



Universidad
Zaragoza

BIOPSIA LÍQUIDA PARA EL DIAGNÓSTICO Y
TRATAMIENTO DE PRECISIÓN EN CÁNCER
COLORRECTAL: ESTADO ACTUAL Y
PERSPECTIVAS FUTURAS.

LIQUID BIOPSY FOR DIAGNOSIS AND
PRECISION TREATMENT IN COLORECTAL
CANCER: CURRENT STATUS AND FUTURE
PERSPECTIVES.

Autora:

Tejero Pastor, Lucía

Directora:

Piazuelo Ortega, Elena

Facultad de Medicina

Curso 2020/2021

ÍNDICE

• RESUMEN	2
• ABSTRACT	3
• INTRODUCCIÓN.....	4
- Cáncer colorrectal. Epidemiología y etiología	4
- Vías de carcinogénesis colorrectal	4
- Retos en el manejo clínico del paciente con CCR. Potencial de la biopsia líquida.....	6
• OBJETIVOS	10
• MATERIAL Y MÉTODOS	11
• RESULTADOS	12
1. Fundamentos de la biopsia líquida.....	12
1.1. Concepto de biopsia líquida.....	12
1.2. Fluidos biológicos con utilidad como biopsia líquida.....	12
1.3. Tipos de biopsia líquida	14
1.3.1. Células tumorales circulantes	14
1.3.2. Ácidos nucleicos circulantes: ADNC y ARNC	16
1.3.3. Exosomas.....	19
1.3.4. Plaquetas educadas por el tumor.....	22
2. Aplicación clínica de la biopsia líquida en el cáncer colorrectal.....	24
2.1. Diagnóstico precoz. Cribado.....	24
2.2. Pronóstico.....	25
2.3. Monitorización de la respuesta al tratamiento	26
2.4. Caracterización molecular. Mecanismos de resistencia al tratamiento.....	27
2.5. Enfermedad mínima residual	28
3. Líneas de investigación actuales.....	30
3.1. Búsqueda de biomarcadores moleculares para el screening de CCR.....	30
3.2. Ensayos clínicos en desarrollo.....	30
• CONCLUSIONES.....	32
• BIBLIOGRAFÍA.....	33
• ANEXO 1: Glosario de abreviaturas	40
• ANEXO 2: Tabla resumen de los ensayos clínicos en desarrollo	42

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial, debido a su elevada incidencia y mortalidad. A pesar de los avances que se han producido en los últimos años en relación a su diagnóstico y tratamiento, el manejo clínico del CCR requiere de nuevos biomarcadores con alta especificidad y sensibilidad en todos los estadios de la enfermedad. Una de las herramientas de análisis más prometedoras en el paciente oncológico es la biopsia líquida. En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica con el fin de establecer el estado actual del uso de la biopsia líquida en el CCR, así como las líneas de investigación en desarrollo en este campo. La biopsia líquida consiste en el análisis de componentes derivados del tumor a partir de sangre y otros fluidos biológicos, como células tumorales circulantes (CTC), ácidos nucleicos (ADN y ARN) y proteínas circulantes, bien libres o en el interior de exosomas y plaquetas. Las ventajas que ofrece esta novedosa técnica frente a la biopsia clásica de tejido son: mínima invasividad, detección de la heterogeneidad tumoral a nivel genético, bajo coste y rapidez en el procesamiento. En el CCR, existen evidencias de su utilidad en la detección precoz del cáncer y la enfermedad mínima residual, para establecer el pronóstico, monitorizar la respuesta al tratamiento, predecir recaídas y metástasis de forma precoz, así como la resistencia al tratamiento. Esta estrategia puede suponer un cambio de paradigma en el diagnóstico y tratamiento del CCR, evitando efectos secundarios innecesarios y minimizando los costes en salud. Sin embargo, se necesitan estudios prospectivos que resuelvan los problemas encontrados, especialmente la falta de consenso en las fases pre-analítica y analítica, las bajas cantidades de CTC y ctADN obtenidos en la muestra, así como la validación clínica. Los resultados de los numerosos estudios y ensayos clínicos que se están desarrollando contribuirán a establecer definitivamente el papel de la biopsia líquida en este tumor.

Palabras clave:

Cáncer colorrectal, biopsia líquida, células tumorales circulantes, ADN circulante tumoral, ARN circulante tumoral, exosomas, plaquetas educadas por el tumor, biomarcadores.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a major global public health problem due to its high incidence and mortality. Despite the advances that have occurred in recent years in terms of diagnosis and treatment, the clinical management of CRC requires new biomarkers with high specificity and sensitivity in all stages of the disease. One of the most promising screening tools in oncological patients is liquid biopsy. A bibliographic review was carried out in order to establish the current status of the use of liquid biopsy in the CRC, as well as the lines of research under development in this field. Liquid biopsy is characterized by the analysis of tumor-derived components, such as circulating tumor cells (CTC), circulating nucleic acids (DNA and RNA) and circulating proteins, either free or inside exosomes and platelets. The advantages offered by this novel technique are: minimal invasiveness, detection of the tumor heterogeneity, low cost and speed in processing. In the CRC, there is evidence of its usefulness in the early detection of cancer and minimal residual disease, to establish prognosis, monitor treatment response and predict relapse and metastasis, as well as treatment resistance. This strategy may represent a paradigm shift in the diagnosis and treatment of CRC, sparing unnecessary side effects and minimizing health costs. However, large prospective studies are needed to resolve the problems found, especially the lack of pre-analytical and analytical consensus, the low amounts of CTCs and ctDNA obtained in samples, as well as clinical validation. The results of the numerous studies and clinical trials that are being developed will contribute to definitively establish the role of liquid biopsy in this tumor.

Key words:

Colorectal cancer, liquid biopsy, circulating tumor cells, circulating tumor DNA, circulating tumor RNA, exosomes, tumor-educated platelets, biomarkers.

INTRODUCCIÓN

Cáncer colorrectal. Epidemiología y etiología.

Se denomina CCR a los tumores malignos que se originan en el colon o en el recto. Dado que comparten muchas características en común, en la práctica clínica se engloban ambas localizaciones bajo el término CCR. Constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial, siendo uno de los tumores sólidos más frecuentes en países desarrollados. Según los datos publicados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, es el tercer tumor más frecuente del mundo (1.93 millones de nuevos casos/año; 10% de todos los tumores), únicamente superado por el de pulmón y mama (1). Por sexos, es el tercer tumor más frecuente en hombres, detrás de los de pulmón y próstata, y el segundo más frecuente en mujeres, tras el de mama. Se prevé que en 2040 se alcance la cifra de 3.04 millones de casos de CCR en el mundo (2). El número de muertes por CCR a nivel mundial en 2020 fue de 935.173 personas, lo que supone un 9,4% de todas las muertes producidas por cáncer (1). Las previsiones para 2040 son de 1.59 millones de muertes por este cáncer. (2)

Existen diversos factores que incrementan el riesgo de sufrir CCR, el más importante de todos es la edad. El 90% de los pacientes tienen más de 50 años al diagnóstico. La mayoría de casos son esporádicos, aunque la presencia de factores genéticos puede favorecer el desarrollo de este tumor, ya que un 30-35% de los pacientes tienen antecedentes familiares de CCR, si bien sólo un 3-5% de los CCR se relacionan con la existencia de mutaciones germinales en genes bien conocidos, como es el caso del síndrome de Lynch o del síndrome polipósico adenomatoso familiar (3). Otra enfermedad relacionada con el CCR es la colitis ulcerosa por enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (4). También influyen los factores ambientales, como la dieta alta en grasas, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol y la reducida actividad física. Por el contrario, una mayor ingesta de fibra y verduras de hoja verde, el aporte de calcio, vitamina D y ácido fólico, actúan como factores protectores contra el desarrollo de este cáncer. Farmacológicamente se ha demostrado que el uso de aspirina, estatinas o la terapia hormonal en mujeres postmenopáusicas tienen un efecto beneficioso si se asocia a un estilo de vida saludable. (5)

Vías de carcinogénesis colorrectal

La mayoría de CCR se desarrollan a partir de un pólipo existente en la mucosa colorrectal que tras la acumulación progresiva de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas acaban desencadenando el carcinoma. Los pólipos colorrectales se clasifican según sus características histológicas en adenomatosos (60-70%), hiperplásicos o serrados (10-30%) y misceláneos (que incluye pólipos inflamatorios, hamartomatosos y lesiones no mucosas).

Las alteraciones genéticas que hacen que un pólipo malignice pueden ser muy variadas: desde un cambio de nucleótido, inserciones y deleciones de pequeñas secuencias a amplificaciones de genes o pérdidas o ganancias de cromosomas enteros. Las alteraciones epigenéticas incluyen cambios en la metilación del ADN (que controla la expresión génica), de forma que zonas del genoma que normalmente están metiladas se desmetilan (hipometilación global) y otras que normalmente no están metiladas se hipermetilan, como las denominadas islas CpG en la región promotora de genes que controlan funciones celulares clave en el desarrollo del cáncer. Existen tres mecanismos moleculares principales asociados a CCR: inestabilidad cromosómica (CIN), inestabilidad de microsatélites (MSI) y fenotipo metilador de la isla CpG (CIMP) (6) :

- La **vía de inestabilidad cromosómica o vía supresora** es el mecanismo más común en el CCR esporádico (70-85%) y explica también los casos de Poliposis Adenomatosa Familiar. Se producen cambios en el número de copias y en la estructura de los cromosomas, dando lugar a mutaciones en protooncogenes y en genes supresores. Las mutaciones en el gen supresor APC sería el factor que iniciaría esta vía.
- La **vía de inestabilidad de microsatélites o vía mutadora**, se produce por deficiencia del sistema reparador de ADN (MMR: ADN mismatch repair). Este sistema está formado por 7 genes: hMLh1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1, hPMS2; con más de 500 mutaciones descritas. La alteración de este sistema conduce a la acumulación de alteraciones de los microsatélites que están distribuidos a lo largo de todo el genoma. Se relaciona con el 15% de los casos de CCR y con el cáncer hereditario no polipósico.
- El **vía serrada o fenotipo metilador** se produce por la metilación de las islas CpG en la región promotora de genes supresores de tumores, inhibiendo su expresión. Se ha visto implicada hasta en un 20-35% de los CCR. Este mecanismo epigenético se relaciona con la mutaciones en los genes BRAF y KRAS.

Estas vías no son excluyentes entre sí, de forma que en un elevado porcentaje de tumores coexisten la vía supresora o la mutadora con un fenotipo metilador, lo que contribuye a la enorme heterogeneidad fenotípica y genotípica que presenta este tumor.

Fearon y Vogelstein desarrollaron una teoría del proceso de tumorigénico, llamado secuencia adenoma-carcinoma, que propone que el CCR se produce por el acúmulo de mutaciones en genes con importantes funciones, cuya secuencia mutacional es fundamental en la determinación de la progresión tumoral. Durante la carcinogénesis los genes supresores de tumores son inactivados, mientras que los oncogenes son activados promoviendo la proliferación tumoral. (7) El desarrollo de CCR por las vías supresora y mutadora siguen este modelo, a diferencia de la vía serrada que no sigue esta secuencia.

Los genes más importantes en la génesis del CCR son: APC, KRAS, BRAF, TP53; PIK3CA y SMAD4. También existen diferentes cascadas de señalización implicadas, la más común es la WNT que ocurre en la mayoría de genes APC mutados. Esta vía es muy importante para la correcta homeostasis del epitelio intestinal; además, es fundamental su asociación con la mutación KRAS para la progresión tumoral (6). Por otro lado, la casada PIK3 también se asocia a la mutación KRAS, facilitando la angiogénesis tumoral y el desarrollo de colonias metastásicas. (8)

El gen RAS se define como el conjunto de genes KRAS, NRAS y HRAS, los cuales codifican para proteínas de membrana con actividad GPTasa. Desempeñan distintas funciones como proliferación, adhesión, migración celular, apoptosis... Las mutaciones RAS ocurren en el dominio de unión a GPT, lo que impide su liberación manteniendo la proteína funcionalmente activa, dando lugar a la activación aberrante de las rutas de señalización RAS-RAF-MAPK-EGFR, con el consiguiente aumento de la angiogénesis y proliferación, disminución de la apoptosis y alteración del metabolismo (9). El oncogen BRAF forma parte de la ruta de señalización MAPK. Sus mutaciones son menos frecuentes y son excluyentes de la mutación en RAS. (10)

Retos en el manejo clínico del paciente con CCR. Potencial de la biopsia líquida.

El cribado de CCR es una estrategia altamente costo-efectiva que ha ayudado a disminuir la incidencia y mortalidad del cáncer (11). El test de sangre oculta en heces (SOHi) bianual, es la primera técnica de screening realizada en individuos mayores de 50 años. Si este resulta positivo se lleva a cabo una colonoscopia, que se considera el “gold standard” y se hace cada 10 años. La ventaja de esta técnica es la posibilidad de extirpar la lesión en el momento diagnóstico; es decir, es diagnóstica y terapéutica. Las limitaciones son: la preparación previa del paciente, el uso de anestesia y sedación y la invasividad, con el riesgo de sangrado o perforación. La sigmoidoscopia solo permite explorar la parte distal del colón, se recomienda realizarla cada 5 años y si se obtiene un resultado positivo se debe completar el estudio con la colonoscopia. Su ventaja es evitar el uso de anestesia. Por último, el test de ADN en heces, un novedoso método diseñado como screening cada 3 años; aunque de momento solo está disponible el test Cologuard. (5)

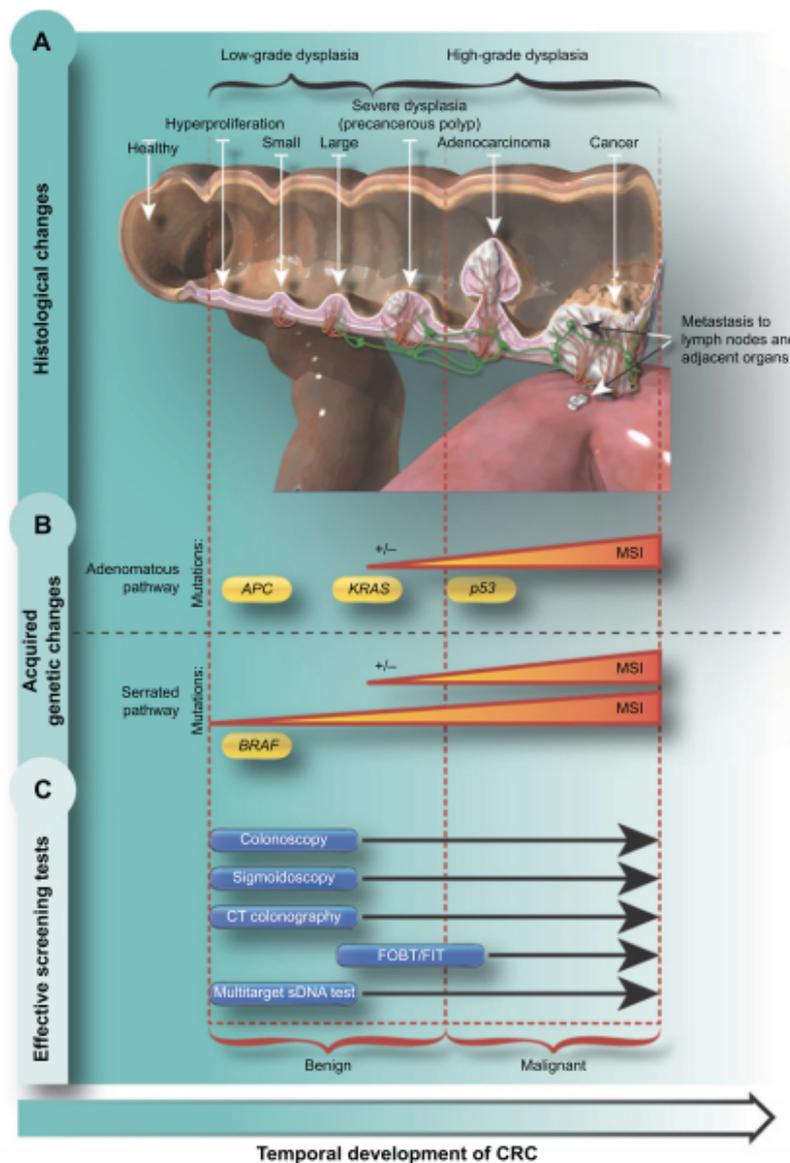


Figura 1. Desarrollo del CCR y métodos de screening. (5)

Aunque los programas de cribado son útiles en la reducción de la incidencia y mortalidad del cáncer, la mayoría de pacientes diagnosticados de CCR son aquellos que acuden a Atención

Primaria, fuera del programa de cribado, por la presencia de síntomas digestivos (11). La detección del CCR en estadios iniciales es un gran reto para el sistema sanitario, ya que la tasa de supervivencia a los 5 años de aquellos individuos diagnosticados en estadios precoces es del 90%, mientras que, en los de estadios avanzados esta tasa se reduce al 13.1% (5). El CCR, al igual que otros tumores sólidos, libera células tumorales al torrente circulatorio, así como microvesículas, o ácidos nucleicos, que podrían ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico precoz y la estratificación de individuos con cáncer. (3)

Una vez detectado el cáncer, el diagnóstico definitivo se obtiene mediante una fibrocolonoscopia y una TAC. La primera permite el análisis anatomopatológico de la muestra y el análisis molecular; la segunda sirve para realizar el estudio de extensión y la estadificación (TNM), explicada en la Tabla 1. (12)

ESTADIO AJCC	ESTADIO TNM	CRITERIOS
Estadio 0	Tis N0 M0	Cáncer in situ o intramucoso
Estadio I	T1 N0 M0	Invade la submucosa
	T2 N0 M0	Invade la musculatura propia
Estadio II	II-A: T3 N0 M0	Invade subserosa o pericólico/perirrectal , no peritoneo visceral
	II-B: T4a N0 M0	Invade peritoneo visceral, no estructuras adyacentes
	II-C: T4b N0 M0	Invade órganos o tejidos adyacentes
Estadio III	III-A: T1,2 N1 M0	T1-2 N1: Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
	III-B: T3,4 N1 M0	T3-4N1: Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
	III-C: Cualquier T N2 M0	Cualquier T N2: Metástasis de 4 o más ganglios linfáticos
Estadio IV	IV-A: Cualquier T y N, M1a	Cualquier T y N; M1:Metástasis a una sola parte del cuerpo, como hígado o pulmones
	IV-B: Cualquier T y N, M1b	Cualquier T y N, M1b: diseminación a más de una parte del cuerpo
	IV-C: Cualquier T y N, M1c	Cualquier T y N, M1c: diseminación a peritoneo, pueden existir metástasis en otros lugares también.

Tabla 1: Estadificación del CCR (12)

La biopsia del tejido tumoral es el método de referencia utilizado en la práctica clínica para definir la histología del tumor, así como su perfil genético, lo que permite establecer el pronóstico y predecir la respuesta al tratamiento. Sin embargo, la biopsia tisular proporciona una visión estática del tumor. Dado que tanto el tumor como las metástasis del mismo contienen diferentes poblaciones celulares con diferentes niveles de heterogeneidad a nivel fenotípico y genético, el análisis de una única biopsia es insuficiente para seleccionar el adecuado manejo terapéutico.

Por otra parte, el manejo terapéutico del CCR es diferente en función del estadio y del perfil genético del tumor. La resección quirúrgica es el tratamiento de elección. La terapia adyuvante se recomienda para los pacientes en estadio II y III con factores clínico-patológicos de alto riesgo. En el CCR metastásico (CCRm) las opciones terapéuticas están representadas por las drogas antiproliferativas y antiangiogénicas (antagonistas del receptor de VEGFR –Bevacizumab o del EGFR-Cetuximab, Panitumumab) frecuentemente en asociación con quimioterapia estándar (Fluororacilo, Oxalipatino, Irinotecan, Capecitabina). La terapia molecular dirigida se ha asociado con un aumento significativo de la supervivencia de los pacientes con CCRm (13). Sin embargo, el CCR se caracteriza por tener un perfil genético muy heterogéneo y cambiante debido al desarrollo de nuevas mutaciones y alteraciones epigenéticas durante el tratamiento que lo hacen resistente al mismo.

Uno de los hitos de los últimos años en el tratamiento del CCR metastásico ha sido la identificación del estado mutacional de KRAS como factor predictivo al tratamiento dirigido contra el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). Alrededor del 40% de pacientes con CCRm presentan mutaciones en KRAS, lo que implica la ausencia de respuesta a los inhibidores de EGFR. Además, la presencia de mutaciones en BRAF que aparece en 10% de los casos, se asocia con peor pronóstico mientras que los tumores con inestabilidad de microsatélites alta tienen mejor pronóstico, si bien se ha visto que no responden al fluorouracilo, por lo que en la actualidad la decisión terapéutica debe ir precedida del estudio molecular del tumor. (14)

Tras el tratamiento completo del CCR es importante establecer un plan de seguimiento. En la actualidad, durante los 2-3 primeros años se recomienda realizar visitas médicas y monitorizar el marcador tumoral CEA cada 3 meses. Se puede realizar una TC cada año e individualizar el seguimiento según los hallazgos. Además, al año de la intervención se debe realizar una colonoscopia (o a los 6 meses si la cirugía no fue completa) y repetirla a los 2-3 años si no presenta alteraciones. (12)

Una herramienta que podría servir para superar todas estas limitaciones que presenta el manejo clínico del paciente con CCR es la denominada biopsia líquida, es decir, el análisis de biomarcadores tumorales a partir de sangre u otros fluidos biológicos. La definición de biomarcador fue introducida en Ginebra en 2001 por un comité de expertos de la OMS, que lo definieron como “cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda ser medido en el cuerpo o sus productos e influir y predecir la incidencia de un resultado clínico o una enfermedad” (15)

Las nuevas investigaciones relacionadas con la biopsia líquida están cobrando especial interés como seguimiento de la respuesta al tratamiento y la detección de la enfermedad residual mínima y el riesgo de recurrencia (16). En este sentido, las mutaciones detectadas en el ADN tumoral circulante (ADNtc) en sangre son útiles para prescribir una terapia tumoral individualizada en aquellos casos donde la biopsia convencional no haya representado de forma completa la heterogeneidad tumoral o cuando una sola muestra no sea suficiente para realizar todas las pruebas necesarias. La vida media del ADNtc es menor de dos horas, lo que permite detectar cambios en el genoma tumoral en tiempo real, y así anticiparse a la aparición de la recaída clínica debido al desarrollo de resistencias contra el tratamiento. De esta misma manera, se puede predecir la aparición de posibles metástasis, e incluso, está superando a los antígenos del cáncer, como por ejemplo el antígeno carcinoembrionario (CEA), en la detección de la enfermedad residual y recurrencias. Se ha demostrado que el ADNtc detecta mutaciones en el gen KRAS, que promueven resistencias contra las terapias dirigidas a EGFR, o en el gen BRAF; por lo tanto,

además de tener un importante papel en la priorización del tratamiento inicial, también detecta posibles resistencias y sugiere el uso de terapias de segunda línea cuando estas aparecen. (17)

Como ya se ha comentado anteriormente, la biopsia tradicional de tejido es la empleada en la actualidad para el diagnóstico del cáncer. Esta técnica presenta numerosas limitaciones: es de naturaleza invasiva, lo que supone mayor riesgo y dolor para el paciente, en ocasiones el tumor es inaccesible o está contraindicada; todo ello dificulta la posibilidad de llevar un seguimiento longitudinal de la evolución del tumor (18). Además, con esta técnica es difícil captar la heterogeneidad tumoral porque ofrece un retrato del tumor en un solo punto y no de todo el órgano, lo que se denomina sesgo de muestra y conlleva una disminución de la sensibilidad y precisión de los resultados.

En los últimos años los laboratorios y grupos de investigación están haciendo grandes esfuerzos para impulsar el uso de la biopsia líquida. Las ventajas de este método diagnóstico en comparación con la biopsia convencional son: menor invasividad, menor coste, mayor rapidez y mejor indicador de la heterogeneidad tumoral. Además, en relación con la “medicina personalizada”, la biopsia líquida da la posibilidad de realizar un seguimiento de la respuesta y/o resistencias al tratamiento en tiempo real, permitiendo adaptar el régimen de tratamiento a cada individuo de forma individualizada.

BIOPSIA LÍQUIDA	BIOPSIA TISULAR
<input type="checkbox"/> Mínimamente invasiva	<input type="checkbox"/> Invasiva
<input type="checkbox"/> Fácil obtención de fluidos	<input type="checkbox"/> Alto coste
<input type="checkbox"/> Bajo coste	<input type="checkbox"/> Dificil obtención en ocasiones
<input type="checkbox"/> Procesamiento rápido	<input type="checkbox"/> Procesamiento largo
<input type="checkbox"/> Baja tasa de fracaso	<input type="checkbox"/> Mala tolerancia
<input type="checkbox"/> Buena tolerancia durante tratamiento	<input type="checkbox"/> No valora la heterogeneidad
<input type="checkbox"/> Heterogeneidad tumoral	<input type="checkbox"/> Dificil monitorizar la respuesta
<input type="checkbox"/> Monitorización de la respuesta	

Tabla 2: Ventajas e inconvenientes de la biopsia líquida en comparación con la biopsia tisular convencional.

Dado el potencial que presenta la biopsia líquida en relación al manejo clínico del paciente con CCR en todos los estadios de la enfermedad, y los importantes avances tecnológicos que se han realizado en este campo en los últimos años, hemos planteado este trabajo con el fin de establecer cual es el estado actual del uso de la biopsia líquida en el CCR, así como las líneas de investigación que se están desarrollando en este campo.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido revisar la evidencia científica disponible en relación a:

- Las bases biológicas, los diferentes tipos de biopsia líquida, así como las técnicas analíticas que se están utilizando en la actualidad en el campo de la oncología.
- Las aplicaciones actuales de la biopsia líquida en el diagnóstico, manejo terapéutico y seguimiento del paciente con CCR.
- Las líneas de investigación que se están desarrollando en el campo de la biopsia líquida en CCR.

MATERIAL Y METODOS

Para la consecución de los objetivos del trabajo, se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos: PubMed, Scielo, Science Direct y Tripdatabase. También se utilizó el buscador Google Académico. Además, se ha consultado en otras fuentes como la página web de la Internacional Agency for Research on Cancer (IARC).

Los términos de búsqueda empleados fueron: “liquid biopsy”, “colorectal cancer”, “circulating tumor cells”, “circulating nucleic acids”, “exosomes” y “tumor-educated platelets”. Se emplearon operadores booleanos “and” y “or”, para relacionar los conceptos o ampliar los resultados de la búsqueda. Se añadieron filtros para refinar la búsqueda como el idioma en inglés o español y el año de publicación, que se fijó del 2011 al 2021, aunque se incluyeron algunos artículos previos a esta fecha pero de importancia histórica.

El contenido de los artículos encontrados se evaluó por su calidad y adecuación a los objetivos planteados mediante el análisis de objetivos, diseño, resultados y conclusiones. Se completó la búsqueda con la lectura y rastreo de bibliografía referenciada en los documentos seleccionados, lo que dio lugar finalmente a 102 referencias. Se incluyeron tanto estudios observacionales (revisiones sistemáticas, revisiones bibliográficas, metaanálisis) como experimentales.

Para responder al tercer objetivo del trabajo se ha realizado una búsqueda de los ensayos clínicos y estudios observacionales en desarrollo actualmente, y por tanto todavía no han sido publicados, mediante la base de datos ClínicaTrial.gov utilizando los términos de búsqueda “liquid biopsy”, “colorectal cáncer” “circulating tumor cells” y “circulating tumor DNA”. Se realizó una selección de aquellos que incluían una mayor número de pacientes y se elaboró una tabla resumen con los 35 estudios de mayor relevancia clínica.

RESULTADOS

1. FUNDAMENTOS DE LA BIOPSIA LÍQUIDA

1.1. CONCEPTO DE BIOPSIA LÍQUIDA

El término “biopsia líquida” fue concebido por Klaus Pantel y Alix-Panabières para designar el estudio de células tumorales circulantes en sangre de pacientes con cáncer (19); si bien, hoy en día, la biopsia líquida engloba también el estudio de otro tipo de material liberado por el tumor como ácidos nucleicos o vesículas extracelulares. Así pues, podemos definir la biopsia líquida como el análisis de material liberado a la sangre u otros fluidos biológicos, por el tumor primario o por las metástasis, y obtenido mediante métodos mínimamente invasivos o no invasivos. (20)

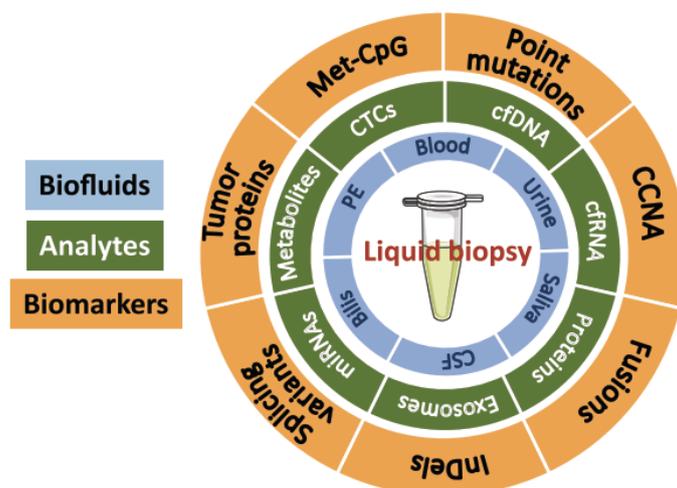


Figura 2: Fluidos biológicos, analitos y biomarcadores englobados en la biopsia líquida. (21)

1.2. FLUIDOS BIOLÓGICOS CON UTILIDAD COMO BIOPSIA LÍQUIDA

La biopsia líquida engloba a cualquier fluido biológico que contenga material tumoral que pueda ser analizado para obtener información del tumor. La selección de uno u otro dependerá de la localización y accesibilidad de la muestra.

La muestra más comúnmente utilizada es la de **sangre** periférica, en concreto, plasma sanguíneo. Se recogen unos 15-20 ml de sangre mediante venopunción en tubos de anticoagulante. Es recomendable procesar la muestra en las primeras 4-6 horas, aunque existen tubos con estabilizante que permite mantener las muestras íntegras mayor tiempo (22). Debido a la vascularización que tienen los tumores, en sangre podemos encontrar cantidades detectables de diferente material tumoral (ácidos nucleicos, proteínas, células tumorales, vesículas extracelulares).

La **saliva** aporta un ADN genómico de gran calidad comparable al del plasma (23). La presencia de ADN tumoral en saliva está altamente relacionada con el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). Se ha demostrado que la saliva tiene mayor sensibilidad en estadios tempranos de la enfermedad que el plasma, se logró una detección del 100% en saliva frente al 70% en plasma (24). De la misma manera, el **esputo** podría servir como muestra para el diagnóstico del cáncer pulmonar.

La **orina** contiene proteínas, vesículas extracelulares, así como ADN tumoral. Este ADNtc, también llamado ADN transrenal (tr-ADN), proviene del aclaramiento renal del ADNlc en sangre o de la células tumorales en el tracto urinario (23). Distintos estudios realizados en pacientes con cáncer, genitourinarios o no, han demostrado la posibilidad de analizar mutaciones puntuales utilizando ADNtr. Así, por ejemplo, se han detectado mutaciones de KRAS en pacientes con cáncer de páncreas y colorrectal avanzado. (25)

El **líquido cefalorraquídeo** (LCR), es de gran utilidad en los pacientes con tumores intracraneales o metástasis cerebrales, ya que, debido a la barrera hematoencefálica, los niveles de marcadores tumorales en sangre son mínimos o nulos (23,26). Se ha descrito la presencia de ADNtc, miARN y células tumorales en LCR. El principal inconveniente es que la punción lumbar es invasiva, pero es una técnica realizada rutinariamente en pacientes con tumores cerebrales (25).

En el CCR, el fluido más relevante además de la sangre, son las **heces**. El análisis de ADN en heces ofrece una mayor sensibilidad para la detección de neoplasias colorrectales proximales y distales, en comparación con los métodos convencionales. Además, gracias a los avances técnicos se están desarrollando tecnologías cada vez más precisas para su detección. Estudios basados en este método de diagnóstico, que incluye múltiples marcadores, como marcadores metilados y mutacionales y la evaluación de la hemoglobina fecal, detectan el CCR con una sensibilidad del 85% y el 60% de adenomas mayores de 1cm (27). Imperiale et al. desarrollaron un estudio transversal para demostrar la sensibilidad del análisis de ADN en la detección del CCR (92,3%) y de lesiones precancerosas avanzadas (42,4%), que superaba a la FIT. (28)

Otros fluidos de los que podrían obtenerse muestras para la biopsia líquida son: el **líquido pleural** y **lavado broncoalveolar**, para el diagnóstico de tumores del sistema respiratorio (25); el **líquido ascítico**, en el que se ha detectado ADNtc en pacientes con cáncer metastásico (29); o el **líquido seminal**, en el que se detectan niveles de ADNtc, PSA o miARNs muy superiores a los de la sangre en el cáncer prostático. (23)

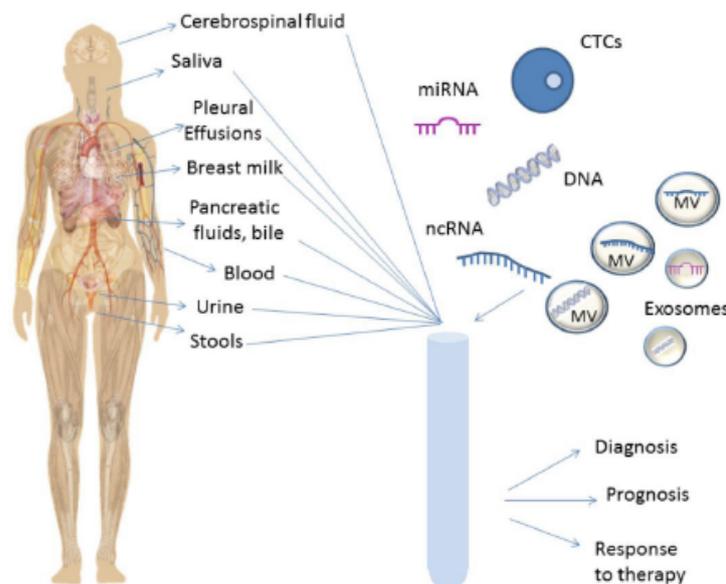


Figura 2: Principales fluidos biológicos analizados mediante biopsia líquida y sus principales componentes tumorales. (30)

1.3. TIPOS DE BIOPSIA LÍQUIDA

1.3.1. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

Las células tumorales circulantes (CTCs) son células presentes en la sangre que proceden del tumor primario o las metástasis (21). Fueron descritas por primera vez en 1896 por Thomas Ashworth, un patólogo australiano, que describió la presencia en sangre de células con características morfológicas similares a las células tumorales durante una autopsia de un paciente fallecido por cáncer (31). Sin embargo, no es hasta los años 90 cuando se despertó el verdadero interés por las CTCs, cuando Racila et al. desarrollaron una técnica de enriquecimiento inmunomagnético para su detección. (32)

Las CTCs son extremadamente infrecuentes, encontrándose en sangre en un número que varía entre 1-10 CTCs/ 10^6 - 10^7 células sanguíneas, una vida media en la circulación de 2,5 horas, y gran heterogeneidad (21), lo que hace que su detección presente dificultades a nivel metodológico. En los últimos años, se han realizado importantes avances tecnológicos que han permitido que en la actualidad ya se estén utilizando en el manejo clínico del paciente oncológico.

Se han descrito dos mecanismos de liberación de CTCs al torrente sanguíneo o linfático, que constituyen el primer paso en la diseminación de las células tumorales. La primera se realiza mediante la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la segunda, por liberación pasiva del tumor primario. El fenómeno de EMT es un proceso biológico por el cual las células epiteliales adquieren progresivamente características fenotípicas de células mesenquimales que les confieren la capacidad de migrar. Esta transición es gradual y comienza con la desaparición de las uniones intercelulares y la pérdida de polaridad de las células epiteliales. Posteriormente hay reorganización de la actina del citoesqueleto, adquiriendo las células capacidad migratoria e invasiva, a través de la formación de lamelipodios, filopodios e invadopodios y la expresión de metaloproteinasas. A nivel molecular se producen cambios en la expresión génica, destacando la pérdida de E-cadherina y la ganancia de N-cadherina (33). Estos cambios de expresión a lo largo del proceso metastásico hacen que no exista un marcador universal de CTCs.

La mayoría de las CTCs mueren debido al sistema inmune o al estrés oxidativo, haciendo que el proceso metastásico sea muy poco efectivo. No obstante, los agregados celulares de CTCs sí tienen un gran potencial metastásico, aunque son muy poco frecuentes. Estos agrupamientos contienen entre 2 y 50 células, plaquetas, células inmunes y fibroblastos que favorecen su supervivencia. (21)

Existen diferentes técnicas de aislamiento de CTCs, que se basan en sus propiedades biológicas o físicas. Es importante controlar aquellas variables pre-analíticas que influyen en el análisis, como el tubo de extracción de sangre, el tiempo transcurrido hasta realizar el procesamiento o la temperatura de almacenamiento, que vendrá determinado por el tipo de aplicación que se realice (contaje, cultivo, generación de xenoinjertos...). (21)

Las técnicas basadas en las propiedades biológicas se fundamentan en la expresión de marcadores de superficie celular, pudiendo distinguirse las que realizan una selección positiva, es decir el aislamiento de las propias CTCs, o negativa, dirigido a las células “no CTC”. La primera se basa en la detección de antígenos específicos en la superficie tumoral, generalmente moléculas de adhesión celular (EpCAM) y citoqueratinas (CK18, CK19 y CK8) o incluso, en la propia morfología epitelial, lo cual permite diferenciar a las CTC del resto de células sanguíneas. Sin embargo, mediante la transición EMT, las CTC expresarán marcadores EMT conocidos (TFG β ,

vimentina, N-cadherina) o marcadores de células madre (ALDH7Aq, Cd44, KLF4), perdiendo así sus marcadores epiteliales y morfología característica; lo que supone una limitación en este mecanismo de detección. Por el contrario, la selección negativa se basa en detectar antígenos expresados por las células sanguíneas, dejando intactas las CTCs y eliminando las células no tumorales. En este caso se utiliza el antígeno CD45, que se expresa en células hematopoyéticas, y la principal diferencia radica en que se aíslan todas las subpoblaciones de CTCs juntas, mientras que en la selección positiva se aíslan subpoblaciones específicas de CTCs. (21)

El sistema CellSearch (Menarini Silicon Biosystems), el único aprobado en la actualidad por la US Food and Drug Administration (FDA), es una herramienta para medir la cantidad de CTC en sangre a través del enriquecimiento de EpCAM, las citoqueratinas citadas y CD45; es decir, combina el proceso de selección positiva y negativa (33). Se trata de una técnica útil como predictor pronóstico en cáncer metastásico de mama, próstata y colon. En cáncer de mama o próstata, los pacientes con más de 5 células tumorales por cada 7,5ml de sangre, tienen mayor probabilidad de presentar mala respuesta clínica; para el cáncer de colon, el límite de CTCs se establece en 3, por encima del cual la probabilidad de supervivencia disminuye. (34)

Las propiedades físicas hacen referencia a la diferencia en tamaño, densidad, deformabilidad o propiedades eléctricas de las CTCs, respecto a las células del torrente sanguíneo. Las células tumorales presentan un mayor tamaño, una densidad similar a las células sanguíneas nucleadas y una mayor capacidad de deformación. (21)

La caracterización molecular de las CTCs puede proporcionar información relevante en relación al tratamiento del tumor (33). Por ejemplo, existe un test que permite identificar pacientes resistentes a la castración, tratamiento necesario en el cáncer de próstata; este test consiste en detectar en CTCs, la expresión de la proteína AR-V7, una variante del receptor androgénico. (35)

Existen diferentes estrategias de expansión de las CTCs para poder realizar ensayos funcionales. El cultivo *ex vivo* de las CTCs es una valiosa herramienta para evaluar la respuesta frente a diferentes tratamientos, así como el estudio del genoma, transcriptoma, epigenoma y proteoma del tumor. El problema para realizar estos estudios *in vitro*, es la dificultad para encontrar pacientes con elevadas cantidades de CTCs o de tecnologías con una gran sensibilidad y especificidad. Hasta la fecha, se ha conseguido cultivar CTCs de algunos tipos de cáncer de forma transitoria durante períodos cortos de tiempo. En cáncer de colon se ha conseguido el establecimiento de una línea permanente (CTC-MCC-41) a partir de CTCs que mantiene las características del tumor primario (36). Otra alternativa son los modelos de xenoinjerto derivados de CTCs, inyectando las CTCs aisladas del paciente en el ratón, o implantando directamente un fragmento del tumor y una vez que ha crecido, aislar y cultivar las CTCs para realizar ensayos funcionales. El modelo de xenoinjertos de CTCs permite imitar la complejidad y heterogeneidad molecular del cáncer, además de evaluar terapias personalizadas *in vivo*. No obstante, en algunas ocasiones es difícil obtener muestra suficiente. (33)

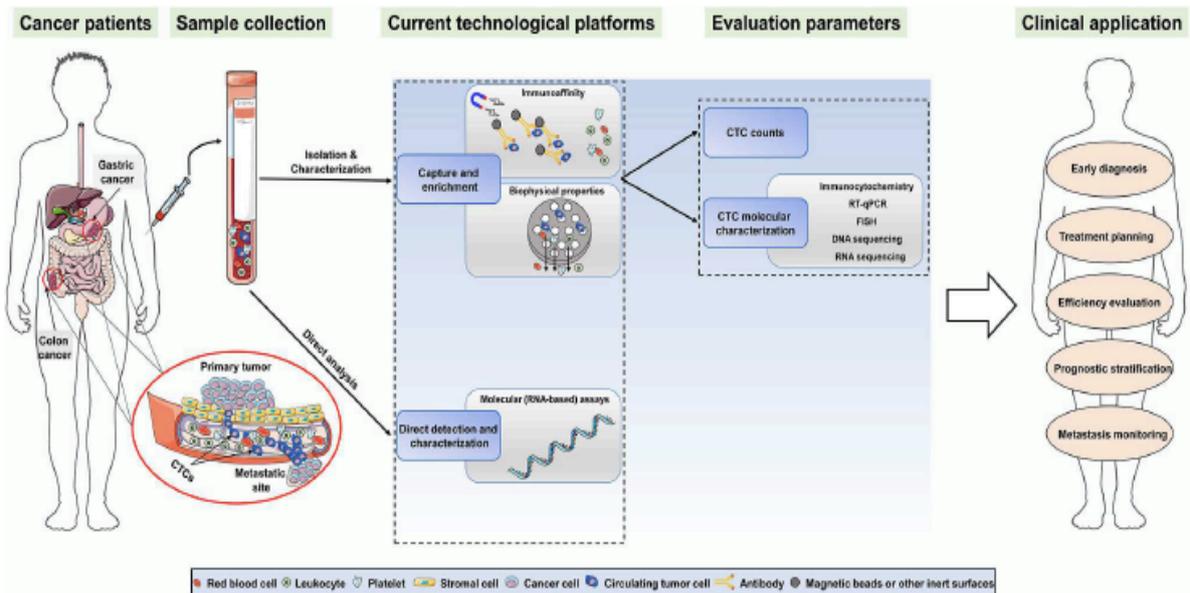


Figura 3: Descripción general de las técnicas de detección de CTCs y las posibles aplicaciones clínicas en el cáncer colorrectal. (37)

En resumen, las células tumorales tienen un papel clave en la biología del cáncer y su análisis sirve para obtener información acerca de la enfermedad mínima residual, ya que se liberan CTCs durante meses tras el tratamiento curativo (33). En la práctica clínica existen obstáculos para la implantación de estos métodos, a pesar de las numerosas plataformas dedicadas a ello y la existencia de un gran número de publicaciones relacionadas con este tema. Es necesario conocer de forma más precisa los factores que influyen en la diseminación y eliminación de las CTCs, para así mejorar en la interpretación de los resultados.

1.3.2. ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTES: ADNc, ARNc

a) ADN CIRCULANTE

Todas las personas tienen moléculas de ADN libre circulante en sangre, liberado como consecuencia de procesos de muerte celular, como la apoptosis y necrosis, o por secreción celular activa, especialmente derivado de los linfocitos (38). En pacientes oncológicos, parte de este ADN corresponde a ADN tumoral circulante (ADN_tc), el cual permite una visión global del genoma tumoral, ya que refleja el ADN liberado por distintas regiones del tumor procedentes, incluso, de diferentes focos tumorales (34). En 1948 Mandel y Metais fueron los primeros en documentar la existencia de este ADN soluble en sangre (39). El verdadero impacto surgió treinta años después, cuando Leon et al. demostraron la relación entre los pacientes con cáncer y los niveles de ADN_tc, y analizaron también la respuesta al tratamiento a partir del nivel de ADN_tc.(40)

La concentración de ADN_tc en personas sanas es de 10-15 ng/ml (41). Estas cantidades no son constantes, varían entre individuos y por su situación fisiopatológica. Por ejemplo, pacientes con tumores en un estadio temprano tienen concentraciones similares a la de los sujetos sanos; sin

embargo, puede elevarse en aquellos con cáncer avanzado, al igual que en enfermedades autoinmunes, traumatismos, sepsis, ejercicio físico o embarazo (21); además, la carga de ADNtc también varía entre distintas personas con el mismo tipo de cáncer, y del estadio del tumor pudiendo llegar a ser <0.01% del total de ADNtc en los estadios iniciales del cáncer, siendo mucho más abundante cuando hay metástasis. (34)

La mayoría de estudios han extraído la muestra de sangre de las venas periféricas, por lo que no se sabe con certeza si la extracción de un determinado punto podría aumentar el rendimiento del aislamiento, obteniendo una mayor cantidad de ADNtc. Se prefiere el uso de plasma en vez de suero, porque este se puede contaminar con ADN liberado por células sanguíneas durante el proceso de coagulación. Para aislar el ADN existen una gran variedad de kits comerciales que se basan principalmente en columnas de afinidad, captura con partículas magnéticas, columnas de centrifugado con membrana de sílice o métodos basados en la extracción con fenol-cloroformo; para medir la concentración y comprobar la integridad del ADNtc aislado se utilizan técnicas de fluorimetría, espectrometría, electroforesis o reacción en cadena de la polimerasa (PCR).(21)

Una vez aislado el ADN, se amplifica mediante PCR y posteriormente es secuenciado. La secuenciación permite identificar alteraciones genéticas específicas del tumor, lo que proporciona información relevante en relación a la biología y evolución del tumor. En los últimos años se ha producido una auténtica revolución tecnológica con la que se ha alcanzado un nivel de sensibilidad muy elevado para poder analizar diferentes tipos de anomalías genéticas del tumor en el ADNtc (mutaciones, alteraciones epigenéticas, reordenamientos génicos...). Existen dos tipos de estrategias para analizar el ADNtc en pacientes con cáncer. La primera engloba diferentes técnicas dirigidas a analizar mutaciones o alteraciones genéticas específicas, que ya se han descrito como clínicamente relevantes en el tumor de interés. Son metodologías basadas en la PCR y secuenciación dirigida. Entre ellas, destacan la Droplet Digital PCR (ddPCR) o la técnica BEAMing (perlas, emulsión, amplificación y magnetismo). Se basan en la realización de una PCR en emulsión, en la que se generan miles de gotas lipídicas con el fin de individualizar los fragmentos de ADN, de forma que en cada gota se amplifique una sola copia, ya sea mutada o no. Estas técnicas tienen una alta sensibilidad, con límites de detección inferiores al 0.01% (41). La principal limitación es que se requiere tener información del espectro mutacional del tumor a estudio y que el número de mutaciones que se pueden analizar es limitado. Uno de los primeros kits comerciales de análisis de ADN aprobado por la FDA fue el COBAS (Roche) para el análisis de mutaciones de EGFR. La segunda estrategia para analizar el ADNtc implica utilizar técnicas no dirigidas, como las nuevas técnicas de secuenciación masiva, que permiten analizar el genoma o el exoma completo del tumor, como la técnica de NGS (de las siglas en inglés Next Generation Sequencing), las cuales permiten detectar todas las anomalías genéticas presentes en el tumor, y realizar una clasificación más precisa de los distintos tipos de tumores, mediante análisis multiparamétricos. Esta herramienta tiene el inconveniente de presentar una menor sensibilidad y de necesitar una mayor concentración de ADNtc. (21,41)

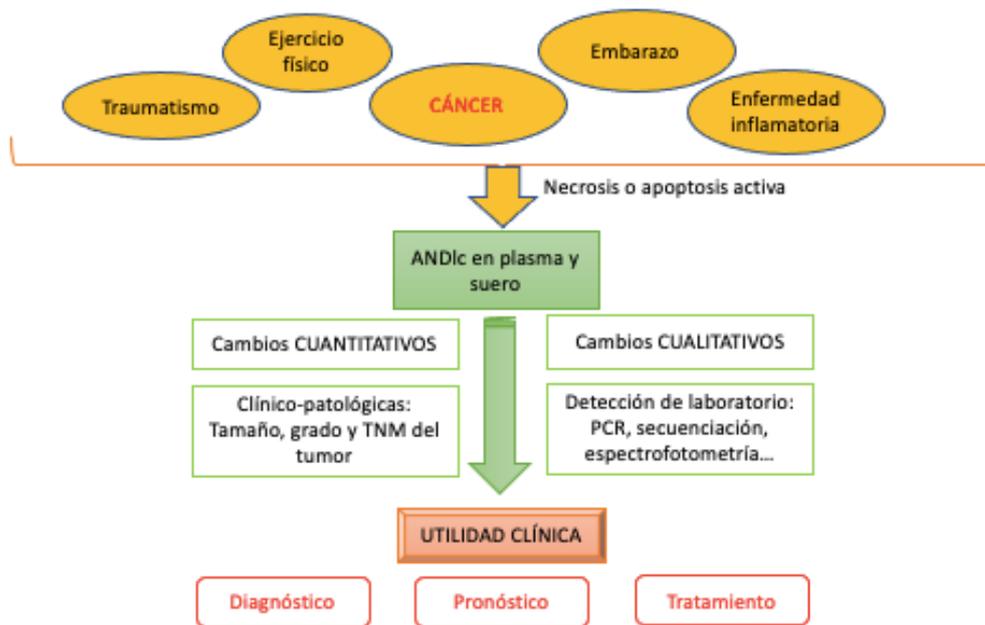


Figura 4: Representación esquemática de los métodos de análisis del ADNc y sus utilidades clínicas. “Modificada (38)”

b) ARN CIRCULANTE

En 1987 se descubrió la existencia de ARN libre circulante (ARNlc) en sangre, pero no fue hasta 1996 cuando se describió la presencia de ARN mensajero (ARNm) tumoral en sangre de pacientes con melanoma (42). A día de hoy todavía se desconoce la función, origen y mecanismo de liberación del ARNlc.

El uso de ARNlc se ha propuesto como biomarcador, las subclases más importantes que pueden desempeñar esta función son: ARNm, microARN (miARN) y ARN no codificante largo (lncARNs). Son detectables en sangre, pero también en otros fluidos corporales. (18)

El principal problema de su utilización radica en las fases pre-analítica y analítica, ya que el ARN se degrada fácilmente en plasma, debido a la degradación enzimática, sobre todo en pacientes con cáncer. Se ha observado que el ARN circula también en el interior de vesículas extracelulares, lo que le aporta una mayor estabilidad (43). Los laboratorios han desarrollado técnicas de purificación y análisis rápidos e integrados, que minimizan la degradación y manipulación de ARNlc. (38)

La telomerasa transcriptasa inversa (hTERT) es una ribonucleoproteína encargada del alargamiento y reparación de los telómeros. Se encuentra elevada en diversos tipos de cáncer, como el de pulmón, CCR, mama, esófago, hepatocelular... Algunos estudios confirman la relación entre los niveles de ARNm de hTERT en plasma y los parámetros clínico-patológicos; pero otros señalan que no existe relación en algunas de las variables, como puede ser el tamaño tumoral (38). No obstante, en el caso concreto del cáncer de próstata, la hTERT ofrece una mayor precisión diagnóstica y pronóstica que el PSA. (18)

El ARN circular (circRNA) es otro tipo de ARN no codificante presente en todas las células eucariotas. Tiene un patrón de expresión específico de tejido y de célula y debido a su estructura es resistente a las ARNasas que actúan en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico, lo que les confiere una alta estabilidad. Actúa como inhibidor competitivo de miARNs para regular la función de las proteínas y expresión de genes; por lo tanto, puede influir en los procesos de proliferación, invasión, metástasis y progresión tumoral. (44)

En cuanto a los miARN, son pequeñas moléculas (entre 20 y 22 nucleótidos) que regulan la expresión genética a nivel postranscripcional. Se encargan de controlar la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular. Se han descrito numerosas alteraciones de estos miARN en cáncer. La principal ventaja del miARN como biomarcador es su mayor resistencia en comparación con el resto de formas de ARNlc, ya que son más estables ante la actividad de distintas ARNasas y frente a modificaciones extremas del pH o de la temperatura. Además, son específicos de tejido, permitiendo identificar el origen tumoral. Muchos viajan en el interior de exosomas, por lo que están más protegidos de la acción de las ARNasas, y sirven como biomarcadores para predecir el pronóstico del cáncer (38). Por ejemplo, miR-451a, miR-21 y miR-4257 presentan un aumento de expresión en el cáncer de pulmón de células no pequeñas y se asocia a un mayor riesgo de recaídas y peor pronóstico. (45)

Por último, los lncARN, son transcritos de más de 200 nucleótidos, con funciones vitales importantes como la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular. Este ARN se puede introducir selectivamente en el interior de los exosomas, donde desempeña la función de mensajero de la comunicación intracelular para regular el crecimiento tumoral, la metástasis, la angiogénesis y la resistencia tumoral. Por ejemplo, el subtipo lncARNs-ATB promueve la tumorigenesis de diferentes tipos de cáncer, como el hepatocelular, gástrico, colorrectal y de pulmón. (44)

El ARN puede aislarse de los fluidos biológicos utilizando kits comerciales disponibles que se basan en extracción con fenol/guanidina, columnas de afinidad o la combinación de ambos. Existen diferentes técnicas para analizar el ARN, la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una de las más utilizadas. Con esta técnica, el ARN se retrotranscribe en ADN complementario y posteriormente se amplifica el fragmento de interés con una PCR tradicional. Existen otras técnicas que permiten analizar simultáneamente un gran número de ARNs, como los microarrays de expresión o técnicas de secuenciación de ARN (RNA-Seq). (46)

1.3.3. EXOSOMAS

Los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares de pequeño tamaño, entre 30 y 100 nanómetros, originadas por un proceso de endocitosis, en el cual la membrana plasmática celular sufre una invaginación que engloba material extracelular y se cierra posteriormente dando lugar a un endosoma temprano. Este evoluciona a endosoma tardío al incorporar material intracelular resultante de una nueva invaginación de la membrana endosomal y formar en su interior vesículas, por lo que reciben el nombre de cuerpos multivesiculares. Los endosomas tardíos pueden evitar la degradación lisosomal y fusionarse con la membrana plasmática, liberando al exterior las microvesículas que contienen, que son los exosomas. (44) El proceso de formación de los exosomas se muestra en la Figura 2.

A diferencia del ADN libre circulante, que es secretado durante el proceso de necrosis y apoptosis; los exosomas son liberados a partir de células vivas, lo que permite obtener una información más representativa de las células parenterales. Expresan proteínas específicas, como CD63, ALIX, TS101 y HSP70, lo que facilita su identificación; además, al microscopio electrónico muestran una forma de copa característica. También se pueden aislar exosomas de órganos específicos o predecir el origen de las metástasis, gracias a la expresión de proteínas de superficie específicas (18). La dificultad para aislar CTCs, convierte a los exosomas en una alternativa más asequible debido a la gran cantidad de métodos de extracción existentes, tanto clásicos (ultracentrifugación), como nuevos kits basados en técnicas de precipitación, exclusión cromatográfica, ultrafiltración, inmunoaislamiento o microfluídica. Una vez aislados, los exosomas se pueden caracterizar por diferentes métodos como microscopía electrónica de transmisión o de barrido, microscopía de fuerza atómica, dispersión dinámica de la luz, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), western blot, o citometría de flujo. Las técnicas mencionadas se especifican en la Figura 4. (48)

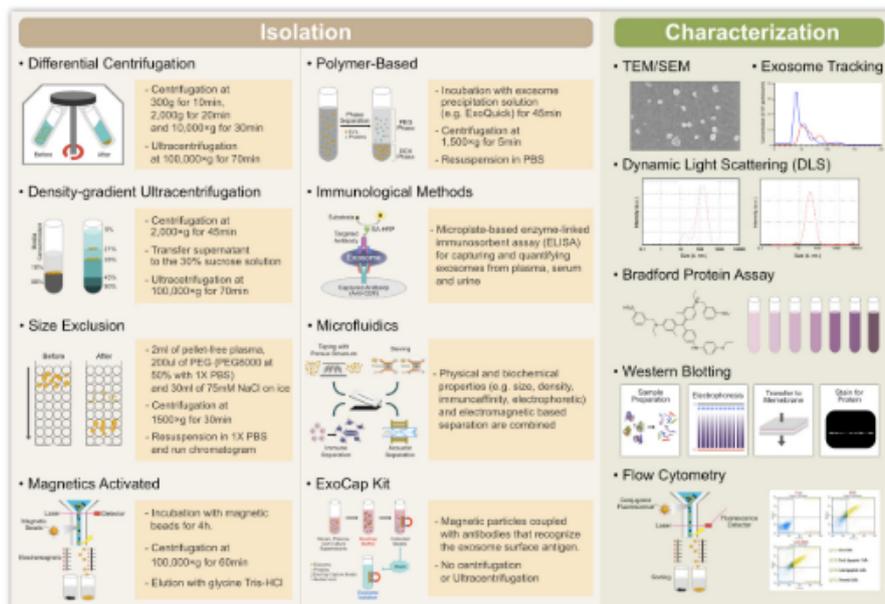


Figura 7. Técnicas utilizadas para el aislamiento y caracterización de los exosomas. (48)

Por otra parte, el contenido de ácidos nucleicos de los exosomas se puede analizar lisando estos y utilizando las técnicas de análisis de ADN o ARN que hemos descrito anteriormente. La mayor parte del ADNtc se encuentra en el interior de estas vesículas (exoADN) y la detección de estas mutaciones tiene un mayor valor pronóstico que el ADN libre circulante (47). De la misma manera, distintas formas de ARN exosomal también son útiles en el diagnóstico de CCR, como por ejemplo los paneles con combinaciones de mARNs (KRTAP5-4 y MAGEA3) y de IncARN (BCAR4). Estudios posteriores han concluido que el análisis de combinaciones de las diferentes moléculas contenidas en los exosomas, aportan una mayor precisión en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. Aportan información cuantitativa, que permite medir la carga tumoral en base a la cantidad de exosomas presentes en sangre; y cualitativa, mediante la caracterización molecular de los componentes del interior de estas vesículas. (18)

A nivel oncológico, el estudio de los exosomas se puede aplicar en diferentes ámbitos: identificación del origen tumoral, diagnóstico precoz, predicción de la progresión tumoral, y respuesta al tratamiento, incluso se pueden utilizar como transportadores de fármacos antitumorales (34,47). Estudios realizados en ratones han demostrado que disminuyen los efectos secundarios, ya que los medicamentos quimioterápicos recubiertos por exosomas son transportados directamente al tejido tumoral. (49)

En la tabla 3 se muestra un resumen de las principales diferencias entre las CTCs, ADNtc, y exosomas, detallando sus ventajas y limitaciones, así como las soluciones propuestas a la mismas.

	VENTAJAS	LIMITACIONES	SOLUCIONES
CTC	Relevancia en el proceso metastásico y la progresión de la enfermedad	Heterogeneidad de las poblaciones	Enriquecimiento independiente del marcador
	Ensayos funcionales in vitro / in vivo	Baja concentración y frágil	Muestreo de grandes volúmenes
	Caracterización molecular a nivel celular y subcelular	Métodos de análisis poco sensibles y específicos	Desarrollo de tecnologías de enriquecimiento
	Permite enfoques basado en inmunomarcaje	Falsos negativos y positivos	Aumentar la sensibilidad y especificidad
	Complementario a ADNtc: Escape de la QT	Existencia de múltiples técnicas de aislamiento	Estandarización de la técnica
	Influir potencialmente en los cambios en las modalidades de tratamiento		
ADNtc	Alta sensibilidad en la detección de la carga tumoral	Falsos negativos y positivos	Aislamiento específico de las mutaciones
	Complementario a CTC: detección de la enfermedad mínima residual	Fracciones tumorales variables, incluso en estadios avanzados	Comprender la biología del ADNtc avanzado
	Predicción de la respuesta y resistencia al tratamiento	Ausencia de estandarización de las condiciones pre-analíticas	Desarrollo de una técnica estándar
	Influir potencialmente en los cambios en las modalidades de tratamiento	Alto grado de fragmentación	Muestreo de grandes volúmenes
EXOSOMAS	Análisis de los perfiles de ARN, ADN y proteínas de células tumorales	Difícil extracción de exosomas específicos del tumor	Identificación de marcadores específicos
	Análisis de la respuesta inflamatoria, el estroma y cambios sistémicos	Grandes cantidades liberadas por diferentes células	Enriquecimiento de exosomas específicos del tumor
	Útil en la administración de fármacos		

Tabla 3. Ventajas y limitaciones en el análisis de CTCs, ADNtc y exosomas. (34,50)

1.3.4. PLAQUETAS EDUCADAS POR EL TUMOR

Aunque el papel que las plaquetas juegan en el desarrollo y extensión de los tumores se conoce desde hace tiempo, su potencial como biomarcadores en el cáncer constituye un área de investigación más reciente y hay pocos estudios publicados hasta la fecha, aunque con resultados prometedores. Estos estudios han demostrado que las células tumorales transfieren diferentes tipos de biomoléculas como ARNs o proteínas a las plaquetas, por lo que se ha acuñado el término de “plaquetas educadas por el tumor” (TEP, tumor-educated platelets) para designar a las plaquetas que contienen material tumoral. Las TEPs podrían constituir una nueva forma de biopsia líquida, tal y como se ha propuesto recientemente (51), a raíz de un estudio realizado por Best et al., en el que analizaron mediante secuenciación masiva el ARN plaquetario de 228 pacientes con diferentes tipos de cáncer (pulmón, glioblastoma, colon, páncreas, hepatobiliar, y mama) y 55 individuos sanos, logrando distinguir los pacientes sanos de los que tenían cáncer con una precisión del 96% e identificar la localización del tumor con una efectividad del 71% (52). En el mismo estudio, además, detectaron en el ARN de las plaquetas, las mutaciones en EGFR, KRAS y PIK3CA, así como las amplificaciones de MET y ERBB2 presentes en los tumores. En otro estudio realizado en 77 pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña, 32 de los cuales eran portadores del gen de fusión EML-ALK, mediante RT-PCR del ARN plaquetario se detectó este gen con un 65% de sensibilidad y un 100% de especificidad, mientras que el análisis de ARNtc mostró sólo un 21% de sensibilidad, reflejando probablemente la baja estabilidad del ARN plasmático (53). En 29 pacientes tratados con crizotinib, la supervivencia libre de progresión fue de 3.7 meses en los pacientes con plaquetas EML-ALK+, y de 16 meses para aquellos con plaquetas EML-ALK-. Algunos se negativizaron tras el tratamiento y un paciente que fue seguido durante 30 meses mostró resistencia al crizotinib, que fue detectada por un aumento plaquetario de EML-ALK 2 meses antes del PET-CT. (54)

Los cambios del proteoma plaquetario durante el desarrollo de un tumor también son objeto de investigación, de forma que las proteínas plaquetarias podrían servir también como biomarcadores diagnósticos, tal y como sugiere un estudio publicado recientemente en el que identificaron siete proteínas plaquetarias que se asociaban estrechamente con la presencia de cáncer de páncreas en estadios iniciales. (55)

2. APLICACIÓN CLÍNICA DE LA BIOPSIA LÍQUIDA EN EL CÁNCER COLORRECTAL

2.1. DIAGNÓSTICO PRECOZ. CRIBADO

El CCR tiene una evolución insidiosa, siendo diagnosticado en estadios intermedios-avanzados en más del 80% de casos (56). Uno de los inconvenientes de los métodos actuales de screening es su baja adherencia. En este sentido, el análisis de ADNtc y CTC en una muestra de sangre supone una alternativa que podría tener una mayor aceptación por la población.

Tanto los tumores localizados como los invasivos liberan CTCs al torrente sanguíneo antes de manifestarse las metástasis, un hecho de gran importancia para detectar el tumor a tiempo. Un estudio realizado con 620 pacientes demostró que las CTCs detectaban un 88% de las lesiones colorrectales, incluyendo aquellas precancerosas (57). Además, sería posible distinguir los individuos sanos de los que tienen un estadio de CCR temprano, a través del aislamiento de células endoteliales circulantes derivadas del tumor (58). En otro estudio, Eliasova et al., utilizando la plataforma MetaCell, demostraron la presencia de CTCs en 83% de los pacientes con CCR estudiados, incluyendo todos los estadios TNM. (59)

En cuanto al ADNtc, se ha contrastado la eficacia diagnóstica de la combinación de este con el biomarcador empleado en la actualidad, el CEA. Así, en un estudio con 75 individuos sanos y 75 con CCR se obtuvo una especificidad del 100% y una sensibilidad del 88% cuando ambos marcadores eran positivos (60). El índice de integridad del ADN circulante también ofrece información valiosa. Umetani et al. desarrollaron un método por PCR cuantitativa con el que demostraron un incremento significativo de la integridad del ADNtc en pacientes con CCR en estadios I/II como II/IV con respecto a controles sanos con un área bajo la curva para detección de CCR de 0.78. (61)

La mutación del oncogen KRAS se desarrolla en estadios tempranos y en loci específicos, convirtiéndolo así en un marcador de gran utilidad, detectado mediante técnicas de PCR (34), si bien dado que se utiliza fundamentalmente para tomar decisiones terapéuticas lo trataremos en el apartado correspondiente.

La metilación del gen SEPT9 se relaciona con la patogénesis del CCR, por lo que su determinación es útil en el screening. Existe ya un test aprobado por la FDA, el Epi ProColon. En el estudio "PRESEPT" demostró una sensibilidad del 48% para CCR (35, 63, 46, y 77% para estadios I-IV respectivamente) con una especificidad del 92% (62). Un metanálisis publicado en 2017 que incluyó 25 estudios, reportó una sensibilidad, especificidad y área bajo la curva de 71%, 92% y 0.88, respectivamente. Además, la metilación de SEPT9 era superior en CCR avanzado (45, 70, 76, y 79% de positividad en estadios I-IV) y con baja diferenciación (31, 73, y 90% en alta, moderada, y baja diferenciación) (63). Recientemente, Sun et al. demostraron que el test de mSEPT9 tenía una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de CCR y adenomas que la SOH. (64)

La combinación de diferentes marcadores puede aportar una mayor sensibilidad al estudio del CCR; además, el ADN tumoral se puede obtener de otro tipo de muestras aparte de la sangre. El test Cologuard para heces, aprobado por la FDA en 2014, combina el análisis de metilación de NDRG4 y BMP3, mutaciones de KRAS y el ensayo inmunohistoquímico fecal, alcanzando así una mayor sensibilidad en el diagnóstico del tumor. No obstante, no se utiliza en la práctica clínica

porque tiene una baja especificidad con un alto porcentaje de falsos positivos, un alto coste y una elevada dificultad logística para obtener heces frescas. (28)

Otro test que analiza múltiples marcadores es el desarrollado por Cohen et al, llamado CancerSeek, mediante el análisis de mutaciones de 16 genes combinados con biomarcadores proteicos en sangre. En el estadio I detectaron el 43% de CCR, pero en los estadios III y IV la tasa aumentó al 70%. Conforme más genes se añaden en el estudio, mayor es la sensibilidad obtenida; por ejemplo, con 58 genes se detecta ADNtc en el 50% de los casos de estadio I. (65)

En conclusión, CTC y ADNtc son marcadores prometedores en el diagnóstico precoz mediante biopsia líquida. Pero el principal inconveniente es que se encuentran en bajas concentraciones en estadios tempranos, por lo que son necesarias técnicas de elevada sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad, aunque esto supone un mayor coste. También es necesario el desarrollo de protocolos de aislamientos estandarizados.

2.2. PRONÓSTICO

El pronóstico predice la recurrencia esperada de la enfermedad y la supervivencia a 5 años. En la actualidad, se calcula en base a la carga tumoral (estadio en el momento del diagnóstico) y a la enfermedad residual (66). El beneficio que aporta la biopsia líquida, es la posibilidad de predecir el pronóstico de forma individualizada, algo demostrado a través de distintos metaanálisis. (67–69)

La detección de CTC en sangre podría ser un factor pronóstico independiente para diversos tipos de tumores, entre ellos el CCR. Cuanto mayor es el número de CTC detectado, peor es el pronóstico. En concreto, a través del sistema CellSearch, aquellos con ≥ 3 CTCs/7,5mL se relacionan con una menor supervivencia libre de enfermedad y un alto riesgo de recurrencia (67). Estos resultados no se observaron en otro estudio realizado en pacientes con CRC estadio III tras tratamiento quirúrgico, donde la detección de CTC no se correlacionaba con la supervivencia (70), probablemente debido al escaso número de CTC detectadas, requiriéndose un seguimiento durante un mayor período de tiempo (71). Otro estudio demostró que obteniendo la muestra de sangre de la vena mesentérica, se obtenía un mayor número de CTC; así demostraron la relación entre el alto nivel del CTC y un peor pronóstico. (72)

La medición de ADNtc también puede servir como factor pronóstico independiente de la supervivencia media. Por ejemplo, un estudio retrospectivo con 97 pacientes mostró una peor supervivencia global en aquellos pacientes con mayores niveles de ADNtc (73). Otro estudio con 96 pacientes con CCR en estadio III, afirma que la detección de niveles altos de este marcador, supone un pronóstico más pobre en cuanto al tiempo de supervivencia libre de recurrencia (71). Es decir, niveles altos de ADNtc se relacionan con una mala respuesta al tratamiento, una supervivencia libre de progresión y una supervivencia global peores. Además, la combinación de los niveles de ADNtc junto con el estado mutacional de KRAS, ofrecen mayor información adicional al pronóstico (68).

La mayoría de estudios se basan en estadios avanzados, pero Scholer et al. desarrollaron un estudio para CCR localizado (estadios I-III), donde observaron que los pacientes con ADNtc positivo 3 meses después de la resección quirúrgica, presentaban menor supervivencia libre de enfermedad (HR 37,7) y supervivencia media en 5 años (HR 6,7). (74)

2.3. MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

El tratamiento del CCR es uno de los grandes desafíos para investigación, especialmente aquellos con estadio II, ya que el 40% de los pacientes son sometidos a quimioterapia adyuvante durante 6 meses, con los riesgos que esto implica, a pesar de que solo un pequeño porcentaje desarrollará recurrencia. En la actualidad, se utilizan el CEA y la TC para el estudio de posibles recurrencias, que presentan varias limitaciones, como una baja sensibilidad, exposición a radiación, coste elevado, así como cierto impacto psicológico para el paciente.

Varios estudios han demostrado que el ADNtc puede servir de marcador de la carga tumoral y monitorizar la respuesta al tratamiento. La elevada renovación del ADNtc, con una vida media de ~2 h, hace que sea un marcador muy útil para obtener información en tiempo real de la evolución del tumor. Además, la detección de determinadas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores en el ADNtc es indicación directa de persistencia de células tumorales (17). En el estudio de Tie et al, se analizó la presencia de mutaciones en tejido tumoral de 53 pacientes, mediante un panel de 15 genes, detectando al menos una mutación en el 98% de los tumores. Posteriormente se monitorizó la mutación detectada en tejido en el plasma, observándose muy buena correlación entre la carga tumoral evaluada por TAC y los niveles de ADNtc, tanto al inicio como a lo largo del tratamiento. (75)

Reinert et al. desarrollaron un método para cuantificar variaciones estructurales somáticas específicas de tumor en el ADNtc. Tras un seguimiento de 36 meses de 11 pacientes con CCR tratados con cirugía, el análisis de ADNtc mostró una sensibilidad y especificidad del 100% para la detección de recurrencia (76). Otro estudio de Tie et al. evaluó la capacidad del ADNtc para detectar recurrencia en 230 pacientes en estadio II tras resección quirúrgica. El 7,9% de los pacientes que no recibieron quimioterapia (QT) adyuvante, tenían niveles de ADNtc detectables, y de estos el 79% desarrolló recurrencia. Sin embargo, de los 164 pacientes con ADNtc negativo, solo el 9,8% desarrolló recurrencia. (77)

El índice de integridad del ADN circulante también podría desempeñar un importante papel en la monitorización del CCR. Un estudio mostró que los niveles séricos absolutos de secuencias ALU115 y ALU247/115 se reducían significativamente tras la intervención quirúrgica. (78)

En cuanto al CCR metastásico, se ha observado que aquellos que reciben quimioterapia combinada y tienen una disminución, antes del segundo ciclo, mayor de 10 veces los niveles de ADNtc, obtienen una mejor tasa de respuesta radiológica que el resto (75). Del mismo modo, en este tipo de pacientes, se evidencia una disminución de la frecuencia alélica de mutaciones en RAS cuando existe un beneficio clínico de la terapia sistémica. (79)

Por otro lado, el número de CTC tras el tratamiento también es un indicador de respuesta precoz al mismo. En individuos con CCR metastásico, la disminución de los niveles en las primeras 3-5 semanas de inicio de la quimioterapia, es indicador de tratamiento eficaz. Por el contrario, niveles persistentemente altos de CTC, se relacionan con un tumor agresivo resistente a la quimioterapia y es un fuerte predictor de recaída (80). Sin embargo, en el ensayo CAIRO2 realizado por Tol et al, se observó una disminución de CTCs tras 1-3 semanas de tratamiento. Esta diferencia de tiempo se debe al tipo de tratamiento empleado, ya que en el segundo se utilizó bevacizumab (81). Por lo tanto, son necesarios nuevos estudios para establecer el momento más indicado para la evaluación de la respuesta a la quimioterapia mediante el recuento de CTC.

2.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO

El desarrollo de las terapias dirigidas ofrece nuevas oportunidades en el tratamiento del CCR metastásico. Como se ha comentado anteriormente, los pacientes reciben tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR, pero este solo está indicado aquellos con el gen KRAS no mutado o salvaje. (14)

Una de las principales limitaciones del tratamiento del CCR metastásico es la adquisición de resistencias multiclonales a la terapia, mediante mutaciones en KRAS, NRAS o BRAF, la amplificación de ERBB2 (Receptor tirosin kinasa Erb-B2), MET, KRAS...(13). Por ejemplo, un estudio en pacientes con CCR tratados con anti-EGFR, demostró cambios en el número de copias y amplificaciones de genes involucrados en la resistencia en todas las muestras de plasma (82). La mayoría de pacientes no responden al tratamiento más de 12-18 meses. (83)

Actualmente, las mutaciones de ADN se analizan a través de muestras del tejido primario, ya que las lesiones metastásicas no suelen ser accesibles. La degradación de los ácidos nucleicos en el proceso de fijación y la subestimación de la heterogeneidad genómica son dos barreras para el estudio, las cuales se pueden vencer con el uso de la biopsia líquida, ya que permite una evaluación dinámica sin requerir numerosas biopsias de tejido. (17)

En este momento, el análisis de ADNtc no es capaz de sustituir a las técnicas de imagen, pero diferentes ensayos investigan si la monitorización de las mutaciones en el ADNtc pueden complementarlas o incluso reemplazarlas (25). Un estudio realizado a pacientes tratados con cetuximab, demostró la presencia de alelos mutantes de KRAS diez meses antes de evidenciarse la recurrencia del tumor (84). Otro estudio de seguimiento mediante el análisis de ADNtc, mostró que las mutaciones de KRAS y BRAF en sangre se correlacionaban en el 97% de los casos con las mutaciones del tejido. Además, en un porcentaje de los pacientes solo se detectaron estas mutaciones en sangre, por lo que la biopsia líquida representa de mejor manera la heterogeneidad tumoral. (85)

Existen evidencias de que las mutaciones KRAS pueden ser reversibles porque se ha observado que al retirar la terapia con Ac anti-EGFR, estas disminuyen; lo que sugiere la reintroducción de fármacos anti-EGFR una vez hayan desaparecido las mutaciones RAS del ADNtc (86). Sin embargo, un estudio retrospectivo evidenció que aquellos individuos con clones mutantes de RAS persistentes (clones mutantes en el ADNtc previos a la nueva exposición), no se beneficiaban de la reintroducción de cetuximab (87). Además, existe un ensayo clínico en fase II que evalúa la eficacia de la terapia Sym004 (compuesta por futuximab y modotuximab, dirigidos contra EGFR), en pacientes con CCR metastásico con progresión de la enfermedad a pesar del tratamiento con cetuximab o panitumab. Los resultados obtenidos revelaban que los beneficiados de este tratamiento tenían RAS, BRAF y EGFR salvajes. (88)

El aislamiento de CTC también permite detectar mutaciones en KRAS o BRAF y estimar la resistencia a quimioterapia (89). Un metanálisis de 13 estudios de CCR tratados con quimioterapia, evidenció importantes diferencias entre aquellos con niveles de CTC altos y bajos en el control de la enfermedad, supervivencia global y supervivencia general. (90)

De la misma manera, el miARN es un marcador emergente que podría monitorizar la resistencia o tolerancia a la quimioterapia. En concreto, un panel de miARN exosomal con miR-1246, miR1229-5p, miR-21-5p y miR-96-5p podría detectar a pacientes resistentes a 5-Fluoracilo y a oxaliplatino (91). El aumento de los niveles de miR-125b también se relaciona con resistencia a

la terapia FOLFOX6 (primera línea de tratamiento en pacientes con CCR avanzada o recurrente basado en oxaliplatino y 5 fluoracilo, en infusión continua, y leucovorín o fluoropirimidinas, orales durante 6 meses); además, el aumento de este marcador predice una menor supervivencia libre de progresión. (92)

En conclusión, la biopsia líquida tiene un gran potencial como guía para el tratamiento sistémico de pacientes con cáncer; no obstante, es necesario el desarrollo de una técnica barata y sencilla para ampliar su uso a todos los hospitales.

2.5. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

El tratamiento más efectivo y que consigue una curación completa del CCR es la cirugía radical. Esta técnica se denomina R0, lo que quiere decir que no quedan restos de tejido tumoral tras la intervención; a diferencia de las resecciones R1 y R2, donde existe enfermedad residual microscópica o macroscópica, respectivamente (66). El análisis de ADNtc permite detectar la enfermedad mínima residual (EMR), definida como la presencia de micrometástasis postquirúrgicas, las cuales son signo de malignidad. (93)

Varios estudios han tratado de demostrar la presencia de enfermedad mínima residual mediante el análisis de ADNtc tras la cirugía, el cual permite una detección más temprana que las técnicas de imagen (17). Por ejemplo, un estudio realizado con 231 pacientes de estadio II sometidos a resección quirúrgica, evidenció que la detección de ADNtc se asocia a un mayor riesgo de recurrencia, tanto en aquellos que recibieron quimioterapia adyuvante (14/178 tenían ADNtc detectable y 11 desarrollaron recurrencia), como en los que no (3/44 pacientes con ADNtc detectable y todos desarrollaron recurrencia) (77). De la misma manera, se ha obtenido información pronóstica similar en los diversos estadios del CCR. Por ejemplo, el estudio llevado a cabo por Reinert et al, asociaba la carga de ADN tumoral con el riesgo de recaída en el CCR con estadios I-III; además, permitió una detección temprana de la recaída y la evaluación de la eficacia de la QT adyuvante, gracias al análisis longitudinal realizado. (94)

Se está estudiando la posibilidad de que pacientes con niveles ADNtc detectables tras la cirugía, se beneficien de una duración de la quimioterapia correspondiente a la eliminación de ADNtc; aunque para ello son necesarios estudios a gran escala y técnicas de mayor sensibilidad y especificidad. Los paneles de NGS detectan un gran número de mutaciones genómicas y epigenéticas, lo que permitiría aumentar la sensibilidad. (95)

En cuanto al CCR metastásico, se ha demostrado la correlación entre los cambios precoces en la frecuencia alélica de una variante (VAF) con la respuesta radiológica al tratamiento; por lo tanto, se podría utilizar como método de selección para la desescalada de la QT adyuvante en algunos pacientes (96). El ensayo IDEA, realizado en 805 pacientes con CCR estadio III, ha confirmado que el ADNtc es un factor pronóstico independiente en el CCR y que los pacientes con ADNtc positivo tratados con 6 meses de terapia adyuvante tuvieron similar pronóstico que los pacientes con ADNtc tratados 3 meses (97). Para ello son necesarios métodos con una alta sensibilidad, porque un falso negativo en el ADNtc podría hacer que un individuo no reciba la terapia adyuvante, a pesar de que se hubiera beneficiado de ella por su alto riesgo de recurrencia. (93)

Por otro lado, el estado de enfermedad mínima residual supone concentraciones más bajas de carga tumoral, por lo tanto, en futuros estudios el análisis de ADNtc permitirá detectar a estos pacientes y someterlos a inmunoterapias prometedoras o a la combinación de irinotecán con ácido folínico, 5-fluorouracilo y oxaliplatino (FOLFOX), aunque esto exige una gran especificidad del ADNtc para evitar toxicidades adicionales (93). Por ejemplo, existen dos ensayos en fase III que demuestran la eficacia de combinar terapia en los casos de CCR metastásico con mutaciones en BRAF-V600E (98,99); por lo tanto, identificar estas mutaciones en pacientes con EMR podría ofrecer la posibilidad de extender el tratamiento adyuvante a este entorno.

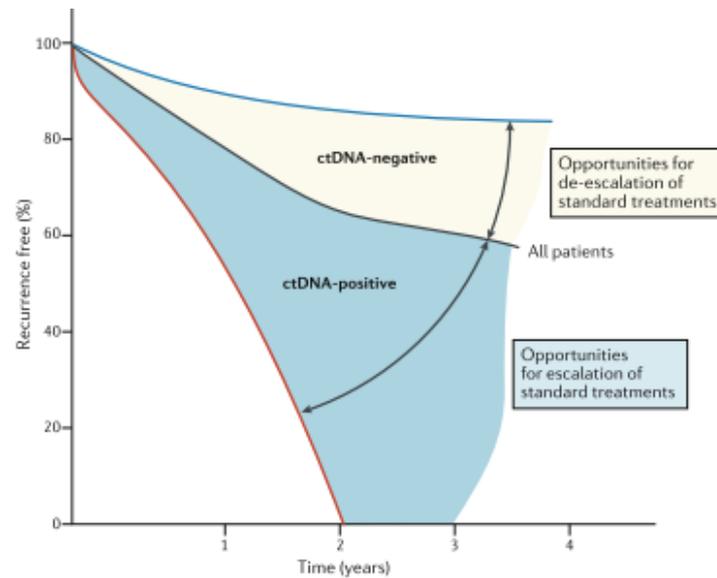


Figura 8. Aplicaciones del ADNtc en la terapia adyuvante: esta tabla muestra como a los pacientes con niveles de ADNtc detectables (alta especificidad) se les podría intensificar la terapia para evitar la recurrencia. Por el contrario, aquellos con ADNtc indetectable (alta sensibilidad) y bajo riesgo de recurrencia, se les podría reducir la terapia disminuyendo también la toxicidad de la misma. (93)

3. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN ACTUALES

3.1. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MOLECULARES PARA EL SCREENING DE CCR

Una de las áreas de investigación más activas en el campo de la biopsia líquida en el CCR es el desarrollo de nuevos biomarcadores moleculares en sangre, heces e incluso saliva, con resultados prometedores para el screening del CCR. Por ejemplo, la detección combinada de secuencias ALU115, ALU247/115 y CEA mediante el análisis de ADNtc en suero podría mejorar la eficiencia del diagnóstico del CCR. Estos biomarcadores han demostrado una elevada sensibilidad (99.09% para ALU115 y 97.27% para ALU247/115). (78)

El estado de metilación del ADN se considera un análisis prometedor en el screening del CCR. Destacan la metilación de los genes APC, MGMT, RASSF2A, WIF1, BCAT1 y IKZF1 en plasma; SDC2 en suero; NDRG4 y TFPI2 en heces (100). De todos ellos, el SDC2 ha mostrado una mayor sensibilidad (87.2%) y especificidad (95.2%) hasta el momento, esto lo convierte en un marcador de metilación potencial para la detección temprana del CCR (101).

En cuanto al potencial de los circARN, los más prometedores son: 91H, PVT1, MEG3 en plasma; o NEAT1_v1 y NEAT1_v2 en sangre (100). También se examinó la capacidad diagnóstica de los lncARN detectables en suero mediante la técnica RT-PCR. El estudio demostró que LOC285194, RP11-462C24.1 y Nbla12061 son marcadores potenciales en el diagnóstico de CCR; además, estos ofrecían mejores resultados que los utilizados tradicionalmente, como CEA o CA125; incluso, la combinación de estos novedosos marcadores con los tradicionales pueden mejorar la precisión diagnóstica. (102)

Existen diferentes tipos de miARN en investigación, aquellos que han obtenido mejores tasas de resultados son: miR-21 en saliva con una sensibilidad del 97% y especificidad del 91%; miR-92a, miR-21, miR-135b, miR-145, miR-133a en heces con una sensibilidad y especificidad en torno al 80%; miR-92a en plasma cuya sensibilidad es del 89% pero la especificidad disminuye al 70%; y miR-24 en plasma cuya sensibilidad del 78.4% y especificidad es del 83.9%. El microARN exosomal circulante permite también la detección de miR-27a y miR-130a en plasma. (100)

El ARN que interactúa con PIWI (piARN) se ha identificado recientemente como nuevo biomarcador. En el estudio realizado se observaron 31 piARN alterados en el suero de pacientes con CCR, pero aquellos que mostraron una mayor sensibilidad y especificidad fueron piR-5937 y piR-288876 (103).

3.2. ENSAYOS CLÍNICOS EN DESARROLLO

Existen 103 ensayos clínicos y estudios observacionales en desarrollo registrados en la base de datos ClinicalTrials.gov, que investigan sobre los diferentes usos de la biopsia líquida en el campo del CCR. En el anexo 2 se ha realizado una selección de los más importantes. Los objetivos de la mayoría de ellos son comparar las técnicas de diagnóstico del CCR actuales con la biopsia líquida, especialmente mediante el análisis de CTC y ADNtc; evaluar la eficacia de los tratamientos administrados; y detectar la enfermedad mínima residual o recurrencias tras el tratamiento.

Entre los diferentes estudios mencionados, destacan el estudio PREEMPT CRC (NCT04369053) que busca validar la biopsia líquida para la detección temprana de CCR mediante la obtención de

muestras sanguíneas de 25000 pacientes sometidos a colonoscopia rutinaria. En cuanto al pronóstico en el CCR, el estudio (NCT03337347) de 256 pacientes con enfermedad localizada, busca determinar si la determinación de CTC en sangre y médula ósea es un factor pronóstico negativo y correlacionar otras características clínico-patológicas de la enfermedad. Los ensayos CHRONOS (NCT03227926) y FIRE-4 (NCT02934529) tratan de dirigir el re-tratamiento con anticuerpos antiEGR a través del análisis de ADNtc para hacer frente a las resistencias desarrolladas durante el tratamiento.

Los estudios terapéuticos existentes en este momento de CCR de estadio II son: el estudio COBRA de fase II/III aleatorizado (NCT04068103), el ensayo CIRCULATE (NCT04120701) y el estudio DYNAMIC-II (ACTRN12615000381583). Tratan de demostrar la asociación entre el nivel de ADNtc y el alto riesgo de recurrencia, a pesar de que los criterios clínicos digan lo contrario. Además, el estudio de fase II/II DYNAMIC-III (ACTRN12617001566325), examina el CCR en estadio III para evaluar la eficacia de la desescalada en el tratamiento quimioterápico según los niveles de ADNtc. En cuanto a los ensayos observacionales en curso, destacan TRACC (NCT04050345) y circADN (NCT02813928), los cuales buscan determinar los límites de referencia del ADNtc como marcador de EMR y de supervivencia. El ensayo IMPROVE-IT2 (NCT04084249) indicará la combinación óptima de ADNtc con las técnicas de imagen para detectar la recurrencia de la enfermedad.

En el anexo 2 se resume en una tabla la información más importante de 35 estudios seleccionados de la base clinicaltrials.gov por su relevancia.

CONCLUSIONES

- 1- En el CCR, la biopsia líquida constituye una valiosa herramienta que complementa a la biopsia tumoral tradicional.
- 2- Las principales ventajas de la biopsia líquida respecto a la biopsia tisular son la mínima invasividad y su capacidad para informar de la heterogeneidad fenotípica y genómica del tumor, así como de las variaciones en tiempo real de la dinámica clonal del tumor.
- 3- Los tumores colorrectales, al igual que otros tumores sólidos, liberan células, ácidos nucleicos, y exosomas a la sangre y otros fluidos corporales, fundamentalmente las heces, y son capaces de modificar el perfil molecular de las plaquetas sanguíneas, siendo todos ellos potenciales biomarcadores para su uso en biopsia líquida.
- 4- La mayor limitación de la biopsia líquida es la baja concentración de sus componentes en sangre y otros fluidos, especialmente en los estadios iniciales del tumor. El desarrollo tecnológico de los últimos años ha permitido alcanzar un nivel de sensibilidad muy elevado para analizar diferentes tipos de anomalías genéticas del tumor.
- 5- Las CTC y el ADNtc son biomarcadores prometedores para el diagnóstico precoz del CCR. Algunos de los test desarrollados, como la metilación de SEPT9, han mostrado una sensibilidad y especificidad para la detección de adenomas y CCR superiores al test de SOH.
- 6- Se ha demostrado la utilidad del análisis del ADNtc plasmático en la detección de enfermedad mínima residual en pacientes con CCR tras tratamiento quirúrgico radical. Esta técnica permite la identificación de aquellos pacientes con alto riesgo de recurrencia y por tanto podría ayudar para la toma de decisiones en terapia adyuvante.
- 7- La cuantificación de CTCs en sangre es útil en la determinación del pronóstico de los pacientes con CCR, de forma que el hallazgo de un número elevado de CTCs se asocia con peor pronóstico.
- 8- La cuantificación de ADNtc en sangre se correlaciona con la carga tumoral, por lo que se podría utilizar para evaluar la respuesta precoz al tratamiento.
- 9- La detección de mecanismos moleculares de resistencia al tratamiento en el CCR metastásico mediante el análisis de ADNtc es, sin duda, una de las aplicaciones más establecidas de la biopsia líquida en el CCR actualmente, permitiendo hacer un tratamiento individualizado para cada paciente.
- 10- Actualmente, se están desarrollando un importante número de ensayos clínicos y estudios prospectivos para establecer la aplicabilidad clínica de la biopsia líquida en el CCR en todos sus estadios, lo que contribuirá a que la biopsia líquida se instaure definitivamente como una herramienta imprescindible en el manejo del paciente con CCR.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Cancer Today [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>
2. World Health Organization. Cancer Tomorrow [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>
3. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2015 Nov 5;1.
4. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(6):639–45.
5. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*. 2016;11:967–76.
6. Kolenčik D, Shishido SN, Pitule P, Mason J, Hicks J, Kuhn P. Liquid Biopsy in Colorectal Carcinoma: Clinical Applications and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2020 May 27;12(6):1376.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Vol. 61, *Cell*. 1990. p. 759–67.
8. Murillo MM, Zelenay S, Nye E, Castellano E, Lassailly F, Stamp G, et al. RAS interaction with PI3K p110 α is required for tumor-induced angiogenesis. *J Clin Invest*. 2014 Aug 1;124(8):3601–11.
9. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Jul 28;6(9):519–27.
10. Gil-Raga M, Jantus-Lewintre E, Gallach S, Giner-Bosch V, Frangi-Caregnato A, Safont-Aguilera MJ, et al. Molecular subtypes in early colorectal cancer associated with clinical features and patient prognosis. *Clin Transl Oncol*. 2018 Nov 1;20(11):1422–9.
11. Castillejo MM, Fernández JC, Mascort Roca J, Rodríguez-Moñino AP. Atención primaria y detección del cáncer colorrectal. *Aten Primaria*. 2017;49(10):565–7.
12. Villaverde RM, Gordo AMJ, Gómez ML, Soto MÁ. Cáncer colorrectal. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2017;12(32):1911–8.
13. Burz C, Rosca A, Pop VV, Buiga R, Aldea C, Samasca G, et al. Liquid biopsy challenge and hope in colorectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(4):341–8.
14. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Bases moleculares del cáncer colorrectal: ¿Hacia un manejo individualizado? *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2011;103(1):29–35.
15. Organization WH. Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation [Internet]. *Environmental Health*. 2001. p. 144. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42363>
16. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1386–422.
17. Wills B, Gorse E, Lee V. Role of liquid biopsies in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 2018;42(6):593–600.
18. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis,

- Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40(3):172–86.
19. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. Vol. 16, *Trends in Molecular Medicine.* Trends Mol Med; 2010. p. 398–406.
 20. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy: Potential and challenges. Vol. 10, *Molecular Oncology.* Elsevier B.V.; 2016. p. 371–3.
 21. Arechederra M, Ávila MA, Berasain C. Liquid biopsy for cancer management: a revolutionary but still limited new tool for precision medicine. *Adv Lab Med / Av en Med Lab.* 2020;1(3):1–13.
 22. Álvarez-Alegret R, Rojo Todo F, Garrido P, Bellosillo B, Rodríguez-Lescure Á, Rodríguez-Peralto JL, et al. Liquid biopsy in oncology: A consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Rev Esp Patol.* 2020;53(4):234–45.
 23. Ponti G, Manfredini M, Tomasi A. Non-blood sources of cell-free DNA for cancer molecular profiling in clinical pathology and oncology. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;141(September 2018):36–42.
 24. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med.* 2015 Jun 24;7(293).
 25. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(9):531–48.
 26. Pan W, Gu W, Nagpal S, Gephart MH, Quake SR. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clin Chem.* 2015 Mar 1;61(3):514–22.
 27. Berger BM, Ahlquist DA. Stool DNA screening for colorectal neoplasia: Biological and technical basis for high detection rates. Vol. 44, *Pathology.* Lippincott Williams and Wilkins; 2012. p. 80–8.
 28. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. *N Engl J Med.* 2014 Apr 3;370(14):1287–97.
 29. Husain H, Nykin D, Bui N, Quan D, Gomez G, Woodward B, et al. Cell-free DNA from ascites and pleural effusions: Molecular insights into genomic aberrations and disease biology. *Mol Cancer Ther.* 2017 May 1;16(5):948–55.
 30. Quirico L, Orso F. The power of microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in liquid biopsies. *Cancer Drug Resist.* 2020 Feb 21;3(2):117–39.
 31. Thomas Ramsden A. A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. *Med J Aust.* 1869;14:146–7.
 32. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LWMM, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4589–94.
 33. Cortés-Hernández LE, Eslami-S Z, Alix-Panabières C. Circulating tumor cell as the functional aspect of liquid biopsy to understand the metastatic cascade in solid cancer. *Mol Aspects Med.* 2020;72:100816.
 34. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet.* 2019;20(2):71–88.
 35. Scher HI, Lu D, Schreiber NA, Louw J, Graf RP, Vargas HA, et al. Association of AR-

- V7 on circulating tumor cells as a treatment-specific biomarker with outcomes and survival in castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncol.* 2016 Nov 1;2(11):1441–9.
36. Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J, Ramos J, Assenat E, et al. Establishment and characterization of a cell line from human Circulating colon cancer cells. *Cancer Res.* 2015 Mar 1;75(5):892–901.
 37. Yang C, Chen F, Wang S, Xiong B. Circulating Tumor Cells in Gastrointestinal Cancers: Current Status and Future Perspectives. *Front Oncol.* 2019;9(December).
 38. González-Masiá JA, García-Olmo D, García-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): Applications in oncology. *Onco Targets Ther.* 2013;6:819–32.
 39. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *Rendus des Seances la Soc Biol ses Fil.* 1948;142:241–3.
 40. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646–50.
 41. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med.* 2018;379(18):1754–65.
 42. Stevens GL, Scheer WD, Levine EA. Detection of tyrosinase mRNA from the blood of melanoma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(4):293–6.
 43. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem.* 2002 Oct 1;48(10):1647–53.
 44. Dai J, Su Y, Zhong S, Cong L, Liu B, Yang J, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1).
 45. Fortunato O, Gasparini P, Boeri M, Sozzi G. Exo-miRNAs as a new tool for liquid biopsy in lung cancer. Vol. 11, *Cancers.* MDPI AG; 2019.
 46. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. Vol. 18, *Molecular Cancer.* BioMed Central Ltd.; 2019. p. 1–14.
 47. Zhou B, Xu K, Zheng X, Chen T, Wang J, Song Y, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1).
 48. Gurunathan S, Kang M-H, Jeyaraj M, Qasim M, Kim J-H. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells.* 2019;8(4):307.
 49. Batrakova E V., Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release.* 2015 Dec 10;219:396–405.
 50. Wang J, Chang S, Li G, Sun Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Front Med.* 2017;11(4):522–7.
 51. Joosse SA, Pantel K. Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients. Vol. 28, *Cancer Cell.* Cell Press; 2015. p. 552–4.
 52. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell.* 2015;28(5):666–76.
 53. Nilsson RJA, Balaj L, Hulleman E, Van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M, et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood.* 2011 Sep 29;118(13):3680–3.

54. Nilsson RJA, Karachaliou N, Berenguer J, Gimenez-Capitan A, Schellen P, Teixido C, et al. Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(1):1066–75.
55. Sabrkhany S, Kuijpers MJE, Knol JC, Olde Damink SWM, Dingemans AMC, Verheul HM, et al. Exploration of the platelet proteome in patients with early-stage cancer. *J Proteomics*. 2018 Apr 15;177:65–74.
56. Ding Y, Li W, Wang K, Xu C, Hao M, Ding L. Perspectives of the Application of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer. *Biomed Res Int*. 2020;
57. Tsai W-S, Nimgaonkar A, Segurado O, Chang Y, Hsieh B, Shao H-J, et al. Prospective clinical study of circulating tumor cells for colorectal cancer screening. *J Clin Oncol*. 2018;36(Supplement 4):556–556.
58. Cima I, Kong SL, Sengupta D, Tan IB, Phyto WM, Lee D, et al. Tumor-derived circulating endothelial cell clusters in colorectal cancer. *Sci Transl Med*. 2016;8(345):345ra89-345ra89.
59. Eliasova P, Pinkas M, Kolostova K, Gurlich R, Bobek V. Circulating tumor cells in different stages of colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2017;55(1):1–5.
60. Flamini E, Mercatali L, Nanni O, Calistri D, Nunziatini R, Zoli W, et al. Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: An important combination for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(23):6985–8.
61. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: Direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem*. 2006;52(6):1062–9.
62. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*. 2014;63(2):317–25.
63. Nian J, Sun X, Ming SY, Yan C, Ma Y, Feng Y, et al. Diagnostic accuracy of methylated SEPT9 for blood-based colorectal cancer detection: A systematic review and meta-analysis. Vol. 8, *Clinical and Translational Gastroenterology*. Nature Publishing Group; 2017.
64. Sun J, Fei F, Zhang M, Li Y, Zhang X, Zhu S, et al. The role of mSEPT9 in screening, diagnosis, and recurrence monitoring of colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2019;19(1):450.
65. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2017 Aug 16;9(403).
66. Norcic G. Liquid biopsy in colorectal cancer-current status and potential clinical applications. *Micromachines*. 2018;9(6).
67. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, et al. Meta-analysis Shows That Detection of Circulating Tumor Cells Indicates Poor Prognosis in Patients With Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(5).
68. Spindler KLG, Appelt AL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(12):2984–91.
69. Tan Y, Wu H. The significant prognostic value of circulating tumor cells in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Vol. 42, *Current Problems in Cancer*. Mosby Inc.; 2018. p. 95–106.

70. Sotelo MJ, Sastre J, Maestro ML, Veganzones S, Viéitez JM, Alonso V, et al. Role of circulating tumor cells as prognostic marker in resected stage III colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(3):535–41.
71. Tie J, Cohen JD, Wang Y, Christie M, Simons K, Lee M, et al. Circulating tumor dna analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III colon cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5(12):1710–7.
72. Denève E, Riethdorf S, Ramos J, Nocca D, Coffy A, Daurès JP, et al. Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clin Chem.* 2013;59(9):1384–92.
73. El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):3067–77.
74. Schøler L V., Reinert T, Ørntoft MBW, Kassentoft CG, Arnadóttir SS, Vang S, et al. Clinical implications of monitoring circulating Tumor DNA in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(18):5437–45.
75. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1715–22.
76. Reinert T, Schøler L V., Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut.* 2016;65(4):625–34.
77. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med.* 2016;8(346).
78. Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J, Wu XH, Wu Y, et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2014;111(8):1482–9.
79. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol.* 2017;28(6):1325–32.
80. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3213–21.
81. Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJM, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol.* 2010;21(5):1006–12.
82. Van Emburgh BO, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Siena S, Bardelli A. Acquired resistance to EGFR-targeted therapies incolorectal cancer. *Mol Oncol.* 2014;8(6):1084–94.
83. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: A cohort study. *Lancet Oncol.* 2005;6(5):279–86.
84. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;32(6):579–86.

85. Mohan S, Heitzer E, Ulz P, Lafer I, Lax S, Auer M, et al. Changes in Colorectal Carcinoma Genomes under Anti-EGFR Therapy Identified by Whole-Genome Plasma DNA Sequencing. *PLoS Genet.* 2014;10(3).
86. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. Vol. 21, *Nature Medicine.* Nature Publishing Group; 2015. p. 795–801.
87. Parseghian CM, Loree JM, Morris VK, Liu X, Clifton KK, Napolitano S, et al. Anti-EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: Implications for anti-EGFR re-challenge. *Ann Oncol.* 2019;30(2):243–9.
88. Montagut C, Argilés G, Ciardiello F, Poulsen TT, Dienstmann R, Kragh M, et al. Efficacy of Sym004 in patients with metastatic colorectal cancer with acquired resistance to anti-EGFR therapy and molecularly selected by circulating tumor DNA analyses a phase 2 randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2018;4(4).
89. Krebs MG, Renehan AG, Backen A, Gollins S, Chau I, Hasan J, et al. Circulating tumor cell enumeration in a phase II trial of a four-drug regimen in advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2015;14(2):115-122.e2.
90. Huang X, Gao P, Song Y, Sun J, Chen X, Zhao J, et al. Relationship between circulating tumor cells and tumor response in colorectal cancer patients treated with chemotherapy: A meta-analysis. *BMC Cancer.* 2014;14(1):976.
91. Jin G, Liu Y, Zhang J, Bian Z, Yao S, Fei B, et al. A panel of serum exosomal microRNAs as predictive markers for chemoresistance in advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019;84(2):315–25.
92. Yagi T, Iinuma H, Hayama T, Matsuda K, Nozawa K, Tsukamoto M, et al. Plasma exosomal microRNA-125b as a monitoring biomarker of resistance to mFOLFOX6-based chemotherapy in advanced and recurrent colorectal cancer patients. *Mol Clin Oncol.* 2019;11(4):416–24.
93. Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AB, Boland P, et al. ctDNA applications and integration in colorectal cancer: an NCI Colon and Rectal–Anal Task Forces whitepaper. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(12):757–70.
94. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, Sharma S, Salari R, Sethi H, et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients with Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5(8):1124–31.
95. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen YJ, Ciombor KK, et al. NCCN Guidelines® Insights Colon Cancer, Version 2.2018 Featured Updates to the NCCN Guidelines. Vol. 16, *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* Harborside Press; 2018. p. 359–69.
96. Hong DS, Morris VK, El Osta B, Sorokin A V., Janku F, Fu S, et al. Phase IB study of vemurafenib in combination with irinotecan and cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer with BRAFV600E mutation. *Cancer Discov.* 2016;6(12):1352–65.
97. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(13):1177–88.
98. Kopetz S, Guthrie KA, Morris VK, Lenz HJ, Magliocco AM, Maru D, et al. Randomized Trial of Irinotecan and Cetuximab With or Without Vemurafenib in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer (SWOG S1406). *J Clin Oncol.* 2021;39(4):285–94.
99. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, et al. Encorafenib,

- Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E–Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(17):1632–43.
100. Tepus M, Yau TO. Non-Invasive Colorectal Cancer Screening: An Overview. *Gastrointest Tumors*. 2020;7(3):62–73.
 101. Oh T, Kim N, Moon Y, Kim MS, Hoehn BD, Park CH, et al. Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer. *J Mol Diagnostics*. 2013 Jul;15(4):498–507.
 102. Wang C, Yu J, Han Y, Li L, Li J, Li T, et al. Long non-coding RNAs LOC285194, RP11-462C24.1 and Nbla12061 in serum provide a new approach for distinguishing patients with colorectal cancer from healthy controls. *Oncotarget*. 2016;7(43):70769–78.
 103. Vychytilova-Faltejskova P, Stitkovcova K, Radova L, Sachlova M, Kosarova Z, Slaba K, et al. Circulating PIWI-interacting RNAs piR-5937 and piR-28876 are promising diagnostic biomarkers of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018 Sep 1;27(9):1019–28.

ANEXO 1: Glosario de abreviaturas

- CCR: Cáncer Colorrectal
- EEI: Enfermedad inflamatoria intestinal
- CIN: Inestabilidad cromosómica
- MSI: Inestabilidad de microsatélites
- CIMP: Fenotipo metilador de a isla CpG
- APC: Adenomatous polyposis coli
- MMR: ADN mismatch repair
- FAP: Poliposis adenomatosa familiar
- HNPCC: Cáncer hereditario no poliposo
- FOBT: Sangre oculta en heces
- SOHi/FIT: Sangre oculta en heces inmunohistoquímico
- SOH: Sangre oculta en heces
- TAC: Tomografía axial computarizada
- TC: Tomografía computarizada
- AJCC: Comité Conjunto Americano del Cáncer
- VEGFR: Receptores para el factor de crecimiento endotelial vascular
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- CTCs: Células tumorales circulantes
- ADNlc: ADN libre circulante
- ADNtc: ADN tumoral circulante
- ARNlc: ARN libre circulante
- ARNtc: ARN tumoral circulante
- trADN: ADN transrenal
- TEPs: Plaquetas educadas por el tumor
- CEA: Antígeno carcinoembrionario
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- AFP: Alfa fetoproteína
- PSA: Antígeno prostático específico
- CA125: Antígeno cancerígeno 125
- HCG: Gonadotropina coriónica humana
- IARC: Centro Internacional de Investigadores sobre el Cáncer
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- HNSCC: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
- LCR: Líquido cefalorraquídeo
- EMT: Transición epitelio-mesenquimal

- EpCAM: Molécula de adhesión celular epitelial
- FDA: US Food and Drug Administration
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- ddPCR: Droplet Digital PCR
- NGS: Next Generation Sequencing
- ARNm: ARN mensajero
- miARN: microARN
- circRNA: ARN circulante
- lncARN: ARN no codificante largo
- hTERT: Telomerasa transcriptasa inversa
- RNA-Seq: Secuenciación de ARN
- ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
- exoADN: ADN en el interior de exosomas
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- HR: Hazard ratio
- QT Quimioterapia
- ERBB2: Receptor tirosin kinasa Erb-B2
- EMR: Enfermedad mínima residual
- VAF: Frecuencia alélica de una variante
- piARN: ARN que interactúa con PIWI

ANEXO 2: Tabla resumen de los ensayos clínicos en desarrollo

ESTUDIO	TIPO	ESTADO	Nº	CONDICIÓN	INTERVENCIÓN	OBJETIVO
NCT04735900	Ensayo clínico	Reclutando	60	CCRm	Biopsia líquida	Detección de enfermedad progresiva a través de la metilación del neuropéptido Y (NPY) en biopsias líquida.
NCT03476122	Obs.	No conocido	750	CCR	CTC	Desarrollo de una plataforma de biopsia líquida automatizada para la detección de CTC precoz.
NCT04232891	Obs.	Reclutando	141	CCRm	Biopsia líquida	Análisis de ADNtc para la detección precoz de recurrencias en el CCRm operable
NCT04776655	Ensayo clínico	No reclutado	280	CCR, CCRm, mutación RAS	Bevacizumab, cetuximab, 5-FU, irinotecan, levofolinato de calcio	Comparación de la eficacia entre el tratamiento de primera línea (bevacizumab y FOLFIRI) con el tratamiento estándar (cetuximab y FOLFIRI) en RAS salvaje
NCT02792478	Obs.	Archivado	238	CCRm, RAS salvaje	Biopsia líquida	Análisis del ADNtc mediante el método BEAMing para determinar el estado de la mutación RAS en los diferentes estadios
NCT03765736	Obs.	Reclutando	500	Cáncer de colon o recto estadios III-IV (metastásico o irresecable)	Estudio genético	Recomendar la incorporación en terapias dirigidas molecularmente a pacientes con CCR refractario, mediante el análisis de perfiles genómico en sangre
NCT04554836	Ensayo clínico	Reclutando	144	Adenocarcinoma de colon o recto	Cetuximab y otros (FOLFIRI) Biopsia líquida	Evalúa la adicción de cetuximab al tratamiento de base con FOLFIRI en pacientes con CCRm que han desarrollado mutaciones en RAS

NCT04425239	Ensayo clínico	Reclutando	136	CCR estadio IV RAS salvaje	Panitumumab Estudio ADNtc	Evaluar la eficacia del tratamiento con Panitumumab y FOLFORI de primera línea intermitente, en vez de una pauta continuada
NCT03401957	Obs.	Reclutando	120	CCR, resistencia al tratamiento, disregulación vía RAS-RAF, espectrometría de masas	Biopsia líquida Cetuximab	Investiga la resistencia al tratamiento debido a mutaciones en el gen RAS y la utilidad de la biopsia líquida en el control dinámico de las mutaciones.
NCT04258137	Ensayo clínico	Reclutando	332	CCR y NSCLC	Biopsia líquida	Se plantea que el análisis secuencial del ADNtc podría mejorar el tratamiento y supervivencia de individuos con CCR avanzado.
NCT04854213	Ensayo clínico	No reclutado	25	CCRM	Radioterapia corporal esterotáxica Biopsia líquida	Investigar la evolución inmunológica y genética en pacientes con CCR oligometastásico (2-3 nódulos pulmonares limitados) inducidas por la radioterapia
NCT04323813	Obs.	Reclutando	900	CCR	Biopsia líquida	Diagnosticar la enfermedad, progresión y riesgo de recurrencia mediante el nivel de ARNm de los genes de responsables de EMT
NCT04369053	Obs.	Reclutando	25000	Cáncer de colon o recto, cáncer GI, pólipos, adenomas	Test Feenome	Validar la prueba de sangre para la detección temprana de CCR mediante muestras sanguíneas de pacientes sometidos a colonoscopia rutinaria
NCT03751176	Ensayo clínico	Reclutando	85	CCRM RAS salvaje	Panitumumab, irinotecan, ácido fólico, 5-FU	Estudiar la eficacia de la reintroducción del tratamiento con anticuerpos monoclonales antiEGFR tras la progresión a la primera línea de tratamiento.

NCT04566614	Obs.	Reclutando	112	CCR, cáncer de pulmón, cáncer vesical, GIST, cáncer pancreático	ADNtc	Evaluar la eficacia de la biopsia frente las técnicas de diagnóstico actuales que generan aerosoles (broncoscopia, endoscopia gastrointestinal) y se han limitado por la pandemia COVID-19
NCT00133913	Obs.	No conocido	486	CCR, cáncer metastásico	Extracción de sangre para el análisis de CTC	Comparación entre los niveles de CTC y las imágenes radiológicas (progresión / no progresión)
NCT02005913	Obs.	No conocido	600	CCR	CTC	Evaluar la eficacia del análisis de CTC en la detección precoz del CCR
NCT03013868	Obs.	No conocido	200	CCR	CTC	Detección de CTC en sangre de pacientes con CCR para correlacionarlo con la progresión y pronóstico tumoral
NCT02602938	Ensayo clínico	No conocido	40	CCR Cáncer de mama	EMT, CTC, aspirina	Determinar si la aspirina afecta en el número de CTCs en el cáncer de mama metastásico y CCR
NCT02948985	Obs.	No conocido	100	CCRm	FOLFIRI +/- cetuximab	Evaluar la eficacia de combinar CTC con marcadores tumorales en CCR avanzado que reciben quimioterapia
NCT03256084	Ensayo clínico	Reclutando	120	CCR	Muestras de sangre y otros fluidos	Eficacia de las CTC como marcadores de riesgo de progresión en el CCR
NCT03637686	Obs.	Reclutando	1800	CCR	ADNtc	Eficacia del ADNtc como marcador de EMR y riesgo de recurrencia tras la administración del tratamiento curativo
NCT04726800	Obs.	Reclutando	300	CCR estadios I-III	ADNtc	Demostrar la utilidad del ADNtc como predictor de la EMR tras la cirugía
NCT03748680	Ensayo clínico	Reclutando	64	CCR, ADNtc, QT adyuvante Supervivencia libre de progresión	QT combinada con flouropirimidina y ocaliplatino	Investigar si el uso de QT adyuvante mejora la supervivencia libre de enfermedad mediante el análisis de ADNtc

NCT04704960	Obs.	No reclutado	400	CCR, metástasis pulmonares	Biopsia líquida	Predecir el resultado del tratamiento local (cirugía o radiación) y la recurrencia de metástasis pulmonares mediante el análisis de ADNtc en pacientes con CCR
NCT03737539	Obs.	Reclutando	300	CCR estadio II-III, ADNtc	Detección de metilación multigénica	Eficacia del efecto predictivo de la metilación postoperatoria del ADNtc en plasma tras la resección tumoral
NCT03594448	Obs.	Reclutando	35	CCR estadio IV MSI	Biopsia líquida en serie	Estudio de la eficacia de la biopsia líquida en serie para detectar MSI en pacientes con CCR estadio IV
NCT04084249	Ensayo clínico	Reclutando	254	CCR, cáncer digestivo o de colon o rectal o gástrico	Análisis del ADNtc	Comparación entre el análisis de ADNtc y la TC en el seguimiento postoperatorio del cáncer
NCT04050345	Obs.	Reclutando	1000	CCR estadios I-III	ADNtc	Análisis del tejido tumoral, muestras de sangre seriadas y datos clínicos en pacientes con CCR para predecir la recaída
NCT03750175	Obs.	Completado	100	CCRM, Mutaciones KRAS, NRAS y BRAF	Análisis de ADNtc	Evaluar la viabilidad y valor clínico del uso de ADNtc como selección del tratamiento con antiEGFR
NCT04394572	Obs.	Reclutando	75	CCR	Muestra de sangre	Identificar nuevos marcadores proteicos e exosomas tumorales circulantes para el diagnóstico de CCR
NCT03844620	Ensayo clínico	Reclutando	100	CCR estadios II-IV CCR refractario	ADNtc	Evaluar la eficacia del análisis de ADNtc para guiar el tratamiento con Regorafenib o TAS-102 en CCR diseminado
NCT04555369	Ensayo clínico	No reclutado	300	CCRM	Quimioterapia ADNtc	Evaluar el valor de ADNtc en la predicción de la eficacia farmacológica de la quimioterapia para el CCRM

NCT03259009	Obs.	No conocido	73	CCRm	Mutación RAS ADNtc	Evaluar la correlación entre la presencia de mutaciones RAS y la eficacia de reintroducción de la terapia antiEGFR
-------------	------	-------------	----	------	-----------------------	--

Tabla 4: Estudios en desarrollo sobre la biopsia y el CCR. Abrevaciones: Obs., Observacional; GI, Gastrointestinal