



**UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA**

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA

Biopsia Líquida: Una herramienta para el diagnóstico oportuno y no invasivo de tumores hematológicos.

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología para optar al grado y título de Especialista en Hematología

Josué Daniel Solano Cerdas

A86158

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

Dedicatoria

Al que siempre ha estado a mi lado desde el primer latido, el que no me abandona y me brinda las fuerzas para seguir adelante, por imposible que parezca ser: mi Dios.

A la única persona que ha decidido entregarme su amor incondicional, luego de conocerme. La que ilusiona mi vida cada día y me hace vivir mis verdaderos anhelos: mi Meli.

A Papito y Mamita, a quienes les deberé mi vida entera, por siempre.

A mis hermanas y familia, porque sin ustedes jamás habría llegado a ser quien soy.



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-66-2021

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el jueves 29 de julio de 2021 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante Josué Daniel Solano Cerdas cerné #A86158, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de Especialista en Hematología. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Walter Rodríguez Romero, Esp., quien preside y tutor, Mónica Araya Rojas, Esp. y Juliana Esquivel Echandi, Esp. lectoras

ARTICULO 1

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: "Biopsia líquida: Una herramienta para el diagnóstico oportuno y no invasivo de tumores hematológicos".

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado X [X] Reprobado []

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 19.55 horas.

Table with 3 columns: Nombre, Firma, No. Cédula. Rows include Walter Rodríguez Romero, Esp., Mónica Araya Rojas, Esp., Juliana Esquivel Echandi, Esp., and Josué Daniel Solano Cerdas Estudiante.

Observaciones: Se indica mención de honor en forma unánime

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita
Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Josué Daniel Solano Cerdas, con cédula de identidad 304470609, en mi condición de autor del TFG titulado Biopsia líquida: una herramienta para el diagnóstico oportuno y no invasivo de tumores hematológicos.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mejor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Tabla de contenidos

Resumen.....	V
Lista de tablas.....	VI
Lista de figuras.....	VII
Antecedentes.....	1
Justificación.....	2
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos.....	4
Metodología.....	4
Desarrollo.....	5
Capítulo I. Biopsia líquida: sus características, componentes y ámbito clínico	5
Células Tumorales Circulantes (CTCs).....	6
ADN libre circulante (cfADN).....	8
Exosomas Derivados de Tumores (tExs).....	10
Micro ARNs tumorales circulantes (miARNs).....	11
ARN mensajeros (mARNs) circulantes.....	12
Plaquetas educadas por tumores (TEPs).....	12
Metodologías de análisis de biomarcadores	13
Capítulo II. Aplicaciones de la biopsia líquida en neoplasias de origen no hematológico	19
Cáncer de mama.....	21
Cáncer de pulmón.....	24
Carcinoma colorrectal.....	26
Cáncer de próstata.....	28
Capítulo III. Utilidad de la biopsia líquida en el estudio de malignidades hematológicas	31
Linfomas.....	32
Mieloma múltiple (MM).....	35
Discusión.....	38
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	47

Resumen

Según el “Informe mundial sobre cáncer” en el 2020 se reportó una incidencia mundial de, aproximadamente, 19.2 millones de casos nuevos, correspondiendo con 9.9 millones de muertes asociadas con esta causa. (WHO, 2021)

El término cáncer hace referencia a un conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de células anormales que se dividen sin control y son capaces de invadir diversos tejidos (American Cancer Society, 2020). Es una enfermedad heterogénea que no se limita a variaciones entre individuos, sino, presenta diferencias dentro de una misma persona, dentro de un mismo tumor.

La complejidad clínica, celular y molecular lleva a que las técnicas diagnósticas requeridas sean altamente sensibles y específicas. Convencionalmente, para el diagnóstico de tumores sólidos se instaura un protocolo diagnóstico de referencia basado en la realización de biopsia tisular que obtiene una porción del tumor sólido y lo dispone para su posterior análisis.

La biopsia líquida es una nueva alternativa diagnóstica que nace entorno a la detección de células tumorales circulantes, sus ácidos nucleicos, proteínas o exomas asociados, a partir de una muestra de sangre periférica, orina u otros fluidos corporales. Esta permite identificar tumores primarios, así como procesos metastásicos, con la gran ventaja de que puede reflejar el comportamiento dinámico de la malignidad, ante la facilidad del muestreo en el tiempo.

El interés en el ámbito onco-hematológico es llevar ese tipo de metodologías innovadoras hacia pacientes que sufren malignidades de origen hematológico, teniendo en cuenta las diferencias de presentación, comportamiento y evolución de estas neoplasias con origen celular tan distinto.

Lista de tablas

Tabla 1. Aplicaciones propuestas para el abordaje de linfomas mediante biopsia líquida..	35
Tabla 2. Comparación general entre biopsia tisular y biopsia líquida.	39
Tabla 3. Ensayos basados en biopsia líquida para tumores endoteliales, aprobados por la FDA para uso clínico..	42

Lista de figuras

Figura 1. Metodologías de enriquecimiento, detección y caracterización de CTCs y ctADN.....	18
--	----

Antecedentes

De acuerdo con la Sociedad Americana de Cáncer, “cáncer” es un término que hace referencia a un conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de células anormales que se dividen sin control y son capaces de invadir diversos tejidos (American Cancer Society, 2020). Las células se convierten en cancerosas en el momento en que dejan de responder de modo normal a señales reguladoras y adquieren la capacidad de dividirse de manera más rápida que las células normales; la capacidad de crecimiento y división es tal que empiezan a dañar y sustraer nutrientes a las células adyacentes. Es un desorden molecular con disrupción de la información genética a nivel celular, que lleva a distorsiones fundamentales a nivel proteico y en circuitos de señalización, lo cual es el origen de esa pérdida de regulación y crecimiento descontrolado. (Johann et al., 2018)

El cáncer es una enfermedad heterogénea que no se limita a variaciones entre individuos, sino, presenta diferencias dentro de una misma persona, dentro de un mismo tumor (Allison & Sledge, 2014). Una gran heterogeneidad puede caracterizar a un solo tumor, dentro del que pueden interactuar o estar espacialmente separadas poblaciones de sub-clones genéticamente distintos (Burrell et al., 2013).

La heterogeneidad tumoral se refiere a la coexistencia de diferencias biológicas, morfológicas, así como distintos perfiles fenotípicos y genotípicos, entre tumores (heterogeneidad inter tumoral) o dentro de un mismo tumor (heterogeneidad intra tumoral). Se puede manifestar en diferentes grados, a lo largo de distintas regiones del tumor, o entre la masa maligna primaria y los focos de metástasis, esto último define una heterogeneidad espacial en un momento dado. También, se puede suscitar una heterogeneidad temporal delimitada por diferencias documentadas en el tiempo de evolución de la neoplasia. Una fuente externa de variabilidad está dada por el microambiente tumoral, el cual se define como un ecosistema complejo de células cancerosas que interactúan íntimamente con células normales programadas por el proceso neoplásico, mediante diversas vías de señalización que activan una comunicación continua que lleva a perpetuar el comportamiento proliferativo del cáncer. (Russano et al., 2020)

La complejidad clínica, celular y molecular lleva a que las técnicas diagnósticas requeridas sean altamente sensibles y específicas. Convencionalmente, para el diagnóstico de tumores sólidos se instaura un protocolo diagnóstico de referencia (*gold standard*) basado en la realización de biopsia tisular que obtiene una porción del tumor sólido y lo dispone

para su posterior análisis mediante metodologías de histoquímica o inmunohistoquímica; este procedimiento se describe como invasivo y, en ocasiones, traumático para el paciente. Además, está sujeto a la heterogeneidad tumoral que complicaría una obtención representativa de todo el tejido maligno. Todo esto es fiel prueba de que la biopsia convencional se convierte en un procedimiento complicado para realización seriada, que en muchas circunstancias podría ser una importante herramienta de soporte clínico. (Crowley, Di Nicolantonio, Loupakis, & Bardelli, 2013)

La biopsia líquida es una nueva alternativa diagnóstica que nace entorno a la detección de células tumorales circulantes, sus ácidos nucleicos, proteínas o exomas asociados, a partir de una muestra de sangre periférica, orina u otros fluidos corporales. Esta permite identificar tumores primarios, así como procesos metastásicos, con la gran ventaja de que puede reflejar el comportamiento dinámico de la malignidad, ante la facilidad del muestreo en el tiempo. Gracias a la posibilidad de evaluar en el tiempo, la biopsia líquida se postula como una alternativa complementaria para seguimiento y evolución del tratamiento, así como de diagnóstico anticipado de recaídas. (Scarlotta, Simsek, & Kim, 2019)

Justificación

Según el “Informe mundial sobre cáncer 2020”, emitido por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, que es el ente especializado de la Organización Mundial de la Salud, en el 2020 se reportó una incidencia mundial de, aproximadamente, 19.2 millones de casos nuevos, correspondiendo con 9.9 millones de muertes asociadas con esta causa. (WHO, 2021)

En la época de 1970, el cáncer ocupaba la cuarta plaza dentro de las principales causas de muerte en Costa Rica, sin embargo, ha escalado niveles hasta llegar a la segunda posición, por detrás de las enfermedades cardiovasculares. Para 2020, en Costa Rica se documentó un total de 13 139 casos nuevos de cáncer en una población estimada de 5 094 114 habitantes; se asoció 6 028 defunciones como consecuencia de esta enfermedad. Del total de casos nuevos en 2020, 541 fueron Linfomas No-Hodgkin, 349 leucemias, 145 mielomas múltiples y 114 Linfomas Hodgkin (WHO,2021). Todos estos datos fueron obtenidos de acuerdo con las estadísticas reportadas por el Registro Nacional de Tumores de Costa Rica a la Organización Mundial de la Salud.

Los alarmantes números que surgen a partir de los pronósticos de incidencia de cáncer en el país llevan a considerar la implementación de estrategias que faciliten la efectividad en

prevención y tratamiento, con lo que se procure mayor bienestar a los pacientes y se reduzcan los gastos económicos.

Durante muchos años, una de las mayores expectativas en el campo de la hematología ha sido alcanzar una alternativa diagnóstica a las biopsias de tejidos, y demás procedimientos invasivos asociados con las clásicas metodologías histo-patológicas, que dé paso a una identificación oportuna de la presencia de células cancerosas, ADN o algún otro componente celular que se externe hacia circulación sanguínea y permita establecer un reconocimiento temprano de desarrollo tumoral. La obtención de esta alternativa les brinda a los pacientes la posibilidad de alcanzar un diagnóstico temprano más sencillo y menos doloroso, así como la consecución de terapias más dirigidas, con mejor capacidad de monitoreo y predicción de recaídas, comparado con las opciones convencionales que implican procedimientos más invasivos y de mayor costo económico.

El acople de la biopsia líquida junto con las plataformas diagnósticas de punta con las que los laboratorios clínicos disponen hoy en día, tal como los métodos basados en citometría de flujo o secuenciación de nueva generación, traza un panorama muy alentador hacia el alcance de esa nueva era en el diagnóstico anticipado de pacientes con tumores hematológicos, brindando una ventaja que va más allá de la simple identificación, con la asignación de valores predictivos y pronósticos que colaboran con la adecuación de una óptima alternativa terapéutica.

Objetivo General

Analizar si la implementación de biopsia líquida dentro del abordaje clínico en la pesquisa de tumores podría representar una ventaja diagnóstica para los pacientes hematológicos.

Objetivos Específicos

- Definir “biopsia líquida” a partir de cada uno de los componentes que la integran, y dentro de un ámbito de diagnóstico hemato-oncológico.
- Comparar las características y aportes clínicos de procedimientos mínimamente invasivos con respecto a la biopsia tisular convencional.
- Especificar las utilidades de esta técnica en tumores sólidos no hematológicos.
- Determinar el tipo de tumores sólidos hematológicos para los que la biopsia líquida podría representar una mejora diagnóstica.
- Interpretar la viabilidad diagnóstica de la metodología para tumores hematológicos sin formación sólida.
- Diferenciar posibles aplicaciones clínicas en la implementación de este procedimiento de muestreo tumoral y los factores que puedan ser contraproducentes entorno a su implementación

Metodología

El presente trabajo consistirá en una revisión bibliográfica en la que se realizará una búsqueda exhaustiva de publicaciones en diferentes bases de datos científicas, tales como: Google Académico, PubMed, SciELO, ScienceDirect; con la finalidad de dilucidar el entorno actual con respecto al tema propuesto. Se implementará información proveniente de artículos de revistas científicas, sitios web, libros y webinars.

La relevancia de la información encontrada determinará el criterio de inclusión, procurando incluir material cuya fecha de publicación sea de 2010 en adelante, considerando excepciones ante casos donde la información encontrada sea de suma importancia y en años posteriores no se encuentre referencia o actualización de esta.

Desarrollo

Capítulo I. Biopsia líquida: sus características, componentes y ámbito clínico

El término “biopsia líquida” se asigna a un tipo de análisis basado en la identificación de material de origen tumoral, a partir de muestras sanguíneas o de otros líquidos biológicos, como: orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido peritoneal, saliva, entre otros. Se fundamenta en un procedimiento con muestreo mínimamente invasivo que alcanza la detección de biomarcadores moleculares específicos, lo cual la convierte en una herramienta complementaria o sustituta de la biopsia convencional, en el abordaje de tumores. (Junqueira-Neto, Batista, Costa, & Melo, 2019)

La detección de componentes celulares neoplásicos circulantes ha captado importancia clínica como biomarcadores para diagnóstico, pronóstico, progresión de la enfermedad, identificación de mecanismos de resistencia terapéutica, caracterización de blancos terapéuticos, monitoreo de recaídas y como herramienta para un mejor entendimiento de los procesos de metástasis. (Crowley et al., 2013)

El plasma se ha implementado a manera de material estándar para el estudio de biomarcadores que llevan al entendimiento del cáncer y el estado evolutivo de la enfermedad en pacientes. Sin embargo, se han realizado investigaciones que demuestran la utilidad de otros fluidos corporales y su correlación con la presencia de biomarcadores específicos a tumores de ciertos sitios anatómicos. Se ha evidenciado que la acumulación de ADN circulante derivado de tumores tiene predilección por ciertos fluidos no sanguíneos, otorgando mayor sensibilidad de muestreo con respecto a la sangre periférica. Por ejemplo, la orina ha demostrado ser una muestra muy representativa para la detección de ADN circulante en el cual se identifican aberraciones genéticas correlacionadas con cáncer de vejiga y de próstata; la saliva ha colaborado con detección de alteraciones relacionadas con cáncer oral; el esputo ha servido en la identificación de cáncer de cuello y pulmón. (Fernandes Marques et al., 2019)

Mediante diversos estudios se ha logrado identificar los componentes celulares que salen a circulación, obteniendo como principales biomarcadores: células tumorales circulantes, ADN libre circulante, micro ARNs circulantes, exosomas derivados de tumores, plaquetas educadas por tumores y ARN libre circulante derivado de tumor (principalmente ARN mensajero). (Junqueira-Neto et al., 2019)

Células Tumorales Circulantes (CTCs)

La existencia de CTCs fue reportada, por primera vez, por Thomas Ashworth, en 1869. No es hasta finales de la década de 1990 que este tipo de células empieza a tomar importancia en las investigaciones clínicas; a pesar de tener una abundancia tan baja de, aproximadamente, 1 CTC por cada 1×10^9 células sanguíneas en pacientes que experimentan procesos de metástasis, variando de tumor a tumor. Estas células malignas presentan diámetro de 10-30 μm , comparado con los 7-12 μm de las células hematológicas sanguíneas. (Siravegna, Marsoni, Siena, & Bardelli, 2017)

Las células tumorales primarias presentan la capacidad de propagarse hacia sitios anatómicos distantes del tumor principal, movilizándose vía circulación sanguínea y vasos linfáticos. Al encontrar un microambiente permisivo, esas células invasoras pueden establecerse y reiniciar un crecimiento neoplásico en órganos distantes a su sitio de origen. Mediante la detección y cuantificación de CTCs a partir de muestras de sangre en pacientes con cáncer se incursiona en un abordaje mínimamente invasivo que permite monitorear la condición del estado de salud. Este método brinda la ventaja de detectar prematuramente la actividad tumoral, permitiendo una identificación de CTCs previo a la aparición de manifestaciones clínicas. De manera adicional, brinda la posibilidad de evaluar la resistencia al tratamiento, así como recaídas tempranas. (Balic, Williams, Lin, Datar, & Cote, 2013)

La principal causa de muerte asociada con cáncer viene dada por procesos de metástasis que llevan a diseminación, y representan el cambio entre una enfermedad localizada hacia una sistémica. La capacidad de un tumor maligno de convertirse en metastásico inicia con la expresión de sus cualidades de movilización e invasión; las células neoplásicas se separan de la masa tumoral primaria, abandonando su microambiente primario, y, a partir de allí, empezar a sortear múltiples ataques por parte del sistema inmunológico del hospedero. Mediante modelos experimentales, se estipula la hipótesis de que millones de células malignas son liberadas continuamente hacia circulación, no obstante, solamente pocas son capaces de sobrevivir en un estado de dormancia quiescente, evadir al sistema inmunológico, resistir a terapias sistémicas, alcanzar algún órgano distante y acentuar la metástasis. Las CTCs deben adaptarse a su nuevo microambiente antes de poder salir de su dormancia, estado en el que detienen la división celular y permanecen hasta que su entorno les brinde las condiciones idóneas para poder reactivar su estado proliferativo. (Joosse, Gorges, & Pantel, 2015)

Las CTCs se movilizan a través de la circulación mediante un proceso activo, un proceso pasivo o mediante ambos. El desplazamiento activo se fundamenta en la capacidad para movilizarse por sus propios medios por una matriz extracelular, atravesar membranas celulares y penetrar paredes endoteliales; este tipo de movimiento implica constantes modificaciones en la morfología celular de las CTCs, así como cambios en su posicionamiento y modificación de tejidos a su alrededor. La migración pasiva se basa en el movimiento provocado por fuerzas externas provenientes del mismo crecimiento tumoral, de acciones mecánicas o por fricción, que terminan impulsando a las células tumorales lejos de su sitio de origen. (Joosse et al., 2015)

Su identificación se basa en propiedades físicas, contemplando: tamaño, complejidad, densidad, antígenos de superficie y propiedades eléctricas. A partir de ello, se han diseñado múltiples métodos para su detección y cuantificación, utilizando metodologías inmunológicas con detección mediante anticuerpos marcados con fluoróforos, con partículas magnéticas o inmovilizados sobre superficies fijas, buscando la captura de las CTCs. La mayoría de los métodos implementados en carcinomas utilizan anticuerpos contra receptores epiteliales como la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) y contra citoqueratinas (CK). (Millner, Linder, & Valdes, 2013)

Ante una presentación de metástasis, las células tumorales pueden experimentar un proceso de transición epitelial-mesenquimal (EMT), en el cual estas pierden su polaridad celular, pierden la capacidad de interacción con otras células y con la matriz extracelular, y ganan propiedades de migración e invasión, estas últimas dos características son propias de células mesenquimales o de células madre. (Masuda et al., 2016)

La EMT se ve significativamente envuelta en procesos de metástasis en ciertos tipos de cáncer. Una buena evidencia se obtiene a partir del carcinoma hepatocelular en el que, en etapas tempranas, las CTCs muestran un fenotipo epitelial característico, el cual varía hacia un fenotipo mesenquimal conforme la neoplasia avanza a etapas avanzadas de metástasis. (Russano et al., 2020)

Entonces, ante una EMT las células tumorales pierden las características epiteliales, dificultando su identificación mediante anticuerpos que detectan receptores epiteliales de superficie. Por lo tanto, mediante metodologías convencionales con detección mediante anticuerpos no se podría identificar gran parte de poblaciones y fenotipos tumorales secundarios, dada la enorme heterogeneidad propia. No obstante, existen otras vías que

permiten subsanar la situación, tal como el abordaje a partir de propiedades metabólicas cuantificables que brindan la posibilidad de diferenciar tejido neoplásico del normal. Un ejemplo se tiene mediante el efecto Warburg que describe el aumento de glicólisis aeróbica y la absorción de glucosa en células tumorales que presentan un metabolismo acelerado. (Joosse et al., 2015)(Masuda et al., 2016)

Una de las principales ventajas que tienen las CTCs, al compararlas con la implementación de otros biomarcadores en el contexto de una biopsia líquida, es que estas presentan la capacidad de poderse cultivar y expandir *in vitro*, con la posibilidad de realizar análisis funcionales de comportamiento celular. (Russano et al., 2020)

ADN libre circulante (cfADN)

En 1948, Mandel y Métais identificaron, por primera vez, la presencia de cfADN en la sangre humana, alcanzando la atención de diversos estudios que llevaron a que en 1994 se detectara la presencia de fragmentos mutados del gen RAS en sangre periférica. Para 1996, se encontraron alteraciones microsatélite en el cfADN de pacientes con cáncer, en altas concentraciones, a nivel de circulación periférica. (Schwarzenbach, Hoon, & Pantel, 2011)

En condiciones normales, así como en condiciones patológicas, es común la ocurrencia de daño celular y tisular, lo que lleva a la liberación de material intracelular gracias a procesos de apoptosis y necrosis; siendo el ADN el material más común. La presencia de cfADN es frecuente en desórdenes como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, infartos, embolismos pulmonares y cáncer; así como en casos de intervenciones quirúrgicas o tratamientos con altas dosis de agentes citotóxicos. Por su parte, muchos estudios han revelado que la presencia de ADN libre circulante en individuos saludables de grupo control es muy inferior comparado con los casos antes mencionados, donde los niveles reportados son mucho mayores. A pesar del reto que representa establecer rangos normales de este tipo de material genético en circulación, un primer estudio que ahondó en el tema estipuló que para sujetos sanos se logra alcanzar concentraciones de ADN en sangre de 0 – 50 ng/mL, mientras que en un grupo de 173 pacientes con cáncer se encontró una concentración media de 180 ng/mL (Leon, Shapiro, Sklaroff, & Yaros, 1977). Dichos datos han encontrado soporte a partir de otros estudios realizados, tal como el de Schwarzenbach que implementó un grupo control de personas sanas y lo comparó contra pacientes de cáncer colorrectal. A partir de ello, se obtuvo un rango de concentración para el grupo de control de 5 – 16 ng/mL, con una media de 7 ng/mL; mientras que el grupo de pacientes

con cáncer presentó concentraciones de 22 – 3922 ng/mL, con una media de 1157 ng/mL (Schwarzenbach, Stoehlmacher, Pantel, & Goekkurt, 2008).

Al descubrir alteraciones genéticas asociadas con tumores presentes en cfADN de pacientes con cáncer se instauró el término de ADN tumoral circulante (ctADN), el cual refleja la incidencia de mutaciones a nivel de oncogenes, genes supresores de tumores, inestabilidad microsatelital y cambios epigenéticos (Siravegna et al., 2017). Esos fragmentos de ADN son liberados constantemente hacia circulación y representan una foto instantánea del tumor, considerando que su vida media en circulación es bastante corta (4 – 30min), con lo que se tiene la seguridad de que el ADN encontrado no corresponde a la situación tumoral de mucho tiempo atrás (Fernandes Marques et al., 2019).

Según estimaciones, en un paciente que presenta un tumor con un peso de 100g, que corresponde a 3×10^{10} células tumorales, aproximadamente, un 3.3% del ADN tumoral de esa masa logra entrar a circulación sanguínea debido a procesos de recambio celular. En promedio, los fragmentos de ADN circulante van de 70 – 200 pb, alcanzando longitudes de 21 kilobases en los de mayor longitud, donde las variaciones dependerán del tamaño y estado replicativo de la neoplasia. La cantidad de cfADN, también, dependerá del aclaramiento, degradación y otros mecanismos fisiológicos en sangre o circulación linfática; considerando que el hígado, el bazo y los riñones se encargan de aclarar ácidos nucleicos con una vida media que va desde los 15min hasta algunas horas. Otra fuente importante de ctADN son las CTCs, así como los depósitos de células malignas en nichos pre-metastásicos ubicados en sitios lejanos al origen canceroso. (Schwarzenbach et al., 2011)

La fracción de ctADN fluctúa de acuerdo con el estadio y el tipo de cáncer. En pacientes con condiciones avanzadas o metástasis, esta fracción puede representar hasta el 10% del cfADN, contrario a lo que ocurre en pacientes avanzados, pero sin metástasis donde representa ~1%, ó <0.1% en estadios tempranos de tumores localizados. Esta información indica el reto que representa detectar ctADN en condiciones tempranas de cáncer, además, de la necesidad de utilizar tecnologías ultrasensibles. (Alba-Bernal et al., 2020)

Se postulan dos mecanismos principales mediante los cuales el ADN puede llegar a circulación. El primero se deriva de procesos de destrucción celular mediados por apoptosis y necrosis, mediante los cuales las células liberan ADN hacia la circulación que, en condiciones normales, es clareado por la acción de células fagocíticas, manteniendo bajos niveles de ADN libre circulante; sin embargo, ante procesos tumorales con amplias masas

celulares, eventos de inflamación significativa o daños celulares importantes, la acción fagocítica no logra manejar el alto contenido de cfADN, llevando a su acumulación en circulación (Crowley et al., 2013). El otro mecanismo se fundamenta en la capacidad que muestran las células tumorales en cultivo celular de liberar espontáneamente fragmentos de ADN hacia circulación, lo cual se hipotetiza como un mecanismo para incidir sobre células distantes susceptibles a transformación maligna (Crowley et al., 2013). Un asunto interesante que se ha logrado determinar es la correlación del tamaño de los fragmentos de cfADN con su posible fuente de origen, de dicho modo, algunos estudios han demostrado que en pacientes con cáncer se encuentran fragmentos más pequeños que los que se pueden obtener en personas sanas, lo cual podría tener explicación en el mecanismo mediante el cual ese ADN sale a circulación: fragmentos de menor tamaño pueden ser consecuencia de mecanismos de liberación programada, mientras que los de mayor tamaño serían consecuencia de procesos de muerte celular en los que existe disrupción completa de membranas celulares que facilita la salida del material genético en presentaciones de mayor complejidad (Fernandes Marques et al., 2019).

Se ha mostrado evidencia que, en pacientes con cáncer colorrectal metastásico, una vez iniciada la terapia sistémica, las concentraciones de ctADN van disminuyendo conforme se avanza en la consolidación del tratamiento, indicando la posibilidad de implementar este biomarcador con fines diagnósticos y pronósticos. (Schwarzenbach et al., 2008)

Exosomas Derivados de Tumores (tExs)

Los exosomas fueron descritos por primera vez en 1983, por Pan y Johnstone (Siravegna et al., 2017). Son vesículas extracelulares de origen endosomal que presentan un tamaño de 40 – 150 nm, las cuales son secretadas por todo tipo de célula, cumpliendo función de mediadores en procesos de comunicación intercelular. Los exosomas pueden contener en su interior biomoléculas funcionales como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, lo cual dependerá del origen de la célula que los produce. El contenido de estas vesículas se puede transferir hacia receptores celulares distantes o adyacentes, llegando a modular diversos procesos a nivel de vías de señalización intracelular, expresión genética o fenotípica. (Rajagopal & Harikumar, 2018)

Más allá de formar parte de procesos celulares normales, un incremento en el índice de liberación de exosomas favorece la progresión de procesos oncogénicos y metastásicos, ya que proteínas oncogénicas contenidas en ellos pueden conducir a la propagación tumoral en otros tejidos (Rajagopal & Harikumar, 2018). Algunos estudios han demostrado

que el ADN contenido dentro de estas estructuras celulares puede usarse como referencia para evaluar el perfil mutacional de las células tumorales, encontrándose mutaciones en los genes de KRAS y TP53 dentro del ADN de exosomas de pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal; ambas mutaciones son altamente prevalentes en dicho tipo de cáncer, con lo que se confirma su valor como biomarcadores tumorales (Thakur et al., 2014).

Adicionalmente, otras investigaciones han generado información entorno a los perfiles proteicos y de ARN de células tumorales que son reflejados en sus exosomas, así como casos en los que los niveles de diferentes miARNs eran similares entre el tejido canceroso y los tExs; o la gran correlación en la expresión de ARN mensajero del factor de crecimiento epidérmico III en tejido de glioblastoma y esas estructuras endosomales en suero de los mismos pacientes. (Junqueira-Neto et al., 2019)

Los exosomas no sólo median cambios en el microambiente y promueven la progresión tumoral, sino, promueven la propagación metastásica al acondicionar nichos pre-metastásicos, reclutando células que colaboran con la angiogénesis requerida para el establecimiento del nuevo sitio tumoral; y colaboran con la sobrevivencia de células cancerosas luego de exponerlas a tratamiento quimioterapéutico, ya que en estudios con células de cáncer de mama se ha visto que las células resistentes logran transmitir su capacidad de resistencia mediante transferencia horizontal de exosomas, cuyo contenido permite modular los patrones de expresión genética en las células receptoras. (Rajagopal & Harikumar, 2018)(Junqueira-Neto et al., 2019)

Micro ARNs tumorales circulantes (miARNs)

Los miARNs son moléculas de ARN no codificante de cadena sencilla, con una longitud de 20-23 nucleótidos, que cumplen un rol en la regulación post-transcripcional de la expresión genética. Se reportan más de 2500 miARNs maduros en el genoma humano. Por sí solo, cada miARN tiene la capacidad de ejercer influencia sobre varios genes, y un solo gen puede estar regulado por varios miARNs. Son el tipo de ARN más abundante en circulación, teniendo la capacidad de ser transportados por exosomas, cuerpos apoptóticos, formando complejos proteicos y mediante plaquetas. (Izzotti et al., 2016)(Siravegna et al., 2017)

Son liberados desde las células asociados con proteínas que unen ARNs o contenidos dentro de exosomas, como medida para protegerlos de la acción de RNAsas. Su presencia en circulación se sugirió como consecuencia de eventos disruptivos de la integridad celular. No obstante, se ha denotado que también son secretados por algunas células con el objetivo de comunicarse y ejercer influencia en la expresión genética en otros

tejidos (Peng & Croce, 2016). Se estipula que 10% - 30% de todos los genes humanos son sometidos a regulación de miARNs (Lawrie et al., 2008).

De manera similar a como ocurre con otros componentes celulares, niveles elevados de miARNs han sido detectados en diferentes fluidos corporales de pacientes con cáncer, Su implementación como biomarcadores para detección de cáncer se logra sustentar debido a que la expresión de este tipo de ARNs se ha visto desregulada en esta enfermedad. Los patrones de expresión de miARNs muestran ser tejido específicos y se presenta la ventaja de que son sumamente estables en tratamiento con formalina. (Mitchell et al., 2008)

ARN mensajeros (mARNs) circulantes

Son los productos directos de la transcripción del ADN, obteniendo un rol preponderante en el proceso de traducción proteica intracelular. Los mARNs son claro reflejo del estado homeostático de las células, por lo que los mARNs extracelulares reflejan la condición intracelular, sirviendo como biomarcadores de diagnóstico y monitoreo terapéutico contra el cáncer. (Junqueira-Neto et al., 2019)

Plaquetas educadas por tumores (TEPs)

Las plaquetas son fragmentos subcelulares no nucleados que representan el segundo tipo celular más abundante en sangre periférica. Se originan en médula ósea a partir de precursores de megacariocitos y cumplen un importante papel en hemostasia y trombosis. Estas células contienen organelas en su interior, así como transcritos de ARN derivados de megacariocitos. (George, 2000)

Las plaquetas logran desempeñar un papel de ayuda en el desarrollo del cáncer al promover la angiogénesis y al colaborar con el mantenimiento de la nueva vasculatura desarrollada (Leslie, 2010). De igual modo, se conoce la existencia de una interacción mutua entre estas células y las neoplásicas, que desencadena efectos en el crecimiento y diseminación tumoral. Las plaquetas logran secuestrar biomoléculas secretadas por células tumorales mediante un mecanismo dependiente de vesículas, con lo que se instaura una "educación" plaquetaria que afecta la expresión genética en células tumorales y altera los perfiles de ARN en las plaquetas. Dicha capacidad de las plaquetas de secuestrar biomoléculas les permite internalizar mARNs circulantes, proteínas y microvesículas emitidas por las células tumorales, conteniendo ARNs específicos del entorno tumoral, lo que origina TEPs que reflejan el perfil tumoral, y pueden actuar como una herramienta útil en el diagnóstico clínico. (Junqueira-Neto et al., 2019)

Metodologías de análisis de biomarcadores

Aislamiento y enriquecimiento de CTCs

Como ya se mencionó, existen diversas tecnologías que permiten el aislamiento de CTCs dentro del microambiente sanguíneo, principalmente basadas en propiedades físicas como tamaño, densidad, deformabilidad, expresión de moléculas de superficie y cargas eléctricas. Además, dada la baja cantidad de CTCs se realizan estrategias de concentración o enriquecimiento celular previo al estudio. (Millner et al., 2013)

Los métodos de discriminación por tamaño y deformabilidad se fundamentan en que las células neoplásicas son más grandes que las células hematológicas en circulación periférica, permitiendo implementar sistemas de captura con microfiltros o membranas con poros selectivos. Las diferencias en densidad se pueden implementar para discriminar mediante la migración dentro de gradientes de centrifugación con ficoll. Por su parte, las propiedades eléctricas dan paso a la separación de acuerdo con la migración dependiente de su carga eléctrica. (Siravegna et al., 2017).

Las técnicas dependientes de la identificación con marcadores específicos se fundamentan en que el fenotipo tumoral es epitelial y parten de un método de selección positiva en el que se detectan moléculas propias de las CTCs de interés, donde se puede utilizar a la molécula de adhesión celular epitelial EpCAM, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la mucina-1, el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) o el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. La selección positiva implementa el reconocimiento mediante anticuerpos marcados con fluorocromos o partículas magnéticas que permiten aislar las CTCs. No obstante, la heterogeneidad fenotípica de las células tumorales puede ocasionar que la molécula seleccionada no esté presente en la superficie celular, ocasionando una posibilidad de fallo en su implementación. Ese panorama se puede subsanar mediante una metodología de selección negativa en la que se busca capturar y descartar las células no malignas mediante el reconocimiento con marcadores específicos, por ejemplo: el marcador panleucocitario CD45, el CD34 para células madre hematopoyéticas y el CD146 para células endoteliales; con esa discriminación negativa se tiene el riesgo de obtener poblaciones de CTCs no tan puras o que las mismas queden atrapadas en una masa de células sanguíneas en la fracción de la muestra que se descarta. (Pantel & Alix-Panabières, 2019)

La *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó un método para la identificación y cuantificación de CTCs que permite predecir la evolución en pacientes con cáncer de mama, colorrectal y próstata. Dicho método es el CellSearch™ que realiza una fase de enriquecimiento celular mediante un ferrofluido magnético que contiene anticuerpos contra EpCAM. La muestra enriquecida es marcada con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que es un marcador fluorescente que tiene la capacidad de unirse fuertemente a regiones de ADN ricas en adenina y timina. Posteriormente, se realiza un marcaje de la CK 8, 18 y 19, las cuales son proteínas estructurales intracelulares de células epiteliales; y de los leucocitos mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra el CD45. Por ende, las CTCs se logran aislar a partir de una muestra de 7.5 mL de sangre periférica mediante selección positiva con inmunomagnetismo acoplado a EpCAM; posteriormente, son identificadas con DAPI, además de ser CD45 negativas y CK positivas. Finalmente, pueden ser escaneadas mediante microscopía de fluorescencia. Al ser definidas como tal, las CTCs se pueden cultivar por micromanipulación y así quedar disponibles para otros análisis. A considerar, se debe tener clara la posible subjetividad de la técnica al depender del análisis de un examinador, y el hecho de que algunas CTCs pueden no expresar EpCAM. (Millner et al., 2013)

Detección de CTCs

Una vez superada la etapa de aislamiento y enriquecimiento, la población de CTCs obtenidas aún contiene contaminación con otros tipos celulares, por lo cual se requiere utilizar métodos de identificación individual. Lo más común es reconocer las células objetivo por medio del uso de detección inmunológica directa con anticuerpos que reconocen antígenos de membrana y citoplasmáticos; siendo común implementar los pasos para identificación que realiza el sistema CellSearch™, al combinar exclusión de leucocitos mediante el CD45, reconocimiento de CTCs con EpCAM y CK, además, de la utilización de marcadores específicos de acuerdo con el tipo de tumor buscado. De igual manera, las CTCs se logran identificar por medio de estrategias basadas en ácidos nucleicos, con la incursión de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y retrotranscripción (RT), para lo que se requiere el diseño de *primers* específicos de tejido, específicos de órgano, para transcritos específicos de tumor o para mutaciones genéticas o patrones de metilación característicos de la neoplasia en estudio. (Pantel & Alix-Panabières, 2019)

El FACS (*Fluorescence Assisted Cell Sorting*) es un método de detección que se vale de técnicas de citometría de flujo basadas en captura con anticuerpos. El FACS permite

alcanzar altos niveles de pureza mediante la discriminación celular por tamaño que define el parámetro denominado *forward scatter* (dispersión frontal), por complejidad interna que establece otro parámetro designado como *side scatter* (dispersión lateral), y de acuerdo con la expresión de dianas deseadas. Cada célula se carga eléctricamente y, posteriormente, es separada en subpoblaciones a través de un sistema de detección electrostático. Es una tecnología que permite el análisis de hasta 50 000 células por segundo, con detección multiparamétrica simultánea. No obstante, este método tiene la limitante que sólo puede analizar una célula a la vez, la cantidad de células que se puede analizar es limitada y, luego de la separación en subpoblaciones, la viabilidad celular se puede ver reducida debido al medio de flujo al que se someten para su separación. (Millner et al., 2013)

El ELISPOT (*Epitelial InmunoSPOT*) es una alternativa de detección de CTCs, *in vitro*. Esta tecnología usa cultivos celulares de CTCs para identificar, por medio de fluorescencia, proteínas epiteliales específicas que son secretadas por las células malignas, tal como CK 19 o el antígeno prostático específico (PSA). Se obtiene información cuantitativa de CTCs viables presentes en la muestra, así como información cualitativa sobre las proteínas que son secretadas o eliminadas durante el cultivo celular. (Pantel & Alix-Panabières, 2019)

Otra importante técnica de detección es la PCR cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR) que analiza la expresión de marcadores celulares específicos mediante el ARN celular. La detección de ARN es un indicador de viabilidad celular, ya que este desaparece rápidamente luego de procesos de muerte. La sensibilidad de la RT-qPCR es superior a la de la inmunocitoquímica, sin embargo, se reporta alta frecuencia de resultados falsamente positivos dada la contaminación en la muestra analizada y la expresión de los genes buscados en células normales. Otro aspecto para considerar de la técnica es que una vez que se recolecta el contenido de ARN de la célula en estudio, esta pierde su viabilidad y no se puede implementar para análisis posteriores. (Millner et al., 2013)

La fluorescencia asistida de hibridación *in situ* (FISH) es un método que detecta la presencia o ausencia de secuencias específicas de ADN en los cromosomas, a partir de sondas fluorescentes. (Millner et al., 2013)

Análisis de ctADN

La obtención de la muestra se puede realizar en tubos con EDTA como anticoagulante, u otros que implementen el uso de soluciones preservantes para prevenir la hemólisis y la degradación de los fragmentos de ctADN; siempre buscando un mayor periodo de tiempo con estabilidad en almacenamiento, previo al procesamiento. La implementación de plasma es de elección sobre el suero, dado que otorga menor probabilidad de contaminación con ADN genómico proveniente de la lisis de los leucocitos. (Rolfo et al., 2020)

La sangre extraída en tubos con EDTA se debe procesar en las primeras 4 – 6 horas, posteriores a la extracción. Al no ser posible un procesamiento rápido, se opta por el uso de tubos especiales de estabilización celular. Para el inicio del procesamiento de la muestra, algunos estudios recomiendan protocolos de centrifugación en dos pasos: un paso inicial a baja velocidad y otro a alta velocidad; con lo que se obtendría la separación del plasma y el consecuente aislamiento del ADN tumoral presente en circulación. Con respecto a la extracción, es preponderante la purificación de todos los fragmentos de cfADN, evitando injerencia de posibles inhibidores de la PCR, o del ADN genómico. Para la extracción existen *kits* comerciales, manuales o acoplados a sistemas automáticos, basados en el aprovechamiento de columnas de centrifugación, membranas de sílice o perlas magnéticas. A pesar del desconocimiento de las posibles variaciones entre los *kits* y protocolos existentes, es claro que el rendimiento dependerá de la metodología de extracción utilizada. Finalmente, se puede realizar cuantificación del ADN de interés mediante técnicas de PCR o fluorimetría. (Perdomo et al., 2020)

Existe una amplia gama de métodos y ensayos que permiten el análisis de ctADN, categorizándose en dos grupos: los que van dirigidos hacia una única variante o un pequeño grupo de variantes genéticas, y los que son de cobertura mucho más amplia. Los ensayos dirigidos detectan variantes somáticas recurrentes y generalmente usan estrategias basadas en PCR. La qPCR se puede implementar para la detección de deleciones pequeñas o sustituciones de una sola base, mediante el uso de *primers* de secuencias específicas. Para incrementar la sensibilidad, algunas técnicas se basan en el uso de PCR digital (dPCR) o de BEAMing, que permiten alcanzar una secuenciación masiva en paralelo. (Scarlotta et al., 2019)

La secuenciación de nueva generación (NGS) puede apuntar hacia cientos de genes que representan una región específica. Esa región se define de acuerdo con el conocimiento

previo de aberraciones genéticas comunes asociadas con el tipo de cáncer que se está investigando. La NGS permite identificar la mayoría de las alteraciones somáticas genéticas. Es una técnica que envuelve secuenciaciones masivas de moléculas de ADN. Esta permite desde la identificación de variantes de un único nucleótido (SNVs) hasta la secuenciación del genoma o exoma completos. (Cirillo, Craig, Borchmann, & Kurtz, 2020) (Crombie & Armand, 2019)

La PCR digital presenta un amplio uso debido a la ventaja de tener bajo costo económico y una elevada sensibilidad, que permite la detección de mutaciones cuya frecuencia es inferior al 0.1%. La dPCR se fundamenta en la distribución de la muestra de ADN en miles de particiones realizadas mediante gotas provenientes de una emulsión de agua-aceite o en múltiples pocillos en un soporte físico; cada porción contiene un fragmento de cadena simple de ADN, mutado o no, que se amplificará por PCR, con posterior detección mediante el uso de sondas TaqMan que localizan y cuantifican mutaciones que son poco comunes pero relevantes para el tumor (Remon et al., 2020). Sin embargo, las metodologías basadas en PCR tienen la limitante de que se necesita conocer las mutaciones que se están buscando, o sea, requieren un objetivo específico, lo cual restringe sus aplicaciones clínicas. Por otra parte, las plataformas de NGS muestran menor sensibilidad al detectar mutaciones con frecuencias menores al 1%, pero tienen la capacidad de detectar mutaciones desconocidas a lo largo de todo el genoma. No obstante, el uso rutinario de NGS en la clínica se podría limitar como consecuencia del elevado costo económico que demanda. La mejor solución ante las dificultades propias de cada metodología sería la combinación de ambas técnicas, con la utilización de NGS en una primera instancia que permita obtener una visión del perfil mutacional, y la PCR que venga a validar los hallazgos de la secuenciación masiva y su monitoreo a lo largo del tiempo. (Russano et al., 2020)

BEAMing (beads, emulsification, amplification y magnetics) es una tecnología implementada por la biopsia líquida basada en el estudio no invasivo del genotipo tumoral a partir de ctADN en sangre periférica. Brinda la oportunidad de evaluar la presencia de mutaciones con valor predictivo o pronóstico. Posterior al aislamiento del material genético canceroso circulante, se amplifican las regiones de interés por medio de PCR. Las secuencias amplificadas se unen a partículas magnéticas impregnadas con oligonucleótidos específicos, y se dividen en millones de microgotas acuosas en una emulsión con aceite, alcanzando que cada microgota contenga únicamente una molécula de ADN unida a una partícula magnética. Después de someter cada microgota a ciclos de

temperatura, similar a lo ocurrido en una PCR convencional, cada secuencia se amplifica de nuevo utilizando los oligonucleótidos como *primers*. Posteriormente, miles de copias de ADN están unidas a las partículas magnéticas, donde se incluye la secuencia de interés. Cuando se termina el proceso de amplificación, la fase acuosa se separa de la oleosa, se recolectan las partículas por magnetismo y se marcan las secuencias de ADN con fluoróforos para identificar las mutadas de las no mutadas, dadas las diferencias en fluorescencia. Finalmente, la proporción de partículas con ADN mutado, comparada con el control, es determinada por citometría de flujo convencional. (Remon et al., 2020)

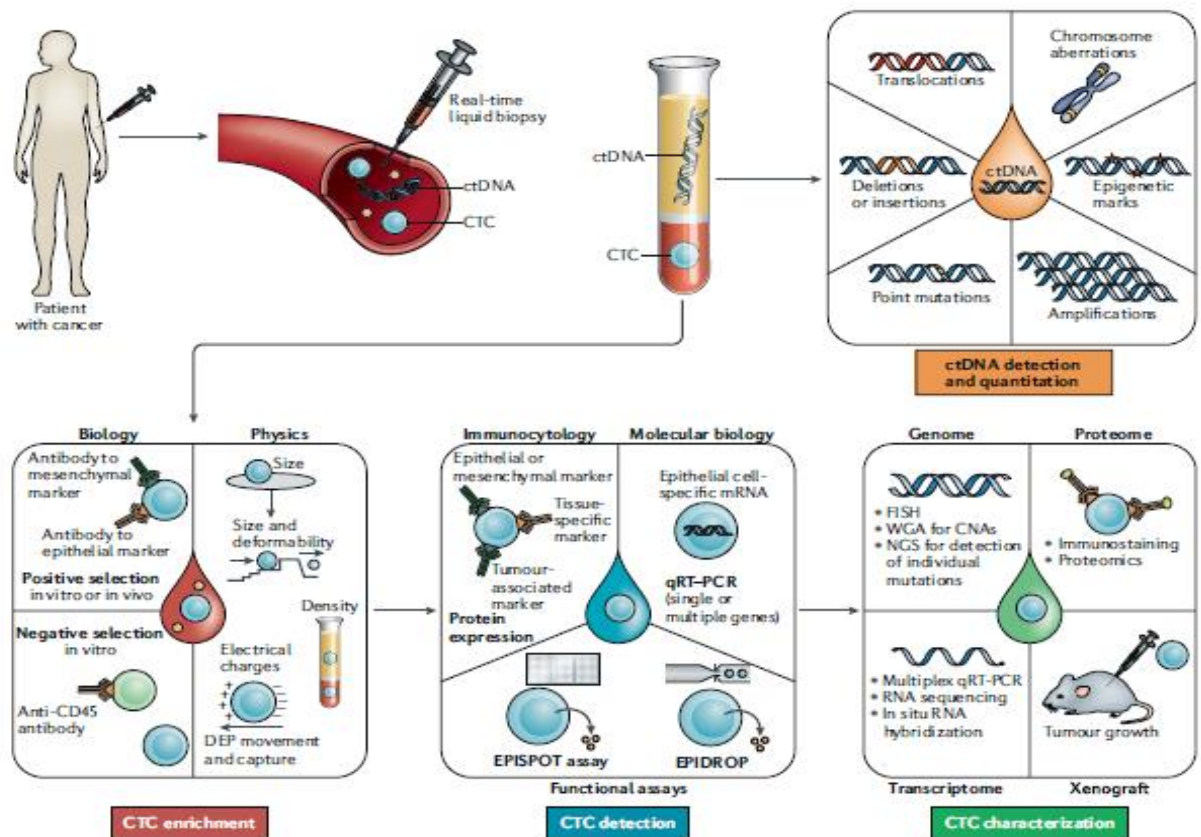


Figura 1. Metodologías de enriquecimiento, detección y caracterización de CTCs y ctADN. (Pantel & Alix-Panabières, 2019)

Manejo de exosomas

Los exosomas se pueden obtener a partir de fluidos corporales mediante una centrifugación por gradiente de densidad, ultracentrifugación, visualizados por microscopía de transmisión o mediante técnicas de reconocimiento de antígenos específicos como la tetraspanina, CD63, CD9 y CD81. Su obtención permite realizar análisis de mARN en búsqueda de mutaciones, variantes de empalme, fusiones de genes y perfiles de expresión genética; ya que en comparación con los fragmentos de ctADN donde solamente se encuentran dos copias del gen tumoral, en un mARN proveniente de un gen altamente expresado se puede obtener miles de copias por célula. (Siravegna et al., 2017)

Capítulo II. Aplicaciones de la biopsia líquida en neoplasias de origen no hematológico.

Posterior a la detección de una masa tumoral mediante métodos de imagenología médica, usualmente se procede con la realización de una biopsia por punción. Esta permite estudiar las características celulares de la masa en cuestión, para así definir si su naturaleza es benigna o maligna. Se presenta como una metodología con elevada especificidad y sensibilidad puesto que obtiene la muestra directamente del sitio de origen de la neoplasia, permitiendo en análisis mediante diversas técnicas citológicas, inmunohistoquímicas o moleculares, con el fin de determinar el origen y pronóstico del tumor que se está enfrentando. (Diamantis, Magiorkinis, & Koutselini, 2018).

Por la naturaleza del procedimiento para obtener una biopsia sólida, sumado a la dificultad de acceso al sitio anatómico en el que se puede encontrar un tumor, muchas veces la muestra obtenida para su posterior análisis es única; en contra parte de lo que puede ocurrir cuando el tumor se encuentra en un sitio con alta accesibilidad, siendo posible la obtención de muestras provenientes de diferentes partes de la masa tumoral. Los estudios realizados a partir de la obtención de porciones de muestras provenientes de distintos sitios de tumores primarios y de masas metastásicas, han demostrado una importante evolución inter-tumoral e intra-tumoral. Dicha evolución define la extensa heterogeneidad manifiesta en el cáncer, que coloca sobre la palestra la dificultad de poder dictaminar un adecuado curso terapéutico a partir de una única muestra de biopsia, dada la posibilidad de subestimar la complejidad genética del tumor al realizar los análisis pertinentes, considerando que la muestra obtenida no contenga los subclones más agresivos de la masa maligna. (Logothetis, 2013)

Como ya se mencionó la biopsia de tumor sólido es un procedimiento estándar que presenta una serie de ventajas. Sin embargo, como toda técnica también muestra diversas dificultades: lo invasivo y molesto que el procedimiento puede representar para el paciente, los riesgos propios de las comorbilidades del paciente, la posibilidad de que se presenten complicaciones quirúrgicas inherentes al procedimiento, el riesgo de esparcir el cáncer hacia otros sitios, la inaccesibilidad del tumor, hasta las consideraciones económicas asociadas. (Crowley et al., 2013)

Existen otras técnicas de laboratorio que han dado un apoyo alternativo al abordaje diagnóstico invasivo, mediante la implementación de proteínas como biomarcadores para procesos malignos, tal como ocurre con el uso de la alfa-fetoproteína, el antígeno carcinoembrionario y el CA-19.9. Sin embargo, se encuentran grandes limitantes con respecto a su sensibilidad y especificidad. Adicionalmente, la vida media de estos alcanza de semanas a meses en circulación, brindando un panorama inexacto de la condición tumoral en un momento dado, y contrario a la posibilidad alcanzada mediante los biomarcadores de los que se vale la biopsia líquida, que permiten evaluar los cambios en términos de horas. (Scarlotta et al., 2019)

La caracterización molecular de tumores en pacientes con malignidades sólidas ha permitido grandes avances en el abordaje preciso dentro de la oncología, con la obtención de perfiles genéticos que dan lugar a la instauración de terapias personalizadas en gran cantidad de tipos de cáncer. Tradicionalmente, los perfiles genéticos se establecen a partir de tejidos derivados del tumor, obtenidos por remoción quirúrgica o biopsias focales, con el fin de poder identificar mutaciones específicas que colaboren en la predicción de perfiles de sensibilidad terapéutica. De manera más reciente, se ha profundizado en la idea de experimentar mediante la biopsia líquida y así practicar ensayos a partir de CTCs y cfADN (además de los otros biomarcadores previamente mencionados), dadas las ventajas propuestas al obtener una muestra mínimamente invasiva. (Cheng et al., 2021)

El camino para reconocer la utilidad de la biopsia líquida como herramienta pronóstica y predictiva en tumores sólidos ha sido paulatino. La mayoría de los avances se han logrado en los casos de cáncer de colon, mama, próstata y pulmón. Se debe indicar que la mayoría de los estudios se han enfocado en un entorno metastásico, gracias a que en ese proceso se genera un ambiente con alta presencia de CTCs y ctADN, brindando un mejor modelo de enfermedad que permite evaluar y monitorear en mejor medida el comportamiento patológico. Adicionalmente, se debe contemplar que caracterizar una malignidad,

únicamente, a partir del muestreo de su masa primaria podría ser contraproducente ante la posibilidad de subestimar la magnitud de esta, ya que las células metastásicas pueden presentar características genéticas únicas que no se estarían reflejando mediante ese tipo de muestra. (Rolfo et al., 2020)

La relativa baja presencia de ctADN en las muestras de sangre, comparado con lo que se obtiene directamente de la masa sólida tumoral, representa un reto entorno a la sensibilidad de la biopsia líquida. Se obtienen resultados falsos negativos dada una baja concentración de ctADN en la biopsia líquida, así como la no inclusión de genes alterados en los paneles de detección molecular. Por su parte, se pueden encontrar resultados falsamente positivos debido a la presencia de variantes de línea germinal o de mutaciones somáticas en células madre hematopoyéticas, en los casos en los que los ensayos no contemplen la secuenciación concomitante de las células hematológicas. Igualmente, la presencia de alteraciones genéticas derivadas de otras malignidades diferentes al cáncer de interés podría ocasionar confusión en la interpretación de los análisis de biopsia líquida. No obstante, trabajar a partir de muestras de sangre permite obtener un panorama conjunto de la masa tumoral primaria y de los focos de metástasis, capturando la heterogeneidad tumoral por completo. (Cheng et al., 2021)

Dadas las estadísticas mundiales de cáncer para 2020, esta revisión contempla los 4 tipos de cáncer más prevalentes para el estudio de los avances de la biopsia líquida en ellos, tal como se presenta a continuación.

Cáncer de mama

Es la neoplasia más común en mujeres, a nivel mundial, alcanzando un 23% de los diagnósticos oncológicos y 14% de las muertes asociadas con cáncer, en dicho grupo, para el 2020 (WHO,2021). Alrededor del 95% de los casos se detectan en un estadio temprano, sin que existan evidencias macroscópicas de metástasis. Aproximadamente el 20% de las pacientes recaen con una enfermedad metastásica incurable, lo que sugiere que esa propagación tumoral podría estar estableciendo desde el momento del diagnóstico. Bajo esa premisa, combinar la facilidad de muestreo de la biopsia líquida con tecnologías moleculares de alta sensibilidad y avanzados protocolos bioinformáticos podría representar una enorme ayuda hacia la mejora del diagnóstico y monitoreo de esa etapa de diseminación maligna. (Alba-Bernal et al., 2020)

El diagnóstico de elección se fundamenta en el uso de la mamografía, la cual brinda una elevada especificidad que supera el 95%, pero carece de sensibilidad que podría bajar

hasta un 65%. El desempeño está sujeto a la edad de la paciente, la densidad de la mama, así como las aptitudes del profesional de salud. Complementariamente, gracias a la búsqueda de biomarcadores que colaboren con la detección del evento maligno se ha incursionado en el uso del CA15-3, el antígeno carcinoembrionario, CCL5, la osteopontina y PAI-1; sin embargo, se ha demostrado que ninguno de estos es efectivo para predecir el cáncer de mama, sumado a la falta de cambios constantes en sus niveles a lo largo del tiempo. (Ozawa et al., 2020)

Este tipo de cáncer se puede clasificar de diferentes maneras, siendo la inmunohistoquímica una de esas maneras de evaluación clínica. De acuerdo con ese modo de designación, se logra estratificar basado en la expresión de cuatro marcadores: el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR), el marcador de proliferación Ki-67 y el receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2). Entonces, según los patrones de expresión de los 4 marcadores se clasifica en: luminal A (ER+, PR+, HER2- y Ki-67 menor al 14%), luminal B (ER+, PR+/-, HER2 +/- y Ki-67 mayor al 14%), sobre-expresión de HER2 (ER-, PR- y HER2+) y triple negativo (ER-, PR- y HER2-). Esta clasificación se correlaciona con pronóstico y evolución, siendo el triple negativo el de peor pronóstico. La probada utilidad al identificar estos marcadores respalda su uso combinado con metodologías basadas en muestro mediante biopsia líquida, ya que su detección por medio de esta alternativa mínimamente invasiva ayuda a definir de modo dinámico su abordaje terapéutico, considerando que se pueden dar diferencias de expresión de esos marcadores entre la masa primaria y las células que salen a circulación con motivo de acentuar un proceso metastásico; siendo sumamente importante poder determinar diferencias de expresión de antígenos en las células malignas circulantes que les puedan proporcionar resistencia ante terapias definidas por medio de la caracterización del cáncer primario. (Ozawa et al., 2020)

HER2 es un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico. La sobre expresión de HER2 juega un papel importante en el desarrollo y progresión de algunos tipos de cáncer de mama y cáncer gástrico. Es por ello por lo que, clínicamente, se ha utilizado como un biomarcador y como posible diana terapéutica en un 30% de pacientes que sufren esas dos condiciones. (Masuda et al., 2016)

El receptor de estrógeno (ER) se expresa en, aproximadamente, el 70% de pacientes con cáncer de mama, confiriendo una clasificación de ER-positivo, lo cual se determina mediante análisis inmunohistoquímicos de tejido. Se establece la hipótesis que la unión del

estrógeno con el ER estimula la proliferación de células mamarias, llevando a un incremento en división y replicación de ADN celular, con lo que se establecen las condiciones para la ocurrencia de múltiples mutaciones dada la elevada tasa de actividad nuclear. No obstante, los tumores ER-positivos muestran un pronóstico favorable y responden a terapia endocrina. (Masuda et al., 2016)

Las bondades de la biopsia líquida permiten que la secuenciación de ctADN mediante NGS lleve a identificar mutaciones en ESR1, el gen que codifica por ER, lo cual no se logró realizar mediante una biopsia sólida de los focos de metástasis en pacientes con cáncer de mama. Adicionalmente, por medio de dPCR se ha logrado correlacionar la presencia de mutaciones en ESR1, en el ctADN, con perfiles de resistencia a terapia endocrina, lo cual podría indicar que el uso de ADN circulante se postula como una estrategia de alta sensibilidad en la predicción y monitoreo de la eficacia del tratamiento. (Schiavon et al., 2015)

La presencia de un fenotipo de expresión tumoral diferente entre una masa primaria y las CTCs podría predecir una pobre respuesta a la terapia convencional contra el cáncer. Se ha visto que, en cáncer de mama metastásico que a partir de las células de su foco primario ha sido catalogado como ER-positivo, se han logrado identificar CTCs cuya expresión es negativa para ER. Igualmente, se han detectado clones de CTCs que son positivas para HER2, en pacientes con cáncer de mama metastásico que inicialmente se calificaron como HER2-negativo, a partir de la masa primaria. La biopsia líquida para determinar ciertos clones de CTCs permitiría anticipar el fallo en terapias establecidas contra blancos específicos en el eje de estrógenos y HER2; dado que utilizar una terapia cuyo objetivo sea bloquear la señalización mediante el ER expresado en las células del tumor primario no sería efectiva contra las células circulantes que no expresan dicho receptor, ocasionando que esas CTCs pasen desapercibidas ante la acción del medicamento. (Russano et al., 2020)

Papakaki et al estudiaron los niveles de expresión de un conjunto de cuatro miARNs circulantes en muestras de pacientes con cáncer de mama localizado. Se observó un incremento de miR-21, miR-23b y miR-200c, de la mano de una disminución en miR-190 en pacientes con recaída, en comparación con un grupo sin recaída. Se llegó a la conclusión que el monitoreo de esos miARNs serviría para predecir la ocurrencia de recaídas y la estratificación de las personas que padecen la enfermedad. De manera similar, Rodríguez-Martínez et al estudiaron el rol de miARNs en exosomas, como herramienta de monitoreo

y predicción ante la respuesta a la terapia neoadyuvante; se determinó la concentración de esos miARNs, antes y después del tratamiento, encontrándose sobre expresión de miR-21 y de miR-105 en pacientes que avanzaron hacia metástasis, comparado con los que no experimentaron esa evolución. Considerando los principales hallazgos de los dos estudios mencionados, los miARNs en circulación muestran un importante potencial para mejorar el manejo clínico del cáncer de mama, mediante una muestra de sangre de simple obtención. (Alba-Bernal et al., 2020)

En términos de seguimiento, al intentar estimar el riesgo de recaída posterior a completar la terapia primaria se tienen que supervisar las características clínicas de la enfermedad al momento del diagnóstico inicial. No hay una herramienta avalada y disponible que permita estimar el riesgo individual, más allá de la imagenología, y por ello la biopsia líquida ha ido tomando importancia. Gracias a esta ventana de oportunidad, mediante el uso de CellSearch™, en un estudio se evaluó la significancia de las CTCs, 5 años posterior al diagnóstico, demostrando que el pronóstico en mujeres con presencia persistente de esas células circulantes fue significativamente más pobre que en la población en la que no se logró detectarlas; se reportó un riesgo de recurrencia anual de 21.4% cuando al menos se detectó 1 CTC, comparado con solamente un 2%, al no detectarlas del todo. (Ozawa et al., 2020)

Cáncer de pulmón

El tamizaje actual para cáncer de pulmón incluye imagenología médica de tórax en individuos con factores que los catalogan como un grupo de alto riesgo, tal como: el fumado crónico, tener una edad superior a los 50 años o padecer de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). A pesar de los grandes avances y la tecnología de punta que caracterizan al ámbito de imágenes médicas, la obtención de resultados falsamente positivos puede ser causal de que el paciente se tenga que someter a un procedimiento quirúrgico de elevado riesgo. Por esto, la consideración de análisis biológicos, no invasivos, que puedan complementar los algoritmos de abordaje inicial en malignidades pulmonares adquieren gran potencial de uso. (Hofman, 2020)

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es el subtipo de cáncer de pulmón más común, que se suele diagnosticar en estadios avanzados cuando no es factible un tratamiento curativo. Es una enfermedad en la que se ha dado un importante estudio de la utilidad de las CTCs. Se han realizado investigaciones dirigidas hacia la búsqueda de

alteraciones genéticas en EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET, RET y NTRK, debido a su potencial uso en terapias dirigidas. (Russano et al., 2020)

Con el avance en la medicina se ha logrado definir de una manera concreta los objetivos claros que se intentan alcanzar mediante un muestreo con biopsia líquida, conociendo las mutaciones más frecuentes que afectan la respuesta a tratamientos y que sirven como guía para la implementación de NGS en ctADN. Recordando que con esta técnica de secuenciación masiva no sólo se podría evaluar el perfil mutacional de un blanco en específico, sino, de otros mecanismos de resistencia como los que alteran diversas vías de señalización celular. Un buen ejemplo se tiene con el gen de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), el cual codifica por un receptor de tirosín quinasa con dominio transmembrana que al mutar lleva a la activación de manera constitutiva de ALK, de íntima relación con actividad tumoral. Se han logrado identificar, aproximadamente, 30 proteínas de fusión para ALK, siendo la proteína 4 asociada con microtúbulos equinodermos (EML-4), la principal acompañante en NSCLC. El reordenamiento EML4-ALK aparece entre el 3% - 7% de los pacientes con este tipo de cáncer, definiendo un subtipo molecular específico que llega a metástasis con facilidad. Esta malignidad es comúnmente observada en los pacientes más jóvenes o en los no fumadores. La importancia de identificar traslocaciones en ALK deriva del desarrollo de tratamientos a partir de inhibidores de tirosín quinasa efectivos contra ese blanco terapéutico, que han demostrado mejorías en la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia global y la tasa de respuesta objetiva, en comparación con la quimioterapia. No obstante, se han determinado mecanismos de resistencia a la terapia con inhibidores de tirosín quinasa, entre los que se incluyen las mutaciones en ALK: G1202R, G1296A, F1174L y L1196M; y desregulaciones en vías de señalización por mutaciones en c-KIT, RAS y PI3K, cuya identificación temprana y su respectivo seguimiento en el tiempo permitiría acoplar una mejor terapia personalizada, sin la necesidad de acudir a terapias de prueba y error (Sánchez-Herrero, Provencio, & Romero, 2020)

Varios estudios han demostrado que en etapas tempranas de cáncer de pulmón es posible detectar CTCs. Se han implementado metodologías de aislamiento basadas en el tamaño y posterior caracterización citológica. Las técnicas comúnmente ensayadas se valen de la utilización de filtros de policarbonato con poros de diferentes tamaños (6.5 µm, 7.5 µm o 8 µm de diámetro). Se lisan los eritrocitos contenidos en la muestra, se realiza el proceso de filtración que retiene las CTCs que no logran atravesar debido a su tamaño superior al de

los poros y su disminuida deformabilidad; posteriormente, se procede al marcaje mediante tinciones especiales, inmunocitoquímica o inmunofluorescencia, y su detección fenotípica. De acuerdo con un estudio reportado en 2014, se realizó un análisis retrospectivo que incluyó a 168 pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, obteniéndose que 5 de esos pacientes alcanzaron la condición maligna algunos meses después de que se les detectara la presencia de CTCs en circulación; mientras que ninguno de los pacientes en los que no se detectó CTCs llegó al padecimiento del estado tumoral. (Hofman, 2020)

La metodología *Cobas EGFR mutations test version 2* es la única basada en biopsia líquida que la FDA ha aprobado para detectar las dos mutaciones activadoras de EGFR más comunes: EGFR del19 y EGFR L858R. Adicionalmente, la prueba permite determinar la alteración EGFR T790M, que se relaciona íntimamente con resistencia adquirida, posterior al uso de inhibidores de tirosin kinasa de EGFR, de primera y segunda generación. Estudios realizados con esta prueba han dado concordancias del 80.5% en resultados de mutaciones para EGFR en 2561 muestras paralelas de tejido y plasma, con una sensibilidad de 46.9% y especificidad de 95.6%. Otro estudio, evidenció una concordancia del estado mutacional de 89%, en 1162 muestras, con sensibilidad de 46%, especificidad de 97%, valor predictivo positivo de 78% y valor predictivo negativo de 90%. (Ou, Nagasaka, & Zhu, 2018)

Carcinoma colorrectal

Este tipo de cáncer presenta la tercera mayor incidencia a nivel mundial y la segunda causa de muerte asociada con malignidades tumorales, para el 2020 (WHO,2020). Muestra una complicación diagnóstica ya que sus síntomas son tan inespecíficos como cambios en el tránsito intestinal, pérdida de peso, deficiencia de hierro, anemia, dolor abdominal o sangrado rectal. Su diagnóstico se apoya en la colonoscopia, y se categoriza según su ubicación anatómica en: carcinoma colorrectal derecho (CCD) o izquierdo (CCI). El CCD contempla los dos tercios proximales del colon transversal, el colon ascendente y el ciego; mientras que el CCI incluye el tercio distal del colon transversal, el ángulo esplénico, el colon descendente, el colon sigmoideo y el recto. Tanto el CCD como el CCI tienen diferencias embrionarias, fisiológicas, patológicas, genéticas, clínicas, así como epidemiológicas, que respaldan sus diferentes cursos, pronóstico y evolución. La mayor incidencia en pacientes en edad avanzada la muestra el CCD. (Helvacı et al., 2019)

Se caracteriza por una amplia heterogeneidad intra-tumoral y marcada inestabilidad genética que impactan el tratamiento y la calidad de vida de los pacientes. La progresión tumoral, relacionada con la acumulación de mutaciones somáticas, se explica por

alteraciones en vías moleculares que desencadenan: inestabilidad cromosomal originada por mitosis alterada; inestabilidad microsatelital dada por inactividad en los mecanismos de reparación del ADN; y un fenotipo metilador de islas CpG que se define por inactivación transcripcional del ADN debido a metilaciones en los promotores de genes supresores de tumores. (Kolenčik et al., 2020)

Existen 6 genes, principalmente involucrados, en el curso del carcinoma colorrectal: APC, TP53 (cuya mutación tiene mayor presencia en la evolución hacia metástasis), KRAS, BRAF, PIK3CA y SMAD4. Las alteraciones genéticas en estos genes ocasionan disrupción en diversas cascadas de señalización celular, tal como la vía de WNT, la de MAPK o la de PI3K. (Kolenčik et al., 2020)

El carcinoma de colon se logra desarrollar precediendo un adenoma no invasivo. Se han descrito mutaciones en el gen APC (*adenomatous polyposis coli*) que brindan la capacidad de iniciar crecimiento celular clonal a nivel de colon; mutaciones en SMAD4 y mutaciones que afectan vías de señalización de receptor tirosin kinasa, además de alteraciones genéticas que afectan la estabilidad de genes involucrados en la reparación del ADN. (Scarlotta et al., 2019)

La plataforma CellSearch™ fue implementada en un estudio de cohorte para analizar la dinámica de CTCs en muestras recolectadas previa y posteriormente a cirugía en pacientes con cáncer colorrectal en proceso de metástasis. Los resultados evidenciaron que en la población de estudio de 44 individuos, todos los que tenían muestras positivas previo a la cirugía desarrollaron una posterior recaída; considerándose como positiva la presencia de dos o más CTCs por muestra. También, se determinó diferencia en la sobrevida media: los pacientes con resultados positivos pre-cirugía alcanzaron los 17 meses, mientras que los que presentaron resultados negativos llegaron a los 69 meses, en promedio. Esta plataforma brinda la posibilidad de estratificar los pacientes de carcinoma colorrectal en grupos pronósticos basados en la cantidad de CTCs identificadas: favorables (menos de 3 CTCs/muestra), y no favorables (3 ó más CTCs/muestra). (Kolenčik et al., 2020).

La biopsia líquida podría tener un gran impacto en la instauración del tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal, ya que una caracterización molecular precisa del tumor permitiría la adecuación de terapia dirigida. Para ejemplificar esto, las mutaciones en KRAS y NRAS pueden variar ampliamente a lo largo de las lesiones tumorales esporádicas, lo que lleva a que el estado de esas alteraciones genéticas, en una evolución metastásica,

sea impredecible. Entonces, se podría detectar esas disrupciones mediante ctADN, ante la ausencia de identificación a partir de biopsias del tumor primario; siendo de vasta importancia debido a que las células cancerosas mutadas en KRAS suelen presentar resistencia al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR, ampliamente suscrito en ese tipo de pacientes. (Morelli et al., 2015)

Se realizó un estudio para determinar la reciprocidad entre mutaciones en los genes RAS, en pacientes con malignidad colorrectal, en muestras obtenidas con biopsia sólida y líquida. Los resultados obtenidos indicaron una correlación del 96.4%; con 55 pacientes positivos por mutaciones en RAS en la muestra de tejido sólido, y 53 que fueron detectados en ctADN. Otro estudio con una cohorte de 140 pacientes en avanzados hacia metástasis arrojó una correlación del 89%, al identificar mutaciones en los mismos genes y a partir del mismo tipo de muestras. (Kolenčik et al., 2020)

Cáncer de próstata

Es la segunda causa de muerte asociada con cáncer en hombres, luego del cáncer de pulmón. Es una enfermedad altamente heterogénea que puede presentarse desde una clínica indolente hasta un tumor resistente a castración, considerablemente agresivo. Su curso clínico, relativamente prolongado, genera la necesidad de implementar marcadores biológicos que sustenten la toma de decisiones a lo largo del abordaje del cuadro maligno. Presenta la posibilidad de ser tratado con tratamientos localizados como la resección quirúrgica, radioterapia dirigida o vigilancia activa, lo cual se fundamenta en la estratificación individual por riesgo, de cada paciente. (Neuhaus & Yang, 2018)

En el abordaje convencional de esta malignidad se implementan las características celulares obtenidas por biopsia de tejido, niveles de antígeno prostático específico (PSA) e imágenes médicas, para poder monitorear el tumor. El PSA se implementa para el monitoreo en cualquier etapa de la enfermedad, a pesar de que su aplicación se ha considerado como controversial ya que no refleja con precisión la carga ni actividad de la malignidad; donde uno de los aspectos negativos que se podría experimentar es la aplicación de un sobre tratamiento en cáncer de curso indolente con terapias que impactan la sobrevida y los síntomas del individuo, pero no cambian los niveles séricos del PSA, los cuales siguen estando elevados a pesar de la evolución favorable del paciente. Esto coloca con urgencia una necesidad de encontrar biomarcadores que realmente reflejen la respuesta al tratamiento de elección; sumando el requerimiento de identificar los perfiles

moleculares que evidencien la gran heterogeneidad tumoral y den paso a instaurar un tratamiento adecuado. (Zainfeld & Goldkorn, 2018)

El tamizaje mediante la PSA ha demostrado ser responsable de un sobrediagnóstico y sobretratamiento. Ese diagnóstico falsamente positivo y la realización de biopsias tisulares innecesarias se ha calculado entre 23% - 42%, en varios estudios. Uno de los mayores problemas de basar la vigilancia con la PSA son los diferentes puntos de corte establecidos; el umbral de 4.0 ng/mL se debería revisar. Se reporta una sensibilidad de 70% – 90% y una especificidad de 20% - 40%, para el antígeno prostático específico. La pobre especificidad se puede explicar en causas no cancerosas que elevan sus niveles, tal como la prostatitis o la hiperplasia prostática benigna. (Neuhaus & Yang, 2018) (Malik, Srinivasan, & Batra, 2019)

Las guías para la examinación clínica incluyen el examen rectal digital, el ultrasonido rectal y la biopsia de próstata. Esta última es el abordaje de elección en el diagnóstico preoperatorio, la cual tiene una tasa de detección que depende de los puntos de punción y el volumen prostático; siendo un procedimiento donde, de modo común, se causa hematuria, retención urinaria, infección o sepsis. En conjunto, las tres metodologías de detección están sujetas a baja sensibilidad cuando respecta a cáncer temprano, pudiendo ocasionar que el paciente pierda la oportunidad de iniciar tratamiento en el tiempo ideal. Por ello, la biopsia líquida ha sido implementada en algunos estudios para evaluar su utilidad complementaria en el abordaje clínico. (Neuhaus & Yang, 2018)

Uno de los principales estudios relacionados con el uso de biopsia líquida en cáncer de próstata logró determinar la presencia de CTCs en 231 pacientes dentro de una población de 276 individuos con metástasis resistente a la castración. Se observó que la presencia de 5 CTCs correlacionó con una significativa peor supervivencia (11.5 meses contra 21.7 meses), comparado con la presencia de <5 células cancerosas circulantes. Se estableció el punto de corte de 5 CTCs como mejor predictor de supervivencia general al año, con respecto al PSA sérico. También, pacientes con <5 CTCs que incrementaron a más de 5, presentaron un peor pronóstico que el mostrado por aquellos que iniciaron con 5 CTCs y disminuyeron sus conteos. Los resultados fueron corroborados en otro estudio en el que se determinó una supervivencia media de 26 meses al detectarse <5 CTCs, y 5 meses cuando la concentración alcanzaba el punto de corte de 5. Por otra parte, un incremento que alcanzara el punto de corte dentro de las primeras tres semanas de iniciado el tratamiento se asoció con peor sobrevida. (Fernández-Lázaro et al., 2020)

Se ha evaluado de manera extensiva el conteo de CTCs en cáncer de próstata localizado y en estadios avanzados. Okegawa *et al.* encontraron que 55% de hombres con cáncer metastásico tenían más de 5 CTCs / 7.5 mL de sangre, previo a terapia de deprivación de andrógenos; estos pacientes respondieron a la terapia por 17 meses, en contraste a los 32 meses de respuesta por parte de individuos que al inicio presentaban <5 CTCs. Otro estudio con CellSearch™ arrojó evidencia de que pacientes que desarrollaron resistencia a castración tenían un promedio de 17 células cancerosas circulantes, mientras que los que no presentaron resistencia mostraron un promedio de 1 CTC. Por la evidencia con respecto a la predicción de la aparición de fenotipos de resistencia, gracias al uso de biopsia líquida, su uso se postula como beneficioso para poder implementar quimioterapia temprana en los casos que lo requieren. (Zainfeld & Goldkorn, 2018)

De Bono *et al.* enumeraron CTCs en un total de 231 hombres con enfermedad resistente a castración, previo al inicio de la terapia específica. Bajo la misma tónica que se ha expuesto, se consideró como favorable <5 CTCs / 7.5 mL de sangre, desfavorable >5 CTCs / 7.5 mL. Estas células se encontraron en 219 individuos, demostrando una prevalencia del 95% en el estadio avanzado de la presentación tumoral. Subsecuentemente, la estratificación desfavorable se asoció con una supervivencia media de 11.5 meses, contra 21.7 meses en los casos favorables. Los casos desfavorables que evolucionaron a favorables luego de exponerse al tratamiento demostraron mejoría en su supervivencia media (alcanzaron 21.3 meses), demostrando la capacidad de las CTCs de reflejar la respuesta al tratamiento, en este tipo de pacientes. (Goldkorn et al., 2014)

Por tanto, las investigaciones basadas en biopsia líquida sugieren que es una metodología con amplia utilización en el pronóstico de las malignidades, así como en la predicción de fallos terapéuticos y se constituye como una de las mejores alternativas para dar seguimiento en el tiempo.

Capítulo III. Utilidad de la biopsia líquida en el estudio de malignidades hematológicas

Retomando la idea de que la principal carga de investigaciones en torno a biopsia líquida se ha dirigido hacia el análisis de tumores sólidos de origen endotelial, que en conjunto representan la mayoría de los casos de cáncer a nivel mundial, se ha podido tomar esto como base experimental para la incursión del muestreo mínimamente invasivo en el abordaje clínico de neoplasias distintas a las de origen sólido.

El interés en el ámbito onco-hematológico es llevar ese tipo de metodologías innovadoras hacia pacientes que sufren de malignidades de origen hematológico, teniendo en cuenta las diferencias de presentación, comportamiento y evolución de estas neoplasias con origen celular tan distinto. Se debe mencionar que no existen muchos datos cuantitativos de neoplasias hematológicas que permitan definir algoritmos diagnósticos o pronósticos a partir de la detección de biomarcadores específicos implementando una biopsia líquida.

A pesar de que las investigaciones relacionadas con biopsia líquida empiezan a tomar auge a partir de la década del 2000, siempre dirigidas hacia tumores sólidos no hematológicos, el abordaje diagnóstico, pronóstico, de seguimiento, evaluación de respuesta al tratamiento, búsqueda de resistencias a terapias convencionales y detección de recaídas es perfectamente aplicable a malignidades hematológicas. Los estudios hematológicos utilizan la misma tecnología de punta que se ha estado implementando para el abordaje en otro tipo de tumores. Entonces, a pesar de que la investigación generada con respecto a la aplicación propia del término de biopsia líquida ha sido muy poca, con respecto a las alteraciones hematológicas, mucha de la información requerida ya se ha venido recolectando de manera indirecta con la aplicación de diagnóstico y seguimiento mediante técnicas inmunocitológicas de reconocimiento específico con anticuerpos marcados con fluorocromos, y con las técnicas de detección de alteraciones genéticas basadas en la metodología de PCR. Esto hace pensar que la introducción de la biopsia líquida como complemento a los algoritmos de abordaje en las distintas neoplasias hematológicas ya lleva camino andado, sin siquiera haberse dado cuenta.

Mientras que la presencia de cfADN ha sido ampliamente descrita en estudios con tumores sólidos, los reportes en malignidades hematológicas resultan ser pocos. Sin embargo, dentro del poco camino recorrido se ha podido identificar mutaciones en RAS, duplicaciones internas en tándem en FLT3 y pérdida de la heterocigosidad, que se han detectado a partir de cfADN en pacientes con leucemia mieloide aguda y síndromes mielodisplásicos,

sustentando la utilidad de las muestras sanguíneas para la detección de anomalías moleculares. (Hohaus et al., 2009)

Dado que la evidencia encontrada para malignidades hematológicas se centra en los síndromes linfoproliferativos crónicos y el mieloma múltiple, esta revisión se fundamentó en ambos para ejemplificar la actualidad de la biopsia líquida en dicho campo.

Linfomas

Existe poca información asociada con el uso de biopsia líquida en síndromes linfoproliferativos. Sin embargo, algunos investigadores han encontrado ADN clonotípico de rearrreglos en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulinas, en 86% de muestras de plasma en pacientes con malignidades de células B (como la leucemia linfocítica crónica) al momento del diagnóstico, y la detección de rearrreglos de Bcl2/IgH en plasma se ha postulado como un marcador de enfermedad mínima residual en pacientes con linfoma folicular. Esto sustenta la presencia de ctADN en ese tipo de síndromes hematológicos. (Hohaus et al., 2009)

La mayoría de los linfomas no expresan células malignas circulantes, por lo que los análisis de CTCs solamente son posibles en los tipos que sí se presentan cargas circulantes de estas, como el linfoma de células del manto, el linfoma folicular, el linfoma de la zona marginal y algunos subtipos del linfoma de Burkitt. En contraste, el linfoma B difuso de células grandes (DLBCL) y el linfoma de Hodgkin clásico no suelen expresar CTCs, pero la cuantificación y análisis de ctADN se vuelve atractiva en estos. (Cirillo et al., 2020)

En un estudio se comparó la presencia de miARNs circulantes en suero, entre individuos con DLBCL y personas sanas. Se partió de la alta expresión evidenciada de miR-155 y miR-21 en DLBCL, así como miR-210 que se asocia con un fenotipo generalmente agresivo. Fue un estudio retrospectivo de 60 pacientes con diagnóstico de novo de DLBCL, muestreados en el momento del diagnóstico, y 43 personas como control sano. Los resultados mostraron mayor expresión de los tres tipos de miARNs en los pacientes, comparados con el control sano. Además, se evidenció que mayores niveles de miR-21 se correlacionaron con mejor supervivencia libre de recaída. Lo obtenido por dicha investigación brinda respaldo a la idea de que la detección incrementada de miARNs específicos en el suero correlaciona con el diagnóstico y pronóstico de DLBCL, a partir de un muestro no invasivo. (Lawrie et al., 2008)

Una investigación retrospectiva en sujetos con linfoma de Hodgkin clásico implementó la secuenciación de nueva generación para analizar muestras de plasma de 80 pacientes recién diagnosticados y de 32 pacientes con recaída. Fundamentado en que el ctADN actúa como un espejo de la genética expresada por las células de Reed-Sternberg, se estableció un perfil de cáncer personalizado para cada uno de ellos, encontrando que un 40% tenían mutaciones en STAT6, TNFAIP3 y ITPKB, siendo las más comunes. Se demostró que en individuos con este tipo de tumor el ctADN se puede utilizar como fuente de material genético tumoral para establecer perfiles mutacionales y caracterizar la biología de la enfermedad. Se debe resaltar la importancia de la hipótesis que se intenta demostrar mediante el abordaje mediante biopsia líquida, que postula un muestreo más oportuno, recordando que la biopsia convencional representa un reto en este tipo de pacientes dado que es común la enfermedad mediastinal y que el acceso a los sitios de localización tumoral resulta complejo, sumado a que la recolección se puede ver afectada por una baja representación en la obtención de células malignas debido al entorno celular y el grado de fibrosis que pueda acompañar al tumor. Otros reportes que analizaron el genotipo de este tipo de linfoma a partir de biopsia líquida y NGS identificaron los mismos genes recurrentemente mutados: STAT6, GNA13, ITPKB, SOCS1 y TNFAIP3. (Dunleavy, 2018)(Cirillo et al., 2020)

Scherer *et al* describieron el caso de un paciente, inicialmente diagnosticado con linfoma folicular mediante la biopsia de un nódulo linfático inguinal, el cual se presentó con transformación hacia DLBCL (evidenciada mediante una biopsia de un nódulo linfático retroperitoneal 9 meses después). Análisis mutacionales realizados a muestras de ctADN recolectadas en el tiempo, como parte del seguimiento al linfoma indolente, revelaron la presencia de las mutaciones que fueron específicas en el clon de la transformación y que no se lograron detectar en el tumor inicial. Lo anterior permitió formular la hipótesis de que la enfermedad transformante estaba presente al momento del diagnóstico y se pudo haber detectado mediante el análisis de ctADN en caso de que este biomarcador formara parte de una estrategia de abordaje diagnóstico en la práctica clínica. (Scherer et al., 2016)

A nivel de linfomas, uno de los ensayos de NGS más realizados es la secuenciación del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y la del gen del receptor de células T (TCR), permitiendo determinar clonotipos o secuencias de un único nucleótido para un clon maligno, de un paciente dado. Igualmente, en neoplasias de origen B, es común realizar PCR cuantitativas mediante *primers* universales dirigidos hacia la identificación de todos

los posibles rearrreglos de VDJ, DJ o I κ K, a partir de tejido del tumor primario o mediante muestras de sangre. Por lo cual, la amplificación mediante PCR y la NGS se pueden realizar utilizando CTCs y ctADN. (Crombie & Armand, 2019)

Otro ejemplo de aplicación para esta clase de malignidades hematológicas lo representa el linfoma primario de sistema nervioso central (PCNSL) y el linfoma vitreoretinal primario (VRL). La realización de biopsias convencionales en estos linfomas representa todo un reto ante el requerimiento de una exploración estereotáctica que permita ubicar el tumor mediante asistencia computacional. Por ende, el uso de sangre, así como de líquido cefalorraquídeo y de humor vítreo, que realmente son muestras de mayor accesibilidad comparadas con el parénquima cerebral, permiten análisis inmunocitológicos con detección por citometría de flujo y la realización de análisis moleculares, gracias al contenido de ctADN, lo cual puede colaborar con el diagnóstico. La identificación de un genotipo específico de enfermedad sería fácil de analizar debido a que se conoce que en al menos el 85% de los pacientes con PCNSL y VRL se presenta una mutación patognomónica que es altamente recurrente: MYD88 L265P. Esta mutación es extremadamente rara en neoplasias que no sean linfomas específicos de sistema nervioso central, dando beneficio a su uso dentro de la metodología de biopsia líquida, la cual ya ha sido ensayada en algunas investigaciones, sin embargo, el número de las cohortes no ha sido lo suficientemente robusto para poder corroborar la información estipulada o poder proceder con una estandarización de implementación clínica. (Cirillo et al., 2020)

En síntesis, la Tabla 1 muestra las posibles aplicaciones de la biopsia líquida en los tipos de linfoma mencionados, las cuales requieren de investigaciones más a fondo que permitan corroborar las hipótesis propuestas, su posibilidad de validación y la capacidad de verificarse para su uso en los diferentes laboratorios clínicos a lo largo del mundo.

Tabla 1. Aplicaciones propuestas para el abordaje de linfomas mediante biopsia líquida. Modificado de (Crombie & Armand, 2019).

Linfoma	Técnica acoplada	Utilidad propuesta
DLBCL	NGS	Pronóstico, respuesta al tratamiento, evaluación de enfermedad mínima residual y de evolución clonal.
del Manto	PCR cuantitativa	Evaluar enfermedad mínima residual.
Folicular	NGS, PCR cuantitativa o dPCR.	Pronóstico, evaluación de enfermedad mínima residual.
Hodgkin	NGS	Determinar el estado mutacional, evaluar evolución clonal y enfermedad mínima residual.

Mieloma múltiple (MM)

Es una malignidad hematológica caracterizada por la proliferación clonal de células plasmáticas en la médula ósea. Es el segundo tipo de cáncer hematológico en prevalencia y permanece incurable a pesar de los avances terapéuticos en su entorno, alcanzando una supervivencia promedio de 5 – 7 años. De manera frecuente es precedido de condiciones premalignas o indolentes como la gammapatía monoclonal de significancia incierta (MGUS) o el mieloma múltiple latente (SM), que resulta asintomático. El riesgo de progresar a MM es del 1% en MGUS y de 10% en la condición latente, por año; esto determina la necesidad de un monitoreo cercano de todos los pacientes que presenten ese tipo de condiciones no cancerosas, sin tratamiento, hasta que se manifieste una clara progresión maligna. (De Luca et al., 2019)

MM es una enfermedad genéticamente heterogénea, compuesta por depósitos tumorales multi focales, a lo largo de la médula ósea. Esto hace que la obtención de una biopsia por aspiración de tejido sólido, tomada en un sitio específico, no contenga la información de todos los clones, con lo que no se alcanzaría un reflejo del completo estado actual de la

patología, considerando la presencia de lesiones malignas fuera de la médula ósea. Adicionalmente, el progreso de la presentación maligna resulta en alteración de las características de cada uno de los clones presentes, lo cual no se puede determinar al muestrear un único sitio anatómico. Como consecuencia, el auge de la biopsia líquida brinda una alternativa llamativa para obtener perfiles moleculares más completos, a partir de los biomarcadores producidos por las células tumorales del mieloma, que salen a circulación periférica, otorgando una alternativa para detectar posibles cambios en el perfil molecular que se asocian con distintas respuestas al tratamiento, dependiendo de cada subclon. (Gupta, Sharma, & Sharma, 2020)

A pesar de que la genética molecular no ha demostrado gran impacto en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo del curso clínico en el mieloma múltiple, la presencia de las traslocaciones t(4;14) y (14;16), la delección 17p y la ganancia de 1q se han asociado con una evolución desfavorable. (Flach et al., 2020)

Con la introducción de la NGS se han podido estudiar células plasmáticas y se han identificado mutaciones, cuyo impacto tumoral ha sido probado, en más de un 60% de pacientes con MM. Cuando en los estudios se incluyen mutaciones cuyo efecto se considera oncogénico, pero aún no se ha logrado comprobar como tal, la detección asciende a más del 90% de los casos (Bolli et al., 2018). La vía MAPK con presencia de mutaciones en KRAS, NRAS y BRAF es un buen ejemplo, ya que estas alteraciones se reportan en aproximadamente 23%, 21% y 9% de los pacientes con MM, respectivamente. De igual manera, es frecuente encontrar mutaciones en genes relacionados con la vía que involucra a NFκB (TRAF3, CYLD, LTB), con la regulación del ciclo celular (TP53 y RB1) y con la vía de respuesta al daño en el ADN (ATM y ATR), así como alteraciones en genes importantes en la diferenciación de linfocitos B, como IRF4, SP140 y PRDM1. Todas esas mutaciones somáticas se han observado mediante NGS y se han asociado como contribuyentes en la progresión tumoral, más que con procesos de iniciación. (Flach et al., 2020)

En MM se han encontrado CTCs que egresan de la médula ósea. Su detección podría ayudar en la predicción del estado de la enfermedad y la sobrevivencia del paciente. Del mismo modo, se puede obtener colaboración al determinar enfermedad mínima residual. Mediante un metaanálisis se determinó que la presencia de más de 400 CTCs en MM recién diagnosticado correlaciona con progresión de la enfermedad, citogenética adversa, menor

sobrevida y mayor tasa de recaída. También, se determinó que la presencia de 100 o más CTCs en casos con recaída se asocia con peor supervivencia. (Gupta et al., 2020)

En un estudio en el que se analizó el perfil transcripcional de CTCs en MM, el perfil de expresión genética se determinó idéntico que el mostrado por las células plasmáticas clonales ubicadas en médula ósea. No obstante, las células circulantes mostraron mayor expresión de genes asociados con respuesta inflamatoria, hipoxia, ciclo celular y migración, lo cual se relaciona con una inferior progresión libre de enfermedad y con una presentación más agresiva. Otra publicación reportó hallazgos similares, demostrando que en la mitad de los pacientes la proporción de CTCs mutadas era mayor que las células provenientes de muestras de médula ósea, sugiriendo la obtención de mejor información proveniente de las células en circulación. También, la presencia de mayores niveles de CTCs en MM latente se asoció con mayor riesgo de progresar a MM en los primeros 2 – 3 años posteriores al diagnóstico. (Ferreira et al., 2020)

Mediante algunas investigaciones, a partir de muestras de plasma, se ha estudiado el rol de los miARNs en esta malignidad. Se han correlacionado altos niveles de miR-17, miR-20 y miR-92 con menor supervivencia libre de progresión. miR-17-92 se ha asociado con un rol en la tumorigénesis al incidir sobre BCL2L1, un facilitador de la apoptosis en MM. Además, se determinó sobre expresión de miR-106b-25, miR-181a/b y miR-19a/b en células plasmáticas malignas, comparado con controles normales. También, se ha estudiado la expresión de miARNs y su relación con subtipos genéticos en mieloma múltiple, encontrando que altos niveles de miR-99b tienen íntima relación con la traslocación t(4;14) (IGH;FGFR3), que se toma como marcador de peor pronóstico; mientras que una baja expresión de miR-221 se asocia con la del(13q), siendo esta alteración altamente estudiada como prerrequisito para expansión clonal. En términos de recaída, elevadas concentraciones de miR-20a y miR-148a están relacionadas con mayor riesgo de incidencia, otorgando peor pronóstico. Una investigación compara los niveles de miARNs de 28 donantes de plasma sanos contra 12 pacientes con MM; se estudia la expresión de miR-148a, miR181a, miR-20a, miR-221, miR-99b y miR-625, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, con presencia de mayores concentraciones en la población enferma, tanto a nivel específico como global. (Huang, Yu, Li, Liu, & Zhong, 2012) (Fu, Zhang, & Khoo, 2021)

Discusión

La biopsia líquida se ha venido consolidando como una alternativa muy prometedora en la oncología médica, dada su importante aplicabilidad en: detección temprana de incidencia de cáncer, estimación de la heterogeneidad tumoral, seguimiento en el tiempo de la dinámica neoplásica, eficaz caracterización de la malignidad para instaurar terapias dirigidas, evaluación de la respuesta temprana al tratamiento, establecimiento de estrategias de monitoreo para la enfermedad mínima residual y cuantificación de la resistencia a las terapias elegidas.

El uso de biomarcadores presentes en sangre periférica para diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades es asunto del día a día en la práctica clínica. La determinación de niveles de glucosa, triglicéridos o enzimas hepáticas es parte fundamental en la rutina de los laboratorios clínicos, donde su adecuada interpretación brinda información precisa del estado de ciertos órganos como el hígado y páncreas, colaborando con el diagnóstico de diabetes o enfermedades hepáticas. Esto es el ejemplo más sencillo del beneficio adquirido con la medición de biomoléculas; siempre considerando la sensibilidad y especificidad alcanzada mediante la metodología que se utilice.

El increíble avance en tecnologías de la salud ha llevado al alcance de enormes volúmenes de información mediante la implementación de técnicas moleculares de alto rendimiento. El acople con los avances en farmacogenética ha permitido establecer los perfiles moleculares de cada tumor para poder instaurar regímenes de tratamiento específicos que abren la puerta a la medicina personalizada.

Una meta clínica que se ha fijado es la de interceptar la aparición del cáncer, principalmente en individuos con riesgo de ocurrencia de esta enfermedad. Para esto se han incrementado esfuerzos por desarrollar metodologías mínimamente invasivas que facilitan identificar marcadores en etapas previas a la consolidación de la malignidad.

La biopsia líquida surge como una alternativa de menor costo económico, comparada con la de tejido sólido. Sin embargo, se debe tener claro que dicho costo se puede elevar de manera acumulativa al realizar detecciones seriadas en el tiempo. Otro aspecto económico para considerar es el de las tecnologías y protocolos requeridos para el análisis de muestras y de datos, que demandan esfuerzos para la estandarización de las diversas metodologías que se han ido acoplando a la pesquisa clínica del cáncer, utilizando este muestreo menos invasivo. Además, dada la poca evidencia que se ha logrado constatar para la posible inclusión de la biopsia líquida en el algoritmo de abordaje clínico de pacientes hemato-

oncológicos, es fundamental establecer estudios robustos que permitan validar su uso. (Cirillo et al., 2020)

La baja tasa de precisión que se ha logrado alcanzar en la implementación de biopsias líquidas es otra de las barreras principales en la consolidación de su uso clínico. Se debe tener claro que la naturaleza de los biomarcadores que se buscan dificulta su manipulación, considerando las bajas concentraciones en las que circulan y su fácil degradación. Por lo que la información que se procura obtener por medio de un muestreo de líquidos biológicos se alcanzará sólo en circunstancias en las que la concentración de los biomarcadores buscados sobrepase los umbrales de detección de las técnicas implementadas. (Pantel & Alix-Panabières, 2019)

Entonces, se debe tener claras las principales características distintivas entre lo que brinda la biopsia tisular convencional y la biopsia líquida, tal como se muestra a continuación:

Tabla 2. Comparación general entre biopsia tisular y biopsia líquida.

Biopsia tisular	Biopsia líquida
Metodología de referencia en la práctica clínica.	Carece de estandarización en las metodologías implementadas. Su uso ha sido experimental.
Elevada sensibilidad dado que la muestra se toma directamente del sitio de origen tumoral.	Baja sensibilidad debido a la presencia de bajas concentraciones de los biomarcadores buscados en los líquidos biológicos.
Brinda una fotografía instantánea de la condición tumoral en el momento del muestreo.	Permite una detección en el tiempo del perfil tumoral; no se limita a un único instante.
Se basa en procedimientos quirúrgicos o aspiración de biopsia.	Se vale de muestras de líquidos corporales de relativa fácil obtención.
Invasiva y riesgosa.	Mínimamente invasiva.
Difícil de repetir.	Fácil de repetir.

Dadas las evidencias, ampliamente reportadas, de mejores respuestas ante el tratamiento antineoplásico cuando la carga tumoral es baja, se resalta lo fundamental de alcanzar métodos de detección temprana. Es ante esta situación que las investigaciones realizadas en torno a la alternativa de incluir la biopsia líquida para un cribado y diagnóstico temprano de malignidades se vuelve promisorio. Según los datos mostrados con anterioridad, la poca

evidencia experimental empieza a dibujar un panorama optimista de las ventajas que se alcanzan al detectar CTCs y ctADN en sangre periférica. No obstante, se deben superar ciertos obstáculos, tal como la falta de capacidad de identificar el órgano de origen del cual provienen los biomarcadores detectados. (Arechederra, Ávila, & Berasain, 2020)

Otro punto por solventar son los altos índices de sobrediagnóstico dado por resultados falsamente positivos, y los de sub-diagnóstico debido a los resultados falsamente negativos; los últimos son, principalmente, afectados por asuntos técnicos como la selección de los biomarcadores adecuados, la capacidad de procesamiento de muestras o los límites de detección y cuantificación de las metodologías utilizadas, o por factores biológicos como la presencia de hematopoyesis clonal de potencial indeterminado no contemplada o un comportamiento tumoral no diseminado. (Rolfo et al., 2020)

Un posible reto al implementar la biopsia líquida para dar seguimiento a malignidades es la existencia de la hematopoyesis clonal de potencial indeterminado, que hace referencia a una expansión asintomática de células de origen hematológico que se originan de una misma célula madre hematopoyética, y que lleva a la expresión de variantes genéticas específicas, recurrentes y disruptivas en individuos que no alcanzan un claro diagnóstico de malignidad hematológica. Es una condición que se asocia con el envejecimiento y mayor mortalidad asociada con otras causas. Es común encontrar mutaciones somáticas en tres genes implicados con cáncer hematológico, como DNMT3A, ASXL1 y TET2; así como se han encontrado variantes en TP53, JAK2 y otros genes mutados en tumores sólidos (NOTCH2, FAT3, EXT2, ERBB4, KRAS y ARID2). Esta condición clonal se puede convertir en una fuente de error al presentar mutaciones que pueden no ser la causa de la malignidad que sufre el paciente. (Rolfo et al., 2020)

En un estudio, Genovese et al secuenciaron el ctADN de 12 380 individuos, en una búsqueda de mutaciones a partir de muestras de sangre periférica. Se detectó la presencia de hematopoyesis clonal de potencial indeterminado con mutaciones somáticas en 10% de los sujetos de estudio con edad mayor a 65 años, pero sólo en un 1% de los menores a 50 años. También, se logró concluir que 42% de los sujetos que llegaron a sufrir cáncer de origen hematopoyético mostraron hematopoyesis clonal de significado incierto al menos 6 meses antes a su diagnóstico. Las mutaciones encontradas estaban dispersas a lo largo de todo el genoma, no obstante, los genes DNMT3A, TET2, ASXL1 y PPM1D presentaron altos números de alteraciones somáticas con elevada tendencia a distorsionar las secuencias codificantes por proteínas. Sin embargo, algunas de las mutaciones

encontradas, de igual modo, estaban presentes en individuos sanos, sugiriendo que no todas las alteraciones genéticas identificadas en ctADN se asocian con el riesgo de desarrollar una enfermedad maligna. Esto respalda el hecho de que una de las limitaciones más importantes con respecto a la sensibilidad de análisis de una biopsia líquida es el número limitado de mutaciones recurrentes que permitan diferenciar entre cursos benignos y patológicos. (Genovese et al., 2014)

Con respecto a posibles limitaciones debido a la elección del biomarcador adecuado se puede subsanar al buscar, simultáneamente, más de un biomarcador específico de la neoplasia en estudio. Por ejemplo, se puede evaluar paralelamente la presencia de antígenos y mutaciones características del objetivo tumoral. Aquí es preponderante la búsqueda de CTCs, ya que por sí solas actúan como biomarcadores, o bien, pueden ser el analito inicial para el posterior análisis de otros marcadores.

Retomando el hecho de que la FDA solamente ha dado autorización para el uso de CellSearch™ como única metodología de aislamiento y detección de CTCs, hay que especificar que esto se debe a que existe amplia información que sustenta su uso como predictor pronóstico en supervivencia libre de enfermedad, según estudios realizados en cáncer de mama, de colon y de próstata metastásicos. De acuerdo con esta metodología, los casos en los que se detecten <5 CTCs por cada 7.5 mL de sangre presentan mejor respuesta clínica que en los que se evidencien >5 CTC por cada 7.5 mL. Se han observado diferencias significativas en el número de CTCs en pacientes comparables en cuanto al estadio maligno y el perfil de metástasis, siendo causa de cuestionamientos con respecto a la utilidad clínica de la cantidad de CTCs. Por ello, es indispensable establecer investigaciones dirigidas hacia el esclarecimiento de todos los factores que influyen sobre la diseminación, dinámica y aclaramiento de las células cancerosas circulantes, con lo que se puedan desplegar herramientas precisas para su uso e interpretación. (Perdomo et al., 2020)

La Tabla 3 muestra el avance en aplicación de la biopsia líquida en malignidades no hematológicas y su incursión en el abordaje clínico de pacientes con malignidades de origen endotelial; basado en los tipos de cáncer presentados en esta revisión, que en conjunto representan la mayor prevalencia a nivel mundial. Esto demuestra que se han establecido las bases para el desarrollo de ensayos de evaluación en malignidades hematológicas.

Tabla 3. Ensayos basados en biopsia líquida para tumores endoteliales, aprobados por la FDA para uso clínico. Modificado de (Arechederra et al., 2020).

Ensayo	Estado FDA	Biomarcador	Aplicación	Otros datos
CellSearch Circulating Tumor Cell Kit	Aprobado por la FDA (Agosto 2013)	Cuantificación de células tumorales circulantes (CTC) de origen epitelial: Enriquecimiento positivo con EpCAM y detección de citoqueratinas 8, 18 y 19.	Pronóstico del cáncer de mama, colorrectal y de próstata.	La sensibilidad del kit depende de la positividad de las CTC para el marcador de superficie EpCAM, así como para las citoqueratinas 8, 18 y 19.
Epi proColon DNAmethylation blood test	Aprobado por la FDA (Abril 2016)	Detección de citosinas metiladas en el gen SEPTIN 9 en ctDNA mediante PCR a tiempo real.	Cribado del cáncer de colon.	Es un ensayo desarrollado para evaluar la metilación de SEPTIN 9, con un tiempo de espera de unas 32 horas. Su sensibilidad es de 69% - 72%.
Cobas EGFR Mutation Test v2	Aprobado por la FDA (Junio 2016)	Detección de 42 mutaciones definidas en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por PCR tiempo real.	Orientar en la selección de tratamiento en el cáncer de pulmón de células no pequeñas	Permite la detección de mutaciones en cfDNA en menos de 4 horas. 75% de sensibilidad y 98% de especificidad.

Debido a que el cfADN que se libera de las células tumorales es un espejo de las características de su origen, la determinación de modificaciones genéticas y epigenéticas atrae interés como un gran candidato para formar parte de los algoritmos de abordaje del cáncer. Sin embargo, la aparición de limitaciones entorno a su utilidad clínica no se pueden obviar. La baja proporción de fragmentos de ADN con mutaciones dentro de la muestra total de cfADN puede llevar a la obtención de un falso negativo; así como la detección de mutaciones cuyo origen se encuentra en la incidencia de hematopoyesis clonal puede dar

falsos positivos. Para el último caso, se debe considerar el procesamiento simultáneo de cfADN y ADN extraído de leucocitos del mismo paciente, para una interpretación adecuada de los hallazgos suscitados. (Schwarzenbach et al., 2011)

Visto desde el punto de vista de las malignidades linfoproliferativas, en ciertos tipos como la leucemia linfocítica crónica o el linfoma del manto, existe un amplio uso de biopsia líquida para su diagnóstico mediante técnicas acopladas a citometría de flujo. Es algo que se viene implementando, inclusive, a nivel país. Sin embargo, la sensibilidad de la metodología no es suficiente para cubrir malignidades linfoides en las que el componente celular circulante es muy pequeño o inexistente; es ahí donde surge la importancia de introducir las técnicas de detección de material genético circulante. (Crombie & Armand, 2019)

Conclusiones

Una de las principales consideraciones que se debe debatir ante la propuesta de aplicación de la biopsia líquida dentro de algoritmos de abordaje clínico es su costo-efectividad. Momentáneamente, es una metodología que se está logrando consolidar en fases de experimentación, pero que tiene un importante recorrido por concretar hasta ser considerada como una alternativa eficiente en su uso en pacientes.

Se ha logrado su validación analítica para ciertos usos, sin embargo, su aceptación por parte de organismos de regulación clínica internacional no se logra alcanzar por completo. Para poder establecer si su aporte realmente mejora la calidad de vida de los pacientes y si su aplicación logra representar ganancia en años de vida, se deben desarrollar vastos ensayos que sustenten la verdadera utilidad, comparando de manera cercana con lo ofrecido por la biopsia de tejido sólido, que ha demostrado ser costo-efectiva al ser sometida a análisis con NGS.

Se deben doblar esfuerzos enfocados en el desarrollo de ensayos robustos y reproducibles que permitan evitar la variabilidad técnica en las fases pre-analítica y la analítica de una biopsia líquida, considerando la amplia gama de metodologías que se pueden implementar para el abordaje de muestras provenientes de recolecciones no invasivas.

No está claro el uso de una única metodología para la realización de una biopsia líquida, ya que al revisar la extensa oferta de protocolos que muestran aplicación, incluyendo distintos procedimientos y condiciones para finalmente obtener los mismos resultados, surge la interrogante de la factibilidad de validar una única técnica óptima que permita obtener cada uno de los biomarcadores buscados.

Existen otros vacíos como la falta de definición de umbrales de sensibilidad en las pruebas implementadas para poder dictar la utilidad clínica. Esto se evidencia de manera muy clara mediante los resultados de diversas investigaciones en las que se cuantifican CTCs, pero en cada una se establece un punto de corte de positividad distinto.

El tema de la existente necesidad de validar métodos que lleven a la estandarización de la biopsia líquida para un uso clínico de alcance global propone otro panorama contraproducente, ya que aún no se sabe cómo estimar el tamaño de la muestra y las características requeridas en los individuos experimentales que se utilizarían como controles.

Otro asunto de relevancia es que la gran parte de ensayos que evalúan la utilidad de la biopsia líquida se fundamentan en el aislamiento, identificación y procesamiento de CTCs y de ctADN, por lo que se debe incursionar en verificar la utilidad, sensibilidad y especificidad de los exosomas, las plaquetas educadas por tumores y los distintos tipos de ARN que de igual manera se postulan como opciones para caracterizar la presentación tumoral en un momento dado.

Esta revisión bibliográfica deja claro que existe gran camino recorrido en investigaciones basadas en biopsia líquida como alternativa para tumores de origen endotelial, de ahí que existan algunos ensayos aprobados por la FDA como el CellSearch™, lo cual ha trazado los pasos a seguir en el campo de la hematología al considerar la introducción este tipo de muestreo dentro de su práctica clínica. A partir del ejemplo de la oncología, se pueden anticipar eventos contraproducentes que retrasen las investigaciones y puesta en práctica en el ámbito hematológico.

Ya existen hipótesis concretas de la posible mejora diagnóstica que pueden obtener los tumores hematológicos de formación sólida, proveniente de la biopsia líquida. Esta revisión mostró dos ejemplos interesantes que tienen sustento en la literatura: el linfoma de Hodgkin (LH) y el linfoma vitreoretinal primario (VRL). En el caso del LH, su dificultad para proceder con un muestreo mediante biopsia convencional debido a su localización en un entorno celular complejo y, muchas veces, acompañado de un importante grado de fibrosis, encuentra en la biopsia líquida una opción muy prometedora que permita un muestreo más representativo de la condición tumoral. Por su parte, en el VRL su localización anatómica compleja hace que el acceso para su muestreo sea ampliamente complejo y riesgoso, con lo que se postula la evaluación tumoral mediante líquido cefalorraquídeo, humor vítreo o sangre periférica como una solución de acceso más sencillo e inmediato, que permita una evaluación en el tiempo.

Entorno a la evidencia encontrada con respecto a biopsia líquida en malignidades hematológicas sin formación sólida se debe mencionar que el respaldo no es muy contundente, evidenciando que es un tema de investigación que da sus primeros pasos. Se debe hacer la excepción con respecto al mieloma múltiple, donde su conformación multifocal y posible ubicación extramedular abren la posibilidad que la aspiración de médula ósea subestime la condición tumoral. Otro punto por destacar con respecto al mieloma múltiple es que se presenta como una malignidad cuyo abordaje clínico ya conoce del muestreo mínimamente invasivo para determinación de biomarcadores que conceden la

posibilidad de dar seguimiento en el tiempo, tal como ocurre con la evaluación de la presencia de picos monoclonales mediante electroforesis de proteínas, a partir de la muestra de suero de los pacientes, o la cuantificación de cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas. Por ende, con la idea de biopsia líquida propuesta en este trabajo de revisión, para el mieloma múltiple se postula la posibilidad de emplear marcadores más específicos para la malignidad, trascendiendo a nivel molecular, o la evaluación de CTCs que permitan predecir cuadros de recaída.

La información recopilada nos deja claro el panorama de la situación de la biopsia líquida que empieza a despegar como una opción novedosa en la práctica clínica, con respecto a malignidades. Es una herramienta que viene demostrando, investigación tras investigación, su enorme potencial como complemento clínico a las metodologías convencionales, puesto que aún es muy temprano como para poder vaticinar que vendrá a sustituir los algoritmos diagnósticos convencionales, dadas los posibles puntos débiles que se pueden encontrar y que se mencionaron a lo largo de esta revisión. Más allá de suplantar a la biopsia tisular, se puede visualizar como un método práctico de seguimiento en el tiempo, con anticipación en el comportamiento tumoral, con miras en mejor definición pronóstica, vigilancia de la respuesta al tratamiento y supervisión de recaídas. Además, se podría considerar como alternativa diagnóstica en los casos en los que la metodología de muestreo invasivo se complica debido a las circunstancias ambientales en que se desarrolla la masa tumoral. Dando siempre el importante lugar clínico que posee la biopsia tisular convencional, la cual no se podría sustituir debido a la enorme cantidad de información que proporciona, con una elevada sensibilidad y especificidad; además, de ser un procedimiento sumamente estandarizado y acreditado del que se conoce a la perfección el rendimiento que se puede esperar, contrario a lo que de momento se tiene en la biopsia líquida.

Bibliografía

- American Cancer Society. (2021). Cancer Facts and Statistics. Retrieved September 27, 2020, from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics.html>
- Alba-Bernal, A., Lavado-Valenzuela, R., Domínguez-Recio, M. E., Jiménez-Rodríguez, B., Queipo-Ortuño, M. I., Alba, E., & Comino-Méndez, I. (2020, December 1). Challenges and achievements of liquid biopsy technologies employed in early breast cancer. *EBioMedicine*, Vol. 62. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103100>
- Allison, K. H., & Sledge, G. W. (2014). Heterogeneity and Cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 28(9).
- Arechederra, M., Ávila, M. A., & Berasain, C. (2020). La biopsia líquida en el manejo del cáncer: una nueva herramienta revolucionaria de la medicina de precisión, aún con limitaciones. *Advances in Laboratory Medicine / Avances En Medicina de Laboratorio*, 1(3). <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0038>
- Balic, M., Williams, A., Lin, H., Datar, R., & Cote, R. J. (2013). Circulating tumor cells: From bench to bedside. *Annual Review of Medicine*, 64, 31–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050311-163404>
- Bolli, N., Biancon, G., Moarii, M., Gimondi, S., Li, Y., de Philippis, C., ... Munshi, N. C. (2018). Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia*, 32(12), 2604–2616. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0037-9>
- Burrell, R. a, McGranahan, N., Bartek, J., & Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501(7467), 338–345. <https://doi.org/10.1038/nature12625>
- Cheng, M. L., Pectasides, E., Hanna, G. J., Parsons, H. A., Choudhury, A. D., & Oxnard, G. R. (2021). Circulating tumor DNA in advanced solid tumors: Clinical relevance and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(2), 176–190. <https://doi.org/10.3322/caac.21650>
- Cirillo, M., Craig, A. F. M., Borchmann, S., & Kurtz, D. M. (2020). Liquid biopsy in lymphoma: Molecular methods and clinical applications. *Cancer Treatment Reviews*, 91(July), 102106. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102106>
- Crombie, J., & Armand, P. (2019). The Emerging Role of Liquid Biopsies in Lymphoproliferative Disorders. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 14(1), 11–

21. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-0493-y>

- Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., & Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(8), 472–484. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.110>
- De Luca, L., Laurenzana, I., Trino, S., Lamorte, D., Caivano, A., & Musto, P. (2019, March 4). An update on extracellular vesicles in multiple myeloma: a focus on their role in cell-to-cell cross-talk and as potential liquid biopsy biomarkers. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, Vol. 19, pp. 249–258. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1583103>
- Diamantis, A., Magiorkinis, E., & Koutselini, H. (2018). *Fine-needle aspiration (FNA) biopsy : historical aspects*. (December 2009). <https://doi.org/10.5603/4351>
- Dunleavy, K. (2018). *Liquid biopsy for Hodgkin: a game changer?* <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-840819>
- Fernandes Marques, J., Pereira Reis, J., Fernandes, G., Hespanhol, V., Machado, J. C., & Costa, J. L. (2019). Circulating Tumor DNA: A Step into the Future of Cancer Management. *Acta Cytologica*, 63(6), 456–465. <https://doi.org/10.1159/000492917>
- Fernández-Lázaro, D., Hernández, J. L. G., García, A. C., del Castillo, A. C., Hueso, M. V., & Cruz-Hernández, J. J. (2020, July 1). Clinical perspective and translational oncology of liquid biopsy. *Diagnostics*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10070443>
- Ferreira, B., Caetano, J., Barahona, F., Lopes, R., Carneiro, E., Costa-Silva, B., & João, C. (2020, April 1). Liquid biopsies for multiple myeloma in a time of precision medicine. *Journal of Molecular Medicine*, Vol. 98, pp. 513–525. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01897-9>
- Flach, J., Shumilov, E., Joncourt, R., Porret, N., Novak, U., Pabst, T., & Bacher, U. (2020, July 1). Current concepts and future directions for hemato-oncologic diagnostics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol. 151. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.102977>
- Fu, Y., Zhang, Y., & Khoo, B. L. (2021, January 1). Liquid biopsy technologies for hematological diseases. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 41, pp. 246–274. <https://doi.org/10.1002/med.21731>

- Genovese, G., Kähler, A. K., Handsaker, R. E., Lindberg, J., Rose, S. A., Bakhoum, S. F., ... Mccarroll, S. A. (2014). *Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405>
- George, J. N. (2000). Platelets. *The Lancet*, 355, 1531–1539.
- Goldkorn, A., Ely, B., Quinn, D. I., Tangen, C. M., Fink, L. M., Xu, T., ... Vogelzang, N. J. (2014). Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: A phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 32(11), 1136–1142. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.51.7417>
- Gupta, N., Sharma, A., & Sharma, A. (2020, April 1). Emerging biomarkers in Multiple Myeloma: A review. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 503, pp. 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.12.026>
- Helvaci, K., Eraslan, E., Yildiz, F., Tufan, G., Demirci, U., Oksuzoglu, O. B., & Arslan, U. Y. (2019). Comparison of clinicopathological and survival features of right and left colon cancers. *JBUON*, 24(5), 1845–1851.
- Hofman, P. (2020, May 1). Liquid biopsy for lung cancer screening: Usefulness of circulating tumor cells and other circulating blood biomarkers. *Cancer Cytopathology*, Vol. 129. <https://doi.org/10.1002/cncy.22367>
- Hohaus, S., Giachelia, M., Massini, G., Mansueto, G., Vannata, B., Bozzoli, V., ... Leone, G. (2009). Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Annals of Oncology*, 20(8), 1408–1413. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp006>
- Huang, J. J., Yu, J., Li, J. Y., Liu, Y. T., & Zhong, R. Q. (2012). Circulating microRNA expression is associated with genetic subtype and survival of multiple myeloma. *Medical Oncology*, 29(4), 2402–2408. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0210-3>
- Izzotti, A., Carozzo, S., Pulliero, A., Zhabayeva, D., Ravetti, J. L., & Bersimbaev, R. (2016). Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: Applicability in cancer diagnosis and prevention. *American Journal of Cancer Research*, 6(7), 1461–1493.
- Johann, D. J., Steliga, M., Shin, I. J., Yoon, D., Arnaoutakis, K., Hutchins, L., ... Xu, J. (2018). Liquid biopsy and its role in an advanced clinical trial for lung cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 262–271. <https://doi.org/10.1177/1535370217750087>

- Joosse, S. A., Gorges, T. M., & Pantel, K. (2015). Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Molecular Medicine*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.15252/emmm.201303698>
- Junqueira-Neto, S., Batista, I. A., Costa, J. L., & Melo, S. A. (2019). Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta Cytologica*, 63(6), 479–488. <https://doi.org/10.1159/000493969>
- Kolenčik, D., Shishido, S. N., Pitule, P., Mason, J., Hicks, J., & Kuhn, P. (2020). Liquid biopsy in colorectal carcinoma: Clinical applications and challenges. *Cancers*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061376>
- Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K., ... Harris, A. L. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, 141(5), 672–675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x>
- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M., & Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Research*, 37(3), 646–650.
- Leslie, M. (2010). Beyond clotting: The powers of platelets. *Science*, 328(5978), 562–564. <https://doi.org/10.1126/science.328.5978.562>
- Logothetis, C. J. (2013). Re: Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *European Urology*, 64(1), 170. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.04.025>
- Malik, A., Srinivasan, S., & Batra, J. (2019, November 26). A New Era of Prostate Cancer Precision Medicine. *Frontiers in Oncology*, Vol. 9, p. 1263. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01263>
- Masuda, T., Hayashi, N., Iguchi, T., Ito, S., Eguchi, H., & Mimori, K. (2016). Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer. *Molecular Oncology*, 10(3), 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.010>
- Millner, L. M., Linder, M. W., & Valdes, R. (2013). Circulating tumor cells: A review of present methods and the need to identify heterogeneous phenotypes. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 43(3), 295–304.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., ... Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-

based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513–10518.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>

- Morelli, M. P., Overman, M. J., Dasari, A., Kazmi, S. M. A., Mazard, T., Vilar, E., ... Kopetz, S. (2015). Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Annals of Oncology*, 26(4), 731–736. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv005>
- Neuhaus, J., & Yang, B. (2018). Liquid Biopsy Potential Biomarkers in Prostate Cancer. *Diagnostics*, 8(4), 68. <https://doi.org/10.3390/diagnostics8040068>
- Ou, S.-H. I., Nagasaka, M., & Zhu, V. W. (2018). Liquid Biopsy to Identify Actionable Genomic Alterations. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38(38), 978–997. https://doi.org/10.1200/edbk_199765
- Ozawa, P. M. M., Jucoski, T. S., Vieira, E., Carvalho, T. M., Malheiros, D., & Ribeiro, E. M. de S. F. (2020, September 1). Liquid biopsy for breast cancer using extracellular vesicles and cell-free microRNAs as biomarkers. *Translational Research*, Vol. 223, pp. 40–60. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.002>
- Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2019). Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(7), 409–424. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0187-3>
- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1(November 2015).
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Perdomo, S., Montealegre-Páez, L., Pacheco-Orozco, R., Martínez-Gregorio, H., Vaca-Paniagua, F., Ardila, J., ... Carreño, D. (2020). La biopsia líquida en el diagnóstico y monitoreo de pacientes oncológicos: oportunidades y retos en Latinoamérica. *Revista Colombiana de Cancerología*, 24(4), 164–177. <https://doi.org/10.35509/01239015.44>
- Rajagopal, C., & Harikumar, K. B. (2018). The origin and functions of exosomes in cancer. *Frontiers in Oncology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00066>
- Remon, J., García-Campelo, R., de Álava, E., Vera, R., Rodríguez-Peralto, J. L., Rodríguez-Lescure, ... Álvarez-Alegret, R. (2020). Liquid biopsy in oncology: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clinical and Translational Oncology*, 22(6), 823–834.

<https://doi.org/10.1007/s12094-019-02211-x>

- Rolfo, C., Cardona, A. F., Cristofanilli, M., Paz-Ares, L., Diaz Mochon, J. J., Duran, I., ... Serrano, M. J. (2020, July 1). Challenges and opportunities of cfDNA analysis implementation in clinical practice: Perspective of the International Society of Liquid Biopsy (ISLB). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol. 151. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.102978>
- Russano, M., Napolitano, A., Ribelli, G., Iuliani, M., Simonetti, S., Citarella, F., ... Santini, D. (2020). Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors: the potentiality of blood samples. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 27;39(1):9. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01601-2>
- Sánchez-Herrero, E., Provencio, M., & Romero, A. (2020). Utilidad clínica de la biopsia líquida para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con CPNM y EML4-ALK. *Advances in Laboratory Medicine / Avances En Medicina de Laboratorio*, 1(1). <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0007>
- Scarlotta, M., Simsek, C., & Kim, A. K. (2019). Liquid Biopsy in Solid Malignancy. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 23(4), 284–296. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2018.0237>
- Scherer, F., Kurtz, D. M., Newman, A. M., Stehr, H., Craig, A. F. M., Shahrokh Esfahani, M., ... Alizadeh, A. A. (2016). Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*, 8(364)(364ra155). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai8545>
- Schiavon, G., Hrebien, S., Garcia-Murillas, I., Cutts, R. J., Pearson, A., Tarazona, N., ... Turner, N. C. (2015). Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer HHS Public Access. *Sci Transl Med*, 7(313), 313–182. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac7551>
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426–437. <https://doi.org/10.1038/nrc3066>
- Schwarzenbach, H., Stoecklacher, J., Pantel, K., & Goekkurt, E. (2008). Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137, 190–196.

<https://doi.org/10.1196/annals.1448.025>

Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(9), 531–548.

<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>

Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., ... Lyden, D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*, 24(6), 766–769. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>

Zainfeld, D., & Goldkorn, A. (2018). Liquid biopsy in prostate cancer: Circulating tumor cells and beyond. In *Cancer Treatment and Research* (Vol. 175, pp. 87–104).

https://doi.org/10.1007/978-3-319-93339-9_4

World Health Organization (WHO). (2021). *Cancer Fact Sheets*. International Agency for Research on Cancer. Retrieved June 13, 2021, from: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>