



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**BIOPSIA LÍQUIDA: FUNDAMENTO DE LA
TÉCNICA Y APLICACIÓN EN TUMORES
HEMATOLÓGICOS**

Autor: Alba Cano Rodríguez

Fecha: Junio 2019

Tutor: María Linares Gómez

ÍNDICE

1. RESUMEN Y ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Fundamento de la biopsia líquida	5
2.2 Procedimiento y técnicas	7
2.3 Aplicación en oncología	9
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
5.1 Linfomas	12
5.2 Mieloma múltiple	13
5.3 Leucemia linfoide	14
5.4 Leucemia mieloide	15
5.5 Síndrome mielodisplásico	16
6. CONCLUSIONES	17
7. BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

La biopsia líquida es una técnica que consiste en la detección de células, material genético, proteínas y exosomas procedentes de un tumor en sangre periférica. Sólo se requiere una muestra de sangre para realizar esta prueba, lo que la convierte en una técnica mínimamente invasiva que nos aporta información sobre la totalidad de un tumor. La biopsia líquida es capaz de solventar los problemas que acarrea una biopsia tisular tales como: dificultad a la hora de acceder al tejido tumoral, riesgo para el paciente, muestra no representativa de la totalidad del tumor u obtención de poca muestra. A través de la sangre periférica se obtiene el ADN circulante o cfDNA y posteriormente mediante técnicas de análisis y secuenciación se buscan mutaciones relacionadas con determinadas neoplasias.

En este trabajo se realizó una revisión de ensayos clínicos que comprobaron la eficacia de la biopsia líquida empleando cfDNA en la búsqueda de mutaciones asociadas a linfomas, mieloma múltiple, leucemia linfoide, leucemia mieloide y síndrome mielodisplásico. Todos los estudios demostraron que las mutaciones presentes en muestras de tejido también lo están en cfDNA, estos resultados aventuran que la biopsia líquida es una herramienta útil para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades hemato-oncológicas, dando resultados equiparables y en algunos casos más sensibles que la biopsia tisular.

ABSTRACT

Liquid biopsy is a technique which consists on the detection of cells, genetic material, proteins and exosomes coming from a peripheral blood tumor. It is only required a blood sample to perform this test, what makes it a minimally invasive technique that gives us information about the totality of a tumour. Liquid biopsy is capable of solving the problems resulted by tissue biopsy such as: difficulty at the time of accessing tumour tissue, patient hazard, a non representative sample of the whole tumour or obtaining a short one. Through peripheral blood is obtained circulating free DNA (cfDNA) and later by means of analysis and sequencing techniques, mutations related to certain neoplasms are sought.

In this paper it is performed a review of clinical trials that verified the effectiveness of liquid biopsy using cfDNA for the search for mutations associated with lymphomas, multiple myeloma, lymphoid leukemia, myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. All the studies showed that the mutations present in tissue samples are also in cfDNA, this results adventure that liquid biopsy is an useful tool for diagnosis, prognosis and monitoring of hemato-oncological diseases, showing comparable results and in some cases more sensitive than tissue biopsy.

2. INTRODUCCIÓN

La oncología engloba una gran complejidad molecular, celular y clínica que pone de manifiesto la necesidad de conocer en qué situación se encuentra un paciente para así poder optar por la mejor terapia ya que los tratamientos tumorales tienen un estrecho margen terapéutico. Para ello son necesarias técnicas sensibles, fiables y específicas.

La biopsia líquida es una nueva herramienta de gran valor en el campo oncológico que consiste en la detección en sangre de células tumorales y también de los ácidos nucleicos, proteínas y exosomas asociados a dichas células.

La biopsia líquida es considerada un marcador de diagnóstico, de pronóstico y predictivo. Permite diagnosticar la enfermedad mediante la detección en sangre de material genético o células procedentes del tumor, comprobar si una persona está curada (si no hay presencia de material genético ni de células tumorales en sangre) o si por el contrario padece la enfermedad mínima residual, evaluar el efecto del tratamiento midiendo a tiempo real las fluctuaciones de material genético procedente del tumor y detectar posibles alteraciones genéticas que indiquen resistencias a los fármacos empleados. Todo ello con una extracción de sangre ¹.

Hasta el momento la técnica existente era la biopsia tradicional, que consiste en extraer una muestra del tejido tumoral y analizarlo mediante histoquímica o inmunohistoquímica, suponiendo una práctica muy invasiva y en ocasiones arriesgada para el paciente. De las limitaciones de la biopsia tradicional (dificultad para obtener el tejido, muestra poco representativa de la heterogeneidad del tumor y dificultad o incapacidad para obtener muestras seriadas a medida que avanza el tratamiento) emergen las ventajas de la biopsia líquida, en la siguiente tabla exponemos una sencilla comparación entre ambas técnicas²:

Características	Biopsia líquida	Biopsia tisular
Técnica invasiva	No	Si
Riesgo para el paciente	No	Si
Hospitalización	No	En función de la localización del tumor
Idónea para repetir la técnica	Si	No
Tiempo de procesamiento	Bajo	Alto
Coste	Medio	Alto
Idónea para monitorización del tratamiento	Si	No
Idónea para detectar mutaciones raras	Si	No
Tasa de fallo en la toma de muestra	Bajo	En función de la localización del tumor

Estabilidad de la muestra	Alta	Necesita ser procesada
----------------------------------	------	------------------------

Figura 1: Tabla comparativa de las características de la biopsia líquida y la biopsia tisular ³.

erios de
se debe

considerar una biopsia líquida?

- Cuando el tumor se encuentra en un lugar de difícil acceso por el riesgo que entraña o ha generado metástasis en dichos lugares, generalmente estas localizaciones de difícil acceso son pulmón, cerebro o hueso.
- Se da una situación en la que el paciente se niega a que le practiquen una biopsia tisular.
- Se nos presenta una situación en la que el paciente no responde al tratamiento y necesitamos monitorizar el tratamiento y conocer a qué mutaciones o posibles resistencias nos enfrentamos.
- Se ha realizado una biopsia tisular pero no se ha obtenido una cantidad de muestra suficiente.

2.1 FUNDAMENTO DE LA BIÓPSIA LÍQUIDA: PRESENCIA DE MATERIAL GENÉTICO TUMORAL EN SANGRE PERIFÉRICA

En sangre periférica podemos encontrar un excelente marcador tumoral que es el material genético tumoral circulante (generalmente DNA), lo definimos como un excelente marcador porque nos ofrece la posibilidad de conocer mutaciones comunes y no tan comunes que sabemos que están presentes en determinados tumores. Además este material genético procede de distintas localizaciones del tumor, lo que muestra la heterogeneidad del mismo. Este DNA que circula en sangre periférica puede tener distintas fuentes de origen: células tumorales en circulación o CTC, exosomas y ácidos nucleicos en circulación conocidos como ADN circulante o *Circulating free DNA* (cfDNA) ⁴.

Células tumorales en circulación (CTC):

Las células tumorales circulantes o CTCs son células presentes en sangre periférica que proceden del tumor primario o de sus metástasis. Pese a encontrarse en una baja cantidad estas células constituyen un sensible marcador tumoral y cada vez se vinculan más a la detección precoz, diagnóstico, monitorización y pronóstico del cáncer. Por este hecho nace la necesidad de encontrar técnicas capaces de detectar estas células así como su heterogeneidad. Además estas células circulantes pueden instaurarse en un nuevo tejido y ser las responsables de nuevas metástasis ⁵. Así mismo se puede apreciar su potencial marcador observando las curvas de supervivencia en función del número de CTCs, viendo que a mayor número de CTCs menor es el porcentaje de supervivencia.

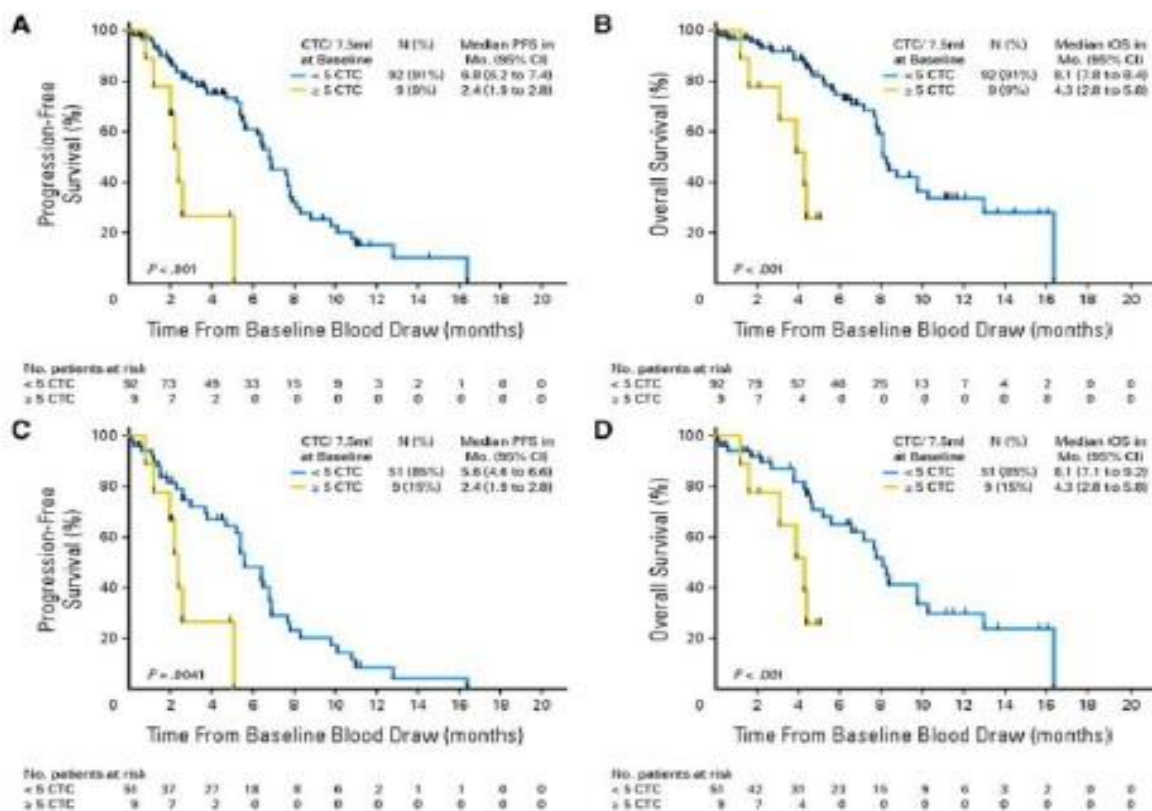


Figura 2: Curvas de supervivencia en función del número de CTCs

Supervivencia libre de enfermedad y global en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico estadio III-IV (A y B) y solo estadio IV (C y D) en función del número de células tumorales detectadas en sangre (más –azul– o menos de 5 –amarillo–) ⁶.

Exosomas:

Los exosomas son unas vesículas de pequeño tamaño (30-150 nanómetros) que se liberan activamente por las todas células, pero recientemente se ha demostrado que las células tumorales liberan exosomas en mayor cantidad. Actúan como mensajeros intercelulares y contienen DNA, RNA y proteínas de su célula de origen. Mediante estos exosomas el tumor puede enviar agentes que destruyan un tejido para facilitar la metástasis, factores que promuevan la angiogénesis e incluso transformar células sanas en tumorales a través de los micro-ARNs. El empleo de exosomas en el campo de la biopsia líquida aún no está muy desarrollado pero comienza a dar sus primeros pasos ⁷.

ADN circulante (cfDNA):

Durante la necrosis y la apoptosis las células tumorales así como las células normales liberan diversos ácidos nucleicos (ADN, ARNm y microARN) a sangre periférica, a dicho DNA es al que denominamos cfDNA. Los niveles de cfDNA en sangre periférica varían de 30 ng/ml en sujetos sanos a 180 ng/ml en pacientes oncológicos, de modo que aunque otras situaciones patológicas tales como infección, trauma o trasplantes pueden provocar un aumento en los niveles de cfDNA, su presencia en sangre cuando existen tumores es muy acusada. Actualmente es la fuente de material genético tumoral que más se emplea en la biopsia líquida ⁸.

El cfDNA procedente de tumores, es decir el ADN circulante tumoral se denomina ctDNA y está formado por fragmentos cortos de ADN de doble cadena (<200 pares de bases) que se recolectan de todos los sitios del tumor, siendo con ello un reflejo de su complejidad y heterogeneidad. La vida media de este DNA circulante es corta, ya que se sufre aclaramiento hepático y renal, por lo que nos permite obtener una imagen prácticamente instantánea del genoma del tumor.

Podemos obtener este cfDNA de plasma o de suero. El cfDNA de plasma es principalmente de origen hematopoyético y el suero contiene 2-24 veces más cfDNA pero el cfDNA del suero se origina a causa de una contaminación por ADN genómico procedente de la zona de lisis celular. Por tanto encontramos más cfDNA en suero pero este es más variable y por este motivo la muestra preferida es plasma mientras que el suero se reserva para estudios retrospectivos ⁹.

2.2 BIOPSIA LÍQUIDA: PROCEDIMIENTO Y TÉCNICAS

Una vez que hemos obtenido las distintas fuentes de material genético tumoral (CTC, exosomas o cfDNA) debemos extraerlo.

En el caso de las CTCs se purifican, se aíslan y se procede a su lisis para obtener DNA y RNA. El cfDNA se purifica y se aísla en distintos pasos, para ello cada laboratorio cuenta con una serie de kits de extracción que contienen tanto los materiales como los procedimientos necesarios. Para obtener DNA procedente de exosomas se emplea generalmente métodos de ultracentrifugación y precipitación, posteriormente se purifican por afinidad empleando un antígeno de superficie ¹⁰.

En la siguiente figura se plasma un esquema de estos procesos de extracción, aislamiento y purificación de cfDNA.

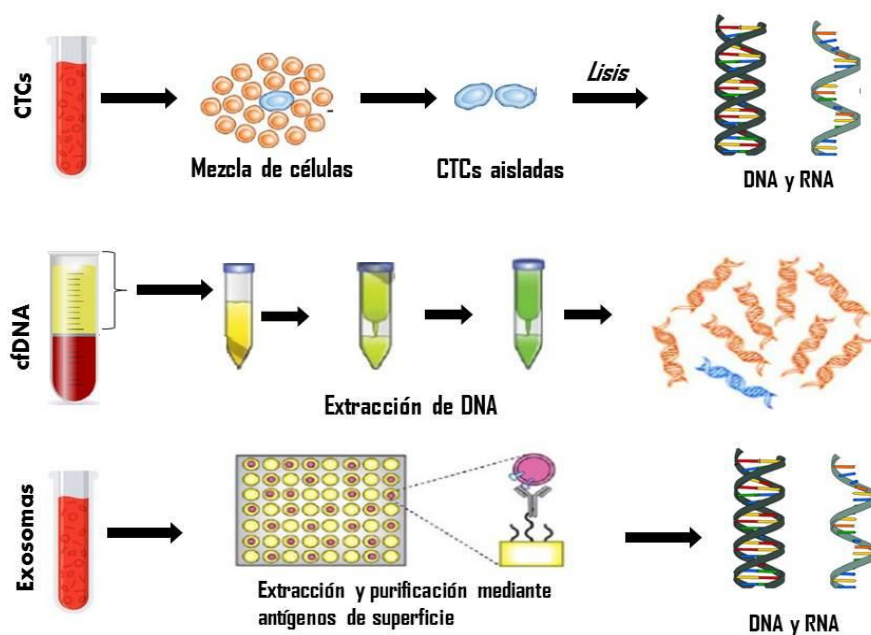


Figura 3: Proceso de extracción de material genético tumoral a partir de sus fuentes¹¹

Cuando ya tenemos el ADN tumoral el siguiente paso es proceder a su análisis. Con el análisis de este ADN podemos conocer información sobre el tumor de origen así como posibles mutaciones presentes en sus células. Es así como a partir de una muestra de sangre podemos obtener valiosa información acerca de la respuesta al tratamiento, diagnóstico, pronóstico y evolución. Si se conoce o se sospecha acerca de una mutación concreta se puede emplear una PCR a tiempo real o final para verificarlo. Si por el contrario no se conoce la mutación se opta por la secuenciación¹².

Actualmente la secuenciación de este DNA tumoral recae en las técnicas de secuenciación de nueva generación o NGS. Estas técnicas han supuesto una verdadera revolución a la hora de llevar la biopsia líquida a la práctica clínica gracias a su rapidez, sensibilidad y coste. La secuenciación de nueva generación consiste en una serie de técnicas de secuenciación masiva que se caracterizan por permitir analizar en paralelo multitud de secuencias de ADN. Para realizar esta técnica se toma la secuencia que se desea conocer, se amplifica (no se puede secuenciar una única molécula, precisa de varias copias) mediante una PCR y finalmente se pone en marcha alguna de las técnicas de NGS comercializadas que definiremos a continuación ¹³. La PCR que empleamos como paso previo a la secuenciación puede ser de dos tipos: el primer tipo es la PCR en emulsión que consiste en encapsular el ADN en nanosferas de manera que cuando se realice la PCR las copias queden adheridas a la superficie de dicha nanosfera. El segundo tipo es la PCR puente, se realiza en un soporte que contienen oligonucleótidos complementarios a cada hebra monocatenaria que se va a amplificar, de manera que cada fragmento monocatenario se une mediante sus dos extremos a un adaptador con el oligonucleótido complementario formando puentes. Tras la amplificación tendremos distintas copias adheridas a la superficie metálica dando lugar a las agrupaciones conocidas como *clusters* ¹⁴. El siguiente paso, tras la amplificación, es la secuenciación para lo que puedes emplean las distintas técnicas englobadas en el término NGS entre las que destacan ¹⁵:

- SOLID: Se trata de una técnica que lleva a cabo una secuenciación por ligación, en su salida al mercado captó el interés de muchos investigadores pero poco después se dieron cuenta de que esta técnica tiene un gran inconveniente: genera secuencias muy cortas (de unos cincuenta pares de bases) lo que da lugar a una alta tasa de error ¹⁶.
- 454 Life Sciences: Se trata de una tecnología basada en la pirosecuenciación que consiste en detectar mediante quimioluminiscencia el pirofosfato liberado cuando la cadena complementaria se elonga, de esta manera conseguimos una secuenciación prácticamente instantánea. Entre sus ventajas destaca que es capaz de analizar secuencias grandes de hasta setecientos pares de bases en un tiempo relativamente corto, sus limitaciones se fundamentan en el alto coste de la técnica y en la baja sensibilidad a la hora de detectar homopolímeros ¹⁶.
- Ion Torrent Sequencing: Esta técnica lleva a cabo una secuenciación mediante un ión semiconductor. Cada vez que un nucleótido se incorpora a la cadena se liberan protones que hacen que cambie el pH del medio, para discernir que nucleótido se ha incorporado se realizan varios ciclos incorporando los distintos nucleótidos conocidos de manera que se asocia a cada uno de ellos un valor de pH. Esta técnica presenta muchas limitaciones a la hora de secuenciar grandes fragmentos,

pero en secuenciaciones a menor escala o en el análisis de exomas aporta grandes ventajas en materia de diagnóstico por su calidad, precio y rapidez ¹⁶.

- Illumina: Se basa en la denominada secuenciación por síntesis, para ello se van incorporando nucleótidos marcados por fluoróforos, estos fluoróforos son capaces de parar la elongación de manera reversible de modo que cada vez que se incorpore un nucleótido será detectado por su fluoróforos y una vez eliminado este podremos seguir con la elongación. Actualmente es una de las técnicas más utilizadas ya que pese a requerir una gran inversión inicial aporta resultados rápidos, económicos y de calidad además de permitir lecturas muy largas ¹⁶.

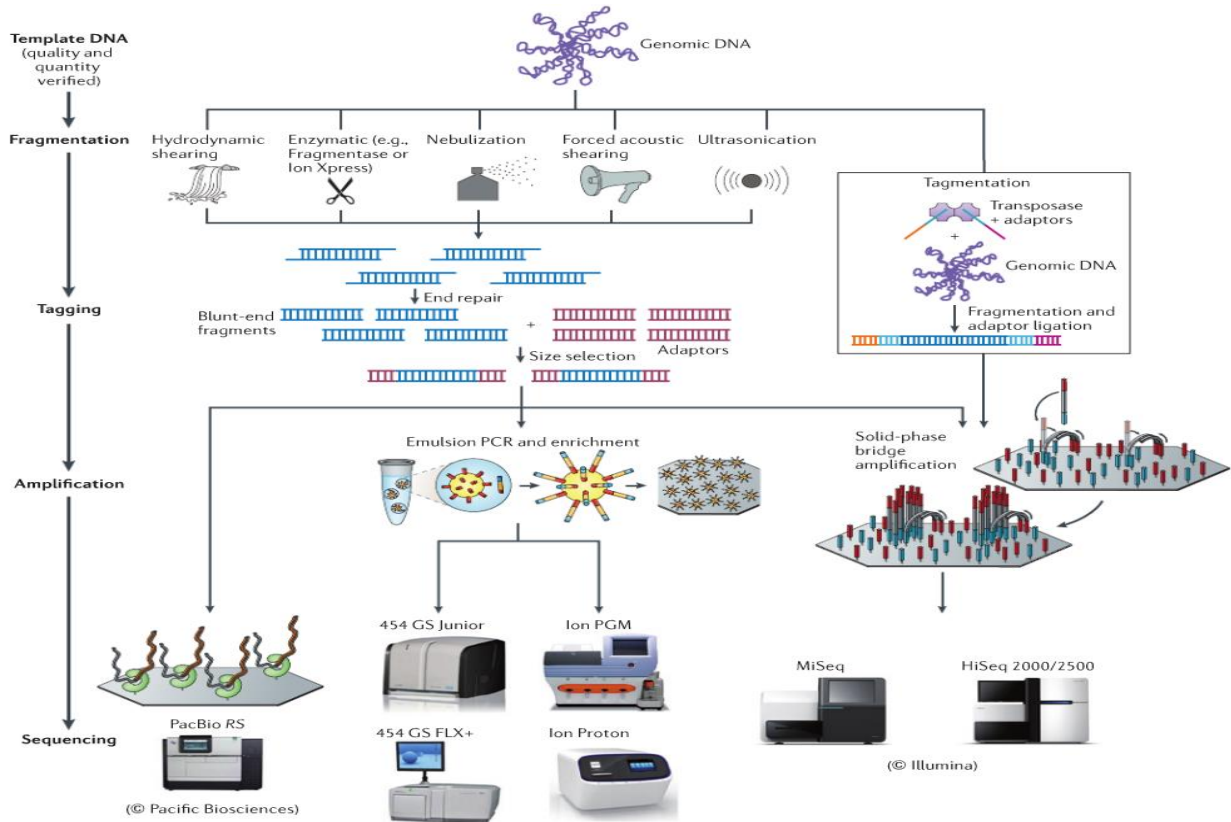


Figura 4. Esquema que plasma el fundamento de algunas técnicas de secuenciación NGS ¹⁷.

Una vez secuenciado podremos obtener la información del tumor primario, así como sus posibles mutaciones.

2.3 APLICACIÓN DE LA BIOPSIA LÍQUIDA EN LA ONCOLOGÍA

Una de las principales aplicaciones actuales de la biopsia líquida es el campo de la oncología. Esta técnica ya está en uso en tumores sólidos como el cáncer de pulmón y en estudios de respuesta al tratamiento para cáncer de mama, en este trabajo estudiaremos sus posibles aplicaciones en el área de la hemato-oncología. Diversos estudios han demostrado que la biopsia líquida es una gran herramienta para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de enfermedades hematológicas, ya que ofrece la posibilidad de detectar mutaciones en cfDNA ⁹. En este trabajo repasaremos los resultados de

estudios que emplean la biopsia líquida en linfomas, mielomas y leucemias. De este modo discutiremos la aplicabilidad de la biopsia líquida basándonos en las características de la enfermedad, su perfil genético y la concordancia entre las distintas técnicas. Las características y el perfil genético de las distintas neoplasias a analizar se introducen a continuación.

- Los linfomas no Hodgkin de células B son los linfomas más agresivos y presentan un reordenamiento IgH (del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas) anormal, esta mutación da lugar a líneas neoplásicas de células B. Las expansiones de células B son policlonales y cada clon contiene un pequeño número de células, es decir no hay un clon dominante. Sin embargo un clon neoplásico presenta un elevado número de células, y se convierte en dominante frente al resto, pudiendo indicar la presencia de un clon neoplásico de linfocitos B ¹⁸.
- El mieloma múltiple (MM) es la segunda neoplasia hematológica más común que afecta a los linfocitos B, por detrás del linfoma no Hodgkin. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de depósitos de células plasmáticas (linfocitos B que se han convertido en células productoras de inmunoglobulinas) en múltiples sitios de la médula ósea e incluso fuera de ella, lo que dificulta la toma de muestras. Es una enfermedad con una gran variabilidad genética, se sabe que aparecen mutaciones en la secuencia genética VDJ que codifica para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Hasta ahora estas mutaciones únicamente se buscaban mediante citometría de flujo multiparamétrica o mediante ASO-PCR (PCR de alelo de oligonucleótido específico) pero recientemente se ha comenzado a introducir la secuenciación de nueva generación o NGS ⁹.
- La leucemia linfoide es una enfermedad que afecta al crecimiento y a la diferenciación de los linfocitos, generalmente causando un aumento de linfocitos inmaduros. La leucemia linfoide aguda (LLA) es la más común en niños (donde tiene un alto porcentaje de curación, no siendo así en el caso de que se desarrolle en adultos) y la leucemia linfoide crónica (LLC) es la más común en adultos. Estas leucemias se asocian a diversas mutaciones como son las de la región CDRIII de la IgH o mutaciones de genes específicos como NRAS, FLT3, NPM1, BTK y PLCγ2 ⁹ siendo interesante el empleo de una técnica mínimamente invasiva que nos permita analizar los diversos perfiles genéticos que esta leucemia puede presentar.
- La leucemia mieloide afecta a la línea mieloide de los leucocitos provocando la acumulación de células inmaduras y aberrantes en la médula ósea que impiden que se realice una hematopoyesis correcta. Puede ser aguda (LMA) o crónica (LMC) y es más común en adultos aumentando la incidencia con la edad. Los marcadores genéticos asociados a esta enfermedad son principalmente mutaciones en los genes FTL y NMP1 y anomalías cromosómicas como la pérdida de heterocigosidad (LOH) o la inactivación del cromosoma X ⁹. Estas anomalías han demostrado estar presentes en cfDNA.

- El síndrome mielodisplásico (MDS) es una enfermedad en la cual las células productoras de sangre de la médula ósea se convierten en células anormales o aberrantes. Esto provoca una insuficiencia medular que da lugar a una citopenia generalizada. Este síndrome se relaciona con la acumulación de mutaciones en determinados genes como *ASXL1*, *STAG2* o *SMG3* y el empleo de cfDNA para detectar estas mutaciones puede suponer una alternativa mínimamente invasiva para su detección ⁹.

La siguiente tabla recoge las principales mutaciones asociadas a determinadas enfermedades hematológicas así como la técnica elegida para su detección a partir de cfDNA.

Disease	Target of detection	Methods	Purpose
Lymphomas	Mutations in genes <i>XPO1</i> , <i>EZH2</i> , <i>MYD88</i> , <i>TP53</i> , <i>POLR2</i> , <i>NPM-ALK</i> etc., <i>IgH</i> and <i>TCRγ</i> gene rearrangements (<i>VDJ</i> and <i>CDR III</i> region), single nucleotide variants (<i>MYD88</i> , <i>CD79A/B</i> , <i>CARD11</i>)	qPCR, dPCR, sequencing, NGS	MRD, diagnosis, treatment response, progress of disease
Multiple myeloma	<i>VDJ</i> rearrangement of <i>IgH</i> , mutations in genes <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>TP53</i>	qPCR, droplet dPCR, sequencing	MRD, treatment response
Myelodysplastic syndrome	Mutations in genes <i>NRAS</i> , <i>TET2</i> , <i>TP53</i> , <i>IDH2</i> , <i>SETBP1</i> etc., loss of heterozygosity, methylation of <i>LINE-1</i>	qPCR, dPCR, sequencing, NGS	MRD, diagnosis, progression of disease
Leukemia	Mutations in genes <i>NRAS</i> , <i>FLT3</i> , <i>NPM1</i> , <i>BTK</i> and <i>PLCγ2</i> , <i>CDR III</i> region of <i>IgH</i> rearrangement,	sequencing, NGS, qPCR, WTB-PCR	Diagnosis, progression of disease, treatment response

Figura 5. Principales mutaciones asociadas a enfermedades hematológicas, métodos de detección y propósito.⁹

3. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo revisional son los siguientes:

- Definir el fundamento de la biopsia líquida y explicar los procedimientos y técnicas que se llevan a cabo
- Analizar las ventajas e inconvenientes que presenta la técnica con respecto a la biopsia tisular
- Realizar una comparación entre biopsia líquida y biopsia tisular en base a los resultados obtenidos en el diagnóstico y seguimiento de diversas enfermedades oncológicas
- Analizar las futuras aplicaciones de la técnica y proponer posibles soluciones a sus inconvenientes más destacados.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo revisional se ha buscado en diferentes bases de datos tales como PubMed, SciELO y Cochrane empleando términos clave como: “Biopsia líquida”, “cfDNA”, “DNA circulante”, “avances en biopsia líquida”, “NGS”, “PCR a tiempo real”, “secuenciación”. En esta búsqueda se seleccionaron una serie de artículos que resultaron relevantes para el trabajo y posteriormente se eligieron los que aportaban más datos concretos al trabajo, en total se emplearon 31 fuentes que incluyen artículos de revistas científicas, tesis doctorales, webs, conferencias y libros.

Los criterios de inclusión de los estudios y ensayos clínicos se centraron en su relevancia y en segundo lugar en la fecha de publicación de los mismos. La mayoría de los estudios revisados se publicaron entre los años 2009 y 2017 mientras que únicamente dos de ellos fueron publicados en fechas anteriores (2004). Todos ellos fueron publicados en revistas de relevancia médica y científica y revisados en diversas ocasiones.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado la utilidad del cfDNA ha sido estudiado en diversas enfermedades hematológicas como marcador de diagnóstico, pronóstico y seguimiento. Algunos de los estudios más relevantes respecto a dichas enfermedades se exponen a continuación.

5.1 LINFOMAS

Los linfomas se dividen en tipo Hodgkin (HL) y no Hodgkin (NHL), siendo este último es más agresivo presenta una amplia heterogeneidad (al menos 40 tumores distintos) que pone de manifiesto la necesidad de una técnica sensible y poco invasiva que permita su diagnóstico temprano y su seguimiento. Muchas de estas técnicas se basan en la detección del reordenamiento IgH.

En 2010, un estudio comparó la detección del reordenamiento IgH presente en linfomas no Hodgkin empleando cfDNA y DNA procedente de una biopsia tisular. El estudio se realizó con 360 pacientes en distintas fases del linfoma no Hodgkin de células B y se detectó el reordenamiento en un 81% de los casos cuando se utilizó cfDNA y en un 77% de los casos cuando se utilizó DNA procedente de tejido. Estos resultados demostraron que el empleo de DNA circulante para detectar el reordenamiento IgH resultó igual o más efectivo que la biopsia tisular ^{9,19}.

Determinados estudios han comparado los niveles de cfDNA de pacientes con linfomas y de pacientes sanos. Se midieron los niveles de cfDNA en sangre periférica de 142 pacientes con HL, NHL y DLBCL (linfoma difuso de células B grandes) y de 41 pacientes sanos. Los niveles de cfDNA de los pacientes con linfomas fueron significativamente más elevados que en los pacientes sanos, mientras que dentro de los pacientes con linfomas

los niveles más altos correspondieron a etapas avanzadas de la enfermedad, peor pronóstico y presencia de síntomas B (sudores, pérdida de peso, fiebre...). Con estos datos se plantea la hipótesis de que la cantidad de cfDNA se relaciona con el tamaño del tumor y se puede correlacionar con parámetros clínicos ^{9,10,22}.

El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) es el tipo más común de linfoma no Hodgkin y uno de los principales problemas que presenta es la dificultad a la hora de detectar la enfermedad mínima residual (MRD). Dicha dificultad se debe a que las células tumorales circulantes (CTC) causantes de la MRD no son fácilmente detectables por citometría de flujo, lo que pone de manifiesto la necesidad de una técnica más sensible. Se propuso emplear la secuenciación de alto rendimiento o NGS a partir de cfDNA de muestras de plasma para la detección de reordenamiento IgH. Se realizó con 16 pacientes y en un 69% de los casos se detectó el reordenamiento IgH en cfDNA mientras que en un 50% se detectaron CTCs, estos resultados, pese a realizarse con una muestra poblacional baja, sugieren que el cfDNA podría ser una alternativa a las CTCs en la monitorización de la enfermedad mínima residual ^{9,10,20}.

Otros estudios se han basado en determinadas mutaciones somáticas poco comunes de los genes XPO1, EZH2 y MYD88 que aparecen en cfDNA de pacientes que sufren DLBCL y se relacionan con una buena respuesta a terapias dirigidas. Estas mutaciones aparecían en cfDNA y se demostró que se detectan con una sensibilidad de 0,05% (referido a la concentración del alelo mutante) mediante NGS y dPCR mostrando ambas técnicas una concordancia del 100%. La detección de estas mutaciones puede ser muy beneficiosa a la hora de elegir el tratamiento del paciente ^{9,10,21}.

5.2 MIELOMA MÚLTIPLE

Como sabemos en esta enfermedad existen depósitos tumorales en múltiples sitios, lo que pone de manifiesto la necesidad de una muestra que englobe la totalidad del genoma del tumor, como es el cfDNA que se libera a sangre a partir de los distintos depósitos tumorales. Pese a que la biopsia líquida apunta a ser una técnica muy útil en el diagnóstico y seguimiento del mieloma múltiple únicamente hay estudios piloto con un número limitado de pacientes ⁹.

Uno de los estudios analizó la presencia de mutaciones en la secuencia VDJ de 26 pacientes con mieloma múltiple que fueron tratados con los fármacos bortezomib, lenalidomida, y panobinostat. El análisis se realizó mediante tecnología NGS a partir de cfDNA y leucocitos circulantes. Las mutaciones de la secuencia VDJ fueron detectadas en un 71% de los casos empleando leucocitos circulantes, en un 85% de los casos empleando biopsia de médula ósea y en un 100% empleando cfDNA. Tiempo después del tratamiento farmacológico (2-4 meses) se detectaron mutaciones en VDJ en un 40% de los casos empleando leucocitos circulantes y en un 34% empleando cfDNA, esto sugiere que las células circulantes pueden darnos información complementaria mientras que el cfDNA nos aporta una visión general de la carga tumoral en médula ósea y en tejidos extra medulares. La mutación se mantuvo positiva en un 91% de los pacientes que no respondieron al tratamiento y en un 41% de los pacientes que respondieron ^{9,23}.

La conclusión temprana que se puede obtener de estos estudios es que la biopsia líquida supone una técnica mínimamente invasiva que asociada a la biopsia de médula ósea mejora la caracterización genética del tumor ^{9, 24}.

5.3 LEUCEMIA LINFOIDE

La leucemia linfóide puede presentar un perfil genético variado, por ello muchos estudios se han centrado en evaluar el potencial de cfDNA como muestra para el diagnóstico, seguimiento y detección de MRD.

Uno de los estudios a destacar comparó los niveles de cfDNA en sangre de 182 pacientes, 150 con LLA, 20 con otras neoplasias y 12 sanos, las muestras se realizan en el diagnóstico, en el día 3 de tratamiento y en el día 4 de tratamiento. En el diagnóstico y en el 3º día de tratamiento se encontraron niveles significativamente elevados de cfDNA en pacientes con LLA (277 ng/ml en el diagnóstico y 248 en el 3º día) en comparación con los pacientes que padecen otras neoplasias (76 ng/ml) y con los pacientes sanos (57 ng/ml). En el 4º día de tratamiento todos los niveles disminuyeron hasta valores normales (64 ng/ml), resultado que se asoció a la disminución de leucocitos en sangre. En este mismo estudio también se analizó la concordancia en la detección de la enfermedad mínima residual empleando cfDNA y leucocitos, y fue de un 86,7% ^{9, 25}.

Otro estudio analizó la presencia de mutaciones en los genes BTK y PLCγ2 a partir de 9 muestras de cfDNA en plasma y DNA celular. En dicho estudio también se tomaron 4 muestras de cfDNA procedente de suero de pacientes con LLC que habían sido tratados con un inhibidor de BTK (ibrutinib). De las 9 muestras de cfDNA en plasma se encontraron 7 mutaciones en BTK y 4 mutaciones en PLCγ2, mientras que de las 9 muestras de DNA celular se encontraron 7 mutaciones en BTK y 2 mutaciones en PLCγ2. Respecto a las 4 muestras de cfDNA en suero de pacientes tratados con ibrutinib únicamente se encontró una mutación en BTK y una en PLCγ2. La conclusión de este estudio es que cualquier mutación detectable en DNA celular se puede detectar con una mayor precisión en cfDNA plasmático ^{9, 26}.

En la siguiente tabla se muestra un resumen de las principales técnicas empleadas para detectar mutaciones de cfDNA en las neoplasias linfocíticas vistas anteriormente, así como la información, ventajas y limitaciones que suponen.

Detecting methods		Information provided	Advantages	Limitations
Genetic aberration	NGS Ig gene sequencing Targeted sequencing of lymphoma-related genes (e.g., CAPP-Seq, Lymphopanel)	<ul style="list-style-type: none"> • Ig gene rearrangement • Mutations • Translocations • Ig VDJ recombination • (Copy number variations[*]) 	<ul style="list-style-type: none"> • High-throughput; • Comprehensive genetic profiles; • Massive genetic information; • Almost universal 	<ul style="list-style-type: none"> • Costly; • Technically demanding; • Time consuming; • Larger panels are subjected to lower sequencing depth; • Less sensitive than dPCR
	dPCR	<ul style="list-style-type: none"> • A few mutations 	<ul style="list-style-type: none"> • More sensitive, especially suitable for rare aberrations; • Relatively low cost 	<ul style="list-style-type: none"> • Less universal; • Less information
Epigenetic aberration	Pyrosequencing	<ul style="list-style-type: none"> • A few methylation alterations 	<ul style="list-style-type: none"> • Economical; • Technically simple 	<ul style="list-style-type: none"> • Less universal; • Less information
	Genome-wide bisulfite sequencing	<ul style="list-style-type: none"> • Genome-wide methylation alterations • Tissue mapping 	<ul style="list-style-type: none"> • Comprehensive methylation profiles; • Tracing the tissue of origin of ctDNA 	<ul style="list-style-type: none"> • Costly; • Technically demanding; • Time consuming

Figura 6. Técnicas para la detección de mutaciones en neoplasias linfocíticas¹⁰.

5.4 LEUCEMIA MIELOIDE

Entre los estudios realizados para este tipo de enfermedad figuran los que han demostrado que al igual que en otras neoplasias los niveles de cfDNA en pacientes enfermos son más elevados que en pacientes sanos ²⁷.

Otros estudios se centraron en las anomalías citogenéticas o cromosómicas como la pérdida de la heterocigosidad o LOH. En el estudio mencionado se incluyeron 45 pacientes que padecían leucemia mieloide aguda (LMA) y síndrome mielodisplásico (MDS) y que tenían estas anomalías genéticas confirmadas. Dichas anomalías se analizaron a partir de cfDNA y a partir de una muestra de médula ósea. En el caso del cfDNA se detectó LOH en el 100% de los casos mientras que en la muestra de médula ósea se detectó LOH en un 89% de los casos con MDS y en el 70% con LMA. Este resultado nos sugiere que el empleo de cfDNA tiene un gran potencial en esta enfermedad como coadyuvante e incluso sustituto de la biopsia tisular ^{9, 28}.

Un estudio realizado en 2015 se focalizó en las mutaciones del gen NMP1, uno de los más mutados en casos de LMA. En el estudio se incluyeron 100 pacientes con LMA y se analizó la mutación en cfDNA (mediante q-PCR y NGS) y en células procedentes de una biopsia de médula ósea. Con el empleo de cfDNA se encontró la mutación en 37 pacientes mientras que empleando muestras de tejido medular se encontró en 35 pacientes. Este estudio además de demostrar la eficacia del cfDNA también demostró la asociación entre las mutaciones de NMP1 con distintos subtipos de leucemia y con la cantidad de células blásticas de la médula ósea ^{9, 28}.

Estos resultados hacen pensar que la biopsia líquida puede ser una herramienta útil a la hora de tomar decisiones sobre el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de esta neoplasia, pudiendo ser utilizada como técnica complementaria e incluso como alternativa a la biopsia tisular si el caso lo precisa.

5.5 SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

Se han realizado varios ensayos para evaluar la eficacia del empleo de cfDNA como muestra a partir de la cual buscar determinadas mutaciones.

En 2016 un equipo de investigadores basó sus estudios en detectar mutaciones de los genes IDH2, SETBP1, U2AF1, ANR y SRSF2 en 33 pacientes con síndrome mielodisplásico. Dichas mutaciones fueron detectadas tanto en cfDNA como en muestras de tejido de médula ósea, por lo que ambas muestras son equiparables y en el caso del cfDNA sólo requiere una extracción de sangre. Se observó también que estas mutaciones se hicieron indetectables después de un trasplante alogénico. En este mismo estudio los investigadores pudieron comprobar como los niveles de cfDNA eran significativamente más elevados en pacientes que sufrían síndrome mielodisplásico en comparación con pacientes sanos, y que dentro de los pacientes con la enfermedad los niveles de cfDNA se correspondían con determinados parámetros clínicos. De este estudio se pueden sacar dos suposiciones: que el cfDNA es una alternativa equiparable a las muestras de médula ósea para la detección de mutaciones y que los niveles de cfDNA reflejan el estado y pronóstico de la enfermedad ^{9,30}.

Otro estudio analizó el potencial del cfDNA en el diagnóstico del síndrome mielodisplásico. Para realizarlo se tomaron muestras de sangre periférica de 16 pacientes y se extrajo cfDNA, a esos mismos pacientes se les realizó una biopsia medular para extraer el DNA del tejido afectado. Se buscaron 14 mutaciones en genes diana empleando dos tipos de secuenciación: NGS y Sanger. En las muestras de cfDNA se encontraron una o más mutaciones que confirmaban el diagnóstico de todos los pacientes, además se detectaron 5 mutaciones empleando NGS que no fueron detectadas mediante el método Sanger en el DNA procedente de la biopsia tisular. Este estudio sugiere que el análisis de cfDNA mediante secuenciación de nueva generación o NGS es un método fiable y sensible para confirmar un diagnóstico de síndrome mielodisplásico ^{9,31}.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de los distintos ensayos clínicos así como los fundamentos en los que se apoya la técnica nos permiten sintetizar y enumerar las ventajas y limitaciones de la biopsia líquida:

Ventajas:

- No es una técnica invasiva
- Puede repetirse en numerosas ocasiones
- Tras la toma de muestra hay bastante material disponible para realizar post-procesamiento
- Nos ofrece la posibilidad de determinar el fenotipo del tumor en el curso de la enfermedad, permitiendo la monitorización del tratamiento, detectando posibles resistencias y evitando con ello toxicidad o daño innecesario. Esto nos permite ajustar el tratamiento de manera individual y en función del progreso de la enfermedad
- Da una imagen a tiempo real de toda la heterogeneidad del tumor
- Nos permite determinar la enfermedad mínima residual así como recaídas en estadios tempranos

Limitaciones:

- Si detectamos DNA circulante necesitamos conocer previamente la mutación o característica presente en el mismo, limitando con ello la detección de muchos tipos celulares
- Se necesitan plataformas muy sensibles y específicas y personal con formación en su manejo
- Las tecnologías que se precisan son costosas y por ello aún no se dispone de ellas en los puntos de atención al paciente
- Carece de consenso en la aproximación técnica y los pasos a realizar no están estandarizados
- La cantidad de cfDNA y de CTCs disponible es limitado y está constituido por fragmentos de pequeño tamaño

Son estas limitaciones las que han propiciado que la biopsia líquida aún no esté implantada como técnica de rutina ni sea válida clínicamente. Una de las más destacadas es la necesidad de una descripción previa que nos permita elegir la fuente de cfDNA (CTCs, DNA o proteínas) en función del objetivo que persigamos. Otra importante limitación es la complejidad técnica de la biopsia líquida, al ser tan compleja no se encuentra en hospitales de día con un amplio flujo de pacientes, y este hecho impide la realización de ensayos clínicos a gran escala ⁶.

Pese a tener aún limitaciones considerables podemos aventurarnos a asumir que la biopsia líquida es una técnica equiparable en la mayoría de los casos a la biopsia de tejidos. Gracias al amplio abanico de mutaciones que podemos encontrar en el cfDNA una muestra de sangre puede permitir solventar las

limitaciones actuales en el diagnóstico y seguimiento de un paciente, sin olvidar la posibilidad de detectar la enfermedad mínima residual en estadios tempranos con las ventajas que eso conlleva.

En resumen, podemos suponer que en un futuro próximo la biopsia líquida puede convertirse en un método de rutina para combinarse con la biopsia tisular e incluso ser una alternativa a la misma.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Camus, V., Jardin, F. and Tilly, H. (2017). The value of liquid biopsy in diagnosis and monitoring of diffuse large b-cell lymphoma: recent developments and future potential. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(6), pp.557-566.
2. López López, R., García Foncillas, J. and Rodríguez Sánchez, C. (2017). *AVANCES EN BIOPSIA LÍQUIDA*.
3. Genetics, R. (2019). *Biopsia líquida: Presente y futuro*.
4. Husain, H. and Velculescu, V. (2017). Cancer DNA in the Circulation. *JAMA*, 318(13), p.1272
5. Kubackzova, V., Vrabel, D., Sedlarikova, L., Besse, L. and Sevcikova, S. (2017). Cell-free DNA - Minimally invasive marker of hematological malignancies. *European Journal of Haematology*, 99(4), pp.291-299.
6. García-Rico Fernández, E. (2017). *Biopsia líquida: Aplicación de métodos ópticos y metabólicos para la detección y caracterización de ácidos nucleicos, proteínas y células en sangre periférica de pacientes con cáncer*. Doctorado. Universidad Camino José Cela
7. McDonald, M., Capasso, K. and Ajit, S. (2013). Purification and microRNA Profiling of Exosomes Derived from Blood and Culture Media. *Journal of Visualized Experiments*, (76).
8. Husain, H. and Velculescu, V. (2017). Cancer DNA in the Circulation. *JAMA*, 318(13), p.1272.
9. Kubackzova, V., Vrabel, D., Sedlarikova, L., Besse, L. and Sevcikova, S. (2017). Cell-free DNA - Minimally invasive marker of hematological malignancies. *European Journal of Haematology*, 99(4), pp.291-299
10. Wu, F., Lu, L., Xu, W. and Li, J. (2018). Circulating tumor DNA: clinical roles in diffuse large B cell lymphoma. *Annals of Hematology*, 98(2), pp.255-269.
11. McDonald, M., Capasso, K. and Ajit, S. (2013). Purification and microRNA Profiling of Exosomes Derived from Blood and Culture Media. *Journal of Visualized Experiments*, (76).
12. Dingle, T., Sedlak, R., Cook, L. and Jerome, K. (2013). Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances. *Clinical Chemistry*, 59(11), pp.1670-1672.
13. Dogliotti, I., Drandi, D., Genuardi, E. and Ferrero, S. (2018). New Molecular Technologies for Minimal Residual Disease Evaluation in B-Cell Lymphoid Malignancies. *Journal of Clinical Medicine*, 7(9), p.288.
14. Bio-rad.com. (2019). *Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) Technology | LSR | Bio-Rad*. [online] Available at: <http://www.bio-rad.com/es-es/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology?ID=MDV31M4VY> [Accessed 27 Mar. 2019].
15. ThermoFisher.com. (2019). *Liquid Biopsy Cancer Research | Thermo Fisher Scientific - UK*. [online] Available at: <https://www.thermoFisher.com/es/es/home/life-science/cancer-research/cancer-genomics/liquid-biopsy-cancer-research-applications.html> [Accessed 5 Mar. 2019].
16. Garrigues, F. (2019). *NGS: Secuenciación de Segunda Generación - Genética Médica Blog*. [online] Genética Médica Blog. Available at: <https://revistageneticamedica.com/blog/ngs-secuenciacion/> [Accessed 3 Apr. 2019].

17. Uco.es. (2019). *Tema 6. Genómica*. [online] Available at: http://www.uco.es/users/bb1rofra/BiologiaSistemas/Tema6_Genomica/6.genomica.html [Accessed 2 Apr. 2019].
18. Prueba "IGH: Detección de reordenamiento (monoclonalidad B)" [Internet]. Laboratoriomedicina-huca.es. 2019 [cited 6 April 2019]. Available from: <http://www.laboratoriomedicina-huca.es/es/catalogo-pruebas/oncologia-molecular/igh-deteccion-de-reordenamiento-monoclonalidad-b>
19. Zhong L, Huang WF. Better detection of Ig heavy chain and TCR γ gene rearrangement in plasma cell-free DNA from patients with non-Hodgkin Lymphoma. *Neoplasma*. 2010;57:507-511.
20. Armand P, Oki Y, Neuberg DS, et al. Detection of circulating tumour DNA in patients with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2013;163:123-126.
21. Camus V, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2016;57:2171-2179.
22. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2009;20:1408-1413.
23. Oberle A, Brandt A, Voigtlaender M, et al. Monitoring multiple myeloma by next-generation sequencing of V(D)J rearrangements from circulating myeloma cells and cell-free myeloma DNA. *Haematologica* 2017;102(6):1105-1111
24. Mithraprabhu S, Khong T, Ramachandran M, et al. Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma. *Leukemia* 2017. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.366.3>
25. Schwarz AK, Stanulla M, Cario G, et al. Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol*. 2009;88:897-905.
26. Albitar F, Ma W, Diep K, et al. Deep Sequencing of Cell-Free Peripheral Blood DNA as a Reliable Method for Confirming the Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome. *Genet Test Mol Biomark*. 2016;20:341-345.
27. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368:1894-1907.
28. Rogers A, Joe Y, Manshuri T, et al. Relative increase in leukemia-specific DNA in peripheral blood plasma from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood*. 2004;103:2799-2801.
29. Quan J, Gao Y, Yang Z, et al. Quantitative detection of circulating nucleophosmin mutations DNA in the plasma of patients with acute myeloid leukemia. *Int J Med Sci*. 2015;12:17-22..
30. Suzuki Y, Tomita A, Nakamura F, et al. Peripheral blood cell-free DNA is an alternative tumor DNA source reflecting disease status in Myelodysplastic syndromes. *Cancer Sci*. 2016;107:1329-1337.
31. Albitar F, Ma W, Diep K, et al. Deep Sequencing of Cell-Free Peripheral Blood DNA as a Reliable Method for Confirming the Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome. *Genet Test Mol Biomark*. 2016;20:341-345.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.