

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Biopsia líquida: avances y retos

Liquid biopsy: advances and challenges

Autor/a: Jorge Menéndez García

Director/es: Virginia Álvarez García

Santander, 5 de junio 2024

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora Virginia Álvarez García que ha hecho posible la realización de este Trabajo de Fin de Grado. Siendo su apoyo y orientación fundamentales.

ÍNDICE

1. Abstract.....	4
2. Introducción a la biopsia líquida.....	5
3. Elementos de interés en la biopsia líquida y técnicas de estudio:	
-ctDNA.....	8
-CTCs.....	13
-Vesículas extracelulares.....	16
-Otros elementos de interés: plaquetas educadas por tumores y cfRNA.....	18
4. Aplicaciones clínicas.....	19
5. Limitaciones y retos.....	28
6. Conclusión.....	33
Bibliografía.....	33

Abstract

Durante las últimas décadas el concepto de medicina de precisión ha ido evolucionando y afianzándose en diferentes campos, especialmente en la oncología médica. La biopsia líquida se postula como una técnica revolucionaria que facilita la evaluación de algunas enfermedades, incluido el cáncer, desde nuevas perspectivas antes inimaginables. Esta técnica altamente sensible aporta información en tiempo real y de forma mínimamente invasiva a través de la sangre o de otros fluidos corporales, permitiendo obtener diagnósticos moleculares precisos, realizar el seguimiento de la enfermedad, estudiar la respuesta al tratamiento y la probabilidad de recidiva. Los principales elementos analizados en la biopsia líquida incluyen principalmente las células tumorales circulantes y el DNA tumoral circulante, aunque existen otros con menor relevancia como las vesículas extracelulares y las plaquetas educadas por tumores. Pese a las ventajas que ofrece y a los avances realizados en el campo en los últimos años, existen una serie de limitaciones y retos derivados principalmente de cuestiones metodológicas como la estandarización de protocolos para procesar la muestra o la alta complejidad y el elevado coste de las técnicas de análisis de las muestras.

Abstract

Over the past decades, the concept of precision medicine has been evolving and establishing itself in different fields, especially in medical oncology. Liquid biopsy is emerging as a revolutionary technique that facilitates the evaluation of certain diseases, including cancer, from previously unimaginable perspectives. This highly sensitive technique provides real-time information in a minimally invasive manner through blood or other body fluids, allowing for precise molecular diagnoses, disease monitoring, assessment of treatment response, and prediction of recurrence. The main elements analyzed in liquid biopsy primarily include circulating tumor cells and circulating tumor DNA, although there are others with smaller relevance such as extracellular vesicles and tumor-educated platelets. Despite the advantages it offers, and the progress made in the field in recent years, there still are a number of limitations and challenges mainly derived from methodological issues such as standardizing protocols for sample processing or the high complexity and cost of sample analysis techniques.

Keywords: biopsia líquida, ctDNA, CTCs, aplicaciones clínicas, retos

Introducción a la biopsia líquida

El cáncer es una enfermedad que está muy presente en nuestro día a día. Según la OMS es una de las 2 primeras causas de muerte antes de los 70 años en 112 de los 183 países que existen y estima que hubo 20 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes en 2020. Se prevé además que las cifras aumenten hasta los 30 millones de nuevos casos en 2040. (1) El cáncer tiene una prevalencia considerable además de una importante repercusión socioeconómica. Se caracteriza por una proliferación sin control de las células de un tejido concreto, que en estadios avanzados puede provocar la invasión de otros órganos en tejidos distantes. Cada tipo de cáncer presenta una incidencia diferente, por ejemplo, en el año 2020 los tumores más frecuentemente diagnosticados a nivel mundial fueron el de mama, pulmón, colon y recto, próstata y estómago, todos ellos con más de un millón de casos. En EE.UU., el cáncer es la segunda causa de mortalidad, con más de 1,8 millones de nuevos diagnósticos de cáncer y más de 600.000 muertes al año. Teniendo tanta repercusión para la población, es importante una detección precoz para mejorar las tasas de supervivencia y reducir la morbilidad y mortalidad que se podría presentar si se detectase en una fase posterior. (2)

En la actualidad, para el cribado poblacional se realizan pruebas invasivas como pueden ser la colonoscopia y la prueba de Papanicolau. Para determinados tipos de cáncer se utilizan además pruebas no invasivas tales como pruebas de imagen (en mama y glioma) o exámenes de sangre (próstata y colorrectal), pero estas no proporcionan información suficiente sobre los perfiles genéticos de estos cánceres. La principal base para su diagnóstico es la biopsia tisular, que consiste en la extracción de una muestra del tejido afectado para obtener un diagnóstico. El análisis de la biopsia permite además confirmar el perfil mutacional del tumor y, por tanto, facilita la elección de las diferentes estrategias de tratamiento. El principal inconveniente del método es que constituye una técnica altamente invasiva. Por eso desde hace años se han ido desarrollando diferentes técnicas prometedoras, entre las que destaca la biopsia líquida (LB), que permiten dar diagnósticos moleculares precisos para obtener terapias adecuadas de forma precoz y mínimamente invasiva. (3)

La biopsia líquida es una prueba de laboratorio que se realiza a partir de muestras de sangre, orina u otros líquidos corporales (saliva, mucosas, derrame pleural, líquido ceforraquídeo...) con el fin de localizar y caracterizar células cancerosas en un tumor o bien fragmentos pequeños de DNA, RNA u otras moléculas que las células tumorales liberan en los líquidos corporales. El análisis de los elementos derivados del tumor obtenidos en la biopsia líquida, ya sean células tumorales, ácidos nucleicos o vesículas extracelulares, va a permitir comprender las alteraciones genéticas propias del tumor y, por tanto, van a facilitar el diagnóstico y a guiar las estrategias terapéuticas a seguir en cada caso. Además, debido a que la biopsia líquida brinda la posibilidad de tomar varias muestras a lo largo del tiempo de una forma mínimamente invasiva, esto va a permitir

a los equipos médicos comprender la naturaleza de los cambios genéticos o moleculares que tienen lugar en un tumor en los distintos estadios de la enfermedad. La biopsia líquida se aplica principalmente con fines diagnósticos ya que tiene una gran utilidad a la hora de detectar el cáncer en sus estadios más tempranos. También es útil en el seguimiento de la enfermedad, permitiendo planificar el tratamiento, determinar su eficacia y averiguar la posible recidiva de un cáncer en función de las alteraciones moleculares que aparezcan a medida que la enfermedad avanza. Desde hace años se evidencia la tendencia al desarrollo y uso de estas nuevas técnicas, no invasivas, que sustituyen gradualmente a las anteriores técnicas, principalmente biopsias sólidas, que han sido tradicionalmente las únicas disponibles con estos fines. (4)

Para conocer la historia de la biopsia líquida es necesario remontarse a 1869, año en el que aparece la primera mención documentada a las células tumorales circulantes (CTCs). En este año, el médico Thomas R. Ashworth observó la existencia de una serie de células similares a las células del tumor primario en la sangre de un paciente fallecido a causa de un cáncer metastásico. Sin embargo, no fue hasta finales de los años noventa cuando la detección de CTCs cobró una especial relevancia, tras el desarrollo, por parte de Racila y colaboradores, de una técnica de enriquecimiento magnético para la detección de CTCs. Este equipo de investigadores demostró la presencia de las CTCs en sangre en los estadios precoces de la enfermedad y señalaron su potencial uso para monitorizar la respuesta al tratamiento y las recurrencias. (5)

El método estándar de estudio de los tumores, que normalmente implica cirugías invasivas para obtener muestras tumorales, presenta limitaciones tanto cualitativas como cuantitativas. A esto se suma la dificultad para la adquisición repetida de muestras a lo largo del tratamiento. Además, la heterogeneidad intrínseca del tumor limita la utilidad de estas técnicas invasivas, sobre todo en las metástasis, debido a su constante evolución y la necesidad de obtener múltiples biopsias en distintos momentos de la enfermedad. Al realizar una biopsia tisular solo capturamos un momento en el tiempo de un único lugar del tumor, aportando información limitada sobre la biología y posible evolución de la enfermedad. (4,6)

Ante los desafíos de las biopsias tradicionales y los recientes avances en el campo de la biopsia líquida, ha comenzado a implementarse el uso de esta última en la práctica clínica, centrándose en el análisis de los fluidos biológicos, principalmente de la sangre. En este sentido, la biopsia líquida se postula como una técnica que aporta una elevada sensibilidad, ya que permite detectar cantidades mínimas de material genético tumoral, permitiendo evaluar alteraciones relevantes y facilitando el muestreo repetido en el tiempo de forma menos invasiva que en el caso de la biopsia tradicional, aumentando la precisión en el diagnóstico y la monitorización de la enfermedad y asegurando la correcta elección del tratamiento. (7,8)

	BIOPSIA LÍQUIDA	BIOPSIA TISULAR
Invasividad	Mínima	Alta
Sensibilidad	Alta	Baja
Coste obtención de la muestra	Bajo	Alto
Coste del análisis	Alto	Bajo
Información histológica	No	Sí
Posibilidad de monitorización continua	Sí	No
Permite estudiar la heterogeneidad temporal y espacial	Sí	No

Tabla 1. Comparación entre biopsia líquida y tisular

A pesar de los progresos llevados a cabo en el abordaje del cáncer, esta enfermedad sigue creando gran preocupación clínica. Algunas de las dificultades que aún siguen sin resolverse incluyen el diagnóstico temprano, la estratificación precisa de los pacientes, la selección adecuada de tratamientos, el seguimiento de la respuesta al tratamiento, la detección de enfermedad residual mínima y el riesgo de recurrencia. En principio, las herramientas basadas en las técnicas englobadas dentro del campo de la biopsia líquida están demostrando gran potencial para abordar estos diferentes aspectos. Sin embargo, aún son necesarios los avances en este campo, ya que pocos tests han recibido la autorización por parte de la Food and Drug Administration (FDA), que representa la institución con mayor autoridad a la hora de proteger la salud pública y también de regular las tecnologías que se utilizan en la práctica clínica. (5)

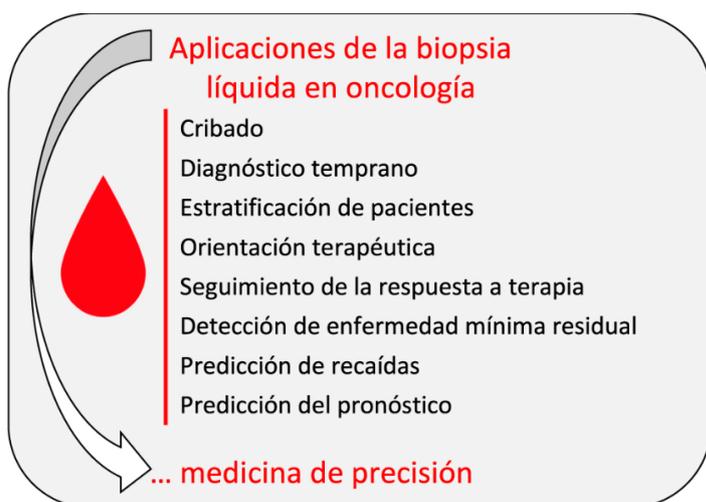


Figura 1. Aplicaciones de la biopsia líquida en el manejo del cáncer

Elementos objeto de estudio en la biopsia líquida

En los últimos años, la biopsia líquida ha comenzado a utilizarse de forma específica para el estudio de los diferentes perfiles moleculares del cáncer, permitiendo así un enfoque oncológico preciso. Los principales elementos que se analizan mediante este tipo de técnicas incluyen el DNA libre circulante (cfDNA), el DNA tumoral circulante (ctDNA) y las células tumorales circulantes (CTCs). Además, también son objeto de estudio, aunque con menor relevancia, elementos como las vesículas extracelulares (EVs), el RNA circulante (cfRNA), el microRNA (miRNA), el RNA largo no codificante (lncRNA) y las plaquetas educadas por tumores (TEP). (9)

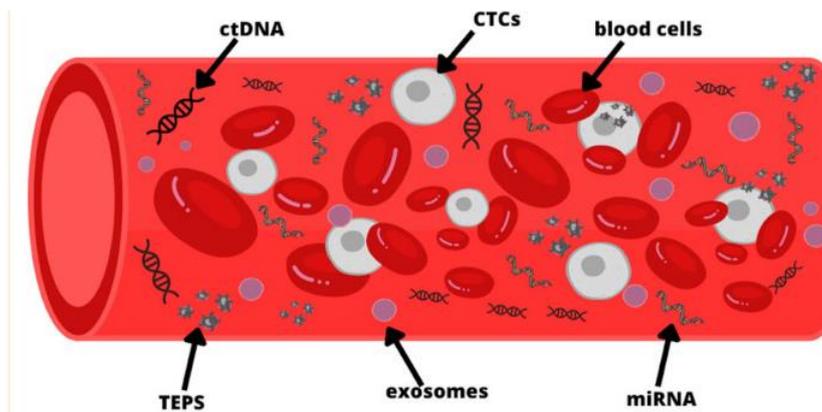


Figura 2. Elementos objeto de estudio en biopsia líquida.

DNA libre circulante (cfDNA)

El cfDNA, fue descrito por primera vez en 1948 por los doctores Mandel y Métais en individuos sanos. Décadas más tarde, en 1977, se observó la elevación de los niveles de este tipo de DNA en pacientes con diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, la aparición de niveles elevados de cfDNA no se considera un parámetro específico del cáncer, ya que también puede observarse en algunas situaciones fisiológicas como el embarazo y el ejercicio intenso, así como en otras patologías, por ejemplo, en el contexto de determinadas enfermedades autoinmunes. (10)

DNA tumoral circulante (ctDNA)

El ctDNA constituye una pequeña fracción del cfDNA total y se corresponde con aquellas moléculas de DNA circulante liberadas a la circulación por las células tumorales. El DNA

circulante puede encontrarse, además, tanto en forma de DNA monocatenario como bicatenario. Se cree que este DNA se libera al torrente sanguíneo mediante procesos celulares que incluyen apoptosis y necrosis o bien mediante secreción activa por parte de la célula. El ctDNA puede proceder, por tanto, de varias fuentes: células tumorales necróticas o apoptóticas, células tumorales vivas y células tumorales circulantes. (11) Las células no tumorales también pueden liberar DNA en determinadas circunstancias, aunque esto sucede de manera poco frecuente. La liberación de fragmentos de ácidos nucleicos hacia el medio extracelular suele responder a una apoptosis programada por daño celular o envejecimiento de la célula. Además, esta liberación de DNA puede darse como consecuencia de un proceso de necrosis o estrés celular, o bien puede formar parte de mecanismos fisiológicos como la reparación del DNA o la renovación celular en las que las células pueden liberar pequeñas vesículas conteniendo DNA. Estos mecanismos existen para mantener la homeostasis entre la tasa de formación y la de muerte celular. (12) El análisis de los fragmentos de ctDNA liberados al medio extracelular permite observar alteraciones a nivel molecular tales como inestabilidad de los microsatélites, mutaciones tumorales específicas y metilación del DNA, entre otras.

El ctDNA puede ser detectado en diferentes tipos de cáncer y, además, sus niveles varían según el estadio en el que se encuentre la enfermedad. De esta manera, los estadios tempranos en los que la masa tumoral es de pequeño tamaño tienden a liberar cantidades relativamente bajas o incluso indetectables de ctDNA. Sin embargo, a medida que el tumor crece y se vuelve más invasivo, los niveles de ctDNA tienden a aumentar, de manera que, en el caso de tumores metastáticos, debido a la existencia de múltiples focos tumorales y a una mayor carga de células malignas, éste tiende a producir una mayor liberación de ctDNA hacia el torrente sanguíneo. No obstante, estos niveles también pueden fluctuar en respuesta al tratamiento, es decir, en pacientes sometidos a una cirugía o a quimioterapia, los niveles de ctDNA pueden reducirse temporalmente como consecuencia de la reducción de la carga tumoral total. Sin embargo, si se desarrolla resistencia al tratamiento o en caso de progresión del tumor, los niveles de ctDNA tenderán a aumentar de nuevo (Figura 4). (13)

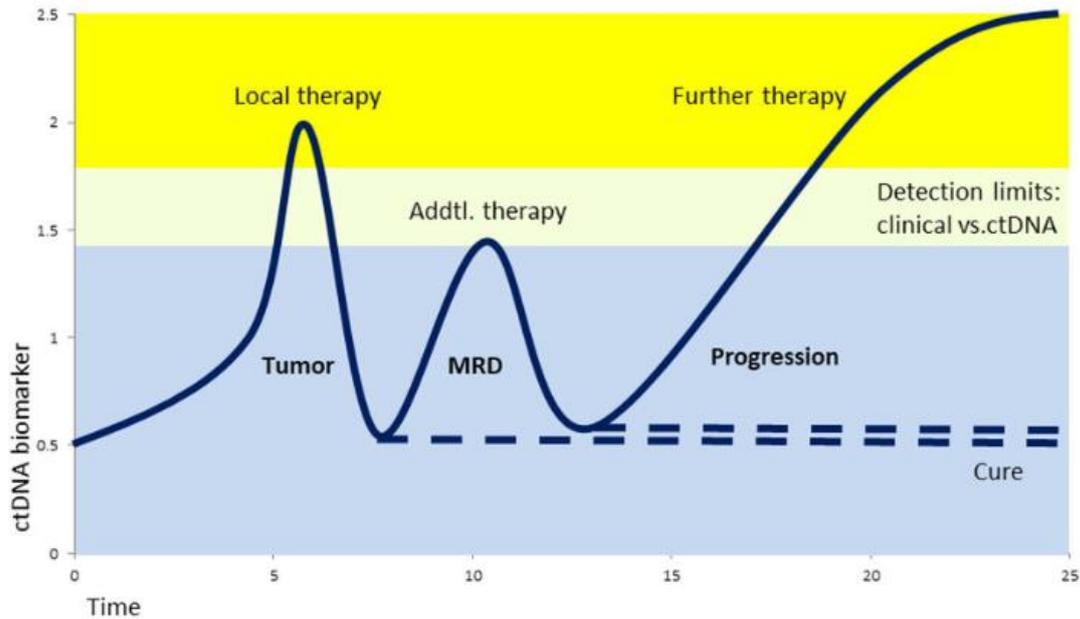


Figura 3. Estadios y progresión del cáncer y su relación con la liberación de fragmentos de ctDNA. Los niveles de ctDNA aumentan a medida que el tumor progresa. Un tratamiento eficaz disminuye los niveles de cfDNA e incluso volverlos indetectables en caso de curación. La detección temprana de enfermedad mínima residual mediante el ctDNA permite administrar un tratamiento adicional de forma más temprana que mediante el uso de técnicas de imagen. La neoplasia puede volver a proliferar aumentando de nuevo los niveles de ctDNA. (14)

La extracción y aislamiento de fragmentos de ctDNA del plasma son procesos relativamente sencillos en comparación con la complejidad asociada a los sistemas de aislamiento y enriquecimiento de las CTCs. En el mercado están disponibles diferentes métodos para el aislamiento del ctDNA basados en la utilización de solventes orgánicos, columnas a base de sílice o perlas magnéticas. Sin embargo, a pesar de esta facilidad aparente para su aislamiento, el análisis posterior de este ctDNA requiere métodos generalmente complejos y altamente sensibles para su caracterización y cuantificación, debido principalmente a que este tipo de DNA representa una fracción muy pequeña del cfDNA total.

La fragmentación del ctDNA liberado al medio extracelular constituye un parámetro a tener en cuenta a la hora de su análisis, ya que puede aportar información valiosa acerca del origen del DNA liberado además de permitir la caracterización del tumor primario. El patrón de fragmentación está directamente asociado con la actividad tumoral, ya que un aumento de la concentración y fragmentación de este ctDNA tiende a relacionarse con indicar un mayor nivel de proliferación. La variabilidad que existe en la distribución y longitud de los fragmentos puede informar de igual modo sobre la heterogeneidad tumoral. Por otro lado, también aporta información sobre la respuesta al tratamiento, ya que la disminución de la longitud de los fragmentos tras la terapia se puede traducir

como una adecuada respuesta. Existen diferencias relativas al patrón de fragmentación entre el ctDNA y el cfDNA. El primero, proviene únicamente de las células tumorales y está compuesto por fragmentos más cortos y de tamaño uniforme, pues todos provienen del mismo tipo de células. Sin embargo, el cfDNA se refiere al DNA que es liberado de células no tumorales y que proviene de la apoptosis de células no tumorales, generalmente de células de origen hematopoyético o células epiteliales. La longitud de los fragmentos de DNA liberados a la sangre varía en función de su origen. De este modo, el ctDNA tiende a ser más corto (<100 pares de bases (bp)) y más fragmentado que el DNA procedente de células no tumorales, siendo el patrón habitual aproximadamente 167bp, lo que podría estar relacionado con los procesos de apoptosis y necrosis de las células tumorales ya mencionados. (15) Los análisis iniciales de fragmentación del ctDNA se realizaron mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), pero con el paso de los años se han ido desarrollando técnicas más simples y eficaces como la PCR cuantitativa o la PCR digital, entre otras. (16)

Las biopsias líquidas requieren, por lo general, de la extracción de 2 muestras de sangre de 10 ml cada una, de manera que pueda obtenerse la suficiente cantidad tanto de DNA total como de ctDNA para su análisis. La evaluación del ctDNA puede ser especialmente relevante en pacientes con tumores de difícil acceso para los que la obtención de una muestra mediante biopsia sea especialmente complicada, por ejemplo, en el caso de pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC). En el futuro, se espera que el análisis del ctDNA consiga sustituir a marcadores tumorales estándar como la AFP (alfa-fetoproteína), habitualmente presente en pacientes con CHC. La utilidad de la biopsia líquida radicaría en ofrecer una imagen más realista del tumor, permitiendo detectar la multitud de cambios genéticos que dotan de complejidad al tumor y ofreciendo además una vía de diagnóstico alternativa para pacientes que no secretan los marcadores tumorales estándar, por ejemplo, la AFP en el caso de pacientes con CHC. (17)

Métodos de detección del ctDNA:

El cfDNA se libera mayoritariamente en forma de fragmentos de 150 a 200 bp coincidiendo con el tamaño aproximado del nucleosoma y tiene una vida media relativamente corta, siendo óptimo su análisis en un plazo aproximado de 2h, para obtener información del estado del tumor en tiempo real. La concentración de cfDNA en plasma suele ser baja (5 a 10 ng/ml) y la fracción que corresponde al ctDNA puede variar, oscilando entre el 0,1% y el 30% del cfDNA total. (18)

La secuenciación de Sanger fue la primera técnica empleada para detectar ctDNA en plasma. Sin embargo, su uso continuado no ha sido viable por razones prácticas, debido a las limitaciones propias de la técnica como su bajo rendimiento, el alto coste por muestra y la ausencia de una sensibilidad suficiente como para detectar y secuenciar fragmentos de DNA circulante presentes en tan baja concentración. Actualmente, la mayoría de los métodos que utilizan el ctDNA como biomarcador de cáncer se centran

en el análisis de su secuencia con el fin de detectar mutaciones y no tanto en su cuantificación. El análisis del paisaje mutacional presente en los tumores puede realizarse mediante técnicas relacionadas con la PCR o bien mediante secuenciación de nueva generación (NGS).

La PCR es una técnica basada en la amplificación selectiva de regiones concretas del DNA mediante el uso de cebadores específicos permitiendo la amplificación y detección de una o varias secuencias del fragmento de DNA de interés. Por su parte, las técnicas de NGS se basan en la secuenciación masiva de fragmentos de DNA, permitiendo obtener información acerca de la secuencia concreta de millones de fragmentos de DNA localizados en diferentes regiones del genoma.

Los métodos basados en la PCR, así como los derivados de la misma, incluyendo la PCR cuantitativa (qPCR) y la PCR digital (dPCR), son rápidos, rentables y relativamente sencillos de manejar. Permiten la detección de mutaciones con una frecuencia alélica baja, de hasta el 0,1% de carga alélica variable e incluso menores en el caso de la dPCR, con una alta especificidad. Inicialmente, la qPCR se utilizaba para estimar la concentración de cfDNA en plasma de pacientes con cáncer. Posteriormente se desarrollaron ensayos de qPCR para detectar mutaciones en el cfDNA tumoral y se mejoró la sensibilidad de la detección al promover la amplificación específica del alelo mutante. Entre las técnicas más utilizadas derivadas de la PCR se encuentran ARMS-PCR, PNA-LNA Clamp PCR o COLD PCR.

La PCR digital es la técnica que se utiliza más frecuentemente en la práctica clínica. Ésta consiste en una variante de la PCR convencional basada en la separación de la reacción en múltiples compartimentos de pequeño volumen correspondientes a reacciones de PCR independientes en las que los componentes de la reacción se distribuyen de manera aleatoria. De esta forma, cada compartimento contendrá ninguna, una o varias moléculas de DNA, que tras la reacción de amplificación podrán ser cuantificadas mediante absorbancia. A diferencia de la PCR convencional, que únicamente amplifica el ctDNA a estudio en una sola reacción, esta técnica divide la muestra en miles de reacciones independientes y posteriormente se realiza la PCR sobre cada una de ellas. De esta forma se obtiene una cuantificación absoluta del DNA con una mayor precisión y sensibilidad, además de permitir la detección de niveles de DNA más bajos que la PCR convencional o la qPCR. Una técnica relacionada sería, el BEAMing, un método de PCR digital altamente sensible que combina PCR en emulsión y citometría de flujo para identificar y cuantificar mutaciones somáticas específicas presentes en el DNA. (19) Sin embargo, los métodos basados en PCR únicamente permiten la detección de mutaciones conocidas en genes concretos, que suelen analizarse de forma individual o mediante paneles que incluyen una selección de genes de interés adaptada a cada tipo de tumor. Por tanto, si las muestras a analizar presentan mutaciones diferentes a las

que se analizan convencionalmente, estas podrían quedar excluidas del análisis, lo que limitará las aplicaciones de la técnica.

Por otro lado, las técnicas de NGS cubren una amplia gama de mutaciones pues examinan secuencias completas de genes de interés. (20,21) El análisis de mutaciones en plasma mediante NGS puede además adoptar un enfoque dirigido en función de la necesidad de seleccionar regiones de interés dentro del genoma, lo que simplificaría el proceso de secuenciación y abarataría los costes. Uno de los principales retos en el análisis de mutaciones tumorales consiste en la identificación precisa de fragmentos del ctDNA en muestras que presentan concentraciones elevadas de cfDNA carente de mutaciones (wild-type). Es por esto que cobran una especial relevancia los términos frecuencia de alelo mutante (mutant allele frequency, MAF) y frecuencia de alelo variante (variant allele frequency, VAF), generalmente empleados para evaluar el rendimiento de un ensayo de perfiles del ctDNA. La frecuencia mutacional se define por tanto como el número de lecturas de secuenciación que contienen el alelo mutante dividido por el número total de lecturas de secuenciación. En consecuencia, las tasas de MAF más bajas requerirán ensayos que ofrezcan una mayor sensibilidad en la detección. La principal limitación en la implementación clínica de las técnicas basadas en NGS se derivan de cuestiones técnicas como la elevada sensibilidad requerida en la detección de variantes alélicas en estadios tempranos de la enfermedad, la complejidad del análisis de los resultados y del elevado coste económico de la técnica. (22)

CTCs

Las CTCs son células tumorales que han logrado liberarse del tumor primario y alcanzar el torrente sanguíneo o el sistema linfático. A medida que el cáncer progresa, las células tumorales circulantes pueden utilizar cualquiera de estos 2 sistemas para viajar a otras partes del cuerpo y establecerse como tumores secundarios. Muchos estudios, como los de Ring *et al.* y Lin *et al.*, coinciden en que estos grupos pequeños de células son iniciadores de metástasis en diferentes tipos de tumores sólidos. (23,24) La detección y estudio de estas células puede proporcionar información útil acerca de factores de gran relevancia como la aparición del cáncer, la eficacia del tratamiento y el potencial de metástasis. (25) En el análisis de CTCs, es fundamental realizar un enriquecimiento de la muestra, ya que estas células son altamente heterogéneas y circulan en escasa cuantía, resultando en una pequeña cantidad muestral.

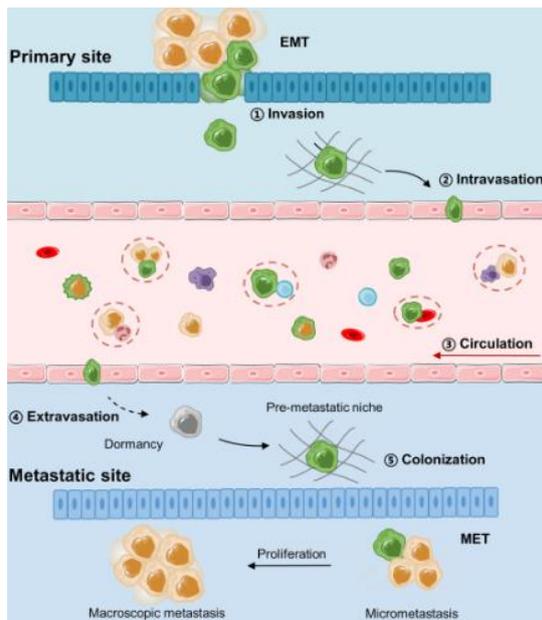


Figura 4. Pasos clave en la formación de metástasis mediadas por CTCs. El tumor primario aumenta de tamaño y comienza a invadir tejidos adyacentes, las células pasan al torrente sanguíneo, donde sobreviven como CTCs aisladas o formando pequeñas agrupaciones celulares. Se extravasan de la circulación y forman el nicho metastásico, colonizando una nueva localización y formándose micrometástasis que podrán crecer y formar metástasis macroscópicas. (23)

Métodos de detección de CTCs:

Hasta ahora, el único sistema aceptado por la FDA para la detección y recuento de CTCs es el sistema CellSearch, basado en la detección de CTCs EpCAM-positivas, es decir, aquellas que sobreexpresan el marcador epitelial de adhesión, directamente relacionado con una peor tasa de supervivencia y peor pronóstico en pacientes con cáncer. La detección y caracterización de CTCs con fenotipo de transición epitelio-mesenquimal es muy importante para identificar pacientes con alto riesgo de recidiva y muerte; este fenotipo consiste en células epiteliales que adoptan características de células mesenquimales, permitiéndoles tener una mayor capacidad para adherirse a la pared vascular, extravasarse, migrar e invadir tejidos distantes al tumor primario. (26)

Existen múltiples enfoques para el enriquecimiento del número generalmente escaso de CTCs procedentes de muestras de biopsia líquida, que incluyen sistemas basados en el uso de perlas magnéticas, sistemas de chips de microfluidos y sistemas híbridos que se desarrollan en función de las diferentes estrategias de captura de las CTCs. A su vez, las estrategias de separación se pueden clasificar en estrategias positivas, negativas y combinadas. Las estrategias positivas se basan en la captura selectiva de las CTCs, utilizando anticuerpos o moléculas que se unen a las CTCs específicamente permitiendo

su aislamiento. Por el contrario, las estrategias negativas consisten en eliminar las células no cancerosas de la muestra sanguínea aislando así únicamente las CTCs. A su vez, estas estrategias positivas de reconocimiento de CTCs se puede dividir en 2 categorías, por un lado, estrategias de inmunoafinidad, basadas en la detección mediada por anticuerpos contra moléculas presentes en la membrana de las células tumorales, y, por otro lado, estrategias que utilizan factores biofísicos para aislar las células y están relacionadas con los métodos de perlas magnéticas y chips de microfluidos. (27)

Dentro de los métodos de detección basados en la inmunoafinidad se encuentra el sistema CellSearch, diseñado para el recuento de CTCs en muestras de 7,5ml de sangre. Este método fue presentado por primera vez en el año 2004, demostrando una gran precisión analítica y reproducibilidad. Es el más utilizado, además de ser el único sistema hasta la fecha aprobado por la FDA para la detección y cuantificación de CTCs en la sangre periférica de pacientes con cáncer metastásico de mama, próstata y colorrectal. Es un sistema semiautomático basado en el aislamiento de las células con fluido férrico y su posterior marcaje con anticuerpos dirigidos contra la molécula de adhesión que expresan las células epiteliales (anti-EpCAM). Las células epiteliales circulantes son aisladas mediante campos magnéticos y posteriormente teñidas con el ácido nucleico fluorescente dye 4,2-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). (28) Esta tinción resulta útil pues se une al núcleo de todas las células presentes en la muestra permitiendo su detección y conteo individual mediante microscopía de fluorescencia. De esta forma, facilita la distinción entre las células epiteliales de los eritrocitos, ya que estos últimos carecen de núcleo. Las células tumorales, además, presentan diferente morfología e intensidad de fluorescencia con respecto a las células sanas, lo que facilita su cuantificación. Para distinguir las células epiteliales de los leucocitos se utilizan anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína específicos para receptores de leucocitos y o bien de células epiteliales. (29)

Existen otros métodos de aislamiento de CTCs, aún pendientes de aprobación por la FDA como la Epic Sciences Platform, AdnaTest y ClearCellFX system. A modo de ejemplo, la Epic Sciences Platform es un método de detección en el que todas las células nucleadas presentes en una muestra de sangre se depositan en un portaobjetos de vidrio, se tiñen mediante inmunofluorescencia con un conjunto de anticuerpos frente a citoqueratinas, y el marcador de células del sistema inmune CD45, así como del marcador nuclear DAPI y se obtienen imágenes de cada célula individual con el objetivo de identificar las células de interés. En la muestra van a estar incluidas células tanto malignas como no malignas, que se pueden evaluar de forma independiente. Un ensayo típico genera imágenes y analiza entre 10^6 y 10^8 células nucleadas individuales en una muestra de sangre, según los requisitos analíticos de la prueba que se realiza. (30,31)

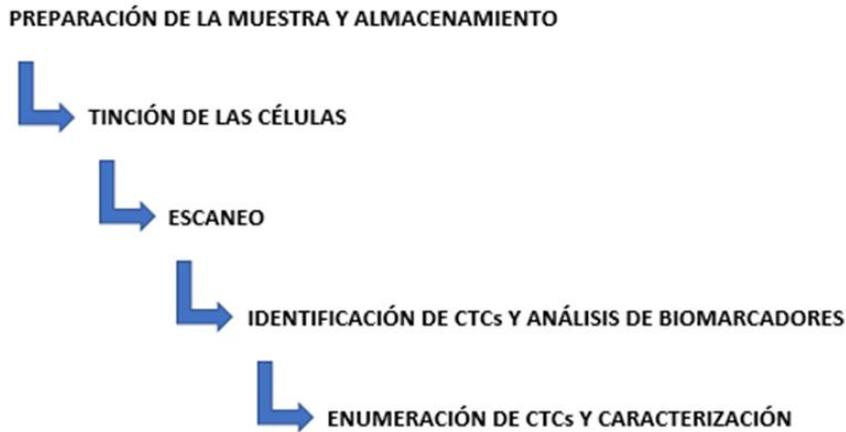


Figura 5 (A). Modificado de Shannon *et al.*

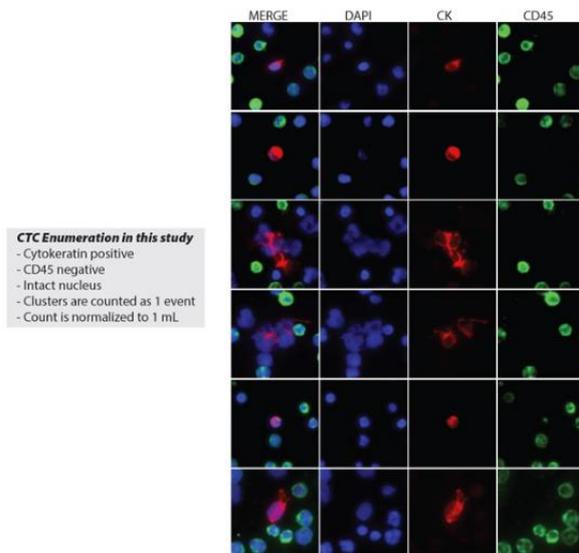


Figura 5 (B)

Figura 5. (A) Método de trabajo de la plataforma Epic Science que incluye preparación de muestras, enumeración de CTCs y análisis de biomarcadores. (30) **(B).** Detección y enumeración de CTCs. Las CTCs son células citoqueratina-positivas, CD-45 negativas y con núcleo intacto (DAPI positivas) a diferencia de las células no malignas. (31)

OTROS ELEMENTOS

Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (EVs) son partículas que puede ser liberadas por las células tanto en condiciones normales como patológicas. Estas vesículas están formadas por una bicapa lipídica que engloba en su interior una serie de moléculas como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos (RNAm y miRNA, etc...) encargadas de llevar a cabo funciones relacionadas con la comunicación intercelular una vez liberadas al medio extracelular. Además, estas vesículas carecen de núcleo en su interior, por tanto, no tienen capacidad de replicación. Algunos investigadores las subdividen en microvesículas para referirse a

EVs grandes (>200nm) y en exosomas para referirse a las pequeñas (entre 20 y 300nm). (32) Las EVs son secretadas por todas las células vivas y se encuentran presentes en todos los fluidos corporales humanos. Presentan características heterogéneas en cuanto a su biogénesis, composición y tamaño. Recientemente, las EVs han comenzado a ganar importancia en el campo de la biopsia líquida debido a su papel como valiosos portadores de biomarcadores de cáncer presentes en sangre y otros fluidos corporales, ya que numerosos estudios han demostrado que las proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y los metabolitos asociados a estas estructuras pueden informar acerca de fenotipos malignos en pacientes con cáncer. A pesar de todo esto, la falta de protocolos estandarizados y clínicamente viables para la caracterización de estas EVs limita, por ahora, su aplicabilidad como biomarcadores del cáncer. (33)

Métodos de detección de las vesículas extracelulares:

Las vesículas extracelulares se observaron por primera vez en 1946 y fueron aisladas originalmente mediante técnicas de ultracentrifugación, basadas en la separación de las vesículas extracelulares del resto de los componentes biológicos de la muestra en función de su densidad y tamaño. Este método sigue siendo considerado actualmente como el “gold standard” a pesar del desarrollo de nuevas técnicas en los últimos tiempos. Estos métodos alternativos se basan principalmente en el aislamiento por tamaño, inmunoafinidad y precipitación de las EVs. No obstante, estos métodos no logran aislar únicamente las EVs y habitualmente se obtienen como resultado mezclas de EVs con otros componentes de la matriz extracelular. (34)

Otro método ampliamente utilizado en los últimos años es la precipitación de EVs en soluciones de polietilenglicol (PEG). Esta técnica consiste en la mezcla de la muestra objeto de estudio junto a una solución de polímeros, y tras un período de incubación, se produce la sedimentación de las EVs mediante centrifugación a baja velocidad. Posteriormente, las vesículas sedimentadas se suspenden en una solución de tampón salino fosfato (PBS) y se analizan. Las principales ventajas de este método basado en la precipitación son su sencillez, velocidad, posibilidad de trabajar en un rango de pH fisiológico y una escasa dependencia de la concentración de los iones. (35)

El aislamiento de EVs se puede conseguir utilizando distinto tipo de metodología. Algunos ejemplos serían la filtración secuencial y la cromatografía de exclusión por tamaño, que se basan en el aislamiento en función del tamaño de la partícula; los ensayos de tipo ELISA o aquellos realizados mediante citometría de flujo, basados en la inmunoafinidad y las técnicas de aislamiento basadas en microfluidos, como el nanofiltro acústico.

El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) es una técnica cada vez más popular que permite valorar el tamaño, la concentración y distribución de las EVs. Este método se fundamenta en la detección de partículas individuales y el posterior seguimiento de

la dispersión de la luz a través de un campo de visión bajo microscopía óptica. Como esta técnica rastrea cada partícula de forma individual, es necesaria una concentración baja de EVs para lograr resultados precisos (aproximadamente entre 10^6 - 10^{10} partículas/ml). Puede caracterizar partículas en tiempo real generalmente de entre 10-2000 nm. Esto es una ventaja con respecto a la citometría de flujo, que detecta partículas a partir de 200nm, por lo que no permite el estudio directo de las EVs. La principal ventaja de esta técnica radica en que ofrece una alta resolución y sensibilidad. (36)

Plaquetas educadas por tumores

Las plaquetas son fragmentos celulares carentes de núcleo producidas por los megacariocitos. Su función fisiológica es la de participar en el proceso de coagulación sanguínea para frenar posibles sangrados y facilitar la cicatrización de las heridas. Las plaquetas educadas por tumor (tumor educated platelets, TEPs) tienen la capacidad de capturar y transportar RNA tumoral mediante diferentes mecanismos, como la internalización de microvesículas tumorales y la interacción con miRNAs, facilitando la diseminación del RNA tumoral. Del mismo modo, también pueden modificar la respuesta inmune frente al RNA tumoral promoviendo así un efecto inmunosupresor que favorece el escape de las células tumorales al sistema inmunológico. De esta forma, pueden estimular la supervivencia de las células tumorales, el crecimiento tumoral y las metástasis. También se ha demostrado la capacidad de las células tumorales de influir en la expresión de RNA en estas plaquetas, por lo que el estudio del transcriptoma de las TEPs señala su potencial como método de diagnóstico y seguimiento del cáncer en algunos tipos de tumores.

cfRNA

El cfRNA fue descrito con posterioridad a la presencia de ctDNA en el plasma de pacientes con melanoma. Gracias al desarrollo de nuevos métodos más sensibles, ha sido posible identificar moléculas de RNAm y miRNA en fluidos corporales, que se pueden encontrar formando complejos de ribonucleoproteínas, plaquetas o CTCs y EVs. El cfRNA puede proporcionar información útil acerca del perfil de expresión génica del tumor, y los miRNA, por su parte, pueden reflejar alteraciones epigenéticas que son reconocidas en la actualidad como se han propuesto como una de las características distintivas del cáncer. El miRNA es una subclase de RNA no codificante compuesto por 18-22 nucleótidos de fragmentos de RNA monocatenario que desempeña un papel importante en las redes de la regulación de genes, regulando positiva o negativamente la expresión de sus genes diana. Una de las principales ventajas de utilizar miRNA procedente de muestras de LB es que son más estables que los RNAm. (37,38)

Aplicaciones clínicas de la biopsia líquida

La biopsia líquida presenta múltiples aplicaciones clínicas, enfocadas al diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. No obstante, existen también una serie de aplicaciones clínicas interesantes que son menos conocidas y están relacionadas con la evaluación del sistema inmune. El uso de la biopsia líquida cuenta con una serie de ventajas con respecto a los métodos de diagnóstico y seguimiento tradicionales, principalmente relacionadas con una menor invasividad y un menor coste de obtención de la muestra. Además, la LB permite la detección de material desprendido de los diferentes sitios metastásicos en vez de analizar solo la porción de tejido obtenida de la biopsia tisular, de esta forma favorece el estudio de la heterogeneidad tumoral. Una de sus principales ventajas es que se pueden obtener muestras en serie permitiendo una mejor monitorización de la respuesta al tratamiento y pudiendo detectar enfermedad residual mínima tras la terapia. La detección temprana del cáncer mediante LB se puede utilizar también para realizar cribados. (39)

Revisando con más detalle las aplicaciones clínicas ya mencionadas destacan las siguientes:

Detección temprana del cáncer:

En muchas neoplasias malignas, el hallazgo y tratamiento temprano son fundamentales para obtener un mejor resultado. Poder identificar a pacientes que presentan cáncer en una etapa temprana mediante un análisis de sangre u otros fluidos corporales, brinda la posibilidad de llevar a cabo cirugía o radioterapia pudiendo lograr remisiones duraderas sin la necesidad de someter al paciente al procedimiento de obtención de una biopsia, que en algunos casos puede resultar una tarea compleja. Además, debido a la escasa invasividad a la hora de obtener la muestra, la LB tiene el potencial de ser aplicada en pruebas de cribado poblacional para distintos tipos de tumores.

Evaluación de tumores inaccesibles para la realización de biopsia tisular:

El análisis del tumor a nivel molecular se ve limitado en pacientes que presentan tumores en localizaciones de difícil acceso o que presentan comorbilidades que dificultan la obtención de la muestra. En estos casos, la biopsia líquida se presenta como una herramienta de gran utilidad puesto que el análisis del cfDNA circulante en la sangre de pacientes con cáncer permitiría obtener la información molecular necesaria cuando no existe posibilidad de obtener tejido tumoral mediante biopsia tradicional. Actualmente, para estudiar este cfDNA se utilizan métodos como la dPCR, que se centran en el análisis de regiones concretas del genoma, aportando una gran sensibilidad. Otra situación en la que se podría utilizar la LB es en la detección y caracterización de neoplasias en mujeres embarazadas, de este modo se puede estudiar a la paciente de forma segura y eficaz sin afectar a la salud y bienestar del feto, pues

simplemente se necesitaría la extracción de sangre de la paciente sin llevar a cabo ninguna prueba invasiva que pueda poner en riesgo al feto.

Evaluación de la heterogeneidad tumoral:

Los tumores sólidos, especialmente aquellos que se encuentran en estadios avanzados, presentan una elevada heterogeneidad a nivel molecular, es decir, están formados por subpoblaciones celulares que presentan alteraciones genéticas únicas y diferentes entre sí. Esta característica propia del cáncer dificulta tanto la elección de la terapia como la eficacia de la misma e impulsa la progresión del tumor debido a la presencia de subpoblaciones celulares con diferentes mutaciones capaces de generar resistencia al tratamiento. El estudio de diferentes secciones de un tumor permite obtener un perfil molecular completo del mismo facilitando la elección de las mejores opciones terapéuticas indicadas para cada paciente. El análisis de biopsias tisulares procedentes de una única porción de tejido impide obtener información acerca del paisaje mutacional completo que presenta el tumor. Sin embargo, el estudio del ctDNA o las CTCs que llegan al torrente sanguíneo desde los diferentes sitios tumorales permiten obtener una información más precisa y completa acerca de las alteraciones genéticas presentes en el tumor. (40)

Diferenciación de patrones únicos de respuesta de bloqueo de “checkpoints” inmunológicos:

La LB permite monitorizar el curso de la enfermedad a lo largo del tiempo después del inicio de tratamiento con fármacos inhibidores de los “checkpoints” inmunológicos que pueden ser utilizados en inmunoterapia. Los “checkpoints” inmunológicos son mecanismos reguladores del sistema inmunológico conformados por proteínas reguladoras inhibitorias de la activación de células T que actúan como moléculas de punto de control para modular la respuesta inmune y regular la hiperactivación. Los más potentes y comúnmente conocidos son el CTLA-4 (antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos) y el PD-1 (muerte programada 1). Estas moléculas se complementan funcionalmente y se encargan de limitar la inflamación tisular y preservar los fenómenos de auto-tolerancia de las células T, previniendo la autoinmunidad, así como de proteger al organismo frente a neoplasias y patógenos. Determinar qué pacientes se beneficiarán de la inmunoterapia es importante para la toma de decisiones terapéuticas. Se ha demostrado que la carga mutacional tumoral detectada mediante NGS se correlaciona con la respuesta a los inhibidores de los checkpoints inmunológicos. La alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) también ha sido predictiva de la respuesta a los inhibidores de los checkpoints inmunológicos en cánceres avanzados. También se ha explorado la carga mutacional del tumor en sangre y el estado de MSI para determinar que pacientes se beneficiarán. Khagi y colaboradores investigaron la asociación entre el ctDNA hipermutado y la respuesta a la inmunoterapia. Un número elevado de alteraciones totales o variantes de significado desconocido dio como resultado tasas de beneficio

clínico significativamente más altas (enfermedad estable igual o superior a 6 meses, con respuesta parcial o completa) que números bajos de alteración en 69 pacientes evaluados con secuenciación de ctDNA mediante NGS. De manera similar al potencial de predicción de la respuesta a la quimioterapia, el análisis del ctDNA puede resultar útil a la hora de guiar la inmunoterapia. Cabe mencionar que la carga mutacional en el ctDNA está asociada con la eficacia de la inmunoterapia y sirve como un reflejo directo de la carga tumoral. (41) Es interesante mencionar que, aunque la inmunoterapia ha prolongado la supervivencia libre de progresión en pacientes con CCR con MSI-H, el estudio KEYNOTE-177 informa de que aproximadamente un 30% de los pacientes en el estudio no mostraron respuesta a pembrolizumab (anti-PD-1). De este modo, en estos pacientes la monitorización del ctDNA para identificar a los que no responden en una etapa temprana puede brindar una oportunidad para la modificación del tratamiento por quimioterapia o incluso la administración de un fármaco alternativo, por ejemplo, anti-CTLA-4 en el caso de estos pacientes. (42,43)

Ricciuti y colaboradores, utilizaron el ctDNA para ayudar a predecir la respuesta a la inmunoterapia en pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas. A los pacientes sometidos a tratamiento con pembrolizumab ± platino/pemetrexed se les evaluó el contenido en ctDNA en sangre al inicio del estudio. El porcentaje de variación en la cantidad de ctDNA en el primer seguimiento y el porcentaje de cambio en las lesiones del tumor se correlacionaron significativamente. Las disminuciones en la cantidad de ctDNA se asociaron con tasas de respuesta significativamente más altas, una mediana de supervivencia libre de progresión más larga y una mediana de supervivencia general en comparación con aquellos que presentaban un aumento. (44)

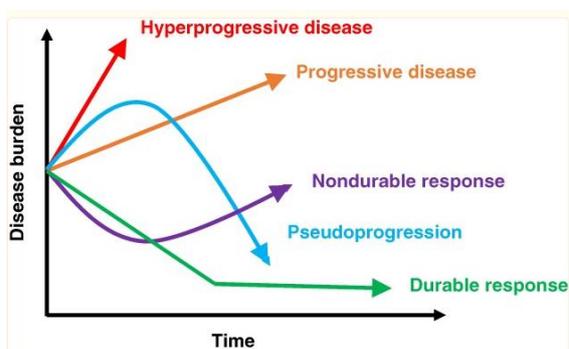


Figura 6. Patrones de respuesta a la inmunoterapia con fármacos inhibidores de los “checkpoints” inmunológicos. Respuesta duradera: el cáncer radiológicamente disminuye de tamaño y permanece invariable una vez finalizado el tratamiento. Pseudoprogresión: las pruebas radiológicas muestran un aumento inicial del tamaño del tumor (probablemente debido a infiltración inmune) y posteriormente disminuye de tamaño. Respuesta no duradera: las lesiones responden inicialmente a la inmunoterapia, pero posteriormente se vuelven resistentes y aumentan de tamaño. Enfermedad progresiva: las lesiones aumentan de tamaño en más de un 20% con

respecto a las pruebas iniciales. Enfermedad hiperprogresiva: se produce crecimiento rápido del cáncer una vez se inicia la inmunoterapia. (45)

Muestreo en serie para respuesta y detección temprana de resistencias:

Una evaluación seriada de CTCs y ctDNA podría proporcionar una predicción temprana de la respuesta y posible resistencia al tratamiento, pudiendo así complementar a los estudios de imagen y a los marcadores tumorales estándar.

En el caso del cáncer colorrectal (CCR), la caracterización molecular del tumor de forma continua y precisa es fundamental para el correcto uso de terapias moleculares dirigidas. Por ejemplo, se puede utilizar la LB para detectar mutaciones del gen KRAS en el cfDNA en caso de que no se hayan detectado en el tumor primario mediante biopsia tradicional. La presencia de alteraciones en el gen KRAS tiene una gran relevancia, pues determina la selección del tratamiento ya que esta mutación genera habitualmente resistencia a los inhibidores del receptor de la tirosina quinasa, como pueden ser los anticuerpos monoclonales anti-EGFR (cetuximab y panitumumab). (46)

En el caso del cáncer de mama, el equipo de Di Cosimo y colaboradores detectaron que los aumentos de ct-miRNA-148a-3p y ct-miRNA-374a-5p en la sangre se relacionaron con una respuesta patológica después de la terapia neoadyuvante con trastuzumab, indicando que la detección de estos miRNA se podrían usar como biomarcadores predictivos. (47)

La LB además también tiene aplicación en el seguimiento de la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer diferenciado de tiroides. El análisis de ctDNA y recuento de CTCs pueden superar potencialmente al método de rastreo convencional basado en la medición de la tiroglobulina sérica (posterior a la cirugía) o a las imágenes radiológicas como métodos para evaluar la respuesta al tratamiento. Según un estudio de Allin y colaboradores, los cambios en los niveles de ctDNA pueden anticipar la progresión del tumor en comparación con la tiroglobulina en pacientes que reciben terapias dirigidas para el cáncer diferenciado de tiroides. (48,49)

Herramienta pronóstica:

La LB ofrece la posibilidad de ser utilizada como herramienta pronóstica, es decir, permite determinar las características moleculares de la enfermedad y con ello decidir la opción terapéutica más adecuada en cada caso, así como la frecuencia en su seguimiento.

El cáncer colorrectal representó la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en el año 2018. En este contexto, el gen KRAS juega un papel fundamental. Este es un oncogén comúnmente mutado, aproximadamente el 40% de los CCR presentan algún tipo de alteración genética en KRAS. Las mutaciones de este gen dan como resultado la

activación constitutiva de la proteína KRAS, la cual estimula la proliferación y supervivencia celular, conduciendo a la tumorigénesis. Estos pacientes mutados presentan un peor pronóstico que los pacientes con KRAS wild-type, requiriendo terapias más precisas. (50)

La importancia del ctDNA para predecir la respuesta a la inmunoterapia quedó demostrada en un estudio prospectivo realizado por Seremet *et al.* Este estudio analizó muestras de plasma de 85 pacientes que fueron sometidos a terapia anti-PD-1 y evaluaron las mutaciones V600E/K en BRAF o Q61/G12/G13 en NRAS, en el ctDNA. Los pacientes con niveles de ctDNA indetectable al inicio del estudio mostraron una mejor supervivencia global y libre de progresión en comparación con aquellos pacientes con niveles de ctDNA detectable. (51) Los pacientes con la mutación V600E/K en BRAF presentaron un peor pronóstico general. Sin embargo, en los pacientes que presentaban esta mutación observaron una mejor respuesta a ciertos tratamientos dirigidos, como los inhibidores de BRAF y MEK, pudiendo mejorar el pronóstico a corto plazo. También se ha observado que pueden experimentar una mejor respuesta a la inmunoterapia. La combinación de estos 2 tipos de terapias podría mejorar significativamente la supervivencia en algunos pacientes una vez realizada la caracterización molecular de los tumores que presentan y la biopsia líquida representa una herramienta prometedora en el manejo de la enfermedad. (52)

Predicción de la respuesta de las células CAR-T:

El tratamiento basado en el uso de células CAR-T se utiliza cada vez más en cánceres hematológicos. La LB podría ayudar a predecir la respuesta y monitorizar la progresión de la enfermedad más allá del uso de pruebas de imagen y biopsia de la médula ósea mediante la cuantificación y el análisis de fragmentos de cfDNA liberados de forma específica por la población de células CAR-T en el paciente (cfCAR-DNA). El estudio de Mika y colaboradores demuestra la utilidad que representa la cuantificación de las células CAR-T y los niveles de cfDNA liberados por estas células en pacientes tratados con axicabtagene-ciloleucel (axi-cel). Los investigadores demostraron que las células CAR-T contribuyen significativamente a la liberación de DNA circulante en pacientes tratados con axi-cel y de esta manera, un incremento de este cfDNA específico, denominado cfCAR-DNA se correlaciona con la expansión de las células CAR-T. Tanto la cinética como el mecanismo de liberación del cfCAR-DNA se encuentra aún bajo investigación, pero en general, se acepta que la mayor parte de este cfDNA procede de la apoptosis de células CART-T. De esta manera, un mayor número de células CAR-T, debido a la proliferación, conduce a cantidades crecientes de cfCAR-DNA liberado. Esta hipótesis está respaldada por la correlación existente entre los recuentos absolutos de células CAR-T y la cantidad de cfCAR-DNA detectado en experimentos in vitro. De manera concordante, se midieron niveles más altos de cfCAR-DNA en pacientes que respondieron al tratamiento con axi-cel. Por tanto, la cuantificación de los niveles de cfCAR-DNA podría usarse como sustituto del recuento absoluto de células CAR-T in vivo.

No obstante, son necesarios estudios adicionales antes de implementar esta metodología en la práctica clínica. (53)

Las células CAR-T son fundamentales en un tipo de terapia personalizada basada en la extracción y posterior modificación genética de las células T del paciente. Esta modificación consiste en la inducción de la expresión de receptor sintético, que presenta un dominio extracelular capaz de reconocer antígenos tumorales vinculado a su vez a una serie de acontecimientos de señalización a nivel intracelular que regulan la activación de las células T. Posteriormente, se amplifica el número de estas células y se infunden de nuevo en el paciente. (54)

Una de las neoplasias que se puede beneficiar de esta terapia es el linfoma B difuso de células grandes, que constituye el tipo de linfoma no Hodking agresivo más común. Entre un 50 y un 60% de estos pacientes se curan mediante quimioinmunoterapia, sin embargo, un pequeño porcentaje es refractario a este tratamiento. El linfoma B difuso de células grandes refractario tiene una mediana de supervivencia muy corta, de aproximadamente 6 meses. Otras neoplasias que también se pueden beneficiar son la leucemia linfoblástica aguda y el mieloma múltiple. En ambos casos, el uso de la LB facilitaría la implementación de este tipo de terapia en la práctica clínica al resultar una herramienta útil para la monitorización de la enfermedad. (55)

Detección de enfermedad mínima residual:

La enfermedad residual mínima (MRD) es el término que se usa para referirse a la presencia de células tumorales residuales tras el tratamiento. Estas células se encuentran en cantidades tan pequeñas que no pueden detectarse con los métodos de diagnóstico convencionales como las pruebas de imagen o los análisis sanguíneos estándar. La presencia de MRD después del tratamiento predice las recaídas. De este modo, estudiando la MRD es posible decidir qué pacientes serán candidatos para recibir tratamiento adyuvante y también se podrá estudiar la respuesta a dicho tratamiento. (56)

Tradicionalmente, se han utilizado varias estrategias de vigilancia de la MRD en pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC), principalmente basadas en imágenes radiológicas y biopsias del tejido. La biopsia líquida, utilizada para evaluar el ctDNA liberado en pacientes con CHC, permite la vigilancia de MRD en neoplasias malignas primarias del hígado. La biopsia líquida es la herramienta de evaluación de la MRD en pacientes con CHC utilizada en la actualidad. La técnica se basa en la detección y el análisis del ctDNA liberado al torrente sanguíneo por neoplasia maligna del CHC, permitiendo evaluar la presencia de células malignas residuales que hayan aparecido tras el tratamiento. (57)

Trasplante de órganos en pacientes con cáncer

La detección y análisis de cfDNA ha supuesto un gran avance en el tratamiento de los pacientes con cáncer que se someten a trasplante de órganos. Los avances en la tecnología de aislamiento y análisis del cfDNA han brindado opciones para realizar una evaluación de MRD previa al trasplante y una evaluación posterior del rechazo del trasplante y la recurrencia del cáncer mediante el análisis de distintas variables genéticas. Sin embargo, y a pesar de los numerosos beneficios derivados del uso de este tipo de herramientas, también existen una serie de desventajas asociadas a la detección de cfDNA incluyendo la necesidad de realizar análisis genéticos dirigidos, es decir, seleccionando previamente las mutaciones de interés. A pesar de estas limitaciones, se han desarrollado numerosas plataformas y enfoques de secuenciación comerciales, de investigación e industriales para proporcionar una solución práctica tales como Guardant360[®] CDx, FoundationOne Liquid Cdx, Vanadis cfDNA platform, PlasmaSelect-R y Oncotype SEQ, todos ejemplos de ensayos de secuenciación comerciales ampliamente disponibles que pueden analizar cfDNA con fines diagnósticos y terapéuticos. Además, empresas, como Natera, han sido pioneras en varios ensayos proporcionando opciones para personalizar la atención de los pacientes que se someten específicamente a un trasplante de hígado.

A diferencia de otros trasplantes de órganos sólidos, donde los antecedentes de cáncer son una contraindicación para el trasplante, el trasplante de hígado es una estrategia que puede utilizarse como enfoque curativo para las neoplasias malignas hepatobiliares. Si bien la resección quirúrgica sola o la ablación por radiofrecuencia son opciones en casos de CHC con función hepática bien compensada o tumores más pequeños, la realidad es que el 90% de los casos de CHC ocurren en el contexto de cirrosis hepática. Por lo tanto, el trasplante de hígado sigue siendo un enfoque sensato para tratar también la cirrosis hepática subyacente, un factor de riesgo importante que facilita el desarrollo de nuevo tejido preoncogénico. A pesar de la promesa de la oncología del trasplante como opción curativa para el CHC irresecable, una advertencia clave que debe tenerse en cuenta es que todavía existe una tasa elevada de recurrencia del CHC después de la resección quirúrgica radical, la ablación o el trasplante hepático. La detección y el seguimiento de la recurrencia del CHC todavía se basan principalmente en imágenes, evaluación de biopsias de tejido y cuantificación de los niveles séricos de alfafetoproteína. Desafortunadamente, las imágenes y la patología aún presentan limitaciones en cuanto a precisión y sensibilidad diagnóstica, y los marcadores séricos comunes muestran un rendimiento pronóstico deficiente. Es por esto que actualmente existe la necesidad de desarrollar un método sólido para detectar el CHC en etapas tempranas y monitorizar la recurrencia del tumor y el rechazo del trasplante. Para abordar esta necesidad insatisfecha, la biopsia líquida ha surgido como un método prometedor que puede ayudar a controlar la recurrencia del tumor y el rechazo de órganos tras el trasplante hepático.

Las biopsias líquidas en forma de detección de biomarcadores de cfDNA se han vuelto cada vez más comunes como un nuevo mecanismo para evaluar la recurrencia del CHC después del trasplante. Algunos ejemplos de biomarcadores de cfDNA que se han examinado con estos fines incluyen la concentración de cfDNA, la densidad de metilación, las mutaciones del gen TP53, la metilación de los genes RASSF1A y GSTP1. Long y colaboradores investigaron el valor diagnóstico de la concentración de ctDNA como marcador de rechazo de trasplantes en pacientes con CHC después de un trasplante de hígado. En este estudio retrospectivo, se midió y evaluó el cfDNA posoperatorio como biomarcador de recurrencia del CHC. Se sometió a 82 pacientes con CHC a hepatectomías y a continuación se aisló cfDNA de muestras de sangre postoperatorias y se utilizó un ensayo fluorométrico de dsDNA para medir la concentración de cfDNA. Los pacientes se dividieron en dos grupos: cfDNA-bajo (cfDNA \leq 2,95 ng/ μ L) y cfDNA-alto (cfDNA $>$ 2,95 ng/ μ L). Los grupos con cfDNA bajo y cfDNA alto tuvieron una mediana de tiempos de recurrencia de 19,5 y 14 meses, respectivamente. Por tanto, este ensayo demuestra la utilidad del análisis del cfDNA a la hora de predecir los tiempos de recurrencia en CHC. (58,59)

Otras aplicaciones en diferentes tipos de cáncer:

Cáncer gástrico

Los ensayos de biopsia líquida aplicados al cáncer gástrico (GC) son relativamente extensos. Varios de estos ensayos tienen como objetivo lograr un diagnóstico precoz. Por ejemplo, el ensayo cfMeDIP-Seq, en el que se combina la inmunoprecipitación de cfDNA metilado con NGS, se usa no solo para el diagnóstico del cáncer, sino también para distinguir entre los diferentes tipos de GC. En los últimos años, la investigación en inmunoterapia ha logrado resultados prometedores en muchos tumores, entre ellos en este tipo de cáncer. La LB se ha propuesto como herramienta para seleccionar pacientes aptos para la inmunoterapia. Por ejemplo, el ensayo clínico INTEGA, comparó la eficacia entre la inmunoterapia sin quimioterapia y la inmunoterapia después de quimioterapia con FOLFOX en pacientes con cáncer de unión gastroesofágica HER2 positivo localmente avanzado o irresecable. Para ello se analizaron de forma simultánea una serie de parámetros, a partir de muestras de sangre periférica, que incluían biomarcadores (estatus HER2) presentes en ctDNA, CTCs y recuento de linfocitos T, tanto de forma previa al tratamiento como antes del segundo ciclo de tratamiento. Los resultados mostraron que la elevación temprana de cfDNA se correlacionaba con una supervivencia libre de progresión y supervivencia global más cortas. Este ensayo sugiere que los pacientes que tienen niveles favorables de células T sanguíneas, ausencia de CTCs o expresión de HER2 en las CTC pueden beneficiarse de un tratamiento con solo inmunoterapia dirigida frente a HER2, mientras que los pacientes que no presenten estas características no se beneficiarán únicamente de inmunoterapia y requerirán de quimioterapia adicional. (60,61) El análisis del status del marcador HER2 presente en el ctDNA también se puede utilizar para la realizar un cribado poblacional del gen HER2, ya que se ha demostrado la existencia de una alta concordancia en la amplificación de gen

HER2 analizado a partir de ctDNA o de biopsia tisular. Además, la detección de la variación en el número de copias de HER2 mediante análisis del ctDNA podría utilizarse para monitorizar la eficacia del trastuzumab, así como la resistencia que puede existir tanto innata como desarrollada frente a este. (62), (63)

Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad tanto en hombres como en mujeres. En 2022 hubo 1,8 millones de muertes a nivel mundial, que representaron el 18,7% del total de muertes por cáncer. La monitorización de las CTCs en el adenocarcinoma de pulmón en sus estadios iniciales ha resultado ser una herramienta eficaz en el diagnóstico temprano. De hecho, se ha observado un aumento significativo en los niveles de CTCs en pacientes con progresión del cáncer de pulmón. La detección de CTCs se puede utilizar como alternativa diagnóstica y de seguimiento de la enfermedad en pacientes con reordenamiento del gen de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) cuando no se pueden obtener muestras de tejido apropiadas a partir de la biopsia tradicional. (64) En otro estudio realizado, se extrajo sangre cada 2 meses en pacientes con NSCLC con mutación en el gen de EGFR y tras el tratamiento con un inhibidor de la tirosina quinasa erlotinib, se valoró la cantidad de CTCs presentes en sangre para estudiar la evolución de la enfermedad. Este estudio confirmó la utilidad de las CTCs como complemento de la detección de mutaciones de EGFR y del diagnóstico histológico en el cáncer de pulmón en casos en los que no se podía obtener suficiente material histológico para su análisis patológico. La cuantificación de CTCs resultó de utilidad también como método para dirigir el tratamiento preciso frente a la mutación de EGFR. (65)

Cáncer de próstata

Esta neoplasia es la segunda más frecuente en el hombre. Para estudiar este cáncer se lleva utilizando durante muchos años el antígeno prostático específico (PSA) a modo de biomarcador. Protocolariamente, tras la existencia de una clínica sospechosa, una exploración física adecuada y la elevación de este biomarcador, se realiza una biopsia con aguja gruesa (BAG) pues una biopsia con aguja fina (PAAF) no obtiene la cantidad de material suficiente, permitiendo así una evaluación histológica adecuada. La baja precisión del PSA como biomarcador, así como la dificultad para diferenciar entre neoplasias de próstata agresivas e indolentes conlleva biopsias innecesarias, así como sobretratamiento de los pacientes. Otro problema de la biopsia convencional al estudiar este cáncer es la posible diseminación de células tumorales a la sangre, sugerida por el incremento de las CTCs posterior a la biopsia. En un ensayo realizado por Vanwelkenhuyzen et al. estudiaron el DNA libre de células en muestras de sangre de pacientes con cáncer de próstata metastásico avanzado que iniciaron tratamiento con lutecio-177-PSMA, una nueva terapia con radioligando. Se recogieron muestras de biopsia líquida antes y durante el tratamiento con 177 Lu-PSMA para realizar un perfil

genómico completo del ctDNA derivado del plasma. De los 46 pacientes que proporcionaron una muestra de sangre antes del tratamiento con 177 Lu-PSMA, se detectó ctDNA en 39, sugiriendo que un ctDNA más alto se correlacionaba con una supervivencia libre de progresión más corta. Reordenamientos estructurales genómicos en el gen AR y alteraciones en la vía de señalización de PI3K que se asociaron de forma independiente con un mal pronóstico del tratamiento con 177 Lu-PSMA. (66,67)

Limitaciones y retos

La biopsia líquida es una técnica emergente, aunque en continua evolución, diagnóstica, no invasiva, que complementa y completa las principales limitaciones de la biopsia tisular. Hoy en día, hay pocas pruebas diagnósticas y de seguimiento de la enfermedad basadas en la LB aprobadas por la FDA, debido a los retos y limitaciones derivados de la misma. (68)

Estas técnicas no invasivas han ido ganando poco a poco una amplia atención en el campo de la oncología. Sin embargo, debido a su reciente desarrollo, aún no está considerada, en varios países una herramienta estándar para el diagnóstico de diferentes enfermedades y, por tanto, en la actualidad se usa principalmente a modo de prueba complementaria a la biopsia de tejido. Principalmente se utiliza en EEUU, Reino Unido, la Unión Europea y Japón. Su principal limitación es la falta de sensibilidad y precisión para identificar diferentes tipos de tumores en comparación con la biopsia tradicional. Tampoco se sabe con certeza si la LB proporciona una muestra representativa de todos los clones genómicos dentro de un tumor individual o de una región específica de este. Sin embargo, es evidente que ofrece una representación más realista del tumor que la propia biopsia tisular pues permite el estudio del ctDNA o las CTCs que llegan al torrente sanguíneo desde los diferentes sitios tumorales.

Existen diferentes variables biológicas que afectan a la cantidad y a las características del cfDNA que son difíciles de controlar. Gran parte del cfDNA se deriva de células que están en proceso de apoptosis y, de esta forma, el estado de salud de un individuo, influenciado por el ejercicio físico y por las infecciones que puedan estar presentes en un momento dado, afectarán a los niveles de cfDNA detectados en sangre. Otra variable que puede influir es la ingesta de gran cantidad de líquidos, lo cual diluirá la concentración de cfDNA en sangre y disminuirán sus niveles, puesto que el cfDNA será eliminado parcialmente por la orina.

El uso de la LB se presenta limitaciones a nivel técnico, principalmente relacionadas con el retraso en el transporte, la distribución de la muestra en alícuotas y el almacenamiento de las mismas. Estas limitaciones pueden provocar daño químico al cfDNA y contaminación de este por parte del DNA de los leucocitos en el caso de no realizar de forma correcta la centrifugación para separar el plasma de los eritrocitos y los leucocitos. El DNA también puede sufrir diferentes tipos de reacciones como de

hidrólisis, de desaminación o de daño oxidativo in vitro en el tubo de extracción de la sangre. A partir de estas reacciones no deseadas se podrían formar productos que pueden ser reconocidos como falsas mutaciones, conocidos como nucleósidos no canónicos que podrían interferir con la precisión del análisis del cfDNA. Existen una serie de kits comerciales que afirman poder reparar estos daños del DNA, pero el consenso general coincide en que la reparación de estos daños es imperfecta. (69) Cabe mencionar que el estudio de la sangre presenta ventajas en cuanto a la facilidad de su obtención con respecto a otros fluidos biológicos, por ejemplo, en comparación con el líquido pleural o el cefalorraquídeo, que precisan de personal experimentado y de técnicas más complejas como la toracocentesis y la punción lumbar respectivamente, con el consiguiente riesgo para el paciente.

Un caso representativo de tumor de difícil acceso mediante biopsia tradicional es el glioblastoma. El glioblastoma es el tumor cerebral primario maligno, y letal, más frecuente en adultos. Representa casi la mitad de los tumores malignos del SNC y se localiza principalmente en los lóbulos frontal y temporal. Presenta una supervivencia media de tan solo 12-15 meses desde el momento del diagnóstico, siendo este catalogado como un tumor muy agresivo con una supervivencia a los 5 años inferior al 5%. Para estudiarlo mediante LB se requiere una punción lumbar o cisternal. La sangre es el fluido óptimo para realizar la biopsia líquida. No obstante, se trata de un tejido de difícil acceso debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, que impide el paso de los biomarcadores circulantes al torrente sanguíneo, dando como resultado niveles bajos de estos en sangre en comparación con los niveles que existen en el líquido cefalorraquídeo, dificultando por tanto, la implementación de estos biomarcadores en la práctica clínica habitual. Esta insuficiencia de material impediría la realización de un correcto genotipado y detección de mutaciones somáticas del tumor. Dado que los glioblastomas surgen en el SNC, la accesibilidad resulta un problema y la barrera hematoencefálica dificulta la liberación de material derivado del tumor a la sangre, que ha sido tradicionalmente el fluido biológico más estudiado. Se necesitan por tanto métodos analíticos ultrasensibles para mejorar la aplicabilidad y utilidad de la biopsia líquida para detectar glioblastoma inicial y recidivante. Recientemente ha surgido una matriz monomolecular (Simoa) que permite la detección de moléculas en concentraciones muy bajas en sangre, allanando el camino para la detección de biomarcadores que se encuentran en semejantes concentraciones. El punto clave para estos biomarcadores será su capacidad para discriminar entre diferentes tipos de cáncer de cerebro puesto que muchos de estos biomarcadores no son específicos del glioblastoma. (70,71)

Continuamente se están descubriendo y publicando una gran cantidad de potenciales biomarcadores para utilizar en el diagnóstico clínico, pero solo un pequeño porcentaje

llega a utilizarse en la práctica. Esto se debe a los obstáculos presentados en las diferentes fases del descubrimiento de estos biomarcadores hasta su implementación clínica, incluyendo las limitaciones derivadas de su detección y análisis. Se plantean así diferentes desafíos, como la falta de protocolos estandarizados para el procesamiento de los fluidos biológicos, la mala consistencia entre los estudios de kits informados empleados para el aislamiento de analitos, la influencia de los factores previos al muestreo en la calidad de los analitos aislados, los datos inconsistentes sobre las tasas de desintegración reportados con el uso de diferentes métodos de almacenamiento, los ciclos de congelación-descongelación y el procedimiento de descongelación pudiendo influir en la concentración e integridad del ácido nucleico a estudio, entre otros . (72)

Además de los pasos que se ejecutan durante el análisis de las muestras a estudio, es importante considerar de forma precisa los pasos preanalíticos para poder obtener las muestras de forma adecuada para el análisis de cfDNA. Al provenir la mayor parte del cfDNA de células no tumorales, un procesamiento inadecuado donde se produzca la liberación de cfDNA por parte de estas células conseguirá reducir aún más la pequeña fracción del ctDNA, por tanto, se deben evitar situaciones de lisis celular que aumenten el cfDNA no tumoral. (73)

Desarrollar los ensayos de la biopsia líquida requiere de mucho tiempo y una planificación sustancial en entornos clínicos y de laboratorio. Es clave en este proceso identificar y estandarizar los diversos análisis previos que incluyen la selección del tipo de muestra el manejo y la recolección de muestras, el procesamiento y el almacenamiento. Obtener protocolos estandarizados óptimos es fundamental para obtener resultados fiables y reproducibles. (74)

El flujo de trabajo del análisis de la biopsia líquida es una combinación compleja de varios pasos que aún no han conseguido una estandarización completa y pueden variar según el biomarcador que se quiera estudiar. Además, la falta actual de procedimientos operativos estándar ha dificultado el estudio y la comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de aislamiento, extracción y cuantificación. Hasta ahora, solo unos pocos ensayos han obtenido la aprobación por parte de la FDA. La fase preanalítica puede variar considerablemente, comienza con la colección del fluido corporal a analizar, generalmente la sangre, que puede requerir la estabilización de la muestra e incluye el almacenamiento y transporte posteriores. Toda esta fase es común a todos los componentes de la biopsia líquida. Sin embargo, las fases posteriores implican flujos de trabajo de distinta complejidad, en función del fluido en el que se encuentre el biomarcador. En el caso de la sangre, a continuación, se realiza la centrifugación de la muestra para separar las células sanguíneas del plasma y posteriormente se procede a la extracción del ácido nucleico en caso de que el objetivo del estudio sea el análisis de cfDNA o cfRNA. Alternativamente, será necesaria una fase

de enriquecimiento si el objetivo del análisis son las CTCs o el interés está centrado en las vesículas como los exosomas. (75)

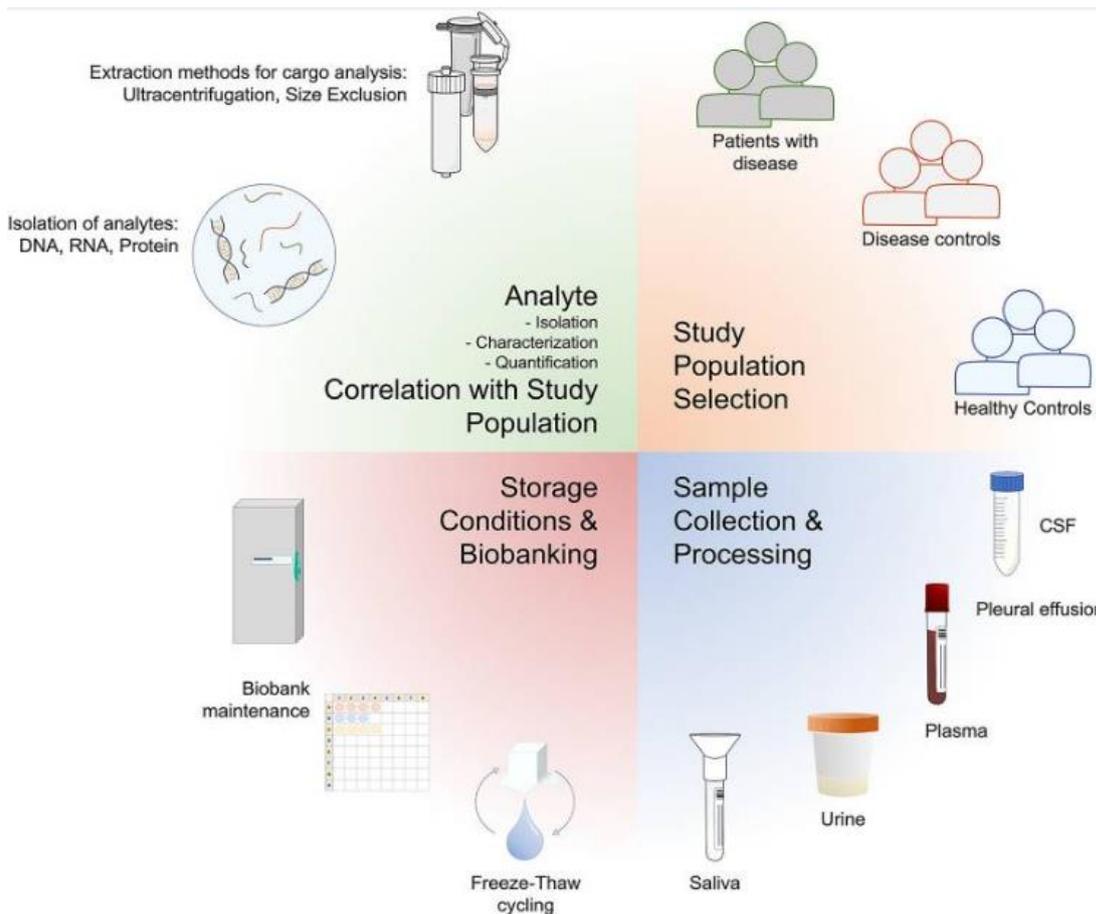


Figura 7. Diferentes variables a considerar en la fase preanalítica de la biopsia líquida. Resumen de diferentes variables que afectan al desarrollo y validación de la biopsia líquida. Se incluyen la recolección y procesamiento de muestras, métodos de aislamiento de analitos, almacenamiento y selección de la población de estudio.

Las técnicas actuales de preparación de muestras y los métodos de detección molecular aún enfrentan diferentes desafíos, como el bajo rendimiento de ácidos nucleicos y la falta de sensibilidad analítica, para detectar de forma eficaz mutaciones de poca abundancia que se encuentran en un contexto de alto contenido de DNA wild-type. Existen varias estrategias para mejorar la detección selectiva de alelos mutantes, por ejemplo, empleando ensayos basados en PCR o ensayos basados en enzimas de restricción como NaME-PrO. Las técnicas basadas en nucleasas parecen ser más robustas y tienen capacidades de multiplexación mucho mejores, siendo menos exigentes técnicamente y no requiriendo una optimización tan extensa como los métodos basados en PCR. El ensayo de enriquecimiento de alelos menores ayudado por nucleasas con sondas superpuestas (NaME-PrO) es práctico y rentable. Permite detectar múltiples mutaciones de baja abundancia que podrían ser relevantes en la clínica. El trabajo de Keraite *et al*, demostró que el enriquecimiento en la fase preanalítica mejora

la detección del alelo mutante PIK3CA mediante qPCR en muestras de sangre procedentes de pacientes con cáncer de mama. (76) Aunque la PCR digital es un enfoque sensible emergente para la detección de alelos mutantes raros mediante cuantificación absoluta, en muchos laboratorios dichos instrumentos no están disponibles. Además de estas dificultades, el precio de los reactivos y consumibles de la técnica de qPCR es menor que el de la dPCR u otras técnicas complejas derivadas de la qPCR. Por tanto, este método de enriquecimiento previo del ctDNA mediante el uso de nucleasas proporciona una solución simple y de bajo coste con un tiempo de respuesta rápido, que permite obtener una sensibilidad comparable a otros enfoques de la qPCR. (77)

Los avances recientes en tecnologías microfluídicas han permitido manejar biomarcadores líquidos derivados de biopsias con alta sensibilidad y rendimiento. La integración de estas tecnologías de microfluidos en un "lab-on-a-chip" (laboratorio en un chip) ofrece una potente solución para procesar y analizar las muestras en una única plataforma, disminuyendo así la complejidad, la pérdida de bioanalitos y la contaminación cruzada asociadas con múltiples pasos de manipulación y de transferencia durante los flujos de trabajo. (78,79)

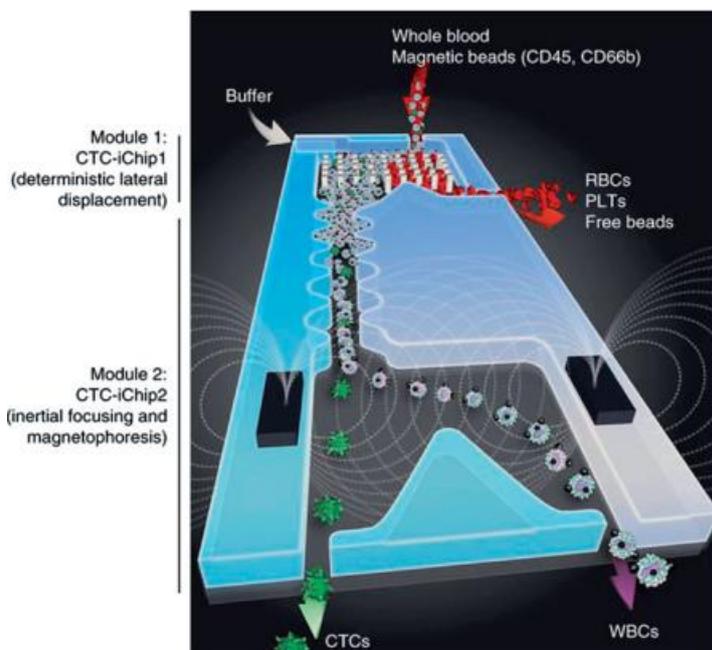


Figura 8. CTC-IChip. Obtención de CTCs mediante previa separación de eritrocitos, plaquetas y posteriormente leucocitos. (78)

En conclusión, a pesar de las múltiples aplicaciones y el enorme potencial que ofrece la biopsia líquida como alternativa a las técnicas tradicionales de diagnóstico y seguimiento del cáncer, la implementación de estas técnicas en la práctica clínica aún precisa de una mejor comprensión de sus limitaciones y su potencial. El desarrollo de estas nuevas tecnologías se vería beneficiado por su aplicación al estudio de grandes cohortes de pacientes con diferentes tipos de cánceres, en distintos entornos

hospitalarios. Sin embargo, no cabe duda de que el desarrollo de la biopsia líquida ha supuesto una revolución en el campo de la Oncología y su uso se verá consolidado con el tiempo ofreciendo un enfoque dirigido a una medicina más personalizada para el paciente. (80)

Conclusión:

La literatura actual respalda la validez de la biopsia líquida como herramienta de diagnóstico mínimamente invasiva para el diagnóstico temprano y el seguimiento de la respuesta terapéutica, la detección del cáncer en poblaciones de alto riesgo y la evaluación de la heterogeneidad tumoral, entre otras muchas aplicaciones. A diferencia de la biopsia tisular, la biopsia líquida proporciona información molecular del tumor permitiendo la detección temprana de la carga tumoral mucho antes que las pruebas convencionales y su seguimiento en tiempo real permitiendo una mejor monitorización de la enfermedad y previniendo las posibles recaídas. A pesar de los innumerables beneficios, la aplicación clínica de la biopsia líquida se ve obstaculizada debido a algunas de sus limitaciones, como la falta de diversos procedimientos de estandarización y aislamiento, los elevados costos económicos, el difícil acceso en algunos tipos de tumores entre otras. La tecnología actual sólo proporciona conocimiento de la actividad tumoral y la expresión genética a un nivel superficial. Es necesario mejorar la tecnología que permita la detección del cáncer multiorgánico y el análisis tumoral en profundidad. Por lo tanto, abordar los desafíos asociados con el uso de la biopsia líquida a través de avances en investigación y tecnología puede permitir su integración óptima en entornos clínicos, lo que conducirá a un cambio profundo en la investigación del cáncer.

Bibliografía

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. USCS Data Visualizations [Internet]. [citado 13 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://gis.cdc.gov/grasp/USCS/DataViz.html>
3. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget.* 8 de diciembre de 2017;9(2):2912-22.
4. Lone SN, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer.* 18 de marzo de 2022;21:79.
5. Arechederra M, Ávila MA, Berasain C. La biopsia líquida en el manejo del cáncer: una nueva herramienta revolucionaria de la medicina de precisión, aún con limitaciones. *Adv Lab*

- Med Av En Med Lab [Internet]. 1 de septiembre de 2020 [citado 28 de enero de 2024];1(3). Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/almed-2020-0038/html>
6. Raza A, Khan AQ, Inchakalody VP, Mestiri S, Yoosuf ZSKM, Bedhiafi T, et al. Dynamic liquid biopsy components as predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 15 de marzo de 2022;41:99.
 7. Kemper M, Krekeler C, Menck K, Lenz G, Evers G, Schulze AB, et al. Liquid Biopsies in Lung Cancer. *Cancers*. 23 de febrero de 2023;15(5):1430.
 8. Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Med*. 6 de abril de 2017;15:75.
 9. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics*. 1 de agosto de 2019;13:34.
 10. Siravegna G, Mussolin B, Venesio T, Marsoni S, Seoane J, Dive C, et al. How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Ann Oncol*. 1 de octubre de 2019;30(10):1580-90.
 11. Biglari N, Soltani-Zangbar MS, Mohammadian J, Mehdizadeh A, Abbasi K. ctDNA as a novel and promising approach for cancer diagnosis: a focus on hepatocellular carcinoma. *EXCLI J*. 3 de agosto de 2023;22:752-80.
 12. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol Rev Brasleira Biol*. 2021;81(4):1133-43.
 13. Connal S, Cameron JM, Sala A, Brennan PM, Palmer DS, Palmer JD, et al. Liquid biopsies: the future of cancer early detection. *J Transl Med*. 11 de febrero de 2023;21:118.
 14. ResearchGate [Internet]. [citado 14 de abril de 2024]. Hypothetical ctDNA biomarker levels during tumor development and... Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/Hypothetical-ctDNA-biomarker-levels-during-tumor-development-and-therapy-After-tumor_fig2_362412051
 15. Udomruk S, Orrapin S, Pruksakorn D, Chaiyawat P. Size distribution of cell-free DNA in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1 de octubre de 2021;166:103455.
 16. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet*. 18 de julio de 2016;12(7):e1006162.
 17. Kopystecka A, Patryn R, Leśniewska M, Budzyńska J, Kozioł I. The Use of ctDNA in the Diagnosis and Monitoring of Hepatocellular Carcinoma—Literature Review. *Int J Mol Sci*. 26 de mayo de 2023;24(11):9342.
 18. Di Capua D, Bracken-Clarke D, Ronan K, Baird AM, Finn S. The Liquid Biopsy for Lung Cancer: State of the Art, Limitations and Future Developments. *Cancers*. enero de 2021;13(16):3923.

19. Hindson B, Ness K, Masquelier D, Belgrader P, Heredia N, Makarewicz A, et al. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal Chem*. 15 de noviembre de 2011;83:8604-10.
20. Kastrisiou M, Zarkavelis G, Pentheroudakis G, Magklara A. Clinical Application of Next-Generation Sequencing as A Liquid Biopsy Technique in Advanced Colorectal Cancer: A Trick or A Treat? *Cancers*. octubre de 2019;11(10):1573.
21. Lin C, Liu X, Zheng B, Ke R, Tzeng CM. Liquid Biopsy, ctDNA Diagnosis through NGS. *Life*. septiembre de 2021;11(9):890.
22. Gezer U, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. The Clinical Utility of Droplet Digital PCR for Profiling Circulating Tumor DNA in Breast Cancer Patients. *Diagnostics*. diciembre de 2022;12(12):3042.
23. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther*. 22 de noviembre de 2021;6:404.
24. Ring A, Nguyen-Sträuli BD, Wicki A, Aceto N. Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2023;23(2):95-111.
25. Sharma YK, Gawande M, Reche A, Bardia MR. Circulating Tumor Cells in Oral Cancer. *Cureus*. 16(1):e51684.
26. Markou A, Tzanikou E, Lianidou E. The potential of liquid biopsy in the management of cancer patients. *Semin Cancer Biol*. 1 de septiembre de 2022;84:69-79.
27. Sawabata N. Circulating Tumor Cells: From the Laboratory to the Cancer Clinic. *Cancers*. 20 de octubre de 2020;12(10):3065.
28. Raimondi C, Nicolazzo C, Gradilone A, Giannini G, De Falco E, Chimenti I, et al. Circulating tumor cells. *Cancer Biol Ther*. 1 de mayo de 2014;15(5):496-503.
29. Resel Folkersma L, Olivier Gómez C, San José Manso L, Veganzones de Castro S, Galante Romo I, Vidaurreta Lázaro M, et al. Cuantificación inmunomagnética de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de próstata: correlación clínica y patológica. *Arch Esp Urol Ed Impresa*. febrero de 2010;63(1):23-31.
30. Werner SL, Graf RP, Landers M, Valenta DT, Schroeder M, Greene SB, et al. Analytical Validation and Capabilities of the Epic CTC Platform: Enrichment-Free Circulating Tumour Cell Detection and Characterization. *J Circ Biomark*. 5 de mayo de 2015;4:3.
31. Scher HI, Armstrong AJ, Schonhoft JD, Gill A, Zhao JL, Barnett E, et al. Development and Validation of Circulating Tumor Cell Enumeration (Epic Sciences) as a Prognostic Biomarker in Men with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. junio de 2021;150:83-94.
32. Novoa-Herrán S. Retos y oportunidades en el estudio de vesículas extracelulares: contexto institucional a nivel mundial y situación actual en Colombia. *Biomédica*. 22 de septiembre de 2021;41(3):5749-6589.

33. Irmer B, Chandrabalan S, Maas L, Bleckmann A, Menck K. Extracellular Vesicles in Liquid Biopsies as Biomarkers for Solid Tumors. *Cancers*. enero de 2023;15(4):1307.
34. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 15 de julio de 2019;8(7):727.
35. Konoshenko MYu, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Res Int*. 30 de enero de 2018;2018:8545347.
36. Serrano-Pertierra E, Oliveira-Rodríguez M, Matos M, Gutiérrez G, Moyano A, Salvador M, et al. Extracellular Vesicles: Current Analytical Techniques for Detection and Quantification. *Biomolecules*. 28 de mayo de 2020;10(6):824.
37. Aili Y, Maimaitiming N, Mahemuti Y, Qin H, Wang Y, Wang Z. Liquid biopsy in central nervous system tumors: the potential roles of circulating miRNA and exosomes. *Am J Cancer Res*. 1 de diciembre de 2020;10(12):4134-50.
38. de Freitas AJA, Causin RL, Varuzza MB, Calfa S, Hidalgo Filho CMT, Komoto TT, et al. Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 1 de septiembre de 2022;23(17):9952.
39. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 12 de septiembre de 2022;15(1):131.
40. Pan D, Jia D. Application of Single-Cell Multi-Omics in Dissecting Cancer Cell Plasticity and Tumor Heterogeneity. *Front Mol Biosci*. 15 de octubre de 2021;8:757024.
41. Khagi Y, Goodman AM, Daniels GA, Patel SP, Sacco AG, Randall JM, et al. Hyper-Mutated Circulating Tumor DNA: Correlation with Response to Checkpoint Inhibitor-Based Immunotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 de octubre de 2017;23(19):5729-36.
42. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(11):651-68.
43. Bortolomeazzi M, Keddar MR, Montorsi L, Acha-Sagredo A, Benedetti L, Temelkovski D, et al. Immunogenomics of Colorectal Cancer Response to Checkpoint Blockade: Analysis of the KEYNOTE 177 Trial and Validation Cohorts. *Gastroenterology*. octubre de 2021;161(4):1179.
44. Ricciuti B, Jones G, Severgnini M, Alessi JV, Recondo G, Lawrence M, et al. Early plasma circulating tumor DNA (ctDNA) changes predict response to first-line pembrolizumab-based therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer*. 25 de marzo de 2021;9(3):e001504.
45. Adashek JJ, Kato S, Ferrara R, Lo Russo G, Kurzrock R. Hyperprogression and Immune Checkpoint Inhibitors: Hype or Progress? *The Oncologist*. febrero de 2020;25(2):94-8.
46. Kolenčik D, Shishido SN, Pitule P, Mason J, Hicks J, Kuhn P. Liquid Biopsy in Colorectal Carcinoma: Clinical Applications and Challenges. *Cancers*. 27 de mayo de 2020;12(6):1376.

47. Di Cosimo S, Appierto V, Pizzamiglio S, Silvestri M, Baselga J, Piccart M, et al. Early Modulation of Circulating MicroRNAs Levels in HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab-Based Neoadjuvant Therapy. *Int J Mol Sci.* 18 de febrero de 2020;21(4):1386.
48. Romano C, Martorana F, Pennisi MS, Stella S, Massimino M, Tirrò E, et al. Opportunities and Challenges of Liquid Biopsy in Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci.* 19 de julio de 2021;22(14):7707.
49. Allin: Circulating tumour DNA is a potential biomarker... - Google Académico [Internet]. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Eur.+J.+Cancer&title=Circulating+tumour+DNA+is+a+potential+biomarker+for+disease+progression+and+response+to+targeted+therapy+in+advanced+thyroid+cancer&author=D.+Allin&author=R.+Shaikh&author=P.+Carter&author=K.+Thway&author=M.+Sharabiani&volume=103&publication_year=2018&pages=165-175&pmid=30253333&doi=10.1016/j.ejca.2018.08.013&
50. Zhu G, Pei L, Xia H, Tang Q, Bi F. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer.* 6 de noviembre de 2021;20:143.
51. Seremet T, Jansen Y, Planken S, Njimi H, Delaunoy M, El Housni H, et al. Undetectable circulating tumor DNA (ctDNA) levels correlate with favorable outcome in metastatic melanoma patients treated with anti-PD1 therapy. *J Transl Med.* 5 de septiembre de 2019;17:303.
52. Fattore L, Ruggiero CF, Liguoro D, Castaldo V, Catizone A, Ciliberto G, et al. The Promise of Liquid Biopsy to Predict Response to Immunotherapy in Metastatic Melanoma. *Front Oncol.* 18 de marzo de 2021;11:645069.
53. Mika T, Thomson J, Nilius-Eliliwi V, Vangala D, Baraniskin A, Wulf G, et al. Quantification of cell-free DNA for the analysis of CD19-CAR-T cells during lymphoma treatment. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 10 de diciembre de 2021;23:539-50.
54. Feins S, Kong W, Williams EF, Milone MC, Fraietta JA. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am J Hematol.* 2019;94(S1):S3-9.
55. Goodman AM, Holden KA, Jeong AR, Kim L, Fitzgerald KD, Almasri E, et al. Assessing CAR T-Cell Therapy Response Using Genome-Wide Sequencing of Cell-Free DNA in Patients With B-Cell Lymphomas. *Transplant Cell Ther.* 1 de enero de 2022;28(1):30.e1-30.e7.
56. Moding EJ, Nabet BY, Alizadeh AA, Diehn M. Detecting liquid remnants of solid tumors: circulating tumor DNA minimal residual disease. *Cancer Discov.* 1 de diciembre de 2021;11(12):2968-86.
57. Abdelrahim M, Esmail A, Abudayyeh A, Murakami N, Victor D, Kodali S, et al. Transplant Oncology: An Emerging Discipline of Cancer Treatment. *Cancers.* 9 de noviembre de 2023;15(22):5337.

58. Reddy T, Esmail A, Chang JC, Ghobrial RM, Abdelrahim M. Utility of Cell-Free DNA Detection in Transplant Oncology. *Cancers*. 31 de enero de 2022;14(3):743.
59. Long G, Fang T, Su W, Mi X, Zhou L. The prognostic value of postoperative circulating cell-free DNA in operable hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol*. diciembre de 2020;55(12):1441-6.
60. Zhang Z, Wu H, Chong W, Shang L, Jing C, Li L. Liquid biopsy in gastric cancer: predictive and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis*. 27 de octubre de 2022;13(10):903.
61. Paschold L, Stein A, Thiele B, Tintelnot J, Henkes SS, Coith C, et al. First-line treatment of unresectable or metastatic HER2 positive esophagogastric adenocarcinoma: liquid biomarker analysis of the phase 2 INTEGA trial. *J Immunother Cancer*. 16 de junio de 2023;11(6):e006678.
62. Chivu-Economescu M, Necula L, Matei L, Dragu D, Bleotu C, Diaconu CC. Clinical Applications of Liquid Biopsy in Gastric Cancer. *Front Med*. 28 de septiembre de 2021;8:749250.
63. Zhang M, Qi C, Wang Z, Chen H, Zhao X, Zhang X, et al. Molecular characterization of ctDNA from Chinese patients with advanced gastric adenocarcinoma reveals actionable alterations for targeted and immune therapy. *J Mol Med Berl Ger*. septiembre de 2021;99(9):1311-21.
64. Li W, Liu JB, Hou LK, Yu F, Zhang J, Wu W, et al. Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer*. 20 de enero de 2022;21:25.
65. Jiang T, Wang P, Zhang J, Zhao Y, Zhou J, Fan Y, et al. Toripalimab plus chemotherapy as second-line treatment in previously EGFR-TKI treated patients with EGFR-mutant-advanced NSCLC: a multicenter phase-II trial. *Signal Transduct Target Ther*. 15 de octubre de 2021;6:355.
66. Fujita K, Kume H, Matsuzaki K, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, et al. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. *Sci Rep*. 17 de febrero de 2017;7(1):42961.
67. Vanwelkenhuyzen J, Van Bos E, Van Bruwaene S, Lesage K, Maes A, Üstmert S, et al. AR and PI3K Genomic Profiling of Cell-free DNA Can Identify Poor Responders to Lutetium-177-PSMA Among Patients with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol Open Sci*. 30 de mayo de 2023;53:63-6.
68. Zhou H, Zhu L, Song J, Wang G, Li P, Li W, et al. Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 25 de marzo de 2022;21:86.
69. Song P, Wu LR, Yan YH, Zhang JX, Chu T, Kwong LN, et al. Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics. *Nat Biomed Eng*. marzo de 2022;6(3):232-45.

70. Ronvaux L, Riva M, Coosemans A, Herzog M, Rommelaere G, Donis N, et al. Liquid Biopsy in Glioblastoma. *Cancers*. 13 de julio de 2022;14(14):3394.
71. Saenz-Antoñanzas A, Auzmendi-Iriarte J, Carrasco-Garcia E, Moreno-Cugnon L, Ruiz I, Villanua J, et al. Liquid Biopsy in Glioblastoma: Opportunities, Applications and Challenges. *Cancers*. 5 de julio de 2019;11(7):950.
72. Batool SM, Yekula A, Khanna P, Hsia T, Gamblin AS, Ekanayake E, et al. The Liquid Biopsy Consortium: Challenges and opportunities for early cancer detection and monitoring. *Cell Rep Med*. 15 de septiembre de 2023;4(10):101198.
73. Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int J Cancer*. 2021;148(3):528-45.
74. Batool SM, Hsia T, Beecroft A, Lewis B, Ekanayake E, Rosenfeld Y, et al. Extrinsic and intrinsic preanalytical variables affecting liquid biopsy in cancer. *Cell Rep Med*. 18 de septiembre de 2023;4(10):101196.
75. Salvianti F, Gelmini S, Costanza F, Mancini I, Sonnati G, Simi L, et al. The pre-analytical phase of the liquid biopsy. *New Biotechnol*. 25 de marzo de 2020;55:19-29.
76. Keraite I, Alvarez-Garcia V, Garcia-Murillas I, Beaney M, Turner NC, Bartos C, et al. PIK3CA mutation enrichment and quantitation from blood and tissue. *Sci Rep*. 13 de octubre de 2020;10:17082.
77. Alvarez-Garcia V, Bartos C, Keraite I, Trivedi U, Brennan PM, Kersaudy-Kerhoas M, et al. A simple and robust real-time qPCR method for the detection of PIK3CA mutations. *Sci Rep*. 9 de marzo de 2018;8:4290.
78. Tadimety A, Closson A, Li C, Yi S, Shen T, Zhang JXJ. Advances in liquid biopsy on-chip for cancer management: Technologies, biomarkers, and clinical analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. mayo de 2018;55(3):140-62.
79. Surappa S, Multani P, Parlatan U, Sinawang PD, Kaifi J, Akin D, et al. Integrated “lab-on-a-chip” microfluidic systems for isolation, enrichment, and analysis of cancer biomarkers. *Lab Chip*. 28 de junio de 2023;23(13):2942-58.
80. Castro-Giner F, Gkountela S, Donato C, Alborelli I, Quagliata L, Ng CKY, et al. Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations. *Diagnostics*. junio de 2018;8(2):31.