



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 RELACIÓN CON EL DIAGNÓSTICO.

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA

P R E S E N T A

DRA. LEIDY DE JESUS UREÑA ARIAS.

ASESORA: DRA. AURA A. ERAZO VALLE SOLÍS.

CO-ASESORA DRA. REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA.

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2021



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 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

Dra. Leidy de Jesús Ureña Arias
Residente

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco primeramente a Dios, quien ha guiado mi camino y ha permitido el cumplimiento de mis metas.

A mi familia, de modo especial a mi amado esposo, Josué Gómez Tejeda, quien me ha apoyado y comprendido en todo momento. A mis padres, quienes siempre han sido un soporte y a mi hijo Josué Miguel Gómez Ureña, que se ha convertido en mi motor de arranque para cada proyecto en el que me involucre. No se pueden quedar mis hermanas, amigos y demás familiares que han cooperado para lograr esta meta.

A los profesores y al consejo de enseñanza, gracias por su disposición y por compartir sus conocimientos y del mismo modo a la Dra. Rebecca Pérez Cabeza de Vaca por su dedicación y entrega en este proyecto.

Leidy De Jesús Ureña Arias

INDICE

I.	RESUMEN	6
II.	INTRODUCCIÓN	7-11
III.	ANTECEDENTES	12-17
IV.	PROBLEMA	18
V.	HIPOTESIS	19
VI.	OBJETIVO	21
VII.	JUSTIFICACION	22
VIII.	MATERIAL Y METODOS	23-27
IX.	RESULTADOS	28-39
X.	DISCUSIÓN	41-42
XI.	CONCLUSIONES	43
XII.	REFERENCIAS	44-46

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 8 pacientes con cáncer de mama loco-regional, de las cuales 100% fueron mujeres, la mediana de edad fue de 57 años. El subtipo histológico más frecuente fue adenocarcinoma ductal infiltrante de bien a moderadamente diferenciado con 74%, correspondiendo 37% para los histológicamente bien diferenciado y la misma cifra para las moderadamente diferencias, seguida de adenocarcinoma lobulillar infiltrante y medular en un 13% cada uno respectivamente. El inmunofenotipo más frecuente fue Luminal A con 50%. El tratamiento recibido antes de la fecha de toma de la muestra corresponde a cirugía de mama con radical o conservadora, solo una paciente no fue llevada a cirugía previa, y todas eran vírgenes a tratamiento sistémico. El promedio de concentración ctADN inicial (ng/ μ L) en suero fue de 544.4 ng/ μ L.

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 es un término que comprende un conjunto heterogéneo de enfermedades caracterizadas por presentar un crecimiento celular anormal y descontrolado, que tiene la capacidad de infiltrar y migrar hacia otros tejidos y órganos. (1)

El cáncer de mama ha superado al cáncer de pulmón como la principal causa de incidencia mundial de cáncer en 2020, con un estimado de 2,3 millones de casos nuevos, lo que representa el 11,7% de todos los casos de cáncer. Es la quinta causa principal de mortalidad por cáncer en todo el mundo, con 685.000 muertes. Entre las mujeres, el cáncer de mama representa 1 de cada 4 casos de cáncer y 1 de cada 6 muertes por cáncer, ocupando el primer lugar en incidencia en la gran mayoría de países y en mortalidad en 110 países. Las tasas de incidencia son un 88% más altas en los países en vías de desarrollo que en aquellos desarrollados, sin embargo, las mujeres que viven en los países de tercer mundo tienen tasas de mortalidad un 17% más altas en comparación con las mujeres de países de primer mundo. (2)

En México el cáncer de mama es el más mortal, ya que en el año 2020 fallecieron 7, 931(8.7%) personas (2). Los datos publicados evidencian que existe una distribución modificada de la geografía y de los niveles de las tasas respecto de 1980, donde se puede decir que el desarrollo económico de los últimos sesenta años en el país, así como los cambios sociales, las tendencias de los fenómenos demográficos como la mortalidad, el proceso de modernización y urbanización que benefició las condiciones de vida de la población y esto contribuyó a cambios en el comportamiento así como en el estilo de vida de la población mexicana; a la vez esto revolucionó el panorama social, demográfico, económico y epidemiológico de la influyendo en enfermedades que, aunque en un porcentaje se relacionan a predisposición genética, están asociadas en mayor cuantía a hábitos socioculturales y ambientales, como el cáncer de mama, se han convertido en un problema de gran impacto en salud pública, y es la primera causa de muerte por tumores malignos de mujeres en México desde 2006.(3)

Un ejemplo del impacto ambiental en esta patología es lo visto en la región norte del país, así como en la Ciudad de México y en Jalisco donde el acceso al hábito y el acceso a alimentos con gran porcentaje de grasas favorece a tener un índice de masa corporal que corresponde a sobrepeso e incluso obesidad, y esto se ve influenciado por el mejor nivel adquisitivo socioeconómico de la población, así

como por el sedentarismo y otros factores de riesgo para cáncer de mama los que pueden justificar 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 (4).

A pesar de los diferentes métodos diagnósticos y el mayor acceso a estudios de tamizaje, no es una mentira que en países latinoamericanos como México existe una parte de la población con cáncer de mama que se diagnostican en etapas localmente avanzadas (IIB-III) hasta en 55.9% y 10.5% en enfermedad metastásica. (5) El estadio tumoral es conocido como un factor pronóstico, este determina el tamaño tumoral, el involucro ganglionar y la presencia o no de metástasis. Según las cohortes de validación del sistema de estadificación de la octava edición del American Joint Committee on Cancer (AJCC), las tasas de supervivencia libre de enfermedad a cinco años, según el estadio fueron del 98% para etapas clínicas I, del 85-98% en estadio II, y para la enfermedad en estadio III del 70 al 95 %. (6)

Muchos pacientes no son tratados adecuadamente, perdiendo parte del beneficio de ciertas terapias; y, por otro lado, algunos recibiendo terapias adicionales que no van a tener repercusión en un beneficio adicional, sometiéndose a una toxicidad innecesaria, por lo que tener disponible una herramienta que proporcione factores pronósticos altamente confiables pueden facilitar y optimizar la selección de pacientes con mayor riesgo de recurrencia.

Cuando se hace referencia a un factor pronóstico se describe una herramienta que es capaz de estimar el resultado clínico en el momento del diagnóstico, independientemente o en ausencia de terapia adicional, un ejemplo de estas suelen ser indicadores de crecimiento, invasión y potencial metastásico. En otro sentido un factor predictivo informa sobre la probabilidad de respuesta a una determinada modalidad terapéutica. Aunque pueden clasificarse por separado, varios factores de esta neoplasia son tanto pronósticos como predictivos. (7)

Es conocido que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y dinámica, con alta carga de alteraciones somáticas únicas que conducen a la reaparición y resistencia de la enfermedad, los métodos convencionales de valor pronóstico y predictivo como la biopsia tumoral (la que proporciona características histopatológicas, el grado de diferenciación celular, invasión linfocelular y perineural así como información molecular al utilizar los diferentes métodos y tinciones para inmunohistoquímica), y

a esto añadido los estudios de radiología que se utilizan para obtener imágenes convencionales no son capaces de informar acerca de la detección precoz de la recurrencia y la monitorización en tiempo real mediante el seguimiento de los mecanismos sensibles o de resistencia al tratamiento. (8)

Es basado en esa premisa que el análisis del ADN tumoral circulante (ADNct) ha surgido como una herramienta práctica y no invasiva para detectar aberraciones genéticas específicas del cáncer en el plasma, incluidas las mutaciones del ADN y los patrones de metilación del ADN. A la fecha se han realizado varias investigaciones que han otorgado datos sobre la posible aplicación en beneficio de las pacientes y el tratamiento más conveniente en etapas tempranas y avanzadas del cáncer de mama. A pesar de esta propuesta tan atractiva debe de integrarse a la práctica clínica el análisis del ctDNA mediante la realización de estudios clínicos multicéntricos prospectivos y bien diseñados para que sea factible que sea estandarizado y validado. (8)

La determinación de ctDNA se realiza en la toma de una bopsia líquida, que consiste en la extracción y análisis de una muestra de sangre siendo un proceso poco invasivo que da información acerca del material circulante en el sistema vascular. El método de biopsia líquida además incluye el análisis de células tumorales circulantes (CTC), miARN circulante y vesículas extracelulares (VE) derivadas de tumores que se desprenden de los tumores primarios y sus sitios metastásicos a la sangre periférica. Se considera una pauta que promete tener un impacto positivo y que tiene la capacidad de revolucionar el diagnóstico y una repercusión potencial en el manejo del paciente con respecto a la detección precoz, la identificación micrometástasis, la evaluación de la respuesta al tratamiento y el seguimiento de la evolución del tumor. (8)

Se ha demostrado que el ctADN 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 (9).

Debido a que el ADN circula en el torrente sanguíneo y su origen es 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 (10).

Para obtener la cantidad necesaria para el análisis de ADN, se requiere de una cantidad de plasma entre 1-10 ml, esto como consecuencia de su pequeña concentración en sangre (10-1.000 copias / ml) en la sangre. El súbito desarrollo de tecnologías moleculares ha permitido valorar los cambios genéticos y epigenéticos, con alta sensibilidad y especificidad. El progreso del análisis del ctDNA depende en gran medida de los avances tecnológicos, ya que este análisis requiere técnicas muy sensibles para separar la presencia de alelos mutantes o metilados de los niveles de fondo de los alelos de tipo salvaje en una muestra. La disponibilidad limitada de muestras clínicas en aplicaciones de biopsia líquida sigue siendo un desafío. Se pueden aplicar numerosas metodologías para la detección de biomarcadores genéticos y epigenéticos, que se clasifican en enfoques basados en PCR y NGS. Cada variedad de técnicas que se han desarrollado para detectar mutaciones y metilación del ADN tiene sus propias ventajas y limitaciones. (8)

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 (10). 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 (11).

III. ANTECEDENTES

Existe información basada en la evidencia, de fuentes primarias y secundarias, que avalan que existe un papel determinante del ctADN en el futuro cercano de la oncología, por dicho motivo se están creando y ensayando cada vez más herramientas para detectarlo en los diferentes tipos de tumores, y en esta investigación en particular se posee un especial interés por su rol en el cáncer de mama, donde sus aplicaciones van desde la monitorización de la respuesta al tratamiento, la probabilidad de recurrencia y el beneficio de los diferentes esquemas terapéuticos. A continuación, dicha evidencia histórica y reciente será plasmada en los antecedentes de este trabajo de investigación, sustentando y dando credibilidad a esta tesis.

Según los datos ofrecidos por Tzanikou, y cols en un artículo de revisión publicado en el 2020 describen los cimientos de la determinación de ADN tumoral circulante, refieren que la primera demostración de la presencia de ácidos nucleicos extracelulares en la circulación de individuos sanos y pacientes enfermos se remonta a 1948 cuando Mandel y Metais realizaron una investigación que creó la base para continuar dicha línea de investigación, aunque no fue hasta la década de los sesenta que Tan et al. Demostró la presencia de niveles elevados de ADC circulante en pacientes con lupus eritematoso sistémico, y diez años posteriores, León et al. concluyeron que la concentración de ADN circulante era mayor en pacientes con cáncer metastásico que en individuos sanos y, que a mayores niveles de concentración en los individuos enfermos existía una tendencia a la mejor respuesta a las terapias antineoplásicas, siendo este estudio una zapata en el uso potencial del ctDNA como herramienta clínica para guiar la estrategia terapéutica. A finales de los ochenta, Stroun et al. indicó la presencia de características asociadas a tumores por hipercromicidad del ADN en el ADN circulante de pacientes con cáncer con diversas neoplasias malignas avanzadas, como leucemia, cáncer de pulmón, páncreas, ovario, riñón y próstata. Durante los últimos años se ha desarrollado y se han creado técnicas sensibles para determinación de ctADN debido al colosal potencial clínico del análisis de este tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de tumores(8).

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 (15).

En personas sanas entre el 70 al 90% del ctDNA es proveniente de neutrofilos y linfocitos, en tanto que en el contexto patológico proviene de las células neoplásicas, los linfocitos T infiltrantes de tumores y las células endoteliales en degeneración. Las causas de su presencia en el torrente sanguíneo son hipotéticas y entre ellas se considera que puede ser producto de la apoptosis, la necrosis y la secreción celular activa del tejido tumoral (13,14).

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 (18) y se correlaciona con parámetros clínicos como el estadio, la carga de la enfermedad, la recurrencia y la respuesta al tratamiento (19). 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 (20).

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 (24).

Yidong Zhou, mostró resultados de estudio realizado en China en donde revelaron que el perfil mutacional del ct ADN de un paciente se correlacionó fuertemente con el del ADN del tumor, mientras que algunos factores clínico-patológicos afectaron la detección de mutaciones derivadas del tumor en la sangre. Según estos hallazgos el perfil del ct ADN es un método prometedor para determinar el panorama genómico y el mejor plan de manejo clínico potencialmente de los pacientes con cáncer de mama, especialmente aquellos con cáncer en estado avanzado (20)

En el contexto de cáncer de mama triple negativo Adrien Saliou et al, describió que el ctADN 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, entre ellos destacan uno de ellos es el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y así como BRCA1/2, TP53, PIK3CA, FGFR, ERBB2 and ERBB3) se ha descrito como dianas terapéuticas potenciales para este subtipo molecular (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 endocrina como agente único o en 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 las opciones terapéuticas, con cada nuevo esquema el intervalo libre de progresión esperado es más corto (22).

Se ha determinado que la evaluación y el control de las condiciones de manipulación preanalíticas del plasma son esenciales para el análisis del ctDNA [36]. Variables preanalíticas como protocolos de procesamiento de muestras, condiciones de almacenamiento y métodos de extracción pueden afectar los resultados. El primer esquema de evaluación de calidad externa (EQA) a gran escala que se realizó para evaluar el impacto de las condiciones preanalíticas en la calidad, cantidad e integridad del cfDNA mostró que los diferentes kits de extracción producen una amplia gama de rendimientos de cfDNA que van desde 2,87 a 224 pg / IL . Además, otro esquema de EQA para el aislamiento y análisis de ctDNA que involucró a 42 laboratorios de 10 países europeos, informó una alta variabilidad en múltiples fases del procesamiento de cfDNA y una tasa de error general del 6,09% (16,17).

Mutaciones detectadas en ctADN en pacientes con cáncer de mama

En el cáncer de mama, la detección precoz de la enfermedad o recaída y el seguimiento de la resistencia incluyen las principales aplicaciones clínicas del análisis de ctDNA. En la detección temprana en la etapa temprana, es probable que el ctDNA esté presente en una concentración muy baja en la sangre debido a la limitada peso de tumor. La detección precoz del cáncer de mama en etapas presintomáticas sigue siendo un desafío. Dado que muchos cánceres se caracterizan por mutaciones comunes en genes específicos como TP53, PIK3CA, que están muy mutados en el cáncer de mama, la localización de la enfermedad mediante la detección de mutaciones en el cfDNA sigue siendo difícil(8).

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 (28). 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 (27)

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 (2).

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 (26). 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 %)
●Phosphatase 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. La muestra analizada en este proyecto son las pacientes que hasta el momento solo se han recolectado y estudiado la primera muestra.

IV. PROBLEMA

A pesar de los avances en el tamizaje, los diferentes esquemas terapéuticos, el cáncer de mama se posiciona como la principal causa de cáncer a nivel mundial en ambos sexos, desplazando incluso al cáncer de pulmón. Es bien sabido que la tasa de incidencia es alta en países desarrollados, sin embargo, en dichas sociedades las etapas clínicas son más tempranas y el impacto en mortalidad es menor. En países en vías de desarrollo como lo es México la incidencia ha aumentado, como además la mortalidad, se debe de tener presente que además de las pruebas de tamizajes, en este país ha habido en las últimas década cambios socioculturales, cambios en el acceso a alimentos más procesados y ricos en grasa, así como el aumento del sedentarismo que son algunos de los factores de riesgo asociados a cáncer de mama. Desafortunadamente aún más de la mitad de las pacientes se diagnostican en etapas localmente avanzadas o metastásicas. LOS Datos antes mencionados hacen de esta neoplasia un importante problema de salud a nivel mundial, y de forma muy clara también para el sistema sanitario mexicano.

El tratamiento del cáncer de mama en el entorno metastásico es paliativo, 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.

En la actualidad no se tiene una información sobre cuáles 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.

Una estrategia que se ha venido desarrollando desde hace años y que tiene repercusión en varios tipos de tumores es el análisis del ADN circulante en sangre, es por ello que surge el interés de valorar a las pacientes con cáncer de mama pertenecientes al Centro Médico Nacional 20 de noviembre ofrecer la posibilidad de analizar mediante biopsia líquida las mutaciones que estab asociadas 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 de muerte celular por apoptosis y más tarde mediante el aumento de las tasas de muerte celular por necrosis pasiva cuando el tumor se diferencia y se vuelve invasivo se puede deducir que eran biomarcadores relevantes para la detección de cánceres agresivos.

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

Hasta el momento, ningún método en México ha disminuido la tasa de mortalidad significativamente y a pesar de los programas de detección temprana para el cáncer de mama, este se sigue diagnosticando en etapas avanzadas, siendo el 42.1% de los casos diagnosticados en estadios III y IV. Múltiples estudios han corroborado hallazgos de concentraciones elevadas de ADN circulante en plasma y suero de pacientes con cáncer de mama y su valor pronóstico/predictivo respecto a los diferentes tratamientos utilizados, así mismo se puede detectar en el ADN plasmático mutaciones propias del tumor primario por ejemplo BRCA, PIK3CA entre otros. En el área de investigación, desconocemos cuales son la principales mutaciones en nuestra población derechohabiente del CMN "20 de Noviembre" y no se cuenta con estudios de biomarcadores moleculares como la concentración de ADN circulante tumoral y su valor pronostico y/o predictivo. Por lo anterior un análisis del ADN circulante en sangre de las pacientes nos ofrece la oportunidad de conocer estas mutaciones y poder evaluar cuáles 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 supervivencia	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.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización del 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 mediana.

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.

En cuanto se cuente con el total de muestras para la comparación entre la primera toma y la segunda, podrá emplearse una t-student pareada, considerando ambos momentos del tiempo como grupos independientes, de varianzas iguales.

En la situación 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 análisis se incluyeron 8 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, a las cuales se les tomó la muestra de ctADN en el periodo de noviembre de 2020 a marzo 2021 y se obtuvo información de los expedientes clínicos electrónicos en el servicio de Oncología Médica en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE así como el resultado de ctADN recolectado por biopsia líquida. **En la tabla 1** podemos ver las características socio-demográficas de las pacientes, se concluye que la edad promedio fue de 58.8 años (D.E. \pm 10.07), La muestra de 8 pacientes analizadas fue en su totalidad del sexo femenino. 4 pacientes no presentaron comorbilidades, y de las enfermedades crónicas más identificadas fueron las cardiovasculares (HAS y una paciente con historia de cardiopatía isquémica). Todas las pacientes estaban en buenas condiciones físicas generales, con un estado funcional adecuado (ECOG entre 0-1).

Características clínico-patológicas de la población, como se evidencia en la Tabla2. El subtipo histológico predominante fue el carcinoma ductal infiltrante de bien a moderadamente diferenciado. La etapa clínica inicial más frecuente lo constituyó la etapa clínica II. Y el fenotipo molecular predominante determinado por inmunohistoquímica fue el luminal A con un total de 4 pacientes.

Si valoramos estos datos por graficas en el caso del subtipo histológico como podemos observar en la **gráfica 1**. Un 37% padeció una histología de adenoma ductal infiltrante G1 y un 37.5 G2. Por otro lado, un 13% constituyó la población de paciente con adenocarcinoma lobulillar y carcinoma medular, respectivamente. Ninguna paciente presento un adenocarcinoma ductal infiltrante de alto grado.

Tabla 1. Características Sociodemográficas de la población de estudio*

	n = 8
Edad promedio \pm D.E.	57.8 \pm 10.07
Sexo	
Masculino	0
Femenino	8
Comorbilidades	
Diabetes mellitus 2	0
Hipertensión arterial sistémica	2
Cardiopatía isquémica	1
Neoplasia previa	1
Ninguna	4
ECOG inicial	
ECOG 0	2
ECOG 1	6
ECOG 2	0
ECOG 3	0
ECOG 4	0

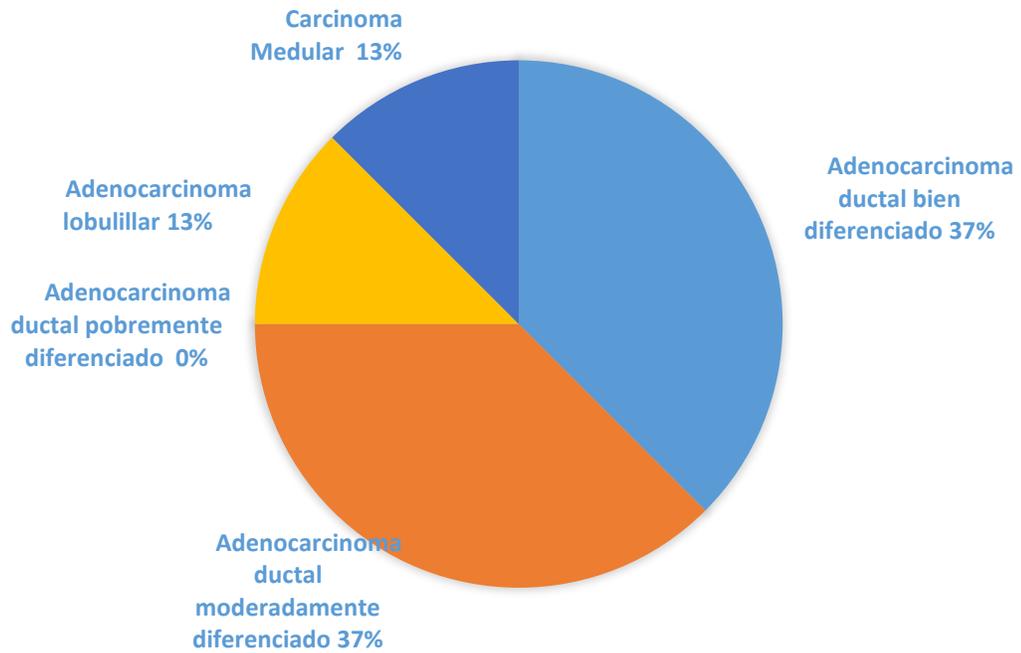
*Información obtenida de los expedientes clínicos electrónicos en consulta (periodo de noviembre 2020-marzo2021).

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

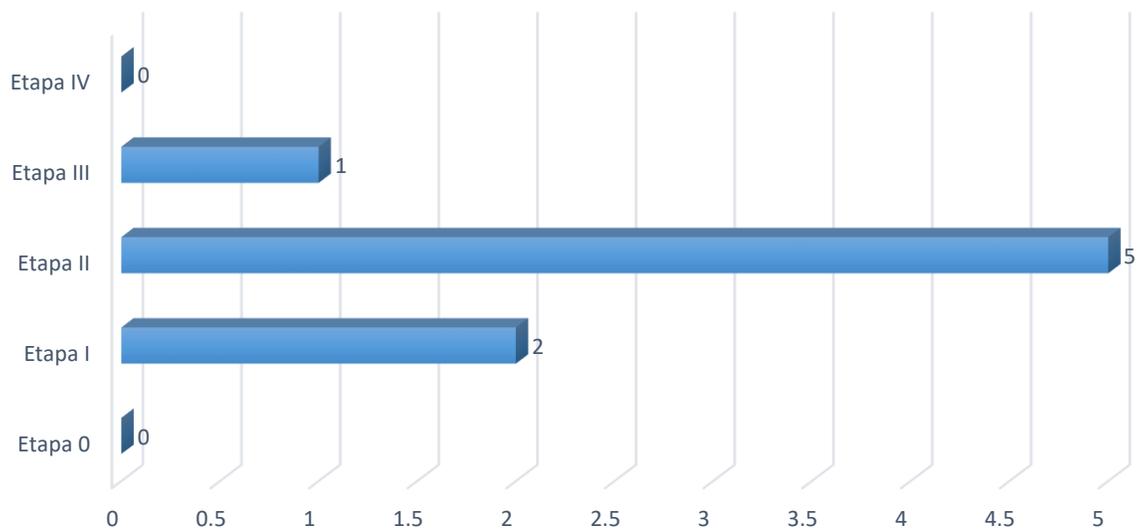
Tabla 2. Características clínico-patológicas de la población

	n
	= 8
Subtipo Histológico	
Adenocarcinoma ductal bien diferenciado	3
Adenocarcinoma ductal moderadamente diferenciado	3
Adenocarcinoma ductal pobremente diferenciado	0
Adenocarcinoma lobulillar	1
Carcinoma Medular	1
Etapa tumoral	
Etapa 0	0
Etapa I	2
Etapa II	5
Etapa III	1
Etapa IV	0
Fenotipo molecular	
Luminal A	4
Luminal B HER 2 Negativo	1
Luminal B HER 2 Positivo	1
Enriquecido Her 2	2
Triple Negativo	0
Datos obtenidos de los expedientes clínicos del CMN 20 noviembre 2020-2021	

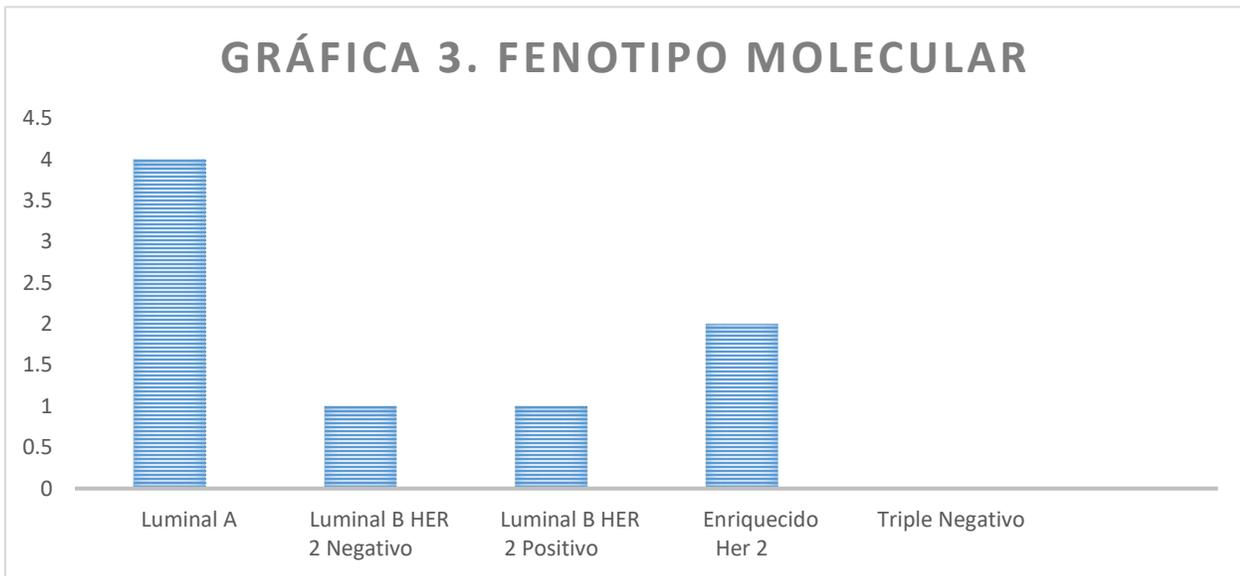
GRAFICA 1. SUBTIPO HISTOLÓGICO ANALIZADO EN PORCENTAJES.



GRÁFICA 2. ETAPA CLÍNICA AL DIAGNÓSTICO.



En la **gráfica 2**, observamos de forma desglosada que de las 8 pacientes analizadas: pertenecían respectivamente a las etapas clínicas I, II, III Y IV un total de 2, 5, 1 y 0 respectivamente. Con respecto al fenotipo molecular podemos determinar en **la gráfica 3** que la mayoría fueron luminal A con un total de 4 pacientes, en tanto que del inmunofenotipo triple negativo no se obtuvo pacientes.



En la **Tabla 3**, A continuación se describe el tipo de tratamiento recibido y la supervivencia libre de enfermedad, el tratamiento previo a la recolección de la muestra de las 8 pacientes 7 se sometieron a cirugía de mama (mastectomía Radical/Cirugía conservadora de mama), 7 pacientes recibieron terapia adyuvante (la mayoría multidisciplinario, conforme al estadio clínico y el fenotipo molecular), una paciente recibió neoadyuvancia, con recurrencia en mama contralateral a los 4 meses del diagnóstico. La mediana de supervivencia libre de progresión es de 12.12 meses a partir del diagnóstico. Con una mediana de 12.5 meses y un rango desde los 4 meses a 16 meses.

Tabla 3. Sobrevida libre de progresión y tratamiento recibido.	
Tratamiento Recibido:	N: 8
Quimioterapia Neoadyuvante	1
Cirugía+ Quimioterapia Adyuvante+Hormonoterapia	1
Cirugía + Quimioterapia adyuvante + Radioterapia adyuvante + hormonoterapia	4
Cirugía + Quimioterapia+Terapia blanco	1
Cirugía + Quimioterapia+Terapia blanco +Hormonoterapia	1
Sobrevida libre de progresión.	12.12 meses± 3.4437
<ul style="list-style-type: none"> • Una paciente recurrió a los 4 meses, el resto no ha tenido datos de progresión. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Antes de la toma de la muestra 7 pacientes habían sido sometidas a la cirugía inicial • Previo a la muestra todas las pacientes eran vírgenes a tratamiento sistémico • La información fue obtenida del expediente clínico electrónico del CMN. Durante el periodo 2020-2021. • El tratamiento se definió como el recibido antes de la toma de la muestra y posterior hasta el momento del análisis actual. • **La supervivencia libre de la enfermedad a partir del diagnóstico hasta la recurrencia o muerte por cáncer. • 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 IMPLEN. En la **figura 1.** se muestra el equipo denominado, así como una imagen representativa de la cuantificación.

En la tabla 4 se puede apreciar la cuantificación de ADN circulante relacionado a cada paciente, se evidencia que la media fue de fue una concentración de 544.4 ng/microlitros con una desviación ± 632.20 . El rango fue de 25.7-1860.7 ng/microlitros.

Tabla 4. Cuantificación ctADN en suero*	
n = 5	Concentración ctADN inicial (ng/microlitro)
# muestra	
1	503.4
2	25.7
3	243.6
4	1860.7
5	109.3
6	102.8
7	1316.4
8	193.3
Promedio ± D.E.	544.4 ng/microlitros ±632.20
<p>*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</p> <p>D.E. = Desviación estándar</p> <p>ct = tumoral circulante</p>	

En las tablas 5 y 6 se evidencia la relación que existe entre el fenotipo molecular y la concentración de ctADN, en la tabla 5 presentamos una simple sumatoria por fenotipos donde es evidente que la 2 pacientes con expresión de HER2 sobreexpresado tienen una alta concentración sumando 1819.8 ng/ml y en la tabla 6 podemos ver que fue el promedio más alto, tras lapaciente con fenotipo Luminal B con HER2 positivo, lo que nos indica que existe una relación entre la expresión de este biomarcador y la expresión del ADN circulante, pudiéndose correlacionar que las pacientes con estas características

podrían presentar una presentación más agresiva de la enfermedad, sin embargo esos son datos de los que nos tenemos suficiente evidencia y deben estudiarse a mayor profundidad.

Tabla. 5. Promedio de CtDNA CONCENTRACIÓN EN SUERO ng/microlitros		
Fenotipo molecular		Promedio de CtDNA CONCENTRACIÓN EN SUERO ng/microlitros
POSITIVO	LUMINAL B/HER2	1860.7
	HER2 +++	909.9
	LUMINAL A	142.975
NEGATIVO	LUMINAL B HER2	102.8
	Total general	544.4
102.8		
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 la tabla 7 se correlaciona el estadio clínico con el fenotipo moléculas, se puede asociar que aquellos luminales A independientemente del estadio clínico expresan valores más bajos del ADN circulante. En tanto en la tabla 8 se ve que aquellos que expresan her2 incluso luminales tienden a tener valores más elevados, de hecho estando en dicho grupo los valores más altos reportados, independientemente del estadiaje clínico una paciente etapa clínica IA con HER2 +++ presento a pesar del estadio temprano de la enfermedad una cifra de 503.4ng/microlitros, una segunda paciente también en una etapa clínica temprana, IA y luminal b con HER2 positivo presento la cifra mas alta de todas las reportadas en el primer muestreo.

TABLA 7 RELACION ENTRE EL EC Y EL FENOTIPO		
EC	Fenotipo	CTDNA
IA	HER2 +++	503.4
IA	LUMINAL B/HERPOS	1860.7
IIA	LUMINAL A	25.7
IIA	LUMINAL A	109.3
IIA	LUMINAL A	193.3
IIB	LUMINAL A	243.6
IIIA	LUMINAL B HER-	102.8
IIIC	HER2 +++	1316.4

TABLA 6.		
EC	Fenotipo	CTDNA
IA	HER2 +++	503.4
IA	LUMINAL B/HERPOS	1860.7
IIIC	HER2 +++	1316.4

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, a la toma de la primera muestra todas las pacientes eran vírgenes a tratamiento sistémico.

Cuando se toman en cuenta los diferentes parámetros se observa que el nivel más elevado de ct ADN es de 1860.7 ng/ μ l quien es una paciente con fenotipo luminal B HER2 positivo con diagnóstico de adenocarcinoma ductal infiltrante moderadamente diferenciado, de 50 años de edad, un buen estado funcional, sin comorbilidades, recibió tratamiento sistémico y radioterapia y hormonoterapia posterior a la cirugía y hasta el momento está sin recurrencia, sin embargo con los datos que obtuvimos consideramos que es una paciente de alto riesgo de recurrencia local y a distancia, y efectivamente a nivel de los datos bibliográficos las pacientes que expresan HER2 tienen un comportamiento patológico más agresivo, a pesar de la etapa clínica en que fue diagnosticada, se puede correlacionar la evidencia con los datos obtenidos pues aquellas con fenotipo luminal A independientemente del estadio clínico tienen un comportamiento más indolentes, menos agresivo y parece tener relación con los datos encontrados en la biopsia líquida. en relación con fenotipo Luminal A.

Con respecto a los datos de las pacientes que han tomado la segunda muestra es un análisis que se realizará en otro apartado del protocolo, y en él se podrá correlacionar de una manera más fidedigna los hallazgos encontrados en esta fase de la evaluación.

X. DISCUSIÓN.

Es conocido que las neoplasias malignas con una proliferación celular y biología más agresiva se asocian a una tasa elevada de proliferación celular y esto a su vez desencadena una cascada de reacciones inflamatorias, cambios en el microambiente celular, angiogénesis que a la vez provoca permeabilidad capilar, invasión, así como apoptosis y necrosis que a su vez van a precipitar que fragmentos celulares y

de ADN lleguen al torrente sanguíneo incluso en etapas que macroscópicamente son estadificadas como tempranas, estos datos se pueden correlacionar con los datos aquí obtenidos, ya que los subtipos moleculares que tienen características más agresivas presentaron elevación significativa de la concentración de ADN circulante.

Como se comentó en el desarrollo del tema en la actualidad los marcadores pronósticos y predictivos que existen son basados en la clínica, las características del tumor a nivel anatomopatológico, la inmunohistoquímica donde se utilizan reactivos donde se identifican receptores hormonales, la expresión del HER2 Y EL KI 67, siendo el tamaño tumoral, la invasión ganglionar, la invasión linfocelular y perineural, así como la metástasis son los elementos que se toman en cuenta para estratificar el riesgo de recurrencia de la enfermedad. (30). Y es por este motivo que se necesita una herramienta de un costo razonable, con un método poco invasivo, reproducible y factible para poder beneficiar a las pacientes y poder ofrecer el tratamiento más adecuado basados un marcador confiable y efectivo.

Con respecto a lo que se ha evidenciado en este análisis podemos decir que los datos obtenidos se relacionan de forma estrecha con la bibliografía consultada donde se evidencia que donde Larsson y colaboradores describen que las mayores concentraciones de ADN circulante se encontraron en aquellos pacientes con tumores más agresivos, que no expresan receptores hormonales, tanto en los HER2/NEU enriquecidos así como en los negativos(22).

En este análisis no se tienen datos sobre la respuesta del nivel del biomarcador en pacientes que recibieron alguna estrategia terapéutica con quimioterapia, hormonoterapia o terapia blanco, debido a que las pacientes analizadas son pacientes que en el momento de la toma de la primera muestra eran vírgenes a tratamiento.

Eleni Tzanikou y colaboradores exponen que el cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea que presenta alteraciones somáticas únicas que conducen a la reaparición y resistencia de la enfermedad y que las herramientas que poseemos a la fecha no son suficientes para brindar a las pacientes las terapias más acertadas en casos especiales, donde el análisis de ADN tumoral circulante

(ADNct) se ha convertido en un método atractivo no invasivo que bien tendría un impacto sumamente favorable, incluso en esas pacientes que como se mostro en las diferentes tablas y gráficas, a pesar de tener una etapa de la enfermedad temprana tiene un riesgo inminente de progresión. (8)

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. Se correlaciona con estirpes histológicas y fenotipos moleculares agresivos, por lo que de llegar a convertirse en una herramienta tendría la facultad de cambiar el pronóstico y el manejo en pacientes vulnerables.

XII. REFERENCIAS

1. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 2011, vol. 144, no 5, p. 646-674.
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan;71(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21654. Epub 2021 Jan 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2021 Jul;71(4):359. PMID: 33433946.
3. 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.
4. Palacio-Mejía L. diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud pública*, 2009.
5. Sánchez, J. C., & Valle-Solis, A. E. (2019). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Octava revisión. Colima 2019. *GACETA MEXICANA DE ONCOLOGIA*.
6. Breast Cancer. In: *American Joint Committee on Cancer Cancer Staging Manual*; 8th ed, 3rd printing, Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al (Eds), Chicago 2018.
7. 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.
8. Tzanikou, E., & Lianidou, E. (2020). The potential of ctDNA analysis in breast cancer. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 57(1), 54-72.
9. Bettegowada C, Sausen M, Leary RJ. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl*, 2014.

10. 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
11. 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
12. Underhill, H. R., Kitzman, J. O., Hellwig, S., Welker, N. C., Daza, R., Baker, D. N., ... & Shendure, J. (2016). Fragment length of circulating tumor DNA. *PLoS genetics*, 12(7), e1006162.
13. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, et al. Fragment length of circulating tumor DNA. *PLoS Genet*. 2016; 12(7):e1006162.
14. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, et al. Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? *Ann N Y Acad Sci*. 2001;945:258–264.
15. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* volume 11, pages 426–437(2011).
16. Malentacchi F, Pizzamiglio S, Verderio P, et al. Influence of storage conditions and extraction methods on the quantity and quality of circulating cellfree DNA (ccfDNA): the SPIDIA-DNAplas External Quality Assessment experience. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(12):1935–1942.
17. Haselmann V, Ahmad-Nejad P, Geilenkeuser WJ, et al. Results of the first external quality assessment scheme (EQA) for isolation and analysis of circulating tumour DNA (ctDNA). *Clin Chem Lab Med*. 2018; 56(2):220–228.
18. . A DNA Methylation-Based Test for Breast Cancer Detection in Circulating Cell-Free DNA. *J. Clin. Med*. 2018, 7(11), 420.
19. . Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes Involved in Critical Regulatory Pathways for Developing a Blood-Based Test in Breast Cancer. *PLoS ONE* 6(1): e16080.
20. . Clinical factors associated with circulating tumor DNA (ctDNA) in primary breast cancer. *Molecular Oncology*. 23 January 2019. DOI: 10.1002/1878-0261.12456.

21. Circulating breast-derived DNA allows universal detection and monitoring of localized breast cancer. *Ann Oncol*. 2020 marzo; 31 (3): 395-403.
22. 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
23. Circulating tumor DNA for triple-negative breast cancer diagnosis and treatment
24. Lehner J. Circulating plasma DNA and DNA integrity in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Epub* 2013 Aug 2.
25. 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 (SAFIRO1 / UNICANCER). *Lancet Oncol* 2014; 15: 267.
26. Cancer Genome Atlas Network. Retratos moleculares completos de tumores de mama humanos. *Nature* 2012; 490: 61.
27. 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.
28. 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
29. Z. Jin, W.S. El-Deiry Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4 (2005), pp. 139-163.
30. 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.