

## Biopsia líquida un nuevo horizonte en el manejo de los Linfomas

### Liquid Biopsy, a New Horizon for Lymphoma Management

Daniel Ricardo Martínez Avila<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3987-1191>

Brenda Benítez Caballero<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3519-6512>

Elías Antonio Gracias Medina<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9389-9291>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR). La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [dmtnez@infomed.sld.cu](mailto:dmtnez@infomed.sld.cu)

#### RESUMEN

En linfomas, la biopsia líquida es una prueba no invasiva que juega un papel importante en la complementación del diagnóstico, como la evaluación de la eficacia, el pronóstico y en la monitorización de la recurrencia temprana y la resistencia a drogas. En la era de la medicina de precisión, la información genética es muy importante para dirigir las opciones terapéuticas. El método estándar para evaluar la respuesta al tratamiento en pacientes con linfomas, es la tomografía por emisión de positrones, pero en algunos casos es insuficiente. Los avances en la tecnología de detección, las investigaciones y la aplicación de la biopsia líquida en hemopatías malignas, ha atraído la atención de los investigadores. El objetivo es realizar una revisión del estado actual de la biopsia líquida en linfomas y sus principales indicaciones.

**Palabras clave:** biopsia líquida; ADN tumoral circulante; linfoma.

#### ABSTRACT

Concerning lymphomas, liquid biopsy is a non-invasive test that plays an important role in complementing the diagnosis, such as in assessing efficacy, prognosis, and for monitoring

early recurrence and drug resistance. In the era of precision medicine, genetic information is very important for directing therapeutic options. The standard method for assessing response to treatment in patients with lymphomas is positron-emission tomography, but it is, in some cases, insufficient. Advances in detection technology, research, and the application of liquid biopsy in malignant hemopathies have attracted the attention of researchers. The objective is to review the current status about liquid biopsy in lymphomas and its main indications.

**Keywords:** liquid biopsy; circulating tumor DNA; lymphoma.

Recibido: 04/10/19

Aceptado: 14/10/19

## **Introducción**

Una "biopsia líquida" es un biomarcador que puede aislarse de fluidos corporales como sangre, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, ascitis o derrame pleural, la biopsia líquida debe ser representativa del tejido que se ha originado. Tiene ventajas sobre la biopsia de tejido porque permite la detección temprana de la enfermedad, la evaluación de la heterogeneidad tumoral y el estudio de su dinámica, monitoriza la respuesta al tratamiento, además, de la evaluación de las metástasis en tiempo real.<sup>(1)</sup>

Los fragmentos libres de ADN (flADN) se vierten en el torrente sanguíneo a una baja concentración en el plasma como fragmentos de ADN bicatenarios que son predominantemente cortos (< 200 pares de bases), estos derivan de las células que sufren apoptosis.<sup>(2)</sup>

La cantidad total de flADN en pacientes con linfoma es siempre mayor que en sujetos sanos de la misma edad y sexo, con una concentración media de 30ng/ml de plasma.<sup>(3,4)</sup> Los niveles de ADN tumoral circulante (ctDNA por sus siglas en inglés) varían según los diferentes subtipos de linfomas, siendo mayor en los agresivos que en linfomas indolentes. Además, del tipo de linfoma, el volumen tumoral también, afecta los niveles de ctDNA, que son más altos en la enfermedad en estadio avanzado que en enfermedades limitadas.<sup>(2)</sup> En

individuos sin neoplasias malignas, el ctDNA en el plasma, deriva principalmente de la apoptosis de las células hematopoyéticas normales. El ctDNA puede aumentar sus niveles en condiciones para-fisiológicas como traumatismos, quemaduras o ejercicio intenso. En sujetos sanos, los rangos de concentración del ctDNA son entre 1 y 10 ng/ml.<sup>(5)</sup>

Para aislar el ctDNA, se deben tener algunas precauciones técnicas importantes para evitar la lisis de los glóbulos blancos que pueden contaminar el ctDNA con ADN genómico (ADNg). Si se usan tubos colectores estándares que contienen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante, se recomienda la extracción de plasma dentro de las 3 horas de la recolección de la sangre periférica.<sup>(6)</sup> Los tubos BCT Streck, pueden estabilizar cfDNA y pueden prevenir la contaminación por ADNg de glóbulos blanco por hasta 14 días a una temperatura entre 6 y 37 °C.<sup>(7)</sup> Después de la recolección, se separa el plasma de la sangre corpuscular por centrifugación de la muestra a 800 rpm a 4 °C durante 10 min. Una segunda centrifugación a 13,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos permite sedimentar y eliminar las células restantes del plasma. Las muestras se almacenan en alícuotas de 1 ml a -80 °C hasta la extracción de ctDNA. Después de la extracción, el flADN generalmente se cuantifica mediante una fluorometría. Aproximadamente 30-40 ng de flADN son necesarios para el posterior análisis molecular.<sup>(8)</sup> El objetivo es realizar una revisión del estado actual de la biopsia líquida en linfomas y sus principales indicaciones.

## **Análisis del perfil personalizado por secuenciación profunda (CAPP-Seq por sus siglas en ingles) para definir el genotipo de linfoma en flADN**

Las neoplasias linfoides albergan un marcador molecular único que es el reordenamiento genético de inmunoglobulina (Ig), la identificación de este biomarcador en el flADN puede usarse para rastrear la enfermedad residual mínima (MRD por sus siglas en inglés) durante el curso del tratamiento. Una vez, que el reordenamiento del gen Ig ha sido identificado en la biopsia del ganglio linfático, es posible evaluar la cantidad de este reordenamiento en el flADN usando secuenciación masiva (next generation sequencing [NGS] por sus siglas en inglés) o métodos basados en la reacción en cadena de polimerasa. Los estudios han

demostrado que la proporción de flADN que lleva el reordenamiento de Ig específico de linfoma, disminuye rápidamente en pacientes que responden a la terapia y, tiende a permanecer negativo en aquellos que mantienen la respuesta; por el contrario, la reordenación de Ig sigue siendo alta en pacientes que no responden al tratamiento. Estos pacientes experimentan una peor supervivencia libre de progresión y una peor supervivencia global en comparación con pacientes con reordenamiento indetectable del gen Ig.<sup>(9,10)</sup> Este método es muy eficaz en el monitoreo de MRD pero tiene algunas dificultades. A pesar, de su valor como herramienta pronóstica, utilizándose el reordenamiento del gen de Ig para cuantificar ctDNA en Linfomas Difusos de Células Grandes B (LDCGB), ésta tiene sensibilidad limitada en entornos de baja carga tumoral y aplicabilidad reducida debido a procesos de hiper-mutación somática, que conduce a dificultades para identificar secuencias clonotípicas.<sup>(4,11)</sup>

### **Diagnóstico de linfoma por ctDNA**

El ctDNA no puede sustituir el diagnóstico del linfoma por la biopsia de tejido. Solo en un escenario único, poco frecuente y especial, es el linfoma primario del sistema nervioso central (PCNSL por sus siglas en inglés) donde las lesiones cerebrales sean quirúrgicamente inaccesibles, podría algún día utilizarse el diagnóstico por ctDNA.<sup>(11)</sup>

La mutación MYD88 L265P se encuentra hasta el 85 % de las biopsias de tejido del PCNSL y nunca se detecta en tumores no hematológicos del sistema nervioso central (SNC), lo que sugiere que la mutación es bastante sensible y altamente específica como marcador para PCSNL.<sup>(12,13)</sup>

Los ensayos de reacción de la cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para detectar la mutación MYD88 L265P pueden producir altas tasas de falsos positivos. La mutación de MYD88 L265P puede ocurrir en condiciones premalignas como las gammapatías monoclonales de significado incierto y la linfocitosis monoclonal de células B, ambos son relativamente comunes en el adulto mayor y por lo tanto, puede coexistir con una masa cerebral en el mismo paciente.<sup>(14)</sup> Las muestras de plasma de grandes cohortes de pacientes diagnosticados con una masa cerebral deben ser probadas para estandarizar los

ensayos de PCR digital para la mutación de MYD88 L265P y así definir su precisión diagnóstica antes de llevar esta prueba a la práctica clínica de rutina en los PCNSL.<sup>(7)</sup>

## **Biopsia líquida como una herramienta para evaluar la respuesta al tratamiento**

La cuantificación de ctDNA junto con la Tomografía por Emisión de Positrones (PET/CT), mejora la precisión de la evaluación de la enfermedad residual en los estudios intermedios en comparación, cuando solo se utiliza PET/CT en LDCGB y en Linfoma de Hodgkin. De hecho, los pacientes PET/CT intermedio positiva, pero ctDNA negativa en biopsia líquida, tienen altas probabilidades de cura. Estos resultados generan la hipótesis de que ctDNA, puede complementar la evaluación por PET/CT intermedio en LDCGB y Linfoma de Hodgkin. Antes de traducir esta tecnología en el manejo del LDCGB se precisa conocer la sensibilidad acumulativa y especificidad del PET/CT y el monitoreo de ctDNA para anticipar el curso clínico de los pacientes, esto debe definirse con precisión en ensayos Clínicos.<sup>(15,16)</sup>

En Linfoma de Hodgkin, las técnicas de imagen, como el PET/CT después de 2 ciclos de quimioterapia, proporciona una herramienta pronóstica para predecir el resultado del tratamiento. Sin embargo, los resultados intermedios del PET/CT son inconsistentes con el resultado final entre un 20 % y un 30 % de los pacientes.<sup>(17,18)</sup> Esta falta de especificidad y/o sensibilidad puede corregirse, al menos en parte, por el monitoreo de la concentración de ctDNA durante el tratamiento. Un estudio, que analiza prospectivamente el ctDNA durante el tratamiento en una cohorte de 24 pacientes con Linfoma de Hodgkin tratados de manera homogénea, con el protocolo ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina), mostró que el análisis de ctDNA puede complementar el estudio intermedio con PET/CT en la predicción de alcanzar respuesta completa al final del tratamiento.<sup>(19)</sup>

Del mismo modo el análisis de ctDNA por CAPP- Seq se ha estudiado al inicio y durante el curso del tratamiento en un estudio multicéntrico de 217 pacientes con LDCGB tratados con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP). Se han identificados dos umbrales diferentes para predecir de manera óptima el resultado de los pacientes; la respuesta molecular temprana (EMR por sus siglas en inglés) y la respuesta

molecular principal (MMR por sus siglas en inglés). Estos umbrales, incluyen una caída de 2 log en el ctDNA después de un ciclo (EMR) y una caída de 2,5 log después de dos ciclos (MMR), ésto predice la supervivencia libre de eventos después de la terapia de primera línea de tratamiento. Curiosamente, el valor pronóstico de la respuesta molecular mantuvo una asociación independiente con un mayor riesgo de progresión y muerte también en análisis multivariados.<sup>(20)</sup>

#### Reordenamientos del gen IgH en biopsia líquida como biomarcador de respuesta al tratamiento en LDCGB

Dado que el LDCGB es una enfermedad neoplásica clonal, todas las células tumorales comparten la misma secuencia de IgH VDJ, que es formado durante la fase de reordenamiento del gen IgH en la maduración de células B, se ha demostrado que estos reordenamientos se pueden detectar en el tumor y en el plasma de pacientes con LDCGB.<sup>(21)</sup> Varios estudios han evaluado el valor de la detección de reordenamientos genéticos de IgH en plasma como biomarcador de monitorización de enfermedades no invasivas durante o después del tratamiento.<sup>(22,23)</sup> Sin embargo, la tasa de éxito en la predicción de la recaída es variable entre los estudios (entre 33,3 y 88 %), las diferencias no pueden atribuirse al tipo de terapia utilizada, R-CHOP, terapia de antígeno quimérico de células T receptoras (CART por sus siglas en inglés) y trasplante alogénico de células madre (Allo-SCT por sus siglas en inglés). Una explicación aceptable de las discrepancias entre los estudios puede ser que aquellos, con las tasas de sensibilidad más altas (75-88 %) se realizaron en pacientes en los que se habían detectado el reordenamiento en el momento del diagnóstico en el tumor y/o plasma.<sup>(22,23)</sup> Por lo tanto, puede ser relevante analizar la presencia de estas translocaciones en el momento del diagnóstico para identificar qué pacientes se beneficiarían más con este enfoque sobre todo en aquellos pacientes que podrían beneficiarse de intensificación del tratamiento.

En conclusión la biopsia líquida es un método no invasivo que puede ser utilizada en pacientes con diagnóstico de linfoma porque: mejora caracterizar la biología y patogénesis de la enfermedad. Identifica nuevos marcadores pronósticos y predictivos. Permite evaluar de manera dinámica el ctDNA durante el tratamiento y puede predecir la probabilidad de respuesta y la necesidad de intensificar los tratamientos.

## Referencias bibliográficas

1. Díaz, LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Am. Soc. Clin. Oncol.* 2014;32:579.
2. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer a survey. *Biochim Biophys Acta.* 2007;775(1):181-232.
3. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):541-9.
4. Kurtz DM, Green MR, Bratman SV. Noninvasive monitoring of diffuse large B cell lymphoma by immunoglobulin high through put sequencing. *Blood.* 2015;125(24):3679-87.
5. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an *in vivo* nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell.* 2016;164:57-68.
6. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clin Chim Acta.* 2013;424:222-30.
7. Omaha NE. Streck Cell-free DNA BCT: instructions for use. Streck. 2014 [acceso 02/09/2019]. Disponible en: from:<https://www.streck.com/news/2016-09-19-Streckannounces-blood-collection-tube-for-cell-free-plasma-RNA.aspx>.
8. Rossi D, Condoluci A, Spina V, Gaidano G. Methods for measuring ctDNA in lymphomas. *Methods Mol Biol.* 2019;1881:253-65.
9. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, *et al* . Circulating tumor DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol.* 2015;16:541-9.
10. Kurtz DM, Green MR, Bratman SV, Scherer F, Liu CL. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-through put sequencing. *Blood.* 2015;125:3679-87.
11. Rossi D, Spina V, Brusca A, Gaidano G. Liquid biopsy in lymphoma. *Haematologica.* 2019;104:648-52.
12. Hattori K, Sakata Yanagimoto M, Okoshi Y. MYD88 (L265P) mutation is associated with an unfavourable outcome of primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol.* 2017;177(3):492-4.

13. Fukumura K, Kawazu M, Kojima S. Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):865-75.
14. Kalpadakis C, Pangalis GA, Vassilakopoulos TP. Detection of L265P MYD-88 mutation in a series of clonal B-cell lymphocytosis of marginal zone origin (CBL-MZ). *Hematol Oncol.* 2017;35(4):542-7.
15. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC. Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2018;36(28):2845-53.
16. Spina V, Brusca A, Cuccaro A. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2018;131(22):2413-25.
17. Adams HJ, Nievelstein RA, Kwee TC. Prognostic value of interim FDG-PET in Hodgkin lymphoma: systematic review and metaanalysis. *Br J Haematol.* 2015;170:356-66.
18. Gallamini A, Rigacci L, Merli F, Nassi L, Bosi A. The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage Hodgkin's disease. *Hematológica.* 2006;91:475-81.
19. Spina V, Brusca A, Cuccaro A, Martini M, Di Trani M. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2018;131:2413-25.
20. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, Soo J, Craig AFM. Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2018;36:2845-53.
21. Armand P, Oki Y, Neuberg DS, Faham M, Cummings C, Klinger M, *et al.* Detection of circulating tumour DNA in patients with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2013;163: 123-6.
22. Hossain NM, Dahiya S, Le R, Abramian AM, Kong KA, Muffly LS, *et al.* Circulating tumor DNA assessment in patients with diffuse large B-cell lymphoma following CAR T-cell therapy. *Leuk. Lymphoma.* 2018 [acceso 05/03/19]:1-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1474463>
23. Herrera AF, Kim HT, Kong KA, Faham M, Sun H, Sohani AR, *et al.* Next-generation sequencing-based detection of circulating tumour DNA After allogeneic stem cell transplantation for lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2016 [acceso 05/03/19];175:841-50. <https://doi.org/10.1111/bjh.14311>

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

### **Contribuciones de los autores**

*Daniel Ricardo Martínez:* Idea original, revisión bibliográfica, redacción del artículo, aprobación del informe final.

*Brenda Benítez:* Revisión bibliográfica, redacción del artículo, aprobación del informe final.

*Elías Antonio Gracias:* Revisión bibliográfica, redacción del artículo, aprobación del informe final.