

Biopsia líquida y secuenciación de nueva generación (NGS): El siguiente nivel de la investigación clínica traslacional

El ADN sin células puede resolver la heterogeneidad de los tumores.

Introducción

El ADN sin células (cfDNA) que circula en la sangre puede proceder de diferentes tejidos, tumores o de microorganismos presentes en el organismo. El análisis de biopsia líquida de cfDNA en sangre resulta especialmente útil para supervisar y controlar determinadas enfermedades, cáncer incluido.

Los tumores pueden desprender una cantidad importante de ADN. El ADN liberado por células tumorales muertas, denominado ADN tumoral circulante (ctDNA), es una pequeña parte del cfDNA total en la sangre. Por lo tanto, es necesario un ensayo robusto para detectar mutaciones somáticas a frecuencias bajas.

Los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS) ofrecen una detección muy sensible y específica de las mutaciones conocidas. Recientemente se están desarrollando exhaustivos ensayos que analizan una mayor variedad de genes candidatos y tipos de variantes para nuevos tumores que no tienen variantes conocidas. A medida que estos métodos evolucionan, cada vez cobra mayor importancia como método para supervisar el estado de la enfermedad el análisis del ctDNA en diferentes usos, como el cribado, la selección del tratamiento, la supervisión y la identificación de la resistencia a los tratamientos.

Ventajas de la biopsia líquida sobre la biopsia de tejido

Gracias ser un método relativamente no invasivo de adquisición de muestras, las biopsias líquidas resultan especialmente útiles cuando no se puede conseguir el tejido necesario. Incluso si se puede acceder al tejido enfermo, en la supervisión de muchas enfermedades es deseable repetir la biopsia, por lo que el análisis de cfDNA ofrece varias ventajas.

La obtención de las muestras para biopsias líquidas se puede hacer con los métodos habituales de flebotomía, disciplina en la que abundan profesionales bien capacitados. Por el contrario, la biopsia de tejido a menudo requiere habilidades especializadas por parte de técnicos o cirujanos cualificados. Para este paso esencial, la biopsia líquida resulta más rentable, ofrece un menor tiempo de procesamiento y tiene una menor posibilidad de que se produzcan eventos adversos asociados. Una vez adquirida la muestra, los métodos de extracción

de ADN optimizados para el análisis de cfDNA son más rápidos y menos costosos que los usados con las muestras fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE). La disponibilidad de los tejidos concretos puede limitar en gran medida las biopsias de tejidos en evaluaciones iniciales o a la hora de repetir biopsias. Se han revisado las directrices de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN, red de centros oncológicos integrales de Estados Unidos) para recomendar la biopsia líquida en algunos tipos de tumores, especialmente en los casos en los que la biopsia de tejido no es factible, como en el cáncer de pulmón no microcítico.¹

Aunque el ctDNA procedente de un origen tisular concreto representa solo una pequeña parte del total del cfDNA total, el análisis del cfDNA se ha perfeccionado como instrumento para evaluar la heterogeneidad de los tumores y superar el sesgo a la hora de obtener muestras de tejidos. El análisis del ctDNA puede utilizarse para supervisar el avance de la enfermedad y su respuesta al tratamiento. Gracias a métodos de secuenciación que pueden identificar nuevas mutaciones, la biopsia líquida puede resultar especialmente útil a la hora de supervisar la resistencia adquirida resultante de las nuevas alteraciones. A medida que aumenta la sensibilidad y se desarrollan ensayos que evalúan muchos genes a la vez, el cfDNA puede utilizarse para crear perfiles tumorales completos (Figura 1). Así pues, la biopsia líquida puede identificar nuevas mutaciones mientras avanza la enfermedad y surgen mutaciones en nuevos tejidos que no son los del tumor original.

Tecnologías utilizadas para analizar el ctDNA

Los métodos moleculares más utilizados a la hora de analizar el cfDNA son la PCR cuantitativa (qPCR), la PCR digital por gota (ddPCR) y la secuenciación de nueva generación (NGS). Ambos métodos de PCR requieren el uso de sondas de ADN específicas para genes concretos y miden cuantitativamente el número de objetivos de la muestra. La NGS también requiere el uso de sondas para capturar fragmentos específicos de ADN, pero los datos que genera son de la secuencia del ADN capturado.

qPCR: La qPCR es eficaz para analizar un reducido número de variantes. No obstante, los ensayos de qPCR se limitan a dianas relativamente escasas y evalúan solo algunos tipos de variantes, por lo que su valor en cuanto a descubrimientos se refiere es limitado.

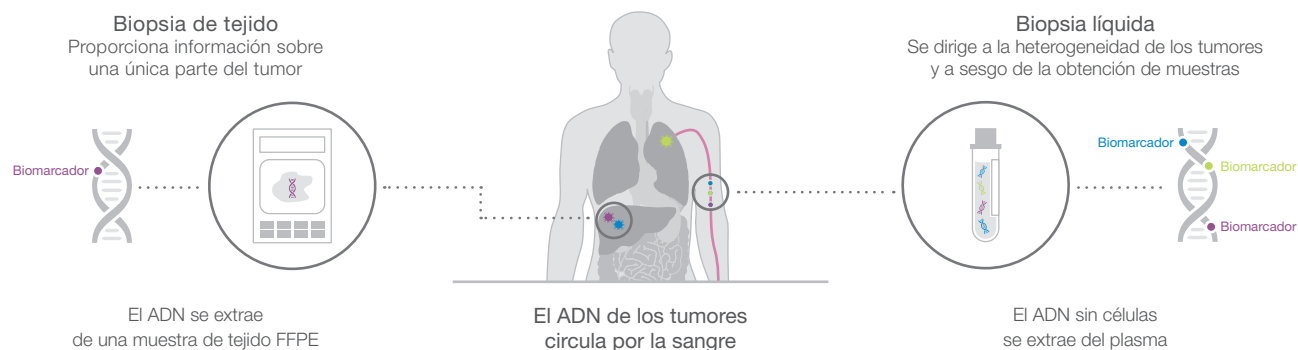


Figura 1: Mediante los nuevos métodos moleculares se pueden evaluar muchos tejidos y biomarcadores de muestras de plasma. La creación de perfiles genómicos utilizando ADN sin células aún a cientos de marcadores en un único ensayo.

Tabla 1: Comparación de la PCR y la NGS selectiva

Método	Ventajas	Dificultades
PCR	Alta sensibilidad Flujo de trabajo conocido Los laboratorios ya disponen del equipo esencial	Solo puede analizar un conjunto limitado de variantes con baja resolución Prácticamente carece de valor para realizar descubrimientos Escasa capacidad de ampliación debido a los crecientes requisitos de las muestras utilizadas
NGS selectiva	Mayor profundidad de secuenciación, que permite una mayor sensibilidad (hasta el 0,5 %) Mayor potencia para realizar descubrimientos, ideal para abordar la heterogeneidad de los tumores Mayor resolución de variantes Mayor rendimiento de las muestras gracias al multiplexado de muestras	No es tan rentable para secuenciar un número reducido de objetivos (menos de 20) Requiere más tiempo para secuenciar un número reducido de objetivos (menos de 20)

ddPCR: La precisión de la ddPCR es mejor que la de qPCR, pero es más cara y requiere mayores conocimientos técnicos. La ddPCR también carece de valor para los descubrimientos, ya que el número de dianas y tipos de variantes se limitan al diseño del ensayo específico.

NGS: Dado que la NGS requiere la resolución de las secuencias de ADN con un único nucleótido, puede descubrir nuevas variantes sin incluir conocimientos previos en el diseño del ensayo. Esto permite evaluar varios tipos de variantes y descubrir mutaciones en una nueva ubicación de un gen. La NGS es más cara y requiere más tiempo cuando se analiza un número reducido de variantes o muestras. No obstante, si los ensayos se diseñan para cubrir más objetivos moleculares, la naturaleza integral de la NGS puede aportar valor en cuanto a eficiencia y ahorro de costes (tabla 1).

Ventajas que ofrece la NGS para la biopsia líquida

La NGS secuencia millones de fragmentos de ADN en paralelo y luego realiza una alineación informática de las lecturas con el genoma. En función del diseño del ensayo, la NGS puede ser muy exhaustiva y cubrir un gran número de genes objetivo y tipos de variantes. A medida que sigue creciendo el número de biomarcadores procesables en los tratamientos contra el cáncer, la capacidad de aunar un gran número de biomarcadores en una sola prueba probablemente se hará más valiosa, tanto para la investigación como para el ámbito clínico, al reducir el número de pruebas que son necesarias para encontrar respuestas significativas. La NGS puede ahorrar muestras, tiempo y dinero al evitar la repetición de las pruebas.

Las opciones de preparación de la biblioteca de secuenciación, como los procesos químicos de captura de híbrido, permiten extraer grandes fragmentos de los genes objetivo de las muestras de cfDNA. Las sondas de hibridación se pueden diseñar con un tamaño lo suficientemente grande para capturar objetivos incluso si hay mutaciones en las regiones hibridadas. La posterior secuenciación de los objetivos capturados permite descubrir nuevas mutaciones que no es necesario conocer de antemano para diseñar el ensayo. Los ensayos NGS se pueden diseñar de forma selectiva para un gran número de genes con una baja profundidad de secuenciación (más exhaustiva, menos sensible), o para un número relativamente pequeño de genes con una mayor profundidad de secuenciación (menos exhaustiva, más sensible). En el caso de la biopsia líquida, en la que la fracción de ctDNA de una muestra de cfDNA es potencialmente baja, es necesaria una gran profundidad de secuenciación para lograr la sensibilidad necesaria que detecte con precisión las variantes poco abundantes. Así pues, si bien existen paneles de genes de NGS con un contenido exhaustivo, los usos de la biopsia líquida han sido limitados hasta hace poco a causa de problemas de sensibilidad.

La NGS permite la creación de perfiles genómicos completos

Las recientes mejoras en los instrumentos usados para la secuenciación permiten secuenciar muestras con una profundidad de cobertura extremadamente alta en grandes partes del genoma de una única

muestra. Al proporcionar exhaustividad y una elevada sensibilidad y especificidad, la NGS permite analizar cientos de genes con la profundidad de secuenciación que requiere el análisis del cfDNA. Estas características permiten evaluar un gran número de mutaciones conocidas, así como descubrir nuevas mutaciones conductoras en la investigación del cáncer. Hay disponibles nuevas herramientas moleculares y métodos bioinformáticos que aumentan la precisión. Los identificadores moleculares exclusivos (UMI) se pueden integrar en las preparaciones de las bibliotecas de ADN para marcar moléculas individuales de ADN antes de llevar a cabo los pasos de amplificación y utilizarse posteriormente durante el análisis de los datos para identificar los errores introducidos por la PCR. Mediante sofisticados algoritmos se identifican los artefactos de la secuenciación y se reduce el ruido de fondo, que produce errores, facilitando así la identificación de las verdaderas variantes con una gran especificidad.

La biopsia líquida, combinada con ensayos moleculares exhaustivos para evaluar las variantes somáticas, permite detectar las nuevas mutaciones que surgen de la evolución de los tumores, la resistencia a los medicamentos y la metástasis. El cáncer es una enfermedad impredecible en la que los genes conductores no siempre se conocen o que no se pueden conocer correctamente por el tipo de tejido. Gracias a su capacidad de evaluar un gran número de genes y de tejidos, la sinergia de la biopsia líquida con la creación de perfiles genómicos completos mediante NGS ofrece un gran valor. Estudios recientes en los que se realizaron biopsias líquidas emparejadas a la correspondiente biopsia de tejido de muestras tumorales han demostrado que, cuando se utilizan ensayos exhaustivos, el análisis del cfDNA detecta un gran número de los biomarcadores recomendados por las directrices, así como alteraciones de la resistencia que las biopsias de tejido emparejadas no detectaron.^{2,3}

Resumen

En la era de la medicina de precisión, un número cada vez mayor de biomarcadores está atrayendo un interés creciente por los métodos moleculares que aúnan muchos biomarcadores en una única prueba. Por otro lado, los estudios han demostrado que la biopsia líquida, gracias a su perspectiva más amplia de la evolución de los tumores sistémicos, puede proporcionar información valiosa para algunos tipos de tumores que la biopsia localizada de tejido podría no identificar. Gracias a los recientes avances de la tecnología NGS, se pueden lograr estas dos metas, lo que permite la creación de perfiles genómicos completos combinada con la sensibilidad y la especificidad que requieren las aplicaciones de la biopsia líquida.

Referencias

1. NCCN Guidelines. www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx. Acceso: 13 de diciembre de 2018.
2. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med*. 2019;25(9):1415-1421.
3. Leighl NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(15):4691-4700.