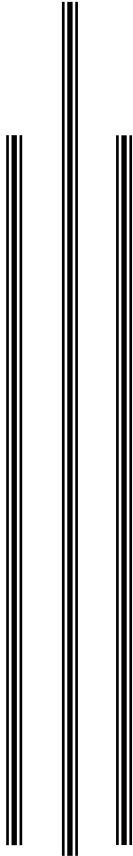




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES  
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO (ISSSTE)  
CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE



IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS  
DE ADN TUMORAL CIRCULANTE Y  
CORRELACIÓN CON EL  
DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE  
MAMA

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN:

ONCOLOGÍA MÉDICA

P R E S E N T A:

DR. EDWIN ALFONSO TEJADA  
VALERIO



ASESORA: DRA AURA ARGENTINA ERAZO VALLE SOLIS  
CO-ASESORA: DRA. REBECA PEREZ CABEZA DE VACA

CIUDAD DE MÉXICO

2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN TUMORAL CIRCULANTE EN PACIENTES CON  
CÁNCER DE MAMA Y SU RESPUESTA AL TRATAMIENTO

FIRMAS DE AUTORIZACIÓN

---

Dr. Mauricio Di Silvio López  
Subdirector de Enseñanza e Investigación  
Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE

---

Dr. Paúl Mondragón Terán  
Coordinador de Investigación  
Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE

---

Dra. Aura A. Erazo Valle Solís  
División de Padecimientos Neoplásicos y Proliferativos  
Asesora de Tesis  
Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE.

---

Dra. Guadalupe Cervantes Sánchez  
Jefa del Servicio de Oncología Médica Adultos  
Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE

---

Dr. Edwin Alfonso Tejada Valerio  
Residente

## **AGRADECIMIENTOS.**

Mi gratitud a Dios y a la vida por la oportunidad de ejercer esta profesión con el mas sincero deseo de servir y ayudar a los demás.

Agradecimiento infinito a mi familia.

Un agradecimiento a todos los pacientes con diagnóstico de Cáncer que nos enseñan el valor de la vida, en especial a las pacientes de Cáncer de mama que participaron en este proyecto

Edwin Alfonso Tejada Valerio

## INDICE

I.	RESUMEN	5
II.	INTRODUCCIÓN	7
III.	ANTECEDENTES	15
IV.	PROBLEMA	21
V.	HIPOTESIS	22
VI.	OBJETIVO	23
VII.	JUSTIFICACION	24
VIII.	MATERIAL Y METODOS	26
IX.	RESULTADOS	32
X.	DISCUSIÓN	42
XI.	CONCLUSIONES	46
XII.	REFERENCIAS	47

## I. RESUMEN.

**INTRODUCCIÓN:** El cáncer de mama es la neoplasia mas frecuente a nivel mundial, comprende un grupo heterogéneo de neoplasias con comportamiento biológico diverso, cuyo diagnóstico representa una carga emocional, económica y social importante para las pacientes y su familia, en los ultimos años se avanza en las estrategias de prevención, tamizaje, diagnóstico y terapias personalizadas con el advenimiento de la medicina de precisión que ha permitido conocer la diversidad molecular de estas patologías

**OBJETIVO:** Cuantificar el ADN circulante tumoral de muestras de pacientes con cáncer de mama, para el análisis de mutaciones en los genes más comunes (BRCA y PI3KCA) y evaluar su función como biomarcador pronóstico durante seis meses.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se trata de un estudio analítico, experimental, longitudinal, concurrente, unicéntrico que se realizó en el servicio de Oncología Médica adultos en pacientes con diagnóstico positivo a cáncer de mama que pertenezcan al CMN “20 de Noviembre”. Se emplearon dos tomas de muestras: para la primera consulta y 6 meses después en seguimiento, tomando como valor basal para todos los parámetros la primera toma de muestra.

**RESULTADOS:** Fueron evaluadas 5 pacientes con cáncer de mama loco-regional, de las cuales 100% fueron mujeres, la mediana de edad fue de 60 años. El subtipo histológico más frecuente fue adenocarcinoma ductal infiltrante moderadamente diferenciado con 60%, seguida de adenocarcinoma lobulillar infiltrante con 20%. El inmunofenotipo más frecuente fue Luminal A con 80%, seguida de Luminal B HER 2 positivo. El tratamiento recibido antes de la fecha de toma de la muestra corresponde a cirugía de mama con 100%, y además un 40% quimioterapia adyuvante. El promedio de concentración ctADN inicial (ng/μL) en suero fue de 680.5 ng/μL y a los 6 meses posterior al tratamiento dicha concentración fue de 56.58 ng/μL con una reducción del valor inicial de 83.5%

**CONCLUSIONES:** Los resultados de este estudio prospectivo y exploratorio indican que las concentraciones de ctADN extraído de plasma de mujeres con cáncer de mama localmente avanzado se podría utilizar como un biomarcador predictivo de respuesta a la quimioterapia

adyuvante, así como marcador pronóstico, lo que debe ser confirmado por estudios de validación futuros con un mayor número de muestras y evaluar la utilidad de este nuevo enfoque como una rutina en el entorno clínico.

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama comprende una serie de patologías de origen neoplásico que afectan la mama, desde neoplasias de origen epitelial que son las más frecuentes, hasta neoplasias de origen mesenquimatoso con menor frecuencia y de comportamiento más agresivo. El cáncer de mama representa la neoplasia más frecuente a nivel mundial, reportándose en las estimaciones de globocan más de 2 millones de casos representando 11.7% de todas las neoplasias (1), además se reporta que se registraron más de 600 mil muertes por dicho diagnóstico en 2020 representando el 6.9% de todas las muertes atribuidas al cáncer. (1)

La epidemiología en México según las estimaciones de globocan 2020 reporta un total de 29 mil casos representando el 15.3% de todas las neoplasias en este país ocupando el primer lugar; la población mexicana en base a estos datos tiene un riesgo acumulado de 4.33, con una tasa de incidencia de 40.5 por cada 100,000 habitantes y una mortalidad de 10.8 por cada 100 mil habitantes. (1). En México, el cáncer de mama ha tenido un incremento constante, tanto en su incidencia, como en su mortalidad, en las últimas tres décadas. De acuerdo con el informe del Departamento de Epidemiología de la Secretaría de Salud, la incidencia se incrementó entre 2000 y 2013, llegando de 10.76 casos por 100,000 habitantes, a 26.1 por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años, estimando 23,873 nuevos casos en 2013.4 Es evidente el incremento, pero obviamente debió existir un sub-registro que explique una diferencia tan sustancial. En ello han influido factores como el envejecimiento poblacional, la “occidentalización” del estilo de vida, la educación e información deficientes relativas a la enfermedad, la carencia de un programa nacional de detección oportuna, la dilación en la atención en las instituciones públicas, así como la insuficiencia de recursos humanos, materiales y técnicos para el tratamiento, conjuntamente con la carencia de unidades mamarias especializadas. (2)

A pesar de los programas de detección temprana para el cáncer de mama, este se sigue diagnosticando en etapas avanzadas, siendo el 42.1% de los casos diagnosticados en



estadios III y IV. La incidencia de recurrencias locales o a distancia es de un 10 a 85% y la mediana de supervivencia de las pacientes con enfermedad metastásicas es de alrededor de 24 meses dependiendo de la etapa clínica inicial, el subtipo molecular de cáncer de mama y el tratamiento recibido. Por lo anterior se hace evidente la necesidad de mejorar el diagnóstico y continuar con la búsqueda de marcadores pronósticos y otros biomarcadores.

(3)

Por definición, un factor pronóstico es capaz de proporcionar información sobre el resultado clínico en el momento del diagnóstico o en diversos momentos durante el curso del paciente con enfermedad metastásica, independientemente de la terapia. Dichos marcadores suelen ser indicadores de crecimiento, invasión y potencial metastásico. En contraste, un factor predictivo es capaz de proporcionar información sobre la probabilidad de respuesta a una modalidad terapéutica dada (4)

En los últimos 5 años los avances en investigación en Cáncer de mama han proporcionado nuevas herramientas pronósticas y predictivas en este tipo de neoplasia, así como el gran avance del conocimiento molecular, estrategias de tratamiento, un enfoque de medicina personalizada. Actualmente las herramientas de detección de material genético circulante de células malignas se han evaluado para diferentes estrategias, como detección temprana, identificación de recurrencias, evaluar respuesta al tratamiento, identificar mecanismos de resistencia a los tratamientos, entre otras.

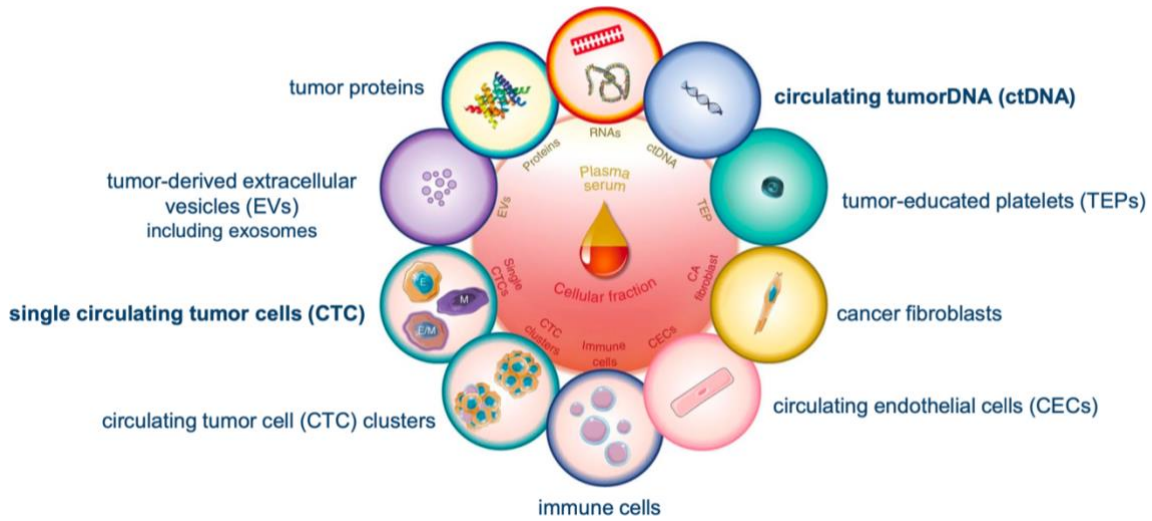


Imagen 1: Tomada de Oncologypro European society of Medical Oncology 2021

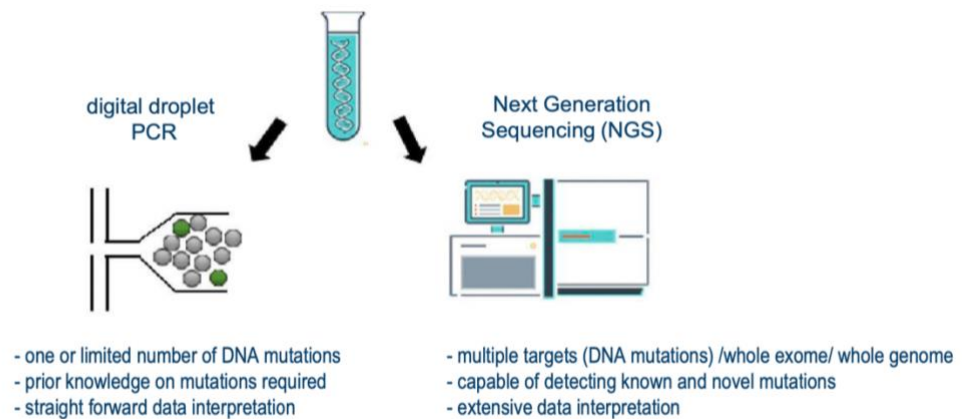


Imagen 2: Tomada de Oncologypro European society of Medical Oncology 2021

Dentro del campo de la oncología, la biopsia líquida se puede utilizar potencialmente para controlar la carga tumoral en la sangre y detectar tempranamente la resistencia emergente en el curso de las terapias dirigidas contra el cáncer.

Aun existe una inseguridad importante asociada con los métodos de análisis de ADN basados en sangre que debe ser resuelta antes de que la biopsia líquida pueda implementarse para una aplicación de rutina más amplia en el diagnóstico de cáncer. Sin embargo, el análisis biológico molecular de ácidos nucleicos en sangre u otros fluidos corporales (es decir, análisis

de biopsia líquida) puede complementar el arsenal de diagnóstico de los patólogos de una manera razonable, particularmente en la medicina de precisión del cáncer y sobretodo representar un método no invasivo, preventivo, aun cuando no se ha manifestado clínicamente la enfermedad.

Comúnmente el diagnóstico de cáncer se realiza mediante el uso de cortes histológicos teñidos con eosina-hematoxilina los cuales son analizados ópticamente por médicos patólogos, quienes basados en su experiencia determinan los parámetros relacionados con el tamaño, invasividad y tipo de tejido tumoral.

En métodos más detallados y específicos, como lo son la detección de las mutaciones para individualizar el estatus de un tumor incluyen la inmunohistoquímica y patología molecular, que generalmente se entiende el análisis de ácidos nucleicos a partir de tejidos, células o fluidos. Las pruebas moleculares son, por lo tanto, una parte fundamental en la mayoría de los pacientes con tumores sólidos y hematológicos.

Como consecuencia, la mayoría de los hospitales con una práctica activa de oncología requieren acceso a laboratorios que proporcionan la información necesaria sobre la composición genética del material de biopsia del tumor. Es probable que esta tendencia se fortalezca con nuevos medicamentos que estén disponibles y aquellos en el mercado que comienzan a utilizarse en combinación o de manera secuencial para superar mecanismos de resistencia (5)

Recientemente el ctADN ha demostrado que tiene potencial como un sustrato no invasivo para la detección y el seguimiento de las células tumorales y de estas mutaciones, sin la necesidad de emplear la biopsia del tejido y empleando una biopsia líquida de la sangre periférica del paciente

Como el ADN es circulante y de origen tumoral puede presentarse con baja frecuencia, a menudo es necesario utilizar herramientas que estén dirigidas al monitoreo fino de estas

moléculas, tal es el caso de la secuenciación masiva (NGS), una herramienta óptima para la detección de mutaciones en este tipo de ADN (6)

La extracción de ADN requiere de grandes volúmenes de plasma (1-10 ml), debido a la baja concentración de ctADN (10-1.000 copias / ml) en la sangre. La capacidad de concentración y análisis del ctADN con tecnologías tales como NGS permite a los investigadores obtener más información con mayor rapidez que con los métodos establecidos. La accesibilidad de las muestras de sangre sugiere que la extracción y análisis del ctADN podrían ser en beneficio relevante en el cáncer, la investigación para la detección temprana y el seguimiento de las células tumorales con potencial de progresión en el futuro. (6)

En el año 2020 se publicaron los primeros resultados de esta investigación por Destruge I y Rodriguez R. con un total de 5 pacientes con criterios de inclusión establecidos para evaluar la presencia de ADN circulante tumoral previo a recibir tratamiento sistémico (Quimioterapia u Hormonoterapia ), en este reporte de seguimiento de estas 5 pacientes se reportaran los resultados del análisis de ctDNA a los 6 meses posterior a la primera muestra para establecer el valor predictivo de esta intervención

## Métodos de detección de mutaciones en ctADN por PCR-RT y NGS (Imagen 2)

Para la obtención del ADN libre de célula una muestra de sangre periférica es recolectada en tubos Streck y sometida a centrifugación, para separar el plasma de donde será obtenido por medio de un proceso de extracción. Posteriormente, el ADN libre de célula se cuantifica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) cuantitativa y se buscan mutaciones específicas, al igual que hiper o hipometilaciones relacionadas con el tipo de cáncer específico que se sospecha. Estos resultados son empleados en las diferentes etapas de la clínica del paciente (7)

La secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing* [NGS]) es un grupo de tecnologías diseñadas para secuenciar gran cantidad de segmentos de ADN de forma masiva y en paralelo, en menor cantidad de tiempo y a un menor costo por base. Todas las técnicas NGS comparten la capacidad de secuenciar una gran cantidad de fragmentos de ADN de forma paralela en un corto lapso. Para lograr este objetivo, siguen un abordaje metodológico semejante que se puede resumir en cinco pasos: 1) segmentación del ADN en varios fragmentos, 2) marcaje del ADN por medio de *primers* o adaptadores que indican el punto de partida para la replicación, 3) amplificación de los fragmentos de ADN marcados con adaptadores por métodos basados en reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), 4) secuenciación o lectura de los fragmentos de ADN y 5) reconstrucción de la secuencia completa por medio de secuencias de referencia y exportación a ficheros de almacenamiento de datos (8)

El desarrollo de resistencia por parte de la célula cancerosa al tratamiento oncológico y subsecuente progresión de la enfermedad es un proceso complejo. El desarrollo de nuevas alteraciones en las vías de señalización de los diferentes procesos celulares a través de mutaciones específicas le confiere a la célula tumoral desarrollar esta resistencia terapéutica. Las principales mutaciones serán descritas más adelante enfocándonos en el cáncer de mama en particular.

La elección de la técnica de detección de mutaciones se utiliza en gran medida depende de las preferencias y las instalaciones locales, y no es posible recomendar una sola técnica establecida. Un laboratorio puede llegar a ser experimentado y hábil en el uso de un cierto análisis que realiza de forma subóptima en otro laboratorio. La fuente de material para la prueba varía también, pero la mayoría de los laboratorios de extracto de ADN genómico de muestras de sangre. Se recomienda que el ARN se extraiga y se almacene para el análisis futuro o para confirmar las mutaciones del sitio de empalme. El uso de ADN genómico como una plantilla, una estrategia de cribado implica generalmente el análisis de cada exón de codificación, junto con su flanco BRCA EMQN 080923 9 secuencias intrónicas. Exones más grandes tales como BRCA1 y BRCA2 exón 11 exones 10-11 se dividen en múltiples fragmentos superpuestos. Se debe tener cuidado en el diseño de cebadores de PCR para evitar las variantes de secuencia (por ejemplo SNP) en el primer sitios de unión que podrían resultar en la amplificación alelo-sesgada.

Un número de métodos de exploración están disponibles para la detección de alteraciones de la secuencia. Estos métodos de selección previa no identifican a la alteración de la secuencia subyacente específica sin embargo, cuando se utiliza como parte de la estrategia de detección de mutaciones, un método de selección previa reduce significativamente la carga de trabajo de secuenciación. Estos métodos se basan por lo general en la diferencia en la estructura, la fusión y / o la propiedad de migración de los fragmentos mutantes y de tipo salvaje, respectivamente.

Actualmente, el manejo eficiente de pacientes con cáncer depende de principios diagnóstico, estadificación tumoral precisa y monitoreo de tratamiento. Evaluación histológica de tejidos tumorales obtenidos de biopsias, así como muestras de sangre, son el "estándar de oro" del diagnóstico, pero la mayoría de los estudios usualmente llevan a cabo estas evaluaciones una sola vez. Se sabe que los tumores metastásicos y primarios de un mismo paciente puede variar a nivel genómico, epigenómico y niveles transcriptómicos, por

lo tanto, los ensayos que permiten el monitoreo repetitivo de estos eventos usando muestras de sangre sería más eficiente en la evaluación de la progresión del cáncer en pacientes cuyo tejido tumoral no esté disponible (9).

## I. ANTECEDENTES

Actualmente el enfoque de las investigaciones en cáncer de mama temprano está basado en desarrollar herramientas clínicas que permitan disminuir la mortalidad por esta causa. Evaluar la respuesta a tratamientos de diferentes modalidades (Quirúrgicos, Radioterapia, Sistémico) es uno de los pilares fundamentales para establecer el beneficio real de dichas intervenciones. La detección de fragmentos de DNA libres circulantes en pacientes con cáncer de mama como marcador de respuesta a tratamiento es una gran promesa y ha venido ganando espacio en los últimos años.

A lo largo del tiempo se han buscado diferentes estrategias para mejorar la sensibilidad y especificidad de estas mediciones; ya que se ha visto en estudios preclínicos que los niveles de cfDNA y ctDNA son significativamente bajos sobre todo en etapas tempranas del cáncer de mama, una de las modalidades que se ha evaluado para mejorar esta situación es la secuenciación de siguiente generación (NGS) con la cual no solo se puede identificar fragmentos de material genético circulante sino además hacer secuenciación masiva para identificar potenciales driver oncogénicos en los fragmentos detectados (10)

Uttley y colaboradores en 2016 realizaron una revisión que reporta las ventajas y desventajas de las diferentes fuentes utilizadas en la biopsia líquida. Establecen los autores en primer lugar que la utilización de CTC tiene como ventajas la cuantificación y detección de reordenamientos y mutaciones puntuales, pero requiere alto coste y múltiples métodos de detección, sin existir una estandarización metodológica. En segundo lugar, los niveles de ctDNA y su carga mutacional se correlacionan estrechamente con la carga tumoral y pueden ser detectados por técnicas de secuenciación (NGS), con un procesamiento más fácil a partir de plasma en comparación con las CTC. Como desventaja, el ctDNA está altamente fragmentado y la detección de reordenamientos supone mayor dificultad. Generalmente los niveles de ctDNA se encuentran aumentados ante trastornos como el cáncer, infarto de miocardio, infecciones graves, embarazo y afecciones inflamatorias como resultado de



muerte celular (ya sea por necrosis o apoptosis); por el contrario, permanece en niveles bajos en individuos sanos. (11)

El ADN tumoral circulante (ctDNA), identificado en función de la presencia de mutaciones somáticas, puede proporcionar información sobre la presencia de cáncer y su composición genética (20) y se correlaciona con parámetros clínicos como el estadio, la carga de la enfermedad, la recurrencia y la respuesta al tratamiento (21). Sin embargo, en el cáncer de mama, el análisis de ctDNA tiene una baja sensibilidad de detección (<40%), en parte debido a la baja frecuencia de mutaciones comunes en el cáncer de mama (12).

El rol del ADN circulante tumoral en pacientes con cáncer de mama después de establecerse el diagnóstico se ha evaluado a lo largo del tiempo, en el año 2002 Silva y Colaboradores definieron a través de la valoración de mutaciones específicas detectadas por biopsias líquidas factores predictivos relacionados a supervivencia libre de enfermedad, en el seguimiento a lo largo del tiempo de estas pacientes el 76% de las pacientes que tuvieron un evento de recurrencia presentaba ADN circulante tumoral positivo, sin embargo estas investigaciones se realizaron aun cuando las técnicas de valoración mostraban baja sensibilidad (13)

Moss et al, realizaron un estudio en donde se analizaron muestras de plasma de pacientes con enfermedad localizada (estadio IIA-IIIC) antes, durante y después de la quimioterapia neoadyuvante. Antes del tratamiento, los pacientes ( $n = 30$ ), tenían niveles significativamente más altos de ADN circulante de mama en comparación con donantes sanas ( $n = 64$ ) con un promedio de 33,5 equivalentes de genoma mamario / ml (GE / ml), en comparación con 0,5 GE / ml observados en donantes sanas (14)

El inicio de la quimioterapia neoadyuvante se asoció con una disminución en los niveles de cfDNA de mama. En algunos casos, el cfDNA de mama se elevó hasta el momento de la cirugía, lo que indica un crecimiento y recambio tumoral continuo a pesar del tratamiento

que es consistente con la enfermedad residual observada en la patología de tales pacientes. Es importante destacar que la alta concentración de cfDNA de mama en las semanas previas a la cirugía predijo la enfermedad residual en el momento de la cirugía. Estos datos sugieren que el cfDNA de mama podría ser un biomarcador útil para la recurrencia del cáncer después de un tratamiento aparentemente exitoso (14).

[Yidong Zhou](#), mostró resultados de estudio realizado en China en donde revelaron que el perfil mutacional del ct ADN de un paciente se correlacionó fuertemente con el del ADN del tumor, mientras que algunos factores clínico-patológicos afectaron la detección de mutaciones derivadas del tumor en la sangre. Según estos hallazgos el perfil del ct ADN es un método prometedor para determinar el panorama genómico y el mejor plan de manejo clínico potencialmente de los pacientes con cáncer de mama, especialmente aquellos con cáncer en estado avanzado (15)

[Adrien Saliou](#), describió que el ct ADN puede usarse para identificar alteraciones moleculares que pueden implicar un efecto terapéutico y se han identificado varios objetivos adecuados que podrían encontrarse en el plasma de pacientes con cáncer de mama triple negativo, uno de ellos es el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y otros (como BRCA1/2, TP53, PIK3CA, FGFR, ERBB2 and ERBB3) se ha descrito como dianas terapéuticas potenciales para pacientes con TNBC (cáncer de mama triple negativo) (16).

En el terreno metastásico, el tratamiento del cáncer de mama es paliativo, siendo su objetivo el control de la enfermedad, paliación de los síntomas asociados para mejorar la calidad de vida y prolongar la supervivencia. Este tratamiento dependerá de varios factores, principalmente el subtipo molecular de cáncer de mama o su aproximado por inmunohistoquímica, así como el volumen tumoral, la urgencia de paliación de síntomas y el estado funcional del paciente.

En pacientes con receptores hormonales positivos y HER2 negativo el tratamiento de elección consiste en terapia hormonal monodroga o combinación con terapias blanco, como es la combinación de un inhibidor de aromatasas y un inhibidor de ciclinas. Estas nuevas combinaciones de medicamentos reportan medianas de supervivencia libre de progresión de más de 20 meses como primera línea. Ante la progresión se cambia el esquema de tratamiento hormonal y así sucesivamente en cada progresión hasta agotar todas las opciones de terapia hormonal, con cada línea de tratamiento la efectividad del mismo se ve disminuida, de tal manera que en el intervalo libre de progresión es cada vez más corto en líneas de tratamiento sucesivas, siendo menor de 6 meses en una tercera línea o subsecuente. El tratamiento con quimioterapia es de elección en pacientes que han agotado las terapias hormonales disponibles, pacientes que requieren una paliación rápida de síntomas, con o sin la presencia de crisis visceral, pacientes con tumores que no expresan receptores hormonales, los llamados tumores triple negativos o tumores que expresan HER 2. Al igual que con la terapia hormonal se cambia el esquema de quimioterapia ante cada evento de progresión hasta agotar las opciones terapéuticas, con cada nuevo esquema el intervalo libre de progresión esperado es más corto (17)

## Mutaciones detectadas en ctADN en pacientes con cáncer de mama

Haciendo un análisis que abarca los datos publicados por 33 estudios entre 1994 y 2015, que reportan la prevalencia y el espectro de variantes sobre mutaciones en los genes BRCA1 (OMIM 113705) y BRCA2 (OMIM 600185) y combinando datos de 4835 individuos de 13 diferentes países de Latinoamérica, el Caribe, así como población Hispana en los EUA, en total se han reportado en la literatura 167 variantes patogénicas, con una prevalencia entre 1.2 y 27.1%. Partiendo de esos datos, se determinó que la proporción de variantes patogénicas del gen BRCA que comparte la población Hispana con la de EUA y Latinoamérica se estima en un 10.4% y que la que se comparte entre Latinoamérica y el Caribe es de 8.2 %. Durante estos años, se ha identificado la susceptibilidad de estas mutaciones con alta penetrancia para cáncer hereditario de mama y de ovario (11). De la misma manera se ha puesto en manifiesto el riesgo inminente de estos casos para presentar otros tipos de cáncer tales como colorrectal, gástrico, pancreático, prostático, biliar, de vías urinarias y vesicular (18)

Un ensayo, conocido como el ensayo SAFIR01, tuvo como objetivo definir la proporción de pacientes en los que podría ofrecerse una terapia dirigida en base a los resultados de los análisis genómicos. Se incluyeron 423 pacientes y se obtuvieron muestras de biopsia de 407 (no se encontró cáncer de mama metastásico en cuatro). La secuencia CGH y la secuenciación de Sanger fueron factibles en 283 (67%) y 297 (70%) pacientes, respectivamente. Se identificó una alteración genómica orientable en 195 (46%) pacientes, con mayor frecuencia en PIK3CA (74 [25%] de 297 alteraciones genómicas identificadas), CCND1 (53 [19%]) y FGFR1 (36 [13%]). Un total de 117 (39%) de 297 pacientes con pruebas genómicas disponibles presentaron alteraciones genómicas raras (definidas como que ocurren en menos del 5% de la población general), incluidas las mutaciones AKT1, y EGFR, MDM2, FGFR2, AKT2, IGF1R y MET de alto amplificaciones de nivel. La terapia se puede personalizar en 55 (13%) de 423 pacientes. De los 43 pacientes que fueron evaluables y recibieron terapia dirigida, cuatro (9%) tuvieron una respuesta objetiva, y otros nueve (21%) tenían enfermedad estable durante más de 16 semanas (19).

El tumor y el ADN germinal de 825 pacientes con cáncer de mama en seis plataformas diferentes (expresión de ARNm, secuenciación del exoma completo, metilación del ADN, polimorfismos de un solo nucleótido, secuenciación de miARN y matriz de proteínas de fase inversa) fueron realizados por The Cancer Genome Atlas, y sus resultados publicados en 2012. Las mutaciones somáticas observadas con mayor frecuencia fueron en gran medida en el gen p53 y el gen fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad catalítica alfa (PIK3CA): Se encontró p53 mutada en el 37 por ciento de las muestras, pero predominantemente en cánceres de mama de tipo basal (80 por ciento) y el subtipo enriquecido en HER2 (72 por ciento). Se observó un gen PIK3CA mutado con una prevalencia global del 36 por ciento, sin embargo, fue más dentro de los subtipos ER-positivos (luminales), con una frecuencia observada del 45 por ciento en el subtipo Luminal A y del 29 por ciento en mama Luminal B cánceres (20). Otras mutaciones somáticas menos frecuentes incluyen:

- Quinasa 1 activada por mitógeno (MAP3K1, 8%)
- Proteína de unión a GATA 3 (GATA3, 11 %)
- Histona-lisina N-metiltransferasa MLL3 (7 %)
- Cadherina 1, tipo 1, E-cadherina (CDH1, 7 %)
- Proteína quinasa 4 activada por mitógeno (MAP2K4, 4 %)
- Fosfatase y tensin homolog (PTEN, 3 %)
- RAC-alfa serina / treonina-proteína quinasa (AKT1, 2 %)

Para el presente trabajo la intención es explorar algunas de las mutaciones con alta relevancia clínica antes mencionadas y poder abarcar algunas nuevas mutaciones que representan un potencial blanco de diagnóstico e incluso para el seguimiento o tratamiento de los pacientes con cáncer de mama atendidos en la consulta de Oncología Médica que acudan al CMN “20 de Noviembre” ISSSTE.

## II. PROBLEMA

El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres en edad adulta por lo que es un problema de salud importante. A pesar de un diagnóstico y tratamiento oportuno una proporción importante de pacientes presenta recurrencia local o a distancia. Otra proporción importante se diagnostica ya con enfermedad metastásica. El tratamiento del cáncer de mama en el terreno metastásico es paliativo e incluso en los casos con una buena respuesta inicial, sin embargo en algún momento de su evolución presentarán falla terapéutica y progresión de la enfermedad. Esto se debe al desarrollo de mutaciones que le confieren a la célula tumoral resistencia al tratamiento.

Actualmente desconocemos cuales son la principales mutaciones en nuestra población derechohabiente del CMN "20 de Noviembre" y no se cuenta con biomarcadores que nos permitan predecir esta falla a tratamiento o poder seleccionar el mejor tratamiento de forma individualizada.

El análisis del ADN circulante en sangre de las pacientes nos ofrece la oportunidad de conocer estas mutaciones y poder evaluar cuales pudieran funcionar como un biomarcador pronóstico y predictivo. Así nos planteamos la siguiente pregunta de investigación ¿Pueden identificarse fragmentos de ADN tumoral circulante e implementarse como biomarcador pronóstico y/o predictivo de respuesta a tratamiento en cáncer de mama localmente avanzado.

### III. HIPÓTESIS

La cuantificación del ADN circulante tumoral tiene relación con los diferentes tratamientos recibidos en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado atendidos en consulta de Oncología Médica del CMN “20 De Noviembre” ISSSTE.

#### **IV. OBJETIVOS.**

##### **OBJETIVO GENERAL:**

1. Cuantificar el ADN circulante tumoral de muestras de pacientes con cáncer de mama, para el análisis de mutaciones en los genes más comunes (BRCA y PI3KCA) y evaluar su función como biomarcador predictivo durante seis meses.

##### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Reclutamiento de pacientes diagnosticados con cáncer epitelial de mama
2. Toma de muestras de sangre periférica (15mL) en una primera consulta de Oncología Médica y 6 meses después de la consulta.
3. Extracción de ADN circulante de las muestras de sangre periférica recolectada
4. Integración de los datos a posible tratamiento o pronóstico paciente-dirigido



## V. JUSTIFICACIÓN.

Se sabe que el desarrollo del cáncer está asociado con una elevada proliferación que inicialmente es contrarrestada por altas tasas de actividad muerte celular apoptótica y más tarde mediante el aumento de las tasas de muerte celular necrótico pasivo cuando el tumor se desdiferencia y se vuelve invasivo por lo tanto se supone que eran biomarcadores relevantes para la detección de cánceres agresivos.

Actualmente el diagnóstico de la mayor parte de los tumores sólidos se fundamenta en el análisis histopatológico de la pieza tumoral, y se complementa con el uso de marcadores tumorales séricos, que presentan importantes limitaciones en su sensibilidad y especificidad. Por ello, en este particular es especialmente relevante en la investigación clínica la búsqueda de nuevos biomarcadores que establezcan un diagnóstico más precoz, selección de poblaciones de riesgo que requieran métodos diagnósticos más sensibles y específicos de cribado, permitan una adecuada gestión de las estrategias terapéuticas, así como una monitorización de la respuesta y un diagnóstico precoz de las recidivas para establecer técnicas precoces que mejoren el pronóstico

Hasta el momento, ningún método en México ha disminuido la tasa de mortalidad significativamente y a pesar de los programas de detección temprana para el cáncer de mama, este se sigue diagnosticando en etapas avanzadas, siendo el 42.1% de los casos diagnosticados en estadios III y IV. Múltiples estudios han corroborado hallazgos de concentraciones elevadas de ADN circulante en plasma y suero de pacientes con cáncer de mama y su valor pronóstico/predictivo respecto a los diferentes tratamientos utilizados, así mismo se puede detectar en el ADN plasmático mutaciones propias del tumor primario por ejemplo BRCA, PIK3CA entre otros.

En el área de investigación, desconocemos cuales son la principales mutaciones en nuestra población derechohabiente del CMN "20 de Noviembre" y no se cuenta con estudios de biomarcadores moleculares como la concentración de ADN circulante tumoral y su valor pronostico y/o predictivo. Por lo anterior un análisis del ADN circulante en sangre de las pacientes nos ofrece la oportunidad de conocer estas mutaciones y poder evaluar cuales pudieran funcionar como un biomarcador pronóstico y predictivo.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **DISEÑO.**

Estudio analítico, experimental, longitudinal, concurrente.

### **GRUPO DE ESTUDIO.**

Pacientes con diagnóstico positivo a cáncer de mama que pertenezcan al CMN “20 de noviembre”

#### **Universo de trabajo**

Pacientes con diagnóstico positivo a cáncer de mama que pertenezcan al CMN “20 de noviembre”

#### **Tiempo de ejecución**

12 meses a partir de aprobación por los comités institucionales y de obtener financiamiento para la ejecución del proyecto

#### **Esquema de selección. Definición del grupo control.**

Grupo de auto-control, debido a que se emplearán dos tomas de muestras: para la primera consulta y 6 meses después en seguimiento, tomando como valor basal para todos los parámetros la primera toma de muestra. En este reporte se analiza de forma comparativa los resultados de la primera muestra y de la muestra de seguimiento de 6 meses

## **Definición del grupo a intervenir**

Pacientes con diagnóstico de cáncer de mama atendidas en el CMN "20 de Noviembre" ISSSTE

## **CRITERIOS DE INCLUSION**

- Pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de mama
- Mayores de 18 años.
- Consentimiento informado por escrito firmado y Aviso de Privacidad

## **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.**

- Pacientes que retiren consentimiento informado
- Pacientes con expediente clínico incompleto
- Pacientes que no presente diagnóstico positivo a cáncer de mama, pero sí a otros tipos de cáncer, muestras mal conservadas y/o que no se disponga de la determinación de las mutaciones de estudio
- Pacientes con enfermedad metastásica

## **Muestreo no probabilístico.**

Muestra no probabilística, con diagnóstico confirmado de cáncer de mama referidos al CMN "20 de Noviembre".

## **Metodología para el cálculo del tamaño de la muestra y tamaño de la muestra.**

La muestra será a conveniencia con una  $n=30$ ; debido a que los recursos económicos para el procesamiento de las muestras son limitados.

Descripción operacional de las variables.

Variable	Categoría	Escala	Unidad de medición	Definición Operacional
Edad	Cuantitativa	Discreta	Años	Habitual
Etapa clínica	Cualitativa	Ordinal		Habitual
Variables biológicas (diferenciación)	Cualitativa cuantitativa	Nominal Discreta	diferenciado/no diferenciado y grado diferenciación	Habitual
Variables biológicas (Concentración de ct ADN)	Cuantitativa	Discreta	Presencia/ausencia	Experimental
Tipo de tratamiento asociado	Cualitativa	Nominal	Esquema de tratamiento utilizado: Quimioterapia sistémica, Radioterapia, Hormonoterapia.	Habitual
ECOG	Cualitativa	Nominal	Severidad o grado de severidad del tumor	Habitual
Inmunofenotipo	Cualitativa	Nominal	Luminal/Enriquecido her 2/Triple negativo	Habitual
Subtipo histológico	Cualitativa	Nominal	Ductal/Lobulillar	Habitual
Meses del diagnóstico a la toma de muestra	Cuantitativa	Discreta	Meses	Habitual
Tiempo de sobrevida	Cuantitativa	Discreta	Meses	Habitual

## **Técnicas y procedimientos por emplear.**

### **INFORMACIÓN CLÍNICA**

A los sujetos de estudio se les aplicó un cuestionario, asistido por oncólogos y diseñado para dicho propósito, el cual se realizó en consultorio previo consentimiento informado por escrito y firmado por los participantes. Dicho cuestionario recaba la información de las variables clínicas y demográficas objeto de estudio. Se realizó una evaluación clínica general como se describe a continuación.

### **METODOLOGÍA**

#### **1. IDENTIFICACIÓN DE LOS CASOS DE CÁNCER DE MAMA**

Se incluirá a todos los pacientes referidos al CMN "20 de Noviembre", ISSSTE, con diagnóstico de cáncer de mama para la fase prospectiva se realizará una historia clínica completa, y el tejido se obtendrá de sangre periférica del paciente. En ambos casos un patólogo experimentado confirmará el diagnóstico histopatológico de las biopsias de cáncer de mama.

#### **2. DETERMINACIÓN DE ADN CIRCULANTE TUMORAL**

Previa cita a las pacientes se colectó nueva muestra de sangre periférica (15mL), dichas pacientes ya se había tomado muestra previa de sangre 6 meses antes

Se empleará un kit de extracción para muestras de ctADN de Qiagen, las cuales se procesarán conforme a las indicaciones del proveedor y serán almacenadas a -70°C.

Una vez recolectadas en su totalidad las muestras, se considerará la contratación de un NGS, por parte del INMEGEN o la RAI-UMAM, conforme al presupuesto disponible y cotización generada por cada institución.

### 3. PRESENCIA Y TIPO DE MUTACIÓN EN GENES BRCA1 Y 2 Y PI3KCA

#### Extracción y Aislamiento de ADN

Después de la firma del consentimiento informado se toma del paciente donador una muestra de sangre periférica de 15mL la cuál es colectada usando tubos de la marca PAXgene Qiagen® para recolección ccfDNA, el plasma debe ser separado por centrifugación, 3000rpm por 10minutos. La extracción de ctADN puede realizarse con la técnica de Trizol. Se deben confirmar los tamaños de extractos de ADN por geles de agarosa y su posterior secuenciación masiva.

### 4. EVALUACIÓN DE LOS FACTORES BIOLÓGICOS DE RIESGO

Diferenciación tumoral. Se estimará mediante el grado de diferenciación del tumor con base a la calificación de la escala de patología específica, aplicada al momento de la interpretación realizada por el servicio de patología.

**Inmunofenotipo.** Se definieron 5 perfiles por inmunohistoquímica basados en la expresión de receptores hormonales (estrogénicos o de progesterona) y/o Her2neu (Luminal A, Luminal B Her 2 Negativo o Positivo, Enriquecido Her2neu y triple negativo)

**Etapas Clínicas.** Los cánceres de seno en etapas más tempranas se identifican como etapa 0 (carcinoma in situ), y los demás van desde la etapa I (1) a la IV (4); El sistema de estadificación que se empleó para el cáncer de seno es el sistema **TNM** del *American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2018*.

**Tipo de Tratamiento recibido.** Cirugía para extirpar el tumor (Lumpectomía/mastectomía), Quimioterapia sistémica, Hormonoterapia sistémica, Radioterapia con haz externo y terapia blanco

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó EXCEL, cuadros de datos y gráficos dinámicos. En general se realizaron medidas de tendencia central y un análisis descriptivo de las variables, las cuáles incluyen la desviación estándar de la media y la media.

Se reportaran las características basales de la población a ingresar en este análisis, previo las variables establecidas de relevancia para esta investigación

Se empleó un cuadro descriptivo de relación entre ctADN y el tipo de tratamiento y se realizó una correlación lineal simple para el ctADN y el tipo de tratamiento, con valor de linealidad expresado en  $R^2$

Se realizará análisis comparativo de las concentraciones de ctDNA al inicio y la concentración después de 6 meses de iniciado el tratamiento definido para cada situación.

En caso de que las variables de los parámetros clínicos tumores sugieran suficiente tiempo de seguimiento e información consistente para el cálculo de sobrevida o tiempo libre de progresión, se considerará determinar las curvas ROC.



## VII. RESULTADOS.

El protocolo se realizó a partir de su autorización con número de registro RPI: 093.2019, previa autorización por el comité de ética de la coordinación de investigación se realizó enmienda para continuar con esta segunda fase de este protocolo de investigación, nuevamente igual que al inicio se solicitó a las pacientes de estudio firma de consentimiento informado y aviso de privacidad para la recolección de sus datos clínicos y la toma de muestra.

En este segundo análisis de este estudio se evaluaron 5 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama las cuales durante el período de Marzo de 2020 a Septiembre de 2020 se recolectó la primera muestra de sangre y 6 meses después se obtuvieron la segunda toma de muestra, además se obtuvo información de los expedientes clínicos en el servicio de Oncología Médica en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE.

Tabla 1. Características Sociodemográficas de la población de estudio*	
	n = 5
<b>Edad promedio <math>\pm</math> D.E.</b>	60.4 $\pm$ 12.32
<b>Sexo</b>	
Masculino	0
Femenino	5
<b>Comorbilidades</b>	
Diabetes mellitus 2	0
Hipertensión arterial sistémica	1
HTA + DMT2	1
Ninguna	3
<b>ECOG inicial</b>	
ECOG 0	0
ECOG 1	5
ECOG 2	0
ECOG 3	0
ECOG 4	0
<b>*Información obtenida de los expedientes clínicos en consulta al SIAH durante un periodo de 2019 a 2021</b>	
D.E. = Desviación estándar	
HTA= Hipertensión Arterial Sistémica	
DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2	
ECOG: Escala Eastern Cooperative Oncology Group	

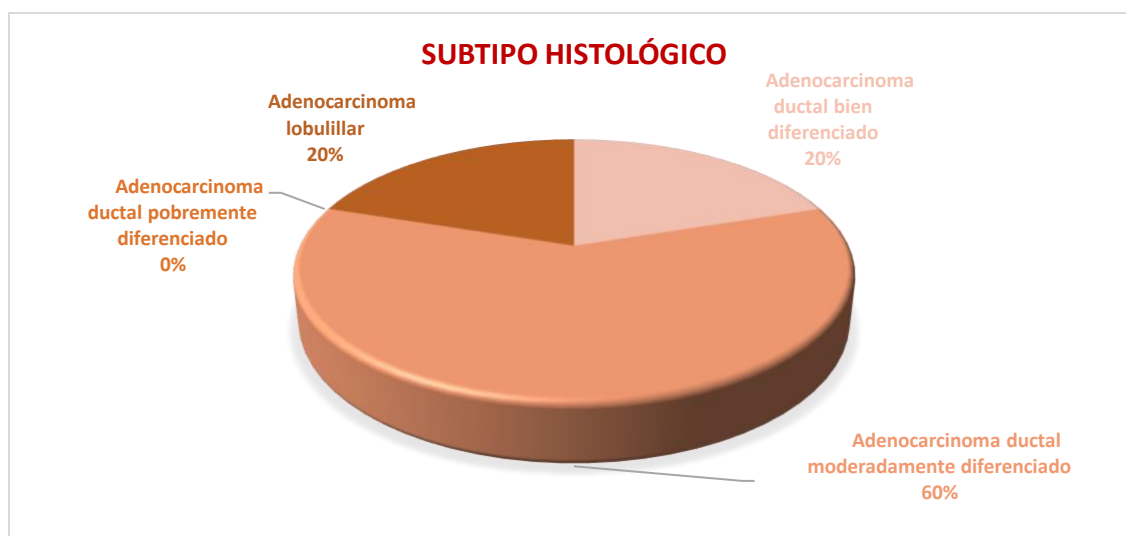
En la **tabla 1** se muestran las características basales de interés de la población a analizar, un total de 5 pacientes a las cuales se les tomó una primera muestra posterior al tratamiento quirúrgico primario y previo a recibir algún tipo de tratamiento sistémico y local (Quimioterapia, Hormonoterapia, Terapia blanco y Radioterapia), el 100% de la población incluida corresponde al sexo femenino, la mediana de edad es de 60.4 años; lo cual corresponde con los promedios de edad en donde predomina el diagnóstico de cáncer de mama a nivel global. Cuando se analizan otras características de la población incluida observamos que 2 pacientes presentaban comorbilidades como Diabetes Mellitus e hipertensión arterial, además el estado funcional de las pacientes basado en el score del grupo oncológico cooperativo del este de los Estados Unidos (ECOG) es de 1 punto en el 100% considerado esto dentro de la escala como pacientes 100% funcionales e independientes para sus actividades diarias personales y laborales.

Durante el seguimiento de este protocolo de investigación se revisaron los expedientes electrónicos de las pacientes para buscar información relacionadas a sus características demográficas, como a aspectos clínicos y patológicos de relevancia para los resultados, en la (Tabla 2 y Gráfica 1 y 2 ) se reportan las principales características de la población en lo relacionado a tipo histológico de cáncer de mama, subtipo molecular cuyo concepto fue descrito previamente, etapa clínica de la enfermedad al momento del diagnóstico. En lo relacionado a La diferenciación tumoral más frecuente fue la moderadamente diferenciada correspondiendo a 3 de los 5 casos; se observaron etapas tumorales entre I, II y III; El inmunofenotipo más frecuente fue el Luminal A correspondiendo al 80% de los casos, seguido de Luminal B Her 2 Positivo que representa 1 de los casos de la población incluida y no se reportaron casos de subtipo molecular triple negativo.

<b>Tabla 2. Característica clínicas y patológicas de la población de estudio*</b>	
	<b>n = 5</b>
<b>Subtipo Histológico</b>	
Adenocarcinoma ductal bien diferenciado	1
Adenocarcinoma ductal moderadamente diferenciado	3
Adenocarcinoma ductal pobremente diferenciado	0
Adenocarcinoma lobulillar	1
<b>Etapa tumoral</b>	

Etapa 0	0
Etapa I	2
Etapa II	2
Etapa III	1
Etapa IV	0
<b>Fenotipo</b>	
Luminal A	4
Luminal B HER 2 Negativo	0
Luminal B HER 2 Positivo	1
Enriquecido Her 2	0
Triple Negativo	0
<b>*Información obtenida de los expedientes clínicos en consulta al SIAH durante un periodo de 2019 a 2021</b>	

Gráfica 1



Gráfica 2



<b>Tabla 3. Supervivencia libre de enfermedad y Tratamiento recibido*</b>		
	<b>n = 5</b>	<b>%</b>
<b>Tratamiento Recibido**</b>		
Cirugía Conservadora de mama/Mastectomía Radical	5	100
Radioterapia Adyuvante	5	100
Quimioterapia Neo-adyuvante	0	0
Quimioterapia Adyuvante	2	40
Cirugía de mama + Quimioterapia + Radioterapia	0	0
Cirugía de mama + Radioterapia	0	0
Cirugía de mama + Quimioterapia	2	40
Terapia blanco	1	20
Hormonoterapia	5	100
Total de recurrencias a 6 meses	0	0
<b>Supervivencia libre de enfermedad a partir de DX ± D.E.***</b>	19.6 ± 3.84 meses	
<p><b>*Información obtenida de los expedientes clínicos en consulta al SIAH durante un periodo de 2019 a 2021</b>  <b>**El Tratamiento recibido se definió como el recibido antes de la fecha de la toma de muestra y en el caso de la hormonoterapia y terapia blanco se mantienen en el tiempo</b>  <b>***La supervivencia libre de enfermedad se considera el intervalo de tiempo desde el diagnóstico hasta recurrencia de enfermedad o muerte por cáncer</b>  <b>D.E. = Desviación estándar</b></p>		

Está bien establecido que para la estrategia de tratamiento adyuvante en las pacientes con cáncer de mama se toman en cuenta diferentes elementos, como son: la edad de las pacientes, su estado funcional, la etapa clínica al diagnóstico, el subtipo molecular entre otros elementos. En el caso de nuestra población a evaluar, en la **tabla 3** se analizan y reportan las diferentes modalidades de tratamiento que recibieron las pacientes, así como la supervivencia libre de enfermedad desde el tratamiento quirúrgico primario hasta la fecha de corte de la población de Octubre de 2021, dicha supervivencia está reportada en meses y como se observa este es un intervalo de tiempo mas prolongado al que se había reportado en el primer análisis de este protocolo en el año 2020.

Observamos dentro de estas características que el 100% de la población se realizó un procedimiento quirúrgico parcial o radical dependiendo de la decisión del especialista quirúrgico, todas las pacientes recibieron tratamiento convencional de radioterapia con ciclo mamario completo, el 100% de las pacientes reciben actualmente tratamiento de bloqueo

hormonal con fármacos de diferentes familia establecido como estándar por 5 años en todas las pacientes con tumores de mama de tipo luminal, solo 2 de las pacientes recibieron tratamiento de quimioterapia adyuvante y en 1 de los casos se ofreció además de tratamiento estándar terapia blanco con anticuerpo monoclonal contra la molécula del Human epidermal receptor growth factor (HER2) actualmente estándar de tratamiento al menos durante 1 año. Como se observa en la tabla 3 la mediana de supervivencia libre de enfermedad es de  $19.6 \pm 3.8$  meses con el 100% de las pacientes sin presentar un evento de recurrencia o muerte

### Extracción y Cuantificación de ct ADN

El procedimiento para la extracción de la segunda muestra es el mismo utilizado para la primera parte de este estudio, se extrajo sangre periférica empleando tubos de recolección especializados marca PAXgene, los cuales permiten la conservación del ctADN. En cuanto al procedimiento para la extracción del ADN, se empleó el método de Trizol, descrito conforme al fabricante y el inserto del producto (*TRIZOL™ Reagent Experimental protocol for DNA isolation. Catalog Number 15596026. Pub. No. MAN0016385; modificado de: Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. BioTechniques 15,532-537*)

La cuantificación del ctADN se realizó utilizando un método espectrofotométrico y el equipo NANOPHOTOMETER marca IMPLLEN. En la **figura 1.** se muestra el equipo denominado, así como una imagen representativa de la cuantificación.



**Fig. 1. Cuantificación de ctADN mediante espectrofotometría.** Se muestra una imagen representativa de la cuantificación de una muestra extraída de ctADN de sangre periférica. En la imagen podemos observar información referente a la concentración en ng/μL y la curva de pureza con la relación 260/280nm.

**Tabla 4. Cuantificación ct ADN en suero inicial y a los 6 meses \***

<b>n = 5 # muestra</b>	<b>Concentración ct ADN inicial (ng/microlitro)</b>	<b>Concentración ct ADN a los 6 meses (ng/microlitro)</b>	<b>Porcentaje de Reducción de la concentración de ctDNA</b>
1	55	13	76.4%
2	290	168	42.1%
3	1125	6.6	>100%
4	1252	15.8	99%
5	993	80	>100%
<b>Promedio ± D.E.</b>	<b>680.5 ± 596.63</b>	<b>56.58 ± 68.96</b>	<b>83.5% ± 25.2</b>
<p><b>*El ct ADN se extrajo mediante la técnica de trizol y se cuantificó espectrofotométricamente en el equipo NanoPhotometer versión 7122 V2.4.2 marca INPLEN</b>  <b>D.E. = Desviación estándar</b>  <b>ct = tumoral circulante</b></p>			

De la población analizada en esta investigación correspondiendo a 5 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión el 100% se logró tomar la muestra de seguimiento de 6 meses posterior, de esta población se había reportado de la muestra inicial los datos de la concentración de ctADN que se extrajo de sueros de muestras sanguíneas periféricas mediante técnica Trizol encontrando un promedio de 680.5 ng/μl con una relación de absorbancia 260/280 promedio de 0.78 nanómetros. Estas pacientes posterior a la toma de esta muestra de sangre y análisis, recibieron los tratamientos subsecuentes antes descritos y al 6to mes de tiempo se procedió a la toma de la segunda muestra, cuyos resultados podemos observar en la columna de la derecha de la tabla 4, vemos que el promedio de concentración de ADN tumoral circulante es de 56.58 ng/μl notándose una diferencia absoluta de la primera y la segunda muestra de 623.42 ng/μl con una reducción del 83% del valor inicial con el valor final a los 6 meses

## ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron los datos de los expedientes de la consulta externa de Oncología Médica del Hospital 20 de Noviembre y los tratamientos recibidos ya sea cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia o terapia blanco tomando en consideración las fechas en referencia a la toma de muestra.

**Tabla 5. Análisis de tipo de Tratamiento recibido en relación con el ct ADN en suero inicial y a los 6 meses\***

n = 5 # muestra	QX	QT	HT	RT	TB	Concentración ct ADN inicial (ng/microlitro)	Concentración ct ADN a los 6 meses (ng/microlitro)	Porcentaje de Reducción de la concentración de ctDNA
1	SI	SI	SI	SI	NO	55	13	76.4%
2	SI	NO	SI	SI	NO	290	168	42.1%
3	SI	SI	SI	SI	SI	1125	6.6	>100%
4	SI	NO	SI	SI	NO	1252	15.8	99%
5	SI	NO	SI	SI	NO	993	180	>100%

\*El ct ADN se extrajo mediante la técnica de trizol y se cuantificó espectrofotométricamente en el equipo NanoPhotometer versión 7122 V2.4.2 marca INPLEN  
 ct = tumoral circulante; ng = nanogramos; QX = Cirugía de mama conservadora o radical; QT = Quimioterapia esquemas Antraciclina más Taxano; HT = Hormonoterapia; TB: Terapia blanco.

Del análisis de estos resultados presentados en la tabla 5 podemos hacer correlaciones, en el caso del tratamiento quirúrgico y del tratamiento de hormonoterapia no podemos establecer conclusiones acerca del impacto que tiene esta intervención con el cambio en las concentraciones de ctDNA debido a que esta se realizó en el 100% de las pacientes, sin embargo en las 2 pacientes que recibieron tratamiento de quimioterapia adyuvante vemos que en una de ellas la concentración inicial de ctDNA fue de las mayores reportadas (1125 ng/μl) y lo mas importante es que el porcentaje de reducción de la concentración de ctDNA en ambas pacientes mostró una reducción importante entre 76 y 100% comparado con el

inicial pudiendo establecerse el beneficio y objetivo principal de ofrecer tratamiento de quimioterapia adyuvante que es eliminar las posibles micrometástasis circulante después del tratamiento quirúrgico. En el caso de las paciente que se categorizaron como luminal B con sobre expresión de HER2 que recibió terapia blanco con anticuerpo monoclonal vemos que igual la reducción en la concentración de ctDNA es bastante proporcional del 100%, este efecto se infiere está relacionado al efecto antitumoral que tienen este tipo de terapia en los tumores con estas características que de por si tienen comportamientos mas agresivos con persistencia de micrometástasis a pesar del tratamiento quirúrgico inicial

De forma global observamos que el promedio de porcentaje de reducción de la concentración de ctDNA es bastante proporcional y como se comentó previamente dicha reducción ronda el 40 y el 100% del valor basal, sin embargo, podemos observar que este patrón es heterogéneo probablemente por la heterogeneidad de la población y el comportamiento biológico intrínseco de los tumores

Al relacionarlo con el fenotipo de cáncer, en la **(Tabla 6)** podemos observar que el nivel de ct ADN es de 1125 ng/μl en la paciente con fenotipo Luminal B Her 2 + (positivo) que se sometió a Cirugía más quimioterapia adyuvante, que se conoce en la literatura es un fenotipo que tiene un comportamiento biológico más agresivo con relación a fenotipo Luminal A como se comentó previamente mostrando una reducción de la concentración de ctDNA de mas del 100%

<b>Tabla 6. Análisis de relación entre el fenotipo de cáncer de mama con el ct ADN en suero inicial y a los 6 meses*</b>			
<b>n = 5 # muestra</b>	<b>Concentración de ct ADN en suero inicial (ng/mcl)</b>	<b>Concentración de ct ADN en suero a los 6 meses (ng/mcl)</b>	<b>Fenotipo</b>
1	55	13	Luminal A
2	290	168	Luminal A
3	1125	6.6	Luminal B HER2 + (positivo)
4	1252	15.8	Luminal A
5	993	180	Luminal A



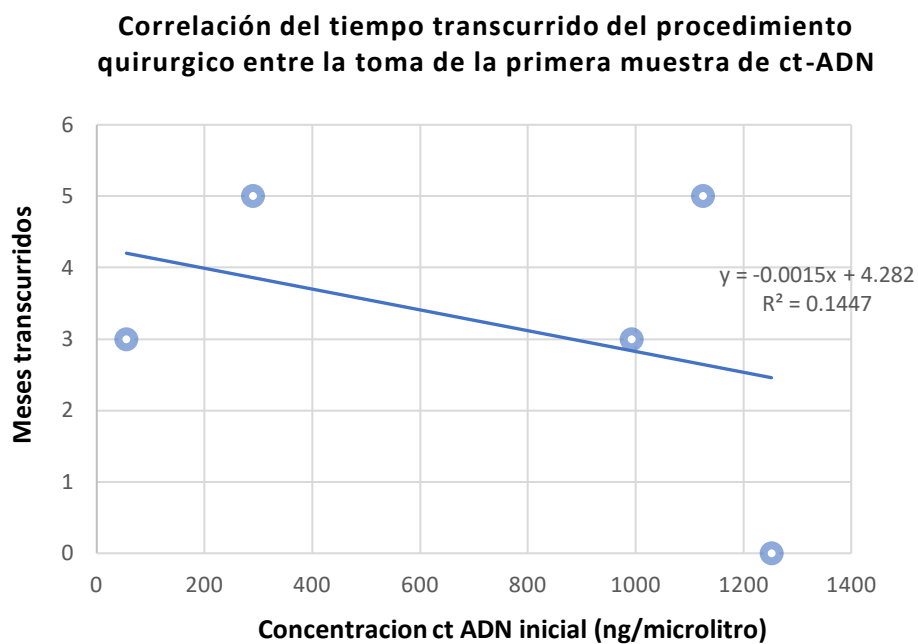
\*El ct ADN se extrajo mediante la técnica de trizol y se cuantificó espectrofotométricamente en el equipo NanoPhotometer versión 7122 V2.4.2 marca INPLEN  
 -En color azul se muestra la paciente con diagnóstico de cancer de mama Luminal B her 2 + (positivo) que recibió terapia blanco y el nivel de concentración de ct ADN inicial y a los 6 meses

<b>Tabla 7. Análisis de relación entre la etapa clínica inicial del cancer de mama con el ct ADN en suero inicial y a los 6 meses*</b>			
<b>n = 5 # muestra</b>	<b>Etapa clínica</b>	<b>Concentración de ct ADN en suero inicial (ng/mcl)</b>	<b>Concentración de ct ADN en suero a los 6 meses (ng/mcl)</b>
1	IIIA	55	13
2	IIB	290	168
3	IIA	1125	6.6
4	IA	1252	15.8
5	IA	993	180

\*El ct ADN se extrajo mediante la técnica de trizol y se cuantificó espectrofotométricamente en el equipo NanoPhotometer versión 7122 V2.4.2 marca INPLEN  
 -En color azul se muestra la paciente con diagnóstico de cancer de mama Luminal B her 2 + (positivo) que recibió terapia blanco y el nivel de concentración de ct ADN inicial y a los 6 meses  
 -La etapa clínica se basa en la clasificación de la AJCC 8va edición

Otros de los aspectos de relevancia en el campo de oncología, así como en el aspecto del pronóstico de las pacientes con cáncer de mama es la etapa clínica al momento del diagnóstico, en la Tabla 7 se muestra un análisis de la relación entre la etapa clínica y los cambios en la concentración de ctDNA, vemos que de forma global al igual que lo comentado para los otros parámetros, hubo una reducción significativa en los niveles de concentraciones de ctDNA, llama la atención que el nivel de concentración inicial no está relacionado de forma directa con la etapa clínica, vemos desde tumores en etapas tempranas IA con valores altos de ctDNA y pacientes con etapas localmente avanzadas con niveles mas bajos, esto puede explicarse por diferentes mecanismos, sin embargo como se mencionó previamente debe estar influenciado por el comportamiento biológico de los tumores

A partir de las fechas de toma de muestra y del procedimiento quirúrgico se analizó un análisis de regresión lineal simple descrita en la Grafica1. Sin embargo, los datos no presentan un comportamiento de esta naturaleza que pueda describirse con la cantidad de datos actuales como consistente.



**Grafica 1.** Se realizó un análisis de regresión lineal por dispersión entre el tiempo transcurrido del procedimiento quirúrgico y la toma de muestra de ct ADN sin encontrar relación entre la concentración de ct ADN obtenida. N = 5; el valor de correlación lineal  $R^2 = 0.1447$ .

## VIII. DISCUSIÓN.

El cáncer de mama en sus diferentes subtipos representa la neoplasia mas frecuente diagnosticada en el mundo, según las ultimas estimaciones de GLOBOCAN 2020 (1) han sido muchos los avances que se han ido desarrollando en los aspectos de screening, aspectos diagnósticos, conocimiento de la biología molecular y en el desarrollo de tratamiento con enfoque en medicina personalizada

En los momentos actuales, el enfoque en las investigaciones aparte de las estrategias de tratamiento es establecer elementos pronósticos y predictivos para las pacientes, tal es el caso de la cuantificación y caracterización de las células tumorales circulantes a través de diferentes mecanismos como el caso de la biopsia liquida para detectar fragmentos de ADN de células tumorales circulantes y establecer estos elementos como factores pronóstico y predictivos de respuesta a tratamiento. Las Células tumorales circulantes como biomarcadores presentan características genéticas derivadas del tumor primario que pueden dar a conocer la situación actual de la enfermedad y la toma de decisiones medicas a través de procedimientos clínicos no invasivos para pacientes. (21)

En el seguimiento de las pacientes de nuestra población incluida, observamos algunos patrones importantes a destacar, vemos que de forma global hubo una reduccion proporcional en la concentración de fragmentos de DNA de celulas tumorales circulantes, rondando esta disminución el 83%, todo esto relacionado en mayor o menor manera a las estrategias de tratamiento empleada para cada paciente en particular, Estos resultados concuerdan con la publicación de Brigitte y colaboradores en 2014 en donde obtenian muestras de ctDNA previo y posterior al tratamiento de quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama etapa temprana y se encontró una diferencia de aproximadamente del 10% de celulas tumorales circulantes posterior a finalizar la quimioterapia adyuvante comparada con la muestra tomada de forma inicial. Además se establece que la medición de las

celulas tumorales circulantes tienen relevancia como factores pronósticos independientes de otros elementos clinico patológicos conocidos (22).

De acuerdo con nuestro estudio, la población presenta un comportamiento sociodemográfico común (**Tabla 1**), al analizar el tipo histológico y las características clínicas se determinó que el estado de Her2/Neu positivo obtenido después de quimioterapia adyuvante dio como resultado mayores concentraciones de ct ADN respecto a fenotipo Luminal A, por lo cual se podría considerar el parámetro de inmunofenotipo tumoral como una característica patológica a tener en cuenta (**Tabla 6**). Lo anterior empata con referencia a lo descrito a Yidong Z. et quienes encontraron que el ct ADN se detectó con mayor frecuencia en pacientes localmente avanzados / metastásicos y fenotipos no luminales (15) en cuanto a lo mostrado en nuestro en este estudio. Además se observa en este subtipo específico de cancer de mama que hubo una reducción de mas del 100% en las concentraciones de ctDNA, esto inferimos relacionado al efecto de la quimioterapia adyuvante y la terapia blanco indicada en esta paciente.

De igual forma la paciente registrada con la concentración inicial mas alta de ctDNA presentó una reducción de dicha concentración importante de 1252 ng/ microlitro a 15.8 ng/microlitro representando una reducción del 99%, esto al igual relacionado a todas las estrategias de tratamiento implementadas en la paciente. Este patrón de presentación en los tumores luminales es el mismo reportado por Brigitte y colaboradores en 2014 (22) en donde las pacientes con este subtipo molecular presentaron mayor porcentaje inicia de células tumorales circulantes comparadas con las no luminales .

Julia Lehner et al, llevó a cabo un estudio de observación prospectivo en un grupo homogéneo de pacientes con cáncer de mama confinado localmente que estaban tratados con quimioterapia neoadyuvante, este enfoque dio como resultado un excelente escenario para la investigación de biomarcadores séricos medidos en momentos definidos durante el tratamiento y la correlación con respuesta a la terapia objetivada por inmunohistoquímica

en el momento de la resección del tumor (15). Moss J. et al, demostró que el cfDNA (ADN circulante libre) de mama previo al tratamiento se detectó en pacientes con enfermedad localizada con una sensibilidad del 80% con una especificidad del 97%. Los niveles elevados de cfDNA de mama se asociaron con perfiles tumorales moleculares agresivos y actividad metabólica de la enfermedad. Durante la quimioterapia neoadyuvante, los niveles de cfDNA de mama disminuyeron drásticamente. Es importante destacar que la presencia de cfDNA de mama hacia el final del régimen de quimioterapia reflejó la existencia de enfermedad residual (14).

En referencia a nuestros resultados, a pesar de que los datos son reducidos, la quimioterapia muestra un impacto positivo en la disminución de la concentración de ctADN, como se mostró en la **Tabla 7**, por lo que es importante dar seguimiento a estas pacientes y continuar con el reclutamiento para un análisis a profundidad con la intención de evaluar significancias estadísticas. Hasta el momento los datos no permiten establecer una relación lineal directa entre el tipo de tratamiento y la concentración de ctADN . Del mismo modo será relevante la inclusión de pacientes que no cursen con la enfermedad a manera de grupo control.

Como se comentó previamente existe una reducción global importante en términos porcentuales de las concentraciones de ctDNA previo y posterior a recibir algún tipo de tratamiento sistémico, sin embargo es difícil establecer el beneficio real de cada intervención independiente por lo pequeña de la población y además sería importante el seguimiento en el tiempo de estas pacientes para definir si existe algún tipo de relación con la presentación de recaídas locales o metastásicas relacionadas a las concentraciones de ctDNA.

Todas las pacientes de esta cohorte recibieron tratamiento locoregional quirúrgico y de radioterapia, además el 100% de las pacientes se mantienen recibiendo tratamiento con hormonoterapia como estándar de tratamiento por 5 años, entonces es difícil establecer aun en este punto el efecto de cada intervención individual, así como la relación entre los cambios de la concentración de DNA circulante tumoral relacionada con cada intervención.

Nuestros resultados dan pauta para subsecuentes investigaciones para establecer el valor real predictivo y pronóstico de la biopsia líquida para ser aplicado como una herramienta en la población con cáncer de mama del servicio de Oncología Médica adultos del centro medico nacional 20 de noviembre. En las investigaciones posteriores se recomienda incluir un numero mayor de pacientes que puedan ser representativas para establecer significancia estadística para intervenciones precisas

## IX. CONCLUSIONES.

- 1- Se logró revisar el comportamiento de la concentración de células tumorales circulantes de 5 pacientes con cáncer de mama antes de recibir tratamiento sistémico adyuvante y posterior a esto (6 meses después)
- 2- La mediana de edad de esta población es de aproximadamente 60 años, con tumores luminales en el 100% de los casos con enfermedad desde localizada hasta localmente avanzada con tumores con grado de diferenciación intermedio en el 75% de los casos
- 3- Se reportó una reducción global de las concentraciones de ctDNA en el 100% de las pacientes con una disminución promedio del 83.5%
- 4- Se observó que las pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante como parte de la estrategia de tratamiento presentaron porcentajes de reducción de las concentraciones de ctDNA bastante significativo que ronda entre el 75 y 100%.
- 5- Se observó que la paciente con subtipo molecular HER2 positivo presentó una reducción porcentual importante de mas de 100% en las concentraciones de ctDNA, partiendo de que son tumores de comportamiento mas agresivo esto podría representar un patrón de respuesta asociado al tratamiento dirigido con terapia blanco contra HER2
- 6- No se puede establecer la relación de la reducción de las concentraciones de ctDNA con otras intervenciones específicas como el efecto aislado que puede agregar la hormonoterapia y la radioterapia ya que fueron recibidas por el 100% de las pacientes y no existe un grupo control comparador.
- 7- Esta investigación genera base para realizar futuras investigaciones en este campo con reclutamiento de un numero mayor de pacientes para establecer la significancia estadísticas de los hallazgos descriptivos comentados.

## X. REFERENCIAS

1. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020. [homepage on the internet]; 2020 [cited 2021 Oct 2021]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
2. J. Cárdenas-Sánchez et al , Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario Novena revisión • Colima 2021
3. Ferlay J, Soerjomataram I. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Journal of Cancer*. 2015.
4. Vara-Salazar E de la, Suárez-López L, Ángeles-Llerenas A, Torres-Mejía G, Lazcano-Ponce E. Tendencias de la mortalidad por cáncer de mama en México, 1980-2009. *Salud Pública de México. Instituto Nacional de Salud Pública*; 53(5):385–93.
5. Vara-Salazar E de la, Suárez-López L, Ángeles-Llerenas A, Torres-Mejía G, Lazcano-Ponce E. Tendencias de la mortalidad por cáncer de mama en México, 1980-2009. *Salud Pública de México. Instituto Nacional de Salud Pública*; 53(5):385–93.
6. Cree IA, et al. *J Clin Pathol* 2014;67: 923–931. doi:10.1136/jclinpath-2014-202404
7. ref Howell JA, Khan SA, Knapp S, Thursz MR, Sharma R. The clinical role of circulating free tumor DNA in gas- trointestinal malignancy. *Transl Res* 2017; 183: 137- 154.
8. Santiago R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: Presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*, vol 61, núm. 2,2020



9. Bettegowada C, Sausen M, Leary RJ. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl*, 2014.
10. Paolo D'Amico et al. The use of liquid biopsy in early breast cancer: clinical evidence and future perspectives, *J Cancer Metastasis Treat* 2021;7:3.
11. Uttley L, Whiteman BL, Woods HB, Harnan S, Philips ST, Cree IA. Building the evidence base of blood-based biomarkers for early detection of cancer: A rapid systematic mapping review. *EBioMedicine*. 2016;10:164–73. )
12. A DNA Methylation-Based Test for Breast Cancer Detection in Circulating Cell-Free DNA. *J. Clin. Med.* 2018, 7(11), 420.
13. Silva JM, Silva J, Sanchez A, et al. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clin Cancer Res* 2002;8:3761-6. )
14. Z. Jin, W.S. El-Deiry Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4 (2005), pp. 139-163.
15. A DNA Methylation-Based Test for Breast Cancer Detection in Circulating Cell-Free DNA. *J. Clin. Med.* 2018, 7(11), 420.
16. Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes Involved in Critical Regulatory Pathways for Developing a Blood-Based Test in Breast Cancer. *PLoS ONE* 6(1): e16080.
17. Lebofsky R, Decraene C, Bernard V. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol* 9:783–790, 2015.

18. Larsson N, Åke Borg, Hodgso S, Sinilnikova O, Niklas Loman, Trudy McDevitt, Clemens Müller-Reible and Ulf Kristoffersson EMQN Best Practice Guidelines for Molecular Genetic Analysis in Hereditary Breast/Ovarian Cancer. These draft guidelines were prepared on behalf of EMQN by following discussions at the EMQN workshop, 24-25 October 2007, Würzburg, Germany
  
19. Meindl A, Ditsch N, Kast K, Rhiem K, Rita K. Schmutzler. Hereditary Breast and Ovarian Cancer. New Genes, New Treatments, New Concepts Medicine Deutsches Ärzteblatt International | Dtsch Arztebl Int 2011; 108(19): 323–30
  
20. Dutil J, Golubeva VA. The spectrum of BRCA1 and BRCA2 alleles in Latin America and the Caribbean: a clinical perspective Breast Cancer Res Treat (2015) 154:441–453. DOI 10.1007/s10549-015-3629-3
  
21. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. Breast Cancer Res. 2009;11(4): R46. doi: 10.1186/bcr2333. Epub 2009 Jul 9. PMID: 19589136; PMCID: PMC2750105.)
  
22. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LA, Cronin KA. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. J Natl Cancer Inst. 2014 Apr 28;106(5):dju055. doi: 10.1093/jnci/dju055. PMID: 24777111; PMCID: PMC4580552.