

COLEGIO DE BIOQUIMICOS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES



AVANCES RECIENTES EN BIOPSIA LÍQUIDA PARA LA INVESTIGACIÓN EN ONCOLOGÍA DE PRECISIÓN

Yoshiharu Sato, Ryo Matoba y Kikuya Kato

Biol. Pharm. Bull. 42, 337–342 (2019)

1-INTRODUCCIÓN

La biopsia líquida es una prueba genética prometedora, ya que es mínimamente invasiva y además permite analizar el ADN circulante tumoral (ADNct) o células tumorales circulantes (CTCs) en una muestra de sangre. Aunque la presencia de ADNct se describió por primera vez hace más de 30 años (1), se necesitó de investigación y desarrollo intensivo de técnicas para comenzar a utilizarse en la década del 2010. En esta revisión, presentamos el progreso actual alcanzado en el análisis de la tecnología aplicada a la biopsia líquida, enfocada principalmente en las aplicaciones de secuenciación de próxima generación (NGS). Además, revisamos los desafíos y dificultades en la aplicación clínica de la biopsia líquida como lo sugieren los resultados de estudios clínicos recientes.

2-BIOLOGÍA DEL ADN CIRCULANTE TUMORAL

Se propusieron mecanismos activos y pasivos como origen del ADN libre de células (ADNcf). En el mecanismo pasivo, el ADNcf se libera en la sangre a través de la apoptosis y la necrosis celular. La fagocitosis de células apoptóticas / necróticas por fagosomas y los macrófagos se asocian con la rotación de ADNcf. En el mecanismo activo, las células tumorales secretan al citoplasma el ADN fragmentado para comunicarse activamente con el tejido distante a través de exosomas (vesículas extracelulares) (2). Se estimó por primera vez el recambio de ADNct fetal en la sangre de la madre y luego se determinó la vida media después del nacimiento, arrojando un promedio de 16.3 minutos (3). Mientras que la vida media del ADNct después de la intervención quirúrgica se estimó en 114 minutos, el nivel de ADNcf fue 3 veces mayor en pacientes con cáncer, comparados con los de individuos sanos (4). Además, se observó que los niveles de ADNct en pacientes con cáncer parecen mostrar una amplia variedad de rangos (5). La tasa de detección de ADNct difiere de acuerdo a la etapa del cáncer, se encontró en el 47% de los pacientes de la etapa 1, el 55% en una etapa 2, 69% en una etapa 3 y 82% de los pacientes en etapa 4 (6). Un estudio de Diehl y colaboradores reportó que el nivel de ADNct se correlaciona con la carga tumoral (4). El tamaño de los fragmentos de ADNcf varía entre 170–200 pares de bases (pb), que reflejan la estructura de los nucleosomas, porque la nucleasa digiere el ADN genómico durante la apoptosis. El perfil de tamaño de fragmentos difiere entre el ADNcf de la célula normal y ADNct de las células tumorales (7). Fragmentos más cortos (< 100 pb) se observan con

frecuencia en ADNct de pacientes con cáncer (8). La mayoría del ADNcf de las células normales se libera después de la apoptosis, mientras que el ADNct también puede liberarse por necrosis (9). La fragmentación basada en la necrosis parece crear fragmentos de ADN más cortos, que conducen a ADNct de menor tamaño en comparación con el ADNcf de células normales. Los fragmentos cortos de ADNct se observan con más frecuencia en pacientes con enfermedad metastásica, que en aquellos con cáncer en etapa temprana (10).

3-METODOLOGÍAS PARA BIOPSIA LÍQUIDA

PCR digital

El concepto de PCR digital fue por primera vez descrito en un informe de Vogelstein y Kinzler (11) en el que se informaba que las mutaciones de las proteínas de la familia RAS, se habían cuantificado en 384 pocillos separados de una microplaca. El ensayo de PCR digital se realizó con un fragmento de molécula de ADN por pocillo. Una sola molécula se puede amplificar un millón de veces o más. En el punto final los resultados del ensayo de PCR se expresan en una secuencia 0 (tipo salvaje) o 1 (mutante), y las frecuencias alélicas del mutante se calculan dividiendo el número de pocillos que contienen mutantes por el número de pozos totales, basados en la cuantificación absoluta de cada alelo. Mientras en la PCR cuantitativa en tiempo real y las técnicas relacionadas, amplifican una mezcla de mutantes y alelos normales, la detección de mutaciones raras puede ser afectado por la gran cantidad de alelos normales presentes. A diferencia de la PCR en tiempo real, debido a que la PCR digital amplifica ambos tipos de alelos por separado, la técnica es adecuada para la detección precisa y sensible de mutaciones raras. Utilizando la PCR digital de gotas (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), se usaron 20000 gotas para un ensayo en el que la relación del límite de detección es de 0.005% (1/20000). La PCR digital es útil cuando el número de mutaciones que se buscan como objetivo es pequeño. Los ejemplos incluyen la detección de la mutación del gen KRAS (es uno de los genes implicados en la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico) en pacientes con cáncer de páncreas, porque la mayoría de ellos tienen la mutación KRAS G12X (12). La PCR digital también se utiliza para controlar la recurrencia de los pacientes mediante el ensayo de mutaciones individuales preexaminadas en biopsias de tejido.

Secuenciación profunda basada en NGS y reducción de ruido mediante la tecnología de código de barras molecular

La secuenciación masiva y paralela profunda es el enfoque actual más factible para la biopsia líquida. Una ventaja del enfoque NGS es su capacidad para determinar secuencias, en contraste con la PCR digital, que puede detectar solo mutaciones únicas. Por ejemplo, debido a que las mutaciones en la proteína tumoral 53 (TP53) están dispersas en casi todo el dominio de la proteína, la NGS es indispensable ya que la aplicación de la PCR digital es difícil. El ensayo de panel basado en NGS, es un ensayo de mutaciones en múltiples genes y una herramienta muy poderosa para detectar mutaciones tumorales. Sin embargo, el alcance del error en la NGS es problemático en la detección de mutaciones raras, especialmente en el análisis de ADNct que requiere alta sensibilidad (por ejemplo, sensibilidad de aproximadamente 0.1%) debido a la tasa de error de secuenciación relativamente alta o errores de la PCR introducidos durante la construcción de la biblioteca genética. Para superar este problema, se ha establecido la reducción de ruido mediante códigos de barras moleculares. En este enfoque, las secuencias de nucleótidos aleatorias (nucleótidos de mezcla degenerados, por ejemplo, N12) se unen al ADN antes de la amplificación por PCR. Después de la amplificación por PCR, se obtiene una secuencia de consenso para las moléculas de ADN amplificadas con origen de molécula única que tienen el mismo código de barras molecular. Los errores de la PCR y los errores de secuenciación pueden eliminarse mediante este procedimiento, porque dichos errores se distribuyen aleatoriamente entre las secuencias analizadas, mientras que se supone que la verdadera mutación se ubica de manera constante en la misma posición. Se han establecido tres tipos principales de ensayo para el código de barras molecular: 1) el ensayo basado en amplicón (Conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa) (13); 2) amplificación específica unilateral de genes (14); y 3) el enfoque basado en la captura híbrida (15) (Figura 1). En el ensayo basado en amplicón, se realiza la amplificación por PCR clásica mediante cebadores específicos de genes en orden directos e inversos. Para introducir un código de barras molecular (caracterización de los organismos que se puede hacer de manera similar a la identificación de los productos comerciales usando el sistema internacional de códigos de barras), se realiza una PCR de

proyección con un cebador de código de barras molecular en los primeros ciclos. La ventaja de este ensayo es su alta precisión para la amplificación del blanco, debido a que se amplifican los dos lados de los cebadores específicos de los genes. El segundo enfoque se basa en la amplificación por PCR unilateral de la región blanco por el cebador genético específico y el cebador universal. Este ensayo tiene una ventaja en la detección de fusión génica o reordenamientos estructurales, porque la amplificación unilateral específica de genes puede analizar fragmentos quiméricos desconocidos unidos a una región específica de genes. En el enfoque de captura híbrida, la ligadura del adaptador con código de barras molecular es seguida por la amplificación con un cebador universal en el adaptador. Las regiones del panel blanco se enriquecen con sondas de captura de ARN del complemento. Este tipo de ensayo se ha utilizado durante mucho tiempo en la secuenciación del exoma. Dos métodos merecen atención específica. La secuenciación dúplex con códigos de barras moleculares a dos cadenas de ADN por separado y puede distinguir las sustituciones que aparecen en ambas cadenas y las de una sola cadena (16). Debido a que el daño se introduce en una sola cadena, las que aparecen en ambas cadenas de ADN se consideran mutaciones. En un trabajo de Kukita y colaboradores, se publicó que los errores en el código de barras en sí, son problemáticos para la precisión de la estimación del recuento molecular. En el sistema de ensayo llamado sistema de secuenciación de lectura integrada no superpuesta (NOIRSS), se eliminan dichos códigos de barras moleculares erróneos, y el sistema puede estimar con precisión el número absoluto de moléculas (16).

Otros problemas en la mutación de genes

Algunos estudios han encontrado que los resultados de genotipificación de las biopsias de tejido, difieren de los de las biopsias líquidas. La heterogeneidad intratumoral indica que la evaluación local del tejido, puede causar malas interpretaciones. Por otro lado, las biopsias líquidas pueden reflejar mutaciones de múltiples regiones o de todo el cuerpo (17). Perkins y colaboradores examinaron la concordancia entre la biopsia de tejido y la biopsia líquida. Las tasas de concordancia para pacientes con cáncer metastásico y para pacientes con tumores primarios fueron 83.3 y 78.3%, respectivamente (18). Existen dos problemas principales en la detección precisa de mutaciones raras que no sean errores de PCR y errores de secuencia. El primero es el daño al ADN. Se informó que los largos tiempos de incubación durante el ensayo basado en la captura híbrida causan daño oxidativo al ADN y la desaminación que resulta en la sustitución $G > A / C > T$. Sin embargo, con las mejoras en los sistemas de ensayo y las líneas de análisis, CAPP-seq, un método basado en la captura, se logró un límite de detección de 0.02% (19), que es comparable a los resultados de la PCR digital específica del sitio. El análisis de ADNct reveló la aparición frecuente de mutaciones somáticas de células normales. Se ha informado recientemente, al genotipo falso positivo plasmático debido a la hematopoyesis clonal como un obstáculo para la detección precisa de ADNct (20). El estudio encontró que las mutaciones somáticas que se originaban en las células madre hematopoyéticas y la proliferación clonal, se acumulan en las células sanguíneas normales. Las personas de edad avanzada suelen tener una amplia variedad de mutaciones y altas tasas de mutación. Las mutaciones en la región exónica de los genes relacionados con el cáncer, también pueden derivarse erróneamente de las mutaciones somáticas de las células madre hematopoyéticas, lo que causa un genotipo plasmático de cáncer que arroja resultados falsos positivos. El análisis de pares de ADNct y las células hematopoyéticas normales, y la eliminación de tales sustituciones no cancerosas, podrían permitir una detección más robusta de ADNct derivado de tumores, aunque esto duplica el costo analítico. Un método para superar este problema es filtrar tales sustituciones falsas positivas, utilizando bases de datos de dominio público como la base de datos COSMIC (21). La ausencia de sustituciones o con baja frecuencia de aparición, se consideran mutaciones no derivadas de tejidos tumorales. La pérdida de alelos mutados durante el proceso de ensayo también es problemática, especialmente para la detección de mutaciones raras (22). No es posible recuperar el material de ADN inicial total, en el análisis final en la mayoría de los ensayos debido a problemas técnicos como el volumen muerto, división de tubos y pérdida por purificación. Dicha pérdida de ADN puede causar fluctuaciones en la relación de mutaciones / alelos de tipo salvaje en función de la probabilidad estadística de distribución hipergeométrica. Este efecto no es insignificante en la detección de mutaciones raras (0.1-0.01%). El desarrollo de ensayos altamente eficientes o métodos de purificación / enriquecimiento de ADNct, mejoraría el rendimiento del análisis.

4-ANÁLISIS DE OBJETIVOS DE LA BIOPSIA LÍQUIDA

El perfil genético de ADNct en la sangre, es el objetivo principal de la biopsia líquida. Además del ADNct, los CTCs también son un recurso atractivo para el análisis genético. Una ventaja de los CTCs en comparación

con el ADNct, es la disponibilidad de ARNm en CTCs viables. Sin embargo, se considera que el número de CTCs es muy bajo (1 en 10^9 células), lo que indica la dificultad del análisis de aislamiento y expresión génica (23). Los estudios más recientes han informado que la precisión de detección (sensibilidad) de los CTCs es mucho menor que la del ADNct (24). Un estudio de detección de mutaciones del gen KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene) reveló que la sensibilidad de la detección del cáncer por análisis de ADNct y CTCs fue de 96% y 52%, respectivamente (25). En pacientes con cáncer metastásico, la sensibilidad de la detección de ADNct fue del 87,2% (6). Además, el análisis de pacientes con cáncer que arrojaron resultados positivos tanto para ADNct como para CTC, reveló que su sangre contenía 50 veces más fragmentos de ADN mutante en ADNct que en CTCs por cada 5 ml de muestra de sangre. Por lo tanto, la biopsia líquida basada en ADNct, es actualmente la primera opción para el desarrollo de pruebas de diagnóstico debido a su alta sensibilidad y especificidad. El perfil de metilación de ADNct es otro objetivo alternativo de la biopsia líquida. Un examen de 30 pacientes con cáncer, reveló que la metilación de los promotores RASSF1A, CALCA y EP300 (Los genes supresores de tumores sufren silenciamiento transcripcional cuando sus regiones promotoras portan citosinas metiladas), detectó con precisión el cáncer, con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 86.7% (26). Un trabajo de Mahon y colaboradores informó que el ADN metilado libre de GSTP1 se puede usar como marcador pronóstico de cáncer de próstata. En un estudio de cáncer de colon, la detección basada en la sangre con metilación del promotor THBD mostró una sensibilidad del 71% y una especificidad del 80% (28). Recientemente se ha propuesto el concepto de plaquetas educadas en tumores. Se considera que el ARN derivado del tumor se acumula en las plaquetas de pacientes con cáncer (29). La detección de genes de fusión como los oncogenes ALK, ROS1 y RET en la sangre es un desafío. El análisis basado en el ADN de los genes de fusión es difícil debido a la aleatoriedad de los puntos de ruptura de fusión. El análisis basado en ARN utilizando plaquetas educadas en tumores puede mejorar la precisión en la detección de genes de fusión, porque los puntos de fusión en el ARNm se encuentran en regiones mucho más pequeñas (es decir, limitadas a regiones exónicas) en comparación con las del ADN.

5-APLICACIONES CLÍNICAS DE LA BIOPSIA LÍQUIDA

Selección terapéutica de medicamentos dirigidos a blancos moleculares

En la selección de pacientes para recibir medicamentos con objetivos moleculares, se utilizan los llamados diagnósticos complementarios, a menudo basados en la genotipificación de genes diana. Un ejemplo representativo es la detección de mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para el inhibidor de la tirosina quinasa EGFR (EGFR-TKI). El único sistema de biopsia líquida aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. y la Agencia Japonesa de Productos Farmacéuticos e Insumos Médicos, es la Prueba de Mutación Cobas EGFR (Hoffman-La Roche, Basilea, Suiza) que utiliza ADN plasmático. Primero, se aprobó el Osimertinib (agente antineoplásico) para el tratamiento de pacientes con prueba positiva para T790M de células no pequeñas de cáncer de pulmón, una mutación resistente, y luego para la activación de mutaciones. La principal fuerza impulsora de la biopsia líquida para detectar la mutación EGFR, fue la aprobación del Osimertinib, un EGFR-TKI de tercera generación, basado en un estudio de Mok y colaboradores. El Osimertinib fue originalmente aprobado para el tratamiento de T790M positivo, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, después del tratamiento con EGFR-TKI que actualmente es recomendado como de primera línea (30). Por lo tanto, la terapia requiere una prueba de mutación T790M en una nueva biopsia. Debido a que la nueva biopsia es más invasiva, su reemplazo con un procedimiento no invasivo como la biopsia líquida fue ventajoso. Después de la aprobación de Osimertinib como tratamiento de primera línea basado en un estudio de Soria y colaboradores, la prueba de mutación con ADN plasmático se volvió menos importante y su utilidad ahora es controvertida (31). Para el diagnóstico complementario, las llamadas pruebas de panel, es decir, las pruebas de mutación simultánea de múltiples genes que usan NGS, son un enfoque de diagnóstico emergente y muy esperado. Actualmente, este tipo de prueba emplea tejidos tumorales, pero varias compañías están desarrollando versiones de biopsia líquida.

Predicción de recurrencia para la detección de cáncer residual

La monitorización de ADNct de los solicitantes mediante biopsia líquida después de la cirugía, puede ser útil para la detección temprana de la recurrencia de la enfermedad basada en el cáncer residual. En un estudio que examinó a 55 pacientes con cáncer de mama después de la cirugía, el grupo de ADNct positivo mostró una tasa de recurrencia, 4 veces mayor que el grupo de ADNct negativo (32). Después de 6 meses de

monitoreo postoperatorio, los pacientes con cambio positivo del ADNct mostraron una tasa de recurrencia del 93%, mientras que los pacientes negativos para ADNct tuvieron solo una tasa de recurrencia del 10%. Spindler y colaboradores informaron que el ADNct detectaba la recurrencia del tumor 11 meses antes, que cualquier otro marcador disponible actualmente o métodos de análisis por imágenes. Diehl y colaboradores sugirieron que el ADNct es más útil para predecir la recurrencia que el marcador tumoral CEA, ampliamente utilizado en entornos postoperatorios. Teóricamente, la detección temprana de cáncer residual por ADNct puede ayudar a erradicar los tumores o prevenir su recurrencia. Sin embargo, todavía no se ha establecido el beneficio clínico (prolongación de la supervivencia global o mejora de la calidad de vida) de este enfoque. Por lo tanto, no hay evidencia de que la detección de tumor residual mejore los resultados clínicos con tratamientos específicos. Cabe destacar que varios ensayos clínicos aleatorios y prospectivos que examinan los beneficios clínicos de detectar marcadores de proteínas tumorales circulantes con este propósito fallaron (34,35). En el futuro, se realizarán grandes estudios prospectivos para investigar la utilidad clínica del enfoque de ADNct en el ajuste de la monitorización de la recurrencia del cáncer.

Diagnóstico temprano de cáncer

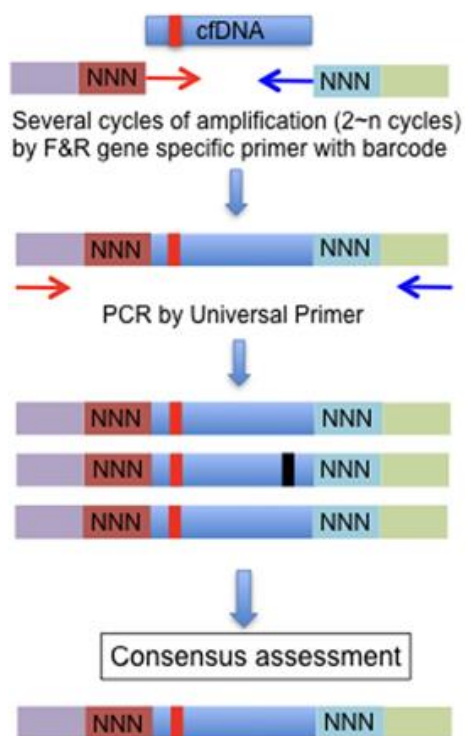
Uno de los objetivos finales de la biopsia líquida, es el diagnóstico temprano de cáncer en individuos asintomáticos. La detección del ADN fetal en la sangre materna y el éxito del genotipo prenatal de la aneuploidía (36,37) ofrecen la esperanza de que la tecnología pueda aplicarse a la detección temprana del cáncer. Para la evaluación de la viabilidad de la biopsia líquida, las mutaciones en el gen KRAS en pacientes con cáncer de páncreas son un objetivo racional, porque > 90% de los pacientes con cáncer de páncreas tienen la mutación en el gen KRAS (38,39). La sensibilidad de la detección de KRAS G12X por el ensayo de ADNct basado en NGS para pacientes con cáncer de páncreas se estimó en un 25-30% (21), mostrando un rendimiento comparable con la PCR digital específica del sitio (40). Esta estimación, indica la necesidad de mejorar del ensayo ADNct como la primera herramienta de detección temprana del cáncer. Aunque la utilidad de cada marcador tiene algunas limitaciones, un estudio encontró que la unidad combinatoria y la integración de múltiples marcadores / enfoques mejoraron la precisión de la detección. Aunque existe un entusiasmo generalizado por la utilización de la biopsia líquida para este propósito, actualmente no existe evidencia que respalde la validez clínica y la utilidad de la biopsia líquida para la detección temprana del cáncer.

6-CONCLUSIONES

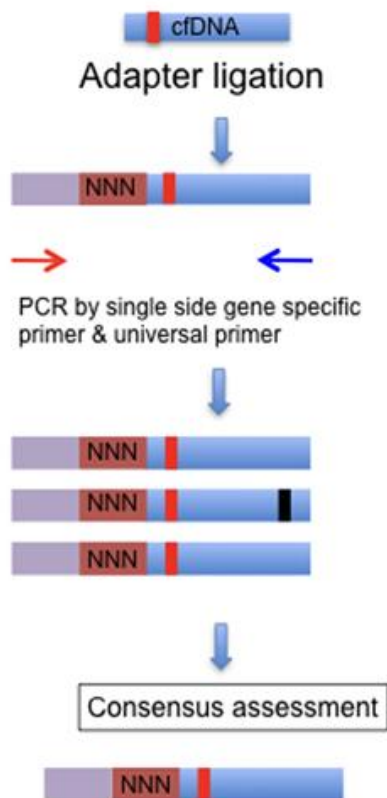
El desarrollo de las tecnologías de PCR digital y NGS mejoraron enormemente el estudio de la biopsia líquida con el objetivo final de la aplicación clínica. En particular, la tecnología de código de barras molecular basada en NGS ha evolucionado rápidamente en los últimos años. Estos desarrollos permiten detectar mutaciones de ADNct ultrarrápidas localizadas en un amplio rango del genoma. Muchos estudios de biopsia líquida se han realizado recientemente en todo el mundo, porque es un método atractivo y la tecnología no es invasiva para el estudio de la genotipificación del tumor como complemento de la biopsia tisular. Sin embargo, la mayoría de esos estudios fueron retrospectivos, lo que indica que quedan muchos desafíos antes de que se vea el uso generalizado de la biopsia líquida en entornos clínicos de rutina. Los puntos importantes son, si la biopsia líquida realmente proporciona más beneficios clínicos que la práctica médica establecida actualmente, si mejora la calidad de vida de los pacientes y si ofrece beneficios de costos desde el punto de vista de la economía de la salud. Para evaluar la viabilidad de la biopsia líquida desde estos puntos de vista, se deben realizar grandes estudios clínicos prospectivos en el futuro. Se espera que la validez clínica y la utilidad de la biopsia líquida se validen en un futuro próximo.

Figura 1-Tres tipos de paneles de ensayos de próxima generación

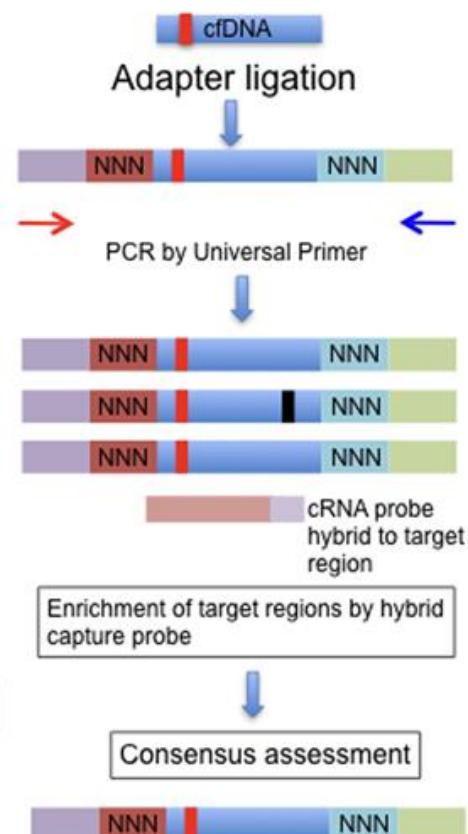
[A] Amplicon based



[B] One-side GSP based

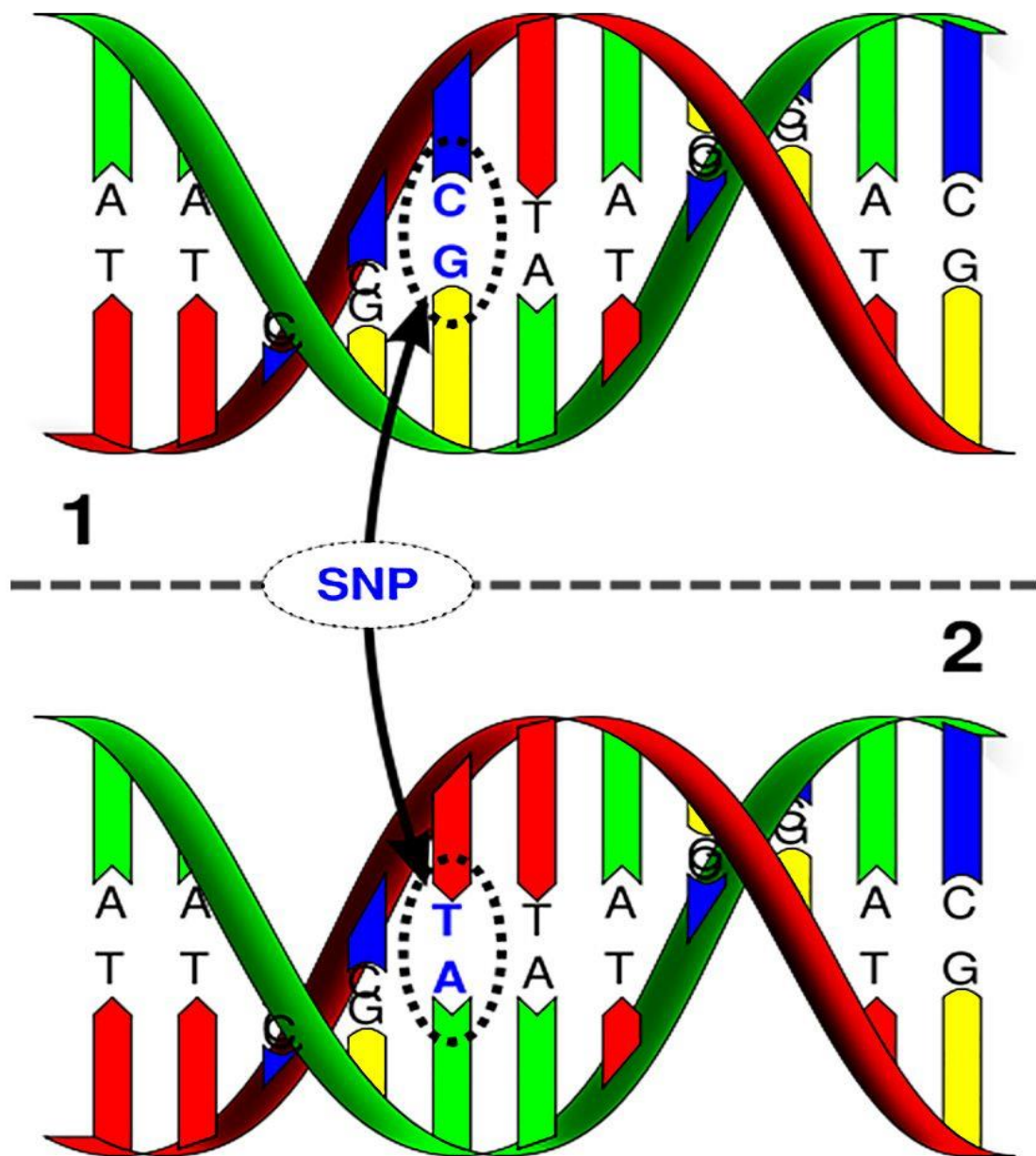


[C] Capture based



Ensayo de un solo tubo, de doble plantilla y una tubería de bioinformática integrada, para la detección de variantes relevantes

Polimorfismo de nucleótido único: la molécula de ADN superior difiere de la inferior en la ubicación de un solo par de bases (SNP=variaciones de un solo nucleótido)



AMPLIACIÓN

Los exosomas son vesículas delimitadas por membrana de entre 50 y 100 nm de diámetro, formadas a través de la membrana endosomal. Se trata de nanovesículas extracelulares liberadas por algunas las células como las células dendríticas, los macrófagos, los linfocitos, las células epiteliales glandulares y las células tumorales. Las encontramos en el plasma, la orina, el líquido cefalorraquídeo, el líquido amniótico, el lavado broncoalveolar, el líquido sinovial, el líquido ascítico, la leche materna y la saliva. Estas vesículas extracelulares representan un importante modo de comunicación intercelular. Sirven de vehículos para la transferencia entre las células de membrana, de proteínas citosólicas, de lípidos y de ARN tanto codificante como no codificante. Los exosomas juegan un papel biológico fundamental en la regulación de la fisiología normal, así como de los procesos patológicos a través de las redes de regulación genética o a través de la programación epigenética.

Los exosomas son considerados como un nuevo mecanismo por el cual las células cancerosas y las células infectadas por virus pueden regular su microambiente. También realizan la expulsión de componentes obsoletos de la membrana y se las ha relacionado con la presentación de antígenos. La saliva ofrece una excelente alternativa para el descubrimiento de biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de diferentes patologías, con ventajas como su fácil recolección y no invasividad. Los exosomas también han surgido como un candidato potencial para modalidades de inmunoterapia y vacunación, así como un nuevo vector para la terapia génica. La muestra de saliva promete ser una detección precoz del cáncer de boca y garganta con la ayuda de Acoustofluidics, que es una tecnología avanzada que fusiona acústica y microfluídica. El comportamiento de los fluidos en la microescala, difiere sustancialmente de lo observado en la macroescala, la tensión superficial y la disipación de la energía son completamente diferentes. El flujo es siempre laminar y no ocurren turbulencias. Un efecto importante es que la relación de superficie por volumen es muy alta, por lo que cualquier reacción química en un microfluido se ve muy acelerada. Las muestras de fluidos se analizan utilizando un pequeño chip acústico desarrollado para aislar los exosomas salivales mediante la eliminación de partículas no deseadas según el tamaño, dejando muestras concentradas ricas en exosomas que facilitan la detección de biomarcadores específicos de tumores. La prueba de saliva promete una detección más fácil del cáncer de boca y garganta. En un estudio colaborativo internacional entre la Universidad de Duke y la Universidad de Birmingham (Reino Unido), los investigadores analizaron muestras de saliva de 10 pacientes diagnosticados con virus del papiloma humano utilizando métodos tradicionales. Descubrieron que la técnica identificaba el ADN del biomarcador tumoral HPV-16 en el 80 por ciento de los casos cuando se combinaba con PCR. Dado que este método es independiente de la variabilidad de la muestra que surge debido a los cambios en la viscosidad de la saliva y los métodos de recolección utilizados, puede resultar ideal para su uso en entornos clínicos. La biopsia líquida del exosoma de saliva, puede un enfoque eficaz de detección temprana y evaluación de riesgos para el cáncer orofaríngeo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23, 707–712 (1987).
- 2) Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta*, 313, 139–142 (2001).
- 3) Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 218–224 (1999).
- 4) Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.*, 14, 985–990 (2008).
- 5) Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov.*, 4, 650–661 (2014).

- 6) Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubner B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.*, 6, 224ra24 (2014).
- 7) Jiang P, Chan CW, Chan KC, Cheng SH, Wong J, Wong VW, Wong GL, Chan SL, Mok TS, Chan HL, Lai PB, Chiu RW, Lo YM. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112, E1317–E1325 (2015).
- 8) Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.*, 61, 1659–1665 (2001).
- 9) Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, Gongora C, Thierry AR. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS ONE*, 6, e23418 (2011).
- 10) Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, Zucknick M, Nees J, Schott S, Cuk K, Riethdorf S, Trumpp A, Pantel K, Sohn C, Schneeweiss A, Surowy H, Burwinkel B. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 146, 163–174 (2014).
- 11) Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 9236–9241 (1999). 12) Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*, 111, 817–822 (2014).
- 13) Peng Q, Vijaya Satya R, Lewis M, Randad P, Wang Y. Reducing amplification artifacts in high multiplex amplicon sequencing by using molecular barcodes. *BMC Genomics*, 16, 589 (2015).
- 14) Kato K. Adaptor-tagged competitive PCR: a novel method for measuring relative gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4694–4696 (1997).
- 15) Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, Sebisanoovic D, Lopez R, Blau S, Collisson EA, Divers SG, Hoon DS, Kopetz ES, Lee J, Nikolinakos PG, Baca AM, Kermani BG, Eltoukhy H, Talasz A. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLOS ONE*, 10, e0140712 (2015).
- 16) Kukita Y, Matoba R, Uchida J, Hamakawa T, Doki Y, Imamura F, Kato K. High-fidelity target sequencing of individual molecules identified using barcode sequences: de novo detection and absolute quantitation of mutations in plasma cell-free DNA from cancer patients. *DNA Res.*, 22, 269–277 (2015).
- 17) Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, SpencerDene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.*, 366, 883–892 (2012).
- 18) Perkins G, Yap TA, Pope L, Cassidy AM, Dukes JP, Riisnaes R, Massard C, Cassier PA, Miranda S, Clark J, Denholm KA, Thway K, Gonzalez De Castro D, Attard G, Molife LR, Kaye SB, Banerji U, de Bono JS. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLOS ONE*, 7, e47020 (2012).
- 19) Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, Liu CL, Neal JW, Wakelee HA, Merritt RE, Shrager JB, Loo BW Jr, Alizadeh AA, Diehn M. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat. Med.*, 20, 548–554 (2014). 20) Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, Kuang Y, Lizotte PH, Feeney NB, Guibert NM, Awad MM, Wong KK, Janne PA, Paweletz CP, Oxnard GR. False-positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis. *Clin. Cancer Res.*, 24, 4437–4443 (2018).
- 21) Kukita Y, Ohkawa K, Takada R, Uehara H, Katayama K, Kato K. Selective identification of somatic mutations in pancreatic cancer cells through a combination of next-generation sequencing of plasma DNA using molecular barcodes and a bioinformatic variant filter. *PLOS ONE*, 13, e0192611 (2018).
- 22) Lievens A, Jacchia S, Kagkli D, Savini C, Querci M. Measuring digital PCR quality: performance parameters and their optimization. *PLOS ONE*, 11, e0153317 (2016). 23) Heitzer E, Auer M, Ulz P, Geigl JB, Speicher MR. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med.*, 5, 73 (2013).
- 24) Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol.*, 32, 579–586 (2014).
- 25) Freidin MB, Freydina DV, Leung M, Montero Fernandez A, Nicholson AG, Lim E. Circulating tumor DNA outperforms circulating tumor cells for KRAS mutation detection in thoracic malignancies. *Clin. Chem.*, 61, 1299–1304 (2015).
- 26) Liggett TE, Melnikov A, Yi Q, Replogle C, Hu W, Rotmensch J, Kamat A, Sood AK, Levenson V. Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.*, 120, 113–120 (2011).
- 27) Mahon KL, Qu W, Devaney J, Paul C, Castillo L, Wykes RJ, Chatfield MD, Boyer MJ, Stockler MR, Marx G, Gurney H, Mallesara G, Molloy PL, Horvath LG, Clark SJ; PRIME Consortium. Methylated glutathione S-transferase 1 (mGSTP1) is a potential plasma free DNA epigenetic marker of prognosis and response to chemotherapy in castrate-resistant prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 111, 1802–1809 (2014).

- 28) Lange CP, Campan M, Hinoue T, Schmitz RF, van der Meulen-de Jong AE, Slingerland H, Kok PJ, van Dijk CM, Weisenberger DJ, Shen H, Tollenaar RA, Laird PW. Genome-scale discovery of DNAmethylation biomarkers for blood-based detection of colorectal cancer. *PLOS ONE*, 7, e50266 (2012).
- 29) Best MG, Wesseling P, Wurdinger T. Tumor-educated platelets as a noninvasive biomarker source for cancer detection and progression monitoring. *Cancer Res.*, 78, 3407–3412 (2018).
- 30) Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, Shepherd FA, He Y, Akamatsu H, Theelen WS, Lee CK, Sebastian M, Templeton A, Mann H, Marotti M, Ghorghiu S, Papadimitrakopoulou VA, AURA3 Investigators. Osimertinib or platinumpemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 376, 629–640 (2017).
- 31) Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, Dechaphunkul A, Imamura F, Nogami N, Kurata T, Okamoto I, Zhou C, Cho BC, Cheng Y, Cho EK, Voon PJ, Planchard D, Su WC, Gray JE, Lee SM, Hodge R, Marotti M, Rukazenzov Y, Ramalingam SS; FLAURA Investigators. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 378, 113–125 (2018).
- 32) Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, Cheang M, Osin P, Nerurkar A, Kozarewa I, Garrido JA, Dowsett M, Reis-Filho JS, Smith IE, Turner NC. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci. Transl. Med.*, 7, 302ra133 (2015).
- 33) Spindler KL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Circulating free DNA as biomarker and source for mutation detection in metastatic colorectal cancer. *PLOS ONE*, 10, e0108247 (2015).
- 34) Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; ASCO. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 24, 5313–5327 (2006).
- 35) Rustin G, van der Burg M, Griffin C, Qian W, Swart AM. Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer. *Lancet*, 377, 380–381 (2011).
- 36) Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet. Med.*, 13, 913–920 (2011).
- 37) Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, Bregant B, Nicolaidis KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: meta-analysis. *Fetal Diagn. Ther.*, 35, 156–173 (2014).
- 38) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53, 549–554 (1988).
- 39) Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Patch AM, Wu J, Chang DK, Cowley MJ, Gardiner BB, Song S, Harliwong I, Idrisoglu S, Nourse C, Nourbakhsh E, Manning S, Wani S, Gongora M, Pajic M, Scarlett CJ, Gill AJ, Pinho AV, Rooman I, Anderson M, Holmes O, Leonard C, Taylor D, Wood S, Xu Q, Nones K, Fink JL, Christ A, Bruxner T, Cloonan N, Kolle G, Newell F, Pinese M, Mead RS, Humphris JL, Kaplan W, Jones MD, Colvin EK, Nagrial AM, Humphrey ES, Chou A, Chin VT, Chantrell LA, Mawson A, Samra JS, Kench JG, Lovell JA, Daly RJ, Merrett ND, Toon C, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Kakkar N, Zhao F, Wu YQ, Wang M, Muzny DM, Fisher WE, Brunicardi FC, Hodges SE, Reid JG, Drummond J, Chang K, Han Y, Lewis LR, Dinh H, Buhay CJ, BeckT, Timms L, Sam M, Begley K, Brown A, Pai D, Panchal A, Buchner N, De Borja R, Denroche RE, Yung CK, Serra S, Onetto N, Mukhopadhyay D, Tsao MS, Shaw PA, Petersen GM, Gallinger S, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Schulick RD, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Capelli P, Corbo V, Scardoni M, Tortora G, Tempero MA, Mann KM, Jenkins NA, Perez-Mancera PA, Adams DJ, Largaespada DA, Wessels LF, Rust AG, Stein LD, Tuveson DA, Copeland NG, Musgrove EA, Scarpa A, Eshleman JR, Hudson TJ, Sutherland RL, Wheeler DA, Pearson JV, McPherson JD, Gibbs RA, Grimmond SM; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491, 399–405 (2012).
- 40) Takai E, Totoki Y, Nakamura H, Morizane C, Nara S, Hama N, Suzuki M, Furukawa E, Kato M, Hayashi H, Kohno T, Ueno H, Shimada K, Okusaka T, Nakagama H, Shibata T, Yachida S. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci. Rep.*, 5, 18425 (2015).
- 41) Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, Schmidt CM, Yip-Schneider MT, Allen PJ, Schattner M, Brand RE, Singhi AD, Petersen GM, Hong SM, Kim SC, Falconi M, Doglioni C, Weiss MJ, Ahuja N, He J, Makary MA, Maitra A, Hanash SM, Dal Molin M, Wang Y, Li L, Ptak J, Dobbyn L, Schaefer J, Silliman N, Popoli M, Goggins MG, Hruban RH, Wolfgang CL, Klein AP, Tomasetti C, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Lennon AM. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114, 10202–10207 (2017).

