

BIOPSIA LÍQUIDA: ESTUDIO GENÓMICO PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y TERAPÉUTICA DEL PACIENTE ONCOLÓGICO

JUAN LLANOS ¹, GÉNESIS CHANCHAMIRE ¹, FANNY CARREÑO ², THAIS REBOLLEDO ¹
CARLOS RAMÍREZ ³

SERVICIO DE RADIOTERAPIA Y MEDICINA NUCLEAR, HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS ¹, UNIDAD DE RADIOGENÓMICA, INMUNOLOGÍA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR ² INSTITUTO VENEZOLANO INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA ³, CARACAS, VENEZUELA.

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que ha ido en aumento en el transcurso de los años y constituye un problema de salud pública mundial y nacional, en nuestro país los diagnósticos en su mayoría tardíos. Con el avance de la Biotecnología, conocimiento genómico han surgido métodos diagnósticos con alta sensibilidad, especificidad, mínimamente invasivos que permite al clínico dar al paciente un tratamiento individualizado, rápido y efectivo mejorando pronóstico y la terapéutica. La biopsia líquida proporciona una herramienta diagnóstica útil, de bajo costo y accesible, para detectar DNA y ARN tumoral circulante en el torrente sanguíneo mediante una muestra simple de sangre periférica con la que se detectan marcadores genéticos específicos para diversos tipos de cáncer. **OBJETIVO:** Experiencia de 2 años en su utilización para determinar marcadores genómicos tumorales, comparar resultados con publicaciones internacionales. **MÉTODO:** Previo consentimiento informado, fueron procesadas 69 muestras mediante la técnica de amplificación por PCR punto final (PCRpf) y secuenciación automatizada realizados en la Unidad de Radiogenómica, Inmunología y Oncología Molecular del Servicio de Radioterapia y Medicina Nuclear del Hospital Universitario de Caracas en los años 2023-2024 **RESULTADOS:** Obtuvimos material genético de excelente calidad y la determinación de biomarcadores específicos

para cáncer mama, tiroides, páncreas, melanoma, gástrico, cuello uterino neuroendocrino. Así también, se validó la operatividad de la prueba mediante el uso del marcador endógeno GAPDH. **CONCLUSIONES:** La biopsia líquida es una herramienta eficaz, versátil, económica, rápida e incruenta con potencialidad para pesquisa, pronóstico y terapéutica personalizada.

PALABRAS CLAVE: Biopsia líquida, cáncer, genómica, diagnóstico, pesquisa, pronóstico, terapéutica.

SUMMARY

The cancer is a disease that has been increasing over the years and constitutes a global and national public health problem, in our country being mostly late diagnoses. With the advancement of Biotechnology and the genomic knowledge, diagnostic methods with high sensitivity, specificity and minimally invasive have emerged that allow the clinician to give the patient an individualized, rapid and effective treatment, improving the prognosis and therapeutics. Liquid biopsy provides a useful, low-cost and accessible diagnostic tool to detect circulating tumor DNA and RNA in the bloodstream through a simple peripheral blood sample with which specific genetic markers for various types of cancer are detected. **OBJECTIVE:** To present 2 years' experience in the use of liquid biopsy to determine tumor genomic markers, and compare the results with international publications. **METHOD:** With prior informed consent, 69 samples were processed using the endpoint PCR amplification technique (PCRpf) and automated sequen-

ORCID

Fanny Carreño 0009-0009-6553-0559
Génesis Chanchamire 0009-0004-4078-0803
Juan Llanos 0000-0001-7530-8235
Thais Morella Rebolledo 0009-0004-4828-3983 thamoreb@hotmail.com

Recibido: 14/03/2025 Revisado:12/05/2025

Aceptado para publicación:01/06/2025

Autor de correspondencia: Juan C Llanos. E-mail:
juancarlosllanosdiaz20@gmail.com

Esta obra está bajo una Licencia
[Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike
4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

cing carried out in the Radiogenomics, Immunology and Molecular Oncology Unit of the Radiotherapy and Nuclear Medicine Service of the Caracas University Hospital in the years 2023- 2024. **RESULTS:** It was possible to obtain genetic material of excellent quality and the determination of specific biomarkers for the breast, thyroid, pancreas, melanoma, gastric, and the neuroendocrine cervical cancer. Likewise, the operability of the test was validated through the use of the endogenous marker GAPDH. **CONCLUSIONS:** Liquid biopsy is an effective, versatile, economical, fast and bloodless tool with potential for personalized research, prognosis and therapeutics.

KEYWORDS: Liquid biopsy, cancer, genomics, diagnosis, research, prognosis, therapeutics.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones, es decir, casi una de cada seis de las que se registran. Los tipos de cáncer más comunes son los de mama, pulmón, colon y recto y próstata ⁽¹⁾.

Los últimos datos oficiales de registros de mortalidad de Venezuela publicadas en el Anuario Epidemiológico de 2012 de la situación del cáncer en el país para la morbilidad o incidencia se obtienen a través de estimaciones por métodos estadísticos, que describen la mortalidad y los datos de morbilidad del Registro Central de Cáncer, del Programa de Oncología del MPPS que describen incremento de las tasas de incidencia y mortalidad con respecto a los años previos ⁽²⁾.

En el último boletín de pronóstico de incidencia y mortalidad de cáncer en Venezuela para el 2023 por la Sociedad Anticancerosa de Venezuela, describen que se evidencia un aumento tanto para la mortalidad como para la incidencia para ambos sexos, determinando 8 a 12 nuevas incidencias por 100 000 habitantes y

8 defunciones más por 100 000 habitantes, con respecto a los años previos, siendo el cáncer de mama y cuello uterino las principales entidades para el sexo femenino y cáncer de próstata y pulmón para el sexo masculino ⁽³⁾.

La biopsia líquida (BL) consiste en un procedimiento mínimamente invasivo, donde a partir de muestras de diversos fluidos corporales podemos aislar componentes celulares como células tumorales circulantes, ácidos nucleicos tumorales circulantes (ctDNA) y expresión de ARN mensajero (ARNm). Como muestras se pueden utilizar múltiples fluidos biológicos como plasma, orina, saliva, secreción nasal, leche materna, líquido amniótico, fluido uterino, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico, lavado bronco-alveolar, heces, lágrimas y semen. Actualmente las biopsias de tejido son el estándar del diagnóstico oncológico en la práctica clínica, pero presentan algunas limitaciones que la biopsia líquida es capaz de compensar, por ello el uso de biomarcadores a partir de biopsia líquida supone un importante adelanto en el diagnóstico precoz de procesos tumorales o de estimar el pronóstico de la enfermedad ⁽⁴⁾.

Estas células circulantes y sus “materiales” derivan, o bien del tumor primario o bien de las propias metástasis. En este último caso se suelen denominar células tumorales diseminadas (DTC). En muchas ocasiones las biopsias clínicas tradicionales, es decir, la obtención directa de material tumoral, son impracticables ⁽⁵⁾.

Su génesis recae en las células del organismo, el cual existe un intercambio de información imprescindible para el mantenimiento de la homeostasis. Uno de los mecanismos de comunicación más importantes es la liberación de moléculas solubles, donde se destaca los exosomas. Las funciones fisiológicas de los exosomas son diversas en función de las células de las que derivan, destacando el mantenimiento de la homeostasis, la modulación de la respuesta inmune, papel en el desarrollo embrionario,

enfermedades neurodegenerativas y síntesis de melanina. Pero también pueden participar como mediadores de comunicación tumoral mediante el transporte de oncoproteínas y onco-ARN, ya desde las primeras fases de la alteración de la división celular. Los pacientes con cáncer tienen niveles más altos de exosomas que los individuos sanos, por ello la utilización de la BL y la búsqueda de biomarcadores en el interior de los exosomas circulantes es algo prometedor para el diagnóstico precoz del cáncer ⁽⁴⁾.

El plasma destaca como fuente principal de ctDNA, usando ácido etilendiamino tetraacético EDTA como anticoagulante. El suero contiene normalmente entre 2 y 24 veces más ctDNA que el plasma, pero probablemente se debe a una contaminación por ADN derivado de la rotura de los glóbulos blancos durante la coagulación. Por ello los niveles de ctDNA son más estables en plasma que en suero, de ahí la tendencia a realizar estudios sobre todo a partir de muestras de plasma en lugar de suero ⁽⁶⁾. Asimismo, cada tipo de cáncer tiene diferentes genes que se encargan de inducir la epigenética de un cáncer en específico, mediante activación de vías de señalizaciones.

En el caso del cáncer de mama, los genes han demostrado que sólo unos pocos genes mutan con frecuencia en como BRCA 1 y 2, TP53 y PIK3CA, CCND1 y FGFR1, así como para alteraciones genómicas raras (AKT1, EGFR, MDM2, amplificaciones de alto nivel de FGFR2, AKT2, IGF1 y MET) ⁽⁷⁾.

Para el cáncer de pulmón, las primeras literaturas describen en cáncer de pulmón células no pequeñas la detección de ADN mutante de EGFR, detecciones de mutaciones KRAS ⁽⁸⁾.

Cáncer de colon, se observa que las mutaciones frecuentes en el gen KRAS mutante, BRAF V600E y EGFR, como los principales genes detectados ⁽⁹⁾.

El cáncer de tiroides diferenciado se ve afectado principalmente por mutaciones en genes

relacionados con la vía MAPK. Estas incluyen mutaciones BRAF, NRAS, HRAS y KRAS. La mutación más frecuente en PTC afecta a BRAF (62 %) y, más concretamente, en la posición 600 (BRAFFV600E). Las fusiones del gen RET son raras RET/PTC1 y RET/PTC3 ⁽¹⁰⁾.

En el cáncer neuroendocrino de cuello uterino se observan biomarcadores como DLL3, TROP-2 y FOLR1, así como mutaciones PIK3CA y PTEN que conducen a la regulación positiva de la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR. Otras mutaciones como la NRAS, fusiones del gen NTRK1, este último es poco frecuente ⁽¹¹⁾.

Para el cáncer de páncreas describen mutaciones en el gen KRAS, que sugiere estar asociados a una peor supervivencia general en los pacientes con esta enfermedad ⁽¹²⁾. Otros reportados para cáncer de páncreas son SIX3, TRIM73, MAPT, FAM150A, EPB41L3, MIR663, LOC100130148 y LOC100128977 ⁽¹³⁾. En la secuencia del aparato digestivo, también se ha estudiado en los cánceres esofágicos, gástrico o en la unión gastroesofágica la presencia de la amplificaciones del gen HER2 y la expresión del PD-L1 (CD274) ⁽¹⁴⁾.

En los sarcomas se encuentran amplificaciones del MDM2, CDK4a, así como mutaciones IDH1/IDH2, EWSR1-FLI1 (para sarcoma de Ewing), PAX3/PAX7-FOXO1 (rabdiosarcoma alveolar), SYT-SSX2 (sarcoma sinovial monofásico), las fusiones SYT-SSX1/SSX2 (sarcoma sinovial bifásico) y TLS FUS/CHOP (liposarcoma mixoide) ⁽¹⁴⁾.

En el caso de los melanomas encontramos mutaciones y amplificaciones en el BRAF V600, KIT y CDKN2A, la familia de los RAS y PD-L1 ⁽¹⁴⁾.

El objetivo del presente trabajo es presentar experiencia de 2 años en la utilización de la BL para determinar marcadores genómicos tumorales, y comparar resultados con publicaciones internacionales.

MÉTODO

Previo consentimiento informado, fueron procesadas 69 muestras de sangre periférica, de las cuales 49 presentaron diagnóstico oncológico y 20 individuos control (sin patología tumoral). Como controles de validación del método de la PCRpf y de la metodología del laboratorio se utilizaron los controles de reacción (sin material genético), endógeno genético (GAPDH) e individuos sanos.

A partir del material genético (ADNg/ARNt, a los ARNt se les realizó Transcripción Inversa (RT) para adquirir el ADNc.), obtenido de la BL, se emplearon diversas amplificaciones de los genes de interés (Cuadro 1) mediante la técnica de PCRpf y por último la Secuenciación Automatizada. Estos estudios fueron realizados en la Unidad de Radiogenómica, Inmunología y Oncología Molecular del Servicio de Radioterapia y Medicina Nuclear del HUC y en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en los años 2023-2024.

Cuadro 1. Biomarcadores genómicos utilizados en la PCRpf de acuerdo a la patología

PATOLOGÍA	Biomarcadores
Mama	BRCA 1 BRCA 2
Tiroides	K-Ras N-Ras B-RAF RET/PTC1 RET/PTC3.
Cuello uterino	K-Ras BRCA1 BRCA 2
Melanoma	BRAF
Gástrico	KRAS NRAS
Páncreas	EGFR K-Ras
Pulmón	EGFR K-Ras
LMA/LLA	BCR/ABL

Los datos obtenidos fueron tabulados en códigos numéricos para el registro de las muestras, incluyendo información clínica de la historia médica de cada paciente (datos personales, dirección, teléfono, diagnóstico, evolución de la enfermedad, paraclínicos tanto de laboratorios como imagenológicos y tratamientos previos).

Los resultados de las amplificaciones fueron visualizados en geles de agarosa, fotografiados y analizados. Las secuenciaciones se recibieron como Figuras.

Se obtuvo una estadística descriptiva de los biomarcadores que se tomaron en consideración en dependencia del diagnóstico de cada paciente, y adicionalmente se demuestran datos como edad y sexo.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 69 muestras de datos, de las cuales 49 son pacientes con diagnóstico de cáncer y 20 individuos sanos, durante el período comprendido entre 2023 a 2024. El sexo que prevaleció en este estudio fue el femenino con 59 pacientes (85 %) y 10 pacientes masculinos (15 %).

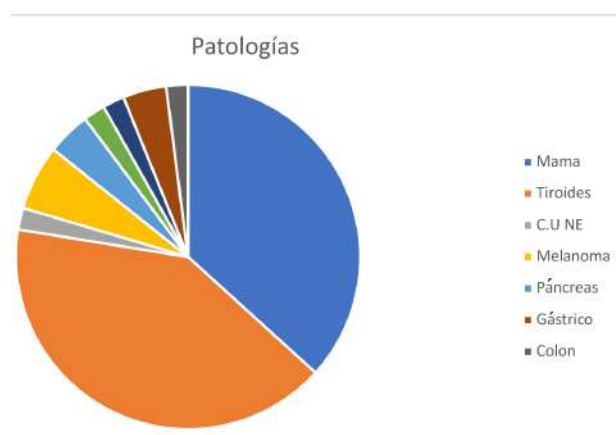


Figura 1. Diagrama circular de la distribución por patologías.

De todas las patologías recibidas durante el período de estudio predominó cáncer de tiroides (39 %), seguido de cáncer de mama (35 %), melanoma (5,8 %), cáncer gástrico y cáncer de páncreas (3,9 %), el resto (cuello uterino neuroendocrino, pulmón, LMA/LLA y cáncer de colon, solo 1,9 %).

La Figura 2 muestra la corrida en gel de agarosa al 1 % del material genético obtenido a partir de la BL. La banda identificada como Pac visualiza un alto contenido y conservación del material genético. La banda identificada como PM corresponde al marcador de peso molecular empleado en el estudio.

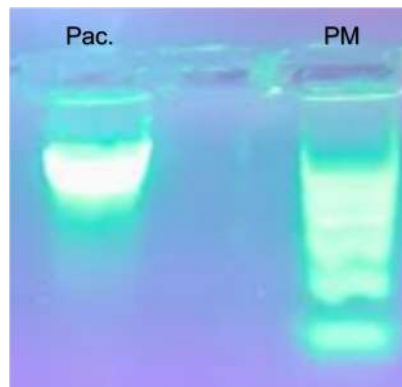


Figura 2. Corrida en gel de agarosa al 1 % de la extracción de ADNg a partir de la BL.

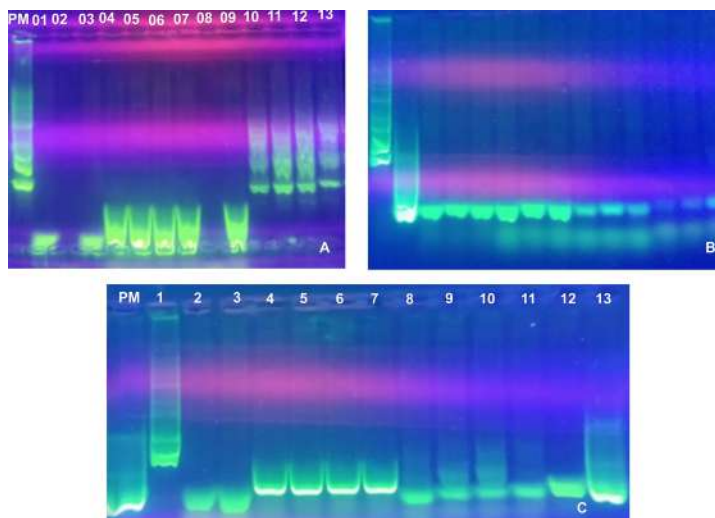


Figura 3. Corridas de geles de agarosa al 2 % de los productos de amplificación por PCRpf de las 69 muestras de la población en estudio

La Figura 3a muestra en el carril PM el marcador de peso molecular de 1Kb, los 13 carriles restantes corresponden a las corridas de varias de las muestras para los marcadores: GAPDH (carril 1 al 3), KRAS (carriles 4 al 9), y RET/PTC 3 (carriles 10 al 13).

La Figura 3b muestra en el carril PM el marcador de peso molecular 1Kb, el carril 2 el marcador de peso molecular de 100pb, los 12 carriles restantes corresponden a las corridas de varias de las muestras para los marcadores:

GAPDH (carril 1,2,3), BRCA 1 (carriles 4,5,6), BRCA 2 (carriles 7,8,9) y BRAF (carriles 10,11,12).

La Figura 3c muestra en los carriles PM y 14 al marcador de peso molecular 100pb, el carril 2 el marcador de peso molecular de 1Kb, los 11 carriles restantes corresponden a las corridas de varias de las muestras para los marcadores: BRAF (carril 3 y 4), NRAS (carriles 5, 6, 7 y 8), RET/PTC1 (carriles 9, 10, 11 y 12) y GAPDH (carril 13).

Por último, la Figura 4 muestra parte de uno de los electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación automatizada de los productos de PCRpf de una BL. Las líneas de diferentes colores representan la aparición en el gráfico de cada una de las bases. Las letras corresponden a cada una de las bases del código genético, y los números en la parte superior representan la enumeración de las bases de la porción secuenciada.

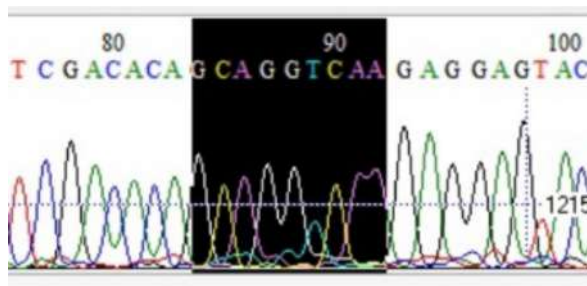


Figura 4. Electroferograma de las secuenciaciones automatizadas de los productos de PCR a partir de BL. Secuenciación de una región del gen KRAS para un paciente con cáncer de páncreas.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo ponen como evidencia por primera vez en nuestro país, la utilidad de la BL para estudios genéticos en oncología. Como se puede observar en la Figura 2 y 3 el protocolo de la URIOM utilizando la BL permite obtener un material genético de alta calidad y pureza con el que se logró amplificar cada uno de los biomarcadores tumorales específicos, lo que conllevó a una orientación de conducta terapéutica individualizada y personalizada para cada paciente ⁽⁴⁾.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por las escuelas europeas y americanas en la implementación de la BL tanto en la confirmación de las enfermedades en etapas avanzadas como en despistajes tempranos ⁽¹⁴⁾. Podemos concluir en:

1. La BL demostró ser para nuestro país una herramienta útil, poco invasivo, económico, de resultados rápidos, eficaz y con excelente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico, pronóstico y con capacidad para definir u orientar el tratamiento inmunológico de la oncología moderna.
2. Es capaz de confirmar diagnóstico oncológico empleando un panel específico de biomarcadores genómicos, y redirigir la terapéutica a emplear.
3. La BL permitió detectar fases avanzadas de la enfermedad (perdidas de bases), que se correlacionan con fase terminal de la misma, que conllevan a implicaciones clínicas importantes, superando de este modo las expectativas de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial para la Salud (OMS) [Internet]. [Consultado 03 febrero 2022]. Disponible en: URL: Cáncer (who.int)
2. Capote N L. Resumen del cáncer en Venezuela. *Rev Venez Oncol.* 2015;27(4):256-268.
3. Villalta DE, Sajo-Castelli AM, Araya LE, Ovalles PJ. Pronósticos de la mortalidad e incidencia de cáncer en Venezuela año 2023 [Internet]. [Consultado septiembre 2023] Disponible en: URL: Pronosticos-de-la-mortalidad-e-incidencia-de-cancer-2023.pdf (cancervenezuela.org)
4. Hernández Jiménez J, Borrás Blasco C. [Analysis of liquid biopsies for cancer diagnosis: Systematic review]. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2020;55(6):343-349.
5. García-Rico Fernández E, López Muñoz F. Biopsia líquida. [Tesis]. Universidad Camilo José Cela. 2017. Disponible en: URL: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=285615>
6. Wu K, Xing F, Wu SY, Watabe K. Extracellular vesicles as emerging targets in cancer: Recent development from bench to bedside. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017;1868:538-563, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.10.001>.

7. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013;497:108-112. doi:10.1038/nature12065
8. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3915-3921. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2324
9. Lindfors U, Zetterquist H, Papadogiannakis N, Olivecrona H. Persistence of K-ras mutations in plasma after colorectal tumor resection. *Anticancer Res*. 2005;25(1B):657-661.
10. Acuña-Ruiz A, Carrasco-López C, Santisteban P. Genomic and epigenomic profile of thyroid cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2023;37(1):101656. doi: 10.1016/j.beem.2022.101656.
11. Cimic A, Vranic S, Arguello D, Contreras E, Gatalica Z, Swensen J. Molecular profiling reveals limited targetable biomarkers in neuroendocrine carcinoma of the cervix. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2021;29(4):299-304.
12. Li T, Zheng Y, Sun H, Zhuang R, Liu J, Liu T, et al. K-Ras mutation detection in liquid biopsy and tumor tissue as prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer: A systematic review with meta-analysis. *Med Oncol*. 2016;33(7):61. doi: 10.1007/s12032-016-0777-1.
13. Uhe I, Hagen ME, Ris F, Meyer J, Toso C, Douissard J. Cell-free DNA liquid biopsy for early detection of gastrointestinal cancers: A systematic review. *World J Gastrointest Oncol*. 2021;13(11):1799-1812.
14. El-Deiry WS, Goldberg RM, Lenz HJ, Shields AF, Gibney GT, Tan AR, et al. The current state of molecular testing in the treatment of patients with solid tumors, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(4):305-343. doi: 10.3322/caac.21560.