



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Facultad de Enfermería de Soria



Facultad de Enfermería de Soria

GRADO EN ENFERMERÍA

Trabajo Fin de Grado

El papel de la enfermería en la Biopsia Líquida

Estudiante: María Villaverde Hueso

Tutelado por: Dr. Diego Fernández Lázaro

Soria, 28 de Mayo del 2019

***“No siempre podemos hacer grandes cosas, pero si podemos hacer cosas
pequeñas con gran amor”***

Madre Teresa de Calcuta

RESUMEN

Introducción: El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbilidad del mundo. Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos probablemente aumente a un 70% en las próximas décadas. Desde el año 2000 en nuestro país, el número de tumores ha experimentado un crecimiento constante debido al crecimiento de la población, el aumento de la esperanza de vida y por el empleo de técnicas de detección precoz de mayor precisión.

Una de estas herramientas es la BL que permite potencialmente el diagnóstico y cribado de tumores por vía no invasiva, lo que en un futuro próximo representara un cambio en la comprensión de la biología molecular de los cánceres.

Justificación y objetivos: La práctica biosanitaria actual en la disciplina de la oncología debe diagnosticar a un paciente con mayor exactitud y precisión para adoptar la mejor opción terapéutica individual y en ese momento particular.

Con este trabajo se pretende concienciar a la enfermería de la importancia que tiene la investigación para el desarrollo de la profesión y los beneficios que aporta identificar su rol en investigación como enfermera profesional.

Metodología: Para la elaboración de este trabajo se realizó una búsqueda limitada a artículos en inglés publicados entre 2010 y 2019 en las bases de datos electrónicas: Pubmed, PsycINFO, CINAHL (Índice acumulativo de enfermería y salud afines), Scielo, Google Scholar, Web of Science y Cochrane Library Plus; para un total de 44 referencias bibliográficas.

Resultados y discusión: La BL se refiere al análisis de las células circulantes del tumor y ácidos nucleicos libres de células principalmente ADN tumoral circulante, ARN y exosomas.

Los componentes de una BL proporcionan el paisaje genético y epigenético de todas las lesiones cancerosas y ofrecen la oportunidad de seguir sistemáticamente la evolución genética tumoral.

Conclusiones: Con este trabajo se pretende aportar nuevas conclusiones al campo de la medicina de precisión desde el punto de vista enfermero. Llegados a este punto cabe destacar la importancia que tiene la continua actualización de conocimientos en la enfermería para prestar una calidad asistencial de calidad a nuestros pacientes.

Palabras clave: cáncer, enfermería, biopsia líquida, medicina de precisión.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	CÁNCER: GENERALIDADES Y EPIDEMIOLOGÍA	1
1.2	INCIDENCIA.....	2
1.3.	PREVALENCIA	3
1.4	MORTALIDAD	4
1.5.	CÁNCER DE MAMA.....	4
1.6.	MEDICINA DE PRECISIÓN: BIOPSIA LÍQUIDA.....	5
1.6.1.	BIOFLUIDOS COMO FUENTE DE INFORMACIÓN PARA LA BIOPSIA LÍQUIDA	6
1.7	BIOPSIA LÍQUIDA VERSUS BIOPSIA DE TEJIDO “TRADICIONAL”	8
2	JUSTIFICACIÓN.....	9
3	OBJETIVOS	10
3.1	GENERAL.....	10
3.2	ESPECÍFICOS	10
4	MATERIAL Y MÉTODOS	10
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5.1	COMPONENTES DE LA BIOPSIA LÍQUIDA	12
5.1.1	CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTCS).....	12
5.1.2	LOS ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTE.....	14
5.1.2.1	ADN CIRCULANTE(cfDNA)	14
5.1.2.2	LA RELACIÓN ENTRE LAS CTCs Y EL cfDNA	15
5.1.2.3	EL ARN CIRCULANTE (cfARN).....	15
5.1.2.4	LIBERACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A LA SANGRE	15
5.1.3	EXOSOMAS	16
5.1.4	MICROVESÍCULAS.....	16
5.1.5	PLAQUETAS	17
5.2	APLICACIONES POTENCIALES DE LA BIOPSIA LÍQUIDA.....	18
5.3	PERFIL Y DIAGNOSTICO MOLECULAR.....	18
5.4	MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA Y ESTABLECER PRECOZMENTE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	18
5.5	ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR)	18
5.6	DETECCIÓN PRECOZ Y CRIBADO.....	18
5.7	IMPACTO DE APLICABILIDAD DE LA BIOPSIA LÍQUIDA EN DISTINTOS TUMORES.....	18

5.8	BIOMARCADORES(BM) PREDICTIVOS Y PRONÓSTICO PARA CÁNCER DE MAMA IDENTIFICADOS MEDIANTE BIOPSIA LÍQUIDA.....	21
5.9	FUTURO PAPEL DE LA ENFERMERÍA EN BL.....	22
6	CONCLUSIONES	23
7	BIBLIOGRAFÍA.....	24
8	ANEXOS	I
	ANEXO I: Bases de datos utilizadas y palabras clave empleadas para cada una de las búsquedas.	I
	ANEXO II: Artículos encontrados en las diferentes bases de datos.	II

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estimación del número de nuevos casos en España para los años 2012 y 2035 (excluidos tumores cutáneos no melanoma).....	2
Tabla 2: Estimación de la prevalencia a 5 años de tumores en el mundo para el año 2012 (población general).	3
Tabla 3. Comparación entre las diferentes aplicaciones).	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características diferenciales de las células del cáncer. Fuente: Elaboración propia.	1
Figura 2: Elementos en la Oncología de Precisión..	5
Figura 3. Los fluidos corporales como fuente de información molecular derivada de tumores. .	6
Figura 4 Extracción sanguínea.....	7
Figura 5 Biopsia líquida versus biopsia tisular. Fuente: Elaboración propia.....	8
Figura 6. Medicina de precisión..	20

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

BL: Biopsia Líquida.

BM: Biomarcadores.

CA19.9: Antígeno Carbohidrato.

CEA: Antígeno Carcinoembrionario.

CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

cfDNA: ADN Circulante Libre.

cfRNA: ARN Circulante Libre

ctDNA: ADN Tumoral Circulante.

CTCs: Células Tumorales Circulantes.

CM: Cáncer de Mama

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.

EMR: Enfermedad Mínima Residual.

EMT: Transición Epitelio Mesénquima.

FDA: Food Drug American.

IGFR1: Factor de Crecimiento de la Insulina 1.

LCR: Líquido Cefalorraquídeo.

LNH: Linfoma No Hodgkin.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PSA: Antígeno Prostático Específico.

TEA: Trastorno del Espectro Autista.

1. INTRODUCCIÓN

Tomar una decisión puede ser algo muy difícil en algunas ocasiones. El Trabajo de Fin de Grado (TFG) supone el broche final a todo un ciclo formativo, a una etapa de nuestra vida y la llave que nos abra la posibilidad de ejercer una profesión. Encontrarse ante la tesitura de que tema escoger para ese trabajo, me supuso muchas horas de pensar y sopesar diversas variables: podría ser un tema sobre el que hubiese trabajado durante la carrera, como los cuidados paliativos o algo en lo que empecé como voluntaria y que ahora me ocupa parte de mi tiempo, como trabajo a tiempo parcial: el Trastorno del Espectro Autista (TEA), o algo en lo que por vínculos familiares pudiera tener una ayuda: la epidemiología de las fracturas de cadera en el anciano.

Todos estos temas tenían su interés, pero pensé que podría profundizar en un tema de actualidad, que relacionado con mi formación como técnico en Anatomía Patológica y mi paso por los laboratorios del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) como alumno en prácticas, supusiera una puesta al día en alguna técnica novedosa y que debido a la creciente importancia de la Oncología, supusiera aprender lo relacionado con una técnica tan importante como la biopsia líquida; que ya empieza a implantarse y que el enfermero deberá conocer, realizar e interpretar para poder contribuir a su realización.

1.1 CÁNCER: GENERALIDADES Y EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad del cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí, que responden a la capacidad de invadir los tejidos adyacentes o incluso dispersarse a diferentes órganos o tejidos (hipótesis de siembra). El proceso de carcinogénesis conlleva modificaciones dinámicas en el genoma de las células normales, lo que finalmente conduce a la transformación en células tumorales, además de que estas células malignas sean capaces de evadir los mecanismos homeostáticos que controlan la proliferación (1). En este sentido, las células tumorales presentan una serie de rasgos diferenciales que son necesarios para el desarrollo de la enfermedad del cáncer (Figura 1).



Figura 1. Características diferenciales de las células del cáncer. Fuente: Elaboración propia.

Las células cancerosas, poseen un conjunto de células adyacentes con interacciones directas que además actúan directamente sobre el micro medioambiente tumoral. Este micro medioambiente presenta un estroma circundante significativamente alterado y es un elemento crítico para el desarrollo del tumor. Varios componentes específicos del micro medioambiente del cáncer de mama (CM), como son las células inmunitarias supresoras, factores solubles y matriz extracelular alterada, tienen la capacidad de actuar juntos para impedir la inmunidad antitumoral efectiva y promover la progresión del CM y la metástasis (2).

La mayoría de los cánceres contienen numerosas variantes genéticas que determinan el comportamiento oncogénico de las células tumorales. La inestabilidad genómica causa la acumulación de mutaciones genómicas. Las diferentes etapas de la progresión tumoral en el CM son una sucesión de expansiones clónicas producidas por la acumulación de mutaciones que generan selectivamente células neoplásicas que tienen una ventaja proliferativa y que conformarían el tumor primario (3).

1.2 INCIDENCIA

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbilidad del mundo, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos en el mundo en el año 2012 (últimos datos disponibles a nivel mundial estimados por los proyectos EUCAN y GLOBOCAN, de la OMS). Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos probablemente aumente en un 70 % en las próximas décadas, alcanzando los 24 millones de casos aproximadamente en el año 2035 (4). También en España, el cáncer es una de las principales causas de morbilidad, con 215.535 casos estimados para el año 2012, 228.482 casos estimados para el año 2017 y una previsión de 315.413 casos para el año 2035 (4).

Tabla 1. Estimación del número de nuevos casos en España para los años 2012 y 2035 (excluidos tumores cutáneos no melanoma) Fuente: GLOBOCAN 2012. Global Cancer Observatory. IARC 2018. Adaptada de Bray F. et al. (4).

ELEMENTOS QUE CONFORMAN LA BIOPSIA LÍQUIDA	CTCs	ARN /ARNtc	Exosomas
Potencial para recapitular la heterogeneidad espacial y temporal del tumor	No	Si	No
Detección de mutaciones somáticas, alteración del número de copias y funciones génicas	Si	Si	Si
Evaluación de patrones de metilación	Si	Si	Si
Análisis de ARNm/miARN/lncRNA/variantes génicas	Si	Si	Si
Estudios de expresión	Si	No	Si
Morfología celular y estudios funcionales ex vivo	Si	No	No
Demostración de co-localización de señal	Si	No	No
Análisis proteómico	Si	No	Si

Desde el año 2000 en nuestro país, el número de tumores ha experimentado un crecimiento constante debido al crecimiento de población, al aumento de la esperanza de vida y por el empleo de técnicas de detección precoz de mayor precisión. Es obvio que el proceso de envejecimiento es un factor de riesgo fundamental para el desarrollo de tumores. Los tumores más frecuentemente diagnosticados en España en el año 2017 fueron los de colonrecto, próstata, pulmón, mama, vejiga y estómago. Siendo en varones los de próstata, pulmón, colorrecto, vejiga, estómago, riñón, hígado, páncreas, linfoma no Hodgkin y leucemias y en mujeres los de mama, colon, útero, pulmón, ovario, páncreas, estómago, LNH, melanoma cutáneo y cérvix. los tumores más frecuentemente diagnosticados (5).

1.3. PREVALENCIA

La prevalencia se encuentra determinada por la supervivencia, es decir, la prevalencia es más elevada en los tumores con mayor supervivencia; mientras que los tumores con supervivencia más cortas tienen una menor prevalencia, aunque se diagnostiquen más frecuentemente. Debido a su alta prevalencia, los tumores constituyen una de las principales causas de ingreso hospitalario. En 2015 los tumores provocaron la tercera causa de estancia hospitalaria (3.599.306 estancias), por detrás de las enfermedades del aparato circulatorio (4.766.949 estancias) y respiratorio (3.886.462). Los ingresos provocados por tumores se mantuvieron relativamente estables con respecto a años anteriores (variación anual + 0,3) (6). En el siguiente diagrama de barras se reflejan los tumores más prevalentes en la población general para el año 2012 (prevalencia a los 5 años).

Tabla 2: Estimación de la prevalencia a 5 años de tumores en el mundo para el año 2012 (población general). Adaptada de Registros de Cáncer 2018. (6).

TIPO	PREVALENCIA
Cáncer de mama	6.232.108
Cáncer de próstata	3.857.500
Cáncer colón-recto	3.543.582
Cáncer de pulmón	1.893.078
Cáncer de cérvix	1.547.161
Cáncer de estómago	1.538.127
Cáncer de vejiga	1.319.749
Cáncer de útero	1.216.504
Cáncer de tiroides	1.206.075
Cáncer de riñón	906.746

1.4 MORTALIDAD

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global, y fue responsable de 8,8 millones de muertes en el año 2015 (OMS). Atendiendo a predicciones poblacionales, se calcula que el número de muertes producidas por tumores aumentará a más de 14 millones en el año 2035 (7).

En España el cáncer es también una causa fundamental de mortalidad, ya que, de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística (8), en el año 2016, un 27,5 % de las muertes se debieron a tumores. Las predicciones poblacionales indican que la mortalidad asociada a tumores para el año 2035 ascenderá a 156.898. Los tumores responsables del mayor número de fallecimientos en 2016 en España en la población general fueron el cáncer de pulmón (22.187 muertes) y el cáncer colorrectal (15.802 muertes), seguidos a una gran distancia del cáncer de páncreas (6.789 casos), el cáncer de mama (6.477 muertes), y de próstata (5.752 muertes) (8).

1.5. CÁNCER DE MAMA

La Sociedad Americana del Cáncer (7), informa que el CM representa por sí solo el 29% de todos los nuevos diagnósticos de cáncer en mujeres en 2016, y se espera que sea la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en mujeres entre 20 y 59 años (4).

Los registros hospitalarios de CM indican 1, 7 millones nuevos diagnósticos anuales de CM en el mundo y veintisiete mil en España, de los cuales aproximadamente 6-10% son inicialmente estadio IV (enfermedad metastásica de novo) y las recidivas metastásicas oscilan entre el 20-30% de todos los casos de tumores de mama existentes (6). Es necesario reseñar que el CM no está restringido a la población femenina, el 1% de estos cánceres ocurren en hombres. Los tumores primarios del seno típicamente no matan; esto ocurre como resultado de la diseminación/metástasis del cáncer a sitios secundarios en el cuerpo. De hecho, las tasas de supervivencia a 5 años son del 99% para el cáncer de mama localizado, 84% para el estadio regional (ganglios linfáticos cercanos) y 23% para las metástasis (órganos distantes) y ganglios linfáticos (7). Debido al comportamiento agresivo de algunas variedades y dado que la mama es un órgano accesible para el diagnóstico temprano, el CM es objeto permanente de estudios en relación con los nuevos métodos de diagnóstico, seguimiento y tratamiento. En la clínica oncológica de rutina se utilizan los siguientes parámetros de seguimiento como son: tamaño del tumor, tipo histológico del mismo, pleomorfismo celular y nuclear, índice mitótico, presencia de necrosis, invasión vascular, estado de los receptores hormonales y de los ganglios linfáticos axilares. Sin embargo, no son suficientes para predecir el curso de la enfermedad (8).

Cuando el CM es una enfermedad sistémica en el momento del diagnóstico, generalmente se administra quimioterapia y terapia hormonal para erradicar cualquier posible presencia de micrometástasis ocultas después de la cirugía radical, reduciendo de esta manera el riesgo de recaída y además mejorando la supervivencia general, tal y como establecen los factores pronósticos clínicamente validados. A pesar del tratamiento local, regional y sistémico implementados, entre 30% y el 50% de los pacientes con ganglios linfáticos axilares negativos y positivos, respectivamente, recaen después de cinco años de cirugía (8).

Probablemente una de las razones principales del fracaso de las terapias sistémicas contra el tumor es nuestra incapacidad para capturar la heterogeneidad del CM (15) y además porque la biopsia de tejido *“tradicional”* invasiva no refleja la dinámica actual tumoral o la sensibilidad al tratamiento. Una de las posibles causas se deba a no disponer de marcadores séricos recomendados en la práctica clínica para monitorizar a los pacientes y predecir su riesgo de recaída (9).

1.6. MEDICINA DE PRECISIÓN: BIOPSIA LÍQUIDA

En los últimos años se ha producido un incremento notable en el conocimiento del cáncer, acompañado de un desarrollo tecnológico muy importante que nos introduce en la senda de la medicina de precisión y de la oncología de precisión en particular (1) (Figura 2). Desde su nacimiento, la medicina de precisión fue entendida como el conjunto de pruebas diagnósticas y los tratamientos resultantes dirigidos a las necesidades particulares de los pacientes. Donde la especialidad de oncología debe ofrecer todas las herramientas que permitan conocer las características fundamentales y diferenciales del cáncer, además de la continua activación de las señales específicas de proliferación, especialmente aquellas relacionadas con los factores que estimulan la progresión y crecimiento aberrante de las células. Esto posibilita que determinados fármacos, al menos en teoría, sean capaces de inhibir concretamente un oncogén activado y alterar selectivamente las células tumorales, evitando las células viables sanas (9).

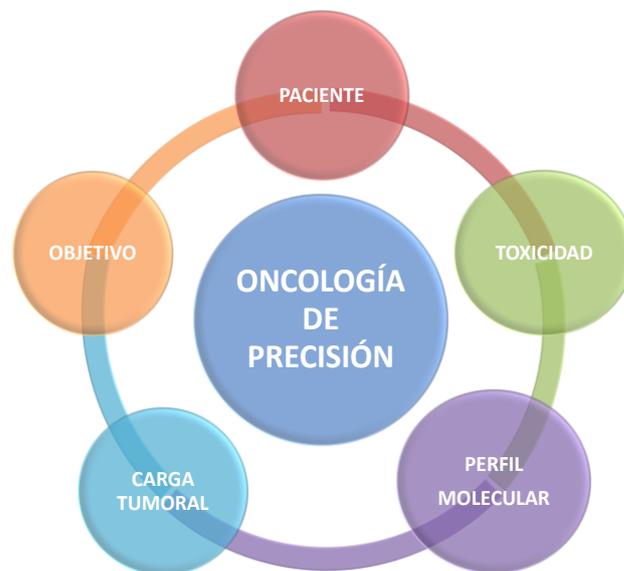


Figura 2: Elementos en la Oncología de Precisión. Adaptada de Hanan D. et al. (1).

Una de estas herramientas, la más actual y en la que más se está invirtiendo tanto tiempo como recursos económicos es la biopsia líquida (BL) que permite potencialmente el diagnóstico y cribado de tumores por vía no invasiva, lo que en un futuro próximo representará un cambio en el paradigma de la comprensión biología molecular de los cánceres y particularmente del CM debido a su heterogeneidad. El término biopsia líquida fue acuñado por Klaus Pantel y Catherine Alix-Panabières para estudiar las células tumorales circulantes (CTCs) en la sangre de los pacientes, pero actualmente se amplía a estudiar el ácido

desoxirribonucleico (ADN) circulante tumoral (ctADNA), el ácido ribonucleico (ARN), el contenido de los exosomas e incluso la información tumoral que tienen las plaquetas que se asocian a los tumores. Los estudios de BL pueden realizarse tanto de la sangre como de otros fluidos corporales como la orina, la saliva, el líquido cefalorraquídeo (LCR) o en el derrame pleural, entre otros (10) (Figura 3).

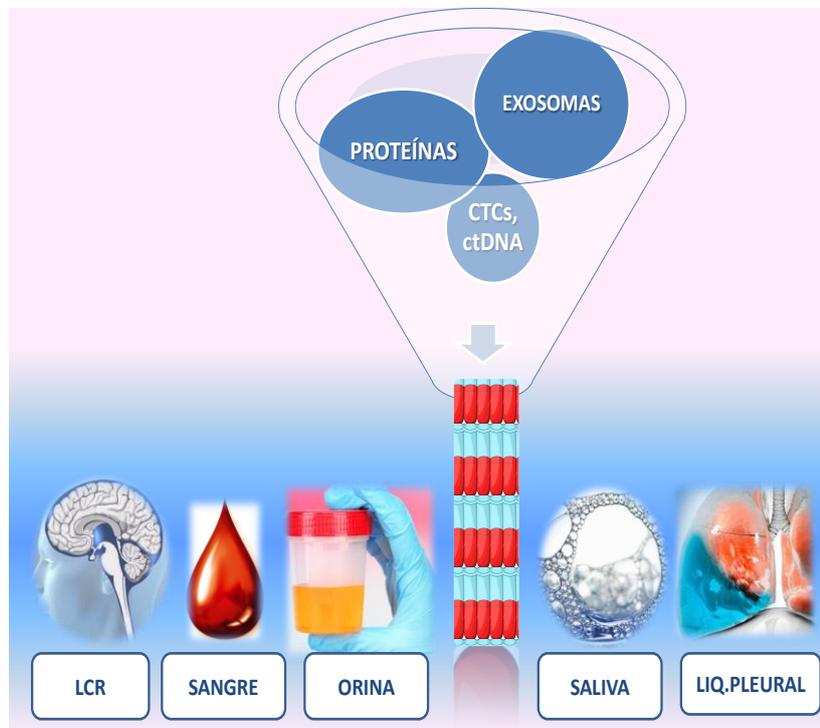


Figura 3. Los fluidos corporales como fuente de información molecular derivada de tumores. Fuente: Elaboración propia.

1.6.1. BIOFLUIDOS COMO FUENTE DE INFORMACIÓN PARA LA BIOPSIA LÍQUIDA

La selección de uno u otro fluido para obtener información sobre la enfermedad dependerá del tumor y la accesibilidad de la muestra. En cada uno de estos biofluidos existe información molecular que es recogida para su análisis mediante BL. La sangre, es el biofluido más utilizado para la búsqueda de marcadores tumorales. En tumores de diseminación hemática (mama, próstata, colón o pulmón) podemos encontrar células tumorales y ácidos nucleicos que se escapan del tumor primario o de las metástasis y tienen la capacidad de migrar e intravasarse a la circulación. Estas “huellas” o marcadores del tumor aportan una valiosa información sobre la enfermedad. Puesto que la obtención de la muestra se basa, por ejemplo, en una simple extracción de sangre (Figura 4) – un procedimiento de rutina y muy poco invasivo – es posible tomar distintas muestras a lo largo de la enfermedad y así seguir tanto el progreso como la evolución del cáncer, en contraposición con la imagen estática que se obtiene en las biopsias de tejido (10).

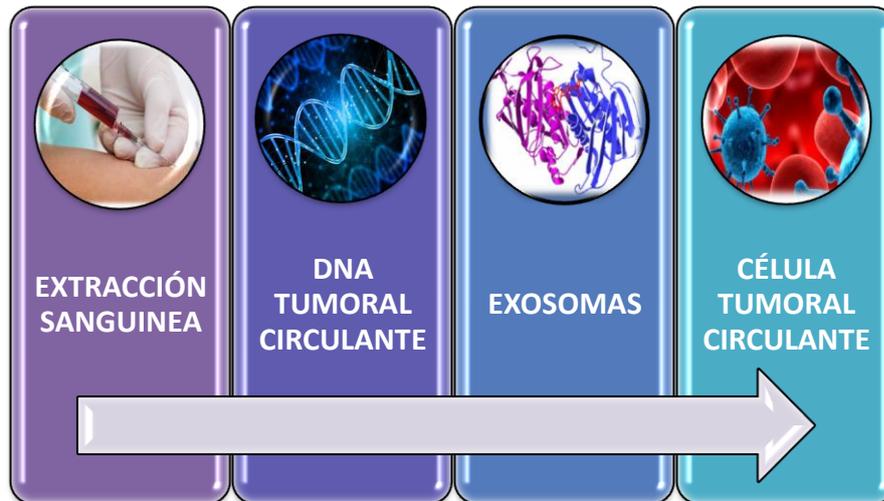


Figura 4 Extracción sanguínea. Fuente: Elaboración propia.

En plasma y/o suero de pacientes oncológicos nos vamos a encontrar una gran cantidad de proteínas marcadores tumorales de origen proteico antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19.9) o el antígeno prostático específico (PSA). Sin embargo, la actual revolución en el campo de estudio de los marcadores sanguíneos, gracias al desarrollo de técnicas genómicas, posibilita estudiar los ácidos nucleicos circulantes tanto ADN como ARN, con gran sensibilidad (11).

En relación al estudio de la orina como biofluido en BL, se divide en sedimento (estudio macroscópico estructuras cristalinas de sales) y el sobrenadante, donde encontramos proteínas, metabolitos, ácidos nucleicos y vesículas de origen extracelular. Con respecto al análisis de proteínas un marcador proteico ampliamente empleado es el PSA, que se encuentra aumentado en orina en pacientes con cáncer de próstata, aunque la rutina clínica lo determina en sangre (12). El ADN en orina procede de la filtración glomerular donde los fragmentos son de 100 pares de bases (13), aunque depende del estado del paciente. La actividad enzimática de la ADNasa-1, hace que nos encontramos una alta fragmentación del ADN, encontrado fragmentos de ADN de alto ($\geq 1\text{kpb}$) o bajo ($< 100\text{ pb}$) peso molecular. Se han analizado mutaciones de ADN presente en orina, de KRAS de pacientes de cáncer colorrectal y páncreas además de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico con sensibilidades similares a las del plasma. La detección de ARN mensajero es prácticamente nula, por la acción de las ARNasas, aunque es posible detección de micro ARN que se encuentran en el interior de los exosomas (11).

En la solución hipotónica de la saliva, se han aislado proteínas, ADN y ARN que hace de este biofluido tenga potencial como fuente de biomarcadores, para ser usado en BL. Con respecto a la identificación proteica en la saliva se identificaron con altos niveles de sensibilidad y especificidad: haptoglobina hp2 (HP), zinc 2-glycoprotein (AZGP1) y calproteína en el cáncer de pulmón y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), p53, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu) y el antígeno carbohidrato 15-3 (CA 15-3) en el CM (14). La cantidad y calidad del ADN salival es similar al plasmático, y se ha empleado para detectar mutaciones la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), inhibidor de ciclina-dependiente de quinasa 2A (CDKN2A), F-box and WD repeat domain containing 7 (FBXW7), HRAS y KRAS; con una sensibilidad del 100% de detección con tumores localizados en la cavidad oral. El ARN

mensajero salival permite la identificación en el cáncer de páncreas de KRAS, Methyl-CpG Binding Domain Protein 3 Like 2 (MBD3L2), Acrosomal Vesicle Protein 1 (ACRV1) y Dolichyl-Phosphate Mannosyltransferase Subunit 1 (DPM1) con 90% de sensibilidad y un 95% de especificidad (15).

La obtención de LCR, aunque supone un procedimiento invasivo es mejor alternativa de la BL en tumores localizados en el sistema nervioso central donde la mayor parte de los pacientes analizados presentaban ácidos nucleicos circulantes en LCR pero no en el plasma (10). En este sentido, los pacientes diagnosticados con linfomas de localización en el sistema nervioso, se identificaron micro ARN (15b, 21, 19, 92a) (11).

1.7 BIOPSIA LÍQUIDA VERSUS BIOPSIA DE TEJIDO “TRADICIONAL”

La biopsia de tejidos ha sido tradicionalmente considerada como una herramienta clave para el diagnóstico y control de numerosas enfermedades. En el caso del cáncer, la biopsia de tejido permite determinar las propiedades histológicas del tumor, así como su perfil genético para diagnosticar y pronosticar su evolución e incluso predecir la respuesta al tratamiento. Hasta hace poco tiempo el tejido era la única forma para estudiar las mutaciones del tumor. A pesar de los avances en la obtención de muestras de tejido, las biopsias presentan limitaciones reales como son la dificultad de realizarlo por la propia localización, por la ausencia de tumor visible y por la iatrogenia implícita del método, y finalmente por la imposibilidad de repetirla frecuentemente, lo que la descarta como método de monitorización. Esto suele ser habitual, por ejemplo, en el cáncer de pulmón, principalmente en estadios I o II, es decir, estadios muy iniciales (16).

Otras limitaciones pueden ser debidas a las comorbilidades del paciente, a la disponibilidad logística, al coste y, en el caso de analizar tejidos almacenados en los bancos, al tiempo transcurrido que puede degradar muchos elementos. Pero la gran restricción viene determinada por la propia naturaleza evolutiva del cáncer ya que, en el proceso biológico de formación y expansión de la masa tumoral, los clones divergen y forman distintas subpoblaciones o subclones que provocan la heterogeneidad tumoral. Esta diversidad y plasticidad no está representada en una muestra de tejido, limitada en tiempo y espacio. En este sentido, una de las herramientas que posibilita superar esas barreras es la llamada BL (Figura 5) (17).



Figura 5 Biopsia líquida versus biopsia tisular. Fuente: Elaboración propia.

La BL permite determinar el fenotipo tumoral a lo largo del tiempo, es decir, la evolución del tumor que es esencial cuando se administra un tratamiento, ya que permite monitorizar su efectividad, así como las posibles resistencias que pudieran aparecer en el curso del mismo. La detección de estos fenotipos celulares resistentes permite no solo evitar toxicidades innecesarias, sino también ajustar individualmente el tratamiento antes de que la enfermedad progrese. Otra ventaja de la biopsia líquida es que permite determinar la enfermedad mínima residual (EMR). Esto es importante en dos situaciones clínicas: en tratamientos adyuvantes o tras una cirugía con intención o en la detección temprana de recaídas (16).

La biopsia líquida podría suponer un avance para conseguir los objetivos clínicos para evaluar la efectividad de tratamientos, (supervivencia global, o la supervivencia libre de progresión de la enfermedad) o mediante los biomarcadores que sirvan como un sustituto de un *end-point* clínicamente significativo y del cual se espera que prediga el efecto de una intervención terapéutica, por criterios más precoces y manejables tanto en clínica convencional como en los ensayos clínicos (17).

En resumen, estudiar las células tumorales circulantes CTCs, el ctDNA, el ARN, el contenido de los exosomas en la sangre de los pacientes tiene la capacidad potencial para proporcionar información sobre las características de los tumores o las metástasis que se obtienen habitualmente por patólogos (Figura 5). Además de la información sobre mutaciones genómicas y alteraciones del número de copias que se obtiene generalmente de CTCs o ctDNA, la BL se utiliza cada vez más para generar información sobre el transcriptoma, el epigenoma, el proteoma y el metaboloma (17). Lo que posibilita que estos analitos puedan constituirse en plataforma clínica y de investigación para superar las limitaciones de los actuales métodos de diagnóstico y seguimiento del paciente oncológico.

2 JUSTIFICACIÓN

La práctica biosanitaria actual en la disciplina de la oncología debe diagnosticar a un paciente con la mayor exactitud y precisión para adoptar la mejor opción terapéutica individual y en ese momento particular. Además, los diferentes fármacos empleados contra el cáncer tienen un índice terapéutico muy bajo (ratio dosis terapéutica/dosis tóxica), por lo que la precisión tiene que ser muy alta, y, además, debe tener continuidad en el tiempo. Esto supone un reto por la complejidad molecular, celular, tisular y clínica de la enfermedad del cáncer; del cual enfermería debe estar actualizada ya que en un futuro muy cercano será una de nuestras herramientas de trabajo que debemos conocer a la perfección para poder colaborar de la mejor manera en su diagnóstico y tratamiento

La denominada biopsia líquida, conceptualmente, cumple con todos estos requisitos. Por ello podría cambiar de forma radical el enfoque diagnóstico y terapéutico del cáncer, así como la monitorización clínica de esta enfermedad. Pudiendo ofrecer a los pacientes unos cuidados de calidad acordes a cada etapa y estadio que se encuentre la enfermedad

Con este trabajo se pretende concienciar a la enfermería de la importancia que tiene la investigación para el desarrollo de la profesión y los beneficios que aporta identificar su rol en este campo como enfermera profesional.

3 OBJETIVOS

3.1 GENERAL

- Adquirir conocimiento sobre las bases biológicas, técnicas, utilidad y limitaciones, así como las líneas de investigación de la biopsia líquida en oncología.

3.2 ESPECÍFICOS

- Conocer las bases racionales y biológicas de la biopsia líquida.
- Conocer los diferentes elementos sobre los que se pueden realizar las técnicas de biopsia líquida.
- Adquirir una visión sobre posibles aplicaciones clínicas.
- Establecer la utilidad de la biopsia líquida en diferentes tipos de tumores.
- Conocer las estrategias de detección de los ácidos nucleicos circulantes
- Describir los biomarcadores más importantes empleados en CM para BL
- Adquirir los conocimientos necesarios sobre la BL para enfrentarnos a las técnicas que en un futuro serán actividades independientes de enfermería.
- Conocer e interpretar los datos obtenidos en la BL para garantizar un tratamiento lo más efectivo posible.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo, se realizó una revisión bibliográfica (no sistemática) entre los meses de noviembre del 2018 y mayo de 2019, con el objetivo de analizar y contrastar aspectos referentes a las bases biológicas, técnicas, utilidad y limitaciones, así como las líneas de investigación de la biopsia líquida en oncología. Este estudio comprende un análisis de otros estudios que han examinado el uso de la biopsia líquida en lo relativo a sus componentes, aplicaciones, detección y seguimiento de mutaciones y cáncer especialmente en CM. Dado que este estudio utilizó un enfoque de investigación secundario, la localización de artículos relevantes para el objetivo de la investigación era esencial.

Estrategia de búsqueda:

Se realizó una búsqueda manual limitada a artículos en inglés publicados entre 2010 y 2019 en las bases de datos electrónicas: Pubmed, PsycINFO, CINAHL (Índice acumulativo de enfermería y salud afines), Scielo, Google Scholar, Web of Science y Cochrane Library Plus.

Se emplearon las páginas web corporativas de la Sociedad Española de Oncología Médica y la Red Española de Registro de Cáncer.

En las búsquedas se emplearon los operadores lógicos o Booleanos AND y OR para combinar o sumar términos respectivamente. Las palabras se seleccionaron teniendo en cuenta los objetivos que se pretenden conseguir con la realización de este trabajo.

Como palabras clave se utilizaron términos Mesh con diferentes combinaciones: *cancer* (cáncer), *tumor microenvironment* (micromedioambiente tumoral), *breast cancer*

(cáncer de mama), *liquid biopsy* (biopsia líquida), *biomarkers in cancer* (biomarcadores en cáncer), *circulating tumor cells* (células tumorales circulantes), *circulating nucleic acids* (ácidos nucleicos circulantes), *exosomes* (exosomas), *platelets* (plaquetas), *genes* (genes), *HER2* (HER2), *PI3K* (PI3K) y *clinical trial* (ensayo clínico).

Con el objetivo de reducir el número de artículos se aplicaron los siguientes filtros:

- Realizados en humanos
- Estudios publicados en los últimos 10 años para los artículos científicos
- Revisiones

Tras la lectura comprensiva de los artículos de interés, se procedió y a aplicar los siguientes criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

- Documentos relacionados con el cáncer y la biopsia líquida
- Publicaciones en inglés.
- Publicaciones cuyos sujetos de estudio fueran humanos.
- Guías y libros publicados de sociedades médicas oncológicas

Criterios de exclusión:

- Publicaciones no relacionados con biopsia líquida
- Documentos duplicados
- Estudios sobre animales
- Estudios con más de 10 años de antigüedad

En esta revisión el contenido de los artículos empleados se evaluó cuidadosamente por su calidad y adecuación mediante el examen del objetivo, el diseño de la investigación, los resultados y las conclusiones de cada artículo seleccionado.

Durante el proceso de recolección de datos se incluyeron los resultados y los hallazgos de los estudios seleccionados, centrándose en el uso de biopsias líquidas para la detección y el control de tumores en pacientes con cáncer, especialmente el CM. Los puntos de datos clave incluyeron información sobre el tipo y la categoría de la biopsia líquida, los materiales analizados mediante el procedimiento de biopsia líquida y las ventajas y desventajas de la biopsia líquida. Así como los fluidos corporales donde se realizaba. Este proceso incluyó la revisión de los sesgos en el diseño del estudio, los hallazgos, las suposiciones y la manera en que se utilizaron los resultados para determinar las conclusiones. De este modo la calidad de las 44 publicaciones utilizadas en esta revisión giró en torno al papel y la eficacia de la biopsia líquida para detectar y monitorizar con precisión diferentes tipos de células y ácidos nucleicos tumorales en pacientes con cáncer, desarrollando con mayor extensión el CM por su heterogeneidad intrínseca, la especial sensibilidad social a este tipo de tumor y la implicación personal del autor.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 COMPONENTES DE LA BIOPSIA LÍQUIDA

La Biopsia líquida se refiere al análisis de las células circulantes del tumor (CTCs) y ácidos nucleicos circulantes libres de células principalmente ADN tumoral circulante (ADNc), ARN y exosomas. Todos ellos son liberados en la sangre periférica del tumor primario y/o en los depósitos metastásicos. Los componentes de una biopsia líquida proporcionan el paisaje genético y epigenético de todas las lesiones cancerosas y ofrecen la oportunidad de seguir sistemáticamente la evolución genómica tumoral (10).

5.1.1 CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTCS)

Las CTCs son células cancerosas que han sido eliminadas y migran activamente al torrente sanguíneo desde el tumor primario. Pueden dar lugar a metástasis de lesiones primarias o de otros tipos (hipótesis de siembra) en órganos distantes y que son responsables de la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer. La Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) facilita la propagación metastásica y la progresión de las células tumorales desde el tumor primario hasta los tejidos circundantes y los órganos distantes. Los cambios de expresión que tienen lugar en las células durante el proceso de EMT alteran la polaridad de las células epiteliales de manera que adquieren los rasgos morfológicos y bioquímicos de células mesenquimales. Este proceso es esencial para que las células tumorales eludan la apoptosis, anoikis, la senescencia celular y para escapar del sistema inmune. Por todo esto es importante tener en cuenta que las células tumorales modifican su expresión a lo largo del proceso metastásico (18). Un paciente promedio de carcinoma metastásico muestra entre 5-50 CTCs en aproximadamente 7.5 ml de sangre. Un elevado número de CTCs se correlaciona con enfermedad agresiva, aumento de metástasis, y disminución del tiempo de recaída. Los CTCs potencialmente puede contener información valiosa sobre la composición del tumor, capacidad de invasiva, susceptibilidad a los fármacos y resistencia frente a la terapia empleada. Dado que la elevada carga de la CTCs sirve de elemento diagnóstico además podrían emplearse como marcadores a tiempo real para la monitorización de la progresión y/o supervivencia de la enfermedad. Los CTCs también podrían guiar el manejo terapéutico, determinar la eficacia o necesidad de la terapia, incluso en la ausencia de metástasis detectables, y proporcionar información sobre los mecanismos de la resistencia frente a los medicamentos. Los CTCs son algunos de los marcadores más importantes de las metástasis, pero siguen siendo objeto de investigación la detección, cuantificación y aislamiento de estas células (19).

La falta de estandarización técnica y los datos inmaduros sobre sus células y moléculas aún pesan en esta prometedora herramienta. Pero el desarrollo tecnológico de los últimos años ha permitido avanzar mucho en métodos para aislar CTCs de la sangre. Todas las opciones de aislamiento disponibles aíslan células de la fracción hematopoyética de manera inespecífica junto con las CTCs. Es necesario, antes del aislamiento considerar la especificidad y sensibilidad, y los ensayos que se desean realizar en las CTCs como son la cuantificación, caracterización molecular o estudios funcionales. En base a las propiedades físicas o biológicas los métodos de aislamiento empleados son: inmunoaislamiento, uso de anticuerpos específicos que identifican moléculas presentes en la superficie celular de CTCs; propiedades físicas, exclusión por tamaño, densidad,

deformabilidad o punto dieléctrico celular dadas las diferencias morfológicas entre las CTCs y el resto de células sanguíneas (20). Otro método de aislamiento se basa en el enriquecimiento positivo y negativo de la fracción de sangre obtenida. El enriquecimiento positivo, permite una selección positiva de las CTCs, emplea antígenos como EpCAM (Expresada en las células epiteliales) o marcadores organoespecíficos como HER2, EGFR Y CEA. Con respecto al enriquecimiento negativo, la fracción no seleccionada es la que interesa el antígeno más comúnmente usado es CD45 (19).

Una tecnología de inmutofafinidad emergente es el sistema CELLSEARCH® es una plataforma de diagnóstico de referencia para el aislamiento y la detección de CTCs mediante el uso de tecnología inmunomagnética. Proporciona un análisis preciso y reproducible que permite detectar CTCs en una densidad tan baja como una CTCs en 7.5 mL de sangre entera, con una especificidad de >99%. La prueba para CTCs del sistema CELLSEARCH® es una prueba de sangre simple y práctica que ayuda a los oncólogos a evaluar el pronóstico de pacientes con cáncer de mama metastásico, próstata o colorrectal. Siendo el primer y único análisis de sangre clínicamente validado y aprobado por la Food Drug American (FDA) para enumerar las células tumorales circulantes (CTC) que se desprenden de un tumor primario y viajan a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático a otras partes del cuerpo (20). Metodológicamente, este sistema usa sangre total y basa el aislamiento de las CTCs en la expresión de EpCAM positiva empleando beads magnéticas. Posteriormente, realiza una inmunofluorescencia de la fracción enriquecida de CTCs para identificar aquellas que sean positivas para citoqueratinas y negativas para CD45. El propio sistema propone eventos como potenciales CTCs y es el técnico especialista quien debe seleccionar aquellos que cumplan el criterio de CTC+ (que combina expresión de marcadores y morfología, ratio núcleo/citoplasma). El sistema CellSearch actual define una CTC como un evento que tiene un núcleo (DAPI positivo); expresa citoqueratinas (CK8, CK18 y CK19); no expresa CD45 y tiene más de 4x4 µm² de tamaño (21).

Los sistemas de aislamiento descritos por Pantel et al. (22), establecen que es obligatorio que las CTCs mantengan su integridad y sean viables para poder realizar ensayos funcionales. Las técnicas de aislamiento a emplear no deber establecer fase de fijación o produzcan un stress celular. Además, se deben emplear condiciones de esterilidad, si deseamos realizar cultivo in vitro de CTCs. EPithelial Immuno SPOT (EPISPOT), es sistema que permite analizar el secretoma de CTCs aisladas, que ha identificado CTCs viables detectando KRT-19, MUC1, PSA y FGF-2 secretados (23).

En lo que respecta al cultivo *ex vivo* de CTCs no se han obtenido protocolos que garanticen el éxito debido al bajo número de células que se aíslan por muestra, porque no todas ellas se encuentran viables y la escasa vida media celular (2 horas alcanzando un máximo de 24 desde la migración del tumor primario) (21).

El avance metodológico en BL en aislamiento, identificación y análisis de CTCs es continuo. Sin embargo, los CTCs todavía no se utilizan de manera rutinaria en las clínicas, como marcador de pronóstico. Esto se debe al contraste entre resultados sobre la conexión entre los CTCs, el pronóstico establecido y las particulares características del tumor, y lo que es más importante a la difícil la demostración de su utilidad como

marcadores predictivos y adecuados para el diagnóstico complementario. Además, los estudios no siempre han sido fácilmente comparables, lo que no ha permitido resolver los problemas que plantean, como la detección mínima de la enfermedad residual (EMR) (24).

La necesidad clínica de los CTCs en CM precoz (CMP), por las ventajas que ofrece la BL, son una opción posible desde el enfoque molecular y fenotípico que contribuya a una mejor comprensión y gestión clínica de pacientes de CMP, en particular en el campo de la EMR en: la vigilancia, una mejor selección de los fármacos específicos y las resistencias adquiridas al tratamiento (20, 24). Quizá sea la hipótesis de que los CTCs podrían ser explotados en todas las fases de la enfermedad del CM, desde el diagnóstico hasta la manifestación de la resistencia a los medicamentos, a través de la monitorización de la EMR, recaída temprana, eficacia del tratamiento terapéutico, aparición de resistencias y selección de la diana de los fármacos, hacen de los CTCs proporcionados por BL una herramienta traslacional de futuro.

5.1.2 LOS ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTE

Además de las CTCs, otro de los componentes mayoritarios en sangre son los ácidos nucleicos: ADN y ARN. Con frecuencia se designan como ácidos nucleicos libres o fuera de la célula (18).

5.1.2.1 ADN CIRCULANTE(cfDNA)

El cfDNA fue descrito por primera vez hace más de 60 años y en la sangre de los pacientes con cáncer fue reconocido por primera vez en los años 70 cuando se detectaron altos niveles de ADN en el suero de pacientes con cáncer. Sin embargo, no todo el cfDNA que se encuentra en la sangre es de origen tumoral, pudiendo proceder de células sanguíneas o de otros tejidos. La liberación del ADN puede realizarse de forma pasiva o activa, el mecanismo pasivo del ADN es medido por mecanismos de apoptosis o necrosis y con un tamaño del cfADN de 150-200 pb, proporcional al tamaño del ADN de los nucleosomas que aparecen los procesos apoptóticos. El cfADN es eliminado en hígado, riñón y bazo, siendo su vida media aproximada en circulación de 16 minutos (19).

En individuos sanos se origina en su mayor parte a partir de la apoptosis de las células nucleadas de la sangre encontrándose en niveles bajos en el plasma sanguíneo y puede aumentar en algunas condiciones inflamatorias e incluso después del ejercicio y a veces también se observan niveles elevados de cfDNA en las enfermedades benignas de mama (44, 54). En pacientes con tumores malignos poseían mayores niveles de cfDNA que aquellos con tumores benignos y estos niveles están altamente elevados de cfDNA particularmente en estadios de enfermedad avanzada, con un rango de 0-65%, en parte debido a la reducción de la actividad de la DNAasa. Sin embargo, el cfADN tumoral se encuentra en un porcentaje muy bajo (1-0.01%) en relación a todo el cfADN total (19).

El cfDNA tumoral es más heterogéneo porque derivara de una combinación de apoptosis, necrosis y secreción activa de células cancerosas proliferantes, CTCs y la renovación de las células tumorales diseminadas en tejidos celulares con micrometastásis (35, 54). La heterogeneidad de cfDNA junto con la limitación de la biopsia clásica que sólo representa una pequeña región tumoral, permite posicionarse a la BL, a través de la repetición de la toma de muestras de sangre, como método potencial para rastrear los cambios mutacionales en el ctADN tumoral (25).

5.1.2.2 LA RELACIÓN ENTRE LAS CTCs Y EL cfDNA

La cantidad promedio de cfDNA en 1 ml de plasma de pacientes con cáncer en etapa avanzada (17 nano gramos) y la cantidad de ADN contenida por una sola célula humana (6 pico gramos), se requerirían más de 2×10^3 CTCs liberando su contenido genético en ese volumen de plasma. Pero como únicamente sólo se detectan 10 CTCs de media en 7,5 ml de sangre gran parte del cfADN procedente de pacientes con cáncer tiene un origen tumoral que va más allá de las células circulantes, pudiendo proceder de cualquier célula presente en el tumor lo que reafirma su importante papel como representante de la heterogeneidad tumoral. Este hecho junto con su alta concentración en la sangre, sitúan al ADN circulante como un mejor biomarcador del tumor presente en biopsia líquida (19, 25).

En la rutina de la práctica clínica, se determina la presencia de una amplificación mediante el análisis de una biopsia del tumor en el diagnóstico inicial. Sin embargo, las amplificaciones de ctDNA pueden "adquirirse y perderse", a través de la progresión del tumor y del tratamiento (19), lo que representa un desafío para la MP en el desarrollo de las terapias personalizadas contra el cáncer. Por lo tanto, es necesario métodos fiables y precisos para cuantificar la fracción tumoral de ctADN mediante la detección de mutaciones somáticas. Para el CM se observaron niveles elevados y de mayor talla molecular ctADN (57). Lo que demuestra, según las investigaciones de los últimos años que el ctADN es un biomarcador preciso y dinámico para pacientes con CM metastásico y, además, se ha utilizado recientemente como una forma precisa de predecir la recaída en pacientes con CMP (58, 59).

5.1.2.3 EL ARN CIRCULANTE (cfARN)

Aunque menos abundante que el cfADN, también existe ARN en la circulación (cfARN) se puede determinar en el suero de pacientes. Este cfARN puede encontrarse en forma de RNA mensajero (mRNA) o microRNA (miRNA). Por ejemplo, es frecuente encontrar elevados niveles de mRNA de la telomerasa transcriptasa inversa (hTERT) en distintos tipos de tumor como el cáncer de mama o colon. Los miRNA se presentan en una alta concentración en los biofluidos, más que los mRNA, y también son más estables (25).

Antes del análisis de miRNA es necesario emplear métodos de aislamiento, preferiblemente en suero, permiten separarlos de las proteínas a las que van asociadas. La RT-PCR porque tiene una sensibilidad aceptable y necesita una baja concentración de ARN. Otros métodos de análisis que aportan más información sobre los miRNA y que actualmente se emplean en investigación son microarrays de expresión, ARN-secuenciación y nanoString Technologies), que permite la cuantificación directa de miARNs en biofluidos (11).

5.1.2.4 LIBERACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A LA SANGRE

Dependiendo de cómo se liberen, los ácidos nucleicos circulantes se pueden encontrar en diferentes formas incluyendo complejos moleculares o macromoleculares, unidos a proteínas séricas o internalizados en vesículas como exosomas o microvesículas. En términos generales, los ácidos nucleicos circulantes pueden ser liberados pasivamente, por células apoptóticas y necróticas, o liberados activamente por células vivas (26).

La liberación pasiva durante los mecanismos de muerte celular, como la necrosis o la apoptosis, tanto el ADN como el ARN celular pueden ser liberados a la circulación por células muertas o que están muriendo. El proceso de necrosis no es la principal fuente de ADN circulante, aunque puede contribuir a sus niveles puesto que se observan fragmentos de ADN entre 21- 80 kb que coinciden con los fragmentos liberados por la escisión de la cromatina en nucleosomas, por la acción de la dexasirribonucleasa activada por caspasas, las cuales se activan durante la apoptosis (27).

Los ácidos nucleicos circulantes pueden liberarse activamente a través de vesículas secretadas por células vivas, como los exosomas y microvesículas (13).

5.1.3 EXOSOMAS

Los exosomas son vesículas endocíticas, secretadas por varios tipos de células tumorales que contienen ácidos nucleicos ARN (principalmente mRNA y miRNA), e incluso se ha escrito la presencia de ADN de cadena única y bicatenario, proteínas (citoesqueléticas, transmembrana y de choque térmico proteínas), y enzimas (GAPDH, ATPasa, PGK1). El contenido de los exosomas refleja la naturaleza y el estado de las células originales del tumor, además los exosomas son capaces de transferir tanto los ácidos nucleicos y las proteínas específicas a las células receptoras del microambiente tumoral o en sitios distantes específicos. Por lo tanto, algunos tipos de cánceres han usado exosomas como una herramienta para transferir el fenotipo maligno a las células normales y establecer un microambiente local fértil y distante para ayudar al crecimiento y proliferación de las células cancerosas (28). Se han descrito marcadores para la caracterización de exosomas en diferentes tipos de cáncer: EpCAM (colon y ovario), EGFR (cerebro) y HER2 (CM) (11).

Previo a los estudios de los mRNA y miRNA, tras el lisado de los exosomas, por técnicas genómicas, es necesario aislarlos por los procesos de ultracentrifugación que es la técnica convencional. Comercialmente existen kits que permiten una metodología menos compleja basadas en técnicas de ultrafiltración, exclusión cromatográfica, precipitación e inmunoaislamiento. Estos últimos se emplean con volúmenes pequeños de muestra y con el objetivo de aislar poblaciones específicas (13, 28).

La BL mediante el desarrollo de perfiles exosómicos en ausencia de biopsias de tejido podría tener resultados muy prometedores para el diagnóstico precoz de la enfermedad y monitorización de la eficacia de la terapia antitumoral (62). En este sentido los exosomas juegan un papel importante en las diferentes etapas del desarrollo en el CM a través de la transferencia horizontal de información genética entre sus células que incluyen la estimulación del angiogénesis tumoral, la reorganización del estroma para establecer el microambiente tumoral, como así como promover el crecimiento tumoral y la resistencia a los medicamentos (13).

5.1.4 MICROVESÍCULAS

De mayor tamaño que los exosomas (100-1000 nm), la composición de su membrana se asemeja más a la de la célula de la que proceden de tal manera que prácticamente representan el perfil proteómico del tumor. Las microvesículas brotan de la membrana de distintos tipos de células: células hematopoyéticas, células endoteliales, células madre mesenquimales y células cancerosas. En CM los macrófagos asociados a

tumor secretan microvesículas con miRNAs en su interior que estimula la agresividad de las células cancerosas (29).

5.1.5 PLAQUETAS

La posibilidad de utilizar las plaquetas sanguíneas alteradas por un tumor como un biomarcador en BL, es reciente. Las plaquetas están involucradas en la progresión y diseminación de varios tumores sólidos, además, su ARN indicaría la presencia, ubicación y características moleculares tumorales, lo que proporciona información extra al diagnóstico de la enfermedad. En este sentido, las plaquetas de pacientes con cáncer como CM o pulmón son distintas de individuos con enfermedades inflamatorias y otras enfermedades diferentes al cáncer (30).

En cualquiera de los elementos que conforman la gama de componentes tumorales de la sangre permite un análisis molecular que proporciona información distinta y complementaria (11). (Tabla 3.)

Tabla 3. Comparación entre las diferentes aplicaciones. Adaptada de Siravegna G. et al. (11).

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES QUE CONFORMAN LA BIOPSIA LÍQUIDA	CTCs	ARN/ARNtc	Exosomas
Potencial para recapitular la heterogeneidad espacial y temporal del tumor	No	Si	No
Detección de mutaciones somáticas, alteración del número de copias y funciones génicas	Si	Si	Si
Evaluación de patrones de metilación	Si	SI	Si
Análisis de ARNm/miARN/lncRNA/variantes génicas	Si	Si	Si
Estudios de expresión	Si	No	Si
Morfología celular y estudios funcionales ex vivo	Si	No	No
Demostración de co-localización de señal	Si	No	No
Análisis proteómico	Si	No	Si

5.2 APLICACIONES POTENCIALES DE LA BIOPSIA LÍQUIDA

Mediante una extracción de sangre, una técnica no invasiva que además permite repetirla cuantas veces sea necesario, se puede establecer un perfil molecular de que abre la puerta a un número importante de aplicaciones clínicas que son el objetivo de la medicina de precisión. Aunque el reto científico, instrumental, humano y tecnológico es ambicioso con los avances actuales es posible que se consiga en un futuro inmediato. Posteriormente será necesario validar y estandarizar todo el proceso, desde la obtención de la muestra, pasando por su análisis hasta, demostrar su utilidad clínica. Porque surge la pregunta de si los resultados conseguidos en plasma reproducen los obtenidos en tejido. En este sentido el potencial del cfADN permite ir adquiriendo a la biopsia aplicaciones clínicas que van a ser utilizadas en los próximos años (17).

5.3 PERFIL Y DIAGNOSTICO MOLECULAR

El tratamiento del cáncer se basa en el diagnóstico histológico y en el perfil molecular para seleccionar las terapias adecuadas a cada situación clínica. Con una extracción de sangre y el estudio molecular de los productos del tumor, fundamentalmente cfDNA pero también CTCs o exosomas se establecen las características moleculares y evolutivas del tumor, como la heterogeneidad tumoral (19).

5.4 MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA Y ESTABLECER PRECOZMENTE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA

Esto se podría conseguir hasta con una antelación de 10 meses sobre la progresión radiológica, pero sobre todo para poder indicar nuevos tratamientos o retratamientos y además permite monitorizar la evolución clonal y las respuestas a diferentes presiones evolutivas y/o terapéuticas, por ejemplo, del cáncer colorrectal o CM (31).

5.5 ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR)

La detección de EMR representa un problema sin solución. La detección de cfADN podría ser útil, como demostró Tie et al. en pacientes de cáncer de colon y recto estadios III y II donde no existe un método y/o definición estandarizados ni consenso sobre la población en riesgo de enfermedad micrometastásica observaron que el porcentaje de recurrencia era 10 veces más elevado cuando se detectaba ctDNA tras la cirugía (31).

5.6 DETECCIÓN PRECOZ Y CRIBADO

La última promesa que puede ser realidad sobre la utilidad de la biopsia líquida es la detección de enfermedad temprana, mucho antes de que aparezca clínica o radiológicamente. Hasta entonces se debe trabajar para conseguir mejorar la sensibilidad en la detección de ctDNA en pacientes asintomáticos y con tumores en estadios muy tempranos (21).

5.7 IMPACTO DE APLICABILIDAD DE LA BIOPSIA LÍQUIDA EN DISTINTOS TUMORES.

La eficacia de esta herramienta se ha demostrado en distintos tumores incluyendo el de pulmón, colorrectal, próstata, melanoma, mama y cáncer de páncreas, entre otros tumores (32).

El cáncer de pulmón ha evolucionado desde prácticamente una sola enfermedad y un solo tratamiento para todos a ser el paradigma de la moderna oncología, con diferentes

diagnósticos moleculares que condicionan tratamientos dirigidos. Estas estrategias personalizadas necesitan tejido reciente que en esta enfermedad suele ser insuficiente en muchos casos, por lo que las determinaciones moleculares basadas en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o Next Generation Sequencing (NGS) en plasma son una alternativa complementaria. También en el cáncer de pulmón ha irrumpido con fuerza la moderna inmunoterapia basada en anticuerpos contra el receptor o el ligando de PD-L1 con un 20%-30% de respuestas en pacientes no seleccionados, que mejoran cuando se realiza inmunohistoquímica, pero continúa siendo insuficiente como marcador predictivo. En estas circunstancias, las técnicas de biopsia líquida tienen un gran potencial como posibilidad de detectar la expresión de PD-L1 en CTCs o en células blancas sanguíneas, aunque con la limitación del aislamiento de estas CTCs, de la concordancia con tejido y la repercusión clínica de los mismos. En este tumor, se está sugiriendo la carga mutacional tumoral como biomarcador predictivo a la inmunoterapia, siendo posible realizarla en plasma e identificando pacientes que se beneficiarían en segunda línea de atezolizumab (33).

Por su parte, el cáncer colorrectal se caracteriza por poseer un perfil genético muy heterogéneo y variable, que resulta de la adquisición constante de nuevas mutaciones durante todo el desarrollo tumoral. De esta forma, la detección de mutaciones tumorales a través de la biopsia líquida, puede resultar de gran ayuda para el seguimiento de la enfermedad. El análisis genético tumoral no sólo resulta útil para el seguimiento de la enfermedad sino también para determinar la respuesta al tratamiento como es el caso de la terapia anti-EGFR en la que solo los pacientes con el gen KRAS sin mutar responden (34).

En el cáncer de páncreas, la biopsia líquida se presenta como una tecnología muy ventajosa dada la complejidad anatómica del tejido, así como la dificultad para acceder a él. Esta situación conlleva que un escaso número de pacientes con cáncer de páncreas sobreviven más de 5 años, en parte porque la mayoría de los pacientes se identifica su estado tumoral cuando la enfermedad se encuentra en un estadio avanzado (35). En la detección de adenocarcinoma ductal pancreático se han combinado, empleando como fuente de biomarcadores los análisis de sangre para detectar mutaciones en el ctDNA, concretamente en el gen KRAS, con biomarcadores de proteínas que incluye antígeno carcino embrionario (CEA), antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) y antígeno de cáncer 125 (CA125). Se ha determinado que la combinación de estos marcadores era superior a cualquier marcador único empleado. Además, la combinación detectó casi dos tercios de los cánceres pancreáticos que no tenían evidencia de metástasis a distancia en el momento de la resección quirúrgica. Se detectaron mutaciones KRAS en el plasma en el 30% de los pacientes, y cada mutación encontrada en el plasma fue idéntica a la encontrada posteriormente en el tumor primario del paciente, lo que es un 100% de concordancia. El uso de KRAS junto con estos cuatro biomarcadores de proteínas aumentó la sensibilidad al 64%. Solo una de las 182 muestras de plasma de la cohorte de control fue positiva para cualquiera de los biomarcadores de ADN o proteínas (99.5% de especificidad). Este enfoque de empleo conjunto de ctADN y proteínas podría resultar útil para la detección temprana de muchos tipos de cáncer (36).

En el CM resultando esencial el desarrollo de técnicas sensibles que permitan detectar mutaciones y la heterogeneidad intertumoral e intratumoral usando una muestra

de sangre, para entender la biología del CM y proporcionar información molecular para adaptarla a la terapia individualizada a cada paciente (8). Los avances recientes en secuenciación de las células individuales que permiten la caracterización genómica de genes conductores y mutaciones accionables en tumores de mama, junto con el desarrollo de las técnicas mínimamente invasivas capaces de evaluar biomarcadores circulantes a base de sangre y otros fluidos biológicos mediante las biopsias líquidas (BL), permitiendo realizar una caracterización completa del CM (3, 21). De esta manera mediante BL el estudio de los biomarcadores puede ser de gran ayuda en la detección temprana de casos en los que los síntomas no aparecen hasta que el tumor se encuentra en un estado muy avanzado y también en los pacientes con alto riesgo de recaída, estableciendo en ambos casos el tratamiento sistémico adecuado y la posible respuesta a la radio o quimioterapia, especialmente cuando no se dispone de evidencia clínica e instrumental (8). Una BL proporciona el paisaje genético y las características epigenéticas de todas las lesiones cancerosas y ofrece la oportunidad de realizar un seguimiento sistemático de la evolución genómica (10). En la clínica la BL es una herramienta de la MP y proporciona una evaluación en tiempo real del CM tras diagnóstico y en la recaída, a través del análisis de mutaciones genéticas en el ctDNA y CTCs, liberados en la sangre periférica desde el tumor primario y/o depósitos metastásicos. Por tanto, CTCs, ctDNAs y exosomas permiten el cribado y la detección precoz de cáncer, monitorización en tiempo real de la terapia, estratificación e intervención terapéutica, diana terapéutica y resistencia mecanismo, riesgo de recaída metastásica (pronóstico) y mejoría de administración de drogas con exosomas (19, 21, 37)



- ✓ Cribado y detección precoz de cáncer
- ✓ Método complementario para la enfermedad mínima residual
- ✓ Elevada sensibilidad
- ✓ Pronóstico de riesgo de recaída metastásica
- ✓ Ayuda para fijar los objetivos terapéuticos
- ✓ Monitorización de la terapia

Figura 6. Medicina de precisión. Fuente: Elaboración propia.

5.8 BIOMARCADORES(BM) PREDICTIVOS Y PRONÓSTICO PARA CÁNCER DE MAMA IDENTIFICADOS MEDIANTE BIOPSIA LÍQUIDA

Tras realizar el diagnóstico a pacientes de CM se deben cumplir dos objetivos clínicos fundamentales como es identificar quién debe o no debe recibir tratamiento adyuvante, especialmente de quimioterapia y cuál es la terapia o combinación de terapias más adecuada para un paciente determinado. La manera tradicional de realizarlo es con una combinación de los métodos clínicos y técnicas patológicas de rutina (64). La MP pretende usar la herramienta de la BL, con la detección en plasma de ctDNA, para cumplir estos objetivos clínicos. Entonces es necesario comprender los biomarcadores pronósticos y biomarcadores predictivos respectivamente (31). Los biomarcadores pronósticos son los que predicen el riesgo de recurrencia de la enfermedad y los biomarcadores predictivos ayudan a identificar por adelantado a los pacientes que probablemente responderán o serán resistentes a terapias específicas (17).

El CM ha sido pionero en el uso del biomarcador HER2 que se sobreexpresa en 10 a 25% de los CM humanos y se asocia con enfermedad metastásica agresiva con un mal pronóstico (46). La sobreexpresión de HER2 impulsa el crecimiento del tumor mediante la activación de las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT, lo que a su vez estimula la proliferación celular, la invasión y la metástasis. Otro mecanismo por el cual la sobreexpresión del HER2 puede promover la progresión del tumor es la deformación de las membranas celulares (38, 39).

La medición HER2 se propuso originalmente como un biomarcador pronóstico y es ahora obligatoria en todos los casos nuevos de CM invasivo y en las lesiones recurrentes o metastásicas. Además, los tratamientos dirigidos frente a HER2 han transformado el resultado de los cánceres con HER2 amplificado (56). En este sentido las amplificaciones pueden "adquirirse" y "perderse", a través de la progresión del tumor y el tratamiento, representando un desafío sustancial para el concepto de terapia personalizada contra el CM, porque es necesario conocer el estado de heterogeneidad de la enfermedad en cada momento. Por tanto, la detección del biomarcador del gen HER2 responde a todas las necesidades de los pacientes (31). En la MP supone que detectar las amplificaciones de HER2 se conviertan en parte de la práctica rutinaria, lo que requerirá la extracción continua de ADN, para determinar el perfil genético de ese momento del CM. En la práctica clínica actual, la biopsia generalmente toma muestras de una sola área del tumor, requiriendo biopsias repetidas con todos sus riesgos asociados. Pudiendo ser técnicamente difícil dependiendo del lugar o lugares de la recaída del cáncer (57). Idealmente, para superar estas limitaciones y para permitir la repetición del muestreo, la presencia de amplificación de HER2 puede ser diagnosticada de forma no invasiva mediante BL. Lo que pone de relieve la utilidad potencial de un sistema preciso y sensible basado en la detección de ctADN, como son los ensayos ddPCR, para cuantificación precisa del número de copias del gen HER2 en el ADN extraído de la sangre (58). Recientemente varios estudios han demostrado que la introducción de ddPCR para determinar el estado del gen HER2 en el cáncer de mama es factible para su uso en la práctica clínica y podría complementar o incluso reemplazar los métodos convencionales de examen en el futuro (21, 39, 40).

La sobreexpresión del gen HER2 parece ser un prerrequisito para la respuesta a la terapia anti-HER2 pero la mayoría de los pacientes con HER2 positivo no responden al trastuzumab, al menos en el contexto metastásico y aproximadamente el 30% de los pacientes con HER2 positivo desarrollan resistencia al trastuzumab después de 11 años de seguimiento. Lo que implica que se necesiten biomarcadores adicionales para predecir con mayor precisión la respuesta al trastuzumab, así como a otras terapias contra el HER2 (41).

El PIK3CA es uno de los genes más comúnmente mutados en todos los subtipos de la enfermedad y conduce a un mayor crecimiento y proliferación y puede ser activada por ligandos como el Factor de Crecimiento de la Insulina 1 (IGFR1) y también por la activación de mutaciones en el receptor PIK3CA. Está demostrada la concordancia de las mutaciones del PIK3CA en muestras tumorales y plasmáticas en CM que se han encontrado elevadas (42).

El uso de BL en la detección de mutaciones del PIK3CA ha demostrado una sensibilidad del 85-90% y una especificidad del 98% en pacientes con cáncer de mama metastásico con tumores positivos a la mutación del PIK3CA (42). Takeshita et al.(43) han demostrado que las mutaciones H1047R, E545K y E542K PIK3CA de ctDNA en el CM triple negativo en estadio temprano tuvieron un valor pronóstico significativo (negativo) sobre la supervivencia. Además, los pacientes con un nivel más alto de mutante PIK3CA, detectado por ctDNA en plasma en CM mostraron un peor pronóstico.

En resumen, la identificación de las alteraciones genómicas del PIK3CA en el plasma proporcionarán una predicción de la respuesta clínica, como ocurrió en el ensayo BELLE-2 que examinó la adición de buparlisib (inhibidor de PI3K) a fulvestrant, donde la detección de mutaciones de PIK3CA en el plasma conducen a una mejora estadísticamente significativa en supervivencia libre de progresión (7,0 vs. 3,2 meses), lo que sugiere que una biopsia líquida para el estado de PIK3CA podría ser un biomarcador de respuesta a tratamiento (44).

5.9 FUTURO PAPEL DE LA ENFERMERÍA EN BL

Si tenemos en cuenta todo lo destacado anteriormente a través de la investigación podemos demostrar la evolución en la práctica asistencial, fomentar la autonomía profesional y el papel independiente de enfermería. Consiguiendo que se haga patente en los equipos interdisciplinarios y que los usuarios y la sociedad lo perciban. Llegados a este punto cabe destacar la importancia que tiene la continua actualización de conocimientos en la enfermería, para con ello conseguir:

- ✓ Un mayor empoderamiento de la profesión enfermera.
- ✓ Garantizar una adecuada gestión e interpretación tanto de la muestra como de los resultados, permitiendo defender unos estándares mínimos de calidad.

6 CONCLUSIONES

- La oncología de precisión debe ofrecer herramientas que permitan conocer las características fundamentales y diferenciales del cáncer, la continua activación de las señales de proliferación, especialmente la relacionada con los factores de crecimiento.
- La biopsia líquida (BL) que permite potencialmente el diagnóstico y cribado de tumores por vía no invasiva.
- El término biopsia líquida estudia las células tumorales circulantes (CTCs) en la sangre de los pacientes, el DNA circulante tumoral (ctDNA), el ARN, el contenido de los exosomas y la información tumoral que tienen las plaquetas que se asocian a los tumores.
- La BL puede realizarse tanto de la sangre como de otros fluidos corporales: orina, saliva, líquido cefalorraquídeo (LCR) o derrame pleural.
- La BL permite superar las limitaciones de la biopsia de tejido ofreciendo posibilidades de identificación del tumor reflejando a tiempo real la heterogeneidad tumoral.
- La BL permite el cribado y la detección precoz del cáncer, la monitorización en tiempo real de la terapia, la estratificación y la intervención terapéutica, la diana terapéutica y el mecanismo de resistencia, el riesgo de recaída metastásica.
- La BL ha demostrado ser eficaz para su aplicación en distintos tipos de tumores incluyendo el de pulmón, colorectal, próstata, melanoma, mama y cáncer de páncreas.
- El estudio de los genes HER2 y PIK3CA HER2 en el CM es factible para su uso en la práctica clínica y podría complementar o incluso reemplazar los métodos convencionales.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the tumor microenvironment in breast cancer. *Pathobiology*. 2015;82(3-4):142-52.
3. Esparza-López J, Escobar-Arriaga E, Soto-Germes S, Ibarra-Sánchez MdJ. Breast Cancer Intra-Tumor Heterogeneity: One Tumor, Different Entities. *Revista de investigacion clinica*. 2017;69(2):66-76.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
5. Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2018. Disponible: <https://seom.org/es/noticias/106525-las-cifras-del-cancer-en-espana-2018>. [Consultada el 10 de marzo de 2019].
6. Rede Española de Registros de Cáncer (RREdRd). Registros de Cáncer 2018. Disponible en: <http://redecanc.org/es/index.cfm>. [Consultada el 13 de marzo de 2019].
7. American Cancer Society. Cancer Treatment and Survivorship Facts & Figures 2014-2015. Disponible: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/cancer-treatment-and-survivorship-facts-and-figures/cancer-treatment-and-survivorship-facts-and-figures-2014-2015.pdf>. [Consultada el 23 de marzo de 2019].
8. Wang J, Chang S, Li G, Sun Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Frontiers of medicine*. 2017;11(4):522-7.
9. Jameson JL, Longo DL. Precision medicine—personalized, problematic, and promising. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2015;70(10):612-4.
10. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(9):398-406.
11. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017;14(9):531.
12. Tan GH, Nason G, Ajib K, Woon DTS, Herrera-Caceres J, Alhunaiddi O, et al. Smarter screening for prostate cancer. *World Journal of Urology*. 2019:1-9.
13. Gahan P, Stroun M. The biology of circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS). *Extracellular nucleic acids: Springer*; 2010. p. 167-89.
14. Porto-Mascarenhas EC, Assad DX, Chardin H, Gozal D, Canto GDL, Acevedo AC, et al. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2017;110:62-73.
15. Wang X, Kaczor-Urbanowicz KE, Wong DT. Salivary biomarkers in cancer detection. *Medical Oncology*. 2017;34(1):7.
16. Buyse M, Sargent DJ, Grothey A, Matheson A, De Gramont A. Biomarkers and surrogate end points—the challenge of statistical validation. *Nature reviews Clinical oncology*. 2010;7(6):309.

17. Heitzer E, Haque IS, Roberts CE, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature Reviews Genetics*. 2018;1.
18. Gold B, Cankovic M, Furtado LV, Meier F, Gocke CD. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility?: a report of the association for molecular pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2015;17(3):209-24.
19. Maltoni R, Casadio V, Ravaioli S, Foca F, Tumedei MM, Salvi S, et al. Cell-free DNA detected by "liquid biopsy" as a potential prognostic biomarker in early breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(10):16642.
20. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clinical chemistry*. 2013;59(1):110-8.
21. Rossi G, Mu Z, Rademaker AW, Austin LK, Strickland KS, Costa RLB, et al. Cell-free DNA and circulating tumor cells: comprehensive liquid biopsy analysis in advanced breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(3):560-8.
22. Pantel K, Alix-Panabieres C. Functional studies on viable circulating tumor cells. *Clinical chemistry*. 2016;62(2):328-34.
23. Alix-Panabières C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Minimal Residual Disease and Circulating Tumor Cells in Breast Cancer*: Springer; 2012. p. 69-76.
24. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO molecular medicine*. 2015;7(1):1-11.
25. Openshaw MR, Page K, Fernandez-Garcia D, Guttery D, Shaw JA. The role of ctDNA detection and the potential of the liquid biopsy for breast cancer monitoring. *Expert review of molecular diagnostics*. 2016;16(7):751-5.
26. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14(9):623.
27. Murtaza M, Dawson S-J, Pogrebniak K, Rueda OM, Provenzano E, Grant J, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nature communications*. 2015;6:8760.
28. Jia Y, Chen Y, Wang Q, Jayasinghe U, Luo X, Wei Q, et al. Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(25):41717.
29. Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends in molecular medicine*. 2014;20(7):385-93.
30. Joosse SA, Pantel K. Tumor-educated platelets as liquid biopsy in cancer patients. *Cancer cell*. 2015;28(5):552-4.
31. Bardelli A, Pantel K. Liquid biopsies, what we do not know (yet). *Cancer cell*. 2017;31(2):172-9.
32. Arneth B. Update on the types and usage of liquid biopsies in the clinical setting: a systematic review. *BMC cancer*. 2018;18(1):527.
33. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, Schleifman E, Zou W, Li Y, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nature medicine*. 2018;24(9):1441.

34. Boutin AT, Liao W-T, Wang M, Hwang SS, Karpinets TV, Cheung H, et al. Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. *Genes & development*. 2017.
35. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer discovery*. 2016;6(5):479-91.
36. Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, et al. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(38):10202-7.
37. Berghuis A, Koffijberg H, Prakash J, Terstappen L, IJzerman M. Detecting blood-based biomarkers in metastatic breast cancer: a systematic review of their current status and clinical utility. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(2):363.
38. Oshiro C, Kagara N, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N, et al. PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 2015;150(2):299-307.
39. Otsuji K, Sasaki T, Tanaka A, Kunita A, Ikemura M, Matsusaka K, et al. Use of droplet digital PCR for quantitative and automatic analysis of the HER2 status in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*. 2017;162(1):11-8.
40. Tantiwettrueangdet A, Panvichian R, Wongwaisayawan S, Sueangoen N, Lertsithichai P. Droplet digital PCR using HER2/EIF2C1 ratio for detection of HER2 amplification in breast cancer tissues. *Medical Oncology*. 2018;35(12):149.
41. Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ, editors. *Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: past, present and future*. Seminars in cancer biology; 2017: Elsevier.
42. Board RE, Wardley AM, Dixon JM, Armstrong AC, Howell S, Renshaw L, et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2010;120(2):461-7.
43. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, et al. Prognostic role of PIK 3 CA mutations of cell-free DNA in early-stage triple negative breast cancer. *Cancer science*. 2015;106(11):1582-9.
44. Baselga J, Im S-A, Iwata H, Clemons M, Ito Y, Awada A, et al. Abstract S6-01: PIK3CA status in circulating tumor DNA (ctDNA) predicts efficacy of buparlisib (BUP) plus fulvestrant (FULV) in postmenopausal women with endocrine-resistant HR+/HER2-advanced breast cancer (BC): first results from the randomized, phase III BELLE-2 trial. *AACR*; 2016.

8 ANEXOS

ANEXO I: Bases de datos utilizadas y palabras clave empleadas para cada una de las búsquedas. Fuente: Elaboración propia.

TÉRMINO DE BÚSQUEDA	Nº DE ARTÍCULOS TRAS APLICAR FILTROS	Nº DE ARTÍCULOS TRAS LEER TÍTULO	Nº DE ARTÍCULOS TRAS LEER EL ABSTRACT	Nº DE ARTÍCULOS ESCOGIDOS
Quality of life AND strength	87	13	9	6
Quality of life AND aerobic capacity	69	9	6	2
Quality of life AND coordination	99	6	2	1
Quality of life AND coordination AND physiotherapy	17	7	5	2
Quality of life AND flexibility	64	3	3	1
Quality of life questionnaires AND physical therapy AND physiotherapy	81	7	3	3
Quality of life questionnaires AND strength	74	7	6	5
Quality of life questionnaires AND coordination	11	2	1	1
Calidad de vida AND fisioterapia	1	1	1	0
Quality of life AND questionnaire	18	2	2	1
Quality of life AND physiotherapy	6	6	0	0
Calidad de vida AND salud AND CVRS	161	20	7	5

ANEXO II: Artículos encontrados en las diferentes bases de datos. Fuente: Elaboración propia.

Nº de búsqueda	Base de datos	Término de búsqueda
1	PubMed	Quality of life AND strength
2	PubMed	Quality of life AND aerobic capacity
3	PubMed	Quality of life AND coordination
4	PubMed	Quality of life AND coordination AND physiotherapy
5	PubMed	Quality of life AND flexibility
6	PubMed	Quality of life questionnaires AND physical therapy AND physiotherapy
7	PubMed	Quality of life questionnaires AND strength
8	PubMed	Quality of life questionnaires AND coordination
9	Cochrane library plus	Calidad de vida AND fisioterapia
10	Cochrane library plus	Quality of life AND questionnaire
11	Cochrane library plus	Quality of life AND physiotherapy
12	SciELO	Calidad de vida AND salud AND CVRS