

Biopsias líquidas:

Avances tecnológicos para la investigación traslacional en cáncer

Por Carlo César Cortés González
Luis Alonso Herrera Montalvo
José De la Luz Díaz-Chávez
Sócrates Avilés Vázquez
Ximena Irán Cortés Fernández
Arijahir Alexis Mancio-Cárdenas
Javier Rodrigo Prado-Baeza

¿Qué son las biopsias líquidas?

Las biopsias líquidas se definen como el análisis de material derivado de tumores corpusculares (células tumorales circulantes, vesículas extracelulares, plaquetas educadas por el tumor) o moleculares (proteínas y ácidos nucleicos circulantes). El uso de las biopsias líquidas en la práctica clínica de pacientes oncológicos permite identificar con mayor precisión alteraciones clínicamente relevantes que caracterizan el potencial metastásico de los tumores, predecir la respuesta a tratamientos específicos o monitorear activamente la aparición de resistencia. Estas pruebas pueden repetirse potencialmente con la frecuencia que se considere necesaria y pueden detectar la respuesta al tratamiento en tiempo real con molestias mínimas para el paciente (1).

La biopsia líquida ha surgido como alternativa al muestreo quirúrgico tradicional, ubicándose como una prometedora herramienta mínimamente invasiva para el manejo integral del cáncer. En términos generales, las pruebas de biopsias líquidas abarcan el análisis de distintos fluidos corporales, sobresaliendo la sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, exudados y secreciones de pacientes.

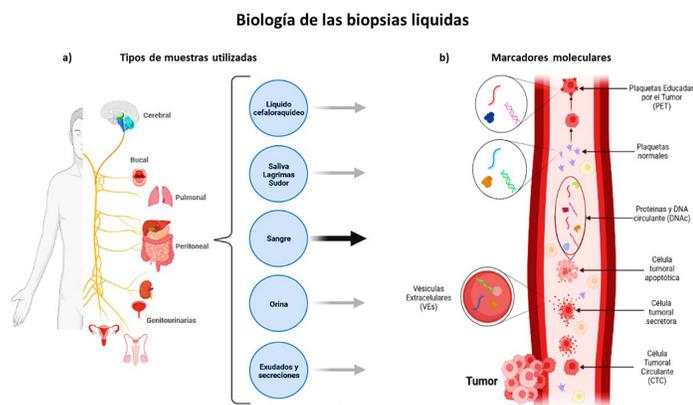


Figura 1. Biología de las biopsias líquidas. En el panel a) se muestran los diferentes tipos de muestras (fluidos

corporales) para la obtención y análisis de biopsias líquidas, incluyendo: sangre, plasma, saliva, líquido cefalorraquídeo y orina. En el panel b) se muestran los biomarcadores moleculares más estudiados: células tumorales circulantes (CTC), vesículas extracelulares (VEs) y biomoléculas circulantes como DNA/RNA y proteínas.

Métodos y herramientas tecnológicas para la obtención y análisis de biopsias líquidas

Protocolos operativos estandarizados para la obtención, preservación y análisis de biopsias líquidas.

La búsqueda de biomarcadores para diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer a través del estudio de biopsias líquidas requiere de estudios longitudinales para analizar muestras de pacientes en distintas etapas de la enfermedad y estudios a gran escala (5). Durante la obtención y análisis de biopsias líquidas son necesarios ciertos cuidados que se prevén a través de la implementación de un protocolo operativo estandarizado, debido a que las muestras biológicas son fácilmente susceptibles de contaminación por DNA genómico, derivado de células lisadas por un manejo no adecuado de la muestra, degradación de ácidos nucleicos y la presencia de inhibidores enzimáticos (2). Dentro de las variables pre-analíticas que influyen en la sensibilidad del análisis de DNAC, son: a) volumen del fluido biológico, b) el tiempo de tránsito, c) los intervalos de tiempo desde la extracción de la muestra hasta el aislamiento de la biopsia líquida, d) el protocolo de separación/centrifugación, e) los métodos de extracción de biomoléculas, y e) temperaturas bajas durante todo el proceso (7).

Tecnologías para el estudio de biopsias líquidas: NGS y ddPCR.

Una de las limitaciones del análisis de biopsias líquidas es la baja presencia de DNA circulante en el plasma de los pacientes, por lo que se requieren de tecnologías de alta sensibilidad para el estudio de biopsias líquidas: la secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés) y la PCR Digital en Gotas (ddPCR).

La NGS es una tecnología de alto rendimiento que puede determinar la secuencia de ácidos nucleicos de genomas completos, exomas (regiones codificantes del genoma) o regiones específicas del genoma. La ventaja que ofrece la NGS es que permite una detección simultánea de mutaciones somáticas. Las desventajas de la NGS son principalmente el costo y el análisis de alteraciones no reportadas, debido a que la NGS genera millones de datos, y el análisis de los datos es uno de los mayores retos (4).

Por su parte, la ddPCR es la tercera generación de PCR que permite realizar una cuantificación absoluta del ácido nucleico, ofreciendo una alta sensibilidad y precisión capaz de distinguir una copia del gen de interés en un fondo de 100,000 copias de otros genes. El fundamento de la tecnología es dividir la reacción de PCR en 20,000 gotas y al final de la reacción contar cada una de estas gotas para evaluar en cuáles hubo emisión de fluorescencia (amplificación) y en cuáles no (3). La principal desventaja de la ddPCR es el número limitado de blancos que se pueden evaluar, hasta 5 blancos y tamizajes de hasta 7 mutaciones (6).

Aplicaciones clínicas de la biopsia líquida en la investigación traslacional del cáncer

En los últimos años se ha mejorado sustancialmente el tratamiento del cáncer debido a la cada vez más frecuente aplicación de la medicina de precisión o personalizada. En este sentido, se ha propuesto que la biopsia líquida puede aportar información complementaria a la biopsia tumoral que aún se considera el gold estándar para el diagnóstico del cáncer. La agencia Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aceptado el uso de la biopsia líquida en algunos tipos de cáncer, donde no es posible obtener una biopsia del tumor (8). Las principales aplicaciones clínicas de la biopsia líquida en la investigación traslacional del cáncer son: a) Diagnóstico temprano del cáncer, b) pronóstico de los pacientes, c) Determinación de la enfermedad mínima residual, y d) Seguimiento de la respuesta al tratamiento (9).

Biopsias Líquidas en el diagnóstico temprano del cáncer

La aplicación de la biopsia líquida como herramienta para el diagnóstico temprano del cáncer se analiza actualmente en varios estudios; sin embargo, existen obstáculos que deben superarse antes de que pueda ser una opción en la práctica clínica. Por ejemplo, en estadios tempranos del cáncer, la presencia de DNA/RNA circulante (DNAC/RNAC), proteínas circulantes y/o células tumorales circulantes (CTC) son casi indetectables. Sin embargo, la especificidad y sensibilidad de estas pruebas puede mejorarse si se combina análisis

de distintos biomarcadores, además de seleccionar el fluido más adecuado para el tipo de tumor; por ejemplo, la orina puede ser una mejor fuente de una biopsia líquida para tumores renales y de vejiga, mientras que el fluido cerebrospinal sería una buena opción para gliomas y otros tumores del cerebro (10).

Biopsias Líquidas en el pronóstico del cáncer

El valor pronóstico de la biopsia líquida se ha evaluado en distintos estudios empleando las CTC y el DNA circulante. En cáncer de mama (CaMa), cáncer colorrectal (CCR) y próstata (CaP), las CTC se asocia a una pobre supervivencia y un mayor riesgo de recurrencia (11). De igual manera, en CaMa, altos niveles de DNAC antes del tratamiento presentan un peor pronóstico y mayor riesgo de recurrencia (12). En CCR el análisis del DNAC puede predecir recaídas de meses antes que los métodos tradicionales, así como la respuesta a la quimioterapia estándar (13, 14).

Biopsias Líquidas para la detección de enfermedad mínima residual.

Actualmente, la recurrencia o metástasis después de la resección del tumor o el tratamiento oncológico es detectable clínica o radiográficamente cuando ya existen miles de millones de células cancerosas, lo que hace improbable la erradicación del cáncer independientemente del tratamiento disponible (15). El uso de la biopsia líquida se ha propuesto como una alternativa atractiva para poder resolver este problema. En este sentido se ha reportado en varios estudios que el análisis de DNAC puede detectar meses antes la recurrencia de la enfermedad comparado con los métodos de imagen usados

actualmente en cáncer de mama, colon, próstata y pulmón (16, 17).

Biopsias Líquidas para monitorear la respuesta al tratamiento.

La biopsia líquida constituye una herramienta útil para el monitoreo de todos los tipos de terapia, así como la respuesta al tratamiento en el cáncer. Por ejemplo, el ensayo “cobas EGFR mutation test v2” fue el primer ensayo de biopsia líquida aprobado por la FDA para pacientes con cáncer de pulmón elegibles para el tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa (18). La prueba “Therascreen PI3KCA RGQ PCR kit” se emplea para analizar mutaciones del gene PI3KCA en pacientes con CaMa positivos para estrógenos y HER2, siendo elegibles para la terapia con un inhibidor de PI3KA (19). Finalmente, en el 2019, la biopsia líquida resulto ser de utilidad para predecir la respuesta a la inmunoterapia dirigida contra PD-L1 en distintos tipos de cáncer (20, 21).

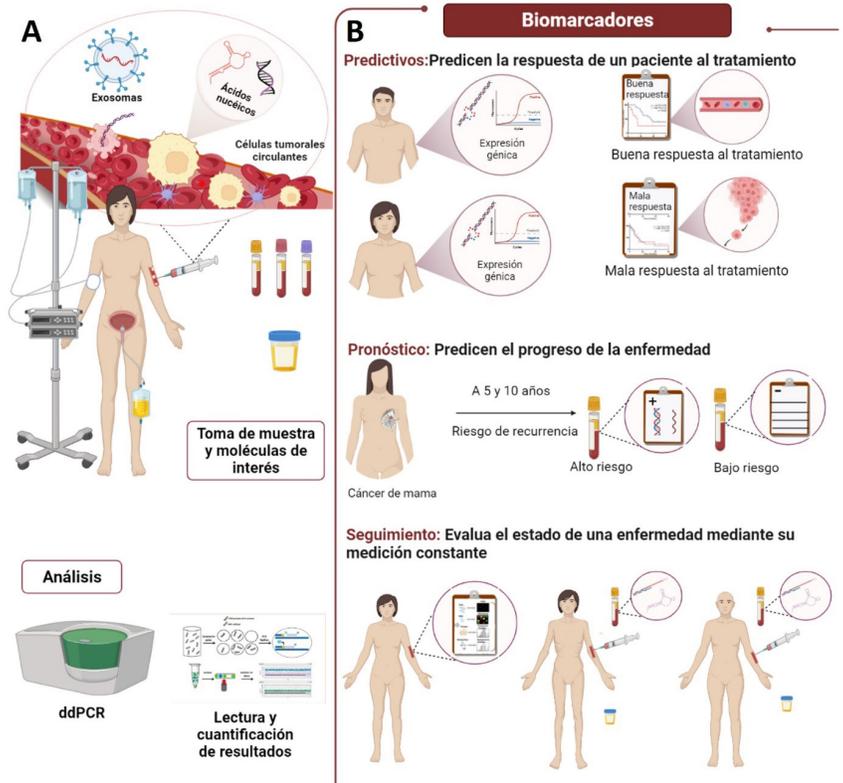


Imagen 2. Biomarcadores predictivos, pronósticos y deseguimiento en pacientes oncológicos.

A) Obtención de biopsias líquidas y análisis de biomarcadores de interés mediante ddPCR o NGS para la creación de perfiles genómicos. B) Principales aplicaciones clínicas de las biopsias líquidas en la investigación traslacional del cáncer.

Conclusiones y Perspectivas

La biopsia líquida es una prueba no invasiva que puede y debe tomarse de forma seriada para obtener un panorama completo del seguimiento y respuesta al tratamiento, a diferencia de la biopsia sólida que es invasiva y no es factible obtenerla de manera repetida. La biopsia líquida es más representativa de la heterogeneidad de los tumores, ya que en circulación podemos encontrar diverso material biológico corpuscular o molecular.

Mediante muestras seriadas, la biopsia líquida permite la detección de nuevas mutaciones generadas durante la selección clonal en el curso de la terapia que pueden ser responsables de la resistencia de las células cancerosas, permitiendo ayudar al médico oncólogo a decidir si hay una mejor terapia para el paciente disponible.

Referencias

1. Ionescu, F.; Zhang, J.; Wang, L. *Clinical Applications of Liquid Biopsy in Prostate Cancer: From Screening to Predictive Biomarker*. *Cancers* 2022, 14, 1728. <https://doi.org/10.3390/cancers14071728>.
2. Alcaide M, Cheung M, Hillman J, Rassekh SR, Deyell RJ, Batist G, Karsan A, Wyatt AW, Johnson N, Scott DW, Morin RD. *Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR*. *Sci Rep*. 2020 Jul 28;10(1):12564. doi: 10.1038/s41598-020-69432-x.
3. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW. *High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number*. *Anal Chem*. 2011 Nov 15;83(22):8604-10. doi: 10.1021/ac202028g.
4. Elazezy M, Joosse SA. *Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management*. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018 Oct 9;16:370-378. doi: 10.1016/j.csbj.2018.10.002.
5. Lommen K, Odeh S, Theije CC, Smits KM. *Biobanking in Molecular Biomarker Research for the Early Detection of Cancer*. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 25;12(4):776. doi: 10.3390/cancers12040776.
6. Olmedillas-López S, Olivera-Salazar R, García-Arranz M, García-Olmo D. *Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology: An Updated Review*. *Mol Diagn Ther*. 2022 Jan;26(1):61-87. doi: 10.1007/s40291-021-00562-2.
7. Rolfo C, Cardona AF, Cristofanilli M, Paz-Ares L, Diaz Mochon JJ, Duran I, Raez LE, Russo A, Lorente JA, Malapelle U, Gil-Bazo I, Jantus-Lewintre E, Pauwels P, Mok T, Serrano MJ; ISLB. *Challenges and opportunities of cfDNA analysis implementation in clinical practice: Perspective of the International Society of Liquid Biopsy (ISLB)*. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020 Jul;151:102978. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102978.
8. U.S. Food and Drug Administration. *FDA Approves Liquid Biopsy Next-Generation Sequencing Companion Diagnostic Test*. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-liquid-biopsy-next-generation-sequencing-companion-diagnostic-test>
9. Martins I, Ribeiro IP, Jorge J, Gonçalves AC, Sarmento-Ribeiro AB, Melo JB, Carreira IM. *Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring*.

- Genes* (Basel). 2021 Feb 27;12(3):349. doi: 10.3390/genes12030349.
10. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, Douville C, Javed AA, Wong F, Mattox A, Hruban RH, Wolfgang CL, Goggins MG, Dal Molin M, Wang TL, Roden R, Klein AP, Ptak J, Dobbyn L, Schaefer J, Silliman N, Popoli M, Vogelstein JT, Browne JD, Schoen RE, Brand RE, Tie J, Gibbs P, Wong HL, Mansfield AS, Jen J, Hanash SM, Falconi M, Allen PJ, Zhou S, Bettgowda C, Diaz LA Jr, Tomasetti C, Kinzler KW, Vogelstein B, Lennon AM, Papadopoulos N. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 2018 Feb 23;359(6378):926-930. doi: 10.1126/science.aar3247.
 11. Reinert T, Schøler LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, Lamy P, Kannerup AS, Mortensen FV, Stribolt K, Hamilton-Dutoit S, Nielsen HJ, Laurberg S, Pallisgaard N, Pedersen JS, Ørntoft TF, Andersen CL. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut*. 2016 Apr;65(4):625-34. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308859.
 12. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, Tacey M, Wong R, Singh M, Karapetis CS, Desai J, Tran B, Strausberg RL, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Gibbs P. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2015 Aug;26(8):1715-22. doi: 10.1093/annonc/mdv177.
 13. Markou A, Tzanikou E, Lianidou E. The potential of liquid biopsy in the management of cancer patients. *Semin Cancer Biol*. 2022 Mar 21:S1044-579X(22)00069-4. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.03.013.
 14. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, Cheang M, Osin P, Nerurkar A, Kozarewa I, Garrido JA, Dowsett M, Reis-Filho JS, Smith IE, Turner NC. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015 Aug 26;7(302):302ra133. doi: 10.1126/scitranslmed.aab0021.
 15. Spindler KL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Circulating free DNA as biomarker and source for mutation detection in metastatic colorectal cancer. *PLoS One*. 2015 Apr 13;10(4):e0108247. doi: 10.1371/journal.pone.0108247.
 16. Chaudhuri AA, Chabon JJ, Lovejoy AF, Newman AM, Stehr H, Azad TD, Khodadoust MS, Esfahani MS, Liu CL, Zhou L, Scherer F, Kurtz DM, Say C, Carter JN, Merriott DJ, Dudley JC, Binkley MS, Modlin L, Padda SK, Gensheimer MF, West RB, Shrager JB, Neal JW, Wakelee HA, Loo BW Jr, Alizadeh AA, Diehn M. Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer Discov*. 2017 Dec;7(12):1394-1403. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0716.
 17. Kwapisz D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Ann Transl Med*. 2017 Feb;5(3):46. doi: 10.21037/atm.2017.01.32.
 18. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, Iwata H, Conte P, Mayer IA, Kaufman B, Yamashita T, Lu YS, Inoue K, Takahashi M, Pápai Z, Longin AS, Mills D, Wilke C, Hirawat S, Juric D; SOLAR-1 Study Group. Apellisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019 May 16;380(20):1929-1940. doi: 10.1056/NEJMoa1813904.
 19. US Food and Drug Administration. theascreen PIK3CA RGQ PCR kit. FDA https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/P190004A.pdf (2019).
 20. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, Yu Z, Yang J, Wang B, Sun H, Xia H, Man Q, Zhong W, Antelo LF, Wu B, Xiong X, Liu X, Guan L, Li T, Liu S, Yang R, Lu Y, Dong L, McGettigan S, Somasundaram R, Radhakrishnan R, Mills G, Lu Y, Kim J, Chen YH, Dong H, Zhao Y, Karakousis GC, Mitchell TC, Schuchter LM, Herlyn M, Wherry EJ, Xu X, Guo W. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2018 Aug;560(7718):382-386. doi: 10.1038/s41586-018-0392-8.
 21. Hofman P, Heeke S, Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy in the era of immuno-oncology: is it ready for prime-time use for cancer patients? *Ann Oncol*. 2019 Sep 1;30(9):1448-1459. doi: 10.1093/annonc/mdz196.

AUTORES

Carlo Cortés-González*1, Herrera LA2, José Díaz-Chávez1, Sócrates Avilés-Vázquez3, Ximena Cortés-Fernández1, Alexis Mancio-Cárdenas1, Javier Prado-Baeza1

*Autor para correspondencia: Carlo César Cortés-González, ccortes@biomedicas.unam.mx

Dr. Carlo César Cortés González
Investigador en Ciencias Médicas
Responsable de la Unidad de PCR Digital
Instituto Nacional de Cancerología, SSA.
Sistema Nacional de Investigadores Nivel I
Línea de Investigación: Biomarcadores moleculares,
Onco-Nefrología, y Respuesta al Estrés Celular en Cáncer.
ccortes@biomedicas.unam.mx
Teléfono 5519350292

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo
Investigador Titular C Tiempo Completo
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Sistema Nacional de Investigadores Nivel III
Departamento Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Línea de Investigación: Alteraciones epigenéticas relacionadas con la inducción de inestabilidad cromosómica.
herreram@biomedicas.unam.mx

Dr. José De la Luz Díaz-Chávez
Investigador en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Cancerología, SSA.
Sistema Nacional de Investigadores Nivel II
Línea de Investigación: Regulación de la expresión de oncogenes y genes supresores de tumor por mutantes de p53.
jdiazchavez03@gmail.com

Dr. Sócrates Avilés Vázquez
Field Application Specialist II México/Latinoamérica, BioRad.
Experiencia en herramientas de biología molecular: CRISPR/CAS9, CAR T Cell Therapy, Biopsias Líquidas, PCR digital, Citometría de Flujo.
socratesav@yahoo.com.mx

IBT. Ximena Irán Cortés Fernández
Ingeniera en Biotecnología por la UTEM.
Estudiante de Maestría en Ciencias Biológicas en el Instituto Nacional de Cancerología, SSA.
Línea de Investigación: Biomarcadores Moleculares, e Investigación Traslacional en Pacientes con Sarcoma.
ximenairan7@gmail.com

QFB. Arijahir Alexis Mancio-Cárdenas
Químico por la Facultad de Química, UNAM.
Estudiante de Maestría en Ciencias Biológicas en el Instituto Nacional de Cancerología, SSA.
Línea de Investigación: Respuesta al Estrés Celular en Cáncer y Biomarcadores Moleculares en Cáncer Renal.
alexismancio@hotmail.com

M. en C. Javier Rodrigo Prado-Baeza
Biólogo por la FES Iztacala, UNAM.
Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas en el Instituto Nacional de Cancerología, SSA.
Línea de Investigación: Respuesta al Estrés Celular e Investigación Biomédica en Cáncer.
javier_pbaeza@comunidad.unam.mx