



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

CENTRO MÉDICO NACIONAL

HOSPITAL "20 DE NOVIEMBRE" ISSSTE

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

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA

P R E S E N T A

DR. GEOVANNY ISRAEL DESTRUJE MOLINA

ASESORA: DRA. AURA A. ERAZO VALLE SOLÍS.

CO-ASESORA DRA. REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA.

CIUDAD DE MÉXICO, 2020



ISSSTE

REGISTRO: 093.2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

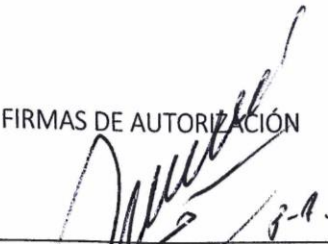
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

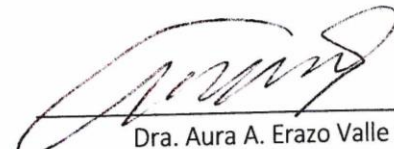
FIRMAS DE AUTORIZACIÓN



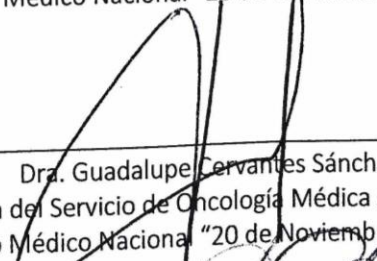
Dr. Mauricio Di Silvio López
Subdirector de Enseñanza e Investigación
Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE



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. Geovanny Israel Destruge Molina
Residente

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a todas las personas que me han apoyado a lo largo del camino, no hay palabras que puedan expresar la gratitud que siento hacia mi familia, amigos y maestros. Espero poder retribuir a la vida un poco de lo mucho que he recibido.

Por el apoyo otorgado a través del financiamiento institucional mediante el Programa Presupuestal E-015 “Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico en salud” ISSSTE.

INDICE

I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	6 - 10
III. ANTECEDENTES	10 - 14
IV. PROBLEMA	15
V. HIPOTESIS	16
VI. OBJETIVO	17
VII. JUSTIFICACION	18
VIII. MATERIAL Y METODOS	19
IX. RESULTADOS	25
X. DISCUSIÓN	31
XI. CONCLUSIONES	33
XII. REFERENCIAS	34
XIII. ANEXOS	37

I. RESUMEN.

INTRODUCCIÓN: El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea causada por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas. Es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial y en México. El ctADN en el plasma se utiliza ampliamente para la investigación básica y clínica, incluidos los estudios oncológicos y representa un potencial biomarcador no invasivo para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes oncológicos.

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 80%, y además un 40% quimioterapia adyuvante. El promedio de concentración ctADN inicial (ng/ μ L) en suero fue de 680.5 ng/ μ L, con un promedio de relación de absorbancia 260/280 de 0.78 nm.

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.

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea causada por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas. Es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial y en México. Se estima una incidencia a nivel mundial de 43.1 casos por 100,000 habitantes al año y una prevalencia a 5 años 6,232.108 casos, en México la incidencia se estima en 35.4 casos por 100,000 habitantes al año, una prevalencia a 5 años de 75,529 casos con una tasa de mortalidad de 9.7 muertes por cada 100,000 habitantes al año (1).

Se ha descrito un incremento progresivo de la mortalidad por cáncer de mama en las mujeres mexicanas, constituyéndolo en un problema de salud pública importante. Así mismo la transición demográfica que se observa a través del territorio nacional marca diferencias importantes a nivel regional (2). Un ejemplo son los estados del norte del país, el Distrito Federal y Jalisco donde el acceso a una dieta rica en grasa que favorece el sobrepeso y donde el nivel socioeconómico de la población es mayor al resto del país y estos factores de riesgo para cáncer de mama podrían dar cuenta de las tasas de mortalidad más altas en estas regiones siendo en 2010 de 13.4% para la CdMX, 12.4% Estado de México, 8.2% Jalisco, 6.4% Veracruz y 6% Nuevo León (3).

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 (3). 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 (4). Por lo anterior se hace evidente la necesidad de mejorar el diagnóstico y continuar con la búsqueda de marcadores pronósticos y otros biomarcadores.

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 (5). Recientemente el empleo de nuevas técnicas y sobretodo la necesidad de mejorar la calidad de vida, reduciendo la invasividad de los métodos diagnósticos, ha permitido el desarrollo de técnicas de vanguardia, como lo es la biopsia líquida.

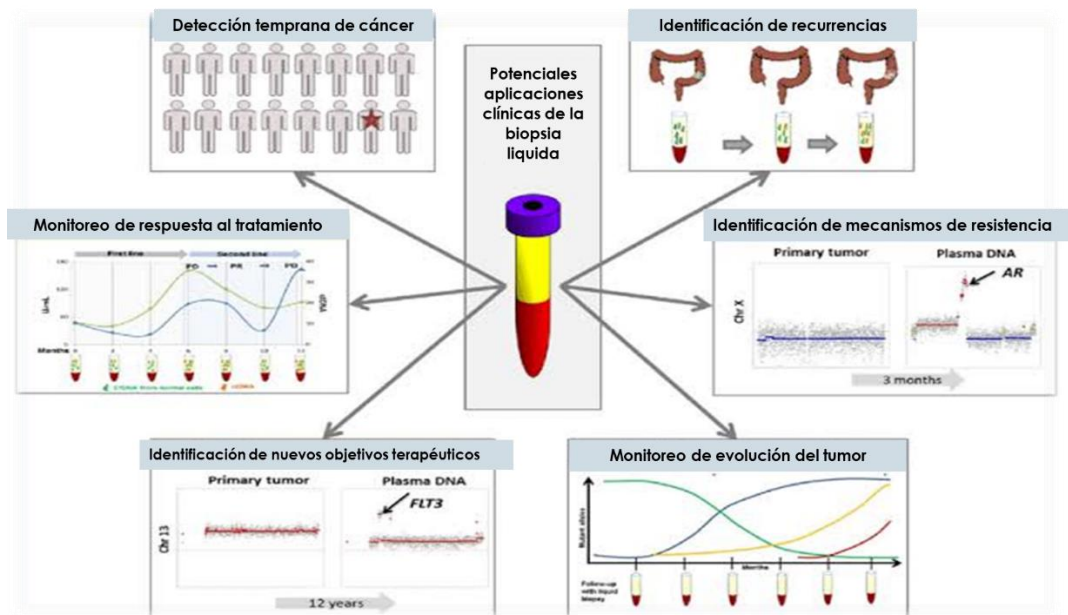


Imagen 1. Aplicaciones potenciales de la biopsia líquida. Modificado de Perakis, *Advances in Clinical Chemistry*, 2017

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.

Todavía existe una inseguridad considerable 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 que 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 status 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 (6).

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 (7).

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 (8).

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.

Métodos de detección de mutaciones en ctADN por PCR-RT y NGS

La secuenciación masiva es una herramienta que permite conocer las mutaciones puntuales en genes vinculados a diagnóstico temprano, y principalmente el uso de ctADN, como biopsia líquida de sangre periférica, se considera recientemente una forma no invasiva, eficiente y determinante para la detección de mutaciones (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 flanqueo 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).

III. ANTECEDENTES

Las herramientas para detectar el cáncer de mama también tienen aplicaciones importantes para monitorear la respuesta al tratamiento y detectar la recaída de la enfermedad.

Las moléculas de ADN libre de células (cfDNA) que circulan en la sangre están emergiendo como importantes biomarcadores no invasivos para el seguimiento de procesos fisiológicos y

patológicos, incluido el cáncer. Los individuos sanos tienen concentraciones bajas de cfDNA, con concentraciones más altas en patologías como el cáncer (19).

Un biomarcador potencial es el ADN tumoral circulante (ADNtc), que se deriva de la necrosis, la apoptosis y las secreciones de las células tumorales y puede detectarse en la sangre periférica (22)

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 (22).

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 (18).

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 (18).

Yidong Zhou, muestra resultados de un 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 (22)

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) (23).

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 aromatasa 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 la opciones terapéuticas, con cada nuevo esquema el intervalo libre de progresión esperado es más corto (10).

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 colorectal, gástrico, pancreático, prostático, biliar, de vías urinarias y vesicular (12)

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 (13).

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 (14). 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.

IV. 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?

V. 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.

VI. 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 pronóstico durante seis meses.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Reclutamiento de pacientes diagnosticados con cáncer 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

VII. 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 las 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 pronóstico 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.

VIII. 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.

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

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 a emplear.

INFORMACIÓN CLÍNICA

A los sujetos de estudio se les aplicará un cuestionario, asistido por oncólogos y diseñado para dicho propósito, el cual se realizará 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 realizará una evaluación clínica general y posteriormente una más específica respecto a los sitios de metástasis, 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

Deberán colectarse 15mL de sangre periférica del paciente en la primera consulta de invitación a participar en el protocolo y 6 meses después, independientes a su estadio de cáncer o su tratamiento previo.

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.

Tipo de órgano metastásico: Se realizará por estudios de imagen y/o resonancia magnética, con registro de características como tipo y número de órganos involucrados, así como localización, tamaño y número de lesiones metastásicas.

ANALISIS 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 cuales incluyen la desviación estándar de la media y la media.

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

En cuánto se cuente con un mayor número de muestras y se requiera de la comparación entre la primera toma y la realizada a los seis meses, podrá emplearse una t-student pareada, considerando ambos momentos del tiempo como grupos independientes, de varianzas iguales.

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.

IX. RESULTADOS.

El protocolo se realizó a partir de su autorización con número de registro **RPI: 093.2019**, solicitando a los 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 estudio se incluyeron 5 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, se recolectó la muestra de ctADN en el periodo de Marzo de 2020 a Septiembre de 2020 y 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
Edad promedio ± D.E.	60.4 ± 12.32
Sexo	
Masculino	0
Femenino	5
Comorbilidades	
Diabetes mellitus 2	0
Hipertensión arterial sistémica	1
HTA + DMT2	1
Ninguna	3
ECOG inicial	
ECOG 0	0
ECOG 1	5
ECOG 2	0
ECOG 3	0
ECOG 4	0
*Información obtenida de los expedientes clínicos en consulta al SIHA durante un periodo de 2019 a 2020	
D.E. = Desviación estándar	
HTA= Hipertensión Arterial Sistémica	
DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2	
ECOG: Escala Eastern Cooperative Oncology Group	

De los pacientes con cáncer de mama reclutados (**Tabla 1**) todas fueron mujeres con una media de edad de 60.4 años, una de ellas con Diabetes Mellitus tipo 2 e Hipertensión arterial Sistémica, la mayoría sin comorbilidades y el 100% con un adecuado estado funcional ECOG 1.

También se revisó en el expediente la información correspondiente a las características clínicas y patológicas de la población (**Tabla 2**) La diferenciación tumoral más frecuente fue la moderadamente diferenciada correspondiendo a 3 de los 5 casos; se observaron etapas tumorales entre II y III; El inmunofenotipo más frecuente fue el Luminal A correspondiendo al 80% de los casos, seguido de Luminal B Her 2 Positivo. También se describe el tipo de tratamiento recibido y la supervivencia libre de enfermedad (**Tabla 3**) En la mayoría de las pacientes 4/5 se realizó el

procedimiento quirúrgico Mastectomía Radical/Cirugía conservadora de mama antes de la fecha de toma de la muestra así como 2 de las cuales recibieron además tratamiento con Quimioterapia adyuvante; obteniendo un promedio de supervivencia libre de enfermedad a partir del diagnóstico de 6.75 meses.

Tabla 2. Característica clínicas y patológicas de la población de estudio*	
	n = 5
Subtipo Histológico	
Adenocarcinoma ductal bien diferenciado	1
Adenocarcinoma ductal moderadamente diferenciado	3
Adenocarcinoma ductal pobremente diferenciado	0
Adenocarcinoma lobulillar	1
Etapa tumoral	
Etapa 0	0
Etapa I	2
Etapa II	2
Etapa III	1
Etapa IV	0
Fenotipo	
Luminal A	4
Luminal B HER 2 Negativo	0
Luminal B HER 2 Positivo	1
Enriquecido Her 2	0
Triple Negativo	0
*Información obtenida de los expedientes clínicos en consulta al SIHA durante un periodo de 2019 a 2020	

Tabla 3. Supervivencia libre de enfermedad y Tratamiento recibido*	
	n = 5
Tratamiento Recibido**	
Cirugía Conservadora de mama/Mastectomia Radical	4
Radioterapia Adyuvante	0
Quimioterapia Neoadyuvante	0
Quimioterapia Adyuvante	2
Cirugía de mama + Quimioterapia + Radioterapia	0
Cirugía de mama + Radioterapia	0
Cirugía de mama + Quimioterapia	2
Supervivencia libre de enfermedad a partir de DX ± D.E.***	6.75 ± 4.34 meses
*Información obtenida de los expedientes clínicos en consulta al SIHA durante un periodo de 2019 a 2020	
**El Tratamiento recibido se definió como el recibido antes de la fecha de la toma de muestra	
***La supervivencia libre de enfermedad se considera el intervalo de tiempo desde el diagnóstico hasta recurrencia de enfermedad o muerte por cancer	
D.E. = Desviación estándar	

Extracción y Cuantificación de ct ADN

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 IMPLÉN. 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*		
n = 5 # muestra	Concentración ct ADN inicial (ng/microlitro)	Relación 260/280 nm
1	55	0,943
2	290	1,051
3	1125	0,084
4	1252	0,978
5	993	0,853
Promedio ± D.E.	680.5 ± 596.63	0.78 ± 0.39

***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**
D.E. = Desviación estándar
ct = tumoral circulante

En la (Tabla 4) se presentan datos de la concentración de ct ADN 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.

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 u hormonoterapia tomando en consideración las fechas en referencia a la toma de muestra.

En la **(Tabla 5)** podemos evidenciar que el nivel de concentración de ct ADN en suero es de 55 ng/μl en la paciente 1 Luminal A que recibió tratamiento con cirugía más quimioterapia adyuvante así mismo se observan niveles mayores de ct ADN 1125 ng/μl en la paciente 3 con fenotipo Luminal B Her 2 + (positivo) que se sometió a Cirugía más quimioterapia adyuvante; por último la paciente 4 Luminal A sin ningún tratamiento previo el nivel de ct ADN fue de 1252 ng/μl.

Tabla 5. Análisis de tipo de Tratamiento recibido en relación con el ct ADN en suero*					
n = 5 # muestra	QX	QT	HT	RT	Concentración ct ADN (ng/microlitro)
1	SI	SI	NO	NO	55
2	SI	NO	NO	NO	290
3	SI	SI	NO	NO	1125
4	NO	NO	NO	NO	1252
5	SI	NO	NO	NO	993

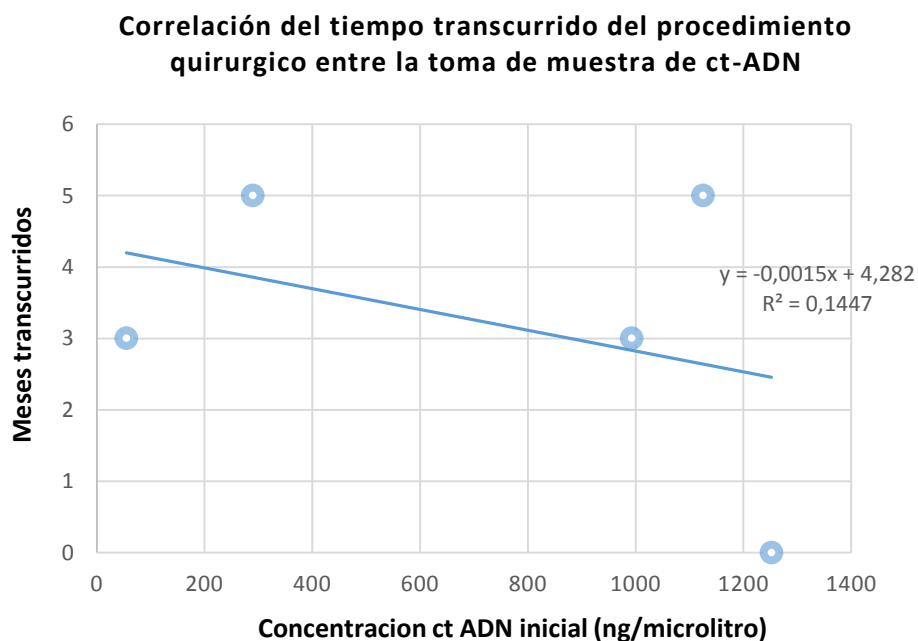
*El ct ADN se extrajo mediante la técnica de trizol y se cuantificó espectrofotométricamente en el equipo NanoPhotometer versión 7122 V2.4.2 marca INPLEN
 ct = tumoral circulante; ng = nanogramos; QX = Cirugía de mama conservadora o radical; QT = Quimioterapia esquemas Antraciclina más Taxano; HT = Hormonoterapia; En color rosa se muestran las 2 pacientes que se sometieron a cirugía de mama y quimioterapia previa a toma de muestra de ct ADN; En color Gris se muestran la paciente que NO se sometió a ningún tipo de tratamiento previa a toma de muestra de ct ADN

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 3 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 en relación a fenotipo Luminal A.

Tabla 6. Análisis de relación entre el fenotipo de cáncer de mama con el ct ADN en suero*		
n = 5 # muestra	Concentración de ct ADN en suero	Fenotipo
1	55	Luminal A
2	290	Luminal A
3	1125	Luminal B her 2 + (positivo)
4	1252	Luminal A
5	993	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 verde se muestra la paciente con diagnóstico de cancer de mama Luminal B her 2 + (positivo) y el nivel de concentración de ct ADN

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 este 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 $R^2 = 0.1447$.

X. DISCUSIÓN.

Se sabe que el desarrollo del cáncer está asociado con una alta proliferación celular que inicialmente se compensa con altas tasas de muerte celular apoptótica activa y más tarde con tasas crecientes de muerte celular necrótica pasiva cuando el tumor se desdiferencia y se vuelve invasivo (16).

Hasta la fecha, los marcadores pronósticos y predictivos se basan principalmente en los tejidos. Además del tamaño del tumor, el estado de los ganglios linfáticos y la metástasis y la clasificación de las células tumorales, se utilizan diversos marcadores inmunohistológicos, en particular para el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (PR), Her2 / neu y Ki67 para estratificar el riesgo de recaída del paciente (17).

Se necesitan con urgencia biomarcadores predictivos de respuesta a la quimioterapia neo/adyuvante.

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 (22) en cuánto a lo mostrado en nuestro en este estudio.

Igualmente en nuestros hallazgos se encontró una menor concentración de ct ADN en suero después del tratamiento adyuvante con quimioterapia en una paciente con cáncer de mama Luminal A indicando que podría ser utilizado como biomarcador predictivo de respuesta sin embargo se requieren más datos al respecto (**Tabla 7**).

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 (18).

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 (**Gráfica 1**).

Del mismo modo será relevante la inclusión de pacientes que no cursen con la enfermedad a manera de grupo control.

El presente estudio tiene un marcado carácter exploratorio, se midió la concentración de ct ADN en diferentes momentos durante la terapia para determinar su capacidad para anticipar o indicar la respuesta a la terapia en un grupo limitado de pacientes, los hallazgos de este estudio deben ser confirmados por estudios de validación independientes.

XI. CONCLUSIONES.

Los resultados de este estudio prospectivo y exploratorio indican que las concentraciones de ct ADN 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 y evaluar la utilidad de este nuevo enfoque como una rutina en el entorno clínico.

XII. REFERENCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Journal of Cancer*. 2015.
2. 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.
3. Palacio-Mejía L. diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud pública*, 2009.
4. Bernard-Marty, C., Cardoso, F., & Piccart, M. J. (2004). Facts and controversies in systemic treatment of metastatic breast cancer. *The Oncologist*, 9(6), 617-632.
5. Gasparini G, Pozza F, Harris AL. Evaluar la utilidad potencial de nuevos indicadores pronósticos y predictivos en pacientes con cáncer de mama con ganglios negativos. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85 (15): 1206.
6. Cree IA, et al. *J Clin Pathol* 2014;67: 923–931. doi:10.1136/jclinpath-2014-202404
7. Bettegowada C, Sausen M, Leary RJ. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl*, 2014.
8. 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.

9. Schwarzenbach H, Dave S. B. Hoon and Klaus Pantel. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Institute of Tumour Biology, Center of Experimental Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg 20246, Germany Published 12 May 2011. Vol 11 doi:10.1038/nrc3066
10. 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
11. 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
12. 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
13. André F, Bachelot T, Commo F, y col. Sistema de hibridación genómica comparada y secuenciación de ADN para el tratamiento directo del cáncer de mama metastásico: un ensayo prospectivo multicéntrico (SAFIR01 / UNICANCER). Lancet Oncol 2014; 15: 267.
14. Cancer Genome Atlas Network. Retratos moleculares completos de tumores de mama humanos. Nature 2012; 490: 61.
15. Lehner J. Circulating plasma DNA and DNA integrity in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. Epub 2013 Aug 2.

16. Z. Jin, W.S. El-Deiry Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4 (2005), pp. 139-163.
17. D.A. Berry, K.A. Cronin, S.K. Plevritis, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med*, 353 (2005), pp. 1784-1792.
18. Circulating breast-derived DNA allows universal detection and monitoring of localized breast cancer. *Ann Oncol*. 2020 marzo; 31 (3): 395-403.
19. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* volume 11, pages 426–437(2011).
20. A DNA Methylation-Based Test for Breast Cancer Detection in Circulating Cell-Free DNA. *J. Clin. Med*. 2018, 7(11), 420.
21. Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes Involved in Critical Regulatory Pathways for Developing a Blood-Based Test in Breast Cancer. *PLoS ONE* 6(1): e16080.
22. Clinical factors associated with circulating tumor DNA (ctDNA) in primary breast cancer. *Molecular Oncology*. 23 January 2019. DOI: 10.1002/1878-0261.12456.
23. Circulating tumor DNA for triple-negative breast cancer diagnosis and treatment decisions. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 17 November 2015. DOI: 10.1586/14737159.2016.1121100.

XIII. ANEXOS

AVISO DE PRIVACIDAD

Título protocolo: "Identificación de fragmentos de ADN tumoral circulante en pacientes con cáncer de mama y su respuesta al tratamiento."

Número de registro:

El presente Aviso de Privacidad tiene como objeto informarles sobre el tratamiento que se le dará a sus datos personales cuando los mismos son recabados, utilizados y almacenados.

Nombre: **Aura Erazo Valle-Solís**

Domicilio: **Av. Félix Cuevas 540, Col. Del Valle, C.P. 03229, Delegación Benito Juárez, México, D.F.**

Teléfono: **52005003 ext** Correo electrónico: **aura.erazo@issste.gob.mx**

Su información personal será utilizada con la finalidad de contacto con usted para solicitar información de seguimiento de estado de salud; para lo cual requerimos obtener datos de su domicilio, correo electrónico, teléfono particular, de trabajo o celular, estos datos son considerados como sensibles de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares.

Es importante que usted sepa que todo el equipo de investigación que colabora en este estudio se compromete a que todos los datos proporcionados por usted serán tratados bajo medidas de seguridad y garantizando siempre su confidencialidad. En el caso de este proyecto las medidas que se tomaran para ello serán utilizar códigos, Iniciales, número de expedientes y se almacenarán en archivo electrónico a cargo del investigador principal.

Los datos que usted nos proporcione no serán compartidos con otras instancias o instituciones y únicamente serán usados por el equipo de investigadores para este proyecto.

Usted tiene derecho de acceder, rectificar y cancelar sus datos personales, así como de oponerse al manejo de los mismos o anular el consentimiento que nos haya otorgado para tal fin, presentando una carta escrita dirigida a el/ la investigador responsable Aura Erazo Valle-Solís o con la Presidente del Comité de Ética en Investigación del CMN "20 de Noviembre", Dra. Zoé Gloria Sondón García. Tel. 52003544 ó 523005003 Ext. 14631, comiteetica20nov@gmail.com.

DECLARACION DE CONFORMIDAD: Manifiesto estar de acuerdo con el tratamiento que se dará a mis datos personales

Nombre y firma del sujeto de investigación o paciente: _____

Fecha: _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, CDMX, a _____

Por de la presente yo: _____ autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado **"Identificación de fragmentos de ADN tumoral circulante en pacientes con cáncer de mama y su respuesta al tratamiento."**

Usted tiene un tipo de cáncer de mama. A pesar de algunos avances en la detección temprana, los tratamientos quirúrgicos y las nuevas estrategias en los tratamientos terapéuticos, el pronóstico de los pacientes con cáncer es muy pobre y se determina principalmente por el estudio de la enfermedad. El **objetivo** de este estudio es conocer la presencia de material genético y moléculas que participan en el establecimiento y desarrollo del cáncer de mama. Estas pruebas se realizan en un laboratorio de investigación, donde los datos personales y los resultados obtenidos son manejados con confidencialidad y discreción absoluta.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en responder las preguntas convencionales de historia clínica, así como donar material biológico siguiendo la indicación de mi médico. La donación se realizará de una muestra de 15mL de sangre periférica, este procedimiento se realizará al inicio de mi participación y 6 meses posteriores a la primera toma de muestra.

Los **beneficios** potenciales derivados del presente estudio son: 1) caracterizar cambios en el material genético (ctADN y mRNA) que se encuentre en circulación en sangre periférica 2) identificar patrones genéticos y/o moleculares en el tejido sitio-específico tumoral.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

Riesgos y molestias:

- a) Por la obtención de las muestras de sangre periférica: Representan un riesgo menor al mínimo, debido a que la toma de las muestras se realiza del mismo modo que las que son empleadas para sus estudios de laboratorio.
- b) Por la obtención de las muestras biopsia tejido sitio-específico tumoral: Es un procedimiento de riesgo mínimo, que se realiza durante la cirugía de obtención de biopsia indicada por el médico. No implica un riesgo o complicaciones adicionales a las inherentes al procedimiento quirúrgico indicado por su médico.

Beneficios: La donación de su muestra permitirá analizar la presencia de moléculas (ctADN, mRNA, ADN), el cual en un futuro podrá emplearse como un método de diagnóstico no invasivo para los pacientes con cáncer.

Participación: Entiendo que mi participación es voluntaria, y conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El investigador principal Dra. Aura Erazo Valle-Solis, se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar las dudas que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Así mismo, el investigador principal ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir la anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos (que tendrán mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de folio (NO empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

Datos del investigador principal a los cuales puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio: Dra. Aura Erazo Valle-Solis, Teléfono de contacto: 52005003. Domicilio de contacto: Av. Félix Cuevas 540, Col. Del Valle, C.P. 03229, Delegación Benito Juárez, México, D.F.

Investigador Responsable

Paciente

Investigador Asociado

Testigo

HOJA DE REGISTRO DE PROTOCOLO



ISSSTE
INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO



2019
A 100 AÑOS DEL NACIMIENTO DEL CAUDILLO
EMILIANO ZAPATA

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"
Dirección
Subdirección de Enseñanza e Investigación
Coordinación de Investigación

2019 "AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR, EMILIANO ZAPATA"

Oficio No. 96.2.2.1.3.2/402/2019

Asunto: **Aceptación de Protocolo**

Ciudad de México a 27 de Marzo de 2019

Dra. Aura A. Erazo Valle Solís
Investigador Responsable
Presente.

Le comunicamos, que su proyecto de investigación titulado: **Identificación de fragmentos de ADN tumoral circulante en pacientes con cáncer de mama y su respuesta al tratamiento**. Con Número **093.2019** folio de la jefatura de departamento de investigación como resultado de proceso de revisión, en el que integrantes de las Comisiones de Investigación, de Ética en Investigación y Bioseguridad del **Centro Médico Nacional "20 De Noviembre"**, aprobaron y dictaminaron **procedente** su realización.

A partir de este momento **será responsabilidad del investigador principal**, realizar a satisfacción los objetivos del proyecto aprobado, así como **dar cumplimiento de lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y a las buenas prácticas clínicas** que indican la Secretaría de Salud y el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado; deberá cumplir ante esta Coordinación y a los comités de Ética en Investigación y en su caso al de Bioética con los informes **semestrales** de la evolución del proyecto y de ser procedente del manejo de presupuesto, y si así lo amerita su investigación copia **de la carta de consentimiento bajo información de todos los pacientes** que participen, este consentimiento deberá incluir el número de expediente, dirección, dirección electrónica y teléfono de cada uno de los pacientes reclutados en el entendido de que esta información es **confidencial** y será susceptible de ser auditada por el comité de ética en investigación.

Es responsabilidad del investigador principal notificar sobre cualquier efecto adverso ocurrido en los pacientes en investigación tanto a la **Comisión de Ética a través de esta coordinación, al Comité de Farmacovigilancia como a la Secretaría de Salud (COFEPRIS) y en los formatos correspondientes** y tiempos obligatorios al tipo de evento a reportar.

Con el fin de dar cumplimiento a la reglamentación en investigación vigente en México y a la que estará obligado (a) es necesario acceda al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación, al "Consejo de Salubridad General, a la comisión para la Certificación de Establecimientos de Atención Médica, Estándares para la Certificación de Hospitales en Investigación" así como a la Comisión Nacional de Bioética.

Las autoridades de este **Centro Médico Nacional "20 De Noviembre"** están comprometidas con impulsar la investigación en salud bajo los más estrictos estándares científicos y éticos contemplados en la legislación Mexicana y en los tratados internacionales que se han suscrito por lo que le felicita por su interés en materia.

Deseándole que esta investigación cumpla los propósitos que se han planteado, sin otro particular, quedamos de usted.

Atentamente,

Vo. Bo.

Dr. Paul Mondragón Terán
Coordinador de Investigación

Dr. Mauricio Di Silvio López
Subdirector de Enseñanza e Investigación.

Dra. Aura A. Erazo Valle Solís
Aceptación del Investigador

Fecha:

c.c.p. Minuta de la Coordinación de Investigación
PMT/abg*