



UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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 Y CORRELACION CON EL
DIAGNOSTICO DE CANCER DE MAMA

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALIDAD EN ONCOLOGIA MÉDICA

P R E S E N T A

DRA. RUT DEL ALBA RODRIGUEZ REYES

ASESORA: DRA. AURA ARGENTINA ERAZO VALLE SOLÍS

CO-ASESOR: DRA. REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA

CIUDAD DE MÉXICO, 2020



ISSSTE



REGISTRO: 093.2019



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 Y CORRELACION CON EL
DIAGNOSTICO DE CANCER DE MAMA

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 Argentina 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

Dra. Rut del Alba Rodríguez Reyes
Residente

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a Dios por permitir la culminación de este proyecto y a todos los miembros de mi familia, por el apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida.

Especial mención a mi compañero de carrera Israel Destruge por su sincera amistad, nuestra asesora de tesis Dra. Rebeca Pérez por su dedicación y motivación durante la realización de nuestro estudio y a cada una de las pacientes que participaron en nuestro estudio.

Finalmente, a Eduardo Buendía Villar, mi mejor amigo y máspreciado regalo, Gracias por creer en mí y ser el apoyo incondicional.

INDICE

I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	6-11
III. ANTECEDENTES	11-17
IV. PROBLEMA	18
V. HIPOTESIS	19
VI. OBJETIVO	20
VII. JUSTIFICACION	21
VIII. MATERIAL Y METODOS	22-27
IX. RESULTADOS	28
X. DISCUSIÓN	34
XI. CONCLUSIONES	38
XII. REFERENCIAS	39
XIII. ANEXOS	45

I. RESUMEN.

INTRODUCCIÓN: El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial y en México. Es una enfermedad heterogénea causada por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas. 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: Se recolectaron la muestra de 5 pacientes con cáncer de mama etapa clínica temprana y localmente avanzada, de las cuales 100% fueron mujeres, la mediana de edad fue de 60.4 ± 12.32 años. Todas las pacientes fueron muestreadas con biopsias locales para su diagnóstico y analizadas en el Servicio de Patología, reportando que el subtipo histológico más frecuente fue adenocarcinoma ductal infiltrante moderadamente diferenciado con 60%, seguida de adenocarcinoma lobulillar infiltrante con 20%. El fenotipo molecular más frecuente fue Luminal A con 80%, seguida de Luminal B HER 2 positivo. De las muestras de sangre periférica obtenida de los pacientes de estudio, se extrajo el suero y el ADN circulante. 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: Las concentraciones de ctADN extraído de plasma de mujeres con cáncer de mama etapa temprana y localmente avanzado se podría utilizar como un biomarcador predictivo para la detección y monitoreo del cáncer de mama.

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama 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 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).

El incremento progresivo de la mortalidad por cáncer de mama en las mujeres mexicanas constituye 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 metastásica es de alrededor de 24 meses dependiendo de la etapa clínica inicial, el subtipo molecular de cáncer de mama y el tratamiento recibido (4).

El cáncer que es una enfermedad heterogénea causada por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas requiere de una detección temprana. La detección de biomarcadores para el análisis histopatológico constituyen un área prometedora en el campo de la oncología, tal es el caso de la biopsia líquida y la detección de ctADN, como un método no invasivo de diagnóstico.

Recientemente el empleo de nuevas técnicas y sobre todo 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.

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 sobre todo representar un método no invasivo, preventivo, aun cuando no se ha manifestado clínicamente la enfermedad.

La cantidad de ADN mutado en plasma varía ampliamente en pacientes con el mismo tipo de tumor, tamaño y estadio clínico. A través de la muestra de pueden detectar todas las alteraciones del tumor, pudiéndose demostrar la heterogeneidad de la enfermedad y ser útil para determinar el pronóstico (5).

Estudios recientes han demostrado que biomarcadores pueden detectar el cáncer en etapa temprana (6).

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 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 (7).

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 (8).

El ctADN es liberado por las diferentes masas tumorales y subclonas, explicando cómo el análisis de ctADN puede ser útil para descifrar la heterogeneidad genética en pacientes con enfermedad avanzada, en contraste con la biopsia de un tumor sólido, en el cual se evalúa solo una parte del territorio genético de un cáncer (9).

El nivel de ADN tumoral circulante (ctADN) y de células tumorales circulantes (CTC), se puede detectar con precisión en la sangre periférica de la mayoría de los pacientes con cáncer. Estos biomarcadores tumorales circulantes permiten crear una amplia gama de posibles aplicaciones clínicas, desde la detección del cáncer en etapa temprana hasta el manejo en etapa avanzada metastásica y poder así dilucidar puntos claves de los procesos biológicos involucrados en la metástasis del cáncer (10).

La presencia de ácidos nucleicos circulantes libres en la sangre fue descrita a mediados del siglo XX (11). El ADN libre circulante (cfADN) aislado del plasma, se deriva de células muertas y corresponde a fragmentos cortos de ADN (tamaño promedio de 170 pares de bases). En individuos sanos, la mayoría de las moléculas del cfADN se derivan de la médula ósea y glóbulos blancos (12). En pacientes con cáncer, una fracción variable de cfADN-llamado ctADN- se deriva de masas tumorales, posterior a la apoptosis y necrosis de las células cancerosas. Dependiendo de varios parámetros, principalmente la carga tumoral, los niveles de ctADN pueden variar desde 0.001% hasta más del 90% del ctADN (13).

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 (14).

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 (14).

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 sitio 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 (15).

III. ANTECEDENTES

En tumores sólidos como los del colon o mama, se ha demostrado que, en promedio, aproximadamente 80 genes albergan mutaciones sutiles que están presentes en prácticamente todas las células tumorales pero que no están presentes en células normales (18). Por tanto, estas mutaciones somáticas tienen el potencial de servir como biomarcadores altamente específicos. Son, en teoría, indicadores neoplásicos aún más específicos que cualquier otro biomarcador descrito hasta ahora (19). En años recientes el ctADN se ha utilizado para determinar mutaciones genómicas y poder elegir las terapias dirigidas a esas mutaciones (16, 17).

El diagnóstico precoz del cáncer de mama es fundamental para reducir la mortalidad asociada al cáncer de mama, sin embargo, su importancia varía según los diferentes tipos y etapas de la enfermedad. Para los estadios II y III, la progresión es mucho más rápida que en estadio I. Como resultado, la supervivencia global y el pronóstico de estas pacientes puede mejorar considerablemente si se diagnostican temprano mientras el tamaño del tumor sea menor de 2 cm (20).

Bettegowda et al, publicaron un estudio con 640 pacientes de distintos tipos y estadios de cáncer, con tasas de detección de ctADN del 73% en pacientes con cáncer colorrectal, 57% gastroesofágico, 50% en mama y 48% en páncreas (8). Se ha demostrado que la detección preoperatoria de ctADN se correlaciona con un peor resultado en cáncer de mama con mutación de PI3KCA (21).

El cáncer de mama en estadio temprano generalmente es curable; sin embargo, su detección es un desafío debido a sus características asintomáticas (22).

La detección temprana en cáncer de mama también tiene implicaciones en la selección de enfoques de tratamiento apropiados y terapia adyuvante y, por lo tanto, aumenta las posibilidades de resolución. Descrito previamente, la fracción de ctADN y la concentración total de cfADN se correlacionan directamente con el estadio de la enfermedad y son significativamente más bajo en etapas tempranas (23)

Esto puede crear muchos desafíos para la extracción y análisis del ADN tumoral en sangre, especialmente en las etapas tempranas. Múltiples estudios han examinado el potencial de la biopsia líquida para la detección temprana del cáncer de mama en estadios pre-sintomáticos (24,25,26). Por ejemplo, un estudio de Beaver et al reportó de manera precisa la detección de mutaciones en el gen PIK3CA usando DDPCR (26). Los investigadores analizaron el ctADN EN plasma de 29 pacientes de cáncer de mama de estadios temprano antes y después de la cirugía usando DDPCR y lo compararon con el análisis del tejido tumoral mediante secuenciación de Sanger y DDPCR (26). Encontraron 15 pacientes con mutaciones PIK3CA en su tumor de los cuales, 14 se detectaron en el cfDNA prequirúrgico. Se evaluó el cfADN postquirúrgico en 10 de esos 14 pacientes y en cinco de ellos (50%) aún se detectó la mutación de PIK3CA en su post-operatorio. Los investigadores concluyeron que el ctADN se puede detectar antes y después de cirugía utilizando el DDPCR en pacientes de cáncer de mama en etapas tempranas. Investigaciones futuras deberían enfocarse en el desarrollo de nuevos métodos para el análisis de ctADN en plasma con mayor sensibilidad para facilitar la detección temprana del cáncer de mama.

Es importante desarrollar protocolos diagnósticos que complementen al análisis del ctADN en plasma y otros Métodos de detección (27).

Un grupo que tendría un gran beneficio de la biopsia líquida son aquellos individuos de alto riesgo para desarrollar cáncer de mama debido a mutaciones germinales en genes de susceptibilidad al cáncer de mama (28).

En las etapas tempranas del cáncer, el análisis cuantitativo de los niveles de cfADN es insignificante para el diagnóstico debido a su similitud en la concentración con células normales del cuerpo. Por tanto, la cantidad de cfADN no se puede utilizar como método decisivo para el diagnóstico de cáncer. Sin embargo, el análisis de las mutaciones somáticas en el ctADN, combinadas con la estimación de los niveles en plasma del cfADN, pueden ser utilizados para un diagnóstico temprano más preciso. Investigaciones previas han demostrado la utilización de la biopsia líquida para medir los niveles de ctADN / cfADN, permitiendo la detección y diagnóstico en cáncer de mama tan temprano como 5 meses previos a la detección clínica y radiológica (29).

Enfocados en el estudio del tipo histológico, un estudio publicado por Riva et al (30) utilizó una cohorte de pacientes con cáncer de mama triple negativo tratadas con quimioterapia neoadyuvante; se detectó la mutación de TP53 en el ADN tumoral circulante antes, durante y después de la quimioterapia neoadyuvante. El nivel de ctADN previo al tratamiento se asoció con la carga y proliferación tumoral. Se observó una marcada y disminución temprana en los niveles de ctADN en todos los pacientes, excepto en un paciente que presentó progresión de la enfermedad durante quimioterapia neoadyuvante. Niveles detectables del ctADN persistente después de un ciclo de neoadyuvante se correlacionó con una supervivencia libre de enfermedad más corta ($p < 0.001$) y una supervivencia global ($p = 0.006$).

En un estudio publicado por Board et se describe que las tasas de mutación observadas en el ctADN dentro de genes como PI3KCA eran fueron más altas en aquellos tumores de mama estadios III en comparación con los de estadios I (31).

En uno de tan pocos estudios, se compararon las muestras de plasma-tumor de 180 pacientes, de diferentes tipos de tejidos, de los cuales un 20% eran pacientes de estadio temprano (hasta IIB), 73% estadio avanzado (estadio IIB y superior) y 11% etapa desconocida, con el objetivo de identificar el estado mutacional utilizando el ctADN para el pronóstico, toma de decisiones para el tratamiento y seguimiento de la enfermedad. Entre 180 pacientes, 42 (23%, 33%) eran pacientes de cáncer de mama. De los datos obtenidos la relación tumor-plasma demostró ser muy variable ya que dependía del tejido de origen, del tamaño tumoral, estadio, metástasis a los ganglios linfáticos, grado, tiempo de recolección de la muestra e incluso la plataforma utilizada para la detección. Por lo tanto, la concordancia reportada de 82% y 32% se observó en muestras del estadio avanzado (estadio IIB y superior) y de etapa temprana (etapa I a etapa IIA), respectivamente. Se demostró que los resultados de supervivencia estaban correlacionados con los niveles basales de ctDNA (ctADN prequirúrgico / en la biopsia). De hecho, de acuerdo al nivel de ctADN basal se estratificaron los pacientes en tres clases: a. nivel alto de ctADN indicando un pronóstico pobre de supervivencia; b. ctADN indetectable demostrando un buen pronóstico y, c. ctADN bajo resultado ambiguo. Los hallazgos de este estudio demuestran que niveles de ctADN y ctADN basal podrían utilizarse como una herramienta determinante para trazar mutaciones tumorales específicas y estratificar pacientes en grupos pronósticos y, por lo tanto, ser útil en la toma de decisiones de tratamiento y en el manejo de pacientes de un gran número de cánceres y variedad de etapas (32).

García-Murillas et al publicaron un estudio con una cohorte de pacientes con cáncer de mama en estadio temprano, se describe que paciente con cáncer de mama triple negativo obtuvieron los niveles más elevados de ctADN (4.96 copias/ml) seguido de los grupos de HER-2 positivos (0.81 copias/ml) y aquellos con enfermedad de receptores estrógeno (RE)/HER-2 negativo (0 copias/ml). El tiempo medio previo a la recurrencia de acuerdo con el subtipo de cáncer de mama fueron: RE/HER-2 negativo: 13.3 meses, HER-2 positivo: 14.5 meses y Triple negativos: 10.6 meses (33).

Otro estudio publicado por Zelinova et al, se monitorizó el perfil molecular de muestras seriadas de ctADN de pacientes con cáncer de mama y se demostró que la secuenciación del ctADN proporciona información dinámica sobre variantes somáticas con efectos patogénicos en tumores. El análisis molecular reveló que pacientes con cáncer de mama de bajo grado y de subtipo luminal A y un paciente del subtipo luminal B tenían variantes patogénicas somáticas detectadas solo en su ctADN previo a la cirugía. Esto se correlaciona con un mejor pronóstico del subtipo luminal A en comparación con otros subtipos de cáncer de mama. La detección de variantes patogénicas somáticas en el ctADN sólo después de la cirugía se asoció con pacientes con estado de HER-2 y luminal B desconocidos, y tipo luminal desconocido; pero estos pacientes tenían un cáncer de mayor grado (G2 o G3). Mientras que pacientes luminal B, HER-2 + y grado 3 tenían variantes patogénicas somáticas detectadas en el ctADN solo después de la quimioterapia, un número limitado de pacientes, la falta de caracterización y la imposibilidad de analizar ciertas muestras impidieron conclusiones significativas de estos resultados (34).

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 (35). 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 (36).

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 (37).

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%). 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 (38).

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. PLANTEAMIENTO DEL 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 las 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 las diferentes etapas clínicas y subtipos histológicos de los 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, el análisis de mutaciones en los genes más comunes (BRCA y PI3KCA) y evaluar su función como factor 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 del ADN circulante con la información del reporte histopatológico y la clasificación de las etapas clínicas del paciente.

VII. JUSTIFICACIÓN.

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 que 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 ctADN	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
Fenotipo molecular	Cualitativa	Nominal	Luminal/Enriquecido Her2/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.

2. 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 cfDNA, 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 Her2 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.

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

Se emplearon cuadros comparativos de los tipos histológicos y su clasificación.

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 de los 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.

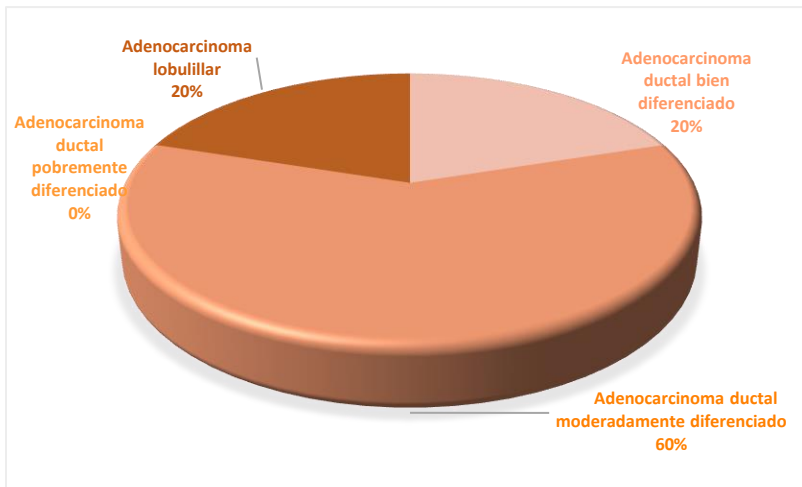
Se reclutaron 5 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, se recolectó la muestra de ctADN en el periodo de marzo de 2020 a septiembre de 2020 y se obtuvo información de los expedientes clínicos en el servicio de Oncología Médica en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE.

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- 2020 D.E. = Desviación estándar HTA= Hipertensión Arterial Sistémica DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2 ECOG: Escala Eastern Cooperative Oncology Group	

Dentro de las características principales de la población (**Tabla 1**) la mediana de edad fue 60.4 años \pm 12.32. Se encontró asociación con enfermedades crónicas como diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión arterial sistémica, sin embargo, todas con un buen estado funcional.

De acuerdo con el subtipo histológico (**Gráfico 1**) el más frecuente fue el adenocarcinoma ductal moderadamente diferenciado, encontrándose en tres de las cinco pacientes y el fenotipo molecular fue el Luminal A en un 80%.

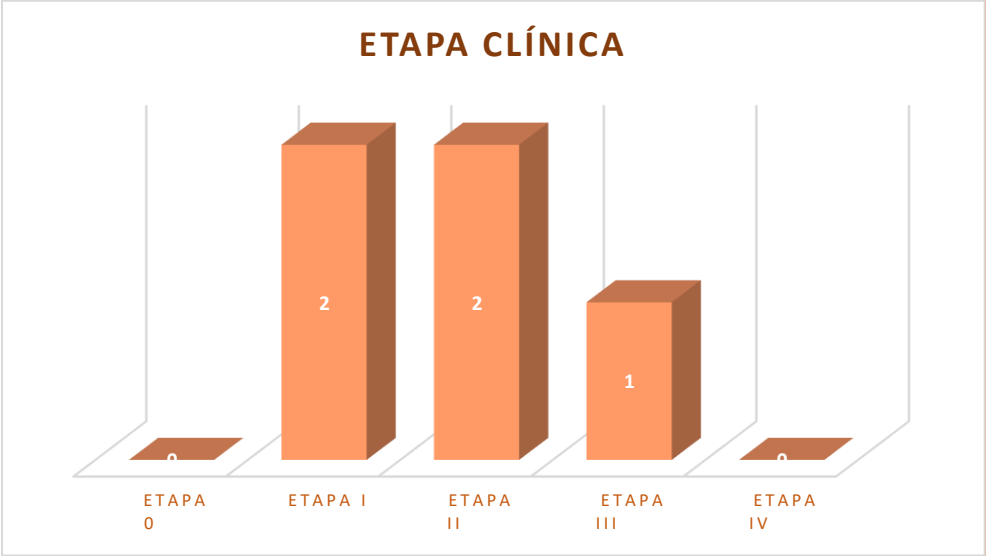
Gráfico 1 Distribución porcentual del subtipo histológico



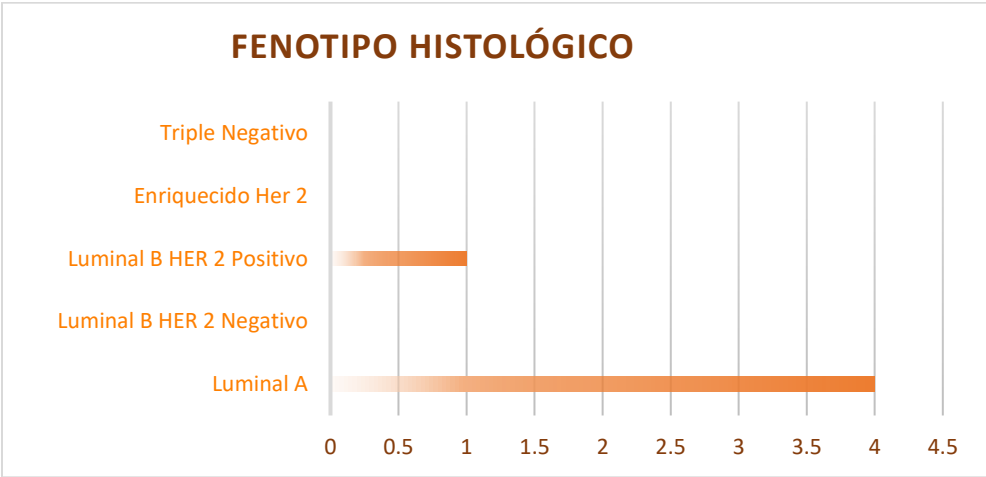
*Información obtenida de los expedientes clínicos en consulta al SIHA durante un periodo de 2019 a 2020

Las etapas clínicas (**Gráfico 2**) con mayor frecuencia fueron las frecuente encontradas fueron las etapas I y II, con dos pacientes cada uno, lo que corresponde a una etapa temprana de la enfermedad. El fenotipo histológico (**Gráfico 3**) más frecuente fue el luminal A correspondiendo al 80% de los casos, seguido de luminal B Her-2 positivo.

Gráfica 2 Distribución de la población por etapa clínica



Gráfica 3 muestra la distribución por fenotipo histológico



Extracción y Cuantificación de ctADN

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.

El ctADN extraído de los sueros de las muestras sanguíneas periféricas se realizó mediante la técnica de Trizol. Los niveles de concentración de ctADN se muestran en la tabla 3. La concentración ctADN promedio fue de 680.5 ng/μl con una relación de absorbancia 260/280 promedio de 0.78 nanómetros.

Tabla 2. Cuantificación ctADN en suero*		
n = 5 # muestra	Concentración ctADN 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

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las recolecciones de los datos se obtuvieron a través de los expedientes electrónicos pertenecientes a las pacientes que acudieron a la al área de consulta externa de oncología médica del centro médico nacional 20 de noviembre y las correlaciones con las características histopatológicas y clínicas del diagnóstico de cáncer de mama con los niveles de ctADN a partir de la fecha de toma de muestra.

Tabla 3. Análisis de relación entre el fenotipo de cáncer de mama con el ctADN en suero*		
n = 5 # muestra	Concentración de ctADN en suero ng/μl	Fenotipo Molecular
1	55	Luminal A
2	290	Luminal A
3	1125	Luminal B /HER-2 positivo
4	1252	Luminal A
5	993	Luminal A

*El ctADN se extrajo mediante la técnica de trizol y se cuantificó espectrofotométricamente en el equipo NanoPhotometer versión 7122 V2.4.2 marca INPLEN

Respecto a la asociación entre la concentración de ctADN en suero y el fenotipo molecular de cáncer de mama (**Tabla 3**), la concentración menor fue de 55 ng/μl y la mayor de 1252 ng/μl, ambos en pacientes luminal A, correspondiendo al subtipo con mayor incidencia en la población.

La paciente 1 recibió tratamiento con cirugía más quimioterapia adyuvante y la paciente 4 ningún tratamiento previo a la toma de muestra. La paciente 3 con subtipo luminal B/HER-2 positivo, el segundo con mayor incidencia obtuvo una concentración de 1125 ng/μl, al igual recibió tratamiento previo de cirugía y quimioterapia adyuvante.

Tabla 4. Relación subtipo histológico y concentración del ctADN en suero*	
Subtipo Histológico	Concentración de ctADN en suero ng/μl
Adenocarcinoma ductal moderadamente diferenciado SBR 6-7	55
Adenocarcinoma lobulillar	290
Adenocarcinoma ductal moderadamente diferenciado SBR 6-7	1125
Adenocarcinoma ductal bien diferenciado SBR 3-5	1252
Adenocarcinoma ductal bien diferenciado SBR 3-5	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 - Los pacientes con Adenocarcinoma ductal bien diferenciado SRB 3-5, en comparación con los demás subtipos presentan niveles más altos de ctADN	

En relación con el subtipo histológico y la concentración del ctADN, la menor de 55ng/μl y la mayor de 1252ng/μl, corresponden a los subtipos de adenocarcinoma ductal moderadamente diferenciado y adenocarcinoma ductal bien diferenciado respectivamente (**Tabla 4**).

Tabla 5. Relación de etapa clínica y concentración del ctADN en suero	
Concentración de ctADN en suero ng/μl	Etapas Clínicas
55	IIIA
290	IIB
1125	IIA
1252	IA
993	IA
*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	

Al comparar los niveles de concentración del ctADN de acuerdo con la etapa clínica (**Tabla 5**), la menor concentración corresponde a la etapa IIIA y las más elevadas de 1125ng/μl y 1252ng/μl a las etapas IA y IIA respectivamente.

X. DISCUSIÓN.

El cáncer de mama es una entidad compleja. Uno de los aspectos fundamentales es su heterogeneidad, lo que representa un gran desafío para la práctica clínica oncológica. A pesar de los grandes avances en el diagnóstico y tratamiento, continúa siendo una enfermedad incurable con una alta tasa de mortalidad a nivel mundial.

La necesidad de una comprensión más profunda de la biología del cáncer, de la heterogeneidad intratumoral, y además, la biología detrás de la progresión de las células tumorales hacia la metástasis es urgente. Hasta la fecha, la evidencia sugiere que tanto las propiedades intrínsecas de las células del cáncer de mama y el microambiente del órgano huésped participan activamente en este aspecto (39).

La heterogeneidad tumoral puede contribuir a la discordancia de los biomarcadores entre la toma de biopsia con aguja con aguja gruesa y la pieza quirúrgica. El concepto de heterogeneidad intratumoral, el cual se ha reportado en una variedad de neoplasias malignas, se identificó mediante estudios de perfiles moleculares y genómicos, en los que se determinó que pueden encontrarse divergencia entre líneas celulares dentro de los tumores, dando lugar a distintas áreas histológicas y biológicas. La evolución de las clonas, células madre cancerígenas y cambios en el microambiente tumoral se han propuesto como fuentes de esta heterogeneidad fenotípica. La identificación de estos distintos subgrupos moleculares en tumores heterogéneos es esencial para poder proporcionar el máximo beneficio terapéutico al paciente.

Sin embargo, es un reto determinar cuáles pacientes muestran heterogeneidad sin un perfil genético porque estas variedades de subpoblaciones pueden estar distribuidas de manera desigual a través del tumor y solo pueden identificarse mediante una tinción adicional (40).

La concordancia entre ctADN y el ADN del tejido tumoral en cáncer de mama varía según el estadio y el subtipo (41).

La heterogeneidad tumoral puede existir dentro del mismo sitio de la enfermedad o entre distintos sitios de enfermedad y la contaminación con tejidos normales adyacentes pueden conllevar a resultados falsos negativos. Como señalaron Navin y Hicks, la heterogeneidad tumoral existe en cáncer de mama porque las células malignas a menudo surgen del tejido de los conductos y están restringidos por la estructura del conducto hasta que comienzan a invadir el tejido del estroma circundante. Exhiben regiones de crecimiento, regiones de hipoxia y necrosis y regiones que interactúan con los vasos sanguíneos y conductos linfáticos. Dadas estas distintas características de selección, células tumorales dentro de una misma masa no son idénticas (42).

La cuantificación de alteraciones tumorales específicas en el ctADN se ha asociado con la carga tumoral, la posible progresión clínica o recaída. Niveles altos de ctADN se asocian a una enfermedad más agresiva y potencialmente resistente. De hecho, se han detectado tanto en etapas tempranas y tardías de cáncer de mama (43,44). Un análisis combinado de CTC y cfADN de 5 pacientes con CTC ≥ 100 / 7,5 ml de sangre mostró que la secuenciación del cfADN es más sensible para detectar mutaciones que las CTC únicas y el tejido tumoral primario (45).

La medición temprana de ctADN pudiera proporcionar información subrogada adecuada de supervivencia global, de la respuesta al tratamiento de un paciente con cáncer. La heterogeneidad genética intratumoral representa un desafío para determinar la respuesta a la terapia dirigida, ya que subclonas pudieran tener una respuesta divergente al tratamiento. Un ejemplo de este fenómeno es la aparición de mutaciones en el gen del receptor de estrógeno (ESR1) en cáncer de mama que resulta en una activación constitutiva del receptor de estrógeno (46, 47).

Madhavan et al analizaron la potencial capacidad del cfADN como marcador para la detección temprana del cáncer de mama. Los investigadores midieron la cantidad y la integridad de cfADN (CFDI) utilizando la PCR cuantitativa. Los pacientes que se incluyeron en este estudio se dividieron en 4 grupos: pacientes con cáncer de mama primario, pacientes con cáncer de mama metastásico con CTC plasmáticas detectables, pacientes con cáncer de mama metastásico sin CTC plasmáticas detectables y controles sanos.

Los resultados de este estudio indicaron la posibilidad de distinguir entre los cuatro grupos utilizando la disminución del CFI disminuido y el aumento de cfADN como marcadores para la detección temprana del cáncer primario de mama primaria (48).

En pacientes con cáncer de mama, los niveles plasmáticos de cfDNA también han sido relacionados con variables clínico-patológicas, tales como tamaño, estadio de tumor, linfadenopatías, nivel y estado del gen HER-2 (49).

Con estos antecedentes, se realiza este estudio con el objetivo de identificar los niveles de concentración del ctADN y su correlación histopatológica y clínica con el cáncer de mama.

De acuerdo con los hallazgos del estudio, al comparar la concentración del nivel ctADN y el fenotipo molecular, cuatro pacientes fueron Luminal A y un paciente Luminal B /HER-2 positivo, encontrándose una diversidad en los resultados en relación con los controles, lo cual pudo verse influenciado por el tratamiento recibido previo a la toma de la muestra. Estos resultados son similares en el estudio presentado por Yidong Z. et al, en el cual la proporción de los subtipos moleculares de Luminal A, Luminal B, sobreexpresión HER-2 y Triple negativo fue 4.23%, 67.61%, 12.68%, and 14.08% respectivamente (6).

El subtipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal invasivo, este hallazgo coincide con el estudio publicado por Chin YM et al para detectar el ADN circulante (ctADN) en pacientes con cáncer de mama etapa temprana y avanzada. En este estudio se reclutaron 109 pacientes antes de recibir tratamiento.

La mayoría de las pacientes (89%) tuvieron el subtipo histológico de carcinoma ductal invasivo y 83% tuvieron el subtipo tumoral de RE (+) /HER-2 negativo (Luminal A), donde el 6% fue RE (+) /HER-2 positivo y el resto 11% cáncer de mama triple negativo (769).

Llama la atención que los niveles más elevados de ctADN se encontraron en pacientes con carcinoma ductal bien y moderadamente diferenciados, lo que habría que considerar algunos factores que pudieran influenciar en los resultados como la heterogeneidad tumoral y la propia enfermedad, al igual, una muestra pequeña, pudiendo ser no representativa para determinar una relación directa con los niveles de ctADN.

Otros factores que pueden afectar de manera negativa y sería importante evaluar es el método histopatológico del diagnóstico y el tratamiento empleado.

La relación entre el nivel de concentración de ctADN y la etapa clínica, los niveles más elevados se encontraron en las etapas clínicas IA y IIA, sin embargo, en una etapa localmente avanzada como la IIA, se encontraron los niveles más bajos, contrastando con resultados de otros estudios en lo que se esperaría mayores concentraciones por ser una enfermedad más avanzada. Esto puede ser justificado ya que al momento de la muestra la paciente había sido sometida a cirugía con posterior tratamiento sistémico de quimioterapia adyuvante, por lo sería importante considerar que idealmente las pacientes deberían ser en pacientes vírgenes a tratamiento, las cuales no siempre se recibe en nuestro centro médico nacional, debido a que en una gran mayoría de la población son pacientes referidos a este centro.

XI. CONCLUSIONES.

La detección del ADN circulante (ctDNA) en pacientes con cáncer de mama en una etapa temprana representa un gran desafío. La heterogeneidad tumoral y la baja sensibilidad de hasta < 40% en parte debido por la baja frecuencia de mutaciones comunes en cáncer de mama y la necesidad de establecer biomarcadores que pudieran identificar las pacientes con mayor riesgo de recaída o de un mayor beneficio de ciertas terapias como las dirigidas o inmunoterapia, hacen, de la determinación de ctADN como una herramienta diagnóstica alterna con un campo amplio para la investigación.

Los resultados de este estudio muestran la divergencia entre los niveles de concentración de ctADN de acuerdo con la etapa clínica y fenotipo molecular, sin poder establecer una relación directa entre ambos.

La recomendación es continuar con el seguimiento de estas pacientes y el reclutamiento de más pacientes, pudiendo así realizar más análisis comparativos y poder hacer correlaciones con el diagnóstico de cáncer de mama. La detección de las variantes derivadas de tumores a través de la secuenciación del ADN circulante puede ser una herramienta poderosa, mínimamente invasiva para el monitoreo y manejo clínico del cáncer de mama (50).

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. Mattox AK, Bettgowda C, Zhou S, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Applications of liquid biopsies for cancer. *Sci Transl Med*. 2019;11(507)
6. J. D. Cohen, L. Li, Y. Wang, C. Thoburn, B. Afsari, L. Danilova, C. Douville, A. A. Javed, F. Wong, A. Mattox, R. H. Hruban, C. L. Wolfgang, M. G. Goggins, M. Dal Molin, T.-L. Wang, R. Roden, A. P. Klein, J. Ptak, L. Dobbyn, J. Schaefer, N. Silliman, M. Popoli, J. T. Vogelstein, J. D. Browne, R. E. Schoen, R. E. Brand, J. Tie, P. Gibbs, H.-L. Wong, A. S. Mansfield, J. Jen, S. M. Hanash, M. Falconi, P. J. Allen, S. Zhou, C. Bettgowda, L. A. Diaz Jr., C. Tomasetti, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, A. M. Lennon, N. Papadopoulos, Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 359, 926–930 (2018).
7. Cree IA, et al. *J Clin Pathol* 2014;67: 923–931. doi:10.1136/jclinpath-2014-202404
8. Bettgowada C, Sausen M, Leary RJ. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl*, 2014.

9. De Mattos-Arruda L., Weigelt B., Cortes J., et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2014;25(9):1729–35. Doi: 10.1093/annonc/mdu239.
10. Bidard F-C., Pierga J-Y., Vincent-Salomon A., Poupon M-F. A “class action” against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev*2008;27(1):5–10. Doi: 10.1007/s10555-007-9103-x
11. Mandel P., Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l’homme. *C R Seances SocBiol Fil* 1948;142(3–4):241–3.
12. Sun K., Jiang P., Chan KCA., et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl AcadSci U S A* 2015;112(40): E5503-5512. Doi: 10.1073/pnas.1508736112.
13. Diehl F., Schmidt K., Choti MA., et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *NatMed* 2008;14(9):985–90. Doi: 10.1038/nm.1789.
14. 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.
15. 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
16. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014;32(6):579–86. [PubMed: 24449238]

17. Friedrich MJ. Going with the Flow: The Promise and Challenge of Liquid Biopsies. *JAMA* 2017;318(12):1095–1097. [PubMed: 28885642]
18. Wood LD, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; 318:1108–1113. [PubMed: 17932254]
19. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-990. doi:10.1038/nm.1789
20. Lannin DR, Wang S. Are small breast cancers good because they are small or small because they are good? *N Engl J Med*. 2017;376(23): 2286-2291.
21. Oshiro C, Kagara N, Naoi Y, et al. PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;150(2):299-307. doi:10.1007/s10549-015-3322-6
22. Caplan L. Delay in breast cancer: implications for stage at diagnosis and survival. *Front Public Heal*. 2014; 2:87.
23. Chen K-Z, Lou F, Yang F, et al. Circulating tumor DNA detection in early-stage non-small cell lung cancer patients by targeted sequencing. *Sci Rep*. 2016;6:31985.
24. Phallen J, Sausen M, Adleff V, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2017;9(403).
25. Amant F, Verheecke M, Wlodarska I, et al. Presymptomatic identification of cancers in pregnant women during noninvasive prenatal testing. *JAMA Oncol*. 2015;1(6):814-819.
26. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of early stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2643-2650.

27. Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet*.2019;95(6):643-660.
28. Heitzer E, Perakis S, Geigl JB, Speicher MR. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. *NPJ Precis Oncol*.2017;1 (1):36.
29. Incorvaia L, Castiglia M, Perez A, et al. Erratum to: Liquid biopsy in cancer patients: the hand lens for tumor evolution. *Liquid Biopsy in Cancer Patients*. Berlin, Germany: Springer; 2017.
30. Riva F, Bidard FC, Houy Alexandre, Stern MH, Proudhon Charlotte, Pierga JY Patient-specific circulating tumor DNA detection during neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer. *Press Clin Chem* 2016.
31. Board R, Wardley A, Dixon J, et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;120(2):461-467
32. Balaji, S.A., Shanmugam, A., Chougule, A., et al. Analysis of solid tumor mutation profiles in liquid biopsy. (2018) *Cancer Med*7(11): 5439–5447.
33. Garcia-Murillas I, Chopra N, Comino-Méndez I, Beaney M, Tovey H, Cutts RJ, Swift C, Kriplani D, Afentakis M, Hrebien S, Walsh-Crestani G, Barry P, Johnston SRD, Ring A, Bliss J, Russell S, Evans A, Skene A, Wheatley D, Dowsett M, Smith IE, Turner NC. Assessment of Molecular Relapse Detection in Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2019 Oct 1;5(10):1473-1478. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.1838
34. Zelinova K, Jagelkova M, Laucekova Z, Bobrovskaja M, Dankova Z, Grendar M, Dokus K. Molecular analysis of circulating tumor DNA from breast cancer patients before and after surgery and following adjuvant chemotherapy. *Mol Clin Oncol*. 2020 Oct;13(4):26. doi: 10.3892/mco.2020.2096

35. 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
36. 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
37. 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.
38. Cancer Genome Atlas Network. Retratos moleculares completos de tumores de mama humanos. Nature 2012; 490: 61.
39. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC, et al. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer 2002; 2:563–72
40. C Greer LT, Rosman M, Mylander WC, Hooke J, Kovatich A, Sawyer K, Buras RR, Shriver CD, Tafra L. Does breast tumor heterogeneity necessitate further immunohistochemical staining on surgical specimens? J Am Coll Surg. 2013 Feb;216(2):239-51.
41. Parsons HA, Beaver JA, Cimino-Mathews A, Ali SM, Axilbund J, Chu D, Connolly RM, Cochran RL, Croessmann S, Clark TA, Gocke CD, Jeter SC, Kennedy MR, et al. Individualized Molecular Analyses Guide Efforts (IMAGE): A Prospective Study of Molecular Profiling of Tissue and Blood in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2017; 23:379–386.
42. Navin NE, Hicks J. Tracing the tumor lineage. Mol Oncol. 2010; 4:267-83.

43. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, Cochran RL, Croessmann S, Zabransky DJ, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:2643–50.
44. Chu D, Paoletti C, Gersch C, VanDenBerg DA, Zabransky DJ, Cochran RL, et al. ESR1 mutations in circulating plasma tumor DNA from metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2016;22:993–9.
45. Shaw JA, Guttery DS, Hills A, Fernandez-Garcia D, Page K, Rosales BM, et al. Mutation analysis of cell-free DNA and single circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients with high circulating tumor cell counts. *Clin Cancer Res* 2017;23:88–96.
46. Toy, W. et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat. Genet.* 45, 1439–1445 (2013).
47. Fanning, S. W. et al. Estrogen receptor alpha somatic mutations Y537S and D538G confer breast cancer endocrine resistance by stabilizing the activating function-2 binding conformation. *eLife* 5, e12792 (2016)
48. Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;146(1):163-174.
49. Huang ZH, Li LH, Hua D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett.* 2006;243: 64–70
50. Chin YM, Takahashi Y, Chan HT, et al. Ultradeep targeted sequencing of circulating tumor DNA in plasma of early and advanced breast cancer. *Cancer Science.* 2020 Oct. DOI: 10.1111/cas.14697.

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 SALUD
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO



2019
BICENTENARIO 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*