



Fundación JL Castaño  
**SEQC**

**SEQC<sup>ML</sup>**  
Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2017-2018

## APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TÉCNICAS ACTUALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Ed. Cont. Lab. Clin 37: 52 - 58

---

### **PCR DIGITAL EN LA MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DEL PACIENTE ONCOLÓGICO.**

#### **Clara Pérez Barrios.**

*Laboratorio de Biopsia Líquida. Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Majadahonda (Madrid).*

#### **Miguel Barquín del Romo.**

*Laboratorio de Biopsia Líquida. Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Majadahonda (Madrid).*

## **1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA**

En los últimos años la caracterización molecular de los tumores ha permitido el desarrollo de fármacos dirigidos frente a dianas moleculares. En muchos casos, para que un paciente pueda recibir uno de estos fármacos es necesario haber identificado previamente en el tumor la alteración molecular frente a la que actúa, que recibe el nombre de **biomarcador**. La biopsia de tejido es la muestra de referencia para realizar estos estudios moleculares, sin embargo, no está exenta de limitaciones:

- El acceso al tejido puede ser dificultoso, lo que influye en la calidad de la muestra.
- La cantidad de la muestra es en ocasiones escasa, y resulta un factor limitante para la realización de estudios complementarios.
- La gran heterogeneidad tumoral puede hacer que las muestras no sean representativas de la totalidad de las células tumorales.
- Es un procedimiento invasivo para el paciente, lo que puede conllevar un riesgo añadido e influir negativamente en su calidad de vida.

Este último punto es especialmente relevante, ya que impide la obtención de muestras seriadas a lo largo del tratamiento para estudiar la evolución molecular del tumor y la aparición de resistencias.

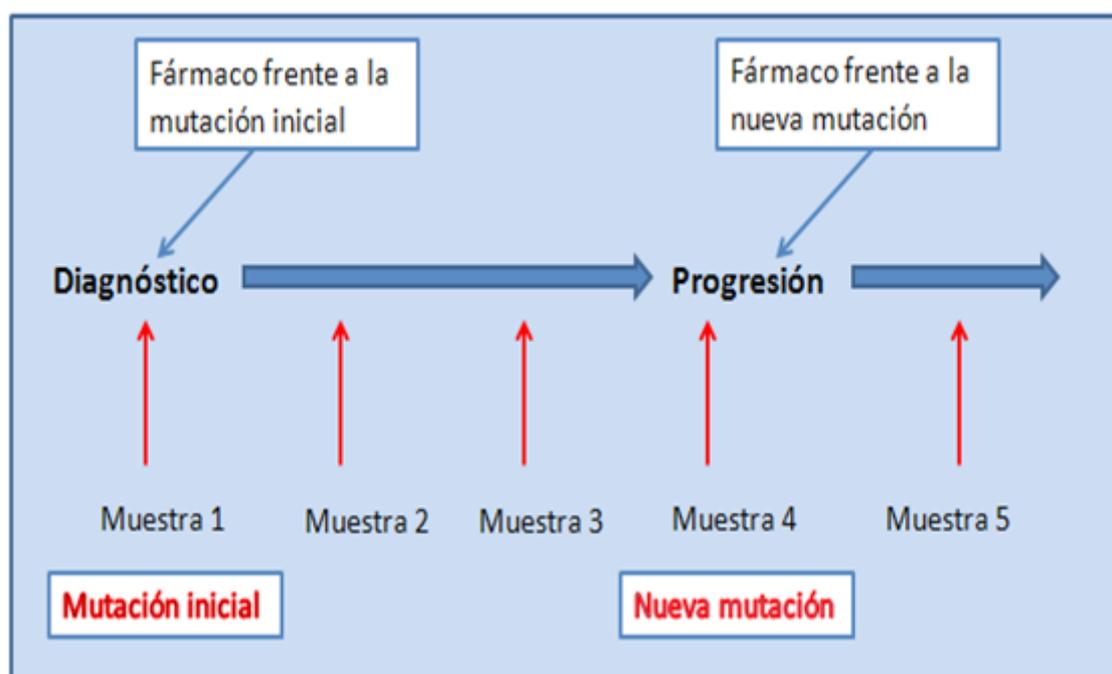
Debido a estas limitaciones, se han desarrollado estrategias alternativas que ayuden a la toma de decisiones clínicas, teniendo especial interés el estudio del **ADN tumoral circulante en sangre (ADNtc)**.

---

El término ADN tumoral circulante hace referencia a las moléculas de ADN que viajan de forma libre a través de la sangre y otros líquidos biológicos y que han sido liberadas por las células tumorales mediante procesos de necrosis y apoptosis fundamentalmente.

La principal utilidad de esta molécula en el ámbito oncológico se debe a que mantiene el perfil molecular del tejido del que procede, por lo que su análisis proporciona información sobre el tumor sin necesidad de realizar procedimientos invasivos.

Por otra parte, la muestra de elección para su estudio suele ser el plasma (en tubos de EDTA), lo que permite determinar y cuantificar de forma continua las mutaciones de interés a lo largo del tratamiento farmacológico gracias a su fácil obtención (figura 1). Esto resulta de gran utilidad en la monitorización del tratamiento y proporciona información de interés para la toma de decisiones clínicas.



**Figura 1:** Esquema de seguimiento del tratamiento oncológico mediante estudio de ADNtc.

### Consideraciones analíticas:

Para el estudio del ADNtc es necesario identificar la mutación somática de interés que se presenta en una frecuencia alélica baja, ya que el ADN tumoral se encuentra mezclado con el ADN liberado por los tejidos sanos. Esto requiere técnicas muy sensibles y específicas para su determinación.

En la fase preanalítica existen varios factores a tener en cuenta que pueden afectar a los resultados. En primer lugar, la muestra de elección es el plasma, ya que reduce el ruido de fondo que se produce por la liberación de ADN de células sanas durante el proceso de coagulación. Para evitar el efecto de la lisis celular es importante centrifugar y separar el

plasma lo más pronto posible tras la extracción de sangre. En segundo lugar, existen diversos métodos de extracción para ADN circulante, tanto manuales como automatizados. La elección entre un sistema de extracción u otro deberá valorarse de forma exhaustiva en función de la carga de trabajo del laboratorio y de los requisitos establecidos para el análisis, ya que es un proceso que influye de manera sustancial en el proceso analítico. De manera general, los métodos automáticos proporcionan mayor reproducibilidad y evitan en gran medida el riesgo de contaminación entre las muestras. Por último, deben establecerse unas condiciones rigurosas de trabajo, incluyendo áreas claramente diferenciadas de pre y post PCR, ya que la cantidad de ADN circulante suele ser escasa, por lo que el laboratorio debe optimizar los procesos de obtención, conservación y procesamiento de las muestras.

### **PCR digital para el estudio del ADN tumoral circulante**

Para el estudio del ADNtc se requiere de técnicas muy sensibles como la PCR digital, que permiten el estudio de mutaciones en muy baja frecuencia (por debajo del 0.1 %). Este tipo de PCR obtiene una sensibilidad mucho mayor a la PCR convencional al dividir la muestra en múltiples particiones que se amplifican de manera individual. Gracias a esto se consigue además una gran precisión en la cuantificación de mutaciones que se encuentran en muy baja proporción, lo que resulta esencial en el escenario de las mutaciones de origen tumoral. Por otra parte, esta división de la muestra evita que se amplifiquen preferentemente unas moléculas sobre otras y no requiere la utilización de curvas patrón como ocurre en el caso de la PCR a tiempo real.

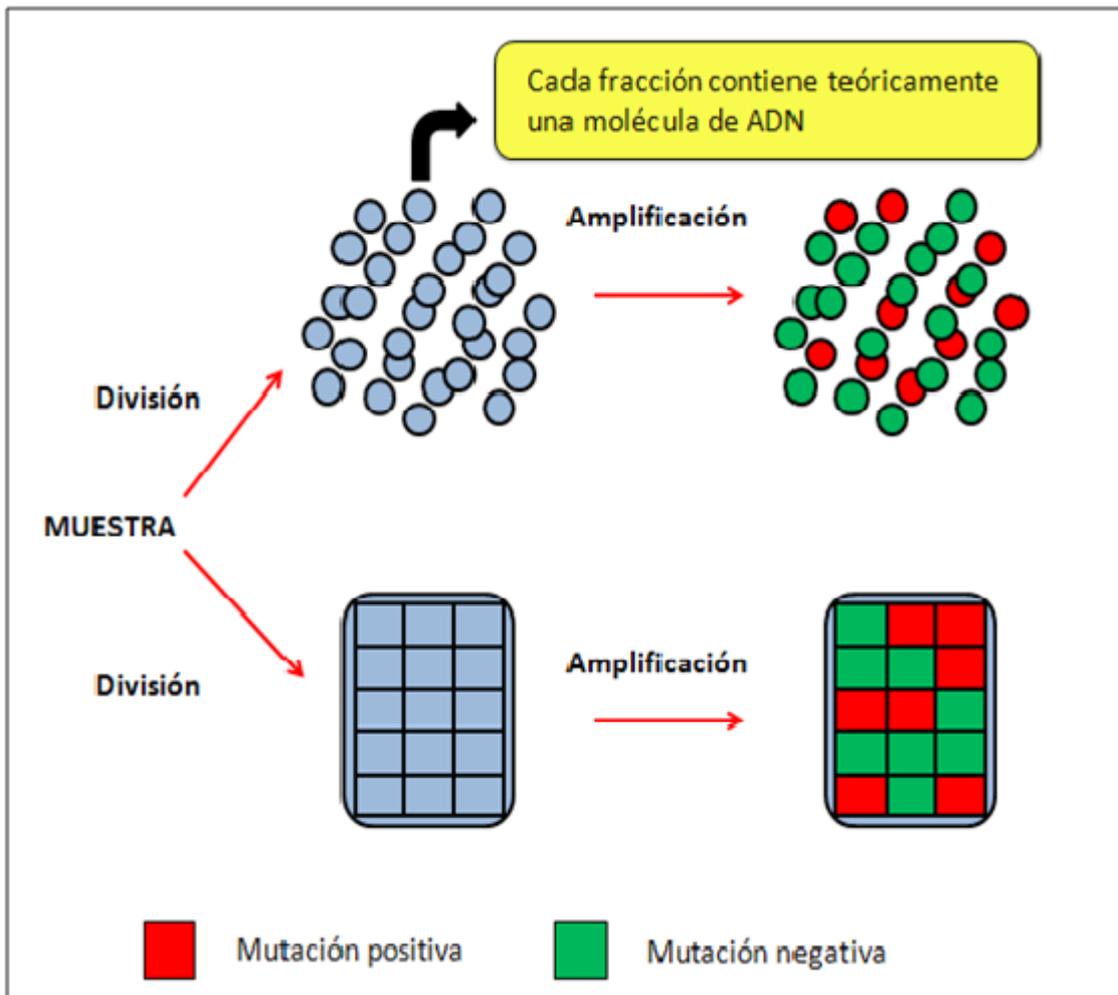
Existen en el mercado dos tipos de PCR digital: “**Droplet digital PCR (ddPCR)**” y “**array-based PCR**” (figura 2). La diferencia principal entre los dos modelos se debe a la estrategia diseñada para la división de la muestra: Mediante la formación de gotas tipo emulsión, o mediante el uso de chips compuestos por microporos.

Ambas estrategias están diseñadas para que en cada fracción de muestra contenga teóricamente de 0 a 2 moléculas de ADN, siguiendo una distribución de Poisson. La amplificación mediante sondas marcadas con diferentes fluorocromos permite contar el número de fracciones positivas y negativas a una mutación y estimar su concentración inicial.

## **2. ÁMBITO DE APLICACIÓN**

La principal aplicación del estudio de ADNtc es el estudio de **biomarcadores** de forma no invasiva para el uso de fármacos dirigidos. Estos biomarcadores pueden ser de dos tipos:

- De sensibilidad o predictores de respuesta a un fármaco.
- De resistencia o predictores de pérdida de respuesta a un fármaco.



**Figura 2:** Representación de los dos tipos de PCR digital.

Es importante destacar que esta metodología no solo permite identificar estos biomarcadores, sino que además hace posible su cuantificación, permitiendo valorar la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo. Diversos estudios han demostrado que la cantidad de ADNtc se correlaciona con la progresión tumoral, de forma que los incrementos sucesivos de ADNtc sugieren un empeoramiento de la enfermedad, así como descensos sucesivos sugieren una mejoría clínica.

En Oncología, la evaluación de la respuesta al tratamiento se lleva a cabo analizando los cambios en el tamaño de las lesiones tumorales mediante pruebas de imagen. Para ello se utilizan los criterios RECIST v1.1, que establecen 4 niveles de respuesta: respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable y enfermedad progresiva. Para considerar el cambio de línea de tratamiento debe haberse detectado un aumento de al menos un 20 % en el tamaño de las lesiones, o lo que es lo mismo, enfermedad progresiva. Sin embargo, en muchas ocasiones es difícil objetivar la respuesta al tratamiento en base a estos criterios. El análisis secuencial de biomarcadores en el ADNtc proporciona información complementaria a las pruebas de imagen sobre el estado del paciente y su respuesta al fármaco admi-

nistrado lo que resulta de gran utilidad clínica. Por un lado, los incrementos sucesivos de las mutaciones de sensibilidad y/o la aparición de mutaciones de resistencia pueden indicar mala respuesta terapéutica con progresión de la enfermedad. Así mismo, el descenso de las mutaciones de sensibilidad unido a la ausencia de mutaciones de resistencia puede relacionarse con una buena respuesta terapéutica.

Por lo tanto, podemos identificar **dos** aplicaciones principales del estudio consecutivo del ADNtc en Oncología:

1- Monitorización de la respuesta a un fármaco y de la evolución de la enfermedad mediante la evolución de las mutaciones durante el tratamiento.

2- Detección temprana de resistencias, identificando la aparición de nuevas mutaciones asociadas a este fenómeno, que además pueden utilizarse como biomarcadores de nuevos fármacos en líneas de tratamiento sucesivas.

Situación actual del estudio del ADNtc en el tratamiento oncológico:

Existen diversos tumores en los que resulta especialmente interesante el estudio de biomarcadores, como por ejemplo el cáncer de colon, el cáncer de pulmón no microcítico o el melanoma entre otros. En los últimos años, diversas empresas han desarrollado ensayos en ADNtc para el estudio de biomarcadores de forma no invasiva, aunque solo un bajo porcentaje de ellos presentan acreditación IVD de producto sanitario, por lo que en su mayoría se utilizan únicamente para investigación.

En el tratamiento del cáncer de colon con anticuerpos monoclonales anti-EGFR, como el Cetuximab, es necesario realizar el estudio previo de los genes NRAS y KRAS. Esto es debido a que ciertas mutaciones en estos genes se asocian a baja respuesta al tratamiento. La empresa Sysmex Inostics ha comercializado recientemente el kit "**OncoBEAM® RAS CRC (CE-IVD)**" que permite el estudio de 34 mutaciones en KRAS y NRAS de forma no invasiva.

En el caso del cáncer de pulmón no microcítico avanzado, la empresa Roche ha lanzado al mercado el kit "**cobas® EGFR Mutation Test v2 (CE-IVD)**", para el estudio de mutaciones puntuales, inserciones y deleciones en el gen EGFR a partir de muestras de plasma, ya que estas mutaciones predicen respuesta a fármacos anti-EGFR como el Gefitinib.

Por último, en el caso del melanoma, las mutaciones en BRAF en la posición V600 predicen buena respuesta a tratamientos dirigidos como el Vemurafenib. El kit automatizado "**Idylla™ ctBRAF Mutation Assay**" de Biocartis permite la detección de forma no invasiva de las variantes V600E, E2, D, K R y M, aunque de momento no tiene marcado CE-IVD.

### **3. LIMITACIONES DE LA TÉCNICA**

Uno de los principales problemas que presenta esta técnica es la falta de criterios estandarizados en los procesos preanalítico y analítico, y la falta de controles externos normalizados. No existen en la actualidad programas de inter-comparación lo que puede comprometer

ter la calidad de los resultados en algunas ocasiones.

Otra limitación importante se debe a la falta de estandarización para establecer la presencia y la cantidad de mutaciones. Es necesario que cada laboratorio establezca sus propios límites de detección y de cuantificación para poder asignar un punto de corte a partir del cual se pueda afirmar con suficiente fiabilidad la presencia o ausencia de la mutación de interés. Además, no existen estudios que permitan establecer los puntos de corte para la toma de decisiones clínicas por lo que la información que aporta esta técnica es orientativa y complementaria a otras pruebas. Además, los resultados deben valorarse teniendo en cuenta varias medidas consecutivas y su tendencia (ascendente, estable o descendente) a lo largo del tratamiento.

Por último, la PCR digital presenta la desventaja de que utiliza sondas específicas frente a mutaciones concretas. Esto no supone un problema cuando se conoce la mutación que se quiere analizar. Sin embargo, el uso de ensayos individuales puede dificultar mucho el trabajo si se quiere hacer un cribado de varias mutaciones o cuando no se conoce la mutación del paciente.

Estas limitaciones hacen que la experiencia del personal de laboratorio sea un factor fundamental para garantizar la fiabilidad de los resultados.

## 4. BIBLIOGRAFÍA

**Aung K, Board R, Ellison G, Donald E, Ward T, Clack G, Ranson M, Hughes A, Newman W and Dive C.** Current status and future potential of somatic mutation testing from circulating free ADN in patients with solid tumours. HUGO J. 2010; 4: 11-21.

**Bordi P, Del Re M, Danesi R, Tiseo M.** Circulating ADN in diagnosis and monitoring EGFR gene mutations in advanced non-small cell lung cancer. Translational Lung Cancer Research. 2015;4(5):584-597.

**Heitzer E, Ulz P, Geigl JB.** Circulating tumor ADN as a liquid biopsy for cancer. Clin Chem. 2015; 61(1):112-23.

**Karachaliou N, Mayo-de-las-Casas C, Molina-Vila MA, Rosell R.** Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. Annals of Translational Medicine. 2015;3(3):36.

**Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, et al.** Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2009;15:2630-6.

**Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ.** Free ADN in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res. 1977;37(3):646-50.

**Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, et al.** Comparison of methods for circulating cell-free ADN isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. Translational Lung Cancer Research. 2016;5(6):665-672

**Pérez-Callejo D, Romero A, Provencio M, Torrente M.** Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring. Translational Lung Cancer Research. 2016;5(5):455-465.

**Wang Z, Chen R, Wang S et al.** Quantification and Dynamic Monitoring of EGFR T790M in Plasma Cell-Free ADN by Digital PCR for Prognosis of EGFR-TKI Treatment in Advanced NSCLC. PLoS ONE. 2014;9(11):e110780.

---

### COMISIÓN DE GENÉTICA

**Presidenta:** Pilar Carrasco Salas.

**Miembros:** Concepción Alonso Cerezo, Ana Cuesta Peredo, Orland Diez Gibert, Begoña Ezquieta Zubicaray, Hada Macher Manzano, Jesús Molano Mateos, Josep Oriola Ambròs, Raquel Rodríguez López, Atocha Romero Alfonso, Ana M<sup>a</sup> Sánchez de Abajo, María Santamaría González (*coordinadora*), Cristina Torreira Banzas.

### ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi , R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, A. Merino, A. Moreno, A. Peña, N. Rico, M. Rodríguez (*Presidente*), MC. Villà.

ISBN 978-84-697-4013-2 – Abril 2018 (recibido para publicación Junio 2017).