

BIOPSIA LIQUIDA

Mariángeles Díaz, Elisa D. Bal de Kier Joffe, Stella Maris Ranuncolo
Departamento de Biología Celular. Área Investigación. Instituto de
Oncología “Ángel H. Roffo”. Facultad de Medicina. UBA.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CONICET).

Consideraciones generales

La biopsia líquida es un estudio/análisis desarrollado a partir de un descubrimiento muy antiguo. Está constituida por células tumorales circulantes (CTCs), ácidos nucleicos (ADN y distintos tipos de ARNs, proteínas y vesículas extracelulares (VECs) obtenidas a partir de distintos fluidos biológicos, siendo la sangre la principal fuente para el estudio en los diferentes tipos de tumores. Uno de sus objetivos es caracterizar cuantitativa y cualitativamente el genoma tumoral a través de una herramienta mínimamente invasiva para el paciente, que permita no solo el diagnóstico, sino también valorar el pronóstico, monitorear la evolución de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos. Sería posible además su aplicación para el *screening* de una enfermedad particular en una población de riesgo (Resumen gráfico).

En el resumen gráfico se detallan los elementos que eventualmente podrían ser aislados tanto a partir de fluidos circulantes (sangre completa, plasma, suero, linfa) como de fluidos extracelulares no circulantes (orina, heces, líquido cefalorraquídeo, saliva, leche materna, líquido amniótico, bilis, mucus) y líquidos acumulados en distintas

condiciones patológicas (ascitis). En la tabla 1 se enumeran algunos ejemplos de estudios realizados en material circulante en distintos tumores.

A continuación, describiremos las características generales de estos elementos comenzando por las CTCs y el ADN circulante libre ya que han sido aprobados por la Food & Drug Administration (FDA) para ciertas aplicaciones clínicas. Luego haremos referencia a otros factores también susceptibles de ser aislados.

Células TumORAles Circulantes (CTCs)

La primera descripción de células tumorales circulantes data de 1869 cuando un médico australiano publicó la observación de ciertas células en la sangre de un paciente fallecido por un tumor maligno, con características que recordaban histológicamente a las células del tumor. El número de CTCs en la circulación sanguínea es extremadamente baja; se calcula que solo $1/10^9$ células circulantes correspondería a una célula tumoral, en un paciente con un tumor maligno metastatizado. Un aspecto importante a tener en cuenta es el hecho de que el conjunto de CTCs no representa una población celular homogénea aún derivando del mismo tumor. En un paciente con un carcinoma, algunas CTCs exhiben un fenotipo epitelial definido que coexisten con subpoblaciones con características de transición epiteilo-mesenquimática y viceversa. Durante estas transiciones de estirpe los marcadores expresados se verán modificados. Pese a lo referido, la evaluación de las CTCs provee una medida de la heterogeneidad tumoral (Tabla 2), ofreciendo una amplia gama de información que abarca desde el número de CTCs hasta el análisis del perfil genómico, del transcriptoma y del proteoma.

Además de su potencial como herramienta de diagnóstico, pronóstico y monitoreo de la respuesta a las terapias, se ha empleado para evaluar el riesgo de recaída, la selección de tratamientos, la identificación de nuevos blancos moleculares terapéuticos, la detección de mutaciones *drivers* y la comprensión de las bases moleculares de la diseminación metastásica. Incluso, el cultivo de las CTCs aisladas de un paciente, permitiría evaluar la sensibilidad a drogas.

Diversos métodos, basados en las distintas propiedades físicas y moleculares de las CTCs han sido desarrollados para su aislamiento. Entre los ensayos inmunomagnéticos basados en el aislamiento positivo de CTCs, el *CellSearch* desarrollado por *Janssen Diagnostics*, es el único hasta el momento aprobado por la FDA para su utilización clínica en pacientes con carcinoma de mama, de próstata y de colon metastatizado. Las pacientes con carcinoma de mama metastatizado que presentaron menos de 5 CTCs/7.5 ml de sangre tuvieron mejor pronóstico. Este método de aislamiento de CTCs se basa en la expresión en membrana de superficie del antígeno anti-EpCAM (Molécula de Adhesión Epitelial). Por otra parte, la vimentina, considerada un marcador de linaje mesenquimático, puede usarse como un marcador universal para la identificación de CTCs derivadas de sarcomas metastatizados utilizando un anticuerpo monoclonal específico para el reconocimiento de la vimentina unida a la superficie de las células de sarcoma y no a la vimentina expresada por otras células de estirpe mesenquimática como los macrófagos, las células endoteliales, los neutrófilos, las plaquetas o los linfocitos T.

Las limitaciones en los usos clínicos de las CTCs son fundamentalmente consecuencia de su bajo número en circulación sanguínea que complica su aislamiento, su fragilidad y la heterogeneidad fenotípica de estas células. Las técnicas de secuenciación en masa han adquirido una importancia relevante en la evaluación genómica y transcriptómica de célula única (*Single Cell*). Aunque aún se encuentra en una etapa prematura de desarrollo, el análisis proteómico de célula única actualmente exhibe adelantos prometedores.

ADN circulante (cADN)

El ADN extracelular comprende el ADN nuclear y el mitocondrial que pueden aislarse a partir de distintos fluidos circulantes y no circulantes, como se mencionó previamente en el apartado correspondiente a las consideraciones generales. El ADN tumoral circulante libre de células (ctADN), que se considera no procedente de las CTCs, consta de cortos fragmentos doble cadena de menos de 200 pb de longitud. La vida media de los mismos es muy reducida (aprox 2.5 h), sugiriendo eventos de renovación constante. Todos tenemos ADN circulante (cADN) en condiciones fisiológicas, proveniente de tejidos con una alta tasa de renovación (médula ósea, intestino, el feto en el caso de las mujeres embarazadas). En individuos sanos la concentración media de cADN oscila entre 2-5 ng/ml, incrementándose en pacientes con patologías inflamatorias crónicas y la misma aumenta aún más en individuos con cáncer ubicándose en el rango de 10-1000 ng/ml. El ctADN presenta diferencias biofísicas y bioquímicas respecto del cADN procedente de células no malignas, entre las que se puede observar la mayor

inestabilidad de los fragmentos cortos de ADN y la diferente concentración de bases GC. Las células tumorales mueren tanto por apoptosis o por cualquier otro mecanismo de fragmentación del ADN que eyecta el ADN a la circulación sanguínea. El cADN puede también originarse por oncosis, fagocitosis o secreción activa. Este último refiere a un curioso proceso mediante el cual las células eucariotas liberan a la circulación complejos ADN/ARN/lipoproteínas citosólicas, denominados *virtosomas*. Estos complejos una vez liberados y captados por otra célula pueden llegar a P{Pinducir su transformación, si el mismo se originó a partir de una célula cancerosa.

La utilidad del ctADN como biomarcador quedó demostrada con la identificación de la mutación del gen KRAS en el ctADN aislado a partir de muestras de sangre de pacientes con carcinoma pancreático. El análisis del ctADN proporciona información cuantitativa (la detección de la enfermedad residual mínima, metástasis ocultas, monitoreo de la respuesta al tratamiento) y cualitativa (análisis del perfil de mutaciones, metilación) con significado clínico. Mencionamos como ejemplo el primer test basado en el ctADN aprobado recientemente por la FDA, Covas® EGFR Mutation Test V2 (*ROCHE Diagnostics*), empleado como guía en el uso del inhibidor de la actividad enzimática de tirosina-quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en pacientes con carcinoma de pulmón a células no pequeñas (NSCLC). Existe un test de *screening* para carcinoma colorectal (CRC) (EpiProColon®), aprobado también por la FDA, que analiza el patrón de metilación del promotor del gen SEPT29, región que se encuentra hipermetilada en pacientes con CRC.

Existen distintos métodos para el estudio del ctADN basados en PCR, como por ejemplo la PCR-Digital que permitiría el hallazgo de mutaciones ya reportadas, y las técnicas de secuenciación masiva o secuenciación profunda para la descripción de nuevas alteraciones. La PCR alelo específica puede ser considerada como la primera aproximación utilizada en el análisis del cADN y más recientemente, una variante de la misma con fines cuantitativos fue empleada por el Covas® EGFR Mutation Test V2. Otras técnicas de PCR han sido desarrolladas como consecuencia del bajo porcentaje que el ctADN representa respecto de la concentración total de cADN (PCR-Digital), droplet-digital PCR, BEAMing (Beads, Emulsion, Amplificación Magnetics).

Pese al enorme potencial, el análisis del ctADN tiene sus limitaciones. Una de ellas es la sensibilidad del test empleado, en particular en estadios tempranos del tumor, como consecuencia de la reducida concentración del ctADN. Es imprescindible la estandarización de los protocolos utilizados en el aislamiento del ADN y en su purificación. Es posible que los protocolos actualmente empleados puedan ocasionar la degradación del cADN y pueda inducir la lisis de células de la sangre.

Otro material en circulación

Vesículas Extracelulares

Las vesículas extracelulares (VECs) son partículas de membrana única originadas a partir de los diversos tipos celulares tanto en condiciones

fisiológicas como patológicas, incluyendo el cáncer. Por motivos aún no establecidos, las células que han adquirido un fenotipo maligno producen mayor número de VECs. Pueden encontrarse en matrices extracelulares, en circulación sanguínea y en todo fluido biológico circulante o no-circulante. Actualmente se considera a las VECs una nueva forma de comunicación intercelular. No existe consenso sobre su clasificación, pero sucintamente, haremos referencia a los dos tipos principales de VECs: las microvesículas (MVs) y los exosomas. Ambas se diferencian en su biogénesis y en su tamaño. Las MVs (100-1000 nm de diámetro) se originan por evaginación de la membrana plasmática. Los exosomas (30-100 nm de diámetro) surgen a partir de la invaginación de la membrana del endosoma secundaria hacia su lumen, dando origen a las denominadas vesículas intraluminales (VILs) resultando en un compartimiento celular especializado denominado cuerpo multivesicular. Posteriormente éste se fusionará con la membrana celular y liberará su contenido de VILs como exosomas. Los exosomas contienen proteínas, lípidos bioactivos, ADN, ARNs pequeños no-codificantes (sncARNs) y ARNs largos no codificantes (lncARNs). El contenido molecular de las VECs las posiciona como elementos apropiados para la identificación de la célula de origen.

Una de las ventajas del aislamiento de las VECs, respecto de las CTCs y del ctADN, es su número elevado circulante y a la mayor estabilidad de su carga debido a que se encuentra protegida por una bicapa lipídica. El número de exosomas circulantes se reportó elevado en pacientes con cáncer de mama y con carcinoma pancreático. Un incremento en VECs circulantes CD138+ se describió en mieloma múltiple mostrando

capacidad de predecir recaída y respuesta a la terapia. Finalmente, un incremento en VECs circulantes demostró valor diagnóstico y pronóstico en pacientes con NSCLC avanzado. El contenido exosomal de ADN genómico y de distintos tipos de ARNs, incluyendo los ARNm y los sncARNs especialmente los microARNs, ha sido muy estudiado. En particular, el análisis del contenido exosomal de ADN genómico ha cobrado relevancia como fuente de biomarcadores cuando se detectaron mutaciones en KRAS y p53 en exosomas aislados a partir del suero de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). En otro estudio la determinación de mutaciones de KRAS en el ADN genómico de exosomas mostró una eficiencia mayor respecto de la determinación de los niveles de CA 19-9 en la estratificación y en el pronóstico de pacientes con PDAC. El contenido proteico de las VECs también ha demostrado utilidad como biomarcador tumoral. En este sentido se identificó a la molécula glipican-1 en exosomas de pacientes con PDAC, mientras no se identificó en ninguno de los individuos del grupo de controles sanos. De modo similar se determinó del-1 y fibronectina (FN) en las VECs de pacientes con cáncer de mama temprano. Finalmente, VECs positivas para el receptor de las asialoglicoproteínas-1 resultaron de utilidad en el diagnóstico de hepatocarcinoma y colangiocarcinoma y los niveles de VECs positivas para EpCAM y CD147 tuvieron valor predictivo en pacientes con CRC.

Uno de los grandes desafíos para lograr la implementación del análisis del contenido de las VECs en la clínica se centra especialmente en la necesidad de alcanzar la estandarización de protocolos para la obtención de muestras, el aislamiento de las vesículas y el análisis de

su contenido molecular. Asimismo, es aún un requerimiento el logro de consenso en la nomenclatura y la definición de cada una de las estructuras membranosas circulantes consideradas como VECs, pese a que para esto último se dispone de las guías publicadas por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, su sigla en inglés).

ARN circulante (cARN)

La fracción de ARN circulante (cARN) libre de células proveniente de células tumorales se designa como ctARN y el conocimiento de su existencia data de 1978. En comparación con el cADN, el cARN es más inestable (vida media 15 segundos), y su estabilidad aumenta cuando se asocia a proteínas o complejos lipoproteicos. Prácticamente los diferentes tipos de ARN caracterizados hasta la fecha y hallados en circulación han demostrado un rol potencial como biomarcadores en oncología. El perfil de expresión de ARN representa la información más relevante, así como también, la identificación de fusiones de transcriptos específicas de tumor y la descripción de variantes del *splicing* o procesamiento de las moléculas precursoras. Los ARNm, los microARN y los lncARN constituyen los tipos de ARN con mayor potencial como posibles marcadores. El estudio de los mismos requiere la aplicación de técnicas de PCR y secuenciación del transcriptoma (ARN-Seq). El ARNm aislado de exosomas circulantes ha sido utilizado para el análisis del estado mutacional de BRAF y de KRAS en pacientes con CRC. De forma similar el estudio del ARNm del EGFRVIII exosomal ha demostrado ser de utilidad en el diagnóstico de gliomas de alto grado.

Por su parte la detección de la variante 7 del receptor androgénico, producto del *splicing* alternativo del ARNm precursor, en exosomas aislados del plasma de pacientes con carcinoma de próstata, demostró ser de utilidad en la detección de resistencia a la terapia hormonal. La determinación del mensajero de la subunidad catalítica de la telomerasa, en la fracción de ctARN, mostró un valor diagnóstico y pronóstico superior al antígeno prostático específico (PSA) en pacientes con carcinomas de próstata. La determinación de los microARN -196a y -1246 en exosomas plasmáticos mostraron utilidad para el diagnóstico temprano de carcinoma pancreático.

En los últimos años la detección de lncARN ha cobrado importancia como marcadores tumorales. La determinación de los niveles del lncARN LINC00152 en exosomas circulantes aislados de plasma han sido asociados a carcinoma gástrico. Más recientemente se ha estudiado un panel de cinco lncARN circulantes con resultados promisorios para el diagnóstico de este carcinoma. La determinación del lncARN HOTAIR en exosomas aislados del suero mostró utilidad en el diagnóstico y pronóstico de glioblastoma multiforme.

Algunas de las limitaciones a la implementación de la determinación de ctARN en la clínica están vinculados con protocolos de extracción de este tipo de ácido nucleico y su estabilidad.

Plaquetas “educadas” por el tumor (PETs)

Conocemos el rol de las plaquetas en la coagulación y en la cicatrización de heridas, pero más recientemente su papel destacado en cáncer ha sido exhaustivamente examinado, denominándolas

plaquetas “educadas por el tumor” (TEP por su sigla en inglés Tumor Educated Platelets). En el siglo XIX se han hecho dos observaciones que, a la luz de estos nuevos conocimientos sobre plaquetas y cáncer, merecen ser recordadas. La primera de ellas fue realizada por Trousseau en 1868 al hacer referencia al hecho de que la coagulación espontánea es un evento común en pacientes oncológicos, insinuando que las plaquetas circulantes son afectadas por el tumor maligno. La segunda de ellas data de 1887 y fue realizada por Billroth al describir el hallazgo de “trombos llenos de elementos tumorales específicos” en los sitios de metástasis, señalando una interacción directa entre plaquetas y células tumorales. La evolución tecnológica de los últimos años ha dilucidado las complejas interacciones entre megacariocitos-plaquetas-cáncer que condujo a la instauración del concepto previamente referido. La educación de las plaquetas por el tumor hace referencia a la existencia de “firmas de ARN específicas” en las plaquetas de pacientes oncológicos. El primer reporte tiene aproximadamente una década cuando, en pacientes con cáncer de pulmón metastatizado, se observó que 197 genes plaquetarios estaban reprimidos y un número considerable de precursores de ARNm eran objeto de un procesamiento diferente en comparación con el grupo control (recordemos que las plaquetas o trombocitos derivan de la fragmentación citoplasmática del megacariocito y carecen de núcleo). Estudios de *arrays* de expresión evidenciaron en plaquetas un perfil de ARNs correspondiente a células tumorales: las moléculas de ARN contenidas en microvesículas, generadas por células de glioma, eran transferidas a las plaquetas. Posteriormente el análisis de TEP, obtenidas de una cohorte de pacientes con seis tipos diferentes de tumores malignos, permitió

mediante análisis de ARN-Seq distinguir entre individuos con tumores localizados, tumores metastatizados e individuos no portadores de tumores malignos. Aún más, permitió identificar con una eficacia del 71%, la localización anatómica del tumor maligno.

Comentarios finales

La ventaja de la biopsia líquida es que es un procedimiento poco invasivo para el paciente y es posible realizarlo en distintas etapas comenzando con el diagnóstico de la enfermedad primaria, pudiéndose repetir con cierta frecuencia, abarcando las instancias posteriores al diagnóstico inicial. En la actualidad, la biopsia tisular es una parte importante de los procedimientos estándar, para la estadificación del tumor maligno y la toma de decisiones terapéuticas. Así es como se realiza el análisis de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica y algunos estudios génicos a partir de ADN aislado del tejido embebido en parafina. Por otro lado, la biopsia líquida, con todos los elementos que integran el *circuloma tumoral* (ctADN, ctARN, CTCs, VECs y TEPS), se considera más representativa de la heterogeneidad del tumor en estudio.

La biopsia líquida no constituye aún en la actualidad una herramienta aplicada rutinariamente, debido en parte a la necesidad de alcanzar la estandarización de los protocolos empleados en el aislamiento de cada uno de los componentes del circuloma tumoral y los métodos empleados en el análisis de cada uno de ellos. El desarrollo tecnológico está haciendo posible la caracterización de cada uno de los integrantes del circuloma con mayor precisión. Resta aún trabajo por realizar con el propósito de lograr una relación costo-beneficio favorable, rapidez,

facilidad de realización y reproducibilidad para lograr el ingreso de la biopsia líquida al escenario clínico de forma rutinaria.

Bibliografía recomendada

Antunes-Ferreira M, Koppers-Lalic D, Würdinger T. Circulating platelets as liquid biopsy sources for cancer detection. 2020; 15(6):1727-1743 falta nombre publicacion.

Bradley SH, Barclay ME. Liquid biopsy for cancer screening. BMJ. 2021; 4:372:m4933.

De Rubis G, Krishnan SR, Mary Bebawy. Liquid biopsies in cancer diagnosis, monitoring and prognosis. Trends in Pharmacological Sciences. Cell. 2019; 40 (3): 172-186.

Heidrich I, Ackar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. Int J Cancer. 2021; 1:148 (3):528-545.

Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic – implementation issues and future challenges. Nat Rev Clin Oncol. 2021; 18 (5): 297-312.

Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T et al. Life and death of circulating cell-free DNA. Cancer Biol Ther. 2019; 20 (8):1057-1067.}

Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid biopsy: general concenepts. Acta Cytol. 2019; 63 (6): 449-45.

Schaffner F, Merlin J-L, von Bubnoff N. Tumor liquid biopsies. Recent Results in Canc Res. Springer. 2020; 1-365.

Sjors GJG, Veld I, Wurdinger T. Tumor-educated platelets. Blood. 2019; 133:22, 2359-2364.

Théry C, Witwer KW, Aikawa E et al. Minimal information for studies of extra-cellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the

International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J. Extracell. Vesicles. 2018; 7(1).

Conflicto de Intereses

Los autores declaran ausencia de conflictos de interés.