

Secuenciación de próxima generación. ¿Es la última frontera?

Next-generation sequencing. Is it the final frontier?

»Alejandro Ruiz-Patiño¹



¹Unidad de Genética Clínica/Biobanco-CTIC, Centro de Tratamiento e Investigación sobre Cáncer Luis Carlos Sarmiento Angulo (CTIC), Bogotá, Colombia

Recibido el 06 de septiembre de 2025. Aceptado el 19 de enero de 2026

<https://doi.org/10.51643/22562915.833>

Resumen

La secuenciación de próxima generación (NGS) ha revolucionado la oncología, desde su rol inicial en la secuenciación del genoma humano hasta convertirse en una herramienta esencial para el diagnóstico, la clasificación, el pronóstico y el tratamiento del cáncer. Su historia se remonta a las técnicas de Maxam-Gilbert y Sanger, evolucionando hacia metodologías de alto rendimiento como la secuenciación masiva paralela. Estos avances permitieron la creación de proyectos clave, como el Genoma Humano, TCGA y el Consorcio Internacional del Genoma del Cáncer, que sentaron las bases para una comprensión molecular profunda del cáncer. Hoy en día, el NGS permite identificar alteraciones germinales hereditarias, translocaciones tumorales específicas y mutaciones accionables con implicaciones terapéuticas, y constituye una herramienta fundamental en la oncología de precisión. Además, ha potenciado el uso de biopsias líquidas para evaluar la respuesta al tratamiento, detectar enfermedad mínima residual y anticipar progresiones tumorales. Más allá de la práctica clínica, el NGS ha dado paso a la secuenciación unicelular, lo que ha permitido la caracterización del microambiente tumoral y de la interacción célula a célula, revelando fenómenos biológicos previamente inalcanzables. Finalmente, las tecnologías de secuenciación de tercera generación, como las desarrolladas por PacBio y Oxford Nanopore, ofrecen lecturas largas y detección directa de modificaciones epigenéticas, aunque aún presentan limitaciones técnicas. Estas prometen ampliar aún más el conocimiento genómico del cáncer. Así, el NGS representa no solo una herramienta diag-

* **Autor para correspondencia:** Alejandro Ruiz-Patiño, MD. Unidad de Genética Clínica/Biobanco, Centro de Tratamiento e Investigación sobre Cáncer Luis Carlos Sarmiento Angulo (CTIC), Bogotá, Colombia

Dirección: Calle 168 #14-69.

Correo electrónico: aruiz@fctic.org

<https://doi.org/10.51643/22562915.833>

Asociación Colombiana de Hematología y Oncología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

nóstica, sino también una plataforma en expansión para el futuro de la oncología, que continúa desafiando los límites del conocimiento.

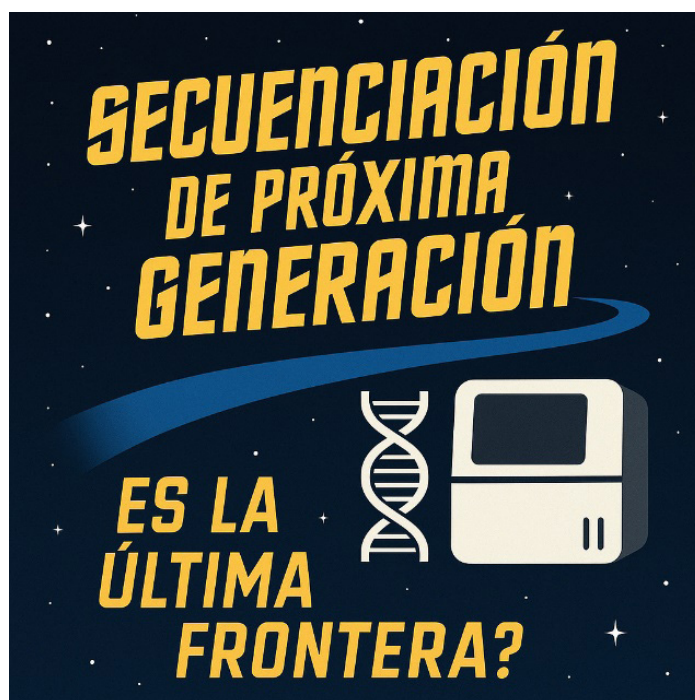
Palabras clave: oncología; genotipificación; secuenciación de próxima generación; genómica.

Abstract

Next-generation sequencing (NGS) has revolutionized oncology, evolving from its origins in early sequencing techniques, such as Maxam-Gilbert and Sanger, into a central tool for cancer diagnosis, classification, prognosis, and treatment. The advent of high-throughput parallel sequencing enabled landmark initiatives such as the Human Genome Project, The Cancer Genome Atlas (TCGA), and the International Cancer Genome Consortium, laying the foundation for a deep molecular understanding of cancer. Today, NGS is routinely used to detect hereditary germline variants, tumor-specific translocations, and actionable mutations, thus guiding targeted therapies in precision oncology. It also enables liquid biopsies for real-time assessment of treatment response, detection of minimal residual disease, and early identification of resistant clones. Beyond its clinical applications, NGS has evolved into single-cell sequencing technologies, offering unprecedented resolution for studying tumor heterogeneity, immune microenvironments, and dynamic cell-cell interactions. These advances have refined existing tumor classifications and uncovered new prognostic and therapeutic biomarkers. Emerging third-generation sequencing platforms, such as those from PacBio and Oxford Nanopore, offer long-read capabilities and direct detection of epigenetic modifications, eliminating the need for PCR amplification. Despite current limitations in error rates and cost, these technologies have already been instrumental in completing previously unsequenced regions of the human genome, suggesting untapped potential in cancer genomics. In summary, NGS has evolved beyond a sequencing tool—it is a continually expanding platform that pushes the frontiers of cancer biology and clinical care, offering hope for more personalized and effective therapies in the future.

Keywords: oncology; genotyping; next-generation sequencing; genomics.

Resumen gráfico



Puntos clave

- Evolución histórica de la secuenciación en oncología: desde las técnicas de Maxam-Gilbert y Sanger hasta la secuenciación masiva paralela, el desarrollo tecnológico ha permitido pasar de secuenciar fragmentos cortos de ADN a analizar genomas completos de forma eficiente y a menor costo.
- La NGS se ha convertido en una herramienta esencial para identificar variantes germinales hereditarias, mutaciones somáticas accionables y biomarcadores como MSI y TMB, transformando el diagnóstico y tratamiento del cáncer.
- La biopsia líquida y el monitoreo dinámico del cáncer: gracias a la alta sensibilidad del NGS, es posible detectar ADN tumoral circulante para evaluar la respuesta al tratamiento, identificar clones de resistencia y estimar la enfermedad mínima residual en tiempo real.
- La secuenciación unicelular y su impacto en la biología tumoral: la secuenciación a resolución celular permite caracterizar la heterogeneidad intratumoral, las poblaciones inmunitarias y la interacción espacial de las células en el microambiente tumoral, aportando nueva información pronóstica y terapéutica.
- El futuro con tecnologías de tercera generación: técnicas emergentes como PacBio y Oxford Nanopore permiten lecturas de larga longitud y análisis epigenéticos sin amplificación por PCR, superando las limitaciones del NGS tradicional y abriendo nuevas fronteras en la genómica oncológica.

Principios de la secuenciación

La secuenciación de próxima generación, o NGS por sus siglas en inglés (Next Generation Sequencing), se ha consolidado como una herramienta fundamental para el diagnóstico, la clasificación y la investigación en el cáncer. Si bien su uso es conocido por la mayoría de las personas que trabajan en esta área, es importante entender su origen y cómo se posicionó como piedra angular del entendimiento molecular del cáncer¹, ya que, antes de la siguiente generación, siempre hubo una tecnología original.

El término secuenciación consiste en determinar, como su nombre lo indica, una secuencia de ADN en regiones genómicas de interés para evaluar el efecto de conductores conocidos, para el descubrimiento de nuevos marcadores o moduladores, o incluso para la determinación de heterogeneidad tumoral al comparar secuencias diferentes dentro de la misma muestra^{2,3}. Uno de los primeros métodos se conoce como la técnica de Maxam y Gilbert, o secuenciación química, que consiste en el clivaje de la secuencia de ADN en diferentes puntos conocidos determinados por su composición química. Una vez se obtenían estos fragmentos, se llevaban a una electroforesis capilar, la cual permitía clasificarlos por tamaño y, dependiendo del tipo de nucleótido al momento del corte, se infería la secuencia⁴. Si bien esta tecnología permitía obtener la secuencia de fragmentos cortos de ADN, su uso resultaba laborioso e ineficiente. En 1977, Frederick Sanger introdujo la secuenciación por terminación de cadenas. En esta metodología, se emplea una polimerasa para elongar la cadena de ADN de interés, pero en la reacción se incorpora una concentración de nucleótidos modificados, conocidos como dideoxinucleótidos (ddNTPs, por sus siglas en inglés), que carecen de grupo hidroxilo en el carbono 3', lo que provoca la terminación de la cadena durante la replicación. Al marcar estas

moléculas con un isótopo radioactivo, correr la reacción en cuatro tubos, cada uno empleando una de las 4 bases modificadas, y correr los fragmentos por electroforesis, similar a la secuenciación química, se podría obtener la secuencia de este fragmento⁵.

Con la modificación de los ddNTPs, al cambiar el marcador radioactivo por uno fluorescente, cada uno de los cuatro con un color diferente; y en vez de correr en columnas individuales, se puede correr la electroforesis en un mismo capilar. A su vez, un láser excita el fluorocromo y una cámara detecta el color del nucleótido estimulado. De esta forma, según el color, se puede caracterizar el nucleótido en cuestión. Esta simplificación de la técnica permitiría optimizar el proceso y, sumada a la invención de equipos de secuenciación automatizada, permitiría conocerla como secuenciación capilar⁶⁻⁸. Si bien la introducción de esta nueva tecnología permitiría incrementar dramáticamente la eficiencia de la secuenciación, cuenta con un límite de hasta 1kb. Esto es producto de un solapamiento de las cadenas a partir de este tamaño y, a su vez, se traduce en la pérdida de la capacidad de diferenciar los nucleótidos⁹. Estas limitaciones hacen que estas técnicas sean consideradas de baja capacidad y se les denomine secuenciación de primera generación.

A pesar de sus inconvenientes, la secuenciación capilar fue la metodología empleada para la secuenciación del genoma humano en sus dos esfuerzos: uno privado, liderado por Celera Genomics bajo dirección de Craig Venter; y otro público, por los institutos de salud de los Estados Unidos (NIH, por sus siglas en inglés), dirigido por Francis Collins. Esta última iniciativa recibió el nombre de Proyecto Genoma Humano en 1990¹⁰. Su origen se remonta a 1985, cuando se planteó la necesidad de crear un genoma humano de referencia durante un taller organizado por Robert Sinsheimer en la Universidad de California, Santa Cruz¹¹. En paralelo,

Renato Dulbecco, presidente del Salk Institute for Biological Sciences, publicaría en *Science* un ensayo traducido al español como “Un punto de inflexión en la investigación sobre el Cáncer: Secuenciando el genoma humano” (Título en inglés: A turning point in cancer research: sequencing the human genome)¹², cimentando las bases de la investigación genómica para el entendimiento del cáncer. Para 1998, Craig Venter, quien había trabajado previamente para el NIH, inicia con fondos de 300 millones de dólares, en contraste con los 3 billones de dólares del proyecto público (Celera Corporation), con la intención de producir la secuencia del genoma de forma más económica y en menos tiempo^{13,14}. La diferencia entre ambas iniciativas no radicaba en la técnica de secuenciación, sino en la forma en que se secuenciaba. Para la iniciativa pública, se utilizaba una técnica jerárquica en la que los cromosomas y fragmentos se secuenciaban en orden (método de clon por clon). Por otro lado, Celera emplearía una técnica conocida como secuenciación paralela o *shotgun sequencing*, en la que el genoma completo se fragmentaría y, mediante bioinformática, se ensamblaría a partir de secuencias que se sobrepusieran en fragmentos más grandes¹⁵. Ambas iniciativas finalizaron la secuenciación para el 2001 y fueron presentadas en *Nature* (la iniciativa pública) y *Science* (la iniciativa privada)^{16,17}. Pero fue hasta el 2003 cuando finalizó el análisis de la secuencia del genoma¹⁶. Considerando el esfuerzo de este megaproyecto de 13 años y 3 billones de dólares, replicar esta iniciativa solo sería posible con el advenimiento de nuevas tecnologías y la reducción de costos.

Interesantemente, por esta época empezaron a realizarse otros descubrimientos sobre genes alterados de forma somática que conducían a procesos oncogénicos. Para 2004, Yardena Samuels y Victor Velculescu, empleando técnicas bioinformáticas, lograron identificar 8 clases, de la I a la III, de las PI3K en el genoma

humano. De estos genes se realizó secuenciación capilar directamente sobre tejido de tumores gástricos, de mama, de pulmón, de cerebro y de colon. Los autores lograron identificar mutaciones recurrentes en los exones 9 y 20 del gen *PIK3CA*, perteneciente a la clase I, que eran somáticas en origen¹⁸. Si bien estudios previos habían logrado identificar mutaciones recurrentes en genes como *KRAS*, estos emplearon técnicas de detección por hibridación y no de secuenciación, como las mencionadas previamente¹⁹. Por otro lado, otros miembros de la misma institución, incluyendo a Velculescu, habían identificado previamente otras mutaciones con técnicas similares a la de este estudio en otras tirosinas quinasas sin embargo estas no tendrían el impacto que las que conocemos para *PIK3CA*²⁰. Ese mismo año, la técnica de Sanger por secuenciación capilar empezó a implementarse para el descubrimiento de alteraciones somáticas de alto impacto. Con los estudios sobre inhibidores de quinasa de tirosina, en los que el gefitinib fue el primero en ser evaluado, los investigadores encontraron que el efecto de estas terapias era bastante escaso. No fue sino hasta encontrar un grupo de pacientes: jóvenes, asiáticas y no fumadoras, quienes tenían un mejor grado de respuesta, que se realizó un análisis somático con secuenciación capilar. De allí se encontraron, en tres grupos independientes al mismo tiempo, las mutaciones de sensibilidad a los inhibidores de EGFR, puntualmente las L858R y las deleciones del exón 19²¹⁻²³. Es pertinente mencionar que, debido a su capacidad, únicamente podían realizarse análisis gen a gen.

Para entonces, los avances en técnicas de secuenciación dieron origen a nuevas metodologías que recibirían la categoría de nueva generación. El principio de todas estas radica en la secuenciación masiva paralela, donde, en vez de determinar por síntesis un fragmento a la vez, se podrían secuenciar miles de fragmentos al tiempo. La primera de estas técnicas

se conoce como la pirosecuenciación y se basa en una reacción fisicoquímica en la que la unión covalente de dos nucleótidos libera un pirofosfato que puede detectarse. Si se alojan miles de secuencias en pozos correspondientes y se les administra nucleótidos conocidos, en el momento en que se libera un grupo fosfato se infiere que la cadena a ser evaluada es complementaria al nucleótido aplicado. Esta tecnología permitió que el primer genoma secuenciado en esta nueva generación costara cien mil dólares en un lapso de dos meses²⁴⁻²⁶. Otras compañías empezaron a desarrollar nuevas técnicas, entre las cuales se destacan la secuenciación por terminadores reversibles, la secuenciación en semiconductores y la secuenciación por ligación o amplificación en círculos o nanobolas. Estos avances dieron origen a la época conocida como la revolución de la genómica, en la que la capacidad de secuenciación se duplicaba cada 5 meses, con una reducción proporcional de costos entre 2004 y 2010²⁷. A pesar de la existencia de diversas tecnologías, Illumina se ha posicionado como líder del mercado. Esta compañía emplea una técnica de amplificación de librería conocida como amplificación en puente, en la que, mediante reacción en cadena de la polimerasa, se crean matrices de fragmentos de alrededor de 200 pares de bases, que se doblan a modo de puentes para su replicación. Para la secuenciación emplean moléculas similares a las ddNTP's sin embargo con un grupo hidroxilo el cual es removido para ligar un fluorocromo, el cual es a su vez removido a la siguiente inserción de base. De esta forma, con cada inclusión de nucleótido, se obtiene una luminiscencia de un color que corresponde a una base; ahora también con las nuevas versiones, con solo dos o un solo color, se puede inferir la base secuenciada²⁸. Para ese momento, con la capacidad adicional de secuenciar a un costo menor, el siguiente paso lógico en el cáncer sería el análisis de los genomas completos de diferentes tumores.

En 2006, el NIH lanza The Cancer Genome Atlas (TCGA) o el atlas genómico del cáncer, un proyecto que buscaba catalogar en un plazo de 3 años varios tipos de tumores. En 2009 se lanzó la fase dos, que permitió analizar más de 30 tipos de tumores hasta 2014. La idea de esta iniciativa, similar al proyecto genoma humano, era la publicación de los resultados para permitir a la comunidad científica hacer uso libre de estos datos. Interesantemente y siguiendo la lógica de la complejidad molecular del cáncer, se incluyeron otros análisis que iban más allá de la secuenciación genómica de los tumores e incluían la secuenciación de ARN, microARNs, variantes de nucleótido único para análisis de fenómenos como pérdida de heterocigocidad, análisis de metilaciones y finalmente, estudios de expresión proteica. Con todas estas herramientas, se amplió la clasificación y el entendimiento de los tumores, dejando claro que la secuencia de ADN, en principio, no es suficiente para el análisis holístico de la enfermedad²⁹. Los datos de esta iniciativa se combinaron con los resultados del Cancer Genome Project lanzado por el Instituto Sanger para el entendimiento de las alteraciones genómicas de los tumores para dar origen, junto con la cooperación de otros países, a la International Cancer Genome Consortium, o consorcio internacional del genoma del cáncer, el cual se puso en marcha en el 2008. Esta iniciativa al igual que el TCGA busca la difusión de la mayor cantidad de contenido genómico con el fin de llevar a la práctica clínica el uso de la genómica³⁰.

El impacto clínico actual de la secuenciación por NGS

Con la publicación de los análisis de los datos de los genomas tumorales, se identificaron 127 genes implicados en procesos comunes a varios tipos de tumor. Entre ellos, se demostró que algunos, como TP53 o BAP1, se asociaban a un

pronóstico más adverso. Estos genes, que recibieron el nombre de *significantly mutated genes* o genes mutados significativos, serían objeto de estudios adicionales y del desarrollo de nuevas moléculas para su tratamiento²⁹. Con el paso de las décadas, el uso de NGS se ha consolidado en la práctica clínica en tres grandes aplicaciones.

La primera, siguiendo la evolución histórica, es la determinación de alteraciones germinales hereditarias en pacientes con cáncer. Este tipo de análisis se ha implementado como una herramienta de rutina, incluso con indicación de testeo universal en pacientes con ciertas patologías, como el cáncer de ovario seroso de alto grado. Mediante estudios, ya sea mediante paneles de genes específicos o mediante secuenciación exómica o genómica completa, se busca identificar una etiología hereditaria del cáncer, determinar riesgos individuales y familiares, así como ofrecer consejería genética sobre decisiones secundarias a estos hallazgos. Si bien la tasa de positividad para síndromes de predisposición al cáncer varía según la patología y los criterios empleados para la selección de pacientes, si se realizara un testeo universal, se estima que entre el 17% y el 23% de todos los pacientes con cáncer presentan una variante patogénica o probablemente patogénica de origen germinal³¹⁻³⁴.

La segunda, al emplear análisis de ARN o incluso del transcriptoma completo mediante NGS, puede identificar translocaciones, que son definitorias de un tipo de tumor. Esto se asocia clásicamente con los tumores de tejidos blandos, donde, por ejemplo, los rearrreglos de EWS y FLI1 permiten el diagnóstico de tumor de Ewing³⁵. Finalmente, y probablemente su uso más relevante en la práctica clínica, es la detección de mutaciones accionables, que determinarán el uso de ciertos medicamentos. Los ejemplos de esto son cada vez más, pero los clásicos incluyen mutaciones de sensibilidad en EGFR en adenocarcinoma pulmonar, muta-

ciones en PIK3CA en cáncer de mama hormosensible, translocaciones de FGFR2 en carcinoma urotelial o rearrreglos de los genes NTRK1-3 en diferentes tipos de tumores, independientemente de su histología. Adicionalmente, aparecen otros marcadores inferidos a partir de la secuenciación de microsatélites, como el MSI (Inestabilidad de microsatélites, por sus siglas en inglés) o la carga mutacional tumoral (TMB), ambos que condicionan un beneficio clínico en pacientes tratados con inmunoterapia³⁶. Estos y otros ejemplos serán abordados en los artículos restantes de este número, que tratan patologías específicas, por lo que invitamos al lector a revisarlos.

Por otra parte, el diagnóstico, al igual que el pronóstico y el tratamiento, no constituye el único aspecto evaluable de la enfermedad. Con el advenimiento de las biopsias líquidas, una herramienta que permite analizar el ADN tumoral en sangre u otros fluidos del paciente, se puede, en principio, evaluar la respuesta del tumor a los tratamientos o incluso si persiste tras un tratamiento definitivo³⁷. Por un lado, en el seguimiento de la respuesta tumoral se puede evaluar si se produce la aparición de clones de resistencia, lo que permite determinar el tratamiento ante la progresión³⁸ o incluso realizar un cambio de tratamiento antes de la presentación de una progresión clínica, interceptando su desarrollo con medicamentos específicos^{39,40}. Todo esto se debe a la versatilidad del NGS y a su capacidad, gracias a su alta profundidad, de identificar copias de ADN a muy baja concentración en el plasma del paciente³⁷. De la misma manera, al aprovechar esta capacidad, podría pensarse que, si la técnica es lo suficientemente sensible como para no detectar ADN tumoral circulante, ello significaría que no hay actividad molecular de la enfermedad. Este concepto recibe el nombre de enfermedad mínima residual o enfermedad molecular residual y se está evaluando en estudios clínicos para definir la necesidad de adyuvancia en cáncer colo-

rectal o definir el pronóstico en cáncer de mama o de pulmón con intención curativa⁴¹⁻⁴⁴.

Con el advenimiento de las vacunas personalizadas y la terapia celular, el NGS se ha posicionado como una herramienta fundamental para su desarrollo. Estas terapias se basan en la creación de productos diseñados para provocar una respuesta inmune contra un antígeno específico, en particular contra la célula tumoral. Para el diseño de estas terapias, se abstraen, mediante secuenciación exómica, genómica o transcriptómica, secuencias únicas del tumor. Se identifican entonces, cambios en el ADN codificante, el cual, al parearse con una muestra germinal del paciente, permite identificar neo antígenos propios de la célula tumoral y de este modo, hacer selección de los mismos para el desarrollo de la terapéutica. Una vez establecida la secuencia de estas nuevas proteínas, se correlaciona con la transcriptómica si estos se encuentran expresados en la célula. Finalmente, mediante una predicción bioinformática, se establece qué de estos péptidos candidatos interactúan con los complejos mayores de histocompatibilidad de los tipos 1 y 2. Con base en estas predicciones de secuenciación, se generan y se administran alrededor de 20 antígenos por vacuna. Es importante resaltar que esta técnica es única para cada paciente⁴⁵.

Más allá de la práctica clínica

Como hemos mencionado previamente, los alcances del NGS nos han permitido la caracterización no solo de la secuencia, sino también de sus consecuencias, de la expresión de los genes mediante la transcriptómica y otros aspectos. Sin embargo, estas mismas técnicas se han aplicado a la resolución unicelular. Tradicionalmente, las células tumorales son lisadas para su contenido genómico ser secuenciado, llevando

a la secuenciación indiferencial del material genómico que se administre. Esta secuenciación en Bulk o al granel, no nos permite diferenciar las células de origen, sus genomas individuales o el comportamiento específico, sino que nos arroja un promedio de las células analizadas. Con el advenimiento de las técnicas de creación de librerías de células únicas, el principio cambia: se marca cada célula con un identificador único, que posteriormente permite aislar la secuencia del exoma, genoma o transcriptoma de cada una y ofrecer resolución a nivel celular. Esto, a su vez, permite establecer la identidad celular de cada una de ellas, así como determinar mutaciones emergentes, los genes activados y las funciones actuales de cada una⁴⁶⁻⁴⁸. Esto ha abierto drásticamente la visión sobre fenómenos tumorales, tales como la interacción del estroma con el tumor, la presencia y el funcionamiento de células del sistema inmunitario en relación con el cáncer, entre otros. A tal punto se ha avanzado que, al combinar el análisis de célula única con la hibridación *in situ*, se puede obtener información no solo de la parte celular, sino también de su componente espacial y temporal⁴⁶. Los usos de estas tecnologías se basan en la experiencia de la secuenciación Bulk, pero pueden refinar aún más los resultados. El caso de cáncer colorrectal, que se había logrado clasificar empleando la clasificación transcriptómica de consenso, pudo ser refinado aún más al incluir dos subcategorías (iCMS2 e iCMS3), que permitieron detectar la presencia de poblaciones epiteliales malignas, correlacionadas con una mayor sensibilidad a la quimioterapia citotóxica estándar. Estas habrían sido indetectables con métodos usuales⁴⁹⁻⁵⁸. En el escenario de la evaluación de respuesta al tratamiento, estudios en diferentes tumores, de los cuales se destaca uno en pacientes con adenocarcinoma de páncreas que habían sido llevados a tratamiento neoadyuvante y posteriormente a cirugía, se evidenció la aparición de diferentes programas celulares tales como la activación de genes asociados a

fenotipos neuroendocrinos y diferenciación de progenitores similares a neurales malignos, ambos, correlacionándose en el tiempo con un pronóstico adverso⁵⁰. En el escenario de la inmunoterapia se han podido caracterizar las diferentes poblaciones linfocitarias y su correlación con la respuesta a inhibidores de punto de control, en asociación con los mecanismos por los cuales se obtiene o se pierde la respuesta. Esto ha permitido demostrar la reactivación de células inmunitarias exhaustas, las cuales se reactivan por efecto de la inmunoterapia, o la aparición de expansiones clonales de linfocitos T citotóxicos infiltrantes tumorales^{51,52}. Al combinar esta capacidad con la evaluación espacial o geográfica del tumor, se identifican regiones en las que la composición celular difiere y su función también varía. Así se pudo encontrar no solamente clonas específicas que realizaban transición epitelio mesénquima, sino que la interacción espacial con células aledañas, era la posiblemente responsable de este fenómeno⁵³.

La última frontera

Todos estos avances se han realizado sobre técnicas de secuenciación de segunda generación, por lo que se plantea si, con la aparición de la tercera generación y las técnicas de secuenciación de molécula única, el alcance de lo que vemos posible puede cambiar. Las metodologías aquí agrupadas se caracterizan por poder realizar secuencias de fragmentos largos, en comparación al NGS que solo permite analizar fragmentos de 150 a 300 pares de bases, sumado a que no requiere de amplificación por PCR. Una de las tecnologías de esta nueva generación fue desarrollada por Pacific Biosciences (PacBio) la cual utiliza una celda de flujo en donde se secuencia la hebra de interés y excita una fluorescencia cada vez que se incorpora un nuevo nucleótido. Adicional al color, se registra la

duración de la misma, en donde las incorporaciones más prolongadas permiten la detección de bases nitrogenadas modificadas, tales como metilaciones. Sumado a que esta tecnología permite la secuenciación de ARN sin necesidad de retro transcripción, como es el caso del NGS, ofrece un flujo simplificado en comparación contra la generación previa^{54,55}. Por otro lado, Oxford Nanopore Technologies emplea un poro insertado en una membrana resistente a corrientes eléctricas que, al aplicarse un potencial eléctrico, permite únicamente el paso de electrones por el poro. Una vez que se prepara una librería para formar una horquilla con el ADN y mantener la estructura de la doble hélice, se pasa la molécula por el poro y se registran los cambios en las corrientes eléctricas, que dependen del nucleótido secuenciado. Esto permite analizar hasta un millón de bases por corrida, sin necesidad de realizar síntesis para determinar la secuencia, a diferencia de las tecnologías previamente discutidas^{56,57}.

Al momento, estas nuevas técnicas no se han implementado de forma masiva en oncología, posiblemente debido a que el NGS es maduro, de bajo costo y con un alto rendimiento. Sin embargo, existen unas limitantes intrínsecas tales como la imposibilidad del NGS de secuenciar fragmentos largos de ADN, sumados a errores producto de la amplificación de PCR y a los llamados falsos positivos durante el ensamblaje de estos fragmentos. Estas dificultades se presentan con una tasa de errores del 5 al 20% con las nuevas tecnologías, por lo que su uso rutinario posiblemente se encuentre en proceso de optimización⁵⁸. La ventaja de las lecturas largas es que permiten una caracterización del genoma mucho más completa, hasta el punto de que fue necesario recurrir a estas tecnologías para completar el 8% del genoma humano que no se había podido secuenciar mediante NGS⁵⁹. Esto indica que existe mucho del genoma de los tumores que, por esta limitante, aún no se conoce ni se comprende si puede o no ser rele-

vante en la práctica clínica futura. Es el equivalente a encontrarnos al borde de ser capaces de viajar a las estrellas habiendo llegado a la Luna. Pero solo con el tiempo sabremos si, con las

tecnologías de tercera generación, podremos conocer audazmente lo que el hombre jamás ha conocido.

Financiamiento Ninguno.

Conflicto de interés El autor declara no tener relaciones de interés comercial o personal en el marco de la investigación que condujo a la elaboración del manuscrito.

Contribución de autoría El autor realizó el diseño de la revisión, la redacción del manuscrito y su revisión final.

Referencias

1. Ghoreyshi N, Heidari R, Farhadi A, Chamanara M, Farahani N, Vahidi M, et al. Next-generation sequencing in cancer diagnosis and treatment: clinical applications and future directions. *Discov Oncol*. [Internet] 2025;16(1):578. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-01816-9>
2. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. [Internet] 2016;534:47–54. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature17676>
3. Griffith M, Miller CA, Griffith OL, Krysiak K, Skidmore ZL, Ramu A, et al. Optimizing cancer genome sequencing and analysis. *Cell Syst*. [Internet] 2015;1(3):210–23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cels.2015.08.015>
4. Gilbert W, Maxam A. The nucleotide sequence of the lac operator. *Proc Natl Acad Sci USA*. [Internet] 1973;70(12):3581–4. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3581>
5. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. [Internet] 1977;74(12):5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
6. Ansorge W, Sproat BS, Stegemann J, Schwager C. A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *J Biochem Biophys Methods*. [Internet] 1986;13(6):315–23. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0165-022x\(86\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0165-022x(86)90038-2)
7. Ansorge W, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M. Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. [Internet] 1987;15(11):4593–602. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/15.11.4593>
8. Hunkapiller T, Kaiser RJ, Koop BF, Hood L. Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science*. [Internet] 1991;254(5028):59–67. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1925562>

9. Al-Shuhaib MBS, Hashim HO. Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. *J Genet Eng Biotechnol*. [Internet] 2023;21(1):115. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00587-6>
10. Hood L, Galas D. The digital code of DNA. *Nature*. [Internet] 2003;421(6921):444–8. <https://doi.org/10.1038/nature01410>
11. Sinsheimer RL. The Santa Cruz Workshop–May 1985. *Genomics*. [Internet] 1989;5(4):954–6. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(89\)90142-0](https://doi.org/10.1016/0888-7543(89)90142-0)
12. Dulbecco R. A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science*. [Internet] 1986;231(4742):1055–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.3945817>
13. Sulston J, Ferry G. The common thread: a story of science, politics, ethics, and the human genome. London: New York: Bantam; 2002. 310 p.
14. Lunshof JE, Bobe J, Aach J, Angrist M, Thakuria JV, Vorhaus DB, et al. Personal genomes in progress: from the human genome project to the personal genome project. *Dialogues Clin Neurosci*. [Internet] 2010;12(1):47–60. Disponible en: <https://doi.org/10.31887/dcns.2010.12.1/jlunshof>
15. Roach JC, Boysen C, Wang K, Hood L. Pairwise end sequencing: a unified approach to genomic mapping and sequencing. *Genomics*. [Internet] 1995;26(2):345–53. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80219-c](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80219-c)
16. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. [Internet] 2001;409(6822):860–921. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/35057062>
17. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. [Internet] 2001;291(5507):1304–51. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(01\)01077-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(01)01077-7)
18. Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle Georget Tex*. [Internet] 2004;3(10):1221–4. Disponible en: <https://doi.org/10.4161/cc.3.10.1164>
19. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*. [Internet] 1987;327(6120):293–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/327293a0>
20. Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Saha S, et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science*. [Internet] 2003;300(5621):949. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1082596>
21. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavata S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. [Internet] 2004;350(21):2129–39. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/nejmoa040938>
22. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. [Internet]

- 2004;304(5676):1497–500. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1099314>
23. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*. [Internet] 2004;101(36):13306–11. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.0405220101>
 24. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. [Internet] 1996;242(1):84–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0432>
 25. Soon WW, Hariharan M, Snyder MP. High-throughput sequencing for biology and medicine. *Mol Syst Biol*. [Internet] 2013;9:640. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/msb.2012.61>
 26. Kircher M, Kelso J. High-throughput DNA sequencing—concepts and limitations. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. [Internet] 2010;32(6):524–36. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/bies.200900181>
 27. Stein LD. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biol*. [Internet] 2010;11(5):207. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-207>
 28. Turcatti G, Romieu A, Fedurco M, Tairi AP. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Res*. [Internet] 2008;36(4):e25. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn021>
 29. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol Poznan Pol*. [Internet] 2015;19(1A):A68–77. Disponible en: <https://doi.org/10.5114/wo.2014.47136>
 30. International Cancer Genome Consortium, Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, et al. International network of cancer genome projects. *Nature*. [Internet] 2010;464(7291):993–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature08987>
 31. Fiala EM, Jayakumaran G, Mauguen A, Kennedy JA, Bouvier N, Kemel Y, et al. Prospective pan-cancer germline testing using MSK-IMPACT informs clinical translation in 751 patients with pediatric solid tumors. *Nat Cancer*. [Internet] 2021;2:357–65. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00172-1>
 32. Ceyhan-Birsoy O, Fiala E, Rana S, Sheehan M, Kennedy J, Yelskaya Z, et al. Universal germline genetic testing in patients with hematologic malignancies using DNA isolated from nail clippings. *Haematologica*. [Internet] 2024;109(10):3383–90. Disponible en: <https://doi.org/10.3324/haematol.2024.285055>
 33. Gray SW, Solomon I, Hampel H, Garcia M, Shaktah L, Dreike S, et al. Universal germline testing for cancer susceptibility and actionable noncancer disorders among 19,842 patients: Initial findings from the City of Hope INSPIRE study. *J Clin Oncol*. [Internet] 2024;42(16_suppl):10594–10594. Disponible en: https://doi.org/10.1200/jco.2024.42.16_suppl.10594
 34. Stadler ZK, Maio A, Chakravarty D, Kemel Y, Sheehan M, Salo-Mullen E, et al. Therapeutic Implications of Germline Testing in Patients

- With Advanced Cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. [Internet] 2021;39(24):2698–709. Disponible en: <https://doi.org/10.1200/JCO.20.03661>
35. Grünewald TGP, Cidre-Aranaz F, Surdez D, Tomazou EM, de Álava E, Kovar H, et al. Ewing sarcoma. *Nat Rev Dis Primer*. [Internet] 2018;4(1):5. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0003-x>
 36. Chakravarty D, Solit DB. Clinical cancer genomic profiling. *Nat Rev Genet*. [Internet] 2021;22(8):483–501. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00338-8>
 37. Ma L, Guo H, Zhao Y, Liu Z, Wang C, Bu J, et al. Liquid biopsy in cancer current: status, challenges and future prospects. *Signal Transduct Target Ther*. [Internet] 2024;9(1):336. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02021-w>
 38. Valenzuela G, Burotto M, Marcelain K, González-Montero J. Liquid biopsy to detect resistance mutations against anti-epidermal growth factor receptor therapy in metastatic colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. [Internet] 2022;14(9):1654–64. Disponible en: <https://doi.org/10.4251/wjgo.v14.i9.1654>
 39. Bidard FC, Mayer EL, Park YH, Janni W, Ma C, Cristofanilli M, et al. First-Line Camizestrant for Emerging ESR1-Mutated Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. [Internet] 2025;393(6):569–80. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/nejmoa2502929>
 40. Bidard FC, Hardy-Bessard AC, Dalenc F, Bachelot T, Pierga JY, de la Motte Rouge T, et al. Switch to fulvestrant and palbociclib versus no switch in advanced breast cancer with rising ESR1 mutation during aromatase inhibitor and palbociclib therapy (PADA-1): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. [Internet] 2022;23(11):1367–77. Disponible en: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.sabcs21-p1-18-16>
 41. Nakamura Y, Watanabe J, Akazawa N, Hirata K, Kataoka K, Yokota M, et al. ctDNA-based molecular residual disease and survival in resectable colorectal cancer. *Nat Med*. [Internet] 2024;30(11):3272–83. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03254-6>
 42. Kasi PM, Aushev VN, Ensor J, Langer N, Wang CG, Cannon TL, et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) for informing adjuvant chemotherapy (ACT) in stage II/III colorectal cancer (CRC): Interim analysis of BESPOKE CRC study. *J Clin Oncol*. [Internet] 2024;42(3_suppl):9–9. Disponible en: https://doi.org/10.1200/jco.2024.42.3_suppl.9
 43. Loi S, Johnston SRD, Arteaga CL, Graff SL, Chandarlapaty S, Goetz MP, et al. Prognostic utility of ctDNA detection in the monarchE trial of adjuvant abemaciclib plus endocrine therapy (ET) in HR+, HER2-, node-positive, high-risk early breast cancer (EBC). *J Clin Oncol*. [Internet] 2024;42(17_suppl):LBA507–LBA507. Disponible en: https://doi.org/10.1200/jco.2024.42.17_suppl.lba507
 44. Marinello A, Tagliamento M, Pagliaro A, Conci N, Cella E, Vasseur D, et al. Circulating tumor DNA to guide diagnosis and treatment of localized and locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev*. [Internet] 2024;129:102791. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2024.102791>
 45. Seclì L, Leoni G, Ruzza V, Siani L, Cotugno G, Scarselli E, et al. Personalized Cancer

- Vaccines Go Viral: Viral Vectors in the Era of Personalized Immunotherapy of Cancer. *Int J Mol Sci.* [Internet] 2023;24(23):16591. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms242316591>
46. Li X, Wang CY. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing. *Int J Oral Sci.* [Internet] 2021;13(1):36. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41368-021-00146-0>
 47. Huang AY, Lee EA. Identification of Somatic Mutations From Bulk and Single-Cell Sequencing Data. *Front Aging.* [Internet] 2022;2:800380. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fragi.2021.800380>
 48. Baslan T, Hicks J. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing. *Nat Rev Cancer.* [Internet] 2017;17(9):557–69. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.58>
 49. Joanito I, Wirapati P, Zhao N, Nawaz Z, Yeo G, Lee F, et al. Single-cell and bulk transcriptome sequencing identifies two epithelial tumor cell states and refines the consensus molecular classification of colorectal cancer. *Nat Genet.* [Internet] 2022;54(7):963–75. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01100-4>
 50. Hwang WL, Jagadeesh KA, Guo JA, Hoffman HI, Yadollahpour P, Reeves JW, et al. Single-nucleus and spatial transcriptome profiling of pancreatic cancer identifies multicellular dynamics associated with neoadjuvant treatment. *Nat Genet.* [Internet] 2022;54(8):1178–91. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01134-8>
 51. Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, Qi Y, Wang C, Kageyama R, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat Med.* [Internet] 2019;25(8):1251–9. Disponible en: <https://doi.org/10.21417/ky2019nm>
 52. Luoma AM, Suo S, Wang Y, Gunasti L, Porter CBM, Nabils N, et al. Tissue-resident memory and circulating T cells are early responders to pre-surgical cancer immunotherapy. *Cell.* 2022;185(16):2918–2935.e29. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.018>
 53. Cui X, Liu S, Song H, Xu J, Sun Y. Single-cell and spatial transcriptomic analyses revealing tumor microenvironment remodeling after neoadjuvant chemotherapeutic therapy in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* [Internet] 2025;24(1):111. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02287-w>
 54. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet TIG.* [Internet] 2018;34(9):666–81. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>
 55. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science.* [Internet] 2009;323(5910):133–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1162986>
 56. Midha MK, Wu M, Chiu KP. Long-read sequencing in deciphering human genetics to a greater depth. *Hum Genet.* [Internet] 2019;138(11–12):1201–15. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02064-y>
 57. Schatz MC. Nanopore sequencing meets epigenetics. *Nat Methods.* [Internet] 2017;14(4):347–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4240>

58. Chen Z, He X. Application of third-generation sequencing in cancer research. *Med Rev* 2021. [Internet] 2021;1(2):150–71. Disponible en: <https://doi.org/10.1515/mr-2021-0013>
59. Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bzikadze AV, Mikheenko A, et al. The complete sequence of a human genome. *Science*. [Internet] 2022;376(6588):44–53. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.abj6987>