



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Biopsia Líquida en el Diagnóstico del Càncer

Jaime Ribes Salvà

**Grau de Bioquímica**

Any acadèmic 2016-17

Treball tutelat per Dra. Maria del Pilar Roca Salom  
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut.

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Biopsia líquida, Biomarcador, Células circulantes tumorales, Exosomas, MicroRNAs y Células tumorales diseminadas.



## **ABSTRACT**

Nowadays, cancer is one of the death causes with greater incidence on the population. Commonly, for the investigation and monitoring of cancer the most used method is the tissue biopsy, a very invasive method for the patient. Thanks to the development of new technologies to avoid invasive processes, the concept of “liquid biopsy” has born, thereby It’s possible to obtain information of the cancer through physiological fluids. In this paper we developed the different uses of liquid biopsy, the cancer biomarkers which this novel method allows us to analyze (such as circulating tumor cells or circulating tumor DNA), as well as It’s role in future advances in cancer research and improvement of therapies for the patient.

# Índice

<b>1-Introducción .....</b>	<b>4</b>
<b>2-Objetivo .....</b>	<b>5</b>
<b>3-Métodos y técnicas .....</b>	<b>5</b>
<b>4-Principales marcadores en la biopsia líquida .....</b>	<b>8</b>
<b>4.1-Células circulantes tumorales (CTCs).....</b>	<b>9</b>
<b>4.1.1-Biología de las CTCs.....</b>	<b>9</b>
<b>4.1.2-CTCs y estadios del cáncer.....</b>	<b>9</b>
<b>4.1.3-Aislamiento, detección y análisis de CTCs .....</b>	<b>10</b>
<b>4.1.4-Dianas terapéuticas y CTCs.....</b>	<b>11</b>
<b>4.1.5-Monitorización a tiempo real con CTCs.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2- DNA circulante tumoral (ctDNA) .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2.1-Origen del ctDNA .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2.2-Técnicas de análisis del ctDNA.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2.3-Aplicaciones del ctDNA en el cáncer .....</b>	<b>17</b>
<b>4.3-Exosomas.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3.1-Biología de los exosomas .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3.2-Exosomas en el diagnóstico del cáncer .....</b>	<b>21</b>
<b>4.3.3-Aislamiento, detección y análisis de exosomas .....</b>	<b>23</b>
<b>4.4-MicroRNAs circulantes .....</b>	<b>24</b>
<b>4.5-Células tumorales diseminadas (DTCs).....</b>	<b>25</b>
<b>5-Conclusión .....</b>	<b>26</b>
<b>6-Referencias bibliográficas .....</b>	<b>27</b>

## 1-Introducción

El cáncer es una de las causas de muerte con mayor incidencia sobre la población en estos tiempos. Esta enfermedad consiste en divisiones anormales y descontroladas de células endógenas del organismo producidas por una serie de mutaciones del DNA que permiten la proliferación y crecimiento celular independientemente de las señales que pueda recibir esta célula. Las masas tumorales en crecimiento pueden llegar a invadir tejidos adyacentes e incluso colonizar tejidos distantes de donde se ha originado el tumor primario (metástasis). Los tumores están formados por varias subpoblaciones celulares con distinta expresión genética y por tanto cada subpoblación presenta distintas características<sup>1</sup>.

Actualmente, la mayoría de protocolos para el diagnóstico del cáncer en pacientes está basado en biopsias las cuales mayormente nos proporcionan información del tumor primario del que se ha obtenido la muestra, pasando por alto así otras subpoblaciones celulares cancerosas y sin aportar mucha información de células metastásicas ya que pueden tener unas características genómicas muy diferentes a las del tumor primario. De este modo, una biopsia tradicional puede llevar a un diagnóstico ineficaz y por tanto a decisiones incorrectas en la monitorización del cáncer y de la elección de sus dianas terapéuticas. Además, ciertos tipos de cáncer como el de pulmón, a la hora de hacer la biopsia, pueden conllevar un riesgo para el paciente debido a su localización<sup>2</sup>.

Todas estas limitaciones han desembocado en la búsqueda de nuevas metodologías de diagnóstico y monitorización más certeras y que proporcionen más información del cáncer. De esta manera sale a la luz el concepto de biopsia líquida, que consiste en la identificación y análisis de marcadores como las células tumorales circulantes (CTCs), los ácidos nucleicos libres y otros tipos de biomarcadores, que podemos encontrar en los distintos fluidos corporales, provenientes del tumor primario y/o de tumores frutos de la metástasis. Así, este método no invasivo nos permite un estudio del cáncer del paciente con una mayor facilidad de obtención y de cantidad de muestra<sup>3</sup>.

Los biomarcadores son marcadores biológicos que pueden ser objetivamente medidos y evaluados como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica<sup>4</sup>.

En 1869 el médico australiano T.R. Ashworth encontró, durante una autopsia, células con características muy parecidas a las cancerosas en la sangre de un cadáver cercana a tumores subcutáneos, 3 años después del que Johannes Müller definiera que los tumores están formados por células<sup>2</sup>. A pesar de esto no es hasta 2004 que se acuña el término de biopsia líquida, debido a que la tecnología necesaria para poder separar, detectar, enriquecer y estudiar las CTCs, ácidos nucleicos tumorales circulantes u otro tipo de biomarcador tumoral se ha desarrollado durante estos últimos años permitiéndonos así un gran avance en la capacidad de identificación y análisis de los marcadores que nos puede proporcionar la biopsia líquida<sup>5</sup>.

Hoy en día ya se utilizan marcadores tumorales proteicos presentes en la sangre periférica como el PSA, en cáncer de próstata, el CA 19-9 y el antígeno carcinoembrionario, en cáncer de colon o de páncreas principalmente, y el CA 125, marcador muy poco específico, que son de importancia a la hora del diagnóstico y de asignar un tipo de tratamiento u otro en pacientes con cáncer. A pesar de esto, la mayoría tumores no posee marcadores o son poco específicos. La ventaja del estudio de CTCs, ácidos nucleicos tumorales circulantes u otros

biomarcadores obtenidos mediante una biopsia líquida sobre los marcadores proteicos tumorales, es el seguimiento de la dinámica tumoral, y por tanto de su evolución en el paciente en respuesta a una terapia o a cirugía curativa, y en un diagnóstico más preciso del tipo de cáncer, intentando que sea lo más temprano posible<sup>6</sup>.

Aunque todavía todos estos métodos se encuentran en fase experimental y no en utilización clínica, la gran mayoría de investigaciones apuntan que en un futuro no muy lejano mediante la biopsia líquida se podrá obtener un perfil genómico personalizado de cada paciente que nos permitiría descubrir distintos factores a tener en cuenta del cáncer. Nos proporcionará información de la agresividad del tumor, su desarrollo frente a un tratamiento determinado, los tejidos más sensibles a la metástasis, los niveles de enfermedad mínima residual después de la terapia o de cirugía curativa y a la elaboración de patrones más concretos de diagnóstico.

## **2-Objetivo**

El objetivo de este trabajo es la elaboración de una búsqueda bibliográfica adecuada referente al concepto de biopsia líquida en el diagnóstico del cáncer, mediante la utilización de bases de datos científicas y fuentes de información fiables. Así como la recopilación y análisis de los artículos seleccionados para poder plasmar aquí toda esa información de manera coherente y estructurada.

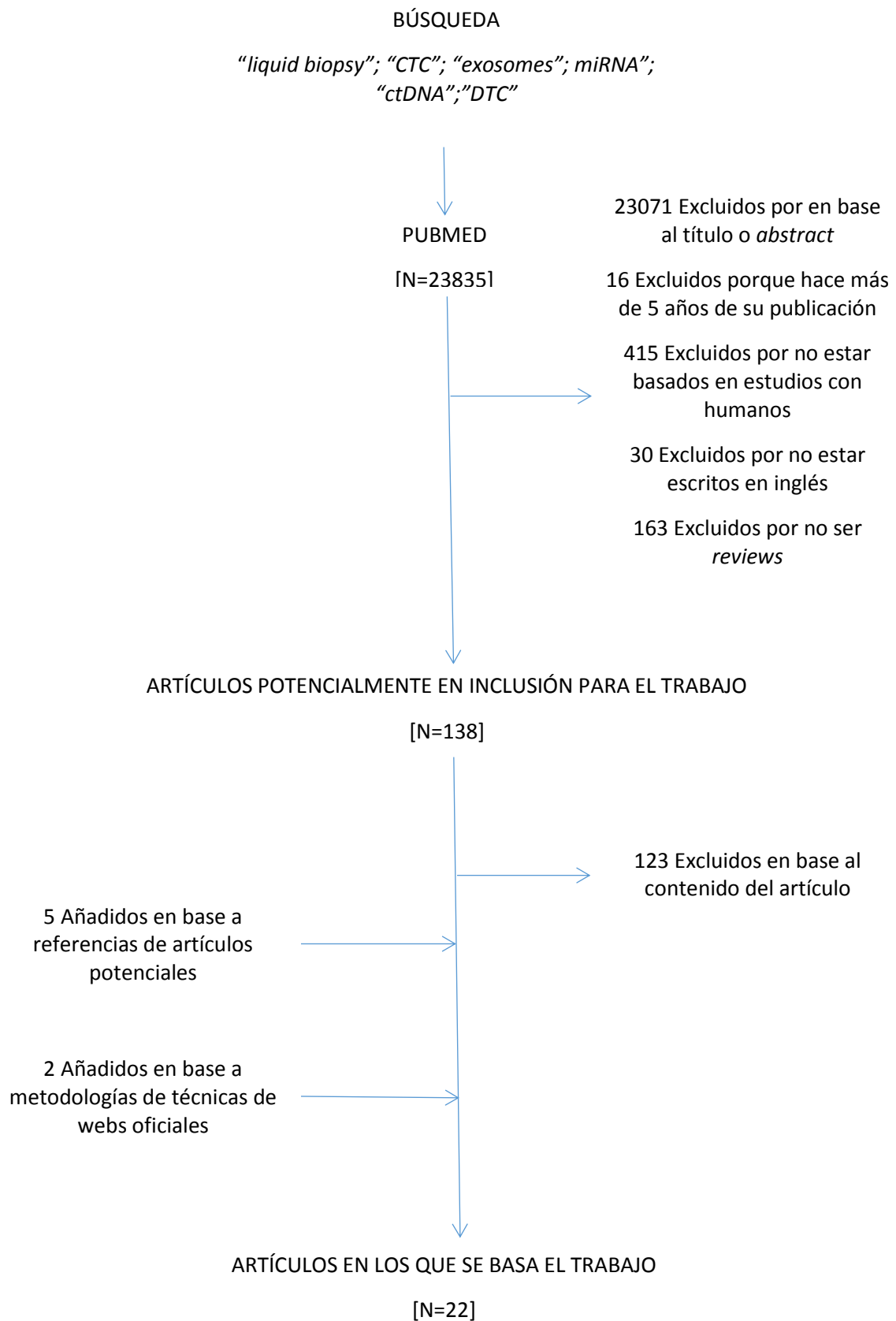
## **3-Métodos y Técnicas**

Este trabajo se ha realizado basándose en la búsqueda bibliográfica en bases de datos científicas y fuentes de información fiables con la finalidad de adquirir la máxima información posible sobre la Biopsia Líquida en el Diagnóstico del Cáncer.

La principal fuente de información utilizada en este trabajo se trata de la base de datos *National Center of Biotechnology Information* de artículos de investigación, considerados bibliografía básica, y de artículos de revisión elaborados por varios investigadores, considerados como bibliografía de síntesis de diversos artículos ya publicados para la obtención de conclusiones generalizadas. En la base de datos del PubMed se han realizado búsquedas a través de los conceptos clave para este trabajo “*liquid biopsy*”, “*CTC*”, “*exosomes*”, “*miRNA*”, “*ctDNA*” y “*DTC*” y se han obtenido como resultado 23.835 publicaciones. Para acotar la búsqueda a un número mucho menor de publicaciones se han utilizado una serie de filtros: 23.071 publicaciones han sido excluidas en base a su título o *abstract*, posteriormente otras 16 también fueron excluidas debido a que hacía más de 5 años de su publicación, otras 415 publicaciones por no estar basadas en estudios con humanos, 30 más por no estar escritas en inglés y finalmente 163 publicaciones fueron rechazadas en este trabajo por no ser artículos de revisión o *reviews*. De este modo se quedaron 138 posibles artículos que podían haber sido utilizados para la elaboración de este trabajo. 115 artículos más se excluyeron de la bibliografía en base a que el contenido del artículo coincidía con el de otros artículos que se adaptaban mejor al enfoque de este trabajo. Finalmente 5 artículos ajenos a la búsqueda inicial fueron añadidos para la realización de este trabajo y se obtuvieron en base a la bibliografía de otros artículos válidos sí utilizados.

Por último, la otra plataforma de fuentes bibliográficas utilizada ha sido internet donde se han consultado páginas web oficiales de las que podamos fiarnos de su contenido. Concretamente las webs consultadas han sido la web oficial de la revista *Nature*, la web de investigación contra el cáncer del Reino Unido y la web oficial de la empresa de productos científicos Thermo Fisher Inc. de las que se ha obtenido un artículo de cada una a parte de información relevante presente en la propia web.

En total se han utilizado 30 artículos para la bibliografía más dos referencias de páginas web.

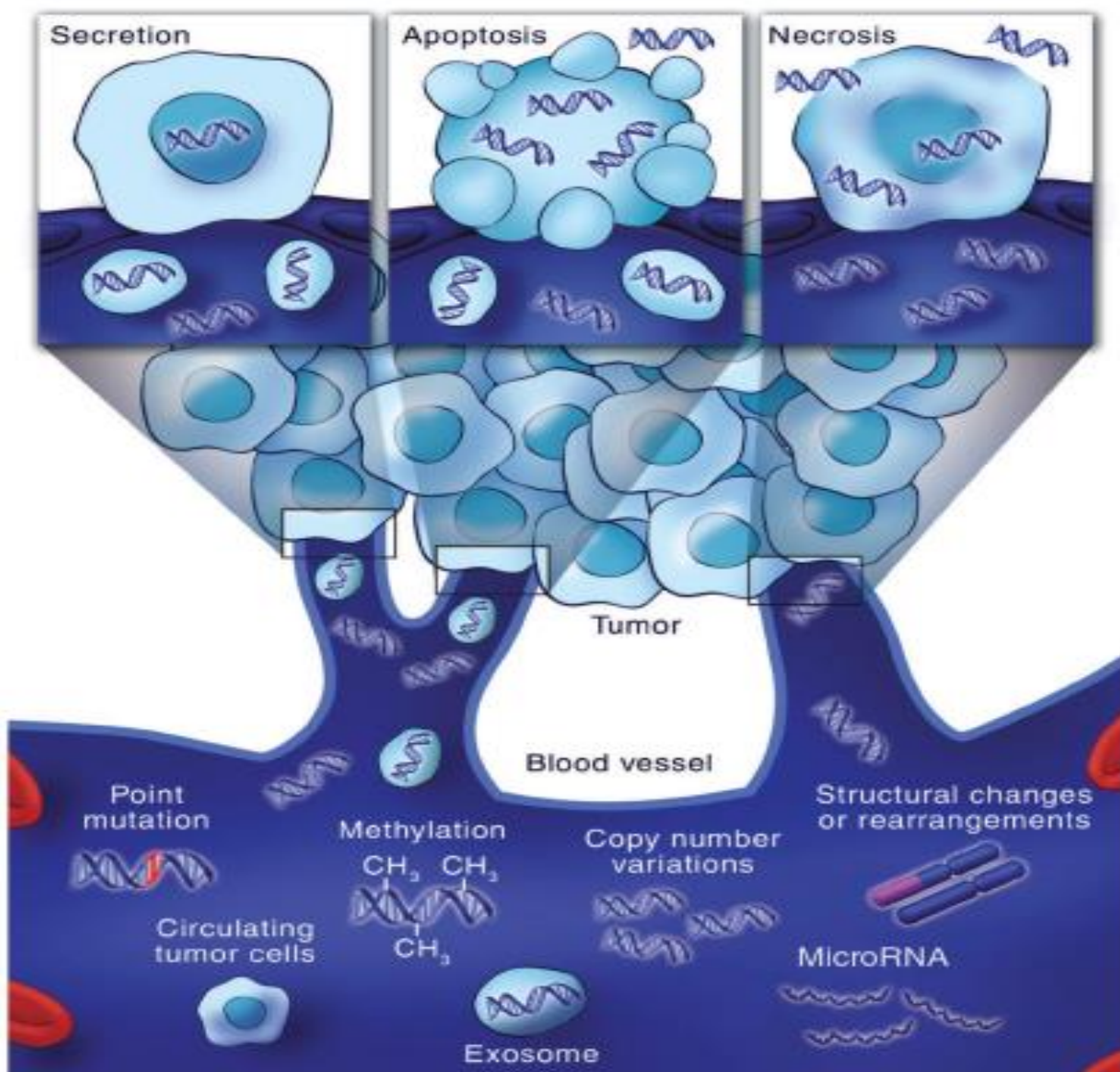


**Fig1.**Proceso de selección de artículos realizado en este trabajo.



#### 4-Principales marcadores en la biopsia líquida

Mediante la biopsia líquida se pueden analizar los diversos fluidos corporales en búsqueda de marcadores tumorales. De entre la gran variedad de candidatos a marcadores que se pueden encontrar en este tipo de muestras destacan sólo algunos que presentan las características válidas para ser considerados como tal, debido a la información que se puede obtener de ellos para el diagnóstico y monitorización del cáncer<sup>7</sup>. Entre estos destacan las CTCs, exosomas derivados de células tumorales, y ácidos nucleicos provenientes de células cancerosas (concretamente DNA y miRNAs) que se pueden obtener de muestras sanguíneas y las células tumorales diseminadas que se pueden obtener del líquido de la médula ósea. Todos ellos (ampliamente expuestos en los siguientes apartados del trabajo) tienen en común su procedencia del tumor primario, por lo que nos aportan conocimiento de éste y cómo evoluciona según el proceso particular de cada caso de cáncer.



**Fig2.** En esta imagen podemos observar los posibles marcadores que podemos encontrar en el torrente sanguíneo liberados por la masa del tumor primario y algunos procesos responsables de su secreción.<sup>8</sup>

## **4.1-Células Tumorales Circulantes (CTCs)**

### **4.1.1-Biología de las CTCs**

Las células de un tumor primario se pueden disgregar de éste y pasar a la corriente sanguínea. Estas células cancerosas en sangre son lo que se denominan CTCs. Las células para poder sobrevivir en la sangre requieren de unas características específicas distintas a la de las células del tejido de procedencia y por tanto las CTCs pasan por un riguroso proceso de selección donde sólo sobreviven las que se han podido adaptar a las circunstancias de este medio. Por otra parte, también tienen que tener las características necesarias para poder invadir otros tejidos y provocar así metástasis<sup>2</sup>.

Para la disgregación de las CTCs a órganos distantes del tumor primario es necesario el paso de estas a través del corriente sanguíneo, esto es posible gracias a heteroagregados formados por las CTCs en asociación con plaquetas activadas y macrófagos que refuerzan el enganche al endotelio contribuyendo de este modo a la metástasis. Además, la migración en ocasiones es dependiente de gradientes de quimiocinas, que dirigen las CTCs a través del vascular<sup>2</sup>.

En los últimos años la mayoría de los ensayos para la detección de CTCs se basaban en la detección de marcadores epiteliales como EpCAM y citoqueratinas que no se expresan en la mesénquima. Esto suena un poco ilógico debido a que las CTCs presentes en sangre deberían haber reducido la expresión de estas proteínas en la transición epitelio mesénquima (TEM) que forma parte del riguroso proceso de selección por el que pasan las CTCs para poder ganar plasticidad y la capacidad de migración e invasión. En cambio, la idea que se tiene en la actualidad es que algunas CTCs tienen una especie de “fenotipo intermedio” donde como es de esperar sí presentan una reducción de marcadores epiteliales, sin embargo, siguen teniendo representación significativa en su expresión, diferenciando las CTCs de las otras células del corriente sanguíneo las cuales no presentan marcadores epiteliales. A pesar de esto, para saber el número real de CTCs en la sangre serían necesarios otros métodos de identificación basados en marcadores típicos de la TEM como el HER2. De hecho, las CTCs se pueden dividir en subpoblaciones en base a la expresión de marcadores epiteliales y/o mesenquimales<sup>6</sup>.

### **4.1.2-CTCs y estadios del cáncer**

Las CTCs son una herramienta poderosa a la hora de extraer información útil para el pronóstico y la toma de decisiones terapéuticas. Estas células juegan un papel importante en la metástasis, la mayor causa de muertes por cáncer, y por tanto el análisis de las CTCs en estadios tempranos del cáncer es de gran ayuda en la monitorización del paciente y en el desarrollo de una terapia más personalizada. Sin embargo, las CTCs han sido estudiadas mayormente con modelos de estadios avanzados de cáncer debido a que en estadios tempranos el número de CTCs en la corriente sanguínea es muy bajo. La baja concentración de estas células en sangre dificulta su aislamiento y por tanto su estudio<sup>9</sup>.

A pesar de que en principio otros marcadores que se pueden obtener mediante la biopsia líquida son potencialmente más útiles que las CTCs en el estudio de estadios

tempranos del cáncer, hay estudios que revelan que la presencia de un mayor número de éstas en la sangre son indicativos de un mal pronóstico de la enfermedad. Es necesario ampliar el número de estudios de mayor sensibilidad de detección de CTCs que aporten información en pacientes de cáncer sin metástasis para sacarle mayor potencial a estos marcadores<sup>6</sup>.

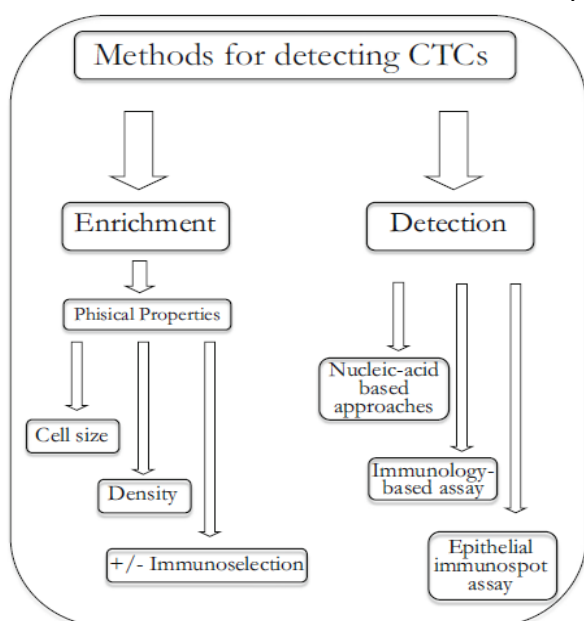
#### 4.1.3-Aislamiento, detección y análisis de CTCs

Las CTCs son células malignas que circulan por la corriente sanguínea a muy baja concentración por eso las técnicas para la detección de CTCs se basan en el enriquecimiento de su concentración para la detección de propiedades específicas de estas células. Estas células son detectadas propiedades físicas como el tamaño, la densidad e inmunoselección positiva y negativa<sup>2</sup>.

Las CTCs tienen un diámetro de entre 20-30µm mientras que las células sanguíneas tienen entre un 8-12 µm. También las células mononucleares y CTCs se pueden separar del resto de las células de la sangre por su densidad mediante enriquecimiento basado en gradientes de ficoll. Los métodos más utilizados, sin embargo, serían los basados en inmunoselección<sup>3</sup>. Por ahora el único test de enumeración de CTCs aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) es el test CellSearch® que consiste en la detección de CTCs mediante inmunodetección discriminando de manera positiva y negativa. Este test consiste en la capacidad de ferrofluidos magnéticos unidos a anticuerpos anti-EpCAM que reconocen moléculas epiteliales en las CTCs, provocando una discriminación positiva, y anticuerpos anti-CD45 que reconocen las CD45 presentes en los linfocitos, produciendo una discriminación negativa. A parte de miembros de la familia de las EpCAM miembros de la familia de las CKs como CK8, CK18 y CK19 también han sido identificados como marcadores útiles de la discriminación positiva de las CTCs para su enriquecimiento<sup>3</sup>.

Respecto a los métodos de detección, éstos se pueden clasificar en distintos tipos según en que se base la técnica. Las técnicas se basan en tres tipos, que son las enfocadas a ácidos nucleicos, los basados en inmunoensayos y el análisis EPISPOT. Los basados en ácidos

nucleicos consisten en identificar y discriminar la expresión génica de las CTCs específicas del epitelio (CKs y EpCAMs) y del órgano (PSA, CEA y MUC-1). Los ensayos inmunológicos representan un método eficaz de detección y aislamiento de CTCs mediante el uso de anticuerpos anti antígenos epiteliales o asociados al tumor combinados con citofotometría de flujo para su identificación y cuantificación. Finalmente el EPISPOT consiste en sembrar



**Fig3.** En esta figura se pueden observar los distintos métodos para detectar CTCs <sup>11</sup>.

la muestra en membranas de nitrocelulosa recubiertas de anticuerpos conjugados que se unen a antígenos específicos según el tipo de cáncer (i.e. PSA para cáncer de próstata o HER2 para cáncer de pulmón) presentes en las CTCs para su detección<sup>5</sup>.

Así, con estos métodos se pueden enriquecer, detectar y enumerar las CTCs presentes en la sangre y estudiar su expresión génica y/o características particulares de éstas para monitorizar la enfermedad y elaborar dianas terapéuticas personalizadas para el paciente.

#### **4.1.4-Dianas terapéuticas y CTCs**

Como ya se ha nombrado anteriormente, el estudio de las CTCs puede conllevar al conocimiento de qué terapia es la más adecuada a distintos niveles, concretamente a nivel proteico, de niveles de mRNAs i de DNA.

Respecto al nivel proteico, en cáncer de mama una de las dianas terapéuticas clave es el receptor de estrógeno (RE), de hecho los tumores primarios se clasifican en RE-positivos y RE-negativos. Pero debido a la reprogramación que sufren las CTCs respecto a las células del tumor primario, podemos encontrar casos donde las células del tumor primario sean RE-positivas y las CTCs provenientes de ese tumor sean RE-negativas escapando así a terapia endocrina contra el cáncer. Otra diana terapéutica en cáncer de mama sería el HER2. Este receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano se encuentra sobreexpresado en un 20% de los carcinomas primarios y hay una discrepancia en su expresión del 30% entre las células del tumor primario y las CTCs. Se está investigando si a pacientes con CTCs HER2-positivas y células HER2-negativas del tumor primario, se les debería proporcionar tratamientos que tienen como diana este receptor<sup>5</sup>.

Otros marcadores proteicos, esta vez en cáncer de próstata, a tener en cuenta como diana terapéutica serían el antígeno prostático específico o PSA y el antígeno de membrana prostático específico o MPSA. Se ha visto que estos marcadores están regulados por la activación del receptor de andrógenos (RA) o su inactivación respectivamente. De este modo, estos marcadores nos podrían aportar ayuda para predecir una terapia basada en RAs<sup>5</sup>.

Hay muchas proteínas que han sido descritas como factores que contribuyen a la respuesta o resistencia a la quimioterapia mediante el transporte del medicamento de dentro a afuera de la célula, reparando el DNA dañado y/o evadiendo a la célula de la apoptosis. Muchos tipos de células cancerosas poseen proteínas de membrana que transportan agentes químicos y toxinas hacia afuera del citoplasma. La mayoría pertenece a la familia de proteínas de múltiple resistencia a los fármacos (MDR) ya ampliamente estudiadas. Su función es ATP dependiente y actúan como bombas de eflujo con transportes específicos de tipos de fármacos. Muchos marcadores MDR han sido detectados en CTCs y se ha visto que la expresión de ciertos tipos de MDR en estas células simboliza mal pronóstico de la enfermedad. Estas MDRs pues, serían un ejemplo más de posible diana terapéutica que se puede estudiar en CTCs<sup>2</sup>.

El siguiente nivel para el estudio de dianas terapéuticas mediante CTCs del que se ha hablado es el de niveles de mRNAs. Muchos investigadores han desarrollado protocolos para analizar la expresión de mRNAs en CTCs mediante RT-PCR teniendo como objetivo firmas

genéticas específicas como por ejemplo de oncogenes de los que se hablará más adelante en este apartado u otros marcadores de expresión génica. Un ejemplo a este nivel sería el ya bien conocido la sobreexpresión del marcador tumoral timidilato sintasa (TYMS). Este enzima expresado de manera constitutiva en leucocitos, participa en el metabolismo del 5-fluorouracilo (5-FU), fármaco contra el cáncer que arresta a las células en la fase S debido a que inhibe la formación de timidina impidiendo la replicación. Se ha descubierto que en los tumores primarios no se ve expresado, pero sí en las CTCs que derivan de él y se ha asociado esta sobreexpresión a un mal pronóstico de la progresión de la enfermedad<sup>5</sup>.

Dentro del transcriptoma que se puede analizar cabe resaltar los miRNAs, que son clave en la regulación de la expresión génica y representan un potencial diagnóstico elevado como marcadores de diagnóstico y por tanto se deberían dedicar más estudios a dilucidar datos sobre estas posibles dianas terapéuticas<sup>6</sup>.

El último nivel de estudio que nos queda por exponer es el DNA de las CTC. Mutaciones en genes pueden afectar al tratamiento que en un principio se había pensado para el paciente y por eso el estudio de estas mutaciones o aberraciones genéticas nos ayudará a elaborar una terapia más adecuada. Un ejemplo sería el que se ha visto en mutaciones del gen EGFR que afectan al tratamiento anti-EGFR en cáncer de pulmón, o mutaciones en KRAS (regulada por EGFR) que también afectarían a esta misma terapia. La detección temprana de estas mutaciones ayudaría a elaborar una terapia individualizada para el paciente<sup>6</sup>.

En cáncer de próstata, mutaciones en el gen que codifica el RA han sido halladas en CTCs con pacientes que se han sometido a una cirugía. Amplificaciones de este gen provocan que las células tumorales sean capaces de captar residuos mínimos de andrógenos en la circulación, evadiendo así la terapia<sup>3</sup>.

Un último ejemplo de resistencia a terapias, este caso en cáncer de mama, sería causa por la activación de la vía de señalización PIK3CA debido a la mutación en este gen. Concretamente afecta a un 15,9% de los pacientes con metástasis de cáncer de mama interviniendo en terapias que tienen como diana el receptor HER2 (activador de esta vía de señalización)<sup>6</sup>.

#### **4.1.5-Monitorización a tiempo real con CTCs**

Mediante la biopsia líquida, como ya se ha comentado en este trabajo, se puede monitorizar la evolución del paciente a distintos estadios. A través de un seguimiento del recuento de CTCs presentes en el torrente sanguíneo se puede definir un mejor o peor pronóstico para éste. Un ejemplo sería, como se ha visto en algunos estudios, el recuento de CTCs antes y después de una operación quirúrgica de extirpación del tumor principal de manera que, los pacientes con mayor número de CTCs tienen un peor pronóstico que los que tienen menor cantidad. También dependiendo del fenotipo que presentan las CTCs se puede llegar predecir el nivel de invasión que puede llegar a desarrollar la metástasis. Y por otra parte, a la hora de decidirse por un tratamiento o de comprobar la eficacia de éste, las CTCs nos pueden aportar información muy concreta para conocer a qué tipos de terapia puede llegar a ser resistente un tipo de cáncer ofreciendo así un tratamiento más personalizado y eficaz<sup>6</sup>.

## 4.2-DNA circulante tumoral (ctDNA)

### 4.2.1-Origen ctDNA

En 1948 se reportó por primera vez la presencia de DNA libre circulante o cfDNA (*cell-free DNA*) en la corriente sanguínea de individuos sanos. La mayor parte de este cfDNA está presente en la sangre debido a que es liberado cuando se produce daño celular, durante el proceso de apoptosis o en situaciones de necrosis<sup>10</sup>. El ctDNA suele ser un DNA de doble cadena cuya longitud oscila normalmente entre 70-200 pares de bases pudiendo llegar a grandes longitudes como 21 kb<sup>11</sup>. En muchas ocasiones se ha observado que la longitud del cfDNA corresponde al patrón característico del proceso de apoptosis de múltiplos de 180 pares de bases, lo que sugiere que probablemente la causa mayor de la presencia de cfDNA en la sangre sea el proceso celular de apoptosis<sup>8</sup>.

En general se ha observado que en pacientes con cáncer los niveles de cfDNA son mucho mayores que los de individuos sanos. Por lo visto esto es debido a que conforme el tumor va aumentando de tamaño, induce a tanto a células sanas adyacentes como a propias células tumorales a procesos apoptóticos o necróticos. Guiándonos por este suceso, en la sangre también podremos encontrar cfDNA perteneciente a células tumorales o ctDNA (*circulating tumor DNA*). También influye en el aumento de los niveles de cfDNA, que en circunstancias fisiológicas normales los restos apoptóticos o necróticos son limpiados por los fagocitos, pero esto no pasa en circunstancias tumorales debido a la evasión del sistema inmune<sup>8</sup>. Otra hipótesis es que el ctDNA presente en la circulación provenga de la lisis de CTCs o micrometástasis ya presentes en la corriente sanguínea<sup>6</sup>.

La cantidad de ctDNA que proviene de células tumorales depende de las características de cada tumor como por ejemplo su tamaño, el estadio en el que se encuentra o como su permeabilidad al torrente sanguíneo. Aun así normalmente el ctDNA suele corresponder a <1% del cfDNA total. Para poder discriminar el ctDNA del cfDNA es necesario saber las mutaciones que los diferencian. Estas mutaciones, normalmente producidas por sustitución de una base, solo están presentes en el DNA proveniente de células tumorales y jamás del que proviene de células sanas<sup>8</sup>.

El ctDNA podría tener una función biológica activa en los procesos tumorales. Este ctDNA podría ser recogido por células sanas y afectar a su metabolismo. En un experimento *in vitro* se observó la capacidad de transformación tumorigénica del ctDNA. Así el ctDNA también podría convertirse en una interesante diana terapéutica<sup>6</sup>.

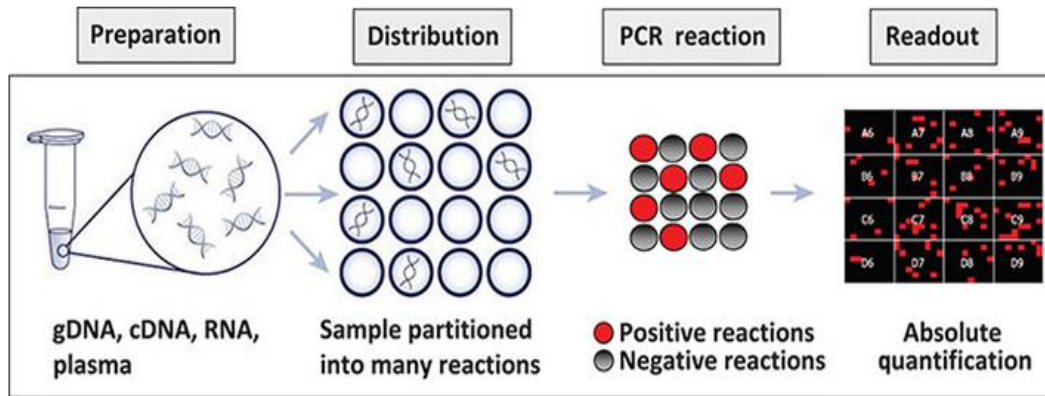
Desde que se descubrió por primera vez el cfDNA ha sido motivo de estudio para poder distinguir de entre un gran mar de cfDNA una pequeña porción de ctDNA que nos proporcione pistas del tumor del que proviene, pero no es hasta hace poco que se ha desarrollado la tecnología genómica digital que se precisa para poder investigar el ctDNA con precisión. Las nuevas técnicas de detección y secuenciación de ácidos nucleicos nos han permitido identificar esa pequeña porción de ctDNA presente en la sangre sin que la gran cantidad de cfDNA predominante interfiriera en los análisis. De este modo podemos utilizar el ctDNA para la identificación de muchos marcadores genéticos específicos de cada cáncer y del estadio en el que se encuentra<sup>12</sup>.

Las ventajas de utilizar el ctDNA como biomarcador de la dinámica tumoral sobre otros marcadores proteicos convencionales es que el ctDNA tiene una vida media muy corta (aproximadamente 2h), permitiéndonos estudiar cambios en el tumor que hacen referencia a las últimas horas y no semanas<sup>6</sup>.

#### **4.2.2-Técnicas de análisis del ctDNA**

Las investigaciones sobre el cfDNA han aumentado recientemente mayormente gracias a las nuevas tecnologías genómicas digitales que nos permiten encontrar raras variantes de mutantes entre una complicada mezcla de DNA. Antes de del desarrollo de estas técnicas modernas, la detección de ctDNA era muy complicada de manera que muchas investigaciones no recientes clasificaban el ctDNA como un biomarcador pobre, inferior potencialmente otros biomarcadores como las CTCs. A pesar de esto, por ejemplo en cáncer de mama, se demostró que los niveles de ctDNA presentan un mejor rango de dinamismo y correlación con cambios en la carga tumoral que marcadores como CA15-3 o las CTCs detectadas por el sistema CellSearch<sup>®</sup>. Algunas técnicas para la identificación de variantes mutantes del cfDNA que provienen de tumores serían la PCR digital (dPCR), el BEAMing (*beads, emulsion, amplification and magnetics*) y la polimerización activada por pirofosforólisis o PAP junto a las técnicas de nueva generación de secuenciadores (NGS)<sup>8</sup>.

La dPCR es una técnica muy utilizada en la identificación de secuencias genéticas minoritarias en un fondo de gran cantidad de una secuencia mayoritaria que directamente cuantifica el número de moléculas diana en lugar de basarse en estándares de referencia o controles endógenos. La dPCR funciona dividiendo una muestra en muchas cámaras de reacciones PCR individuales en tiempo real. El número de cámaras de reacción varía entre sistemas y van desde varios miles a millones. Alguna de estas reacciones contiene la molécula diana dando así un resultado positivo para esa reacción por un marcador fluorescente, mientras que otras no la contienen, obteniendo un resultado negativo para esa reacción. Después del análisis de las reacciones, la fracción de respuestas negativas se utiliza para generar una respuesta absoluta para el número exacto de moléculas diana en la muestra, sin referencia a los controles endógenos. Para calcular el valor absoluto de moléculas diana, como es posible que dentro de una cámara de reacción que haya dado positivo se encuentre más de una molécula diana, se considera que la dispersión de la muestra obedece a la distribución de Poisson<sup>13</sup>.

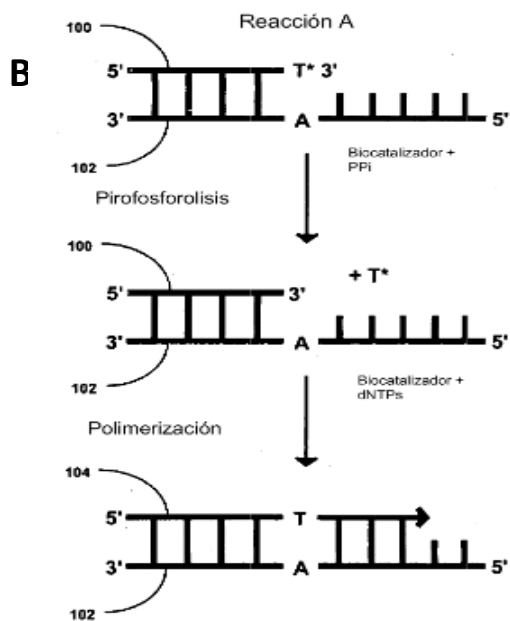
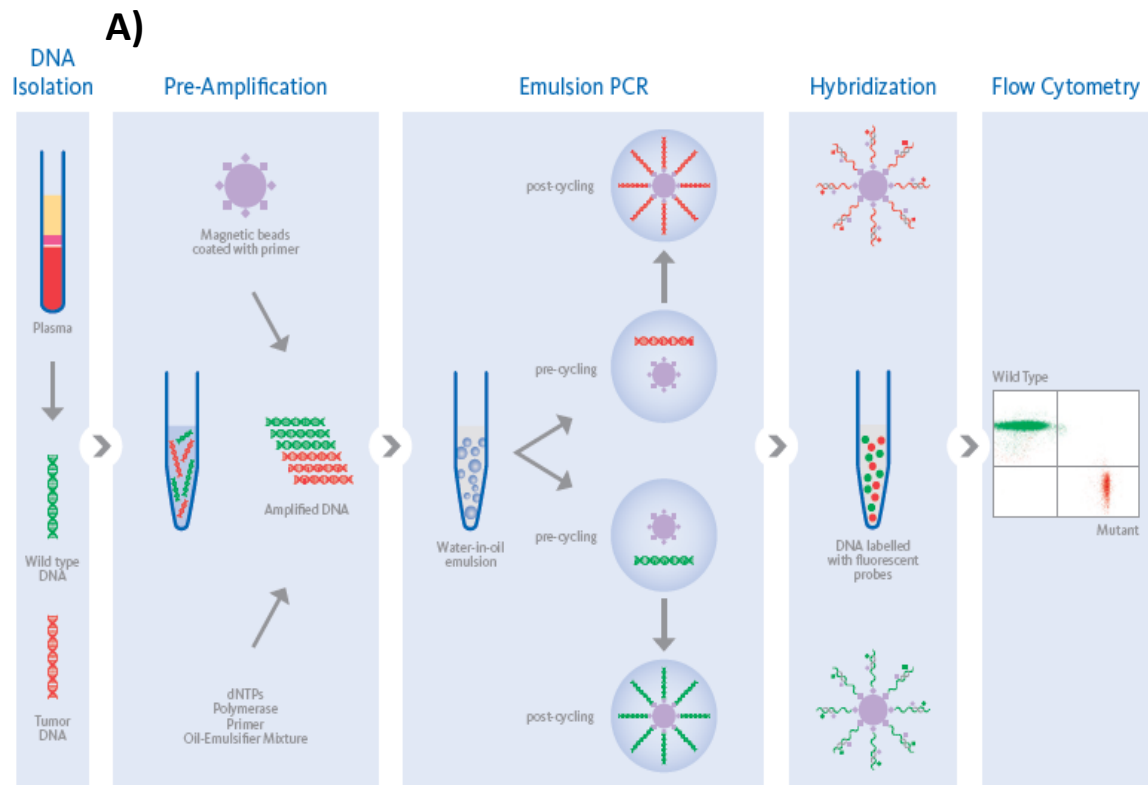


**Fig4.** Esquemización de los pasos de la dPCR<sup>23</sup>.

El BEAMing es un proceso construido sobre la emulsión de agua en aceite de PCR que incluye perlas magnéticas dentro de los compartimentos y asegura que una hebra del producto de PCR está unida a las perlas. Después de la amplificación, cada compartimento contiene una perla que está recubierto con miles de copias de la única molécula de DNA originalmente presente. Estas perlas se pueden recuperar con un imán o por centrifugación. Las perlas obtenidas reflejan con precisión la diversidad de DNA presente en las poblaciones del modelo y este método puede usarse para determinar qué fracción de DNA de una población contiene una mutación específica. Millones de perlas pueden analizarse usando citometría de flujo<sup>14</sup>.

En PAP, la pirofosforólisis y la polimerización por DNA polimerasa se acoplan en serie utilizando un oligonucleótido activable por pirofosforólisis (P\*). P\*, que es un oligonucleótido específico de alelo con un didesoxinucleótido en el extremo 3', puede ser activado por pirofosforólisis para eliminar el didesoxinucleótido terminal 3' en presencia de pirofosfato (PPi) y la cadena complementaria de la plantilla alélica; Entonces el P\* activado puede extenderse por polimerización de DNA. La especificidad resulta tanto de la pirofosforólisis como de la polimerización debido a que la amplificación inespecífica significativa requiere la combinación de pirofosforólisis desajustada y mala incorporación por la DNA polimerasa, lo cual es un evento extremadamente raro<sup>15</sup>.





**Fig5. A)** Esquema de los procesos de la técnica molecular de amplificación y detección BEAMing<sup>24</sup>. **B)** Representación de la reacción del PAP<sup>15</sup>.

Dos tipos de procesos potenciales se han descrito para poder analizar el ctDNA. El primero requiere de la identificación específica de la mutación o mutaciones en el tejido tumoral para poder elaborar sondas específicas para cuantificar el ctDNA en la sangre. EL otro proceso consistiría en la búsqueda de mutaciones de interés del DNA sustraído del plasma o el sérum "a ciegas" ya que el tejido del tumor primario no ha sido estudiado. En cualquier caso, el genotipo es identificado y la mutación es cuantificada y representada en número de fragmentos mutados por mL o como fracción de mutación (%) en una muestra individual<sup>8</sup>.

Un ejemplo de la búsqueda de mutaciones “a ciegas”, sería en que se hizo en un grupo de investigación que desarrolló su propia técnica de análisis llamada CAPP-Seq (*cancer personalized profiling by deep sequencing*). Esta técnica fue implementada para pacientes con NSCLC de manera que se diseñó un marco genético con múltiples alteraciones propias de este cáncer y se identificó a >95% de los tumores con un 96% de especificidad para fracciones de alelos mutantes de aproximadamente el 0,02%. Aunque el ctDNA fue detectado mayoritariamente en pacientes con estadios II-IV de NSCLC mientras que solo el 50% de los pacientes en estadio I fueron identificados. Se midió unas 10 veces menos ctDNA en pacientes de estadio I en comparación con estadios más avanzados<sup>6</sup>.

#### **4.2.3-Aplicaciones ctDNA en el cáncer**

Las aplicaciones clínicas para la tecnología anteriormente expuesta, incluyen el diagnóstico de la enfermedad, monitorizar la respuesta tumoral a la terapia y definir escenarios clínicos ambiguos que den lugar a dudas. Además debido a la corta vida media del ctDNA, cambios en este pueden predecir una respuesta rápida a la terapia que recibe el paciente sin tener que esperar semanas<sup>8</sup>.

Otra aplicación potencial del ctDNA es la detección de residuos mínimos de la enfermedad después de que el paciente se someta a cirugía o a terapia. En este contexto, como en casos de cáncer de mama o de colon, la cirugía de extirpación cura a muchos casos con este tipo de cáncer. Una vez hecha la cirugía no teníamos métodos para saber que pacientes están curados y cuales aún presentan residuos mínimos de la enfermedad. De manera que como son grupos de pacientes con alto riesgo clínico para la recaída por residuos mínimos de la enfermedad, se les administraba indistintamente quimioterapia como tratamiento auxiliar a pesar de que un gran número ya no la necesitaban debido a que la cirugía fue exitosa. El ctDNA es un marcador potencial de si hay enfermedad mínima residual después de cirugía y podría determinar qué pacientes precisan de terapia auxiliar y cuales no<sup>8</sup>.

Un ejemplo de esto ha sido un estudio que se ha realizado con pacientes de cáncer de colon a los que se les ha hecho una intervención quirúrgica. Se determinó un perfil de mutación para cada paciente obtenido del tumor extirpado, creándose así, huellas moleculares de las mutaciones de cada paciente para su seguimiento. Mediante estos perfiles genéticos se detectaron y cuantificaron los ctDNAs de los pacientes, haciéndoles un seguimiento de 2-5 días. En este estudio se observó que todos los pacientes a los que se les observó ctDNA recayeron en la enfermedad mientras a los que no se les detectó, se quedaron libres de ella. Estudios similares se han realizado “a ciegas” examinando mutaciones en *KRAS* en pacientes con cáncer colorrectal que se les había extirpado el tumor por cirugía y se demostró una fuerte correlación entre la detección de ctDNA después de la operación y la recurrencia a la enfermedad<sup>8</sup>.

Para la monitorización del paciente el ctDNA obtenido de muestras sanguíneas analizado antes y después del tratamiento nos puede proporcionar una imagen global de la genética molecular del tumor. Esta imagen genética incluye cambios genéticos en el perfil de mutaciones que ocurren durante la terapia como la heterogeneidad que surge como resultado de un proceso de selección provocado por la terapia. La comprensión de esta resistencia adquirida a fármacos a nivel molecular se puede usar para la elaboración de medicamentos con los que combinar la terapia que supriman los agentes causantes de la resistencia<sup>8</sup>.

En el cáncer colorrectal, la resistencia adquirida a anticuerpos anti-EGFR se asocian a mutaciones en la vía de señalización de *RAS*, y estas mutaciones han sido detectadas en el ctDNA antes de que el progreso de la enfermedad pudiese ser documentado por detección estándar. Es interesante señalar que los pacientes que adquirieron resistencia a anticuerpos anti-EGFR, presentaban un patrón heterogéneo de mutaciones en *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *EGFR*. La proporción de alelos mutantes *KRAS* estaba aumentada o disminuida en presencia o ausencia de medicamentos anti-EGFR<sup>6</sup>.

En un estudio de cáncer de mama, mediante la secuenciación de todo el genoma, se han detectado ctDNA con las mutaciones pertenecientes a la secuenciación previa del tumor en más del 75% de los pacientes en estadios avanzados del cáncer y en alrededor de un 50% en pacientes con cáncer de mama localizado. En otro estudio que también se secuenciaba todo el genoma tumoral, se encontraron en más del 80% de los pacientes mutaciones en *TP53*. Un grupo de investigadores desarrolló un ensayo en el que monitorizaba la evolución de pacientes con cáncer metastásico de mama en respuesta a la terapia. En este último estudio demostraron que los niveles de ctDNA mutado relacionado con resistencia a la terapia incrementaron, incluyendo mutaciones que activan a *PIK3CA* en respuesta al tratamiento a paclitaxel (medicamento que se une a la tubulina estabilizándola impidiendo la división celular), mutaciones en la subunidad 1 del complejo coactivador mediador (*MED1*) del receptor de estrógenos en respuesta al tratamiento con tamoxifeno (medicamento que tiene como diana el receptor de estrógeno) y con trastuzumab (anticuerpo del receptor de estrógeno), y finalmente, mutaciones en *GAS6* (ligando del receptor tirosin-kinasa *AXL*) en respuesta al lapatinib (un inhibidor de la actividad tirosin-kinasa)<sup>6</sup>.

Se ha analizado el genoma completo de ctDNA provenientes de tumores prostáticos en un estudio en pacientes con cáncer metastásico de próstata. La secuenciación reveló un gran número de aberraciones incluyendo mutaciones previamente documentadas en otros estudios que secuenciaron el genoma de tumores primarios de próstata como la pérdida en 8p y la ganancia en 8q. Un gran número de copias ganadas en el locus de *RA* se observaron en los pacientes de cáncer de próstata<sup>6</sup>.

Cambios en la secuencia del DNA, como mutaciones puntuales somáticas o deleciones, son la causa más frecuente de variantes asociadas al desarrollo de tumores y representan las mutaciones oncogénicas más frecuentes como *KRAS*, *PIK3CA*, *EGFR* y *BRAF*. Pero aparte de mutaciones puntuales, hay otros tipos de alteraciones genéticas presentes en las células cancerosas incluyendo amplificaciones, reordenamientos, metilaciones del DNA, mutaciones en el DNA mitocondrial y aneuploidias. También se han desarrollado métodos para la detección de este tipo de aberraciones genéticas. Un ejemplo sería el PARE (*personalized analysis of rearranged ends*) que consiste en el desarrollo de biomarcadores tumorales a partir de la identificación de reordenamientos en el DNA tumoral, y otro ejemplo sería el cariotipado digital, este método se basa en la búsqueda de alteraciones asociada a cambios cromosomales (precisa el análisis de todo el genoma tumoral)<sup>8</sup>.

Métodos como el PARE o el cariotipado digital usando NGS nos permiten la detección de reordenamientos, amplificaciones y aneuploidias tumorales en circulación mediante el análisis de ctDNA sanguíneo. Si se proponen marcos genéticos concretos sobre este tipo de aberraciones genéticas, basados en observaciones de estudios previos, mediante la biopsia líquida se podrían detectar estas aberraciones, como amplificaciones de *HER2/neu* o reordenamientos en *ALK*, en ctDNA extraído de muestras de plasma de pacientes con cáncer.

A pesar de que el coste de estos ensayos es elevado en este momento, el precio de las NGS está disminuyendo, por lo que en un futuro no muy lejano los costes de estos métodos serán viables para propuestas clínicas<sup>8</sup>.

Distintos estudios soportan la presencia de cambios en la metilación del DNA presentes en las células tumorales que se ven reflejados en el ctDNA que se puede obtener de una biopsia líquida. Existen técnicas moleculares por las que es posible detectar este tipo de cambios genéticos y por las que se ha observado que el grado de metilación del ctDNA es un reflejo de las metilaciones del tumor primario. Estas características de metilación pueden ser útiles en el estudio de detecciones tempranas del tumor y ayudar a comprender su agresividad. Para determinar si el DNA metilado en la circulación es un buen biomarcador, se precisan de más estudios que estudien metilaciones que puedan servir como buenos candidatos<sup>8</sup>.

### **4.3-Exosomas**

#### **4.3.1-Biología de los exosomas**

Los exosomas son pequeñas vesículas de forma esférica de entre 30-100 nm de diámetro resultado de la exocitosis de la unión de cuerpos multivesiculares y de un endosoma tardío o de una vesícula formada a partir de la membrana plasmática<sup>16</sup>. Una parte importante de la formación de los exosomas está controlada por el complejo de clasificación endosómica necesario para el transporte o ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), el cual es el responsable de la acumulación y clasificación de las moléculas en la maquinaria endocitaria. En las células tumorales el ESCRT está alterado y por eso el perfil proteico dentro de los exosomas expulsados puede estar modificado<sup>17</sup>.

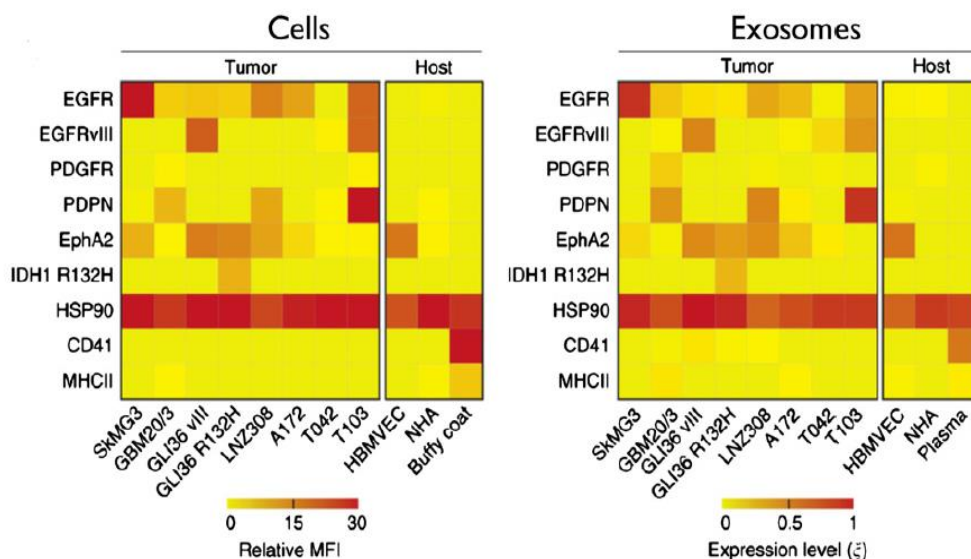
Una vez los exosomas han sido expulsados de las células, otras células pueden capturar estas vesículas como respuesta fisiológica a la maquinaria endocítica fusionándolos con la membrana plasmática o con lisosomas. Si los exosomas se fusionan con los lisosomas en la célula diana, el contenido de estas será degradado por enzimas proteolíticas, pero si por el contrario, los exosomas se fusionan con la membrana plasmática, su contenido es liberado en el citoplasma de la célula produciendo una modificación paracrina en el comportamiento de la célula diana. De este modo los exosomas juegan un papel muy importante en la comunicación célula-célula o *crosstalk*. Los mecanismos por los que las células incorporan los exosomas son la endocitosis, incluyendo la pinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, fagocitosis u otras, la unión directa de la membrana celular con el exosoma o fusión de membranas, y por último, los exosomas contienen un gran número de proteínas en la superficie de la membrana como leptinas, inmunoglobulinas, integrinas y tetraspaninas que están involucradas en la función de exosomal, su motilidad y su integración en las células. Éste último mecanismo depende de la interacción ligando-receptor entre proteínas de la superficie del exosoma y de la membrana celular. Así, la metástasis tumoral no se produce en órganos aleatorios, sino en determinados órganos donde las células tienen mayor o menor facilidad para interactuar con la composición de la superficie de los exosomas<sup>18</sup>.

La composición de los exosomas es un reflejo de las células de las que provienen, por lo que el estudio de los exosomas provenientes de células tumorales es una manera de

obtener información de ese tumor de manera no invasiva. Esto ha sido probado en análisis comparativos en pacientes con glioblastoma multiforme y sujetos sanos donde se compararon los perfiles proteicos de las células y los exosomas expulsados por estas provenientes de muestras sanguíneas (Fig6)<sup>16</sup>. Además, como los exosomas están ligados a vía de secreción determinadas, poseen algunas proteínas comunes, independientemente de que células provengan, que son de gran ayuda a la hora de desarrollar técnicas de aislamiento. Estas proteínas como ALIX, CD9, CD63, CD81, HSP70 y TSG-101, entre otras, son conocidos marcadores de exosomas y por tanto importantes para su aislamiento<sup>17</sup>. Otras particularidades que tienen en común los exosomas es que son ricos en lípidos de membrana asociados a porciones *lipid rafts*, como el colesterol, la ceramida, esfingolípidos y glicerofosfolípidos con cadenas alifáticas largas saturadas<sup>19</sup>.

En el interior de los exosomas podemos encontrar una gran variedad de componentes como RNAs de cadena simple, RNAs de cadena larga no codificantes (lncRNAs), miRNAs, proteínas y lípidos. También en estudios recientes, se han encontrado moléculas de DNA de doble cadena<sup>17</sup>.

A pesar de que podemos encontrar una gran cantidad de componentes comunes en los exosomas que haya en la circulación, muchos de los componentes que poseen son específicos de ciertas alteraciones celulares o de procesos tumorgénicos. Esto es muy útil para la identificación del origen de estas vesículas aportándonos así biomarcadores adecuados que nos ayuden a estudiar el origen del tumor, su evolución y a definir terapias adecuadas<sup>16</sup>.

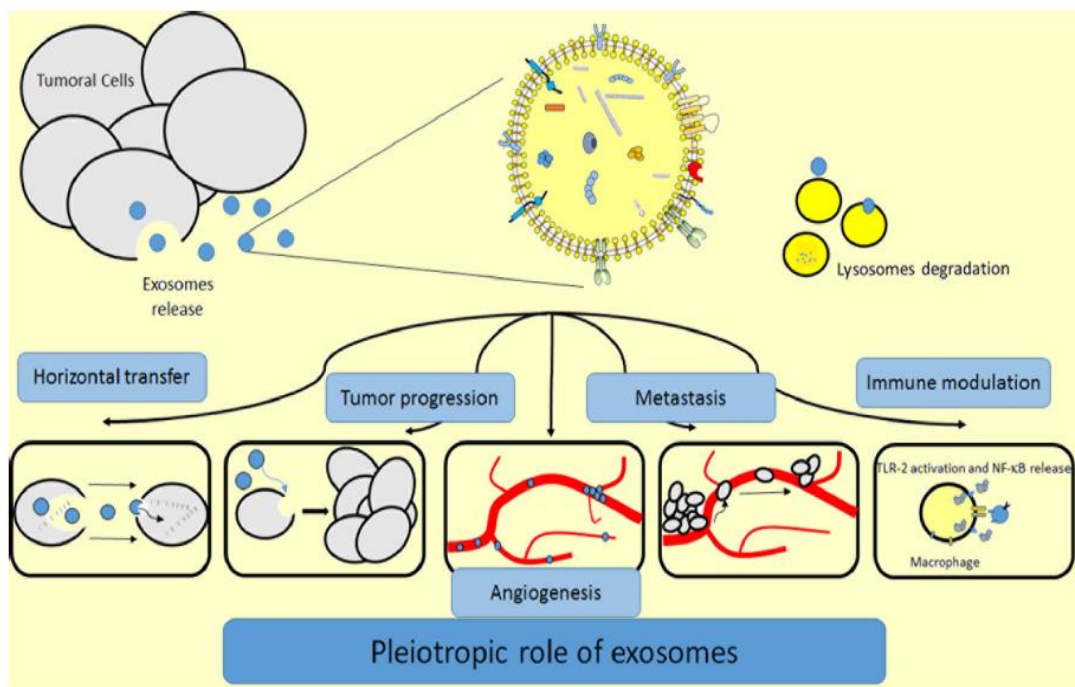


**Fig6.** Análisis comparativo de proteínas mediante micro resonancia magnética nuclear en el que los exosomas reflejan el perfil proteico de sus células parentales y distinta huella molecular, puede distinguir los exosomas tumorales de los derivados de células sanas<sup>16</sup>.

### 4.3.2-Exosomas en el diagnóstico del cáncer

Gracias a la biopsia líquida podemos aislar los exosomas de una muestra de sangre o de orina y se han hecho muchos estudios para encontrar marcadores en estos exosomas que reflejen la biología del tumor para así poder tenerlos como una potente herramienta de diagnóstico temprano del tumor y actuar con la mayor rapidez y precisión posible.

Los exosomas pueden jugar un papel pleitrópico en el desarrollo del tumor afectando en aspectos de desarrollo y crecimiento tumoral (Fig7.). Se ha estudiado que células de carcinoma renal son capaces de expulsar exosomas que contienen algunos miRNAs y mRNAs capaces de transformar células endoteliales normales en células con un fenotipo angiogénico para dirigirlos a una metástasis en el pulmón. También se ha demostrado que exosomas provenientes de células de melanomas con alto índice de metástasis promueven la formación de nidos pre-metastásicos a través de la reprogramación de células progenitoras de la médula ósea hacia fenotipos vasculogénicos. Otro rol de los exosomas en el cáncer se puede observar en el cáncer de mama y mielomas múltiples donde los exosomas tienen la capacidad de promover resistencia a la terapia a través de transferencia horizontal. Además están involucrados en la formación de microentornos pro-inflamatorios que promueven el crecimiento tumoral mediante la expresión en la superficie de proteínas como el CMH-II, la CD40 y la CD40L. Exosomas que provienen de líneas celulares de cáncer de ovario contienen proteínas funcionales que reprograman el metabolismo celular referente a resistencia por daño oxidante concretamente el metabolismo de las pentosas fosfato, favoreciendo de este modo la supervivencia de las células tumorales. En cáncer de mama, exosomas derivados de estas células tumorales, presentan 27-Hidroxicolesterol, un lípido asociado con la proliferación y metástasis de células tumorales ER+. Por todo esto es por lo que los exosomas podrían jugar un papel pleitrópico en el desarrollo tumoral<sup>17</sup>.



**Fig7.** Figura representativa del rol pleitrópico de los exosomas en el cáncer<sup>17</sup>.

En el cáncer de páncreas (CP), exosomas derivadas de células tumorales contenían elevadas concentraciones del factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) en comparación con personas sanas o pacientes de CP sin evidencias de un progreso en la enfermedad después de 5 años de su diagnóstico y tratamiento. También en este tipo de cáncer, la proteína de superficie celular GPC-1 ha sido encontrada en pacientes de CP tanto en estadios tempranos como tardíos del cáncer mientras que no se han encontrado en sujetos sanos. Este marcador ayudaría así a diferenciar a pacientes con CP de pacientes con enfermedades pancreáticas benignas como la pancreatitis crónica. Además, diferentes marcadores de exosomas de CP están asociados a formar metástasis en órganos diana concretos como por ejemplo las integrinas  $\alpha_6\beta_4$  y  $\alpha_6\beta_1$ , presentes en la superficie del exosoma, están ligadas a metástasis en el pulmón, mientras que la integrina  $\alpha_v\beta_5$  a metástasis en el hígado<sup>9</sup>.

En la próstata, los exosomas que este órgano secreta son denominados prostasoma. Producidos por las células del epitelio ductal, son componentes normales del fluido seminal. Estos prostasomas tienen distintas funciones en el esperma como antioxidantes o antibacterianas. Se han encontrado componentes interesantes en el análisis de prostasomas aislados de esperma humano como la fosfatasa prostática ácida (PAP), PSA, transglutaminasa específica de la próstata y el antígeno de célula madre prostática (PSCA) que también son marcadores de cáncer de próstata. En la superficie de los prostasomas podemos encontrar la presencia de inhibidores del complemento como las proteínas CD45 y CD59 que le otorgan resistencia a la actividad citotóxica del complemento. Pero no solo las células prostáticas normales son las que producen estos prostasomas, sino que también son producidos por células neoplásicas y por tanto son un reflejo de estas. Las células tumorales exportan los prostasomas al entorno extracelular de manera que estos participan en la proliferación celular y la metástasis. De hecho se ha observado que en pacientes con cáncer de próstata los niveles de prostasomas están incrementados y se asocian a una mayor agresividad de la enfermedad. Los prostasomas contienen en su interior DNA cromosómico, mRNAs y miRNAs. Varios estudios se han centrado en estudiar los miRNAs que contienen los prostasomas para poder utilizarlos como marcadores tumorales tanto de diagnóstico como de seguimiento. Por ejemplo como ya es bien sabido, el PSA es el marcador tumoral por excelencia del cáncer de próstata, pero este marcador es incapaz de darnos información sobre el estadio en el que se encuentra el tumor ni de su agresividad. En cambio, los miRNAs presentes en los prostasomas sí son capaces de darnos esta información, como el miR-21 que se ve significativamente elevado en estadios tempranos del cáncer pero no en estadios tardíos mientras que el miR-16 está más presente en plasma en estadios de metástasis y poco expresado en el tejido del tumor primario. El rol de los miRNAs en los prostasomas también influye en qué terapia podría ser la adecuada para el paciente ya que, por ejemplo, se ha observado que mir-34a presente en los prostasomas influye en el mecanismo de acción del docetaxel, que es un antimitótico quimioterapéutico utilizado en distintos tipos de cáncer<sup>18</sup>.

Siguiendo por la línea de los miRNAs presentes en los exosomas, cabe nombrar el miRNA-21. Este miRNA se ha visto que es sobreexpresado en pacientes con leucemia, con carcinoma esofageal de células escamosas o con glioblastoma y se ha relacionado con un aumento de la progresión y agresividad tumoral<sup>17</sup>.

En el cáncer de ovario, se han identificado ocho miRNAs (miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-200b, miR-203, miR-205 y miR-214) tanto en células tumorales como en exosomas derivados de estas en un estudio de 467 pacientes. Los resultados del estudio

muestran que los niveles de estos miRNAs son diferentes en enfermedades benignas de ovario e indetectables en sujetos sanos<sup>17</sup>.

Por lo que respecta a exosomas derivados de pacientes con NSCLC se han obtenido proteínas mutadas como EGFR, KRAS y claudinas entre otras. La translocación de ALK-EML4 también se ha identificado en estos exosomas. Se ha demostrado que exosomas que presentan EGFR son capaces de interactuar con células endoteliales activando las vías de Akt y MAPK obteniendo como resultado una sobreexpresión de VEGF y promoviendo de este modo la permeabilidad vascular del tumor. También muchos ncRNAs se han hallado en exosomas de NSCLC que están ligados a procesos de proliferación y evolución del cáncer<sup>17</sup>.

Así, después de lo expuesto en este apartado, se puede decir que los exosomas participan activamente en distintos procesos tumorales y que su estudio para la identificación de marcadores válidos y su tabulación pueden ser de gran ayuda en un futuro no muy lejano para el diagnóstico, seguimiento y mejoras en las terapias para gran variedad de tipos de cáncer.

#### **4.3.3-Aislamiento, detección y análisis de exosomas**

Los exosomas permiten avances significativos para el diagnóstico y la monitorización del cáncer ya que se encuentran en abundancia, son estables y diversos. Se han identificado gran cantidad de exosomas en diversos fluidos corporales como la sangre, la ascitis y el fluido cerebroespinal, incluso en tumores en los que no se encuentran cantidades detectables de CTCs. Por ejemplo tumores del sistema nervioso central que normalmente no producen muchas CTCs sí se han encontrado exosomas provenientes de estos tumores en muestras sanguíneas<sup>16</sup>.

La obtención clínica de exosomas plantea un conjunto de desafíos debido a su pequeño tamaño. Los métodos convencionales normalmente se basan en ultracentrifugaciones de larga duración para concentrar grandes volúmenes de muestra y un extenso proceso de detección. Para solucionar estos retos tecnológicos de aislamiento y análisis, una serie de sistemas han sido desarrollados para facilitar el estudio de exosomas<sup>20</sup>.

Dispositivos microfluídicos se han diseñado para recolectar exosomas intactos directamente de muestras biológicas sustituyendo métodos de ultracentrifugado o de precipitación por propiedades. Un ejemplo sería un dispositivo que usa un filtro membranoso desmontable (0,1  $\mu\text{m}$  de poro) para enriquecer los exosomas por selectividad de tamaño de grandes volúmenes e muestra. Una capa capilar insertada debajo de la membrana guía a los exosomas filtrados a un canal de recolección. También recientemente se ha demostrado la separación de exosomas en un continuo flujo mediante sistemas acústicos de nanofiltros. El aislamiento se produce por las ondas de ultrasonido que separan las vesículas por tamaño y densidad con una separación de alta resolución y rendimiento. El desarrollo de sistemas microfluídicos como estos podría ser un gran avance en el aislamiento de exosomas para uso clínico<sup>16</sup>.

Al igual que en las CTCs, tecnología magnética también puede utilizada para el aislamiento de exosomas para diagnóstico clínico. Como en las CTCs, nanopartículas magnéticas unidas a anticuerpos específicos se pueden usar para identificar exosomas



derivados de células tumorales aunque este método presente un reto para la ingeniería ya que los exosomas son mucho más pequeños que las CTCs<sup>16</sup>.

De este modo, aunque ya existen estrategias de aislamiento para exosomas, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que faciliten este proceso ya que los que podemos encontrar hoy en día deberían ser más rápidos y precisos para el diagnóstico clínico.

#### **4.4-microRNAs circulantes**

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes de entre 19-25 nucleótidos que juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica mediante la unión al extremo 3'UTR de mRNAs inhibiendo su expresión o induciendo su degradación<sup>21</sup>.

Se ha visto que aparte de los miRNAs que puedan contener los exosomas expulsados por células tumorales, también existe la presencia de miRNAs circulantes que se mantienen estables, protegidos de RNasas presentes en la sangre, mediante su unión a proteínas de unión a RNAs o a HDLs<sup>21</sup>.

Hasta la fecha más de 2500 miRNAs maduros humanos han sido registrados en miRBase. Utilizando las técnicas adecuadas como microarrays o NGS, distintos miRNAs han sido identificados como potenciales marcadores tumorales. En la Tabla 1 se muestran una lista de miRNAs circulantes, obtenidos de la base de datos miRTarBase, muy estudiados que se relacionan distintos fenotipos tumorales, regulando la expresión de genes supresores tumorales<sup>21</sup>.

En un estudio se analizó la expresión de miR-21 en pacientes con carcinoma colorrectal y se observó que este miRNA fue secretado por las células del carcinoma en el suero de los pacientes. También se observó un descenso significativo de la presencia del miR-21 en el suero de los pacientes una vez se les intervino con cirugía curativa. Además se demostró una distinción clara al comparar los niveles pacientes con cáncer e individuos sanos y se relacionó una mayor presencia de este miRNA en sangre a un mayor tamaño del tumor y a un peor pronóstico<sup>21</sup>.

Otro estudio comparó el perfil de expresión de miRNAs entre pacientes con carcinoma hepatocelular y pacientes control que podían ser individuos sanos, pacientes con hepatitis B crónica o pacientes con cirrosis hepática inducida por hepatitis B. En este estudio se identificó siete miRNAs diferenciales (miR-29a, miR-29c, miR-133a, miR-143, miR-145, miR-192 y miR-505) que solo se hallaban en los pacientes con carcinoma hepatocelular<sup>21</sup>.

Muchos estudios como los anteriores se han centrado en la identificación de miRNAs identificativos de los distintos tipos de cáncer para precisar el potencial de estas moléculas como biomarcadores usando una combinación de distintos perfiles de expresión ya registrados en bases de datos para el diagnóstico del cáncer incluso en estadios tempranos de éste. Como se muestra en la Tabla 1, diversos miRNAs han sido catalogados como marcadores de distintos tipos de cáncer y por tanto continuar por esta línea de investigación de miRNAs circulantes podría llegar a tener un gran potencial a nivel de detección temprana en enfermos de cáncer y de prevención en la población normal<sup>21</sup>.

	Cancer site	Representative targets <sup>a</sup>
hsa-miR-21-5p	Hepatocellular, colorectal, breast, lung, pancreatic, nasopharyngeal	<i>PTEN, PDCD4, RPS7</i>
hsa-miR-221-3p	Hepatocellular, colorectal, lung, sarcoma	<i>CDKN1B, KIT, TMED7</i>
hsa-miR-155-5p	Lung, breast, colorectal, pancreatic, laryngeal	<i>CEBPB, SOCS1, TP53INP1</i>
hsa-miR-223-3p	Hepatocellular, colorectal, lung, esophageal, pancreatic, sarcoma	<i>IGF1R, FBXW7, NFIA</i>
hsa-miR-92a-3p	Colorectal, hepatocellular, breast, gastric, endometrial	<i>BCL2L11, FOXN2, SOX4</i>
hsa-miR-16-5p	Breast, esophageal, gastric, lung, melanoma, pancreatic, ovarian	<i>BCL2, VEGFA, CCNE1</i>
hsa-miR-20a-5p	Lung, colorectal, gastric, hepatocellular, pancreatic	<i>CCND1, TGFBR2, E2F1</i>
hsa-miR-141-3p	Colorectal, hepatocellular, breast, lung	<i>ZEB2, ZEB1, YRDC</i>
hsa-miR-145-5p	Colorectal, hepatocellular, lung, breast, gastric, ovarian	<i>IRS1, FSCN1, POU5F1</i>
hsa-miR-210-3p	Colorectal, breast, lung, pancreatic, glioma, hepatocellular, melanoma, renal, bladder	<i>EFNA3, ISCU, E2F3</i>

**Tab1.** Los 10 miRNA más frecuentemente documentados en el cáncer<sup>21</sup>.

#### 4.5-Células tumorales diseminadas (DTCs)

Las células tumorales diseminadas (DTCs) son células que se disgregan del tumor principal y son capaces de colonizar en otro tejido. Uno de los lugares más comunes donde se pueden encontrar estas DTCs es la médula ósea (MO). Diversos ensayos clínicos se han centrado en el estudio de las DTCs presentes en la MO para poder utilizarlas como marcadores en el seguimiento de pacientes diagnosticados de cáncer. La mayoría de estos estudios se centran en el potencial metastásico post-operatorio en estos pacientes, es decir, en la capacidad latente de estas DTCs<sup>22</sup>.

Las citoqueratinas son los marcadores estándar que se utilizan en la detección de células provenientes de tumores epiteliales en órganos mesenquimales como la MO. Células hematopoyéticas y células del estroma de la MO podrían dar falsos positivos, pero parece ser que la gran mayoría de positivos para citoqueratina tienen un origen epitelial y también la mayoría de las células citoqueratina-positivas presentaban cambios genómicos, indicando así que se tratan de células tumorales. También en estudios de análisis proteómicos recientes se han encontrado que las DTCs expresan fenotipos con perfiles proteicos de estrés de células madre y de TEM permitiendo a las DTCs sobrevivir en ambientes de hipoxia. Curiosamente, los nidos de células madres hematopoyéticas están localizados en las partes donde hay más hipoxia de la MO<sup>22</sup>.

La latencia del cáncer puede representar un estado estable caracterizado por las DTCs ya sea por la imposibilidad de estas de proliferar (por ejemplo, factores de crecimiento importante no se encuentran en el entorno) o por un balance entre la proliferación de las DTCs y su muerte. Este estado de latencia puede cambiar por cambios en las DTCs (más mutaciones o modificaciones epigenéticas) y cambios atribuidos al entorno (aumento de factores de crecimiento, angiogénicos o citoquinas). El medio que se encuentra en la MO tiene características importantes para el mantenimiento de la latencia tumoral de las DTCs como el

equilibrio entra la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos, acogiendo a las DTCs en el nido de células madre hematopoyéticas y la memoria inmunológica de los linfocitos T. Aunque el rol del sistema inmune como componente para controlar la progresión metastásica, aún está bajo debate. Algunas clases de macrófagos también podrían ayudar al desarrollo de la metástasis mediante la facilitación del proceso de angiogénesis y la destrucción de la matriz extracelular. Otros procesos pueden influir en el paso de la latencia a la metástasis como en el cáncer de próstata, el estatus del receptor de GAS6 se asocia a la formación de metástasis en el hueso. También se ha observado que las DTCs latentes en la MO adquieren un fenotipo maligno y de metástasis agresiva durante el proceso de latencia<sup>22</sup>.

Se han realizado varios estudios en pacientes con distintos cánceres para buscar la correlación entre las DTCs y el pronóstico de metástasis después de la terapia o de pasar por un proceso de cirugía. En algunos sí se ha visto esta correlación, pero en los estudios con mayor número de individuos no se han encontrado marcadores de pronóstico significativos. De este modo son necesarias futuras investigaciones sobre esta materia para poder establecer o descartar a las DTCs presentes en la MO como biomarcadores de la latencia tumoral<sup>22</sup>.

## **5-Conclusión**

Gracias a la biopsia líquida se pueden obtener diversos marcadores, de manera no invasiva, que nos pueden servir para el diagnóstico y monitorización del cáncer. De estos marcadores destacan las CTCs las cuales ya sea por los niveles en las que se encuentran en sangre como por la identificación de su expresión génica nos dan una imagen del cuadro tumoral que presenta el paciente, sobre todo información de la agresividad del tumor, posibles tejidos diana en los que se puede producir la metástasis y conocimiento de la aparición de mutantes resistentes a terapias.

Otro marcador que hay que destacar es el ctDNA liberado mayoritariamente por células muertas tumorales que gracias a las nuevas técnicas de secuenciación y detección de ácidos nucleicos es incluso más fácil su identificación que las CTCs, lo que lo convierte en el marcador potencialmente más útil en el diagnóstico del cáncer. Este marcador además, al tener una vida media de horas en el torrente sanguíneo, permite una monitorización del paciente más inmediata pudiéndose ver los efectos de la terapia o de una cirugía curativa en un plazo mucho más corto de tiempo que los demás marcadores expuestos en este trabajo.

Los exosomas también formarían parte de estos marcadores destacables que se pueden obtener por biopsia líquida. Éstos pueden proporcionar la misma información que las CTCs excepto por el hecho de que las CTCs pueden presentar un panorama genético diferente al del tumor primario mientras que los exosomas, aunque también contengan carga genética, el panorama genético solo es representativo de la célula tumoral del que fue expulsado, y de que estos segundos se hallan en mayor cantidad en la sangre. Aunque es un marcador potencialmente muy bueno debido al gran número de exosomas liberados por los tumores, aun se precisan mejoras en el protocolo de obtención de los mismos ya que los que ahora mismo se utilizan requieren de muchos pasos que consumen largos periodos de tiempo.

El estudio de los miRNAs circulantes hay ayudado a la clasificación de distintas familias de estos relacionándolos directamente con el diagnóstico de tumores concretos o de resistencia adquirida a terapias. Aunque parece ser que es uno de los campos donde más se

ha investigado, aun se precisan tabulaciones más concretas de estos pequeños RNAs no codificantes que nos sirvan de guía para un diagnóstico más certero en etapas tempranas del cáncer.

Finalmente los últimos posibles marcadores que nos podría proporcionar la biopsia líquida son la DCTs presentes en la médula ósea. Aunque podrían ser muy útiles a la hora de conocer el grado de latencia del tumor, los estudios realizados con un gran número de individuos aún no han mostrado correlación entre las DTCs y el estado de latencia tumoral.

Si bien estas metodologías y el uso de estos biomarcadores todavía están en fase experimental o de ensayos clínicos, parece ser que la mayor parte de la evidencia científica apunta a que en un futuro no muy lejano se utilizaran a nivel clínico. Cuando la investigación proporcione más consenso sobre este tema, se habrá dado un gran paso en la lucha contra el cáncer ya que habrá un diagnóstico más precoz, una monitorización más certera que proporcione información de cómo evoluciona el tumor, un diseño de terapias personalizadas según las necesidades de cada paciente e incluso se podría llegar desarrollar métodos de prevención que clasifiquen a la población según el riesgo que puedan tener de padecer algún cáncer para evitar que se llegue a producir.

## 6-Referencias Bibliográficas

1. What is cancer? | Cancer Research UK. at <<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>>
2. Chinen, D. *et al.* *Circulating Tumor Cells as Cancer Biomarkers in the Clinic.* (2017). doi:10.1007/978-3-319-55947-6
3. Alix-panabie, C. *Circulating Tumor Cells : Liquid Biopsy of Cancer Mini-Reviews.* **118**, (2013).
4. Strimbu, K. & Tavel, J. A. *What are Biomarkers?* **5**, 463–466 (2011).
5. Alix-panabières, C. & Pantel, K. *Liquid biopsy in cancer patients : advances in capturing viable CTCs for functional studies using the EPISPOT assay* **7159**, (2015).
6. Alix-panabières, C. & Pantel, K. *Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy.* 479–492 (2016). doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1483
7. Physiology, C. *Liquid Biopsy for Cancer : Circulating Tumor Cells , Circulating Free DNA or Exosomes ?* **310003**, 755–768 (2017).
8. Diaz, L. A. & Bardelli, A. *Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA.* **32**, 579–586 (2016).
9. Zhou, B., Xu, J. & Cheng, Y. *Early detection of pancreatic cancer : Where are we now and where are we going ?* 1–39

10. Sidransky, D. Circulating DNA What We Know and What We Need to Learn. 1–4
11. Massihnia, D. *et al.* A headlight on liquid biopsies : a challenging tool for breast cancer management. (2016). doi:10.1007/s13277-016-4856-x
12. Pantel, K. Real-time Liquid Biopsy in Cancer Patients : Fact or Fiction ? **73**, 6384–6389 (2013).
13. Digital PCR - PCR Technologies Guide | Sigma-Aldrich. at <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/digital-pcr.html>>
14. Diehl, F. *et al.* BEAMing : single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. **3**, 551–559 (2006).
15. Harrow, D., Keith, A., Amar, P. & Jara, I. 2 381 505 51. (2012).
16. Shao, H., Chung, J. & Issadore, D. Diagnostic technologies for circulating tumour cells and exosomes. 1–9 (2016). doi:10.1042/BSR20150180
17. Reclusa, P. *et al.* Exosomes genetic cargo in lung cancer : a truly Pandora ' s box. **5**, 483–491 (2016).
18. Minciocchi, V. R., Zijlstra, A., Rubin, M. A. & Vizio, D. Di. Extracellular vesicles for liquid biopsy in prostate cancer : where are we and where are we headed ? 1–8 (2017). doi:10.1038/pcan.2017.7
19. Urbanelli, L. *et al.* Exosome-based strategies for Diagnosis and Therapy. 10–27 (2015).
20. Ibsen, S. D. *et al.* Rapid Isolation and Detection of Exosomes and Associated Biomarkers from Plasma. (2017). doi:10.1021/acsnano.7b00549
21. Matsuzaki, J. & Ochiya, T. Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers : a systematic review. *Int. J. Clin. Oncol.* (2017). doi:10.1007/s10147-017-1104-3
22. Pantel, K. & Alix-panabie, C. Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells : a special source for liquid biopsy in cancer patients. **584**, 1–6 (2014).
23. PCR (reacción en cadena de la polimerasa) digital. at <<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/digital-pcr.html>>
24. Gmbh, S. I., Inostics, S. & Corporation, S. BEAMing Digital PCR Technology Go Beyond Biopsy with Blood OncoBEAM™ Technology : BEAMing Digital PCR OncoBEAM™ : Analytical Sensitivity OncoBEAM™ Advantage : Unparalleled Sensitivity with High Multiplexing Capabilities OncoBEAM™ : The Gold Standard f. 49–50 (2016).