Impact of previous surgery for benign prostatic hyperplasia. *Int J Urol*. 2010;17(9):784–790.
39. Resnick MJ, Koyama T, Fan KH, et al. Long-term functional outcomes after treatment for localized prostate cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(5):436–445.
40. Syndikus I, Morgan RC, Sydes MR, et al. Late gastrointestinal toxicity after dose-escalated conformal radiotherapy for early prostate cancer: results from the UK Medical Research Council RT01 trial (ISRCTN47772397). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;77(3):773–783.
41. Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA. Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med*. 2010;152(3):159–166.
42. Moulder JE, Fish BL, Cohen EP. Noncontinuous use of angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of experimental bone marrow transplant nephropathy. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19(7):729–735.
43. Molteni A, Moulder JE, Cohen EF, et al. Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II type 1 receptor blocker. *Int J Radiat Biol*. 2000;76(4):523–532.

44. Charrier S, Michaud A, Badaoui S, et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells. *Blood*. 2004;104(4):978–985.
45. Kharofa J, Cohen EP, Tomic R, et al. Decreased risk of radiation pneumonitis with incidental concurrent use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and thoracic radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;84(1):238–243.
46. Wedlake LJ, Silia F, Benton B, et al. Evaluating the efficacy of statins and ACE-inhibitors in reducing gastrointestinal toxicity in patients receiving radiotherapy for pelvic malignancies. *Eur J Cancer*. 2012;48(14):2117–2124.
47. Nuyttens BP, Thijs T, Deckmyn H, et al. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res*. 2011;127(suppl 2):S26–S29.
48. Pugh N, Simpson AM, Smethurst PA, et al. Synergism between platelet collagen receptors defined using receptor-specific collagen-mimetic peptide substrata in flowing blood. *Blood*. 2010;115(24):5069–5079.
49. Cohn LD, Becker BJ. How meta-analysis increases statistical power. *Psychol Methods*. 2003;8(3):243–253.
50. Evangelou E, Ioannidis JP. Meta-analysis methods for genome-wide association studies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2013;14(6):379–389.
51. Tucker SL, Geara FB, Peters LJ, et al. How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on a predictive assay of normal-tissue radiosensitivity? *Radiother Oncol*. 1996;38(2):103–113.
52. El Naqa I, Pandey G, Aerts H, et al. Radiation therapy outcomes models in the era of radiomics and radiogenomics: uncertainties and validation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018;102(4):1070–1073.
53. West C, Azria D, Chang-Claude J, et al. The REQUITE project: Validating predictive models and biomarkers of radiotherapy toxicity to reduce side-effects and improve quality of life in cancer survivors. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2014;26(12):739–742.
54. Azria D, Lapierre A, Gourgou S, et al. Data-based radiation oncology: design of clinical trials in the toxicity biomarkers era. *Front Oncol*. 2017;7:83.
55. Rosenberg NA, Huang L, Jewett EM, et al. Genome-wide association studies in diverse populations. *Nat Rev Genet*. 2010;11(5):356–366.
56. Cook JP, Morris AP. Multi-ethnic genome-wide association study identifies novel locus for type 2 diabetes susceptibility. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(8):1175–1180.
57. Akiyama M, Okada Y, Kanai M, et al. Genome-wide association study identifies 112 new loci for body mass index in the Japanese population. *Nat Genet*. 2017;49(10):1458–1467.
58. Li YR, Keating BJ. Trans-ethnic genome-wide association studies: advantages and challenges of mapping in diverse populations. *Genome Med*. 2014;6(10):91.
59. Pandey G, Pandey OP, Rogers AJ, et al. A nasal brush-based classifier of asthma identified by machine learning analysis of nasal RNA sequence data. *Sci Rep*. 2018;8(1):8826.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA