



V SIMPOSIO
GETHI

18/19

noviembre de 2019

Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Madrid. Aula Jiménez Díaz. Madrid

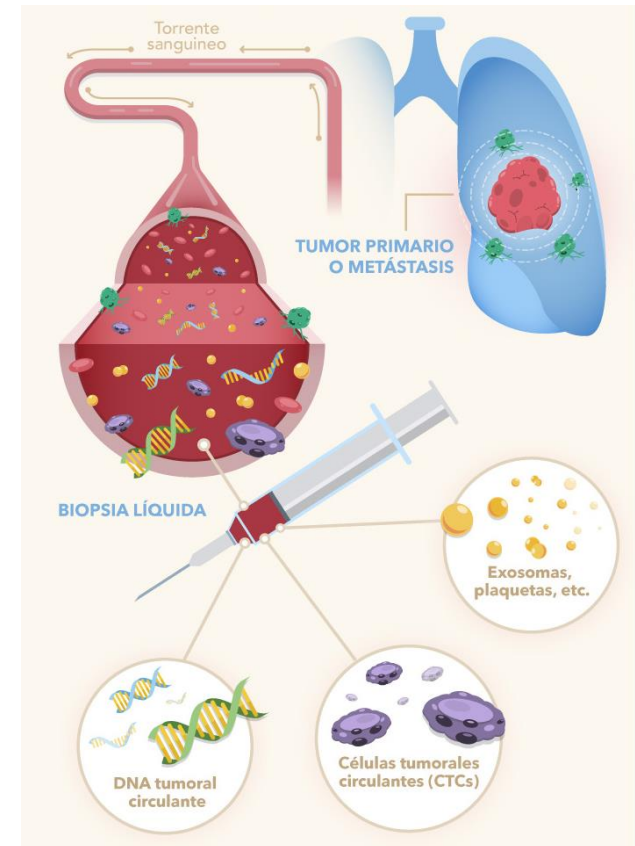
BLOQUE C: PAPEL ACTUAL Y FUTURO DE LA BIOPSIA LÍQUIDA EN EL MANEJO DEL CÁNCER RARO

¿De qué plataformas disponemos y en qué se diferencian?

Gorka Alkorta-Aranburu
Clínica Universidad de Navarra, Pamplona

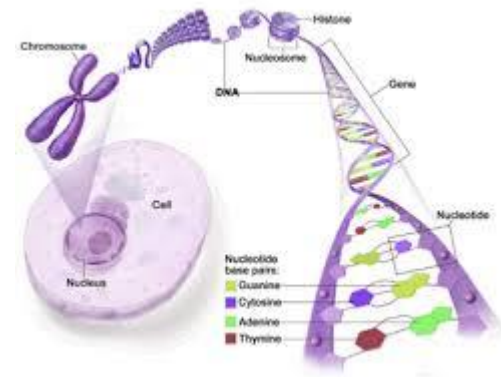
Agenda, distintos tipos de plataformas...

- Caracterización del tumor
- Biopsia sólida problemas de muestreo
- Biopsia líquida alternativa de muestreo
- CTCs – como detectarlos, plataformas que disponemos, aplicaciones clínicas y dificultades para su aplicación clínica.
- cfTNA – plataformas que disponemos, variante *versus* error de secuenciación, reproducibilidad de los resultados, aplicaciones clínicas y dificultades para su aplicación.
- Conclusión final



Caracterización del tumor

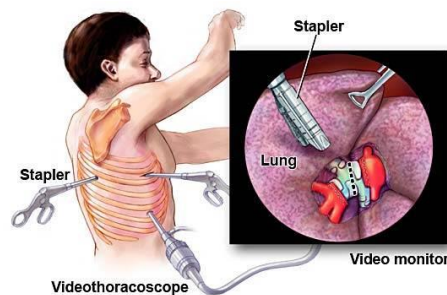
- Permite identificar:
 - individuos con riesgo a padecer cáncer hereditario
 - características moleculares del tumor que guían
 - la selección del tratamiento
 - la monitorización de la enfermedad,
 - la detección temprana del cáncer
 - el diagnóstico de cáncer raro o cáncer de origen desconocido (CUP)



<https://www.mariekeating.ie/>

Biopsia sólida problemas de muestreo

- Puede no ser posible - paciente o localización/tamaño tumor
- Es invasiva – cirugía compleja/cara
- Puede ser limitado – mayor demanda estudios moleculares
- Puede no reflejar la situación actual de la enfermedad
 - i.e., el tratamiento produce cambios en las células tumorales
- Puede no reflejar las características moleculares del tumor



www.lhsc.on.ca/

Biopsia líquida alternativa de muestreo

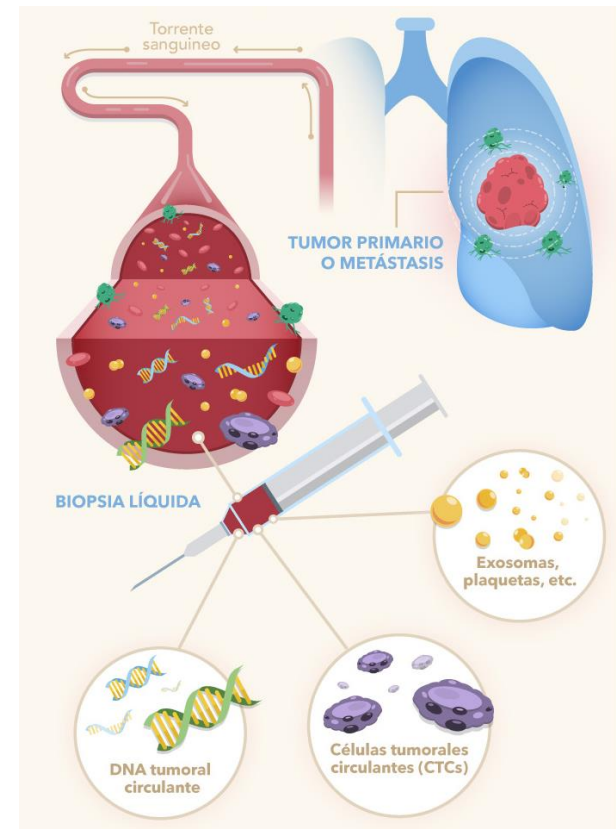
- Estudia los tumores a través de un análisis de sangre no invasivo:
- células tumorales (CTCs)
- trozos de ADN/RNA (cfDNA)
- exosomas, plaquetas,...

Table 8.

Comparison between the applications of ctDNA, CTCs, and exosomes.

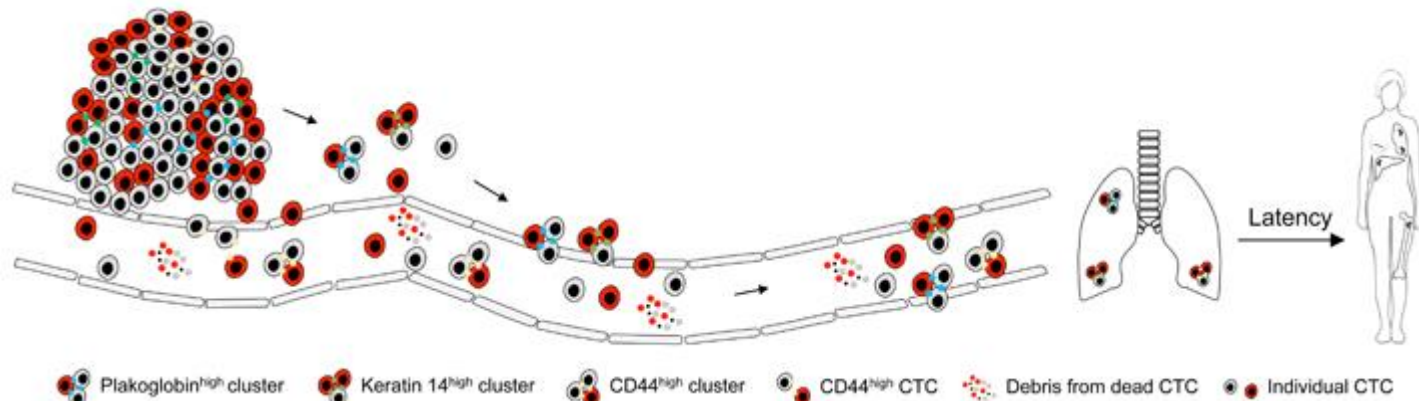
Applications	ctDNA	CTCs	Exosomes
Photography of spatial and temporal tumor heterogeneity	No	Yes	No
Detection of point mutations, insertions and deletions, amplifications, translocations and copy number alterations	Yes	Yes	Yes
Epigenetic alterations (e.g. methylation)	Yes	Yes	Yes
Analysis of miRNA	No	Yes	Yes
Analysis of RNA expression and proteomics	No	Yes	Yes
Phenotypic analysis of cells, such as cell morphology or <i>in vivo</i> studies	No	Yes	No
Influence by preanalytical variability	Yes	Yes	Yes
Functional study <i>ex vivo</i>	No	Yes	No
Biobanking preservation	Yes	No	Yes

CTC, circulating tumor cell; ctDNA, circulating tumor DNA; PCR, polymerase chain reaction.



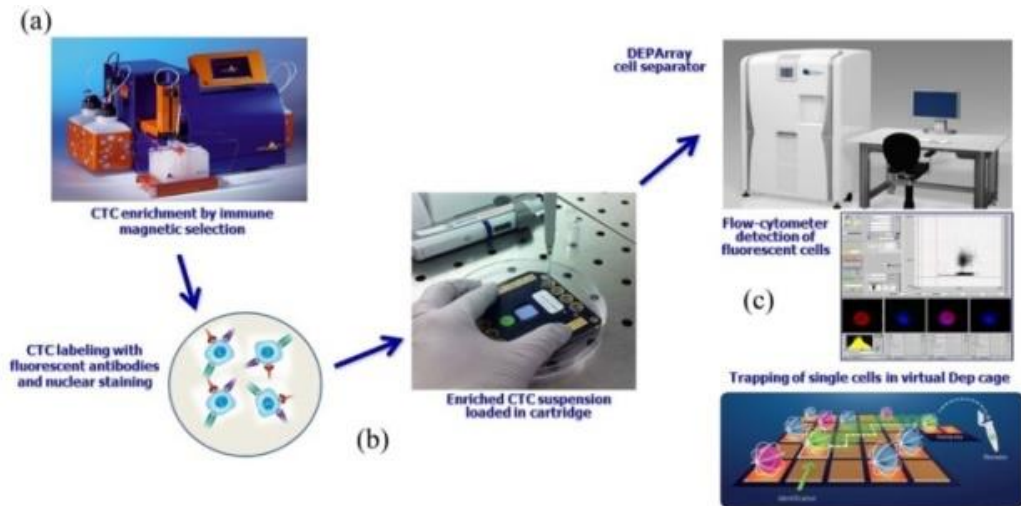
CTCs – introducción

- Desprenden de tumores primarios o secundarios
- Migran al sistema circulatorio
- Responsables del desarrollo de metástasis.
- Pueden agruparse con células tumorales parentales o con otras células formando agregados con mayor capacidad de metástasis.



CTCs – como detectarlos

- Estratificar los componentes de muestras de sangre periférica
- Evaluar la eliminación de leucocitos
- Teñir la fracción enriquecida con anticuerpos con fluoróforo
- Recuperar las células en gotas de buffer



Palmirotta *et al.*, (2018) Ther Adv Med Oncol

CTCs – diferencias entre las plataformas

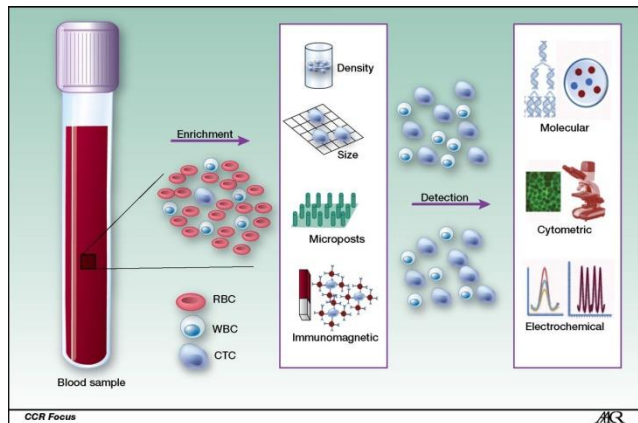
Technology	Methods	Platforms
Physical properties	Size, density, others	Physical filter
		Density gradient
		Dielectric
		Photoacoustic
		Microfluidic
High-throughput imaging	Scanning of cells on slide	Imaging cytometry
Leukocyte depletion	Negative depletion of leukocytes	Batch cell lysis
		Microfluidic CTC-iChip
		Immunomagnetic separation
Antibody capture	Selection for tumor-specific markers	CellSearch
		Magsweeper
		Microfluidic CTC-Chip
Functional characteristics	Protein secretion, cell migration	Epispot assay
		Invasion assay
Nanotechnology	Nanomaterials able to increase interactions with CTCs and specific antibodies, and to enable their electrical conductivity	Immunomagnetic nanobeads, nanostructures substrates in microchip

- Su escasez
- La baja eficiencia de su captura
- La falta de consenso del marcador diferencial

Palmirotta *et al.*, (2018) Ther Adv Med Oncol

CTCs – aplicaciones clínicas

- Necesario optimizar y estandarizar el aislamiento de las CTCs
- En la práctica clínica, la cuantificación de los CTCs como el estudio de sus ácidos nucleicos ya son marcadores candidatos para:

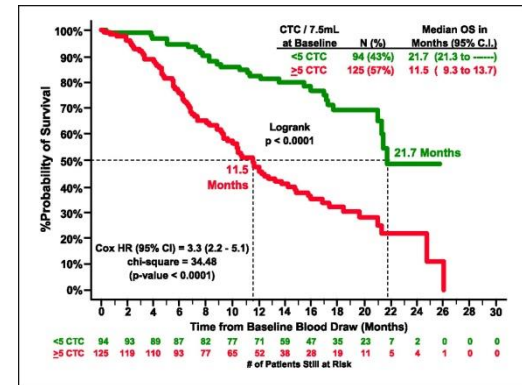


Yap *et al.*, (2014) Clin Cancer Res

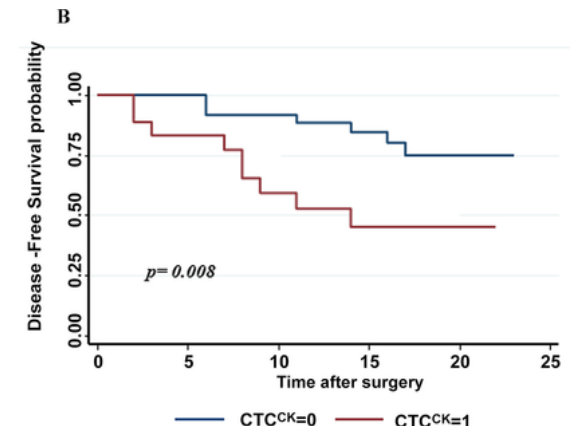
- Pronóstico – estratificación de los pacientes,
- Diagnóstico – sustituir a biopsia sólida y detección temprana
- Predictivo – resistencia o respuesta a tratamiento

CTCs – cantidad absoluta

- Pronostico.
 - Pacientes con > 5 CTC en 7,5 ml de sangre tienen menor supervivencia libre de progresión y supervivencia general.
- Diagnostico.
 - El número absoluto aumenta o disminuye en relación con la carga tumoral, permite la detección temprana del cáncer
- Predictivo.
 - Su identificación post-tratamiento peor supervivencia libre de progresión/supervivencia general.



de Bono et al., (2008) Clin Cancer Res

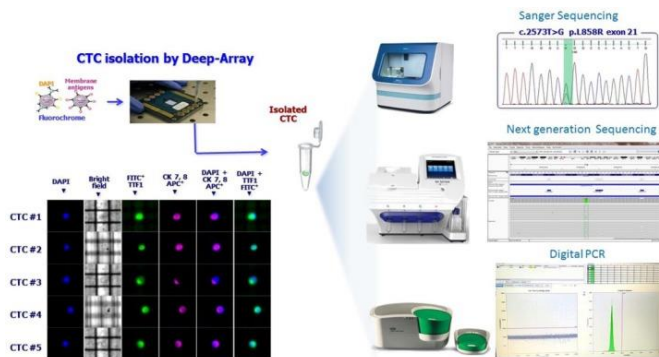


Bayarri-Lara et al., (2016) PLoS One

CTCs – caracterización ácidos nucleicos

PERFIL GENOMICO

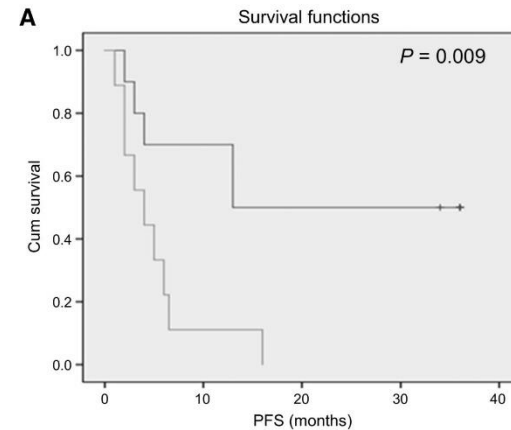
- Tejido de origen
- Aislar la diversidad mutacional que explica la variabilidad de la respuesta entre pacientes.



Palmirotta *et al.*, (2018) Ther Adv Med Oncol

PERFIL EPIGENOMICO

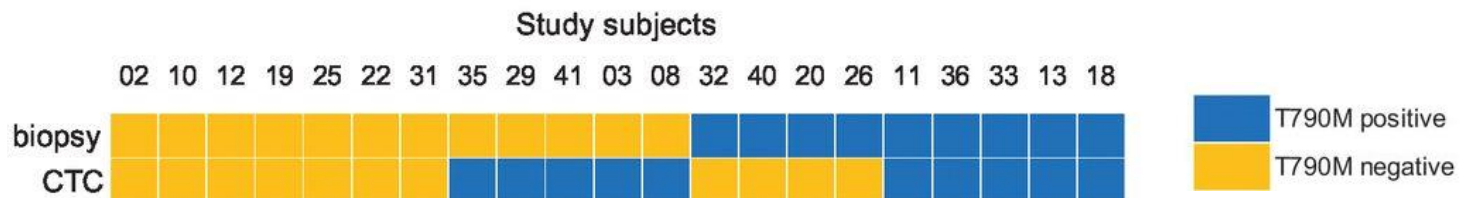
- Estratificación como la monitorización.
- Metilación del receptor de estrógeno 1 (*ESR1*).



Mastoraki *et al.*, (2018) Clin Cancer Res

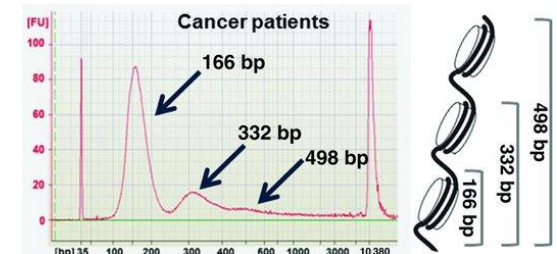
CTCs – dificultades para su aplicación clínica

- Su escasez
- La falta de estandarización para su aislamiento
- La carestía de su caracterización molecular
- La alta heterogeneidad a nivel genómico, transcriptómico como metabolómico entre CTCs y las células del tumor primario
 - Por ejemplo, la presencia de la mutación de resistencia del gen *EGFR* (T790M) en CTCs pero no en el tumor primario.



cfTNA – introducción

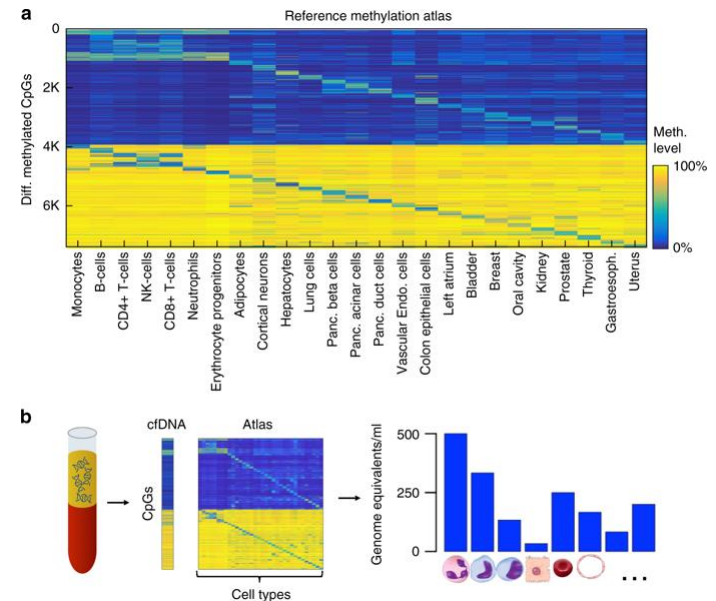
- La cuantificación y la identificación de variantes en ácidos nucleicos libres en circulación relevante en medicina de precisión
- Entre un 0.1 y 10% de los cfDNA son tumorales (ctDNA)
- La inflamación, el trauma y el ejercicio exhaustivo incrementan la cantidad de ácidos nucleicos libres en circulación
- No hay procedimientos estandarizados; pero:
 - Plasma antes que suero
 - Sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo
 - Tubos con EDTA que inhibe la actividad ADNasa
 - Eliminar cuanto antes las células sanguíneas que pueden lisar y liberar su ADN mediante centrifugación.



Heitzer *et al.*, (2015) Clin Chem

cfTNA - plataformas que disponemos para biomarcadores epigenéticos y en qué se diferencian

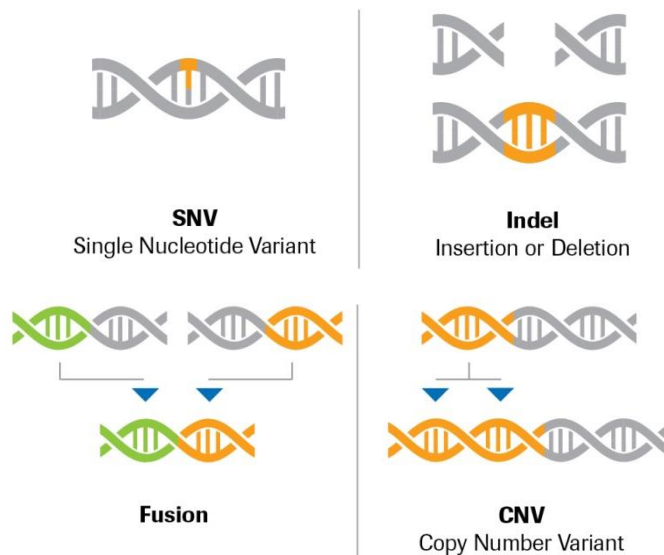
- Métodos que solo se centran en el estudio de posiciones candidatas mediante distintas variantes del PCR tradicional.
- Métodos que permiten identificar perfiles globales a nivel genómico:
 - NGS
 - MCTA-Seq que permite identificar islas CpG hipermetiladas a nivel genómico



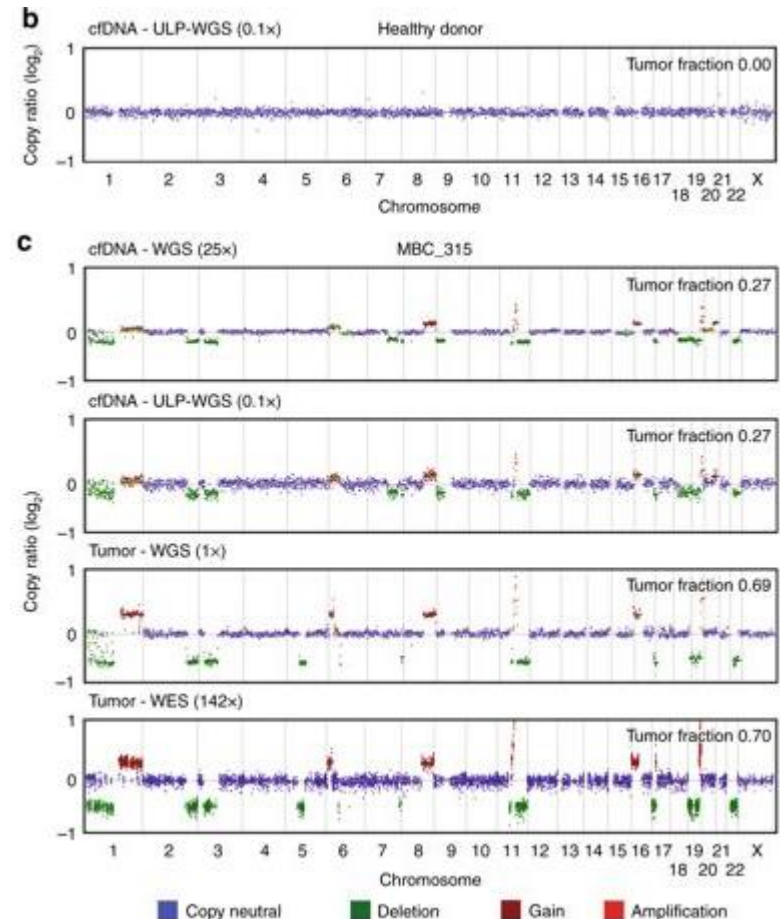
Moss *et al.*, (2018) Nature Communications

cfTNA - plataformas que disponemos para biomarcadores genéticos y en qué se diferencian

- NGS permiten la identificación de SNV, indels, CNVs y fusiones sin conocimiento previo de su localización genómica.

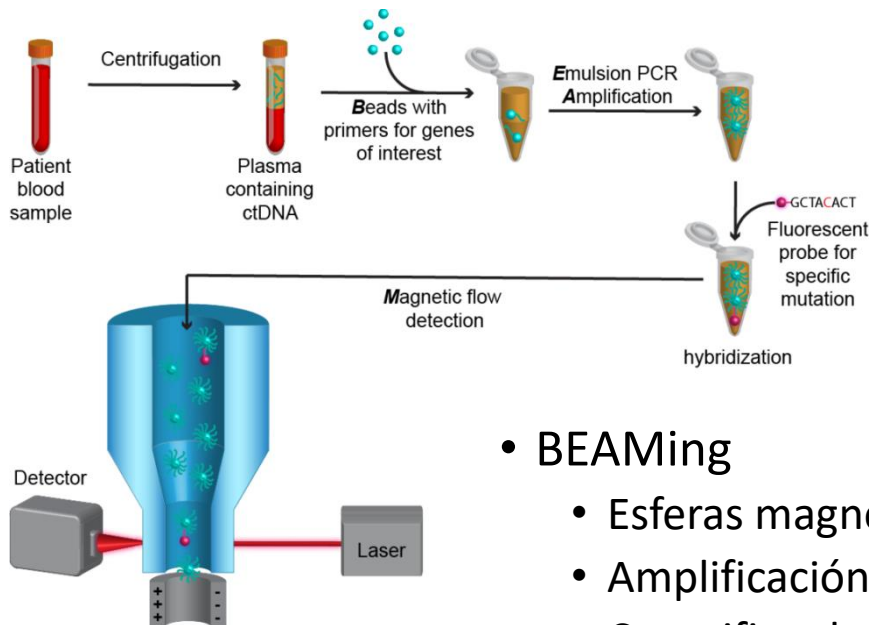


<https://sequencing.roche.com/>



Adalsteinsson *et al.*, (2017) Nature Communications

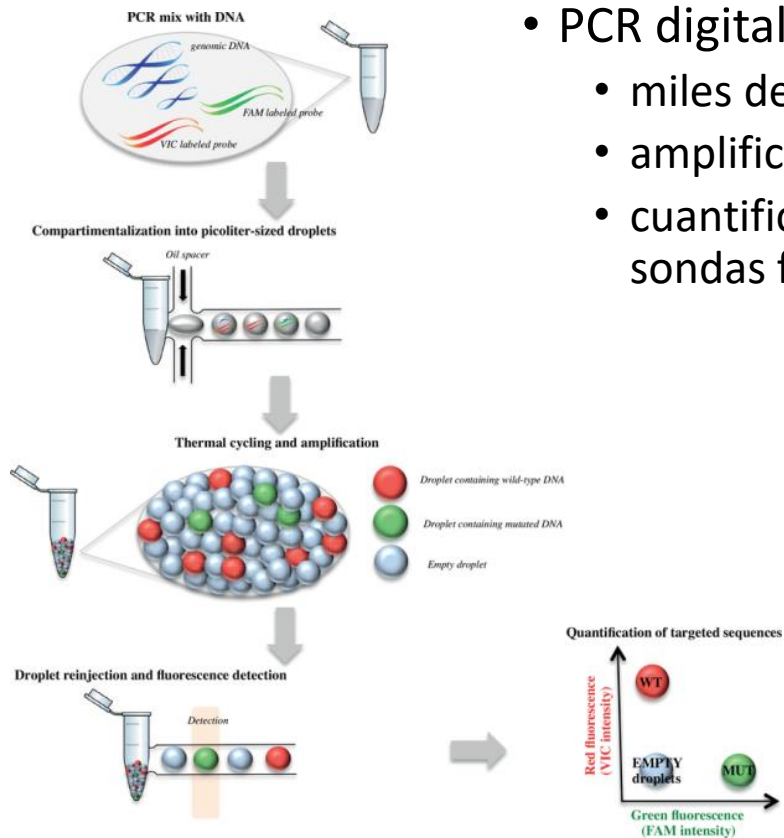
cfTNA - plataformas no NGS que disponemos para biomarcadores genéticos y en qué se diferencian



- BEAMing

- Esferas magnéticas en una emulsión de agua y aceite
- Amplificación de una única molécula por PCR
- Cuantificar la presencia de la variante genética mediante citometría de flujo

cfTNA - plataformas no NGS que disponemos para biomarcadores genéticos y en qué se diferencian

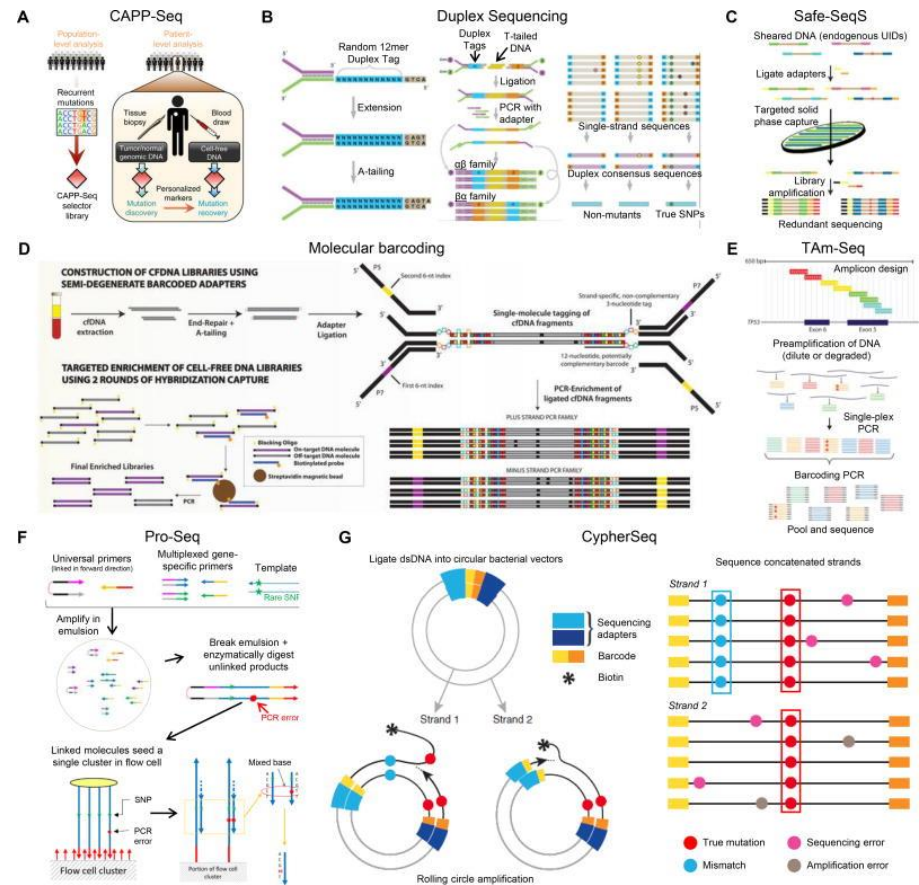


Zonta *et al.*, (2016) PLoS One

- PCR digital:
 - miles de gotas en emulsión de agua y aceite
 - amplificación de una única región
 - cuantificar la presencia de la variante mediante sondas fluorescentes.
- BEAMing y PCR Digital
 - Buena sensibilidad
 - Limitados con muchas muestras o variantes candidatas
 - Perder información potencialmente importante.

cfTNA - plataformas NGS que disponemos para biomarcadores genéticos y en qué se diferencian

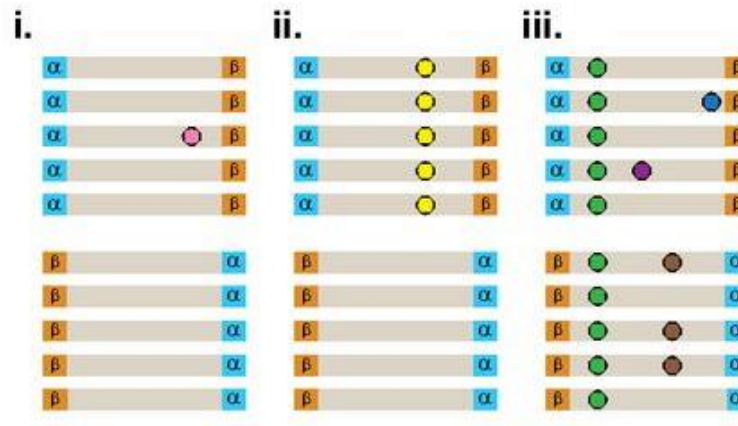
- Paneles de NGS
- niveles de sensibilidad adecuados solo en regiones genómicas de interés
- Análisis bioinformático:
 1. verificar la calidad de los datos crudos de secuenciación
 2. Identificar, anotar e interpretar variantes



Palmirotta *et al.*, (2018) Ther Adv Med Oncol

cfTNA – variante *versus* error de secuenciación

- Cada molécula de origen se etiqueta con un código de barras único.
- A cada uno de estos grupos se le llama familia.
- Error de secuenciación no en la mayoría de los miembros.
- Informamos eventos identificados por dos o más familias.



Schmitt *et al.*, (2012) PNAS

cfTNA – reproducibilidad de los resultados

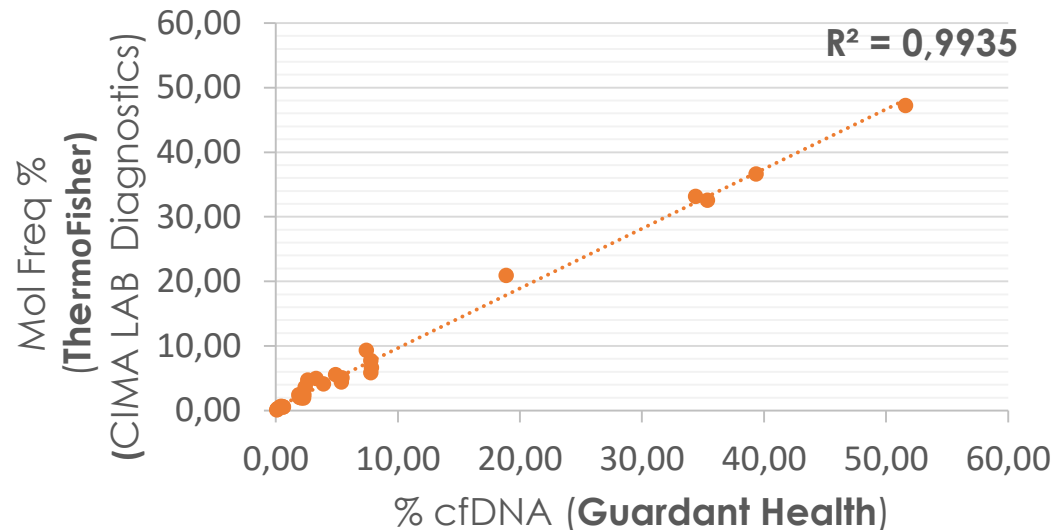
- Optimizar (y estandarizar) el tipo de la muestra como su recogida, conservación y posterior manipulación para poder garantizar la reproducibilidad de los resultados.
- Validación técnica (n=16)



Macías *et al.*, (en revisión)

cfTNA – reproducibilidad de la frecuencia alélica

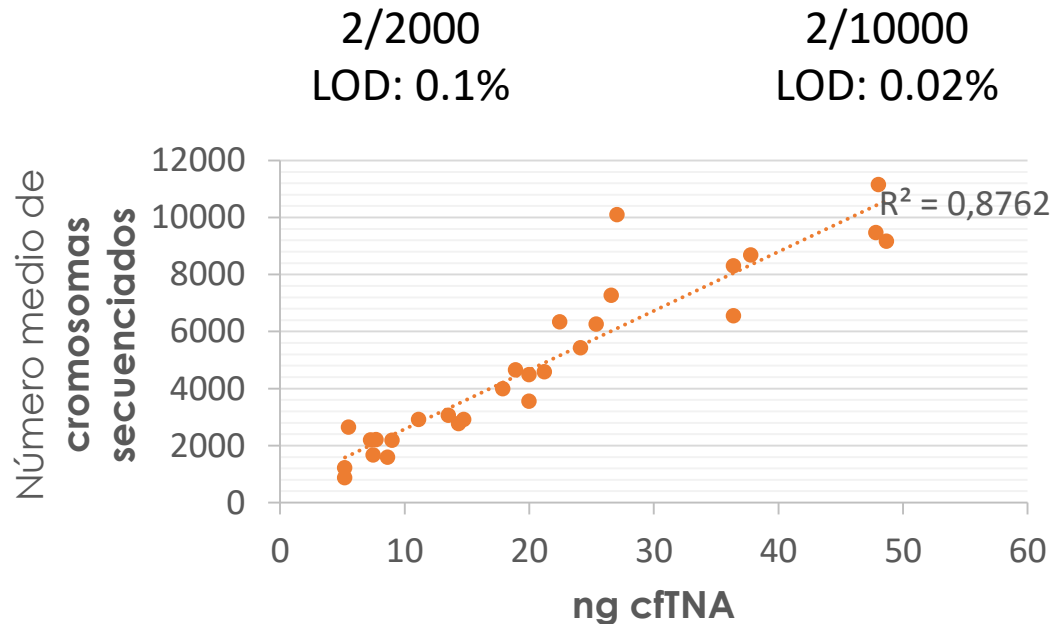
- Mismos valores de frecuencia alélica (n=28).



Macías *et al.*, (en revisión)

cfTNA – reproducibilidad de la resolución obtenida

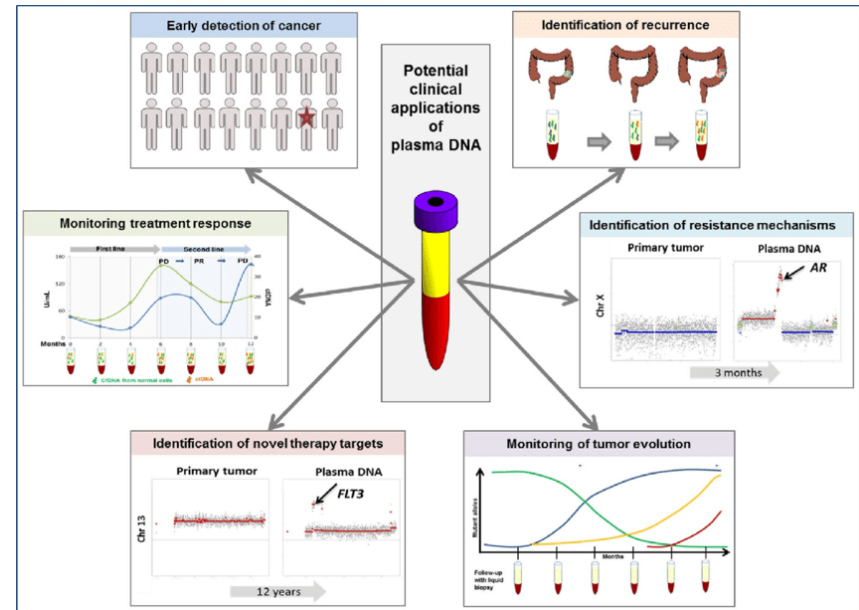
- Cantidad de cfTNA de partida dictamina la resolución (LOD).



Macías *et al.*, (en revisión)

cfTNA – aplicaciones clínicas

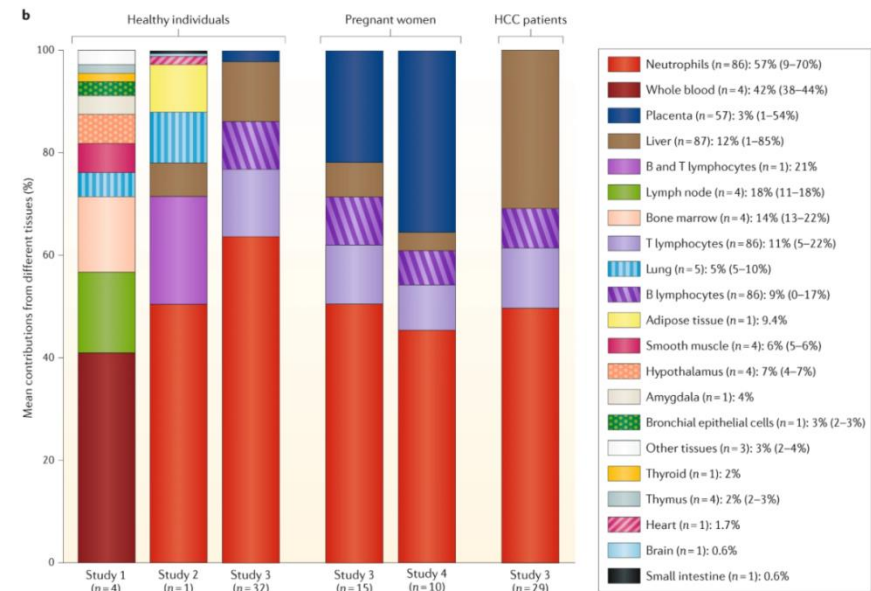
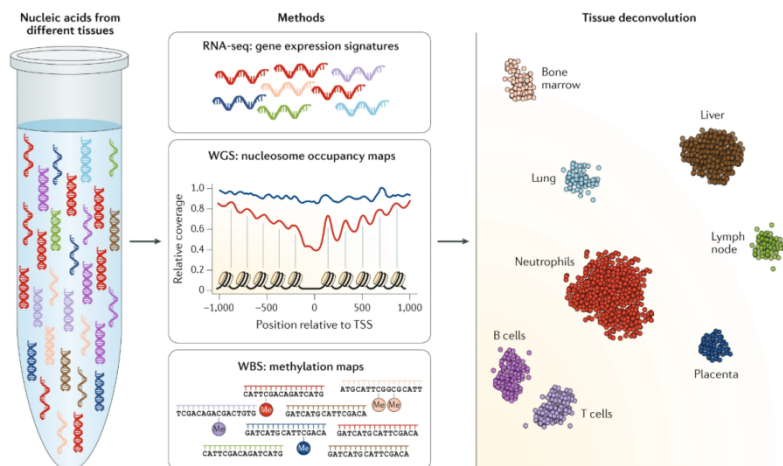
- Selección de terapias dirigidas
- Seguimiento al tratamiento
- Monitorización de la enfermedad residual mínima (MRD)
- Detección y caracterización temprana del cáncer pudiendo indicar el tejido de origen en personas sanas



Perakis *et al.*, (2017) Adv Clin Chem

cfTNA – tejido de origen

- Deconvolución de los perfiles de expresión génica obtenidas mediante microarrays o RNA-seq, de ocupación de nucleosomas o de metilación



- Leucocitos *versus* eritrocitos

Heitzer *et al.*, (2019) Nature Reviews Genetics

cfTNA – dificultades para su aplicación

- Su escasez
- La falta de estandarización para su recolección, aislamiento y análisis
- La carestía de su caracterización molecular
- Falta de comparaciones entre laboratorios
- Falta de conclusiones de grandes ensayos multicéntricos

Table 7.

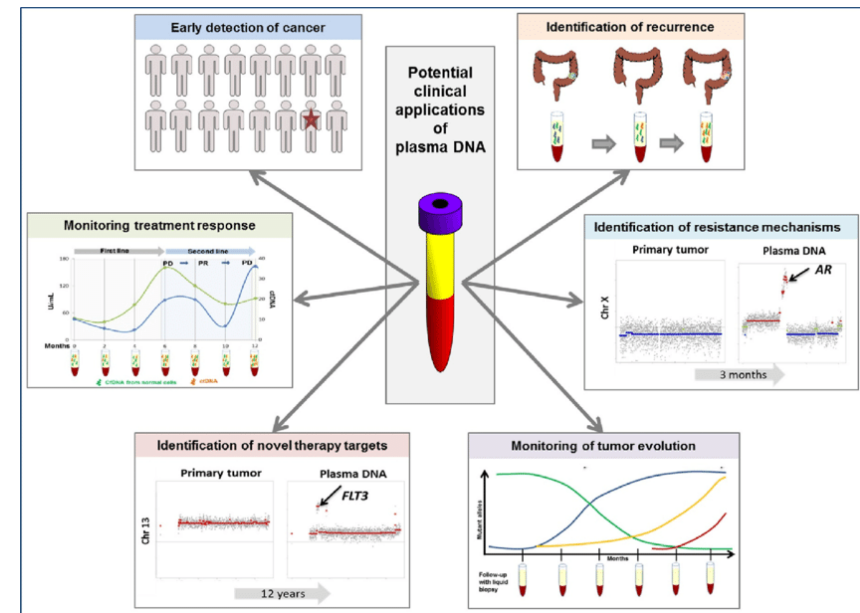
Overview of challenges and future prospects of liquid biopsies.

Current issue	Challenges	Future prospects	References
Recovery of rare CTCs and low levels of ctDNA and exosomes	Recovery of a large amount of analytical samples from liquid biopsy	High-throughput assaying	177,178
RNA molecules labile nature	Ability to detect gene translocations and RNA expression data	Innovative high-throughput technologies such as multiplex digital PCR and expression arrays	177,181
Low sensitivity and specificity of ctDNA in early-stage disease	Identification of patients with early-stage disease	Advanced genomic approaches that have higher sensitivity to identify mutations in matched ctDNA and tumor tissue samples	28,179
Difficult interpretation of the clinical results based on the data obtained from CTCs and ctDNA	Identify the crucial alterations that identify metastatic or resistant tumor cell clones	Better knowledge of the dynamic biology of CTCs, exosomes, and ctDNA release	28,181
Variability of assay platform for the genomic characterization determines the difficult reproducibility of data	Validation and reproducibility of molecular and computational data	Standardization and analytical validation of the methods used for liquid biopsy	180,181
High cost of technologies and bioinformatics analysis necessary for liquid biopsy	Diffusion and implementation of liquid biopsy on a large scale as routine analysis	Introduction of low-cost biotechnology and computational software	180,181
Tumor heterogeneity with consequent increase in the data obtained	Reduction of mutational expression data complexity	Implementation of databases, new computational algorithms, and innovative software to support interpretation of large amounts of data	180,181

CTC, circulating tumor cell; ctDNA, circulating tumor DNA; PCR, polymerase chain reaction.

Conclusiones

- La implementación sistemática de la biopsia líquida no es todavía una realidad. Limitaciones:
 - muestra de partida
 - procesos analíticas
 - análisis bioinformáticos
- La biopsia líquida es capaz de reflejar la heterogeneidad espacial y temporal del cáncer mejorando la caracterización del tumor y:
 - monitorización de la enfermedad mínima residual
 - las decisiones terapéuticas
 - la identificación de recidivas
 - identificar el tejido de origen



Perakis *et al.*, (2017) Adv Clin Chem

Muchas gracias



Universidad
de Navarra

CIMA LAB
DIAGNOSTICS



<https://www.unav.edu/web/cimalab>

galkorta@unav.es