

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización y comparación de mutaciones en tumores  
primarios, tejido metastásico y DNA circulante en pacientes  
con cáncer de mama metastásico**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Fernando Moreno Antón**

**Directores**

**Miguel Martín Jiménez**  
**Eduardo Díaz-Rubio García**  
**Milagros González Rivera**

**Madrid**  
**Ed. electrónica 2019**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

**DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
MÉDICO-QUIRÚRGICAS**



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE  
MUTACIONES EN TUMORES PRIMARIOS, TEJIDO  
METASTÁSICO Y DNA CIRCULANTE EN PACIENTES  
CON CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO**

Fernando Moreno Antón

Directores

Miguel Martín Jiménez  
Eduardo Díaz-Rubio García  
Milagros González Rivera

Madrid, 2019



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

**DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
MÉDICO-QUIRÚRGICAS**



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE MUTACIONES EN  
TUMORES PRIMARIOS, TEJIDO METASTÁSICO Y DNA CIRCULANTE EN  
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

Fernando Moreno Antón

Directores  
Miguel Martín Jiménez  
Eduardo Díaz-Rubio García  
Milagros González Rivera

Madrid, 2019



Al Dr. Miguel Martín, por ofrecerme participar en este proyecto, por ser capaz de transmitir ilusión en todo lo que hace y haberse convertido en mi referencia profesional desde la residencia.

Al Dr. Díaz Rubio, por facilitarme desarrollar mi trabajo durante los últimos años y por su capacidad docente, que ha transmitido a varias generaciones de Oncólogos.

A la Dra. Milagros González, por la ayuda en el diseño y metodología del trabajo.

A la Dra. López Tarruella por su apoyo en este y otros proyectos, por tantas llamadas y mensajes en cualquier momento.

A Javier Gayarre y Rocío Ramos por el trabajo que realizado desde el laboratorio y por ayudarme a entender la metodología de la secuenciación.

A María por su capacidad de trabajo y haber servido de nexo de unión con el laboratorio de oncología del Gregorio Marañón.

A mis compañeros del Servicio de Oncología del Hospital Clínico por su ayuda en el trabajo diario que hace todo más fácil.

A las pacientes y sus familias por la generosidad al haber participado en este estudio y la confianza depositada en nosotros.

A Clara, Ana y Carmen por haberme permitido privarles de mucho tiempo estar juntos que sin duda les correspondía.

A Clara por haberme estimulado y ayudado durante estos años y acompañarme en un proyecto de vida que va más allá de esta tesis.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy y por su incondicional apoyo mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1 Heterogeneidad en cáncer de mama .....</b>	<b>26</b>
1.1.1 Heterogeneidad intertumoral.....	26
1.1.2 Heterogeneidad intratumoral.....	27
<b>1.2 Modelos de progresión metastásica .....</b>	<b>33</b>
<b>1.3 Genes implicados en cáncer de mama .....</b>	<b>35</b>
<b>1.4 DNA libre circulante (cfDNA) y cáncer de mama.....</b>	<b>39</b>
1.4.1 Mecanismos de liberación de DNA .....	40
1.4.2. Aplicaciones clínicas y traslacionales de ctDNA en cáncer de mama .....	41
<b>2. JUSTIFICACIÓN HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
<b>2.1 Justificación.....</b>	<b>48</b>
<b>2.2 Hipótesis .....</b>	<b>48</b>
<b>2.3 Objetivos .....</b>	<b>48</b>
2.3.1 Objetivo principal.....	48
2.3.2 Objetivos Secundarios.....	49
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Diseño del estudio .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2 Población del estudio y tamaño muestral .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3 Criterios de inclusión y exclusión .....</b>	<b>53</b>
<b>3.4 Obtención del material biológico .....</b>	<b>53</b>
<b>3.5 Almacenamiento de las muestras.....</b>	<b>55</b>
<b>3.6 Metodología de secuenciación genómica.....</b>	<b>56</b>
3.6.1 Elección de genes y generación del panel HGM. ....	56
3.6.2 Procedimiento de adjudicación.....	56
3.6.3 Secuenciación masiva de muestras de biopsia sólida. ....	57
3.6.4 Secuenciación masiva de muestras de biopsia líquida .....	59
3.6.5 Validación de resultados mediante tecnología Illumina .....	61
<b>3.7 Análisis estadístico .....</b>	<b>62</b>

<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
<b>4.1 Estudio descriptivo de la muestra</b> .....	<b>67</b>
4.1.1 Variables demográficas .....	67
4.1.3 Variables clínicas y patológicas.....	68
4.1.4 Variables asociadas al tratamiento recibido .....	72
<b>4.2 Resultados de estudios de secuenciación masiva</b> .....	<b>76</b>
4.2.1 Variantes comunes identificadas en el tumor primario y metástasis .....	77
4.2.2 Variantes comunes en el tumor primario, metástasis y plasma .....	79
4.2.3 Variantes comunes en el tumor primario y metástasis no presentes en plasma	82
4.2.4 Variantes identificadas en metástasis y plasma no presentes en el tumor	
primario.....	83
4.2.5 Confirmación de las variantes encontradas por Illumina.....	84
<b>4.3 Análisis de mutaciones en función del fenotipo tumoral</b> .....	<b>84</b>
<b>4.4 Análisis de variantes patogénicas/probablemente patogénicas más frecuentes</b>	
.....	<b>86</b>
4.4.1 Variantes en ESR1 .....	86
4.4.2 Variantes en PIK3CA .....	86
4.4.3 Variantes en ERBB2 .....	88
4.4.4 Variantes de BRCA 1 y 2 .....	88
4.4.5 Variantes de TP53 .....	89
4.4.6 Variantes en AKT1 .....	90
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>92</b>
<b>5.1 Comparación de las alteraciones genómicas en tejido del tumor primario y de</b>	
<b>las metástasis.</b> .....	<b>93</b>
5.1.1 Comparación de primario y metástasis por IHC e hibridación .....	93
5.1.2 Comparación de primario y metástasis por técnicas de secuenciación .....	95
<b>5.2 Alteraciones genómicas en muestras de ctDNA obtenidas en sangre periférica</b>	
.....	<b>97</b>
<b>5.3 Comparación de las alteraciones genómicas en ctDNA con las obtenidas en la</b>	
<b>biopsia del tumor primario y de sus metástasis.</b> .....	<b>99</b>
<b>5.4 Análisis de las variantes genéticas encontradas para identificar marcadores</b>	
<b>de respuesta al tratamientos dirigidos así como mecanismos de resistencia al</b>	
<b>mismo</b> .....	<b>103</b>
5.4.1 Variantes en el receptor estrogénico (ESR1) .....	103
5.4.2 Variantes de PIK3CA .....	106
5.4.3 Variantes de ERBB2 .....	109

5.4.4 Variantes en BRCA 1/2 .....	110
5.4.5 Variantes de TP53 .....	111
5.4.6 Variantes de AKT1 .....	112
5.4.7 Variantes en BRAF .....	113
<b>5.5 Relevancia clínica de la determinación de mutaciones .....</b>	<b>113</b>
<b>5.6 Limitaciones y fortalezas del estudio.....</b>	<b>115</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>118</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>120</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>137</b>
8.1 Anexo 1. Aprobación por el comité ético del Hospital Gregorio Marañón ....	137
8.2 Anexo 2. Aprobación por el comité ético del Hospital Clínico San Carlos .....	138
8.3. Anexo 3. Aprobacion por el comité de investigación del Hospital Infanta Cristina de Parla .....	139
8.4 Anexo 4. Consentimiento informado del estudio .....	140
8.5. Anexo 5. Comparativa Ion Torrent e Illumina.....	145
8.6. Anexo 6. Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral.....	154

### ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**CDI:** Carcinoma ductal infiltrante.

**CDIS:** Carcinoma ductal in situ.

**cfDNA:** DNA libre circulantes

**ctDNA:** DNA libre tumoral

**CGH:** Hibridación genómica comparativa.

**CTCs:** Células tumorales circulantes.

**ctDNA:** DNA tumoral circulante.

**ddPCR:** PCR digital

**DTCs:** Células tumorales diseminadas

**ECOG:** Eastern Cooperative Oncology Group

**FISH:** Hibridación con fluorescencia in situ.

**gDNA:** DNA genómico

**HCSC:** Hospital Clínico San Carlos

**HGUGM:** Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

**HUIC:** Hospital Universitario Infanta Cristina

**IAs:** Inhibidores de Aromatasa

**ICGC:** Consorcio internacional para el estudio del Genoma del Cáncer.

**IHC:** Inmunohistoquímica

**METABRIC:** Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium.

**NGS:** Secuenciación de nueva generación.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**RE:** Receptor estrogénico.

**RP:** Receptor de progesterona.

**SLP:** Supervivencia libre de progresión

**SMGs:** Genes significativamente mutados

**SNS:** Secuenciación de núcleos individuales.

**SPP:** Sector-Ploidy-Profiling.

**TCGA:** Atlas del Genoma del Cáncer.

**WES:** Secuenciación completa del exoma.

**WGS:** Secuenciación del genoma completo.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Heterogeneidad tumoral en el diagnóstico. 29	
<b>Figura 2.</b> Heterogeneidad a nivel celular.....	32
<b>Figura 3.</b> Diseminación y modelo metastásico en cascada.....	33
<b>Figura 4.</b> Modelos de progresión lineal y paralela .....	34
<b>Figura 5.</b> Modelo de progresión paralela.....	35
<b>Figura 6.</b> Lista de genes en orden de frecuencia en cáncer de mama.....	39
<b>Figura 7.</b> Métodos para la detección de ctDNA.....	40
<b>Figura 8.</b> Ácidos nucleicos libres en la sangre. ....	41
<b>Figura 9.</b> Jerarquía clonal de mutaciones en ctDNA .....	46
<b>Figura 10.</b> Diseño del estudio MIRROR .....	52
<b>Figura 12.</b> Criterios para la identificación de las variantes. ....	77
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de mutaciones en PIK3CA.....	106

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Genes significativamente mutados en cáncer de mama del TCGA.....	36
<b>Tabla 2.</b> Genes frecuentemente alterados identificados en cáncer de mama.....	38
<b>Tabla 3.</b> Determinaciones analíticas en estudio MIRROR.....	51
<b>Tabla 4.</b> Panel de genes seleccionados .....	56
<b>Tabla 5.</b> Características patológicas del tumor primario y las metástasis.....	70
<b>Tabla 6.</b> Variación intraindividual de RE, RP y HER2 entre primario y metástasis.....	72
<b>Tabla 7.</b> Variantes patogénicas y probablemente patogénicas comunes entre tumor primario y metástasis. ....	79
<b>Tabla 8.</b> Variantes patogénicas comunes tumor primario, metástasis y plasma.....	82
<b>Tabla 9.</b> Variantes comunes primario y metástasis no presentes en plasma.....	82
<b>Tabla 10.</b> Variantes patogénicas identificadas en metástasis y ctDNA no presentes en tumor primario.....	83
<b>Tabla 11.</b> Variantes de ESR1 .....	86
<b>Tabla 12.</b> Variantes de PIK3CA .....	87
<b>Tabla 13.</b> Variantes de ERBB2.....	88
<b>Tabla 14.</b> Variantes de BRCA .....	88
<b>Tabla 15.</b> Variantes TP53 .....	89
<b>Tabla 16.</b> Variantes de AKT1 .....	90
<b>Tabla 17.</b> Expresión de RE y RP en tumor primario y las metástasis. ....	94
<b>Tabla 18.</b> Sobreexpresión/Amplificación de HER2 en el tumor primario y la metástasis. ....	95
<b>Tabla 19.</b> Genes más frecuentemente mutados en cáncer de mama y sus posibilidades terapéuticas asociadas.....	114

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Curva de reclutamiento.....	67
<b>Gráfico 2.</b> Localización de las metástasis biopsiadas.....	69
<b>Gráfico 3.</b> Inmunofenotipo del tumor primario.....	71
<b>Gráfico 4.</b> Inmunofenotipo de las metástasis.....	71
<b>Gráfico 5.</b> Tratamientos previos recibidos en estadios iniciales.....	72
<b>Gráfico 6.</b> Quimioterapia neoadyuvante.....	73
<b>Gráfico 7.</b> Terapia anti-HER2 neoadyuvante.....	73
<b>Gráfico 8.</b> Quimioterapia adyuvante.....	74
<b>Gráfico 9.</b> Tratamiento hormonal adyuvante.....	74
<b>Gráfico 10.</b> Terapia anti-HER2 adyuvante.....	75
<b>Gráfico 11.</b> Radioterapia previa.....	75
<b>Gráfico 12.</b> nº líneas previas para la enfermedad avanzada.....	76
<b>Gráfico 13.</b> Variantes comunes identificadas en tumor primario y metástasis.....	77
<b>Gráfico 14.</b> Clasificación de variantes comunes primario y metástasis en función de patogenicidad.....	78
<b>Gráfico 15.</b> Variantes patogénicas y probablemente patogénicas comunes entre tumor primario y metástasis.....	79
<b>Gráfico 16.</b> Variantes identificadas en tumor primario, metástasis y plasma.....	80
<b>Gráfico 17.</b> Clasificación de variantes comunes entre tumor primario, metástasis y plasma en función de patogenicidad.....	80
<b>Gráfico 18.</b> Clasificación de las variantes acorde al mecanismo mutacional.....	81
<b>Gráfico 19.</b> Variantes patogénicas y probablemente patogénicas comunes en tumor primario y metástasis y plasma.....	81
<b>Gráfico 20.</b> Variantes identificadas en metástasis y ctDNA no presentes en tumor primario.....	83
<b>Gráfico 22.</b> Variantes patogénicas/probablemente patogénicas de PIK3CA.....	87
<b>Gráfico 23.</b> Mutaciones de ESR1 según momento de exposición a IAs.....	105

# RESUMEN

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada en mujeres en los países occidentales. Los mayores avances en el tratamiento del cáncer de mama están relacionados con el desarrollo de terapias dirigidas como tamoxifeno frente al receptor estrogénico (RE) y trastuzumab para el cáncer de mama HER2 positivo.

La utilización de tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) en proyectos cooperativos internacionales como el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y el Consorcio Internacional para el estudio del Genoma del Cáncer (ICGC) ha aportado información esencial sobre el perfil de mutaciones del cáncer de mama. Este conocimiento ha llevado a la identificación de potenciales dianas terapéuticas para las cuales existen tratamientos disponibles que deben ser testados en ensayos clínicos.

Sin embargo, la heterogeneidad espacial y temporal intratumoral del cáncer de mama puede tener implicaciones relevantes tanto en el desarrollo de programas de análisis de biomarcadores como en el desarrollo de terapias dirigidas. Dada la heterogeneidad documentada entre el tumor primario y sus metástasis, las biopsias del tumor primario pueden no constituir la fuente idónea para la caracterización de la enfermedad. Por otra parte, la biopsia de las diferentes localizaciones metastásicas no es posible en la mayoría de las ocasiones, la repetición de las biopsias en cada nueva progresión es difícil de realizar y a menudo no cuenta con la aprobación de las pacientes.

Es preciso, por tanto el desarrollo de abordajes que permitan el análisis de las alteraciones genéticas del cáncer por métodos no invasivos, que permitan la repetición de los estudios cuantas veces sea necesaria e independientemente de su localización anatómica con el objetivo de identificar dianas terapéuticas y potenciales mecanismos de resistencia.

El análisis del DNA tumoral circulante (ctDNA) está siendo estudiado como una alternativa a la realización de biopsias tisulares. Dado que el ctDNA es liberado a la

circulación tanto por células del tumor primario como de sus metástasis podría constituir una herramienta mínimamente invasiva para obtener información de todas las localizaciones metastásicas en tiempo real.

## **OBJETIVOS**

El objetivo principal del estudio es evaluar la concordancia de las mutaciones identificadas en tejido parafinado del tumor primario y metastásico en pacientes con cáncer de mama metastásico. Los objetivos secundarios fueron la determinación de los perfiles genómicos de ctDNA procedente de sangre periférica y la comparación de estos perfiles con los identificados en el tumor primario y metastásico para evaluar las mutaciones de los genes más relevantes en diferentes tejidos.

## **MATERIAL Y METODOS**

Se incluyeron pacientes con cáncer de mama metastásico,  $\geq 18$  años, con muestra parafinada archivada del tumor primario e indicación clínica para la realización de biopsia de la recidiva. Se excluyeron pacientes con metástasis óseas como única localización metastásica, trastornos de la coagulación o situación funcional según escala del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 3 o 4.

Las muestras parafinadas del tumor primario y metastásico fueron evaluadas por un patólogo para seleccionar áreas del tumor con celularidad  $>70\%$ . Se extrajo muestra de DNA utilizando mediante el kit QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen). La extracción de cfDNA se realizó mediante QIAamp<sup>®</sup> Circulating Nucleic Acid (Qiagen).

La secuenciación masiva ha sido realizada utilizando la tecnología Ion Torrent por GENOMICA SAU a partir de 80 muestras de tejido parafinado y 40 muestras de plasma utilizando el panel HGM diseñado para cubrir los 54 oncogenes y genes supresores más frecuentes en cáncer de mama. Posteriormente se ha realizado una validación de variantes identificadas por Ion Torrent utilizando una tecnología de NGS alternativa (Illumina).

## RESULTADOS

Entre noviembre de 2013 y marzo de 2017, un total de 80 pacientes cumplieron los criterios de inclusión y exclusión y firmaron el consentimiento informado. Tras aplicar unos criterios estrictos de calidad para el análisis de las muestras finalmente se dispone de datos completos (muestras válidas de tumor primario, metástasis y plasma) en 40 de estos pacientes.

Se han identificado 110 variantes en 34 genes categorizadas como patogénicas, probablemente patogénicas o de significado incierto comunes entre el tumor primario y sus metástasis. Cuando estas 110 variantes han sido analizadas en muestras de plasma se han detectado en ctDNA un total de 107 (sensibilidad = 0.972). Las variantes más frecuentes ( $\geq 5\%$ ) se encontraron en TP53 (17;16%), KMT2C (15;14%), PIK3CA (10;11%), PTPN14 (6; 5%) y BRCA2 (5; 5%)

De las variantes comunes a las 3 muestras, 22 fueron consideradas patogénicas (21%), 10 probablemente patogénicas (9%) y 75 de significado incierto (70%). La mayoría de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas fueron identificadas en los genes TP53 y PIK3CA.

Por otra parte, hemos identificado 13 variantes en tumor metastásico y ctDNA no presentes en el tumor primario. 6 de estas 13 variantes fueron consideradas patogénicas o probablemente patogénicas. La más frecuente fue la mutación en ESR1 identificada en 4 pacientes.

De las 110 variantes comunes entre tumor primario y metástasis identificadas por Ion Torrent se confirmaron por Illumina un total de 94 (85%). Al analizar la presencia de estas 94 variantes en ctDNA se identificaron 54 variantes (sensibilidad = 0.63).

**CONCLUSIONES**

Aunque la mayoría de las variantes identificadas son compartidas por el tumor primario y sus metástasis, el análisis por NGS del tumor metastásico ha permitido identificar variantes no presentes en el tumor primario. Estos hallazgos sugieren que el tejido tumoral procedente de las metástasis debería ser la fuente de material genómico utilizada para identificar biomarcadores pronósticos y de respuesta al tratamiento..

El análisis de ctDNA en plasma mediante la tecnología Ion Torrent ha mostrado una elevada sensibilidad en la detección de variantes identificadas en tejido de tumor primario y metastásico. De este modo, el análisis de ctDNA podría ser una fuente alternativa para la detección de alteraciones genómicas en pacientes con cáncer de mama avanzado.

# ABSTRACT

**ABSTRACT****BACKGROUND**

Breast cancer is the most frequent cancer diagnosed in occidental countries. Major advances in breast cancer treatment involve targeted therapies such as tamoxifen for estrogen receptor (ER)- positive BC and trastuzumab for human epidermal growth factor (HER2)-positive breast cancer.

International collaborative efforts such as The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the International Cancer Genome Consortium (ICGC) have provided important insight into the mutational landscape of breast cancer using next-generation sequencing (NGS) technologies. These efforts have led to a catalog of new potential targets for which available treatments may be tested in rationally designed clinical trials.

However, the spatial and temporal intra-tumor genetic heterogeneity documented in breast cancer may have important implications for biomarker discovery programs and targeted cancer therapeutics. Given the heterogeneity documented between primary cancers and metastatic lesions, primary biopsies may not constitute an ideal source for the genetic characterization of metastatic disease and extensive sampling of metastatic deposits is often unfeasible. Hence, approaches that provide a global assessment of somatic genetic alterations in cancer irrespective of its anatomical location would be required for the identification of potential therapeutic targets and mechanisms of resistance.

Plasma derived cell-free tumor DNA (ctDNA) has been tested as a potential non-invasive surrogate for tumor tissue biopsies. Given that ctDNA is believed to be shed into the circulation by cancer cells from both the primary tumor and/or its metastases, it may constitute a source of tumor material from all disease sites, offering a real time, easily obtainable and minimally invasive tool for the development of molecular biomarkers

**OBJECTIVES**

The primary objective of this study is to assess the concordance of mutations between paraffin embedded primary and metastatic tumor tissue in patients with metastatic breast cancer (MBC).

Secondary objectives include determining the genomic profiles of circulating tumor DNA (ctDNA) from peripheral blood and comparing these genomic profiles with those from the primary tumor and metastatic tissue in order to assess mutations in most relevant genes in different tissues.

**MATERIAL AND METHODS**

MIRROR study is a multicenter, transversal, observational study performed by the Medical Oncology departments of three hospitals in Madrid, Spain: University Hospital Gregorio Marañón, University Hospital Clínico San Carlos, and University Hospital Infanta Cristina.

Inclusion criteria were patients with metastatic breast cancer,  $\geq 18$  years old, formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sample isolated from the primary tumor available and a clinical indication for biopsy of the metastatic relapse. Patients will be excluded if have metastatic bone disease only, have coagulation disorders, or have an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of 3 or 4.

For primary tumor and metastatic tissues, a hematoxylin and eosin section of FFPE sample was assessed by the pathologist to select areas of tumor with  $>70\%$  cellularity. Two unstained sections were macrodissected and processed for DNA extraction using the QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen). cfDNA was extracted using QIAamp<sup>®</sup> Circulating Nucleic Acid (Qiagen).

Massive parallel sequencing has been done with the Ion Torrent technology by Genómica SAU from 80 samples of paraffin embedded tissue and 40 samples of plasma using HGM panel designed to cover the 54 most commonly reported oncogenes and

tumor suppressor genes. Identified variants with Ion Torrent have been subsequently validated using an alternative NGS technology (Illumina).

## RESULTS

Between November 2013 and March 2017, 80 patients who met inclusion criteria and signed informed consent were enrolled. After implementing stringent quality criteria for sample analysis, finally we achieved 40 patients with valid samples from the three sources (primary and metastatic tumor and plasma).

A total of 110 common variants distributed in 34 genes and categorized as pathogenic, likely pathogenic or of uncertain significance were identified in primary and metastatic tumor. When these variants were further analyzed in plasma, 107 of 110 of them were also detected (sensitivity = 0.972). The most frequently common variants identified in primary and metastatic tumor and ctDNA were *TP53* (17, 15%), *KMT2C* (15, 14%), *PIK3CA* (12, 11%), *PTPN14* (6, 5%), *NFI* (5, 4%) and *BRCA2* (5, 4%).

Twenty two of the variants were considered pathogenic (21%), 10 likely pathogenic (9%) and 75 of uncertain significance (70%). The majority of pathogenic and likely pathogenic variants were identified in *TP53* and *PIK3CA* genes.

On the other hand, we identified 13 variants present in metastatic tumor and ctDNA that were not detected in primary tumor. Six out 13 variants were considered pathogenic or likely pathogenic. The most frequent were *ESR1* mutations identified in 4 patients.

The Illumina technology confirmed the Ion Torrent results in 94 of the 110 (85%) primary and metastatic common variants. When we analyzed the presence of these variants in ctDNA, we detected 59/94 variants (sensitivity = 0.63)

## CONCLUSIONS

Although most variants present in the primary tumor were also present in metastatic tissue, new variants not present in the primary tumor can be found in metastases.

Therefore, metastatic tissue rather than primary tumor seems to be the most appropriate source of genomic material to identify biomarkers of efficacy in clinical trials.

The analysis of ctDNA with Ion Torrent technology has shown a high sensibility in the detection of variants identified in primary and metastatic tumor. Therefore, ctDNA could be an alternative source of detection of genomic alterations in patients with metastatic breast cancer.

# INTRODUCCIÓN

### 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tumor más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres de Europa Occidental y Norteamérica, con 268.600 nuevos casos y 41.760 muertes esperadas en Estados Unidos en el 2019 (1). En España se diagnostican anualmente unos 26.000 nuevos casos de cáncer de mama alcanzándose una supervivencia a los 5 años del 83%, similar a los países europeos de nuestro entorno (2,3). La mejoría experimentada en supervivencia en pacientes con cáncer de mama durante las últimas décadas está relacionada no sólo con los programas de diagnóstico precoz sino también con los avances en el diagnóstico y tratamiento. En este sentido, el mejor conocimiento y la mejor caracterización de la enfermedad ha permitido la administración de tratamientos dirigidos más eficaces y menos tóxicos.

Actualmente disponemos de fármacos dirigidos a pacientes con un tipo de expresión génica concreta como es el caso de la expresión de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) así como sobreexpresión de HER2. Otros fármacos, aún en fase de desarrollo, se han diseñado tratando simultáneamente de identificar alteraciones genómicas que puedan predecir la respuesta al fármaco y que permitan seleccionar grupos de pacientes potencialmente susceptibles de responder mejor a estos tratamiento (4,5). Sin embargo, el uso de terapia dirigida se asocia con el desarrollo de resistencias y la aparición de clones tumorales con mutaciones que adquieren la habilidad de evadir el bloqueo funcional que produce la terapia de diana. El desarrollo de clones resistentes produce una disminución de la eficacia de los tratamientos que se traduce en respuestas antitumorales de cada vez más corta duración. La identificación de las alteraciones genómicas de estos clones y la asignación de fármacos dirigidos contra ellas podría permitir aumentar la eficacia de los tratamientos mediante, por ejemplo, el uso de terapias de diana secuenciales o concurrentes y podría repercutir favorablemente en la duración de la respuesta al tratamiento y finalmente en la supervivencia de las pacientes (6).

## 1.1 Heterogeneidad en cáncer de mama

### 1.1.1 Heterogeneidad intertumoral

Desde hace décadas es conocida la variación histológica que puede presentar el cáncer de mama, reflejada en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que clasifica la enfermedad en 17 categorías en función de sus rasgos morfológicos microscópicos (7). Así, determinados subtipos histológicos como los carcinomas medulares o los metaplásicos están asociados a alteraciones moleculares específicas a un pronóstico diferenciado (8,9). Sin embargo, la relevancia clínica de esta clasificación es limitada dado que la mayoría de los casos (>70%) son clasificados como carcinomas infiltrantes no específicos que muestran entre sí diferencias sustanciales tanto en el comportamiento clínico como en la sensibilidad al tratamiento (8,10).

La tecnología de *microarrays* ha permitido el análisis de la expresión de miles de genes simultáneamente lo que ha contribuido a un conocimiento más profundo de la heterogeneidad del cáncer de mama y a la clasificación del cáncer de mama en los llamados subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, *HER2-enriched* y *basal-like* (11–14). El subtipo luminal A se caracteriza por presentar expresión del receptor de estrógenos y/o progesterona, bajo grado histológico e índice proliferativo; los tumores luminales B presentan igualmente expresión de receptores hormonales pero se asocian a un mayor grado histológico y mayor índice proliferativo, menor sensibilidad al tratamiento hormonal y peor evolución clínica que los tumores luminales A. El cáncer de mama *HER2-enriched* se caracteriza por presentar amplificación de HER2 y alto grado histológico. Finalmente, los tumores *basal-like* expresan marcadores propios de células basales como las citokeratinas basales, no expresan RE, RP, ni HER2 y tienen un comportamiento más agresivo y peor pronóstico. No obstante, esta clasificación se realizó evaluando un bajo número de tumores primarios de mama y sólo midieron los niveles de expresión de un número limitado de genes. Estudios posteriores focalizados en el grupo heterogéneo de cáncer de mama triple negativo ha revelado subtipos adicionales tales como el claudin-low que han mostrado un perfil de expresión génica similar al de las células madre de la glándula mamaria (*mammary stem cells*), aumento de activación de los genes de respuesta inmunes, rasgos mesenquimales y positividad

para marcadores de transición epitelio-mesénquima (15). En otro estudio, el análisis del perfil de expresión génica de 587 tumores triple negativo identificó 6 subtipos tumorales incluyendo dos subtipos *basal-like*, un subtipo inmunomodulador, mesenquimal, mesenquimal *stem-like* y luminal receptor androgénico (16). Estas diferencias de expresión génica pueden traducirse en una diferente sensibilidad a los tratamientos que no obstante, debe ser validada en la clínica (17).

El estudio METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*) ha ofrecido un mayor refinamiento de la taxonomía molecular del cáncer de mama integrando el análisis del número de copias con el perfil de expresión génica de aproximadamente 2000 pacientes con cáncer de mama. Este análisis permitió identificar 10 subtipos moleculares con diferente evolución clínica (18).

El desarrollo y la implementación de la secuenciación de próxima generación (*next-generation sequencing*) ha permitido descubrir alteraciones moleculares múltiples (mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, amplificaciones, duplicaciones de segmentos, translocaciones e inversiones) en cáncer mama (19). Uno de los hallazgos más relevantes de estos estudios es que salvo las mutaciones somáticas en GATA3, TP53 y PIK3CA que aparecen en > 10% de los diferentes subtipos de cáncer de mama, la incidencia de otras mutaciones es muy baja (20–24). En el 2012, el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) mostró los resultados del perfil génico de cientos de muestras de cáncer de mama procedentes de diferentes plataformas mediante el análisis del número de copias de DNA genómico, metilación de DNA, secuenciación de exoma, *arrays* de mRNA, secuenciación de microRNA y *arrays* de proteína de fase reversa (25). Este análisis integrado mostró la existencia de 4 tipos fundamentales de cáncer de mama. Además de mostrar una significativa heterogeneidad genética, el estudio mostró patrones de expresión proteica y vías de señalización propias de cada subtipo lo cual podría servir de base para explorar nuevas dianas terapéuticas.

### **1.1.2 Heterogeneidad intratumoral**

La heterogeneidad intratumoral ha sido reconocida como una de las causas del fracaso de los tratamientos antitumorales dirigidos a dianas terapéuticas y ha sido

ampliamente estudiada desde que fue propuesta en 1976 (26).

Las técnicas de hibridación genómica y de secuenciación masiva han evidenciado que este fenómeno podría ser más frecuente de lo que se pensaba. Algunas hipótesis indican que la heterogeneidad celular tiene su origen en alteraciones en su proceso de diferenciación. De hecho, la iniciación y el desarrollo del cáncer dependen de factores genéticos, particularmente por la adquisición de múltiples mutaciones con efecto funcional en la patogénesis del cáncer (mutaciones conductoras o “*driver mutations*”) asociadas a otras que por sí solas no conferirían ninguna ventaja selectiva (mutaciones pasajeras o “*passenger mutations*”). No obstante, la falta de relevancia clínica de las “*passenger mutations*” se ha puesto recientemente en entredicho, ya que podrían modular la actividad de las “*driver mutations*” y ser por tanto una de las razones de la resistencia a terapias de diana contra las mismas (27).

#### **1.1.2.1 Heterogeneidad espacial**

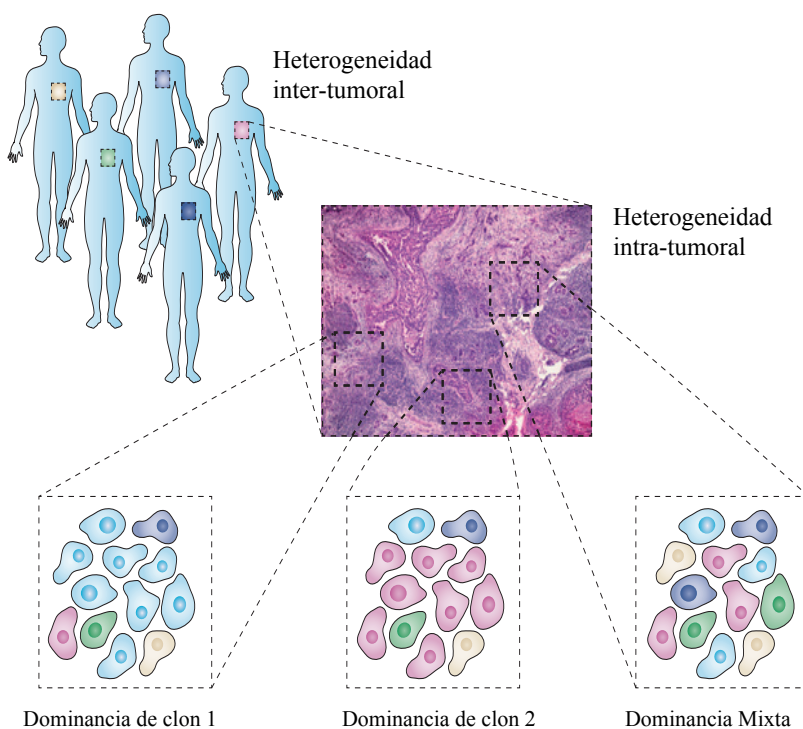
La heterogeneidad espacial se refiere a la heterogeneidad observada entre diferentes regiones del tumor primario, entre el tumor primario y las metástasis o entre las distintas lesiones metastásicas siendo evidente en ocasiones desde el punto de vista histopatológico.

En un estudio de prueba de concepto se analizaron mediante hibridación genómica comparativa (CGH) basada en microarrays de alta resolución, secuenciación de TP53 e hibridación con fluorescencia in situ (FISH) diferentes áreas morfológicas de 6 casos de cáncer de mama primario metaplásico con el objetivo de conocer si la diversidad morfológica estaba sustentada por heterogeneidad genética. Aunque en la mayoría de los casos, los componentes morfológicamente distintos eran clonales, en dos casos se observaron alteraciones genéticas específicas en regiones morfológicamente diferentes (28).

Otro estudio similar aportó evidencia adicional de la heterogeneidad genética en cáncer de mama mostrando que regiones morfológicamente distintas de un tumor pueden asociarse con alteraciones moleculares diferenciadas (**Figura 1**). Así, analizando tumores triple negativo con áreas de diferenciación apocrina se observó que estas zonas

presentaban ganancia y pérdida de los brazos 9p y 9q respectivamente mientras que estas alteraciones no estaban presentes en el resto del tumor (29).

Un tercer estudio evaluó la heterogeneidad espacial en 20 casos de cáncer ductal infiltrante de mama primario mediante un método llamado Sector-Ploidy-Profiling (SPP) que realiza una macrodissección tumoral, clasificación de las poblaciones según el contenido en DNA e hibridación genómica comparativa (CGH). Este estudio clasificó los tumores primarios en dos grupos en función del nivel de heterogeneidad genética encontrada: tumores monogenómicos, siendo aquellos que muestran perfiles muy similares en diferentes áreas geográficas del tumor y tumores poligenómicos, aquellos con diferentes poblaciones subclonales en distintas áreas del tumor (30).



**Figura 1. Heterogeneidad tumoral en el diagnóstico.** Al igual que la heterogeneidad inter-tumoral, la heterogeneidad intra-tumoral de los fenotipos celulares puede dificultar el diagnóstico y la toma de decisiones. En primer lugar, la biopsia de una localización metastásica puede no reflejar la composición fenotípica del tumor. En segundo lugar, la toma de decisiones basadas en el fenotipo dominante de una muestra puede ser errónea si no se tienen en cuenta subpoblaciones menores con características clínicas y biológicas diferentes. Modificado de Marusyk A et al (31).

A diferencia del análisis con *microarrays* o CGH, las técnicas de NGS permiten evaluar la heterogeneidad espacial intratumoral sin necesidad de realizar microdissección del tumor y el análisis de poblaciones celulares geográficamente

diferentes facilitando una estimación de las frecuencias alélicas de eventos mutacionales detectados en el seno del tumor. Así, mediante secuenciación del genoma completo (WGS) de 21 muestras de tumores primarios de diferentes subtipos, Nik-Zainal et al mostraron la presencia de diferentes subclones en cada muestra tumoral caracterizados por diferentes mutaciones somáticas, reordenamiento de cromosomas y alteraciones en el número de copias (32,33).

### 1.1.2.2 Heterogeneidad temporal

Más allá de la heterogeneidad espacial en las muestras tumorales existe evidencia de la evolución de las células tumorales durante la historia natural de la enfermedad apoyando la hipótesis que el cáncer se comporta como un ecosistema en evolución bajo la presión selectiva del sistema inmune del huésped y de los tratamientos administrados. Balko et al analizando el genoma de 74 pacientes con cáncer de mama triple negativo y enfermedad residual tras neoadyuvancia observaron diferente perfil genómico entre el tumor primario y las muestras pareadas de tumor residual tras tratamiento con un incremento de la amplificación MCL1, deleciones y o mutaciones de PTEN, amplificaciones de JAK2 y amplificación de CDK6/CCND1-3 tras exposición a quimioterapia neoadyuvante (34).

El cambio en las alteraciones genéticas que ocurre a lo largo de la evolución de la enfermedad es denominada heterogeneidad temporal y se ha observado en tres diferentes escenarios: la transición desde carcinoma *in situ* a carcinoma invasivo, la evolución del tumor primario a lo largo del tiempo y la progresión desde tumor primario a enfermedad metastásica.

El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) se considera un precursor del carcinoma ductal infiltrante (CDI) evidenciado mediante estudios patológicos, epidemiológicos y moleculares. Estudios recientes han mostrado una elevada concordancia en términos de status mutacional de PIK3CA en muestras pareadas de CDIS e CDI (35). Para intentar corroborar las alteraciones genómicas en la transición de tumor *in situ* a infiltrante, se analizaron 13 muestras de CDIS e CDI sincrónicos. Mediante técnica de FISH se analizaron 5 oncogenes y 3 genes supresores observándose que el CDIS tenía menor inestabilidad cromosómica que el CDI (36).

No obstante, la forma más estudiada de heterogeneidad temporal intratumoral en cáncer de mama se refiere a las diferencias entre el tumor primario y sus metástasis. En uno de los primeros estudios que evaluó este aspecto, se utilizaron CGH y FISH para analizar 29 tumores primarios y sus metástasis asincrónicas pareadas. En el 31% de los casos la composición genética de los tumores pareados diferían casi completamente, apoyando la idea que las propiedades biológicas del tumor primario reflejan pobremente las de sus metástasis (37). Estudios posteriores realizados con NGS han confirmado la heterogeneidad subyacente a la progresión tumoral. Analizando mediante WGS un carcinoma lobulillar primario y sus correspondientes metástasis (desarrolladas 9 años después del diagnóstico del primario) se observó que de las 32 mutaciones somáticas detectadas en las metástasis sólo 5 estaban presentes en el DNA del tumor primario, mientras que otras 6 estaban presentes con menor frecuencia, dos fueron indeterminadas y 19 no fueron detectadas (38). En otro caso de carcinoma inflamatorio *basal-like* y sus metástasis cerebrales aparecidas 8 meses después de completar la quimioterapia neoadyuvante, se observaron dos mutaciones de novo así como una delección no presente en el tumor primario estando 20 mutaciones compartidas sustancialmente enriquecidas en las metástasis (39). Estos estudios sugieren que la heterogeneidad intratumoral temporal podría ser proporcional al intervalo de tiempo entre el diagnóstico de tumor primario y la aparición de la recaída metastásica. Así en un estudio con autopsias de 10 pacientes con cáncer de mama metastásico en el que se realizó secuenciación completa del exoma (WES) y análisis del número de copias para reconstruir la trayectoria de la progresión del cáncer de mama se observó que el grado de heterogeneidad genética entre el tumor primario y las metástasis evaluados tanto a nivel de mutaciones como de número de copias fue proporcional al tiempo pasado entre los dos eventos (40).

### 1.1.2.3 Heterogeneidad a nivel celular

La información sobre la heterogeneidad espacial y temporal proviene de estudios que analizan la masa tumoral a nivel global, sin considerar la diversidad de las alteraciones moleculares entre las distintas células del mismo tumor. La modalidad de NGS conocida como secuenciación de núcleos individuales (*single-nucleus sequencing*, SNS) ha sido utilizada para conocer el perfil genómico de una célula individual revelando un modelo de evolución cromosómica en el cual se producen cientos de

reordenamientos en ráfagas seguidas de expansiones clonales estables que conducen a la formación de la masa tumoral (41). Estos datos han supuesto un desafío al modelo de evolución gradual que sostiene que los cambios en el número de copias se acumulan gradualmente y secuencialmente a lo largo del tiempo. Con este método de SNS se consigue cubrir el 10% del genoma de la célula individual siendo suficiente para medir alteraciones en el número de copias pero inadecuado para detectar mutaciones a nivel de resolución de pares de bases. Para mejorar la cobertura se ha desarrollado el método conocido como nuc-seq que utiliza la enzima Phi29 para realizar amplificación por desplazamiento múltiple. Esta técnica permite cubrir > 90% del genoma de una célula aislada, permitiendo detectar mutaciones a nivel de pares de bases. Así, secuenciando genomas de células tumorales aisladas, Navin et al mostraron que las células de cáncer de mama triple negativo tenían 13 veces más mutaciones que las células normales, a diferencia de las células de tumores con expresión de receptores hormonales (42). Además se observó que no existían dos células tumorales genéticamente idéntica (**Figura 2**) (43)



**Figura 2. Heterogeneidad a nivel celular.**

El análisis del genoma completo de 4 células de un cáncer de mama RE positivo mostró que no existen dos células genéticamente idénticas. Las mutaciones clonales se observan en negro, subclonales en regiones intergénicas en rojo y subclonales en regiones exónicas en verde. Adaptado de Navin et al (43)

## 1.2 Modelos de progresión metastásica

En el modelo de **progresión lineal** las células del tumor primario experimentan sucesivas rondas de mutaciones hasta adquirir capacidad de proliferar autónomamente, abandonar su localización primaria y realizar una siembra metastásica (44).

Esta expansión clonal está relacionada con el tamaño tumoral. De este modo, las mutaciones en el gen supresor p53 son raras en tumores de mama de menos de 2 cm y aumentan de manera significativa en tumores de más de 5 cm (45). Estos hallazgos, así como la asociación entre el tamaño tumoral y la mayor frecuencia de metástasis (que ha fundamentado la clasificación TNM) han servido para proponer el concepto de que sólo tras adquirir cierto tamaño el tumor primario tiene capacidad de generar metástasis macroscópicas. De este modo, la extirpación quirúrgica de un tumor antes de alcanzar los 2 cm ocasionaría una parada de la progresión clonal y evitaría la diseminación de células con potencial metastásico. Un concepto relacionado con este modelo es el de la cascada metastásica. En este modelo se sugiere que una vez que las células tumorales diseminadas se han adaptado a la localización a distancia y han formado metástasis macroscópicas pueden entonces formar metástasis secundarias y así sucesivamente hasta ocasionar una siembra metastásica (**Figura 3**) (46).

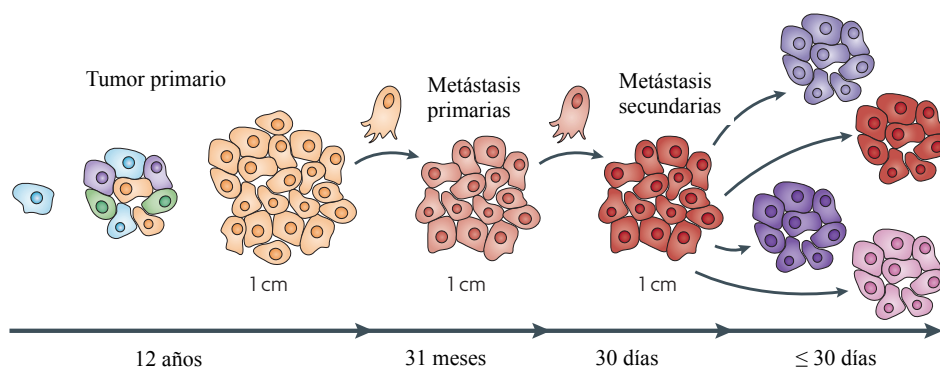
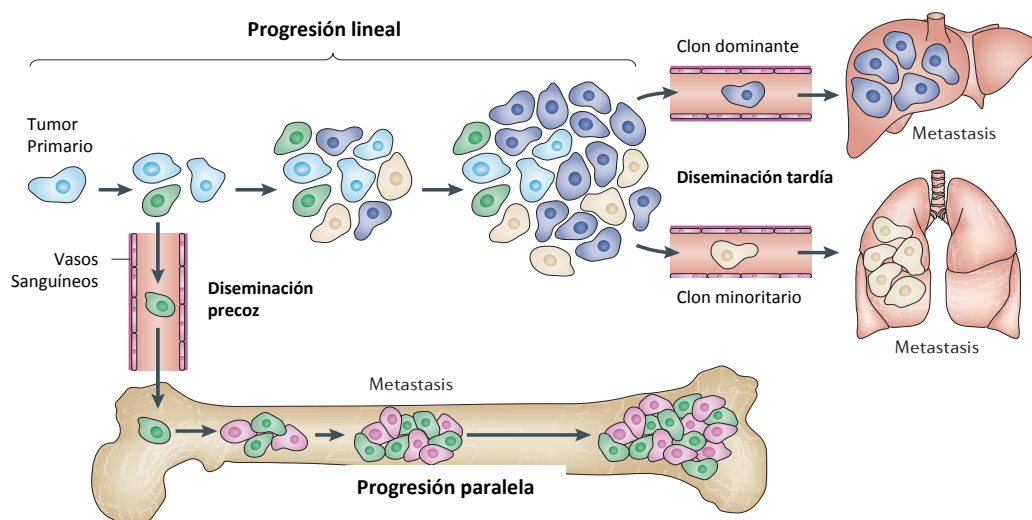


Figura 3. Diseminación y modelo metastásico en cascada. Modificado de Klein CA (47).

Sin embargo, la presencia de metástasis al diagnóstico en pacientes con cáncer de mama precoz (estadios T1-T2) así como la existencia de carcinomas metastásicos de origen desconocido hacen poner en duda la aplicabilidad de este modelo.

El modelo de progresión paralela no cuestiona los mecanismos de crecimiento tumoral como la selección clonal o la acumulación de alteraciones genómicas. Sin embargo, no sitúa la diseminación metastásica próxima al final del desarrollo del tumor primario. A priori, el modelo de progresión paralela predice mayor disparidad entre el tumor primario y la célula metastásica original que el modelo lineal y subraya la importancia de las alteraciones genéticas y epigenéticas en la selección de las localizaciones metastásicas (**Figura 4**).

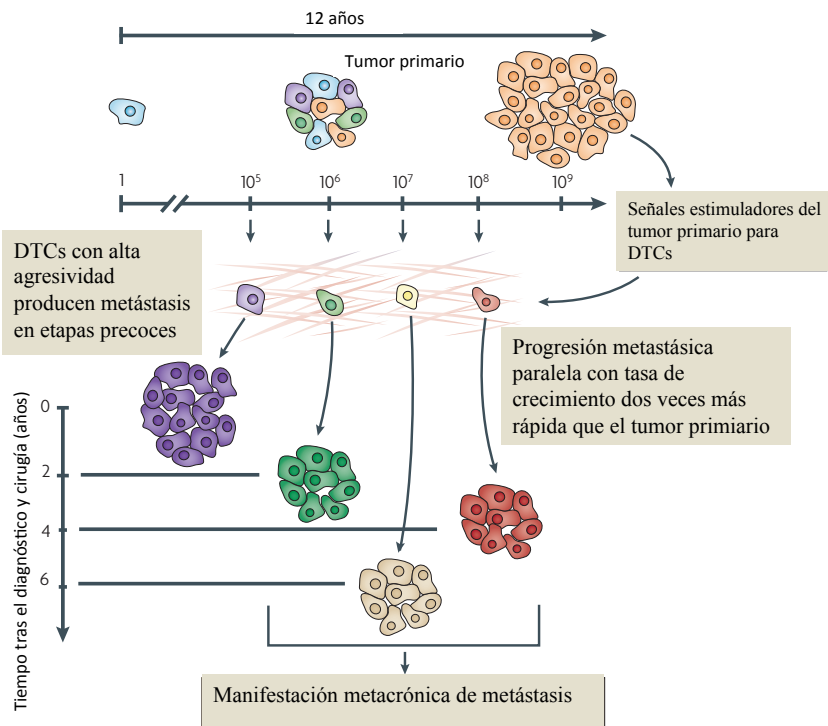


**Figura 4. Modelos de progresión lineal y paralela**

En el modelo de diseminación lineal la siembra metastásica se produce en etapas tardías de la progresión tumoral mientras que en el modelo de progresión paralela la diseminación metastásica ocurre en etapas precoces de la progresión tumoral conduciendo a diferencias sustanciales entre las lesiones metastásicas. En el caso del modelo de progresión paralela estas diferencias hacen que el tumor primario no sea fiable para el diagnóstico y el diseño de terapias dirigidas efectivas. Incluso en el modelo de progresión lineal, la diversidad clonal intratumoral puede ocasionar metástasis procedentes de un clon minoritario que haga que no sea fiable la toma de decisiones en base al tumor primario. Modificado de Marusyk A et al (31)

De este modo, el modelo de progresión paralela se basa en tres premisas: en primer lugar la acumulación paralela e independiente de alteraciones genéticas y epigenéticas en el tumor primario comparado con las metástasis. En segundo lugar, la siembra de células tumorales a diferentes localizaciones metastásicas mediante una adaptación al nicho independiente y paralela durante el proceso de desarrollo de metástasis. La tercera

es la ontogénesis de las células metastásicas desde el tumor primario en diferentes momentos (**Figura 5**).



**Figura 5. Modelo de progresión paralela.**

Células tumorales diseminadas (DTCs) pueden diseminarse antes del diagnóstico y progresar en paralelo en distintos órganos con diferentes ritmos de crecimiento. Los factores secretados por el tumor primario pueden estimular la colonización e influir en el tamaño tumoral y en la capacidad de diseminación de las metástasis. Modificado de Klein CA (47).

### 1.3 Genes implicados en cáncer de mama

Durante las últimas décadas diferentes tecnologías han permitido caracterizar las mutaciones en el genoma de las células tumorales. El análisis de los cariotipos reveló reordenamiento de cromosomas y alteraciones en el número de copias. Después, el análisis de la pérdida de heterocigosidad, la hibridación de DNA tumoral a *mirroarrays* ofreció mayor resolución en el análisis del número de copias. Más recientemente, la secuenciación de DNA ha permitido la caracterización sistemática de todo el repertorio completo de mutaciones incluyendo sustituciones de bases, pequeñas inserciones/deleciones, reordenamientos y cambio en el número de copias conduciendo a una mejoría sustancial en el conocimiento de los genes implicados y del proceso mutacional del cáncer.

Los genes que acumulan mutaciones somáticas en un porcentaje mayor del justificable por el azar se denominan genes significativamente mutados (SMGs) y son considerados los probables “*drivers*” o responsables de la progresión maligna. En el Atlas del Genoma del Cáncer de mama (TCGA) se observaron al menos 20 SMGs en el tipo luminal A, 8 en el luminal B pero solamente 3 en el subtipo *basal-like* (**Tabla 1**) (48). La razón no es que el genoma del cáncer de mama luminal A sea más complejo (de hecho, es al contrario) sino que el genoma del cáncer de mama *basal-like* es tan complejo que es difícil de identificar los eventos causales usando estadísticas de mutaciones recurrentes. Eventos como reordenamiento cromosómico (grandes deleciones, amplificaciones, inversiones, translocaciones) posiblemente desempeñen un papel relevante en el cáncer de mama siendo preciso una secuenciación completa del genoma para capturar la complejidad del cáncer de mama *basal-like* (49).

Gen	Luminal A (n=225)	Luminal B (n=126)	Basal-like (n=93)
TP53	28	39	74
PIK3CA	105	40	8
GATA3	32	19	NA
MAP3KI	30	6	NA
MLL3	19	NA	NA
CDH1	23	6	NA
MAP2K4	16	NA	NA
RUNX1	13	NA	NA
PTEN	9	6	NA
TBX3	6	6	NA
AKT1	8	NA	NA
CBFB	5	NA	NA
TBL1XR1	5	NA	NA
NCOR	12	NA	NA
CTCF	9	NA	NA
ZPF36L1	NA	4	NA
GPS2	4	NA	NA
SF3B1	7	NA	NA
CDKN1B	3	NA	NA
RB1	NA	NA	4
GPR32	3	NA	NA
CCND3	2	NA	NA

**Tabla 1. Genes significativamente mutados en cáncer de mama del TCGA**

Utilizando técnicas de secuenciación masiva paralela Shah et al analizaron el perfil mutacional de 104 cánceres de mama triple negativo. Las alteraciones en PTEN, PIK3CA y TP53 fueron las más frecuentemente encontradas (50). Ellis et al utilizando una cohorte de pacientes con tumores RE + sometidas a tratamiento neoadyuvante con inhibidores de aromatasa observaron mutaciones en genes no implicados previamente en cáncer de mama como TBX3 , RUNX1 , LDLRAP1 , MYH9 , AGTR2 , STMN2 , SF3B1 y CFBF (51). En otra serie de 103 tumores primarios los 6 genes más frecuentemente mutados fueron CFBF , TP53 , PIK3CA , AKT1 , GATA3 y MAP3K1 (52). Stephens et al secuenciaron el exoma de 100 tumores primarios observando mutaciones inactivadoras y deleciones en los genes MAP3K1 y MAP2K4. Además observaron patrones mutacionales en ARID1B, CASP8, MAP2K13, NCOR1, SMARCD1 y CDKN1B que sugieren comportarse como genes supresores (53). Curtis et al observaron variantes heredadas (variantes en número de copias, polimorfismos de nucleótido simple) y aberraciones en el número de copias somáticas adquiridas asociadas con la expresión en ~40% de los genes (54).

En base a estos estudios Balko et al han propuesto un listado con los 25 genes más frecuentemente mutados en cáncer de mama (**Tabla 2**).

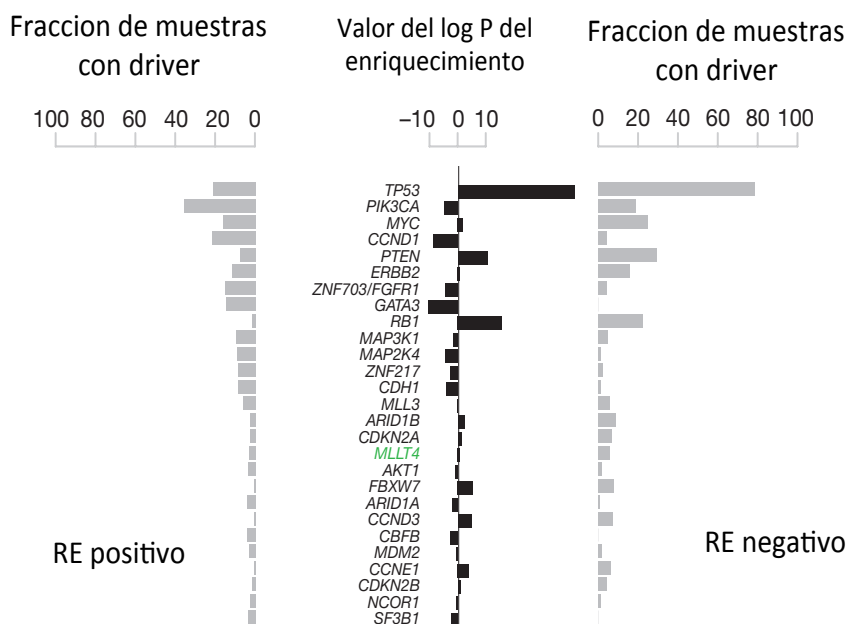
Al igual que con el resto de los tumores, la mayoría de la información disponible de las secuencias del genoma del cáncer de mama proviene de exones codificantes de proteínas, por lo que es desconocida la relevancia de regiones no transcritas, intrones y regiones intergénicas en la patogénesis del cáncer de mama. El abordaje de esta cuestión ha estado limitado debido a que las secuencias de exomas no informan sobre reordenamientos genómicos y capturan relativamente pocas mutaciones limitando el poder estadístico para establecer firmas mutacionales en el genoma por estos procesos.

	Ellis et al	Shah et al	Curtis et al	Banerji et al	Stephens et al	TCGA
ERBB2	M A	M	A	M A	A	A
PIK3CA	M	M		M	M	M A
TP53	M	M		M	M	M
AKT1	M			M	M	M
GATA3	M			M	M	M
PTEN		M D	D		M	M
RB1	M	M D	D		M	M
MAP3K1	M D			M	M	M
CDKN1B	M		D		M	M
CDH1	M				M	M
MLL3	M				M	M
MAP2K4	M D		D		M	M D
SF3B1	M				M	M
CBFB	M			M		M
RUNX1	M			D		M
TBX3	M				M	M
BRCA1		M			M	M
BRCA2		M	D			M
MYC			A		A	A
CCND1			A		A	A
EGFR		M A	A			M A
NF1					M	M
NCOR1			D		M	
CDKN2B			D			M D
AKT2	M				M	

**Tabla 2. Genes frecuentemente alterados identificados en cáncer de mama**

Las deleciones (D) están representadas en azul, mutaciones (M) en verde y amplificaciones (A) en rojo. Ellis et al(51) . Shah et al (50), Curtis et al (54), Banerji et al (52), Stephens et al (53), TCGA (48).

Recientemente se han publicado las secuencias genómicas completas (WGS) de 560 casos de cáncer de mama y de tejido no tumoral procedente de cada individuo (556 mujeres y 4 hombres). Se detectaron 3.479.652 sustituciones de pares de bases, 371.993 pequeñas inserciones y deleciones (*indels*) y 77.695 reordenamientos con significativa variación en el número entre cada individuo. Incorporando los cambios en el número de copias, deleciones homocigotas y amplificaciones se observaron un total de 1628 mutaciones “*driver*” probables en 93 genes. Se identificó al menos una mutación “*driver*” en el 95% de los cánceres. Los 10 genes más frecuentemente mutados fueron TP53, PIK-CA, MYC, CCND1, PTEN, ERBB2, ZNF703/FGFR1, GATA3, RB1 y MAP3K1 representando el 62% de los “*drivers*” (**Figura 6**) (55).



**Figura 6. Lista de genes en orden de frecuencia en cáncer de mama.**

Modificado de Nik-Zainal S et al (55).

#### 1.4 DNA libre circulante (cfDNA) y cáncer de mama

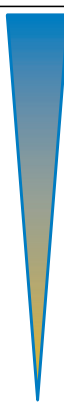
Desde su primera descripción por Mandel y Metais en 1948 (56), la utilidad clínica del DNA libre circulante (cfDNA) en suero y plasma ha sido un área de investigación en múltiples disciplinas médicas. La evaluación del DNA fetal en la circulación sanguínea de la madre ha permitido identificar mutaciones puntuales, aneuploidía y es hoy en día una técnica standard en el asesoramiento genético en mujeres gestantes de alto riesgo (57).

En Oncología la detección de cfDNA tumoral, también conocido como ctDNA ha supuesto un desafío por tres motivos principales: discriminación de ctDNA del cfDNA normal; la presencia de niveles en ocasiones muy bajos de ctDNA y la dificultad para cuantificar de modo fiable el número de fragmentos mutados en una muestra.

La diferenciación de ctDNA de cfDNA es posible debido a la presencia de mutaciones en el DNA tumoral. Estas mutaciones somáticas están presentes exclusivamente en el genoma de las células malignas o premalignas del mismo individuo por lo que confiere

al análisis del ctDNA una extraordinaria especificidad como biomarcador. Sin embargo, su identificación es compleja debido a que el ctDNA representa a menudo una pequeña porción (<1%) del cfDNA (58). De este modo, técnicas de secuenciación standard como Sanger y pirosecuenciación pueden sólo detectar mutaciones en pacientes con alta carga tumoral y elevados niveles de ctDNA (59). De hecho, previo a la introducción de técnicas digitales como PCR digital (60), BEAMing (61) o polimerización activada por pirofosforólisis (PAP) (**Figura 7**) (62), la detección de cfDNA procedente de tumores era detectada de modo inconsistentes llevando a considerar el análisis de ctDNA inferior a otros biomarcadores como las células tumorales circulantes (CTCs) (62).

Técnica	Sensibilidad	Aplicación Óptima
Secuenciación Sanger	>10%	Tejido tumoral
Pirosecuenciación	10%	Tejido tumoral
Secuenciación de nueva generación (NGS)	2%	Tejido tumoral
PCR Cuantitativa	1%	Tejido tumoral
ARMS	0.1%	Tejido tumoral
BEAMing, PAP, PCR Digital, TAM-Seq	0.01% o menor	ctDNA, variantes raras en Tejido tumoral

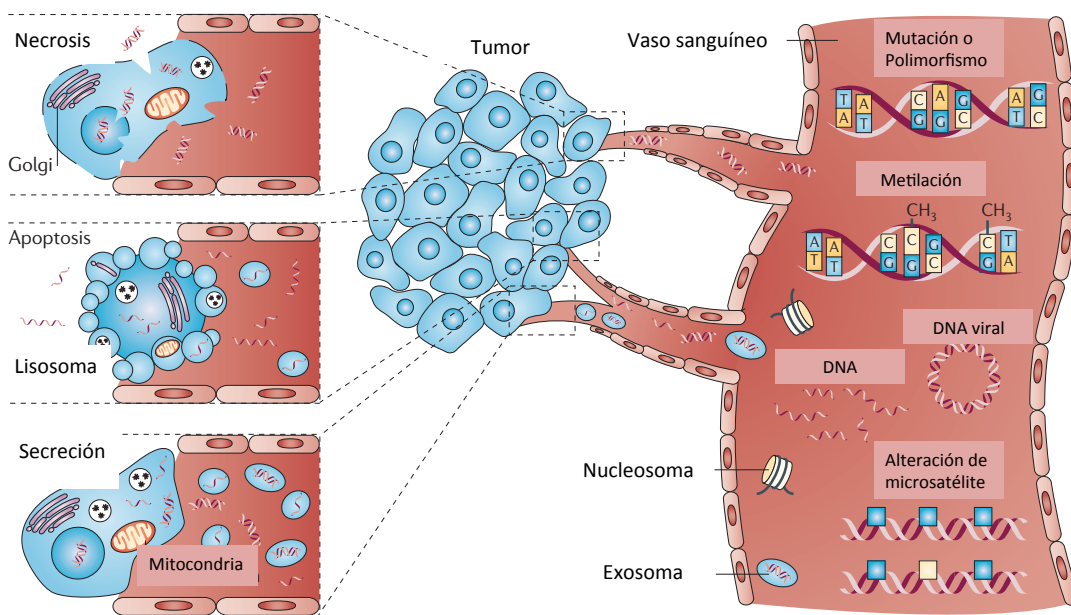


**Figura 7. Métodos para la detección de ctDNA, sensibilidad de la técnica y medio óptimo de aplicación**

#### 1.4.1 Mecanismos de liberación de DNA

En general, los pacientes con cáncer tienen niveles más altos de cfDNA que los pacientes sanos (63–66). Al aumentar el volumen tumoral, se eleva también de manera paralela el recambio celular y en consecuencia el número de células apoptóticas y necróticas (**Figura 8**) (67). En condiciones fisiológicas, los productos de la apoptosis y necrosis son eliminados por los fagocitos. Sin embargo, este mecanismo de eliminación es ineficaz en la masa tumoral conduciendo a la acumulación de detritus celulares y a su consiguiente liberación en la circulación.

El proceso de apoptosis conduce a la liberación de fragmentos de DNA de 180 pares de bases (pb) mientras que las células necróticas liberan fragmentos de DNA de mayor peso molecular por encima de 10000 pb (68). La mayoría de los fragmentos de cfDNA miden entre 180 y 200 bp, lo que sugiere que la apoptosis es la responsable de la mayor parte del cfDNA de la circulación (69). La liberación pasiva de cfDNA en la circulación sistémica procedente de las células apoptóticas o necróticas depende de la localización, tamaño, vascularización del tumor siendo por tanto responsable de la variabilidad en los niveles de cfDNA observada.



**Figura 8. Ácidos nucleicos libres en la sangre.**

La liberación de DNA se produce a través de diferentes eventos fisiológicos como apoptosis, necrosis y secreción.

#### 1.4.2. Aplicaciones clínicas y traslacionales de ctDNA en cáncer de mama

Las aplicaciones potenciales del análisis de ctDNA son:

- **Estratificación en base a alteraciones genómicas accionables**

- **Monitorización longitudinal de la carga tumoral e identificación de mecanismos de resistencia**
- **Evaluar la enfermedad mínima residual y la detección precoz de recaídas**
- **Descifrar heterogeneidad genética**

#### **1.4.2.1 Estratificación de pacientes en base a alteraciones genómicas accionables**

Los actuales modelos de “medicina de precisión” permiten adaptar el tratamiento médico a la complejidad genómica de cada tumor (70). El análisis de las alteraciones en las biopsias tisulares tiene como objetivo seleccionar el tratamiento dirigido más adecuado. En esta línea, el análisis del plasma está siendo utilizado de manera prospectiva como alternativa a la biopsia tisular en programas de screening molecular (71). Esto podría permitir que pacientes con cáncer de mama avanzado sin lesiones metastásicas accesibles para biopsia puedan ser incluidos en ensayos clínicos y tener acceso a un tratamiento personalizado.

Las alteraciones genómicas identificadas en ctDNA (mutaciones de PIK3CA, por ejemplo) han permitido estratificar a pacientes con tumores sólidos y monitorizar la respuesta a terapias dirigidas. Existen diversos programas que pretenden personalizar de manera prospectiva el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama según sus alteraciones genómicas (72–75). Así, en la era previa a la secuenciación masiva, el estudio SAFIR-01 identificó alteraciones genómicas (PIK3CA, CCND1, FGFR1...) en el 46% de las muestras de tejido analizadas permitiendo el tratamiento con terapias dirigidas de un 13% de las paciente (72). En esta línea el estudio SAFIR-02 se aprovecha de la secuenciación genómica masiva como herramienta para la toma de decisiones. Se trata de un estudio randomizado que incluye paciente con cáncer de mama HER2 negativo metastásico y/o recurrente en el que se realiza una biopsia de la localización metastásica y posterior secuenciación orientada a alteraciones genómicas tratables con terapia dirigida. Las pacientes son randomizadas a quimioterapia vs tratamiento dirigido a la alteración genómica detectada. No obstante, a pesar del racional del tratamiento dirigido hay que ser cautelosos al asumir que el tratamiento de una alteración genómica determinada va a conducir a un beneficio en un paciente en concreto. De hecho, estudios previos que evalúan la eficacia de tratamientos dirigidos en pacientes metastásicos en función de su perfil molecular no han mostrado beneficio clínico comparados con el tratamiento a elección del investigador (76,77).

#### **1.4.2.2 Monitorización de la carga tumoral e identificación de mecanismos de resistencia.**

En análisis de ctDNA en plasma tiene el potencial de identificar y caracterizar las mutaciones de cada paciente y monitorizarlas tras la administración de tratamiento. De este modo, permite mostrar respuestas al tratamiento así como identificar mutaciones de resistencia al mismo (78,79).

En cáncer de mama metastásico, la detección de ctDNA utilizando variaciones estructurales y mutaciones en TP53 y PIK3CA identificadas en el tumor primario ha demostrado ser más sensible y específica que otros biomarcadores en sangre periférica (enumeración de CTCs por método de CellSearch, niveles de CA15.3) así como pruebas de imagen radiológica (80). Además la fluctuación en el número de copias de ctDNA se asoció con la respuesta al tratamiento y existió una relación significativa entre el número de copias de ctDNA y el pronóstico de la paciente (80).

Un desafío común en pacientes con cáncer de mama metastásico es la aparición de resistencias al tratamiento. El análisis de ctDNA en diferentes momentos a lo largo del tratamiento permite la identificación de mutaciones asociadas con la adquisición de resistencia a fármacos en cáncer de mama avanzado (81). Un incremento en la cantidad de fracciones alélicas en plasma de ctDNA a lo largo del tiempo podría ser un indicador de presión selectiva debido al tratamiento y de aparición de resistencia al mismo. Por ejemplo, una paciente con cáncer de mama RE positivo y HER2 positivo tratada con tamoxifeno y trastuzumab mostró un incremento en los niveles de mutación del gen MED1, coactivador del RE e implicado en la aparición de resistencia a tamoxifeno (82,83). Tras tratamiento con lapatinib (inhibidor de tirosin kinasa de HER2) y capecitabina, se identificó la mutación de GAS6, ligada a la activación del receptor de tirosin kinasa AXL, implicado en la resistencia a lapatinib (84). Recientemente han despertado gran interés las mutaciones en el gen del receptor estrogénico (ESR1) que aparecen en un 20-40% de las pacientes tratadas con terapias endocrinas y constituyen uno de los mecanismos de resistencia a inhibidores de aromatasas (85,86). La identificación precoz de esta mutación previa a la progresión radiológica podría suponer un beneficio potencial para las pacientes al permitir una modificación temprana en el tratamiento (87,88).

#### **1.4.2.3 Evaluación de enfermedad mínima residual y detección precoz de recidiva.**

En pacientes con cáncer de mama precoz, el análisis de ctDNA permitiría detectar marcadores genómicos de enfermedad mínima residual tras cirugía curativa anticipándose al desarrollo de una recaída clínica o radiológica. Además permitiría categorizar a las pacientes en alto y bajo riesgo de recurrencia evitando de este modo la administración de tratamientos sistémicos tóxicos e innecesarios.

El porcentaje de detección de ctDNA en cáncer de mama precoz es variable probablemente debido al uso de diferentes técnicas de análisis (89–91). Recientemente, se ha detectado ctDNA en hasta un 50% de pacientes con cáncer de mama precoz (92). En concreto, el análisis de mutaciones de PIK3CA en plasma mediante PCR digital ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 90% y 100% en una serie de 29 pacientes con cáncer de mama precoz (89).

La identificación de alteraciones genómicas en el plasma de pacientes con tumores en estadios iniciales permiten anticipar el diagnóstico de recaídas metastásicas clínicas entre 8 y 11 meses (90,91). Dada la mayor sensibilidad de la identificación de alteraciones genómicas que los métodos de imagen, su determinación permitiría identificar pacientes con mayor riesgo de recaída y el desarrollo de estrategias de tratamiento previas al desarrollo de metástasis clínicas. Así la identificación de alteraciones genómicas asociadas con el desarrollo de resistencias primarias o secundarias al tratamiento tanto durante la fase adyuvante como durante el seguimiento permitiría modular el tratamiento complementario a largo plazo de las pacientes (93).

#### **1.4.2.4 Descifrar la heterogeneidad tumoral**

Las alteraciones genómicas encontradas en un cáncer de mama pueden variar según la región analizada, entre el tumor primario y sus metástasis y entre las distintas localizaciones metastásicas (93,94). Actualmente la toma de decisiones clínicas está basada en biopsias que pueden no ser representativas de la carga tumoral global y no evaluar en tiempo real el comportamiento del tumor. Los objetivos clínicos del análisis de la heterogeneidad tumoral consistirían en: caracterizar el tumor y servir de guía en la toma de decisiones de tratamiento y en la monitorización de la aparición de resistencia a

fármacos y en la selección de terapias dirigidas. Sin embargo, estos objetivos no pueden ser alcanzados mediante los actuales métodos de diagnóstico de biopsias de tejido.

Dada la imposibilidad de hacer un muestreo de múltiples metástasis, el análisis de ctDNA podría constituir una muestra representativa de todas las alteraciones genómicas y mostrar la jerarquía tumoral del cáncer de mama. Para demostrarlo, Murtaza et al realizaron un análisis de biopsias secuenciales sobre tejido y extracción de ctDNA en una paciente con un cáncer de mama metastásico RE+/HER2 + incluyendo múltiples localizaciones metastásicas procedentes de autopsia. Las mutaciones obtenidas en el tumor y en plasma identificadas mediante secuenciación masiva paralela fueron agrupadas usando un método bioinformático Bayesiano llamado Pyclone. Las mutaciones ubicuas (presentes en todas las muestras tumorales) tenían los niveles más altos de ctDNA seguidas de las mutaciones presentes exclusivamente en las metástasis y finalmente las mutaciones privativas (presentes sólo en una de las localizaciones metastásicas) (**Figura 9**). De este modo, permite identificar la variedad dinámica de la heterogeneidad clonal y subclonal (81).

El ctDNA puede analizarse de otros fluidos como el líquido cefalorraquídeo (LCR) permitiendo la caracterización tanto de tumores primarios cerebrales como de metástasis de un modo más preciso que sólo mediante ctDNA plasmático (95). Así, al analizar series de autopsias de pacientes con cáncer de mama, aquellas con enfermedad limitada al sistema nervioso (enfermedad extracraneal mínima o ausente), las mutaciones presentes en las metástasis cerebrales fueron detectadas en cfDNA procedente de LCR pero no en las procedentes de plasma. Por el contrario en las pacientes con enfermedad visceral extensa, las mutaciones en ctDNA obtenido del plasma y del LCR fueron comparables.



**JUSITIFICACIÓN**  
**HIPÓTESIS Y**  
**OBJETIVOS**

### 2. JUSTIFICACIÓN HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 2.1 Justificación

La identificación de alteraciones genómicas en el tejido tumoral permite el desarrollo de terapias dirigidas a las mismas que podrían mejorar los resultados del tratamiento. Como consecuencia de la evolución del tumor y la selección del tratamiento, el perfil mutacional del cáncer de mama avanzado puede evolucionar con el paso del tiempo por lo que las alteraciones genómicas encontradas en el tumor primario pueden ser distintas a las del tumor metastásico. Debido a la dificultad para obtener biopsias de las diferentes localizaciones metastásicas es necesario disponer de fuentes alternativas para la obtención de DNA tumoral más accesibles, menos invasivas y subsidiarias de repetición.

#### 2.2 Hipótesis

- Las alteraciones genómicas del tumor primario en pacientes de cáncer de mama son diferentes a las alteraciones genómicas del tumor metastásico.
- El perfil genómico de las metástasis se refleja en el ctDNA permitiendo su análisis mediante una técnica no invasiva.

#### 2.3 Objetivos

##### 2.3.1 Objetivo principal

- Comparar las alteraciones genómicas tumorales encontradas en el tumor primario con las alteraciones genómicas en el tejido tumoral metastásico de pacientes con cáncer de mama metastásico.

### 2.3.2 Objetivos Secundarios

- Identificar las alteraciones genómicas en muestras de ctDNA obtenidas en sangre periférica.
- Comparar las alteraciones genómicas de las metástasis y del tumor primario con las obtenidas ctDNA.
- Comparar las alteraciones genómicas de las metástasis y ctDNA con las del tumor primario.
- Analizar las variantes genéticas encontradas para identificar marcadores de respuesta al tratamiento así como mecanismos de resistencia al mismo.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Diseño del estudio

Para testar la hipótesis planteada y responder a los objetivos descritos se diseña un estudio clínico observacional, descriptivo, transversal, de serie de casos incidentes, con componente retrospectivo en pacientes de cáncer de mama metastásico (Estudio MIRROR, NCT02626039).

El estudio ha sido clasificado como Estudio Observacional No Postautorización (No-EPA) por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios el 22 de enero de 2014 y cuenta con el dictamen favorable de los Comités Éticos de Investigación Clínica del HGU Gregorio Marañón (Centro Coordinador), así como el correspondiente de los centros colaboradores (Hospital Clínico San Carlos y Hospital Infanta Elena de Parla) (**Anexos 1, 2 y 3**).

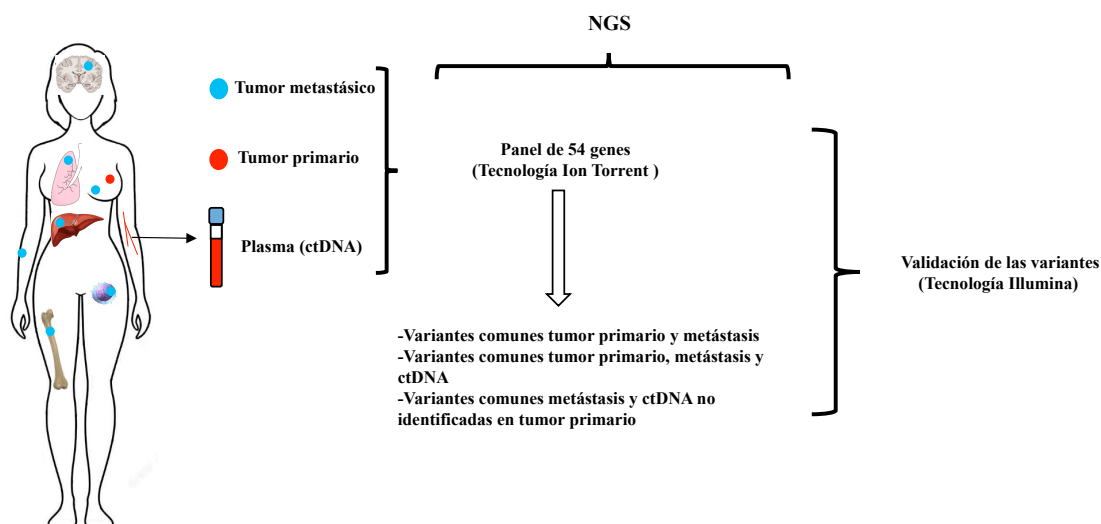
Para su realización se han analizado las muestras de tejido tumoral metastásico y sangre periférica obtenidas en el momento de inclusión en el estudio y sobre tejido del tumor primario obtenido de muestra archivadas. (**Tabla 3**).

Especimen	Muestra	Estudio
<b>Tumor primario</b>	Tejido	RE, RP, HER2
	DNA	NGS
<b>Tumor metastásico</b>	Tejido	RE, RP, HER2
	DNA	NGS
<b>Plasma</b>	DNA	NGS

**Tabla 3. Determinaciones analíticas en estudio MIRROR**

Las variantes de DNA presentes en el tumor primario, metástasis y plasma fueron evaluadas en primer lugar utilizando la tecnología Ion Torrent (Ion Torrent, Life Technologies) a partir de un panel de 54 genes diseñado para secuenciar las regiones exónicas de los oncogenes y genes supresores más frecuentemente implicados en cáncer de mama (**Tabla 4**).

Posteriormente se realizó una validación de las variantes encontradas utilizando una tecnología de secuenciación masiva alternativa (Illumina) en la Unidad de Genómica del Hospital Universitario Gregorio Marañón (**Figura 10**).



**Figura 10. Diseño del estudio MIRROR**

### 3.2 Población del estudio y tamaño muestral

La población incluida en el estudio son pacientes con cáncer de mama metastásico que han progresado al tratamiento previo bien sea en fase adyuvante o metastásica. La muestra poblacional seleccionada corresponde a las pacientes atendidas en consultas de los Servicios de Oncología Médica de los Hospitales Gregorio Marañón , Hospital Clínico San Carlos de Madrid y Hospital Infanta Elena de Parla.

Todas las pacientes incluidas en el estudio firmaron un consentimiento informado por escrito (**Anexo 4**). Con el objetivo de garantizar la confidencialidad se procedió a la codificación de los datos de las pacientes mediante la asignación de un código único. El tratamiento de los datos de carácter personal se ajustó a lo dispuesto en la ley orgánica 15/1999 del 13 de Diciembre de Protección de datos de carácter personal y su reglamentación posterior.

El tratamiento administrado a las pacientes incluidas ha sido acorde a criterio médico y práctica habitual e independiente de la participación de la paciente en el estudio.

### **3.3 Criterios de inclusión y exclusión**

Se han incluido los casos incidentes consecutivos que reunían los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

#### **Criterios de inclusión:**

- Cáncer de mama metastásico.
- Progresión a tratamiento previo tanto en fase adyuvante como metastásica.
- Mayor de edad ( $\geq 18$  años).
- Firma de consentimiento informado.
- Disponibilidad de muestras de tumor primario archivado parafinado.
- Indicación clínica para realizar la biopsia de la metastasis.
- Lesiones metastásicas accesibles para biopsia.

#### **Criterios de exclusión**

- ECOG 3-4
- Alteraciones en la coagulación
- Metástasis óseas como única localización metastásica.

### **3.4 Obtención del material biológico**

#### **Procedimiento de extracción de muestras de sangre**

La extracción de sangre se ha realizado durante los 15 días previos o posteriores a la fecha de la biopsia de la metástasis con el objetivo de homogeneizar la muestra de pacientes.

La muestra de sangre se ha obtenido mediante venopunción realizada para determinaciones analíticas de rutina tras la firma del consentimiento informado.

La extracción y procesamiento de las muestras previo su análisis se ha realizado según el siguiente procedimiento:

1. Extracción entre 10 ml de sangre del paciente en tubos que contengan EDTA como anticoagulante.
2. Inmediatamente a la extracción de sangre del paciente, se invierten los tubos suavemente 10 veces.
3. Se recoge la información del paciente y se rotulan los tubos con su código identificativo apuntándose el día y hora en la que se ha realizado la extracción de sangre.
4. Para llevar a cabo la separación del plasma de la sangre, se han realizado dos centrifugaciones consecutivas a 1900g (3000 rpm) durante 10 min a 4°C de temperatura sin pausas entre ellas.
5. Se aspira el sobrenadante sin perturbar la capa leucocitaria, dejando alrededor de 5 mm de plasma por encima de esta capa, evitando de este modo la contaminación con células. A continuación se transfiere el sobrenadante a tubos de centrífuga de 15 ml de base cónica, etiquetados con los códigos de los pacientes.
6. Se centrifuga el plasma durante 10 minutos a 16000g (en rotor de ángulo fijo) y a 4°C de temperatura.
7. Se aspira el sobrenadante, dejando alrededor de 7 mm de plasma, para evitar perturbar el sedimento. Posteriormente se transfiere el plasma a viales de congelación de 2 ml, debidamente etiquetados. Por cada 10 ml de sangre se obtienen aproximadamente 2 viales de 2 ml de plasma.
8. Se congela el plasma a -80°C de hasta su análisis.

9. En el protocolo original no se especificó un intervalo de tiempo entre la extracción de sangre y el procesamiento de la misma. Tras la inclusión de las primeras 60 pacientes se realizó una modificación del protocolo previo a cualquier análisis de DNA en el que se requería un intervalo entre la extracción y el procesamiento menor de 4 horas con el objetivo de asegurar la calidad del DNA y la fiabilidad de los resultados obtenidos (96).

### **Procedimiento de obtención de muestras de tejido parafinado**

Las muestras de tejido parafinado han sido obtenidas del Servicio de Anatomía patológica de cada centro participante procedentes de las biopsias del tumor primario y de la localización metastásica realizadas para el diagnóstico de la paciente en la práctica clínica habitual. No ha sido preciso obtener material adicional. Los resultados de expresión de RE y RP así como de la sobreexpresión y/o amplificación de HER2 han sido obtenidos a partir de los informes de anatomía patológica de los centros participantes no siendo precisa su confirmación centralizada. Se ha considerado positiva la expresión  $\geq 1\%$  mediante IHC para el RE y RP. Igualmente, se ha considerado positivo el resultado para HER2 en caso de tinción intensa y uniforme en  $\geq 10\%$  de las células tumorales (3+) así como ratio HER2/CEP17  $\geq 2.0$  o número de copias de HER2  $\geq 6$  mediante hibridación con fluorescencia in situ (FISH) (97).

Con el tejido excedente del bloque de parafina utilizado para el diagnóstico según práctica asistencial, se han realizado diferentes secciones, una para su estudio por Hematoxilina y Eosina (H&E) para la identificación del área tumoral y el resto de secciones de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , en número variable de 2 a 10, han sido utilizadas para la secuenciación de DNA.

### **3.5 Almacenamiento de las muestras**

Todas las alícuotas generadas de Plasma han sido almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, en la Unidad de Investigación Clínica en el Servicio de Oncología Médica del HGUGM.

### 3.6 Metodología de secuenciación genómica

#### 3.6.1 Elección de genes y generación del panel HGM.

Se han seleccionado 54 genes atendiendo a criterios de frecuencia de mutación, relevancia clínica de la mutación y posibilidad de tratamiento con terapia dirigida (48,55,98) (Tabla 4)

<b>MIRROR - Panel de Genes seleccionados</b>				
AFF2	CDH5	FOXA1	MLL3	PTPRD
AKT1	CDKN2A	FOXP1	MED23	RB1
AKT2	CDKN1B	GATA3	NCOR1	RAD51
ARAF	CDKN2B	GINS2	NF1	RUNX1
BRAF	CTCF	HERC1	PEMT	SF3B1
BRCA1	CTNNA1	HRAS	PGCP	TBX3
BRCA2	EGFR	KRAS	PIK3CA	TBX4
CBFB	ERBB2	LRP1B	PIK3R1	TBX5
CCND1	ESR1	MAP2K4	PTEN	TP53
CCND3	FBXW7	MAP3K1	PTPN14	WT1
CDH1	FGFR1	MED23	PTPN22	

**Tabla 4. Panel de genes seleccionados**

#### 3.6.2 Procedimiento de adjudicación

Se convocó concurso público para la contratación del suministro de la tecnología necesaria para el proyecto de investigación denominado “Caracterización y comparación de mutaciones en tumores primarios, tejido metastásico, células tumorales y DNA circulante en pacientes de cáncer de mama metastásico”, con código GOMHGUGM092013, cuyo investigador principal es el Dr. Miguel Martín Jiménez, del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) (EXPTE. FIBHGM PA 02/2014), resultando adjudicataria del

contrato de servicio de realización de analíticas de secuenciación masiva para el proyecto de investigación MIRROR la entidad GENOMICA SAU.

Se formalizó contratación de Genómica SAU para la realización de la secuenciación masiva de un panel de genes solicitado por el Servicio de Oncología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón en los siguientes tipos de muestras

- 80 muestras de biopsia sólida: Genómica realizará la extracción de DNA genómico a partir de muestras parafinadas en formato IHC o PEN slides.
- 40 muestras de biopsia líquida (DNA tumoral circulante, ctDNA): de acuerdo a pliego técnico de contratación se especificaba extracción de DNA libre circulante a partir de 2 ml de plasma.

Debido a las variaciones entre los protocolos relativos a la extracción y procesamiento de las muestras entre el Laboratorio de Oncología (LAOT) del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y GENOMICA, se realiza una adecuación de las condiciones para poder proceder a optimizar los análisis de las muestras.

### **3.6.3 Secuenciación masiva de muestras de biopsia sólida.**

Análisis de secuenciación masiva realizado por Genómica SAU previa extracción del DNA genómico (gDNA) a partir de las muestras parafinadas (FFPE).

Secuenciación de 80 muestras de biopsia sólida pertenecientes al proyecto MIRROR con el Panel HGM, compuesto de 2 pools de 1238 y 1224 pares de primers.

Análisis de las variantes identificadas en *S5 Torrent Server VM* con el *software Ion reporter v5.2* y *workflow Annotate variants single sample v5.2*.

- **Desarrollo.**

Para cada muestra, se extrae el gDNA de las muestras parafinadas (en formato IHC) con el kit *QiAamp DNA FFPE tissue* y se clasifican en base a su calidad/cantidad para aplicar el programa de amplificación óptimo con el que se obtiene una secuenciación de calidad (según recomendaciones de *Life Technologies* para los parámetros *Reads on Target*, *Base coverage depth & Uniformity*).

-Calidad/cantidad DNAg de cada muestra: Genómica determina la calidad/cantidad de cada muestra en base a la concentración obtenida con Qubit. Se requieren 10 ng totales de DNAg para amplificar cada pool del Panel HGM a una concentración mínima de 1.7 ng/ $\mu$ l.

-Secuenciación y Control de calidad de la secuenciación: Se genera una librería para cada muestra a partir de la amplificación con cada uno de los pools de primers que componen el Panel HGM. Posteriormente, se cuantifica la concentración de cada pool y se genera una librería a partir de una mezcla equimolar de los dos pools. Finalmente, se generan esferas cargadas con los amplicones de cada librería y se secuencian usando un *Chip Ion 540™* por cada cinco muestras.

- **Protocolos de GENOMICA para la realización de cada uno de los pasos del ensayo**

El ensayo y las condiciones de análisis se han llevado a cabo con los protocolos incluidos en el sistema de calidad de GENOMICA bajo las normas ISO 9001 y 13485 que están acordes con las directrices recomendadas por *Life Technologies™*.

- **Resultados de control de calidad/cantidad**

Todas las muestras analizadas cumplieron con los criterios de control de calidad/cantidad de cada muestra necesarias para la secuenciación, según recomendaciones específicas de *Life Technologies™*.

- **Resultados de la secuenciación.**

Los datos de secuenciación reportados indican las variantes detectadas que afectan a exones, que se han secuenciado un mínimo de 20 veces con respecto a un número total de al menos 100 veces y con una  $p \leq 0.01$  (Protocolo establecido por GENOMICA para asegurar la fiabilidad del resultado). En el caso de estar localizada la variante dentro de un exón se muestran únicamente las que suponen cambio de aminoácido.

Se ha realizado un análisis bioinformático de las variables encontradas para obtener la relación de mutaciones obtenidas con un valor que permita ordenarlas de mayor a menor impacto basado en el efecto de la mutación, localización, función, y frecuencia alélica.

### 3.6.4 Secuenciación masiva de muestras de biopsia líquida

Los análisis de secuenciación masiva han sido realizados por Genómica SAU previa extracción del DNA tumoral circulante (ctDNA) a partir de muestras de sangre.

Secuenciación de 40 muestras de biopsia líquida pertenecientes al proyecto MIRROR con el Panel HGM, compuesto de 2 pools de 1238 y 1224 pares de primers.

Análisis de las variantes identificadas en *S5 Torrent Server VM* con el *software Ion reporter v5.2* y *workflow Annotate variants single sample v5.2*.

- **Desarrollo.**

Para cada muestra de plasma, se extrae el DNA circulante con el kit *QIAamp<sup>®</sup> Circulating Nucleic Acid (Qiagen)* y se clasifican en base a su calidad/cantidad para aplicar el programa de amplificación óptimo con el que se obtiene una secuenciación de calidad (según recomendaciones de *Life Technologies* para los parámetros *Reads on Target, Base coverage depth & Uniformity*).

-Calidad/cantidad DNAg de cada muestra: Genómica determina la calidad/cantidad de cada muestra en base a la concentración obtenida con Qubit. Se recomiendan 10 ng

totales de DNA para amplificar cada pool del Panel HGM a una concentración mínima de 1.7 ng/ $\mu$ l. En el caso de no alcanzar los 10ng, se añade el volumen máximo de DNA que admite la técnica (6 $\mu$ l) y se aumenta en tres ciclos la reacción de amplificación de las librerías.

-Secuenciación y Control de calidad de la secuenciación: Se ha generado una librería para cada muestra a partir de la amplificación con cada uno de los pools de primers que componen el Panel HGM. Posteriormente, se cuantifica la concentración de cada pool y se genera una librería a partir de una mezcla equimolar de los dos pools. Finalmente, se generan esferas cargadas con los amplicones de cada librería y se secuencian usando un Chip Ion 540™ por cada dos muestras.

- **Protocolos de GENOMICA para la realización de cada uno de los pasos del ensayo**

El ensayo y las condiciones de análisis se han llevado a cabo con los protocolos incluidos en el sistema de calidad de GENOMICA bajo las normas ISO 9001 y 13485 que están acordes con las directrices recomendadas por *Life Technologies™*.

- **Resultados de control de calidad/cantidad.**

Todas las muestras analizadas cumplieron con los criterios de control de calidad/cantidad necesarios para la secuenciación, según recomendaciones específicas de Life Technologies.

- **Resultados de la secuenciación.**

Los datos de secuenciación reportados indican las variantes detectadas que afectan a exones, que se han secuenciado un mínimo de 20 veces con respecto a un número total de al menos 100 veces y con una  $p \leq 0.01$  (Protocolo establecido por GENOMICA) para

asegurar la fiabilidad del resultado). En el caso de estar localizada la variante dentro de un exón se muestran únicamente las que suponen cambio de aminoácido.

Se ha realizado un análisis bioinformático de las variables encontradas para obtener la relación de mutaciones obtenidas con un valor que permita ordenarlas de mayor a menor impacto basado en el efecto de la mutación, localización, función, y frecuencia alélica.

### **3.6.5 Validación de resultados mediante tecnología Illumina**

Para la validación mediante tecnología Illumina de las variantes identificadas en el primer abordaje (Ion Torrent) se emplearon las mismas muestras de DNA que en el primer análisis. Con este objetivo se diseñó un panel de genes personalizado (*TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit*, Illumina) de 116 amplicones. No obstante debido a la baja cantidad de DNA disponible fue preciso realizar una modificación del protocolo recomendado por Illumina en 71 de 120 muestras de DNA.

#### **Preparación de las muestras**

-Determinación de la concentración de DNA de cada muestra mediante fluorimetría (Qubit).

-Preparación de las librerías a partir de DNA genómico (concentración mínima de DNA 10 ng) siguiendo las recomendaciones del fabricante (*TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit, procedure Dual Strand #1000000002191 v04* Illumina). En aquellas muestras en las que la cantidad de DNA de partida era inferior a lo especificado en el protocolo, se realizó una modificación del mismo para su procesamiento.

-Generación de una librería para cada muestra a partir de la amplificación de cada uno de los *pools* de *primers* (CAT A (127714) y CAT B (128574)) que componen el panel. Posteriormente, se secuenciaron las librerías en la plataforma *MiSeq (Illumina) paired-end 2x150* (Reactivo: V3-600 Ciclos).

### Análisis de las muestras secuenciadas

Tras el proceso de secuenciación se ha realizado un análisis secundario de las muestras con el *software MiSeq Reporter 2.6.2* que incluye los siguientes pasos: Demultiplexado, generación de archivos FASTQ, alineamiento y llamada de variantes.

-Demultiplexado: separación de los datos de las muestras agrupadas en función de las secuencias índice (*index*) que marcan las muestras de diferentes librerías.

-Generación de archivos FASTQ: Tras el demultiplexado, se generan archivos intermedios en formato FASTQ. Los archivos FASTQ contienen las lecturas de cada muestra y las puntuaciones de calidad.

-Alineamiento: El alineamiento compara las secuencias obtenidas con las secuencias de los amplicones especificadas en el archivo *manifest* (algoritmo de Smith-Waterman de bandas). El archivo *manifest* especifica el genoma de referencia (hg19) y las regiones de referencia objetivo que se deben utilizar en este paso. Las lecturas alineadas se escriben en archivos con formato BAM.

-Llamadas de variantes: La llamada de variantes se realiza con el *software Somatic Variant Caller*. Este *caller* registra polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), pequeñas inserciones y pequeñas deleciones. Para cada variante detectada proporciona la probabilidad de error como puntuación de calidad de una variante. *Somatic Variant Caller* genera archivos en formato VCF.

-Análisis de la cobertura de variantes. Los archivos bam, bai, fueron analizados mediante el *software IGV Win 2.4.3*.

### 3.7 Análisis estadístico

Se analizarán las variantes encontradas en el tumor metastásico, tumor primario y muestras procedentes de sangre periférica.

Para el análisis nos hemos centrado en las sustituciones de nucleótidos simples, pequeñas inserciones y deleciones (indels).

Se han seleccionado las variantes acorde a los siguientes criterios:

- Variantes con frecuencia alélica menor (MAF) < 0.01.
- Variantes que afectan a exones codificantes y a uniones de splicing.
- Variantes de impacto medio y alto (inserciones y deleciones que afectan al marco de lectura, mutaciones sin sentido, con cambio de sentido así como mutaciones canónicas en los sitios de unión). Se han descartado las variantes que producen cambios en aminoácidos sinónimos.
- Se han descartado variantes benignas y probablemente benignas de acuerdo a diferentes bases de datos (CLINVAR: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>; *Leiden open variation database*: <http://www.lovd.nl/3.0/home>; BRCA *exchange*: <http://brcaexchange.org/>; BRCA share: <http://www.umd.be>; *Locus specific databases*: [http://grenada.lumc.nl/LSDB\\_list/lombs](http://grenada.lumc.nl/LSDB_list/lombs); *varsome* (<https://varsome.com/>) BIC: <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>; *Pubmed*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).
- Las variantes ha sido clasificadas según las guías de consenso del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y la Asociación Americana de Patología Molecular (ACMG) (99).

A continuación se realizarán los siguientes análisis comparativos

- **Variantes comunes en el tumor primario y metástasis**
- **Variantes comunes en el tumor primario, metástasis y plasma**
- **Variantes comunes en el tumor primario y metástasis no presentes en plasma**
- **Variantes identificadas en metástasis y plasma no presentes en tumor primario**

Además se analizarán variables asociadas al tumor primario, tumor metastásico y tratamientos recibidos.

- **Variables asociadas el tumor primario**
  - Estadio tumoral al diagnóstico

- Grado histológico
- Expresión de RE
- Expresión de RP
- Sobreexpresión/amplificación de HER2
- Ki 67

### **Variables asociadas al tumor metastásico**

- Localización de la metástasis biopsiada
- Expresión de RE
- Expresión de RP
- Sobreexpresión/amplificación de HER2
- Ki 67

### **Variables asociadas a tratamientos recibidos**

- Tratamiento previo en adyuvancia/neoadyuvancia
  - ✓ Tratamiento hormonal
  - ✓ Tratamiento con quimioterapia
  - ✓ Terapia frente a HER2
- Tratamiento previo para metástasis
  - ✓ n° de líneas previas de tratamiento
  - ✓ Tratamiento hormonal
  - ✓ Tratamiento con quimioterapia
  - ✓ Terapia frente a HER2

Las características clínicas y demográficas de las pacientes serán definidas usando métodos de estadística descriptiva. Se realizarán análisis univariante para describir la distribución y dispersión de las variables. Se realizarán análisis bivariantes para encontrar relación entre las diferentes variables. Los análisis se realizarán utilizando el paquete estadístico STATA versión 12.1.

### **Tamaño muestral**

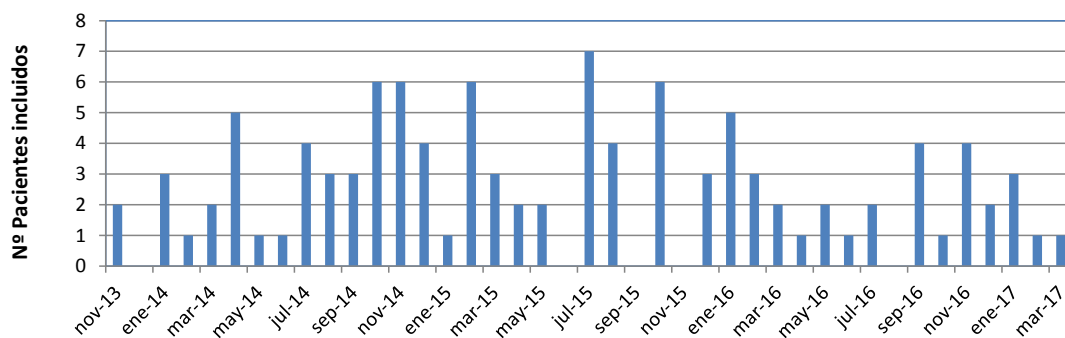
Dado que el estudio MRROR es un estudio piloto, el tamaño muestral se estableció de forma empírica. De este modo, asumiendo un ritmo de reclutamiento de 2 pacientes completamente evaluables al mes durante un periodo de 2 años, se estimó un tamaño muestral mínimo de 40 pacientes para proceder al análisis.

# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

Entre noviembre de 2013 y marzo de 2017 un total de 80 pacientes cumplieron los criterios de inclusión y exclusión y firmaron el consentimiento informado.

En el siguiente gráfico se muestra la curva de reclutamiento desde el inicio del mismo hasta la fecha de inclusión de la última paciente (**Grafico 1**).



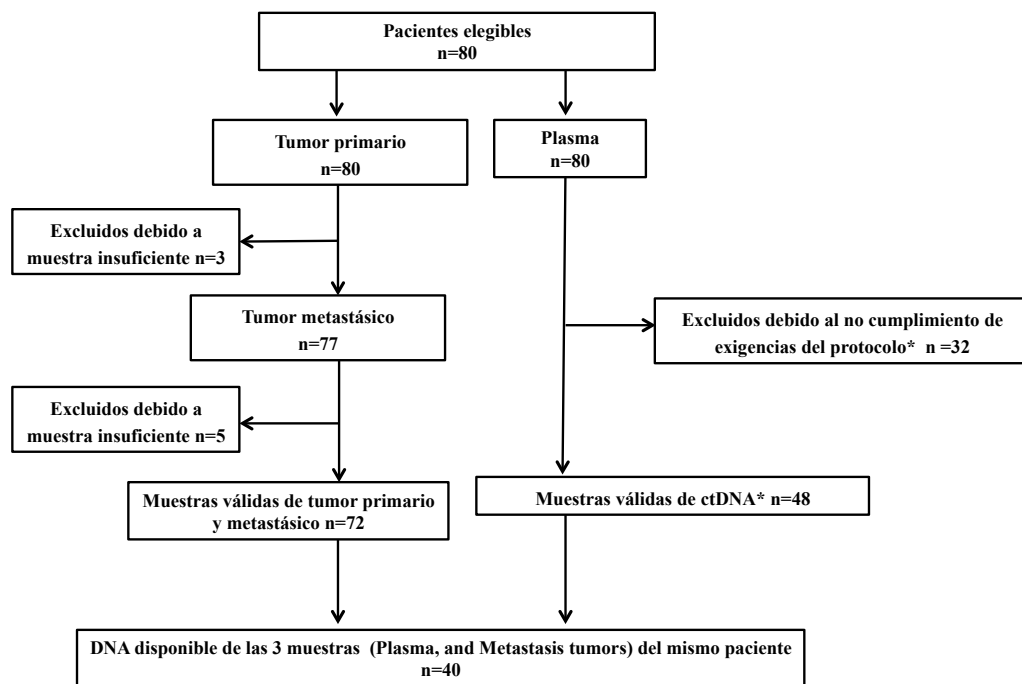
**Grafico 1. Curva de reclutamiento**

Se han analizado secuencialmente las muestras de tumor primario, metástasis y plasma. 3 de las muestras de tumor primario y 5 de la metástasis fueron excluidas del análisis por baja celularidad tumoral (<10% de células tumorales). De las 72 pacientes con muestra válida de tejido en ambas localizaciones, 32 fueron excluidas porque la muestra de plasma fue analizada con un intervalo mayor de 4 horas desde su extracción. Finalmente se dispone de 40 pacientes con muestras válidas procedentes de tumor primario, metástasis y plasma (**Figura 11**).

### 4.1 Estudio descriptivo de la muestra.

#### 4.1.1 Variables demográficas

De las 40 pacientes analizadas, 31 eran procedentes del Hospital Gregorio Marañón, 7 del Hospital Clínico San Carlos y 2 del Hospital Infanta Cristina de Parla.



**Figura 11. Diagrama de flujo de las pacientes del estudio. \*Ver texto.**

Respecto a la procedencia geográfica de las pacientes, 35 eran de origen caucásico (87.5%), 3 hispanas (7.5%) y 2 orientales (5%).

La edad media de las pacientes al diagnóstico de cáncer de mama fue de 48 (26-75) años. La edad media de las pacientes en el momento de la recidiva fue de 53 (28-80) años.

#### 4.1.3 Variables clínicas y patológicas

De las 40 muestras de tumor primario evaluado, 23 provenían de biopsias previas a la cirugía (57%) y 17 de muestras quirúrgicas (43%).

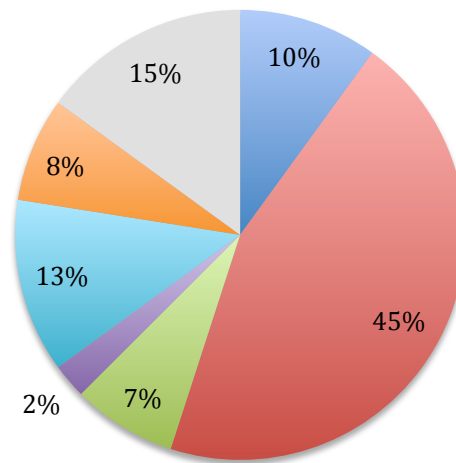
La mediana de tiempo desde la extracción hasta la congelación de la muestra de sangre fue de 0.58 horas (0-4).

La mediana número de días de diferencia entre la extracción de la muestra de sangre periférica y la realización de la biopsia de tejido de la localización metastásica fue de 3.5 días (-10 a +15).

En el diagnóstico inicial el tumor fue estadio I en 6 pacientes (15%), estadio II en 10 pacientes (25%), estadio III en 12 pacientes (30%) y estadio IV en 7 pacientes (18%). No se disponía de esta información en el momento del análisis en 5 pacientes (12%).

Las muestras metastásicas provienen de recaídas a nivel de cerebro (n=4), hígado (n=18), mama (n=3), hueso (n=1), Piel (n=5), pulmón (n=6) o ganglionar (n=3) (**Gráfico 2**).

■ Cerebro ■ Hígado ■ Mama ■ Hueso ■ Piel ■ Ganglios ■ Pulmón



**Gráfico 2. Localización de las metástasis biopsiadas**

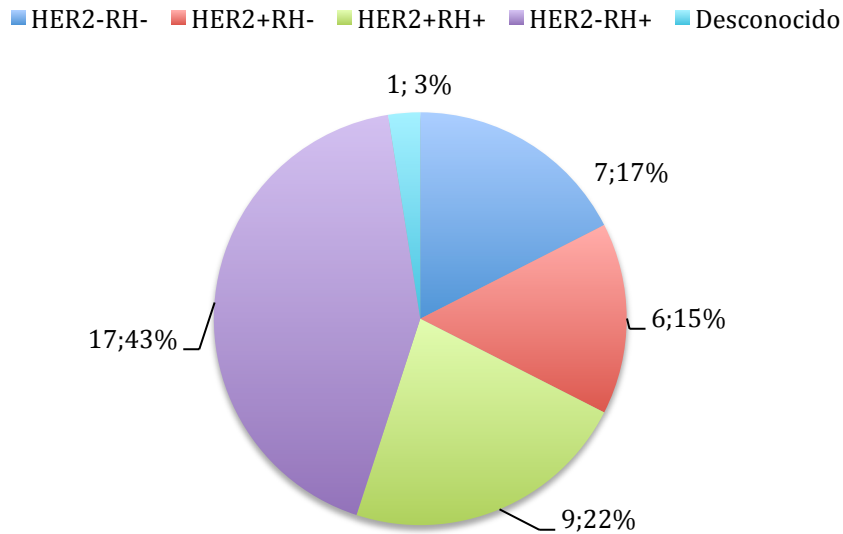
El tumor primario fue grado 3 en 16 (40%) de pacientes, grado 2 en 20 (50%) y grado 1 en 2 (5%). El receptor estrogénico (RE) fue positivo en 26 (65%) y negativo en 13 (33%) pacientes. El receptor de progesterona (RP) fue positivo en 15 (38%) y negativo en 24 (60%) casos. Se observó sobreexpresión/amplificación de HER2 en 15 (38%) de las pacientes.

En la biopsia de la metástasis el RE fue positivo en 25 (62%) y negativo en 15 (38%) pacientes. El RP fue positivo en 15 (38%) y negativo en 25 (62%) casos. Se observó sobreexpresión/amplificación de HER2 en 16 (40%) de las pacientes (**Tabla 5**).

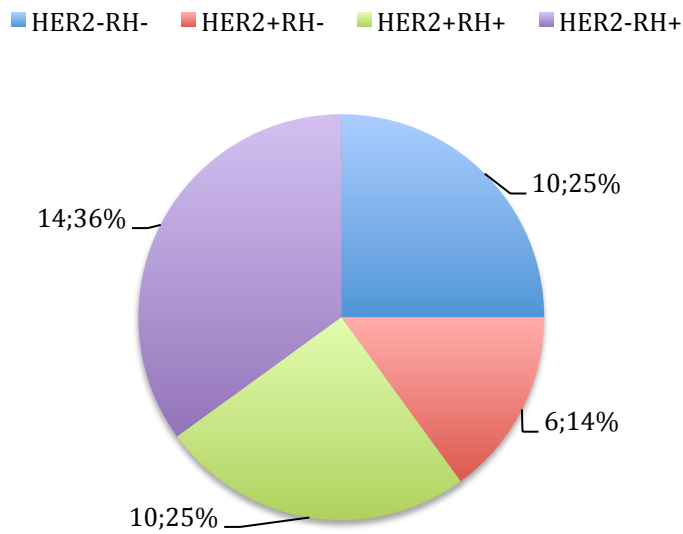
	Tumor Primario	Metástasis
<b>Grado</b>		
1	2 (5%)	ND
2	20 (50%)	ND
3	16 (40%)	ND
Desconocido	2 (5%)	ND
<b>RE</b>		
Positivo n (%)	26 (65%)	25 (62%)
Negativo n (%)	13 (33%)	15 (38%)
Desconocido	1 (2%)	
<b>RP</b>		
Positivo n (%)	24 (60%)	15 (38%)
Negativo n (%)	15 (38%)	25 (62%)
Desconocido n (%)	1 (2%)	
<b>HER2</b>		
Positivo n (%)	16 (38%)	16 (40%)
Negativo n (%)	24 (60%)	24 (60%)
Desconocido n (%)	1 (2%)	
<b>Técnica HER2</b>		
IHC n (%)	13 (32%)	8 (20%)
Hibridación n (%)	20 (50%)	30 (75%)
Desconocida n (%)	7 (18%)	2 (5%)
<b>Ki 67 % (rango)</b>	30% (5-90)	40% (5-80)

**Tabla 5. Características patológicas del tumor primario y las metástasis.** ND: No disponible

Al agrupar las pacientes por fenotipos tumorales (HER2-RH+/HER2-RH-/HER2+RH+/HER2+RH-) se objetivan similares porcentajes en el tumor primario y metastásico (**Gráficos 3 y 4**).



**Grafico 3. Inmunofenotipo del tumor primario.**



**Grafico 4. Inmunofenotipo de las metástasis**

A pesar de que a nivel porcentual global no hay cambios en la expresión de RE y HER2 analizando las variaciones dentro de un mismo individuo se observan diferencias en un porcentaje relevante . Así, existe discordancia en un 20% en la expresión del RE, del 27.5% en la expresión del RP y del 30% en HER2 (**Tabla 6**).

Status RH y HER 2	RE		RP		HER2	
	n°	%	n°	%	n°	%
Primario +/- recaída +	21	52.5	14	35	9	22.5
Primario +/- recaída-	5	12.5	10	25	6	15
Primario - /recaída +	3	7.5	1	2.5	6	15
Primario - /recaída -	10	25	14	35	18	45
Desconocido	1	2.5	1	2.5	1	2.5
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100</b>	<b>40</b>	<b>100</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

Tabla 6. Variación intraindividual de RE, RP y HER2 entre primario y metástasis

#### 4.1.4 Variables asociadas al tratamiento recibido

Respecto a la administración de tratamiento en etapas iniciales 8 pacientes recibieron tratamiento neoadyuvante, 17 adyuvante y 8 ambos. 7 pacientes fueron diagnosticadas en estadio IV por lo que no recibieron ningún tratamiento (neo)adyuvante previo a la inclusión en el estudio (**Gráfico 5**).

■ Neoadyuvancia ■ Adyuvancia ■ Ambos ■ Ninguno

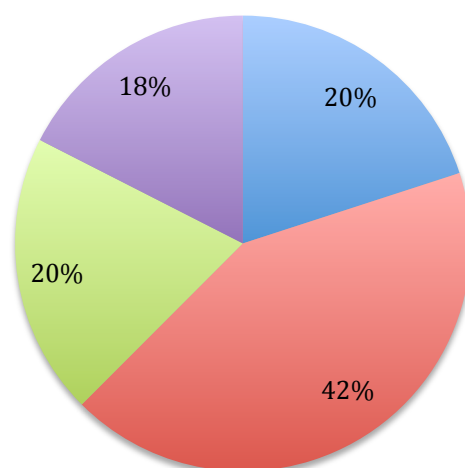
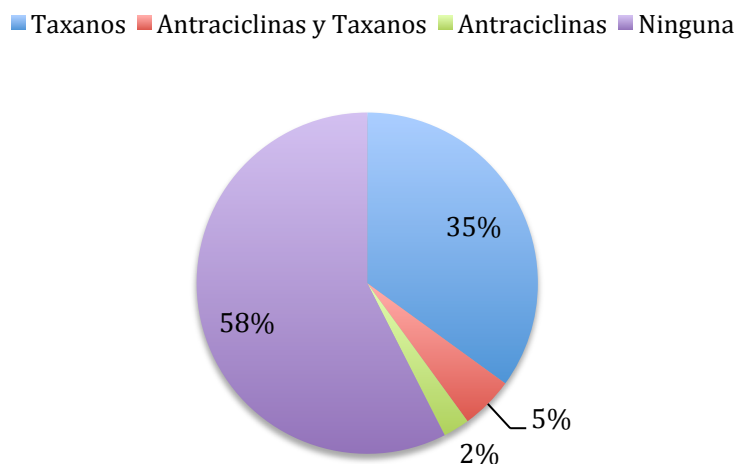


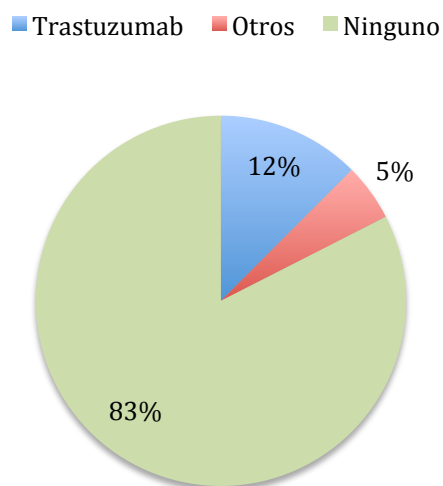
Gráfico 5. Tratamientos previos recibidos en estadios iniciales.

El régimen de quimioterapia neoadyuvante administrado mayoritariamente fue basado en taxanos (14; 35%) seguido de regímenes con antraciclinas y taxanos (2; 5%) y antraciclinas solas (1; 2%) (**Gráfico 6**).



**Gráfico 6. Quimioterapia neoadyuvante**

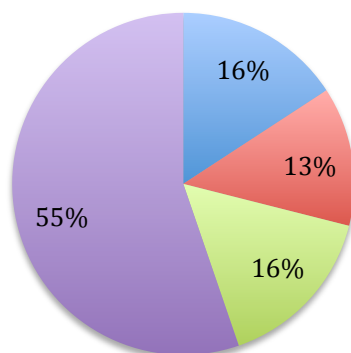
El 17% de las pacientes tratadas en neoadyuvancia recibieron terapia antiHER2, siendo trastuzumab el tratamiento más frecuentemente utilizado (12%) (**Gráfico 7**).



**Gráfico 7. Terapia anti-HER2 neoadyuvante**

Respecto al tratamiento adyuvante, 6 pacientes (16%) recibieron quimioterapia basada en taxanos, 5 pacientes quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos (13%), 6 pacientes regímenes con antraciclinas (16%) y 22 pacientes no recibieron quimioterapia adyuvante (55%) (**Gráfico 8**).

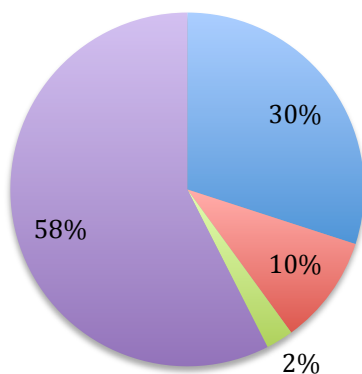
■ Taxanos ■ Antraciclinas y taxanos ■ Antraciclinas ■ Ninguna



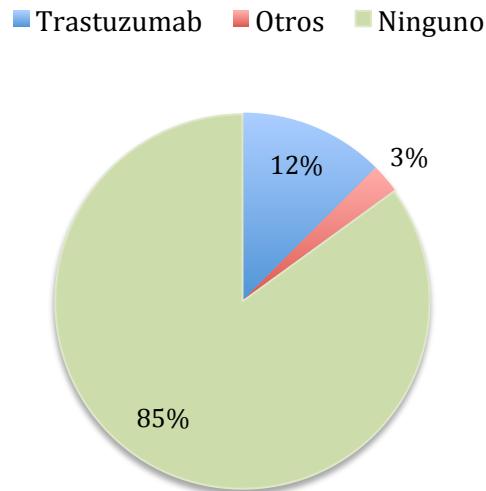
### Gráfico 8. Quimioterapia adyuvante

El tratamiento hormonal adyuvante recibido fue tamoxifeno en 12 pacientes (30%), inhibidores de aromatasas en 4 pacientes (10%), tratamiento con tamoxifeno e inhibidores de aromatasas en una paciente (2%) no recibiendo tratamiento hormonal adyuvante 23 pacientes (58%) (**Gráfico 9**). Se administró terapia dirigida en 6 pacientes de los cuales 5 (12%) recibieron tratamiento con trastuzumab (**Gráfico 10**).

■ Tamoxifeno ■ I. Aromatasa ■ Tamoxifeno + I. Aromatasa ■ Ninguno

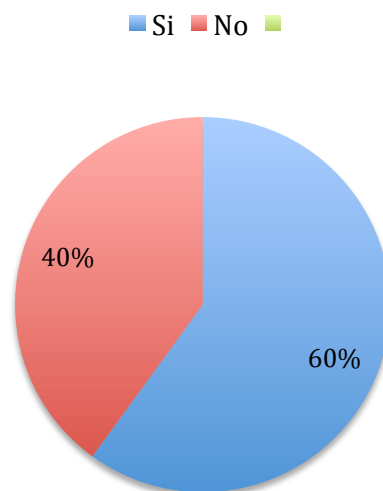


### Gráfico 9. Tratamiento hormonal adyuvante



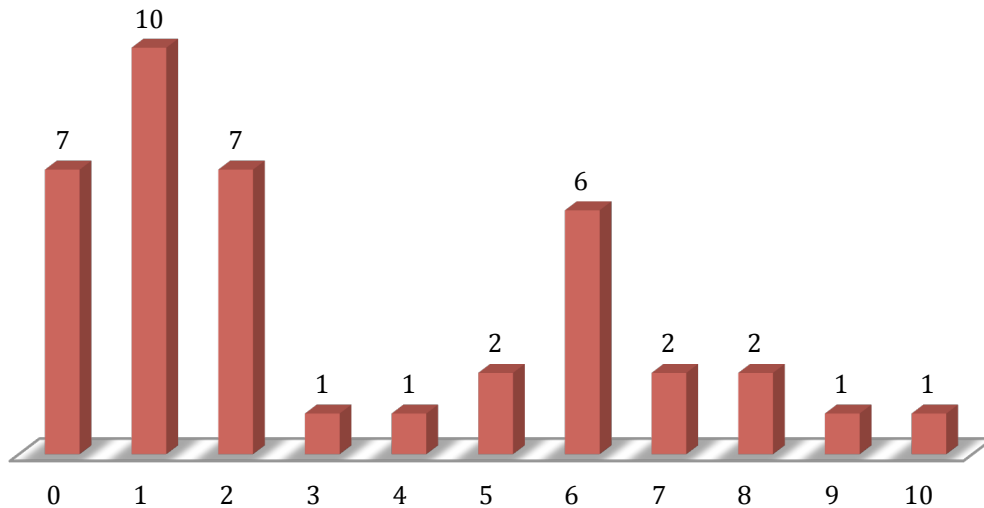
**Grafico 10. Terapia anti-HER2 adyuvante**

Finalmente, 24 pacientes (60%) recibieron tratamiento con radioterapia tras la cirugía, 16 pacientes (40%) no recibieron radioterapia en etapas iniciales (**Gráfico 11**).



**Grafico 11. Radioterapia previa**

De los 40 casos analizados, hay 7 pacientes a la 1ª recaída, seguido de 10 casos en 2ª recaída. En los 23 casos restantes las muestras de tumor metastásico se tomaron entre la 3ª y 9ª progresión de la enfermedad (**Gráfico 12**).



**Grafico 12. nº líneas previas para la enfermedad avanzada**

#### 4.2 Resultados de estudios de secuenciación masiva

Se presentan los resultados de las variantes genéticas identificadas a partir de DNA obtenido del tumor primario, metástasis y plasma. La cobertura mediana para las muestras de tejido tumoral fue 6930x (rango x5354-9324) y para ctDNA 15400x (rango x10942-24090). Se han descartado las variantes con una frecuencia alélica menor superior a un 1% y se han seleccionado aquellas localizadas en regiones codificantes (exones). Se han tenido en cuenta únicamente aquellas variantes que han sido descritas y catalogadas como patogénicas, probablemente patogénicas y de significado incierto siguiendo las guías para la interpretación del Colegio Americano de Genética & Genómica Médica y la Asociación de Patología Molecular (99) (**Figura 12**). Se han considerado presentes las variantes con una frecuencia alélica  $\geq 2\%$  en tejido parafinado (primario y metástasis) y cualquier frecuencia en el caso de variantes identificadas en plasma.

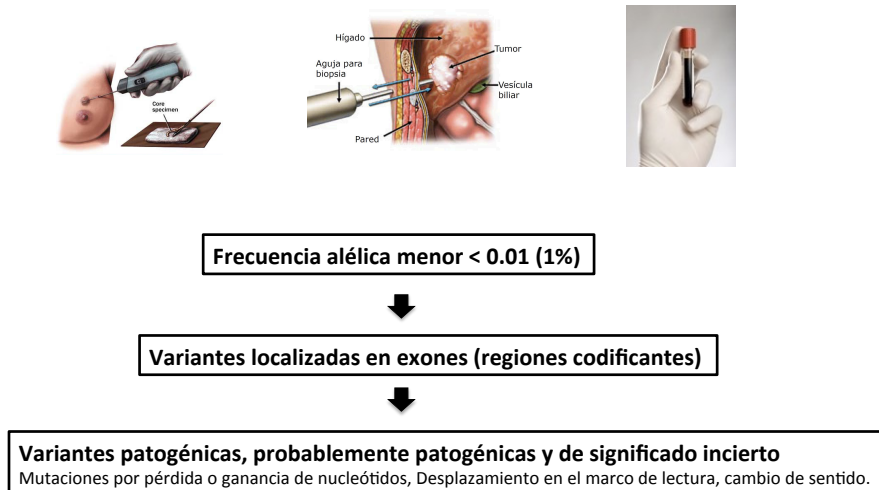


Figura 12. Criterios para la identificación de las variantes.

4.2.1 Variantes comunes identificadas en el tumor primario y metástasis

Se han identificado 110 variantes en 34 genes comunes entre el tumor primario y sus metástasis. Las variantes más frecuentes ( $\geq 5\%$ ) se encontraron en TP53 (17;15%), KMT2C (16;15%), PIK3CA (14;12%), PTPN14 (6; 5%) , BRCA 2 (5; 5%) y NF1 (5; 5%), (Gráfico 13).

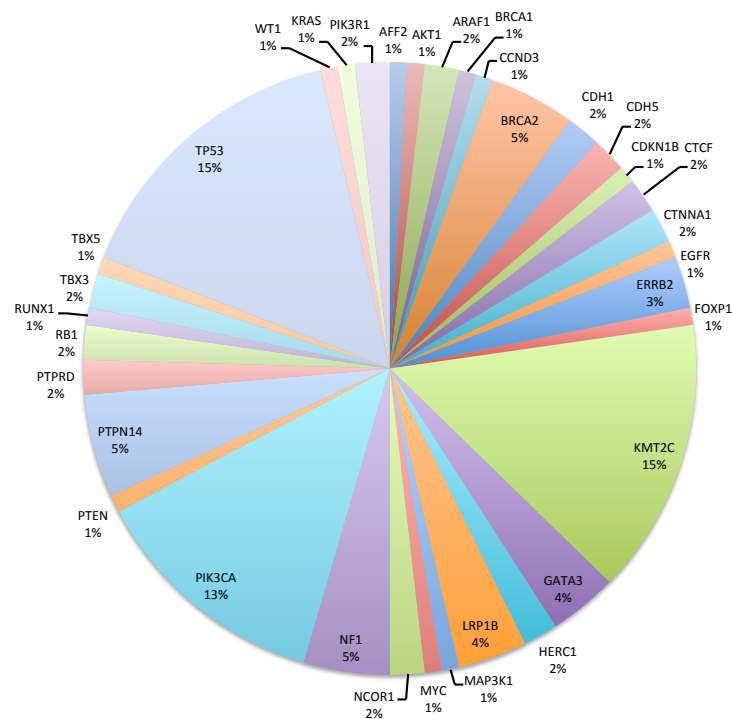
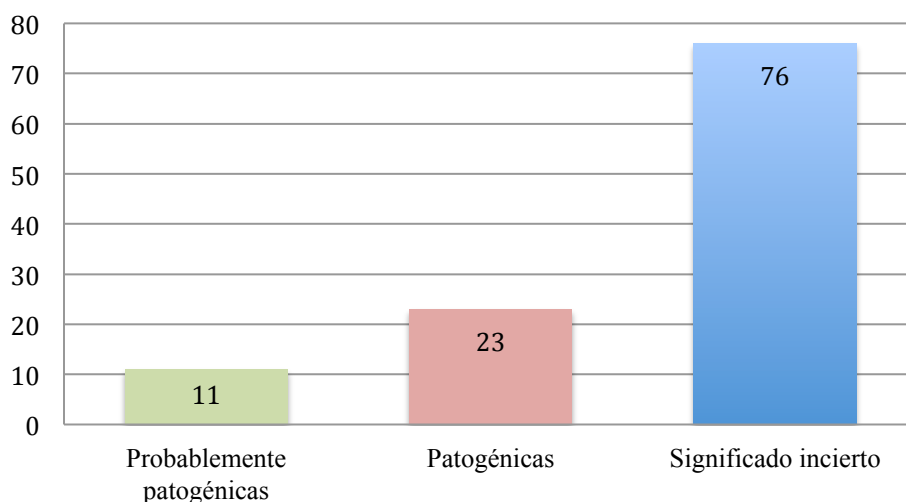


Gráfico 13. Variantes comunes identificadas en tumor primario y metástasis

De las variantes comunes entre tumor primario y metástasis, 34 fueron consideradas patogénicas o probablemente patogénicas (31%) (**Gráfico 14**).



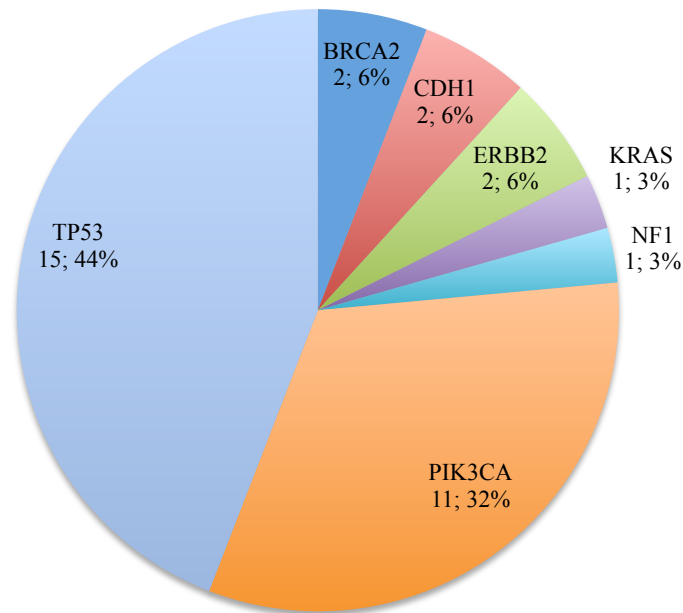
**Gráfico 14. Clasificación de variantes comunes primario y metástasis en función de patogenicidad.**

Las variantes patogénicas y probablemente patogénicas más frecuentes fueron TP53 (15; 44%) y PIK3CA (11; 32%) (**tabla 7**) (**gráfico 15**).

ID PACIENTE	GEN	PROTEINA	ID PACIENTE	GEN	PROTEINA
HCSC-MUT-21	BRCA2	p.Arg3128Ter*	HUGM-MUT-36	PIK3CA	p.His1047Arg*
HCSC-MUT-20	BRCA2	p.Lys1828fs*	HUGM-MUT-37	PIK3CA	p.His1047Arg*
HCSC-MUT-35	CDH1	p.Gln23Ter <sup>+</sup>	HUGM-MUT-05	TP53	p.Cys135Arg <sup>+</sup>
HUGM-MUT-16	CDH1	p.Pro277fs <sup>+</sup>	HUGM-MUT-07	TP53	p.Gly266Glu <sup>+</sup>
HCSC-MUT-37	ERBB2	p.Val777_Gly778insGlySerPro <sup>+</sup>	HUGM-MUT-36	TP53	p.Arg342Pro <sup>+</sup>
HUGM-MUT-45	ERBB2	p.Val777Leu <sup>+</sup>	HUGM-MUT-13	TP53	p.Asn239Ter*
HUGM-MUT-16	KRAS	p.Gly12Cys*	HUGM-MUT-28	TP53	p.Cys242fs*
HUGM-MUT-53	NF1	p.Arg1534Ter <sup>+</sup>	HUGM-MUT-45	TP53	p.Tyr205fs*
HCSC-MUT-35	PIK3CA	p.Cys420Arg <sup>+</sup>	HUGM-MUT-53	TP53	p.Trp91Ter*
HUGM-MUT-14	PIK3CA	p.Val344Gly <sup>+</sup>	HUGM-MUT-06	TP53	p.Arg248Gln*
HUGM-MUT-31	PIK3CA	p.Gly106Val <sup>+</sup>	HUGM-MUT-23	TP53	p.Gln317Ter*
HCSC-MUT-19	PIK3CA	p.Gly451_Asp454del*	HUGM-MUT-29	TP53	p.Asp207fs*
HUGM-MUT-19	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUGM-MUT-31	TP53	p.Cys238fs*
HUGM-MUT-22	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUGM-MUT-40	TP53	p.Arg337His*
HUGM-MUT-05	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUGM-MUT-42	TP53	p.Arg273His*

HUGM-MUT-14	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUIC-MUT-01	TP53	p.Arg213Ter*
HUGM-MUT-23	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUIC-MUT-09	TP53	p.Arg342Ter*

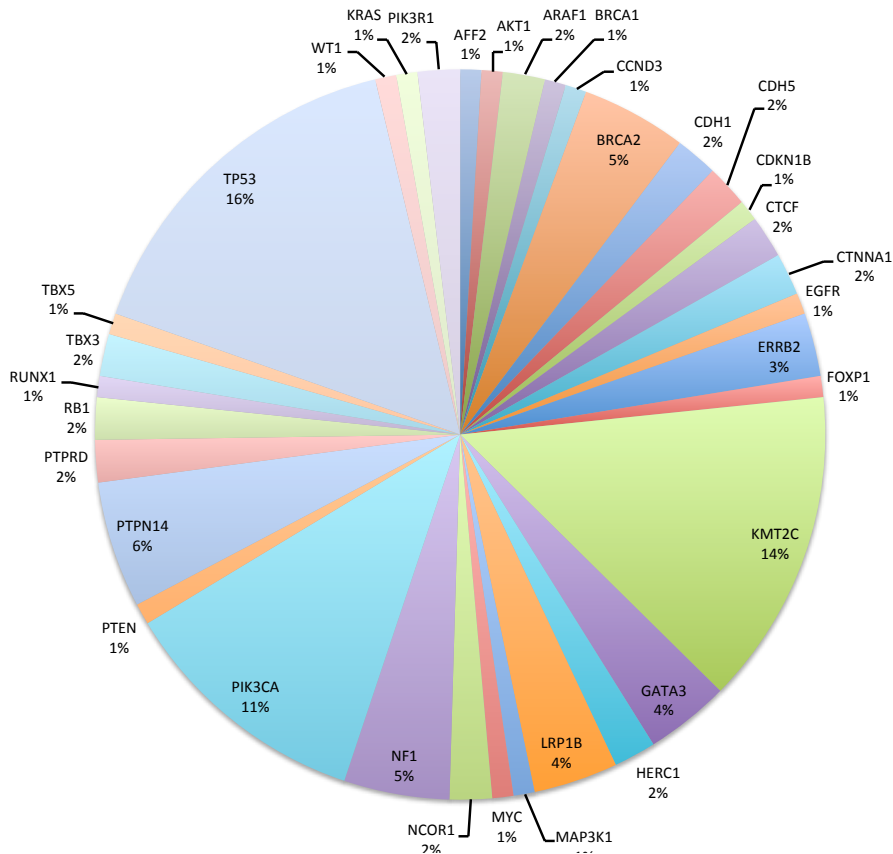
**Tabla 7. Variantes patogénicas y probablemente patogénicas comunes entre tumor primario y metástasis. \*Patogénicas + Probablemente patogénicas**



**Gráfico 15. Variantes patogénicas y probablemente patogénicas comunes entre tumor primario y metástasis.**

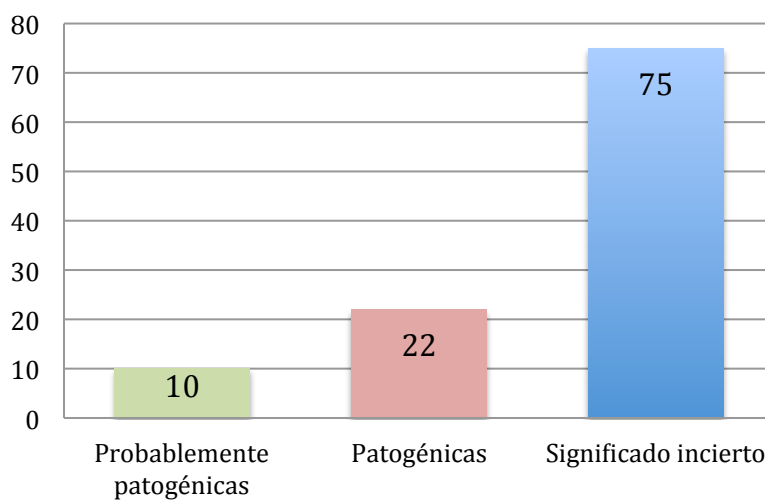
#### 4.2.2 Variantes comunes en el tumor primario, metástasis y plasma

De las 110 variantes comunes en tumor primario y metástasis se han identificado en plasma 107 variantes en 34 genes distintos (sensibilidad del 97.2%). Las variantes más frecuentes ( $\geq 5\%$ ) se encontraron en TP53 (17;16%), KMT2C (15;14%), PIK3CA (10;11%), PTPN14 (6; 5%) y BRCA2 (5; 5%) (**Gráfico 16**).



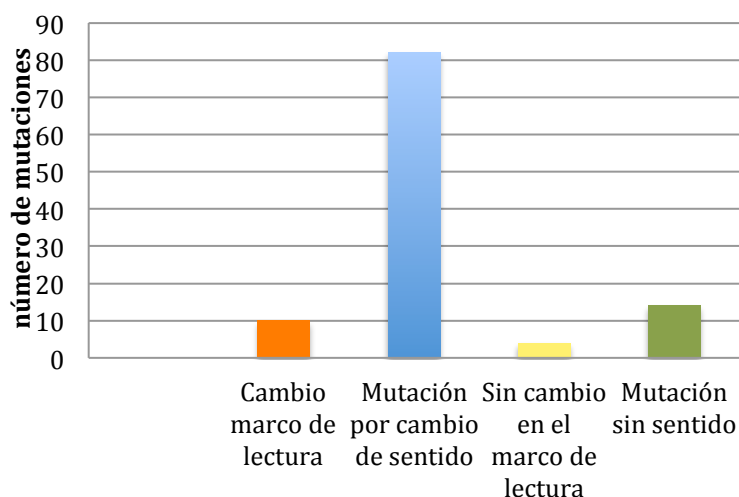
**Grafico 16. Variantes identificadas en tumor primario, metástasis y plasma.**

22 de las variantes identificadas fueron consideradas patológicas (21%), 10 probablemente patológicas (9%) y 75 de significado incierto (70%) (**Gráfico 17**).



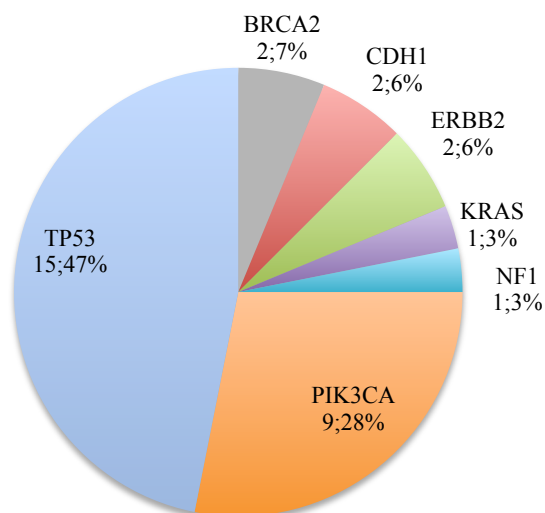
**Grafico 17. Clasificación de variantes comunes entre tumor primario, metástasis y plasma en función de patogenicidad.**

Atendiendo al mecanismo mutacional, las variantes más frecuentes fueron las mutaciones por cambio de sentido (*missense*, 81;76%), seguidas de mutaciones sin sentido (*nonsense*, 13;12%), cambios en el marco de lectura (*frameshift*, 10;9%) y sin cambio en el marco de lectura (*non-frameshift*, 3;3%) (Gráfico 18).



**Gráfico 18. Clasificación de las variantes acorde al mecanismo mutacional**

La mayoría de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas fueron identificadas en los genes TP53 (15; 47%) y PIK3CA (9; 28%) (Gráfico 19) (Tabla 8).



**Gráfico 19. Variantes patogénicas y probablemente patogénicas comunes en tumor primario y metástasis y plasma**

ID PACIENTE	GEN	PROTEINA	ID PACIENTE	GEN	PROTEINA
HCSC-MUT-21	BRCA2	p.Arg3128Ter*	HUGM-MUT-37	PIK3CA	p.His1047Arg*
HCSC-MUT-20	BRCA2	p.Lys1828fs*	HUGM-MUT-05	TP53	p.Cys135Arg <sup>+</sup>
HCSC-MUT-35	CDH1	p.Gln23Ter <sup>+</sup>	HUGM-MUT-07	TP53	p.Gly266Glu <sup>+</sup>
HUGM-MUT-16	CDH1	p.Pro277fs <sup>+</sup>	HUGM-MUT-36	TP53	p.Arg342Pro <sup>+</sup>
HCSC-MUT-37	ERBB2	p.Val777_Gly778insGlySerPro <sup>+</sup>	HUGM-MUT-13	TP53	p.Asn239Ter*
HUGM-MUT-45	ERBB2	p.Val777Leu <sup>+</sup>	HUGM-MUT-28	TP53	p.Cys242fs*
HUGM-MUT-16	KRAS	p.Gly12Cys*	HUGM-MUT-45	TP53	p.Tyr205fs*
HUGM-MUT-53	NF1	p.Arg1534Ter <sup>+</sup>	HUGM-MUT-53	TP53	p.Trp91Ter*
HCSC-MUT-35	PIK3CA	p.Cys420Arg <sup>+</sup>	HUGM-MUT-06	TP53	p.Arg248Gln*
HUGM-MUT-31	PIK3CA	p.Gly106Val <sup>+</sup>	HUGM-MUT-23	TP53	p.Gln317Ter*
HUGM-MUT-19	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUGM-MUT-29	TP53	p.Asp207fs*
HUGM-MUT-22	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUGM-MUT-31	TP53	p.Cys238fs*
HUGM-MUT-05	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUGM-MUT-40	TP53	p.Arg337His*
HUGM-MUT-14	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUGM-MUT-42	TP53	p.Arg273His*
HUGM-MUT-23	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUIC-MUT-01	TP53	p.Arg213Ter*
HUGM-MUT-36	PIK3CA	p.His1047Arg*	HUIC-MUT-09	TP53	p.Arg342Ter*

**Tabla 8. Variantes patogénicas comunes tumor primario, metástasis y plasma. \* Patogénicas <sup>+</sup> Probablemente patogénicas**

#### 4.2.3 Variantes comunes en el tumor primario y metástasis no presentes en plasma

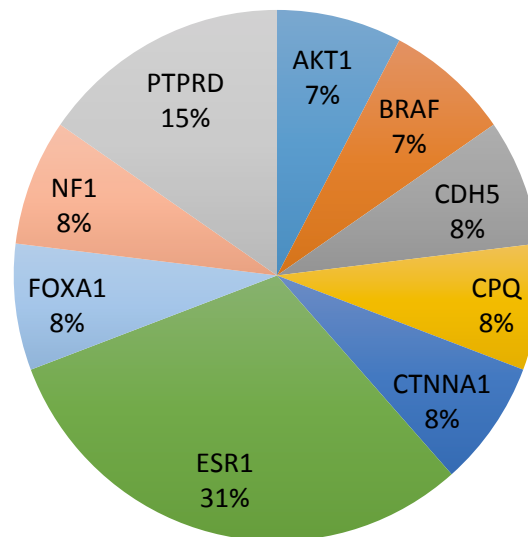
Se han identificado 3 variantes en 2 genes presentes en el tumor primario y metastásico no presentes en plasma. Las dos mutaciones identificadas en PIK3CA son consideradas patogénicas o probablemente patogénicas (**Tabla 9**).

ID PACIENTE	GEN	PROTEINA
HCSC-MUT-19	PIK3CA	Gly451Asp454del*
HUGM-MUT-14	PIK3CA	Val344Gly <sup>+</sup>
HUGM-MUT-16	KMT2C	Gly2484Ter

**Tabla 9. Variantes comunes primario y metástasis no presentes en plasma. \* Patogénicas <sup>+</sup> Probablemente patogénicas**

#### 4.2.4 Variantes identificadas en metástasis y plasma no presentes en el tumor primario

Se han identificado 13 variantes en 9 genes tanto en metástasis como en plasma no identificadas en el tumor primario (**Gráfico 20**). 6 de las variantes encontradas fueron patogénicas o probablemente patogénicas (**Tabla 10**). Las mutaciones más frecuentes se encontraron en ESR1 siendo identificadas en 4 pacientes (Asp538Gly n=3, Leu536Arg n=1). Todas las pacientes con mutaciones en ESR1 tenían tumores ER+/HER2- y una mayor exposición a inhibidores de aromatasa en el entorno metastásico (3 pacientes) que en adyuvancia (1 paciente).



**Gráfico 20. Variantes identificadas en metástasis y ctDNA no presentes en tumor primario.**

ID PACIENTE	GEN	PROTEINA	MUTACION
HUGM-MUT-21	AKT1	Glu17Lys <sup>+</sup>	c.49G>A
HUGM-MUT-36	BRAF	Asp594Asn <sup>+</sup>	c.1780G>A
HUGM-MUT-21	ESR1	Leu536Arg <sup>+</sup>	c.1607T>G
HUGM-MUT-22	ESR1	Asp538Gly <sup>+</sup>	c.1613A>G
HUGM-MUT-38	ESR1	Asp538Gly <sup>+</sup>	c.1613A>G
HUGM-MUT-56	ESR1	Asp538Gly <sup>+</sup>	c.1613A>G

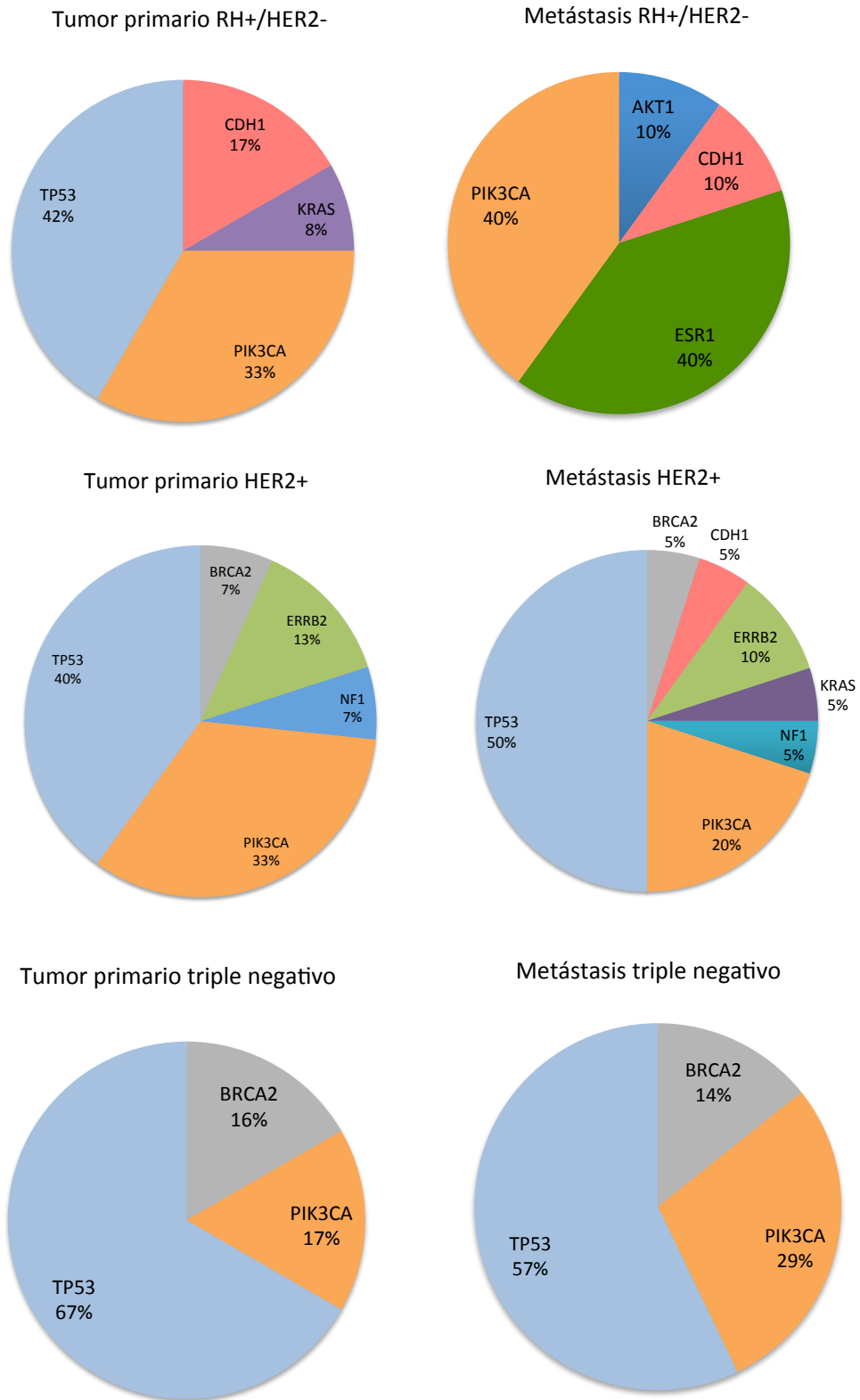
**Tabla 10. Variantes patogénicas identificadas en metástasis y ctDNA no presentes en tumor primario. \*Patogénicas <sup>+</sup>Probablemente patogénicas**

#### 4.2.5 Confirmación de las variantes encontradas por Illumina

Tras finalizar la secuenciación por Ion Torrent se disponía de material para realizar una validación independiente mediante la tecnología Illumina en 38 de las 40 pacientes. De las 110 variantes comunes entre tumor primario y metástasis identificadas por Ion Torrent se confirmaron por Illumina un total de 94 (85%). Al analizar la presencia de estas 94 variantes en ctDNA se identificaron 54 variantes (sensibilidad = 0.63). Sin embargo, de las 13 variantes comunes detectadas en tumor metastásico y ctDNA no presentes en el tumor primario identificadas por Ion Torrent, al utilizar la tecnología Illumina se confirmó la presencia en 12 de ellas (92.3%).

#### 4.3 Análisis de mutaciones en función del fenotipo tumoral

A continuación se presentan los resultados de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas (mutaciones) en función del fenotipo tumoral. Agrupando los tumores en función de la expresión de RH y HER2 en el tumor primario y metastásico en 3 subgrupos (RH+/HER2-, triple negativo y HER2+) se observan diferencias en el perfil de genes mutados no sólo entre los diferentes subgrupos si no también entre el primario y la metástasis. Así, aunque en el tumor primario predominan las mutaciones de TP53 y PIK3CA independientemente del fenotipo tumoral, se observan mutaciones en CDH1 y KRAS en tumores RH+/HER2-, mutaciones en ERBB2, NF1 y BRCA2 en tumores HER2+ y mutaciones de BRCA2 en tumores triple negativo. Los tumores RH+/HER2- experimentan una importante diferencia en los genes mutados entre el tumor primario y las metástasis, no observándose mutaciones de TP53 en la metástasis y apareciendo mutaciones de resistencia al tratamiento como ESR1 y AKT. En el caso de los tumores HER2+ se observa menor porcentaje de mutaciones de PIK3CA y aparición de mutaciones en CDH1, KRAS y NF1. Sin embargo el perfil mutacional de los tumores triple negativos se mantiene estable entre el tumor primario y las metástasis (**Gráfico 20**).



**Gráfico 21. Análisis mutacional en tumor primario y metástasis en función del fenotipo tumoral.**

#### 4.4 Análisis de variantes patogénicas/probablemente patogénicas más frecuentes

##### 4.4.1 Variantes en ESR1

Se ha identificado 4 variantes de ESR1 en 4 pacientes distintas (**Tabla 11**). Todas las variantes encontradas fueron probablemente patogénicas.

PACIENTE	MUTACIÓN	PROTEINA	PRIMARIO	METÁSTASIS	PLASMA
<b>HUGM-MUT-21</b>	c.1607T>G	Leu536Arg	no detectada	Detectada	Detectada
<b>HUGM-MUT-22</b>	c.1613A>G	Asp538Gly	no detectada	Detectada	Detectada
<b>HUGM-MUT-38</b>	c.1613A>G	Asp538Gly	no detectada	Detectada	Detectada
<b>HUGM-MUT-56</b>	c.1613A>G	Asp538Gly	no detectada	Detectada	Detectada

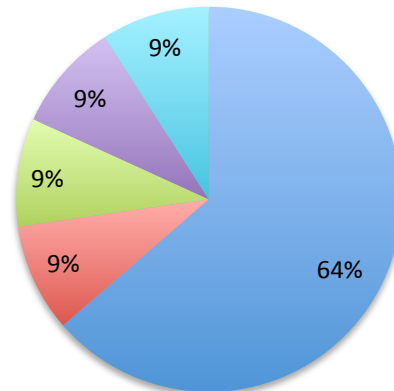
**Tabla 11. Variantes de ESR1**

En ninguna de las pacientes la variante de ESR1 estaba presente en el tumor primario. Las 4 pacientes habían recibido tratamiento previo con inhibidores de aromatasa (3 para enfermedad avanzada y 1 en adyuvancia) y 2 tratamiento con tamoxifeno (todas en adyuvancia). En todos los casos el tumor expresaba RE. Aunque en 3 de las pacientes el tumor primario sobreexpresaba HER2 todas las biopsias de las metástasis se correspondieron con tumores HER2 negativos.

##### 4.4.2 Variantes en PIK3CA

Se han identificado 11 variantes patogénicas/probablemente patogénicas de PIK3CA. La mutación más frecuentemente identificada es c.3140A>G (His1047Arg) que se relaciona con una activación constitutiva del dominio catalítico de la proteína que ocasiona un aumento de las cascadas de señalización celulares activadoras del crecimiento celular, supervivencia, metabolismo, movilidad y proliferación celular (**Gráfico 21**).

■ His1047Arg ■ Gly451Asp ■ Cys420Arg ■ Val344Gly ■ Gly106Val



**Grafico 22. Variantes patogénicas/probablemente patogénicas de PIK3CA**

Todas las mutaciones fueron detectadas en la metástasis y tumor primario. Sin embargo en plasma sólo se identificaron 9 de las 11 mutaciones (**Tabla 12**).

ID PACIENTE	MUTACION	PROTEINA	PRIMARIO	METASTASIS	PLASMA
HCSC-MUT-19	c.1351.1362del	Gly451Asp	Detectada	Detectada	No detectada
HCSC-MUT-35	c.1258T>C	Cys420Arg	Detectada	Detectada	Detectada
HUGM-MUT-05	c.3140A>G	His1047Arg	Detectada	Detectada	Detectada
HUGM-MUT-14	c.1031T>G	Val344Gly	Detectada	Detectada	No detectada
HUGM-MUT-14	c.3140A>G	His1047Arg	Detectada	Detectada	Detectada
HUGM-MUT-19	c.3140A>G	His1047Arg	Detectada	Detectada	Detectada
HUGM-MUT-22	c.3140A>G	His1047Arg	Detectada	Detectada	Detectada
HUGM-MUT-23	c.3140A>G	His1047Arg	Detectada	Detectada	Detectada
HUGM-MUT-31	c.317G>T	Gly106Val	Detectada	Detectada	Detectada
HUGM-MUT-36	c.3140A>G	His1047Arg	Detectada	Detectada	Detectada
HUGM-MUT-37	c.3140A>G	His1047Arg	Detectada	Detectada	Detectada

**Tabla 12. Variantes de PIK3CA**

El fenotipo tumoral tanto del tumor primario como de las metástasis en las pacientes con mutación de PIK3CA fue RH+/HER2- en 5 pacientes, HER2+ en 5 pacientes y triple negativo en una paciente.

#### 4.4.3 Variantes en ERBB2

Se han identificado 2 variantes patogénicas/probablemente patogénicas de ERBB2 (Tabla 13). Las dos variantes han sido identificadas en todas las muestras.

PACIENTE	MUTACION	PROTEINA	PRIMARIO	METASTASIS	PLASMA
HCSC-MUT-37	c.2340_2341ins GGCTCCCCA	Val777_Gly778ins GlySerPro	Detectada	Detectada	Detectada
HUGM-MUT-45	c.2329G>T	Val777Leu	Detectada	Detectada	Detectada

**Tabla 13. Variantes de ERBB2**

El análisis de la sobreexpresión/amplificación de HER2 por IHC y/o Hibridación en tejido fue positivo en ambos casos tanto en el tumor primario como en la metástasis.

#### 4.4.4 Variantes de BRCA 1 y 2

Se han identificado 2 variantes patogénicas/probablemente patogénicas de BRCA2. Las dos variantes fueron identificadas en todas las muestras (Tabla 14).

PACIENTE	GEN	MUTACION	PROTEINA	PRIMARIO	METASTASIS	PLASMA
HCSC-MUT-20	BRCA2	c.5484delA	Lys1828fs	Detectada	Detectada	Detectada
HCSC-MUT-21	BRCA2	c.9382C>T	Arg3128Ter	Detectada	Detectada	Detectada

**Tabla 14. Variantes de BRCA**

Tanto la mutación 9382C>T (Arg3128Ter) como c.5484delA (Lys182fs) fueron también identificadas en línea germinal. Una de las pacientes ya disponía de estudio mutacional de BRCA2 en línea germinal previo a la inclusión en el estudio mientras que en la segunda paciente se realizó a posteriori tras conocer los resultados en las muestras de tumor.

#### 4.4.5 Variantes de TP53

Se han identificado 15 variantes patogénicas/probablemente patogénicas de TP53. En todos los casos fueron identificadas en el tumor primario, la metástasis y en plasma (Tabla 15).

ID PACIENTE	MUTACION	PROTEINA	PRIMARIO	METASTASIS	PLASMA
HUGM-MUT-05	c.403T>C	Cys3Arg	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-07	c.797G>A	Gly134Glu	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-06	c.743G>A	Arg248Gln	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-13	c.714_71SinsT	Asn239Ter	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-29	c.619_622del	Asp207fs	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-23	c.949C>T	Gln317Ter	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-28	c.723delC	p.Cys242fs	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-31	c.712_716del	Cys238fs	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-36	c.1025G>C	Arg342Pro	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-40	c.10101G>A	Arg337His	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-42	c.818G>A	Arg273His	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-45	c.613_622del	Tyr205fs	Detectado	Detectado	Detectado
HUGM-MUT-53	c.272G>A	Trp91Ter	Detectado	Detectado	Detectado
HUIC-MUT-01	c.637C>T	Arg213Ter	Detectado	Detectado	Detectado
HUIC-MUT-09	c.1024C>T	Arg342Ter	Detectado	Detectado	Detectado

**Tabla 15. Variantes TP53**

El fenotipo tumoral del tumor primario en las pacientes con mutación de TP53 fue RH+/HER2- en 5 pacientes, HER2+ en 6 pacientes y triple negativo en 4 pacientes. Sin embargo, en la metástasis, el fenotipo fue HER2+ en 10 pacientes y triple negativo en 5 no identificándose ningún tumor con fenotipo RH+/HER2-.

**4.4.6 Variantes en AKT1**

Se ha identificado una variante patogénica en AKT1 en la metástasis y plasma no presente en el tumor primario (**Tabla 16**). Corresponía a una paciente con un tumor RH+/HER2- tanto en el primario como en la metástasis previamente expuesto a tratamiento con inhibidores de aromatasa.

ID PACIENTE	MUTACION	PROTEINA	PRIMARIO	METASTASIS	PLASMA
HUGM-MUT-021	c.49G>A	Glu17Lys	No detectado	Detectado	Detectado

**Tabla 16. Variantes de AKT1**

# DISCUSIÓN

## 5. DISCUSIÓN

Los mayores avances en terapia dirigida durante los últimos años se han conseguido mediante el análisis de biopsias tumorales obtenidas previo al inicio del tratamiento. La identificación de dianas terapéuticas ha permitido el diseño de terapias dirigidas para las mismas como trastuzumab en cáncer de mama e imatinib, cetuximab y vemurafenib en otras neoplasias. Igualmente, el acceso a tejido tumoral tras la aparición de resistencia clínica ha ayudado a identificar mecanismos de resistencia secundaria a estas terapias dirigidas (100).

Sin embargo, la obtención de tejido tumoral para el estudio de biomarcadores es compleja debido a que se trata de una maniobra invasiva, costosa, que requiere tiempo para su realización y no es subsidiaria de repetición. Por otra parte, el tejido biopsiado puede no ser representativo de la carga tumoral global ni evaluar en tiempo real el tejido tumoral. Así, diferentes estudios de secuenciación han demostrado la existencia de diferencias en los perfiles de mutaciones entre diferentes regiones tumorales del mismo paciente así como entre especímenes procedentes del tumor primario y de sus metástasis (101–103).

Para superar las limitaciones de las biopsias tisulares se necesitan técnicas menos invasivas capaces de:

- a) Conocer las características del tumor identificando la heterogeneidad inter e intratumoral.
- b) Servir de guía para la elección del tratamiento.
- c) Monitorizar la aparición de resistencia a fármacos y seleccionar terapias adaptadas en función de las mismas.

El análisis de biomarcadores presentes en circulación sanguínea como células tumorales circulantes (CTCs), ctDNA y exosomas han sido estudiados como biopsias líquidas subrogadas o complementarias a las biopsias tisulares.

Con estos antecedentes hemos realizado un perfil mutacional en el tumor primario, sus metástasis y ctDNA en una muestra de 40 pacientes con cáncer de mama metastásico con los siguientes objetivos:

Comparar las alteraciones genómicas tumorales en el tumor primario de pacientes con cáncer de mama y las alteraciones genómicas en el tejido tumoral de las metástasis que aparecieron durante el curso clínico de la enfermedad.

- Estudiar las alteraciones genómicas en muestras de ctDNA obtenidas en sangre periférica.
- Comparar las alteraciones genómicas en ctDNA con las obtenidas en la biopsia del tumor primario y de sus metástasis.
- Analizar las variaciones genéticas encontradas para identificar marcadores de respuesta al tratamientos dirigidos así como mecanismos de resistencia al mismo.

## **5.1 Comparación de las alteraciones genómicas en tejido del tumor primario y de las metástasis.**

### **5.1.1 Comparación de primario y metástasis por IHC e hibridación**

Desde el punto de vista clínico la concordancia entre el tumor primario y sus metástasis es especialmente relevante, no sólo para confirmar el diagnóstico de malignidad sino también para seleccionar el uso de terapia dirigida. Los estudios que comparan expresión de RE, RP y HER2 en el tumor primario y sus metástasis muestran una elevada discordancia (**tablas 17 y 18**). Aunque factores preanalíticos y analíticos (procesamiento de la muestra, tiempo de fijación, etc..) pueden tener influencia no son los principales responsables de estas diferencias. En un meta-análisis que incluyó 4200 pacientes se observó cambio en el estatus de RE de positivo a negativo del 24% y de negativo a positivo del 14%. En el mismo sentido experimentaron cambio 2739 pacientes analizadas para el RP (46% y 15%) y 2987 pacientes analizadas para HER 2 (13% y 5%) (104).

En nuestra serie se observa un porcentaje de cambio del 20% en RE (12.5% positivo a negativo y 7.5% negativo a positivo), del 27.5% en RP (25% positivo a negativo y 2.5%

negativo a positivo) y del 27.5% en HER2 (12.5% positivo a negativo y 15% negativo a positivo). Este elevado porcentaje de variación justifica la realización de biopsias de las recidivas dada la existencia de terapias dirigidas para tumores con expresión de receptores hormonales y sobreexpresión de HER2 (105,106). No obstante, aunque los resultados de la re-biopsia tienen un impacto en el manejo de las pacientes y de manera intuitiva el tratamiento adaptado a la información obtenida podría mejorar los resultados, esta hipótesis no ha sido confirmada en ensayos clínicos.

Autor (año)	Método	nº pacientes	Ganancia RE%	Pérdida RE%	Ganancia RP%	Pérdida RP%
Simons 2009(107)	IHC	25	0	12	0	28
Amir 2012(108)	IHC	117	16	15	8	74
Lindstrom 2012(109)	IHC	459	7	24	7	33
Jensen 2012(110)	IHC	118	3	8	-	-
Heitz 2013(111)	IHC	411	19	22	16	41
Curtit 2013(112)	IHC	235	5	12	7	22
Aurilio 2013 (113)	IHC	107	3	18	3	40
Ibrahim 2013 (114)	IHC	120	7	9	8	33
Aurilio 2014 (115)	IHC	4200, 2739,2987	14	24	15	46
Yang 2014 (116)	IHC	133	3	15	6	27
Qu 2014 (117)	IHC	48	4	10	2	14

**Tabla 17. Expresión de RE y RP en tumor primario y las metástasis.**

Autor	Método	n° pacientes	Ganancia HER2%	Pérdida HER2%
Simons 2009(107)	FISH	25	8	0
Amir 2012(108)	IHC, FISH	117	8	20
Lindstrom 2012(109)	IHC, FISH	104	5	8
Jensen 2012(110)	IHC, FISH	114	7	2
Heitz 2013(111)	IHC, FISH	411	11	40
Curtit 2013(112)	IHC, FISH	235	5	12
Aurilio 2013 (113)	IHC, FISH	86	4	2
Ibrahim 2013 (114)	IHC, FISH	120	12	5
Aurilio 2014 (115)	IHC	2987	5	13
Yang 2014 (116)	IHC, FISH	133	3	3
Qu 2014 (117)	IHC	48	4	4

**Tabla 18. Sobreexpresión/Amplificación de HER2 en el tumor primario y la metástasis.**

### 5.1.2 Comparación de primario y metástasis por técnicas de secuenciación

La secuenciación de las metástasis permitiría no sólo la identificación de mutaciones accionables sino también ayudar a conocer el mecanismo de formación de las mismas. Así, la presencia de mutaciones exclusivas del tumor primario sugeriría la existencia de siembra metastásica precoz mientras que la presencia de mutaciones privativas en las metástasis indicaría la ganancia de mutaciones que incrementarían el potencial metastásico.

En nuestro estudio, hemos identificado 110 variantes comunes entre el tumor primario y sus correspondientes metástasis mediante Ion Torrent de las cuales 95 (85%) han sido validadas por Illumina. A pesar del importante número de variantes comunes se han detectado hasta 13 variantes en la metástasis no presentes en el tumor primario de las cuales 6 son consideradas patogénicas o probablemente patogénicas. Al analizar por orígenes se observa que las mutaciones en los genes más frecuentes (TP53 y PIK3CA) se encuentran habitualmente tanto en el tumor primario como en sus metástasis. De este

modo, la mayoría de estas mutaciones consideradas “*driver*” tenían lugar en el tumor primario acorde a la hipótesis que sugiere ser un evento precoz en la evolución del cáncer (118). Sin embargo, las mutaciones en genes menos frecuentes (ESR1, BRAF, AKT1) habitualmente sólo se encuentran en las metástasis.

Existen pocos estudios que realicen una comparación directa de muestras pareadas de tumor primario con metástasis distantes metacrónicas de cáncer de mama. Goswami et al analizaron 265 muestras de tumores primarios y metastásicos que incluyeron 86 carcinomas de colon (32.5%), 79 carcinomas de mama (29.8%) y 20 melanomas (7.5%). Se observó el mismo perfil mutacional en 227 parejas primario-metástasis (85.7%) mientras que las 38 restantes (15.3%) tuvieron resultados discordantes y fueron considerados tumores clonalmente divergentes (119).

Mediante hibridación genómica comparativa y NGS de 365 genes, Bertucci et al analizaron el número de copias y el perfil mutacional de muestras pareadas primario/metástasis de 23 pacientes con cáncer de mama. Definieron variantes recurrentes como aquellas alteraciones presentes en 10 o más muestras en COSMIC V68 mientras que el resto de variantes fueron consideradas no recurrentes. Identificaron 499 mutaciones que incluyeron 39 variantes recurrentes (AKT1, ERBB2, PIK3CA y TP53) y 460 variantes no recurrentes. La concordancia entre primario y metástasis fue del 75% siendo mayor en caso de variantes recurrentes que afectan a genes conductores o “*drivers*” de la enfermedad que en las variantes no recurrentes o pasajeras que son reflejo de la inestabilidad genómica (92% vs 73% respectivamente) (120).

Mediante NGS, Meric-Bernstam et al. analizaron la concordancia de 182 genes en 33 muestras pareadas de tumor primario y metastásico. Al igual que en nuestro estudio las mutaciones más frecuentes fueron en PIK3CA (primario 36% , metástasis 42%) y TP53 (primario 36%, metástasis 35%). El 86.6% de las mutaciones somáticas y el 62.3% de los cambios en el número de copias fueron concordantes observándose tanto pérdidas como ganancias en las mutaciones en las metástasis comparado con el tumor primario (121). Sin embargo, en nuestro estudio, sólo hemos observado ganancia de mutaciones en las metástasis mientras que todas las mutaciones identificadas en el tumor primario fueron también identificadas en las metástasis.

Una de las posibles explicaciones al aumento en el número de mutaciones en las metástasis puede ser la exposición a tratamientos previos. Así, algunos estudios han demostrado mayor número de mutaciones en PIK3CA y TP53 en las metástasis comparado con el tumor primario (122). En nuestra serie el número de mutaciones asociadas a estos dos genes fue similar entre el primario y metástasis. Sin embargo, destaca la presencia de mutaciones en ESR1 en 4 pacientes y de mutaciones potencialmente accionables como AKT1 y BRAF. Estos datos sugieren que las mutaciones se acumulan con el tiempo favorecidas por la exposición a tratamientos. No obstante, otra posible explicación es existencia de clones minoritarios en el tumor primario siendo preciso la realización de un análisis de múltiples focos tumorales o la realización de secuenciación de células individuales para su confirmación (123).

En resumen, nuestros resultados muestran una elevada concordancia entre el tumor primario y sus metástasis. No obstante, se han identificado mutaciones en el tumor metastásico no presentes en el tumor primario. Estos hallazgos sugieren que el tejido tumoral procedente de las metástasis debería ser la fuente de material genómico utilizada para identificar biomarcadores de eficacia en ensayos clínicos.

## **5.2 Alteraciones genómicas en muestras de ctDNA obtenidas en sangre periférica**

A pesar del factor de confusión que supone la heterogeneidad intratumoral, en ocasiones no es posible ni deseable la realización de múltiples biopsias en los pacientes para evaluarla. Por otra parte, el análisis de una biopsia única podría no reflejar fielmente el espectro de alteraciones genómicas de un paciente introduciendo sesgos en la selección y en la valoración de la eficacia de las terapias personalizadas. De este modo, el análisis de ctDNA podría ser una alternativa a la realización de una o múltiples biopsias de las metástasis permitiendo una caracterización del tumor de una manera menos invasiva.

El ctDNA procedente de múltiples regiones tumorales puede reflejar tanto la heterogeneidad intratumoral como la heterogeneidad entre metástasis distantes (79,124,125). Así, Yates et al encontraron que 5 de 7 pacientes con biopsias de varias localizaciones metastásicas analizadas mediante WGS tenían de 1 a 2 mutaciones *driver* adicionales específicas de cada metástasis, sugiriendo que cada clon metastásico

presenta una evolución genómica diferencial (118). De este modo, aunque las biopsias procedentes de diferentes localizaciones pueden diferir en su perfil mutacional, el análisis de ctDNA permitiría detectar mutaciones no observadas en sus correspondientes muestras de tejido (126–129).

En nuestro estudio hemos utilizado la técnica de Ion Torrent para la secuenciación de las muestras de ctDNA. La secuenciación por Ion Torrent permite detectar mutaciones en DNA plasmático con una frecuencia alélica de hasta el 0.5%. Otras técnicas como Beaming y PCR digital pueden detectar mutaciones en DNA plasmático circulante con una frecuencia alélica del 0.01% pero su coste es mayor y sólo es posible aplicarlas a un número limitado de mutaciones preseleccionadas no siendo adecuado su uso en programas de *screening* molecular. La tecnología utilizada en nuestro estudio permite realizar un *screening* de las mutaciones más frecuentes en cáncer de mama a un coste razonable y con un tiempo hasta la obtención de resultados óptimo (7 días desde la recepción de la muestra hasta el análisis final). Para llevar a cabo el estudio, hemos seleccionado un panel con los genes más frecuentemente mutados en cáncer de mama (**Tabla 4**). La utilización de un panel de genes es una alternativa a la secuenciación del exoma completo. Aunque la secuenciación del exoma completo en DNA plasmático proporciona información más completa sobre el genoma del tumor comparado con el análisis de genes seleccionados, sólo es posible en pacientes con altos niveles de DNA circulante y requiere un análisis bioinformático más sofisticado que no permite su aplicación en programas de *screening* molecular.

En nuestra serie se han identificado 120 variantes en plasma de las cuales 38 son consideradas patogénicas o probablemente patogénicas. Las más frecuentes corresponden a TP53 (37.5%) y PIK3CA (22.5%) identificándose adicionalmente 4 mutaciones en ESR1 y 2 en ERBB2. Estos porcentajes son acordes a los comunicados en estudios recientes que pretenden identificar mutaciones en ctDNA en pacientes con cáncer de mama. Así, Yi et al utilizaron un panel de 1021 genes para analizar ctDNA de 100 pacientes con cáncer de mama metastásico identificando mutaciones puntuales en 96 de 100 pacientes (96%) (130). Al igual que en nuestro estudio, las mutaciones más frecuentemente identificadas fueron TP53 y PIK3CA, presentes en 43 (43%) y 32 (32%) de las pacientes respectivamente detectándose además 12 mutaciones de ESR1 (12%) y 11 mutaciones en ERBB2 (11%).

De este modo, nuestro estudio ha mostrado cómo es posible identificar las mutaciones más frecuentes en cáncer de mama a través de una muestra de sangre periférica con resultados similares a los reportados por otros autores en cuanto a mutaciones identificadas y frecuencia de presentación.

### **5.3 Comparación de las alteraciones genómicas en ctDNA con las obtenidas en la biopsia del tumor primario y de sus metástasis.**

Uno de los objetivos secundarios del estudio MIRROR fue evaluar la sensibilidad del análisis del ctDNA en plasma en la detección de alteraciones genómicas identificadas en las muestras del tumor primario y metastásico a través de dos plataformas de NGS (Ion Torrent e Illumina).

Los estudios retrospectivos que comparaban las mutaciones detectadas en plasma frente a las muestras pareadas en tejido han mostrado una sensibilidad del análisis de ctDNA variable (131–138). Para el análisis de determinados *loci* (por ejemplo, para estratificar pacientes candidatos a recibir tratamientos dirigidos), estudios recientes han demostrado que es posible realizar test a gran escala aunque la utilización de técnicas con sensibilidad limitada ha conducido a porcentaje de detección de ctDNA bajos (139,140). Sin embargo, el desarrollo de análisis específicamente diseñados para detectar niveles bajos de ctDNA ha mostrado niveles de sensibilidad del 92 y 100% (y cifras de concordancia entre el 96% y el 100%) para mutaciones de KRAS y BRAF respectivamente en pacientes con cáncer colorectal metastásico (133).

Además de estos estudios en los que se analizan mutaciones en un único gen disponemos de resultados de análisis de paneles de genes realizados en tumores de distinto origen en los que se comparan las mutaciones identificadas en ctDNA y en tejido tumoral archivado (mayoritariamente tumor primario). Janku et al analizaron mutaciones en BRAF, EGFR, KRAS y PIK3CA mediante BEAMing en muestras de plasma de 157 pacientes con cáncer metastásico (mayoritariamente cáncer colorectal 43% y melanoma 22%) y compararon los resultados con el análisis mutacional de tejido archivado. Los resultados fueron concordantes en el 91% de los casos de mutaciones de BRAF, en el 99% de los casos de mutaciones de EGFR y en el 91% de los casos de mutaciones de PIK3CA (141). Kim et al utilizaron un panel de 54 genes para valorar la

concordancia entre ctDNA y DNA tumoral en una muestra de 61 pacientes con cáncer metastásico de distintos orígenes. Detectaron al menos una mutación somática en 44 de 61 muestras de tejido (72.1%) y en 29 de 44 (65.9%) muestras de ctDNA obteniéndose un porcentaje de concordancia del 85.9% (142). Utilizando un panel con 46 genes, Lebofsky et al compararon el perfil mutacional de biopsias de localizaciones metastásicas de 34 pacientes con 18 tumores diferentes con sus correspondientes muestras de ctDNA en plasma. En 27 pacientes, 28 de las 29 mutaciones identificadas en las biopsias (97%) fueron detectadas en las muestras de ctDNA. El análisis de ctDNA identificó una mutación adicional no detectada en tejido. En los 7 pacientes restantes, la detección de mutaciones en las metástasis no fue posible debido a la insuficiente cantidad de tejido, pero fue posible realizarla en todas las muestras de DNA plasmático informando de la presencia de tres mutaciones adicionales potencialmente accionables (143). Estos resultados sugieren que el análisis de ctDNA es una alternativa a la biopsia de tejido independientemente del tipo de tumor y de la localización metastásica.

Específicamente en cáncer de mama, en un estudio de “prueba de concepto” de Mattos et al analizaron el perfil mutacional en el tumor primario, metástasis y ctDNA de una paciente diagnosticada de un carcinoma de mama RE positivo/HER2 negativo con metástasis óseas y hepáticas sincrónicas. Se identificaron 16 mutaciones somáticas en la biopsia hepática de las cuales 9 (CDKN2A, AKT1, TP53, JAK3, TSC1, NF1, CDH1, MML3 y CTNNB1) fueron detectadas en el tumor primario. Sin embargo, el análisis de ctDNA identificó todas las mutaciones presentes tanto en el tumor primario como en las metástasis (144). Además, el análisis de ctDNA permitió la monitorización longitudinal de la paciente y correlacionar los niveles de fracciones alélicas mutadas con la respuesta evaluada mediante PET-TC. Estos resultados han sido corroborados por investigadores del instituto Jules Bordet utilizando un panel de 50 genes para analizar 69 muestras de tejido tumoral (primario y metástasis) y 31 muestras de plasma procedentes de 17 pacientes con cáncer de mama metastásico. Utilizando la misma técnica de secuenciación empleada en nuestro estudio (Ion Torrent, Life Technologies, Carlsbad, CA) obtuvieron resultados en 60 muestras de tumor y 31 muestras de plasma. En el análisis de muestras de tejido, 12 de 17 pacientes (71%; 95% CI 44-90) presentaban al menos una mutación en p53, PIK3CA, PTEN, AKT1, IDH2 y SMAD4. Al analizar exclusivamente las muestras de tejido y plasma extraídas al mismo tiempo se observó

que en cuatro pacientes no se identificaron mutaciones en tejido ni en plasma; en nueve pacientes se identificaron las mismas mutaciones tanto en tumor como en plasma; en dos pacientes la mutación fue identificada en tumor pero no en plasma y en dos pacientes la mutación fue identificada en plasma pero no en tumor. De este modo, en 13 de 17 pacientes (76%, 95% CI 50-93) las muestras de tumor y plasma ofrecen resultados concordantes mientras que en 4 de 17 (24%, 95% CI 7-50) casos los resultados son discordantes ofreciendo información complementaria (145).

En el estudio MIRROR, el análisis de ctDNA mediante Ion Torrent ha permitido identificar el 97.2% (107/110) de las variantes detectadas en tejido de tumor primario y metastásico. Sin embargo, a diferencia del estudio de Rothé et al disponemos de las 3 muestras (tumor primario, metástasis y plasma) en todas las pacientes permitiendo un análisis más exacto de la evolución clonal del tumor así como de la sensibilidad de la técnica para la detección de mutaciones en las distintas muestras. La confirmación de estas variantes en ctDNA mediante Illumina fue difícil debido a que en 37 de las 40 muestras de plasma la cantidad de DNA sobrante tras el primer análisis fue insuficiente de acuerdo al protocolo recomendado por Illumina. De este modo, sólo fue posible detectar en ctDNA 59 de las 94 variantes comunes a tumor primario y metástasis previamente identificadas por Illumina ofreciendo una sensibilidad de 0.62. Es posible que este menor porcentaje de detección sea debido a la baja cantidad de muestra restante más que a una diferencia real de sensibilidad de las técnicas de NGS. Así en el estudio de Rothé et al con Illumina se detectaron el 92% de las variantes identificadas por Ion Torrent y en nuestro propio estudio al restringir el análisis a las variantes detectadas únicamente en tejido y plasma, pero no en el tumor primario, la tecnología Illumina fue capaz de identificar el 92.3% (12/13).

En el último año, el grupo de Cristofanilli de la Universidad de Chicago ha publicado la comparación del perfil genómico en tejido y ctDNA en 45 pacientes utilizando dos plataformas comerciales diferentes (Foundation one para biopsia tisular y Guardant 360 para ctDNA). Considerando todos los genes analizados la concordancia fue del 91-94.2%. Sin embargo, al considerar únicamente las alteraciones genómicas en cada estudio (excluyendo las variantes concordantes wild type) la concordancia fue menor (10.8-15.1%). Un hecho relevante es que las mutaciones concordantes se asociaron con una frecuencia alélica mayor (MAF). Así, en las alteraciones genómicas con  $MAF > 1\%$

se observó una concordancia (72.7%). Esto puede indicar que las variantes detectadas en menor cantidad pueden estar presentes en zonas no incluidas en la biopsia de tejido así como ser más difíciles de detectar en plasma. Cuando se centran en 5 genes representativos de cáncer de mama (TP53, PIK3CA, ERBB2, BRCA1 y 2) la sensibilidad y especificidad fue de 35.7% y 95% respectivamente (146). No obstante este estudio presenta varias limitaciones que son superadas por el estudio MIRROR. En primer lugar utilizan dos plataformas distintas que incluyen diferentes genes por lo que sólo es posible realizar la comparación entre los genes comunes. En segundo lugar se trata de un estudio retrospectivo en el cual la mayoría de las muestras (60%) utilizadas corresponden al tumor primario y finalmente las dos muestras fueron extraídas con diferentes intervalos de tiempo. El intervalo temporal entre la realización de la biopsia y la extracción de sangre puede ser relevante dado que estudios previos han mostrado una concordancia del 100% al obtener las muestras en el mismo momento que baja a un 79% cuando se las muestras son obtenidas en diferentes puntos (147). Para intentar minimizar este sesgo en nuestro estudio, la biopsia tisular y la muestra de plasma se han extraído en un intervalo de tiempo de +/- 15 días y sin haberse administrado tratamiento sistémico entre ambas muestras minimizando de este modo el sesgo temporal

Existen diversas hipótesis que podrían justificar los resultados discordantes entre la biopsia de la metástasis y el plasma. En primer lugar, los métodos de análisis dependen de la detección de cambios genéticos específicos de la célula tumoral y se basan en asumir que el genoma del cáncer no evoluciona hasta un punto en el que puede perder los marcadores capaces de identificarlo. La segunda cuestión que complica más la interpretación es que el ctDNA proviene de células apoptóticas tumorales, mientras que las células viables pueden ser más difíciles de detectar por lo que sería necesaria una mayor sensibilidad de la técnica para su análisis (148). Finalmente, esta discrepancia puede justificarse por factores metodológicos (uso de distintas técnicas de secuenciación con sensibilidades diferentes, bajo número de pacientes estudiados) así como por la heterogeneidad del cáncer de mama.

En nuestro estudio, 3 de las 110 variantes comunes entre tumor primario y metástasis no fueron detectadas en plasma. Por otra parte 13 variantes identificadas en plasma no fueron detectadas en el tumor primario. El hecho de que existan alteraciones genómicas

detectadas utilizando una muestra que no han sido identificadas en la otra indican una heterogeneidad tumoral que no puede ser completamente evaluada utilizando una única muestra. De este modo, nuestros resultados muestran el potencial valor complementario del análisis de tejido y ctDNA para caracterizar con precisión la carga mutacional del tumor y poder seleccionar y predecir la mejor respuesta a la terapia dirigida.

#### **5.4 Análisis de las variantes genéticas encontradas para identificar marcadores de respuesta al tratamientos dirigidos así como mecanismos de resistencia al mismo.**

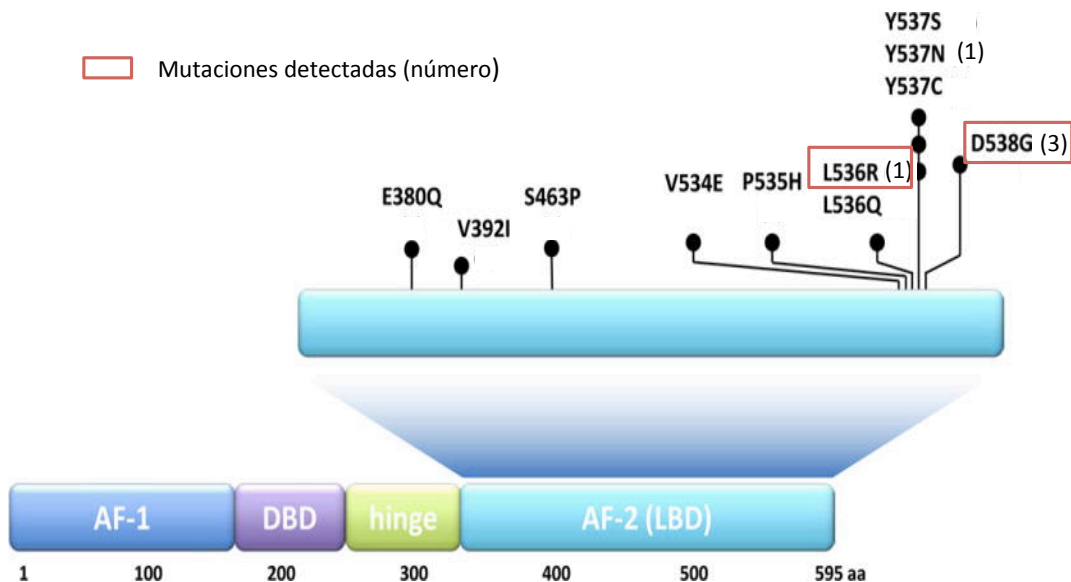
##### **5.4.1 Variantes en el receptor estrogénico (ESR1)**

Los inhibidores de aromatasa (IAs) son uno de los tratamientos más eficaces en cáncer de mama con expresión de receptores hormonales (149). La inhibición de la aromatasa en los tejidos periféricos anula la producción estrogénica y por lo tanto impide la activación del receptor estrogénico. Uno de los mecanismos de resistencia a terapias hormonales más relevantes recientemente descritos han sido las mutaciones del receptor estrogénico (ESR1).

Las mutaciones de ESR1 fueron descritas por primera vez en 1996 en modelos celulares cuando se observó que ocasionan una modificación en el dominio de unión al ligando del receptor estrogénico y conducen a una activación constitutiva del receptor y resistencia a terapias hormonales (150). Sin embargo, estudios posteriores realizados en tumores primarios no identificaron mutaciones de ESR1 por lo que se perdió el interés en su estudio durante más de una década. No fue hasta el año 2013 cuando el análisis por NGS mostró una elevada prevalencia (11-55%) de mutaciones en muestras de cáncer de mama metastásico RE positivo con exposición previa a inhibidores de aromatasa (IAs) (151–154).

Estudios más recientes analizando mutaciones de ESR1 en biopsia líquida de cohortes de pacientes procedentes de ensayos clínicos en cáncer de mama avanzado RE + refractario a IAs sugieren una prevalencia entre el 11-39% (123,155–158). Sin embargo, las mutaciones de ESR1 son excepcionales en tumores primarios sugiriendo que aparecen mediante selección clonal de una población minoritaria de clones

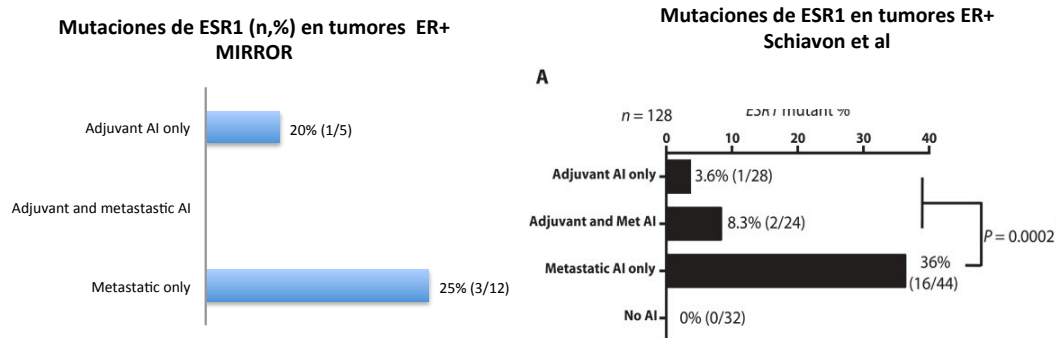
resistentes o adquiridas posteriormente bajo la presión selectiva de terapias endocrinas (159).



**Figura 13. Variantes de ESR1**

Las 5 mutaciones más frecuentes (D538G, E380Q and D537S/N/C) representan más del 80% de las mutaciones de ESR1 (160). En nuestra serie no se identificaron mutaciones de ESR1 en el tumor primario. Sin embargo se han identificado 4 mutaciones en la metástasis y en plasma (3 en D538G, 1 en L536R) (**Figura 13**).

Todas las pacientes habían recibido tratamiento previo con inhibidores de aromatasa, 3 tratamiento con tamoxifeno y una tratamiento con fulvestrant. Al igual que en estudios previos la presencia de mutaciones de ESR1 se asocia con más frecuencia a exposición a IAs en pacientes con metástasis (5/25; 20%) que en adyuvancia (1/26; 3.8%) (**Gráfico 23**) (157)



**Grafico 23.** Mutaciones de ESR1 según momento de exposición a IAs en el estudio MIRROR y Schiavon et al.

Es posible que las mutaciones de ESR1 se seleccionen durante el tratamiento mediante la selección de subclones mutados presentes en escasa cantidad previo a la exposición a la terapia a consecuencia de la heterogeneidad intratumoral y diversidad clonal. La baja carga tumoral de la enfermedad micrometastásica podría justificar la ausencia de selección por el tratamiento y de detección de los subclones mutados en pacientes tratadas durante la adyuvancia y el predominio de detección en etapas avanzadas.

Salvo un caso en el cual se extrajo la muestra tras la progresión a IAs en el resto de las pacientes tanto la biopsia tisular como la muestra de plasma se extrajeron meses después de la exposición al tratamiento. Esto sugiere que una vez seleccionada por la exposición a tratamiento con IAs la mutación de ESR1 puede persistir a lo largo de siguientes tratamientos convirtiéndose en el clon dominante.

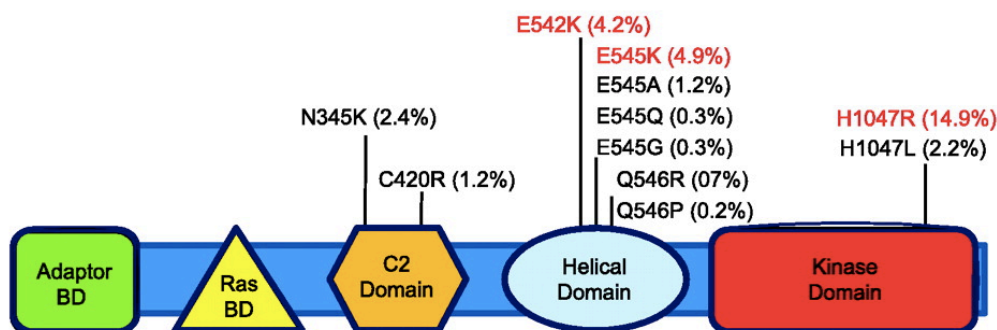
En estudios previos la comparación de mutaciones de ESR1 en DNA tumoral y ctDNA mostró un nivel de concordancia del 97% con el análisis de DNA de tejido contemporáneo con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 100% (161). En nuestra serie, las 4 mutaciones fueron identificadas tanto en el tejido metastásico como en ctDNA.

La determinación de ESR1 podría ser utilizada para seleccionar el tratamiento hormonal más adecuado. Los tumores con estas mutaciones son resistentes a terapias de deprivación estrogénica (supresión ovárica e IAs). Sin embargo, estudios in vitro e in vivo muestran sensibilidad a reguladores negativos del RE como tamoxifeno y degradadores del receptor estrogénico como fulvestrant (162,163). Estos resultados han

sido confirmados en el análisis retrospectivo de pacientes tratadas con fulvestrant o exemestano tras progresión a un IAs no esteroideo. Así, las pacientes con mutaciones de ESR1 tienen mejor supervivencia libre de progresión (SLP) con fulvestrant que con exemestano (HR 0.52, 95% CI 0.3-0.92, p= 0.02) mientras que las pacientes con ESR1 no mutado (wild-type) experimentaron similar SLP tras recibir cualquiera de los dos tratamientos (HR, 1.07; 95% CI, 0.68-1.67; p= 0.77) (164). De este modo, el análisis de mutaciones de ESR1 tanto en tejido como en plasma podría en el futuro ser de utilidad para detectar resistencia al tratamiento y seleccionar el tratamiento hormonal más adecuado.

#### 5.4.2 Variantes de PIK3CA

La vía fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3Ks) incluye una familia de enzimas de señalización intracelular con tres puntos regulatorios fundamentales (PI3K, AKT y m-TOR). PI3K es la vía más frecuentemente alterada en cáncer de mama detectándose mutación y/o amplificación de genes que codifican las subunidades catalíticas p110 (PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD) y la subunidad reguladora p85 (PIK3R1, PIK3R2 y PIK3R3) en el 36% de los casos (165). Aproximadamente el 80% de las mutaciones descritas corresponden a E542K, E545K en el exón 9 y H1047R o H1047L en exón 20 (166). La más frecuente es la mutación H1047R situada en el dominio kinasa de PIK3CA presente en el 14.9% de los tumores primarios de mama (**Figura 14**) . En nuestra serie se observa un porcentaje similar identificándose 7 mutaciones H1047R (70% de las mutaciones en PIK3CA y 17.5% de los tumores analizados).



**Figura 14. Porcentaje de mutaciones en PIK3CA.** Modificado de Kalinsky et al (167).

Estudios retrospectivos han mostrado asociación de las mutaciones de PIK3CA con mejor pronóstico en tumores primarios RE+/HER2- (168). En un meta-análisis de 6 ensayos se observó una correlación entre la presencia de mutaciones de PIK3CA y una mejoría en la supervivencia libre de recidiva (HR 0.72, 95% CI 0.57–0.91; P = 0.006) (169). Sin embargo en cáncer de mama HER2+ las mutaciones en PIK3CA representan un factor pronóstico adverso tanto en etapas iniciales como en estadios avanzados. Así, en un estudio retrospectivo en pacientes tratadas en adyuvancia con trastuzumab y quimioterapia basada en antraciclinas, la presencia de mutación se asoció a una peor supervivencia global (HR 2.14, 95% CI 1.01–4.51; P = 0.046) (170). En pacientes con cáncer de mama avanzado HER2+ tratadas con trastuzumab, la pérdida de PTEN y la mutación en PIK3CA se asociaron a un menor tiempo hasta la progresión y supervivencia global (171).

Estas mutaciones aumentan la actividad PI3K e inducen la transformación celular *in vitro* y la tumorigenicidad *in vivo* cuando están sobreexpresadas en células epiteliales mamarias (172). Sin embargo, la adquisición de mutaciones de PIK3CA no parece ser responsable del desarrollo de resistencia al tratamiento endocrino. Así, en muestras pareadas de 120 pacientes con cáncer de mama tratadas con terapia hormonal, Arthur et al mostraron que el 43% de las pacientes presentaban al menos una mutación en PIK3CA al diagnóstico y 41% en el momento de la recurrencia. Sólo 8% de las pacientes cambiaron el estatus mutacional (4 ganancias y 2 pérdidas) al experimentar recurrencia local, recidiva metastásica o progresión al primer tratamiento hormonal (173). Estos resultados son acordes con los publicados por Schleifman et al que mostraron un 90 y 99% de concordancia para PIK3CA y AKT respectivamente entre el tumor primario y metastásico (174). Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman estos hallazgos habiendo identificado 11 mutaciones de PIK3CA en las metástasis y en el tumor primario sin haber experimentado ganancia mutacional con la progresión.

Con la aparición de fármacos inhibidores de la vía de PI3K/AKT/m-TOR se ha desarrollado de manera paralela un programa de análisis de biomarcadores de activación de esta vía para predecir el beneficio de su administración tanto en biopsia sólida como en plasma. En el análisis de ctDNA mediante PCR digital (ddPCR) de 550 pacientes incluidas en el estudio BOLERO2 el beneficio del inhibidor de m-TOR everolimus se

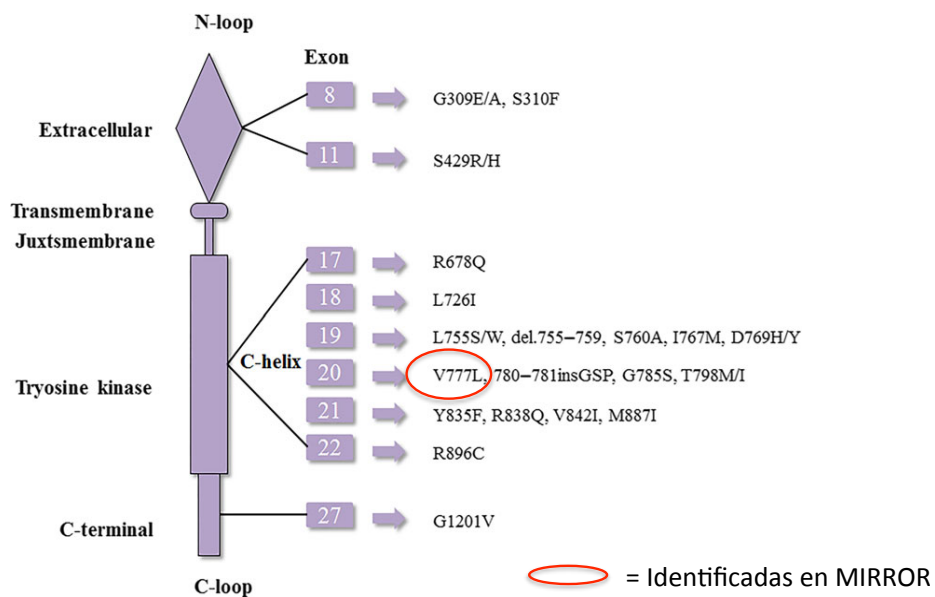
observó tanto en pacientes con PIK3CA mutado o wild-type (HR 0.37 y 0.43 respectivamente). Estos resultados son consistentes con los observados en DNA de tejido archivado mediante NGS (175). Buparlisib es un pan-inhibidor de PI3K cuya actividad ha sido testada en ensayos clínicos en combinación con terapia hormonal y quimioterapia. En el estudio BELLE-2 se randomizaron 1147 pacientes que habían progresado a un tratamiento previo con un inhibidor de aromatasa a recibir fulvestrant + placebo vs fulvestrant + buparlisib. Los objetivos principales del estudio fueron demostrar una mejoría en la SLP en la población general y en el grupo con activación de la vía PI3K. En la población global se observó una mejoría en SLP con la combinación de fulvestrant + buparlisib (6.9 vs 5.0 meses, HR 0.78;  $p < 0.001$ ). Al analizar el grupo de 372 pacientes con activación de la vía PI3KCA en el tejido archivado no se observaron diferencias en la mediana de SLP entre la combinación y la monoterapia hormonal. Sin embargo, en las 200 pacientes con activación de la vía PIK3CA identificada en ctDNA se observó una mejoría significativa en la SLP con la combinación (7.0 vs 3.2 meses, HR 0.64,  $p < 0.001$ ). Por el contrario, las pacientes en las que no se objetivó activación de PIK3CA en ctDNA no experimentaron beneficio con la adición de buparlisib (mediana de SLP de 6.8 meses en ambos brazos de tratamiento). Una posible justificación de esta diferencia en el valor predictivo de las mutaciones de PIK3CA en función de la muestra utilizada es la diferente sensibilidad de la técnica en cada la detección de las mismas (Secuenciación de Sanger para tejido y BEAMING para ctDNA) que explicaría el 21% de discrepancias en la frecuencia mutacional (176). El estudio BELLE-3 ha confirmado estos resultados. Las pacientes fueron randomizadas a recibir fulvestrant + buparlisib o fulvestrant + placebo tras progresión a tratamiento con everolimus. El tratamiento con buparlisib se asoció a una mejoría significativa en la mediana de SLP (3.9 vs 1.8 meses,  $p < 0.001$ ). Se observó mutación en PIK3CA en el 34% de las muestras procedentes del tumor primario y en el 39% de las muestras de ctDNA. Comparado con las pacientes con estatus wild-type, que tuvieron un beneficio modesto del tratamiento con buparlisib, las pacientes con mutación de PIK3CA mejoraron significativamente la SLP frente a placebo (HR 0.39 y 0.46 para el grupo de muestras de tejido y ctDNA respectivamente) (177).

El recientemente presentado estudio SANDPIPER ha mostrado que la combinación del inhibidor selectivo de la isoforma alfa de PI3K3 taselisib con fulvestrant mejora la SLP en pacientes con tumores PIK3CA mutados (178). Estos datos sugieren que el análisis

de las mutaciones de PIK3CA podría ser de utilidad para identificar aquellas pacientes que se beneficien de la administración de tratamiento con terapias dirigidas a esta vía.

### 5.4.3 Variantes de ERBB2

Se han descrito mutaciones de ERBB2 en el 2.4% de los cánceres de mama (179). De acuerdo a la localización en el dominio estructural de ERBB2 las más frecuentes (68%) afectan al dominio tirosina kinasa entre los residuos 755-781 seguido de las localizadas en el dominio extracelular en los residuos 309-310 (20%) (**Figura 15**) (180).



**Figura 15. Mutaciones identificadas en ERBB2.** Modificado de Bose et al (180)

En nuestra serie hemos identificado dos variantes patogénicas/probablemente patogénicas que afectan al dominio tirosina kinasa.

Estas mutaciones pueden ser inhibidas con el inhibidor de la tirosina kinasa de HER2 neratinib. En un reciente estudio fase II que incluyó 22 pacientes portadoras de mutación activadora de ERBB2 se observó un porcentaje de beneficio clínico del 31% y una SLP de 16 semanas (181). Estos datos de actividad han llevado al desarrollo de ensayos clínicos con neratinib en monoterapia y en combinación con otros fármacos en pacientes con mutaciones activadoras de ERBB2 (182). En esta mismo estudio se realizó un análisis de ctDNA plasmático mediante un panel de 70 genes de Guardant Health (Guardant360, [www.guardanthealth.com/guardant360/](http://www.guardanthealth.com/guardant360/)). El análisis de ctDNA

identificó la mutación en 11 de 14 pacientes (sensibilidad 79%; 90% CI 53%-94%) y no se identificó en ninguno de los 32 controles negativos (especificidad 100%; 90% CI 91%-100%). En nuestra serie, hemos identificado dos variantes tanto en plasma como en el tejido tumoral primario y metastásico. En una serie reciente de 1834 pacientes con cáncer de mama avanzado sometidas a análisis de ctDNA por Guardant Health entre octubre 2015 y agosto 2016 se identificaron mutaciones activadoras de ERBB2 en ausencia de amplificación de HER2 en 48 de 1584 pacientes (3%) (182).

De este modo, el análisis de mutaciones de ERBB2 en plasma puede ser útil para seleccionar a pacientes candidatas a terapias dirigidas.

#### 5.4.4 Variantes en BRCA 1/2

Aproximadamente un 7% de los cánceres de mama están relacionados con predisposición hereditaria. La mayoría de los casos están asociados a mutaciones en línea germinal de los genes BRCA1 y 2 con un riesgo acumulado a los 70 años del 57% (95% CI 47-66) para las portadoras de BRCA 1 y del 49% (95% CI 40-57) para las portadoras de BRCA 2 (183,184).

Todas las mutaciones de BRCA 1/2 conocidas están recogidas en la base de datos del National Human Genome Research Institute (NHGRI: [http://www.nhgri.nih.gov/Intramural\\_research/Lab\\_transfer/Bic/](http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/)) siendo las más frecuentes G61C en BRCA1 y I2490T en exón 15 de BRCA2 (185).

Se han identificado 2 variantes patogénicas/probablemente patogénicas de BRCA2 (Arg3128Ter y Lys182fs) en las tres muestras. Adicionalmente, el estudio en línea germinal ha confirmado la presencia de estas variantes. La identificación de mutaciones en BRCA es relevante no sólo desde el punto de vista de asesoramiento genético si no que tiene implicaciones terapéuticas. Los tumores con mutación de BRCA son sensibles a derivados del platino (186) y recientemente han mostrado beneficiarse de la administración de los inhibidores de PARP como olaparib y talazoparib (187,188). Es probable que dada la relevancia terapéutica de la determinación de la mutación de BRCA su análisis se extienda más allá de la línea germinal y sea incorporado de manera

rutinaria durante los próximos años al estudio en tejido y plasma para la identificación de mutaciones somáticas.

#### 5.4.5 Variantes de TP53

Las mutaciones en TP53 son una de las más frecuentes en cáncer estando descritas en aproximadamente un 25% de los casos (165). Habitualmente se concentran en los exones 5-9 y están conservadas entre el tumor primario y metastásico. En nuestra serie se confirman estos resultados identificando mutación de TP53 en 15 biopsias de tumor primario y metastásico. A pesar de que la mutación en TP53 se mantiene en ambas muestras existe una variación importante en el fenotipo tumoral del tumor primario y metastásico en estas pacientes. Así, el fenotipo tumoral del tumor primario en las pacientes con mutación de TP53 fue RH+/HER2- en 5 pacientes, HER2+ en 6 pacientes y triple negativo en 4 pacientes. Sin embargo, en la metástasis, el fenotipo fue HER2+ en 10 pacientes y triple negativo en 5 no identificándose ningún tumor con fenotipo RH+/HER2-. Estos resultados están en la línea de los observados por Meric-Bernstam et al que identificaron mutación de TP53 en el 87.5% de los tumores triple negativo, en el 68.8% de los tumores HER2+ y en el 18.2% de los tumores RH+.

En el plasma se han identificado todas las variantes comunes a tumor primario y metastásico. Otros estudios han mostrado porcentajes similares de concordancia entre tejido y biopsia líquida siendo capaces de identificar mutaciones adicionales en ctDNA no presentes en el tumor primario (189).

Las mutaciones en TP53 se asocian a un pronóstico adverso en tumores RE + pero no en tumores RE-. (190) Esta observación sugiere que p53 puede comportarse como un factor limitante de la señalización del RE en cáncer de mama y con peor respuesta a terapias endocrinas (191). Dado el escaso tamaño muestral y el bajo número identificado de mutaciones de TP53 no es posible evaluar su valor pronóstico en nuestra serie.

Aunque tradicionalmente las mutaciones de TP53 han sido consideradas no accionables, diversos compuestos como el reactivador e inductor de apoptosis masiva 1 (PRIMA-1), 2-sulfonilpirimidinas (PK11007), pirazoles (PK7088), zinc metalochaperona-1 (ZMC1)

han sido capaces de reactivar la proteína mutada p53 adquiriendo propiedades de la forma nativa mostrando actividad antitumoral en modelos preclínicos con p53 mutada (192). De este modo, su identificación podría ser útil para seleccionar pacientes candidatos a terapias dirigidas a reactivación de la acción de TP53.

#### 5.4.6 Variantes de AKT1

Aunque el mecanismo más frecuente de activación de la vía PI3K/AKT/m-Tor es la presencia de mutaciones de PIK3CA, está descrita la amplificación y sobreexpresión de isoformas de AKT así como mutaciones activadoras de AKT en diversas neoplasias (193,194). Independientemente del mecanismo de activación de la vía, todos ellos pasan por AKT como punto central de la misma conduciendo a la pérdida de control en la supervivencia celular, proliferación, angiogénesis, metabolismo e incremento en la capacidad de migración (195).

La mutación somática en el nucleótido 49 ocasiona una sustitución de lisina por glutamina en el aminoácido 17 (Glu17Lys) que conduce a una activación constitutiva de la enzima y al incremento en la fosforilación de AKT independiente de factores estimulantes de crecimiento. En pacientes con cáncer de mama esta mutación presenta frecuencias entre el 1.4% y 8.2% (196,197). Inicialmente su presencia parecía restringida a tumores ductales, lobulillares y con expresión de RE. Igualmente se observó que la presencia de mutaciones en PTEN, PIK3CA y AKT1 fueron mutuamente excluyentes sugiriendo que la activación de la vía de PI3K por cualquiera de estos mecanismos es biológicamente equivalente (198). Sin embargo, estudios recientes han mostrado presencia de mutaciones de AKT1 en carcinomas medulares, RH negativos así como coexistencia con otras alteraciones en la vía de PI3K (197). En nuestra serie hemos identificado una mutación en AKT1 (Glu17Lys) en plasma y biopsia de la metástasis en una paciente diagnosticada de un cáncer de mama triple negativo. Sin embargo, esta mutación no fue identificada en el tumor primario lo que sugiere haber sido adquirida con la progresión de la enfermedad. Este hallazgo puede poner en duda la hipótesis del papel de las mutaciones de AKT en cáncer de mama. Estudios previos sugerían que la activación de AKT confería una ventaja selectiva durante la tumorigénesis precoz en cáncer de mama RE + pero inhibía la diseminación tumoral

durante la progresión justificando la mayor presencia de mutaciones de AKT en etapas precoces que en etapas más avanzadas (196,199).

Actualmente están en marcha ensayos clínicos con diferentes inhibidores e AKT. AZD5363 es un inhibidor potente de AKT que ha demostrado sinergia con fulvestrant en modelos preclínicos lo que ha llevado a la puesta en marcha del estudio fase I FAKTION (NCT01992952) que evalúa la combinación de AZD5363 en combinación con fulvestrant en pacientes con mutación E17K en AKT1. Ipatarsertib es un inhibidor de AKT1 que está siendo desarrollado en cáncer de mama triple negativo. En el estudio fase II LOTUS la adición de ipatasertib a paclitaxel aumentó la SLP frente a placebo tanto en población general (6.2 vs 4.9 meses; HR 0.60) como la población de pacientes con baja expresión de PTEN (6.2 vs 3.7 meses; HR 0.60) . Por lo tanto, la determinación de mutaciones en AKT1 podría ser útil a la hora de identificar pacientes candidatos a inhibidores de la vía PI3K-AKT-mTOR.

#### **5.4.7 Variantes en BRAF**

Las alteraciones en BRAF (amplificaciones, mutaciones, reordenamientos) que conducen a su activación están presentes en sólo un 1.2% de los cánceres de mama asociándose con mayor frecuencia a tumores con fenotipo triple negativo (200). En nuestra serie hemos identificado 1 mutaciones (p.Asp594Asn). Se trata de una mutación adquirida en metástasis y plasma en una paciente con un cáncer de mama primario luminal que evolucionó a triple negativo en la recidiva. La inhibición de BRAF con fármacos como dabrafenib y vemurafenib ha demostrado excelentes resultados en otras neoplasias como melanoma, lo que podría justificar su evaluación en pacientes con cáncer de mama avanzado y mutación de BRAF (201).

#### **5.5 Relevancia clínica de la determinación de mutaciones**

La determinación de mutaciones somáticas para seleccionar el tratamiento en cáncer de mama es compleja y su valor en la práctica clínica es difícil de demostrar. Existe múltiples barreras para la implementación del análisis genómico, como la necesidad de procedimientos invasivos, coste de la realización del test y desconocimiento de las implicaciones clínicas asociadas a las mutaciones. En la **tabla 19** se muestran los genes

más frecuentemente mutados en cáncer de mama relacionados con las potenciales estrategias terapéuticas. No obstante, hasta la fecha únicamente las terapias frente a HER2, PIK3CA e inhibidores de PARP han sido validados en la clínica.

Gen	Pérdida o Ganancia de función	Potenciales implicaciones terapéuticas
TP53	Pérdida	Resistencia a inhibidores de MDM1
PIK3CA	Ganancia	Sensibilidad a inhibidores de PI3K, AKT y m-TOR
MYC	Ganancia	Desconocida
CCND1	Ganancia	Sensibilidad a inhibidores de CDK 4/6
PTEN	Pérdida	Sensibilidad a inhibidores de PI3K, AKT y m-TOR
ERBB2/HER2*	Ganancia	Sensibilidad a agentes anti-HER2
ZN703/FGFR1	Ganancia	Sensibilidad a inhibidores de FGFR
GATA3	Pérdida	Desconocida
RB1	Pérdida	Resistencia a inhibidores de CDK 4/6
BRCA 1 Y 2	Pérdida	Sensibilidad a inhibidores de PARP
MAP3K1	Pérdida	Desconocida

**Tabla 19. Genes más frecuentemente mutados en cáncer de mama y sus posibilidades terapéuticas asociadas.**

Durante los últimos años se han realizado estudios con el objetivo de conocer la aplicabilidad y el valor de la determinación del perfil mutacional en la selección del tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico. En el estudio SAFIR 01 se incluyeron 423 pacientes con cáncer de mama metastásico con lesiones accesibles para biopsia procedentes de 18 centros en Francia. Se obtuvieron 407 muestras siendo posible realizar CGH en 283 (67%) y secuenciación por Sanger en 297 (70%). El objetivo principal fue conocer el porcentaje de pacientes a los que se les podría ofrecer una terapia dirigida. Se identificaron alteraciones genómicas accionables en 195 (46%) de las pacientes, siendo las más frecuentes PIK3CA (74;25%), CCND1 (53;19%) y FGFR1 (36;13%). En 117 (39%) de 297 pacientes se observaron alteraciones genómicas raras (definidas como aquellas que aparecen en menos de 5%) e incluyeron mutaciones de AKT1, EGFR, MDM2, FGFR2, AKT2, IGF1R y amplificaciones de MET. Finalmente se pudo personalizar el tratamiento en 55 (13%) de 423 pacientes. De las 43

pacientes que recibieron terapia dirigida y fueron evaluables para respuesta en el momento del análisis, 4 (9%) tuvieron respuesta objetiva y 9 (21%) estabilización de la enfermedad durante más de 16 semanas (202). En un estudio piloto utilizando cada paciente como su propio control se encontró que un 27% de los pacientes con cualquier tipo de cáncer alcanzaban un 30% de incremento en SLP con el tratamiento dirigido en base al perfil genómico comparado con la SLP del tratamiento recibido previamente (203). No obstante, este potencial beneficio debe ser confirmado mediante ensayos randomizados. Con este objetivo, el estudio SHIVA randomizó a pacientes con cualquier tipo de tumor sólido metastásico refractario a el tratamiento standard a recibir tratamiento según las alteraciones genómicas identificadas o tratamiento a elección del investigador. De los 741 pacientes analizados se identificó al menos una alteración molecular en 293 (40%). Las alteraciones analizadas se agruparon dentro de tres vías (receptores hormonales, PI3K/AKT/mTOR, RAF/MEK) accionables con 11 terapias moleculares disponibles (erlotinib, lapatinib + trasuzumab, sorafenib, imatinib, dasatinib, vemurafenib, everolimus, abiraterona, letrozol, tamoxifeno). No se observó mejoría en la SLP en el grupo de pacientes tratadas con terapia experimental frente a las tratadas con terapia a elección del investigador (2.3 vs 2.0 meses; HR 0.88, p=0.41) (204). Dados estos resultados no se puede recomendar el uso de terapia dirigida según el perfil mutacional fuera de sus indicaciones aprobadas.

### **5.6 Limitaciones y fortalezas del estudio**

La inclusión de pacientes en este estudio ha sido compleja por diferentes motivos:

- 1-Ausencia de tejido de tumor primario en pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante dado que toda la muestra fue utilizada con fines diagnósticos
- 2-Dificultad para la realización de biopsias diagnósticas en determinadas localizaciones metastásicas. A diferencia de determinadas localizaciones como la piel, hígado y determinadas cadenas ganglionares, otras localizaciones metastásicas como pulmón o cerebro están menos representadas dado que sólo son accesibles mediante biopsias quirúrgicas por lo que únicamente se han incluido pacientes sometidas a intervención con finalidad terapéutica.

3-Ausencia de material tras la utilización de tejido de la biopsia de la enfermedad metastásica con finalidad diagnóstica.

4-Criterios estrictos para el procesamiento de la muestra de sangre tras su extracción. Aunque en el protocolo inicial no se estableció un tiempo máximo entre la extracción de la muestra de sangre y su procesamiento cuando se llevaban incluidas 60 pacientes y previo a cualquier análisis, GENOMICA SAU estableció un margen temporal máximo de 4 horas lo que no permitió el análisis de algunas muestras.

Entre las limitaciones del estudio se encuentra el escaso tamaño muestral, la inclusión de pacientes con diferente número de recidivas/progresiones previas, la elección de las pacientes en función de la accesibilidad de la lesión metastásica que podría suponer un sesgo en la selección de las pacientes y la heterogeneidad de los subtipos tumorales incluidos.

Entre las fortalezas se encuentra la utilización de criterios estrictos de selección y la utilización de metodología rigurosa de análisis, la realización de la biopsia y la extracción de sangre en el mismo margen de tiempo evitando exposición a fármacos que podrían enmascarar los resultados.

# CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES

1. Existe una elevada concordancia de las alteraciones genómicas identificadas por NGS entre el tumor primario y sus metástasis.
2. La determinación de alteraciones genómicas en tejido de las metástasis permite identificar variantes no presentes en el tumor primario
3. Las variantes identificadas en el tejido de las metástasis no presentes en el tumor primario pueden aparecer como mecanismo de resistencia tras exposición a determinados tratamientos.
4. El perfil mutacional difiere en función del fenotipo tumoral tanto en el tumor primario como en las metástasis
5. La determinación de alteraciones genómicas en ctDNA mediante la tecnología de Ion Torrent tiene una elevada sensibilidad, siendo capaz de detectar la mayoría de las variantes presentes en el tumor primario y metastásico
6. La elevada concordancia del ctDNA y las biopsias de tejido en cáncer de mama sugieren que el ctDNA podría ser utilizado para estratificar a las pacientes con finalidad pronóstica y predictiva de respuesta.

# BIBLIOGRAFÍA

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016 ;66(1):7–30.
2. Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, et al. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol*. 2010;21(3):30-36.
3. Proyecto El Álamo III. Encuesta de evolución de pacientes con cáncer de mama en hospitales del grupo GEICAM 1998-2001. 2014.
4. Carneiro BA, Costa R, Taxter T, et al. Is Personalized Medicine Here?. *Oncol Williston Park N*. 2016;30(4):293–303.
5. Zardavas D, Baselga J, Piccart M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(4):191–210.
6. Biankin AV, Piantadosi S, Hollingsworth SJ. Patient-centric trials for therapeutic development in precision oncology. *Nature*. 2015;526(7573):361–70.
7. Sinn H-P, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care Basel Switz*. 2013;8(2):149–54.
8. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(9):1046–52.
9. Huober J, Gelber S, Goldhirsch A, et al. Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. *Ann Oncol*. 2012;23(11):2843–51.
10. Tan PH, Ellis IO. Myoepithelial and epithelial-myoepithelial, mesenchymal and fibroepithelial breast lesions: updates from the WHO Classification of Tumours of the Breast 2012. *J Clin Pathol*. 2013;66(6):465–70.
11. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
12. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(14):8418–23.
13. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869–74.

14. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10393–8.
15. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):68.
16. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750–67.
17. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, et al. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer*. 2015;121(1):8–16.
18. Curtis C, Shah SP, Chin S-F, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346–52.
19. Russnes HG, Navin N, Hicks J, et al. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3810–8.
20. Walerych D, Napoli M, Collavin L, et al. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(11):2007–17.
21. Zardavas D, Phillips WA, Loi S. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data. *Breast Cancer Res*. 2014;16(1):201.
22. Usary J, Llaca V, Karaca G, et al. Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene*. 2004;23(46):7669–78.
23. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012;486(7403):400–4.
24. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*. 2012;486(7403):405–9.
25. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61–70.
26. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23–8.
27. Haynes B, Sarma A, Nangia-Makker P, et al. Breast cancer complexity: implications of intratumoral heterogeneity in clinical management. *Cancer Metastasis Rev*. 2017; 36(3):547-55
28. Geyer FC, Weigelt B, Natrajan R, et al. Molecular analysis reveals a genetic

basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas. *J Pathol.* 2010 ;220(5):562–73.

29. Patani N, Barbashina V, Lambros MBK, et al. Direct evidence for concurrent morphological and genetic heterogeneity in an invasive ductal carcinoma of triple-negative phenotype. *J Clin Pathol.* 2011;64(9):822–8.

30. Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, et al. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome Res.* 2010;20(1):68–80.

31. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(5):323–34.

32. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell.* 2012;149(5):979–93.

33. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell.* 2012;149(5):994–1007.

34. Balko JM, Giltane JM, Wang K, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov.* 2014;4(2):232–45.

35. Miron A, Varadi M, Carrasco D, et al. PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas. *Cancer Res.* 2010;70(14):5674–8.

36. Heselmeyer-Haddad K, Berroa Garcia LY, Bradley A, et al. Single-cell genetic analysis of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer reveals enormous tumor heterogeneity yet conserved genomic imbalances and gain of MYC during progression. *Am J Pathol.* 2012;181(5):1807–22.

37. Kuukasjärvi T, Karhu R, Tanner M, et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res.* 1997;57(8):1597–604.

38. Shah SP, Morin RD, Khattra J, et al. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature.* 2009;461(7265):809–13.

39. Ding L, Ellis MJ, Li S, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature.* 2010;464(7291):999–1005.

40. Desmedt C, Brown D, Szekely D, et al. Unraveling breast cancer progression through geographical and temporal sequencing. *Cancer Research.* 2014;74(19):986.

41. Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature.* 2011;472(7341):90–4.

42. Navin NE. The first five years of single-cell cancer genomics and beyond.

Genome Res. 2015;25(10):1499–507.

43. Navin NE. Delineating cancer evolution with single-cell sequencing. *Sci Transl Med.* 2015;7(296):296.

44. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature.* 1975;255(5505):197–200.

45. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(4):1157–67.

46. Bross ID, Viadana E, Pickren J. Do generalized metastases occur directly from the primary? *J Chronic Dis.* 1975;28(3):149–59.

47. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):302–12.

48. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61–70.

49. Ding L, Ellis MJ, Li S, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature.* 2010;464(7291):999–1005.

50. Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature.* 2012;486(7403):395–9.

51. Ellis MJ, Ding L, Shen D, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature.* 2012;486(7403):353–60.

52. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature.* 2012;486(7403):405–9.

53. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature.* 2012;486(7403):400–4.

54. Curtis C, Shah SP, Chin S-F, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012;486(7403):346–52.

55. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature.* 2016;534(7605):47–54.

56. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142(3–4):241–3.

57. Lo YMD, Chiu RWK. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:285–306.

58. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor

dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985–90.

59. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;32(6):579–86.

60. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(16):9236–41.

61. Dressman D, Yan H, Traverso G, et al. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):8817–22.

62. Liu Q, Sommer SS. Pyrophosphorolysis-activated polymerization (PAP): application to allele-specific amplification. *BioTechniques.* 2000;29(5):1072–1076.

63. Delgado PO, Alves BCA, Gehrke F de S, et al. Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumour Biol J.* 2013;34(2):983–6.

64. Hashad D, Sorour A, Ghazal A, et al. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *J Clin Lab Anal.* 2012;26(6):467–72.

65. No JH, Kim K, Park KH, et al. Cell-free DNA level as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2012;32(8):3467–71.

66. Schwarzenbach H, Alix-Panabières C, Müller I, et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):1032–8.

67. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61(4):1659–65.

68. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980;284(5756):555–6.

69. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PloS One.* 2011;6(9):e23418.

70. De Mattos-Arruda L, Rodon J. Pilot studies for personalized cancer medicine: focusing on the patient for treatment selection. *The Oncologist.* 2013;18(11):1180–8.

71. Rothé F, Laes J-F, Lambrechts D, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Ann Oncol.* 2014;25(10):1959–65.

72. André F, Bachelot T, Commo F, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre,

- prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol.* 2014;15(3):267–74.
73. Arnedos M, Soria J-C, Andre F, et al. Personalized treatments of cancer patients: a reality in daily practice, a costly dream or a shared vision of the future from the oncology community? *Cancer Treat Rev.* 2014;40(10):1192–8.
74. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, et al. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature.* 2013;501(7467):355–64.
75. Meric-Bernstam F, Brusco L, Shaw K, et al. Feasibility of Large-Scale Genomic Testing to Facilitate Enrollment Onto Genomically Matched Clinical Trials. *J Clin Oncol.* 2015;33(25):2753–62.
76. Dienstmann R, Serpico D, Rodon J, et al. Molecular profiling of patients with colorectal cancer and matched targeted therapy in phase I clinical trials. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(9):2062–71.
77. Le Tourneau C, Delord J-P, Gonçalves A, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(13):1324–34.
78. Janku F, Angenendt P, Tsimberidou AM, et al. Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget.* 2015;6(14):12809–21.
79. Murtaza M, Dawson S-J, Pogrebniak K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat Commun.* 2015;6:8760.
80. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(13):1199–209.
81. Murtaza M, Dawson S-J, Pogrebniak K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat Commun.* 2015;6:8760.
82. Cui J, Germer K, Wu T, et al. Cross-talk between HER2 and MED1 regulates tamoxifen resistance of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2012;72(21):5625–34.
83. Nagalingam A, Tighiouart M, Ryden L, et al. Med1 plays a critical role in the development of tamoxifen resistance. *Carcinogenesis.* 2012;33(4):918–30.
84. Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, et al. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res.* 2009;69(17):6871–8.
85. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, et al. D538G mutation in

estrogen receptor- $\alpha$ : A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res.* 2013;73(23):6856–64.

86. Robinson DR, Wu Y-M, Vats P, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet.* 2013;45(12):1446–51.

87. Fribbens C, O’Leary B, Kilburn L, et al. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2016 ;34(25):2961–8.

88. Bardia A, Iafrate JA, Sundaresan T, et al. Metastatic Breast Cancer With ESR1 Mutation: Clinical Management Considerations From the Molecular and Precision Medicine (MAP) Tumor Board at Massachusetts General Hospital. *The Oncologist.* 2016;21(9):1035–40.

89. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(10):2643–50.

90. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015;7(302):302ra133.

91. Olsson E, Winter C, George A, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol Med.* 2015;7(8):1034–47.

92. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014 ;6(224):224ra24.

93. De Mattos-Arruda L, Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol Oncol.* 2016 Mar;10(3):464–74.

94. Yates LR, Gerstung M, Knappskog S, et al. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat Med.* 2015;21(7):751–9.

95. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun.* 2015;6:8839.

96. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol.* 2018;36(16):1631–41.

97. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update.

J Clin Oncol. 2013;31(31):3997–4013.

98. Balko JM, Stricker TP, Arteaga CL. The genomic map of breast cancer: which roads lead to better targeted therapies? *Breast Cancer Res* 2013;15(4):209.

99. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–24.

100. Hyman DM, Taylor BS, Baselga J. Implementing Genome-Driven Oncology. *Cell*. 2017;168(4):584–99.

101. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883–92.

102. Yates LR, Gerstung M, Knappskog S, et al. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat Med*. 2015;21(7):751–9.

103. Turajlic S, Swanton C. Metastasis as an evolutionary process. *Science*. 2016;352(6282):169–75.

104. Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, et al. A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer*. 2014;50(2):277–89.

105. Finn RS, Martin M, Rugo HS, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016 17;375(20):1925–36.

106. Swain SM, Baselga J, Kim S-B, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(8):724–34.

107. Simmons C, Miller N, Geddie W, et al. Does confirmatory tumor biopsy alter the management of breast cancer patients with distant metastases?. *Ann Oncol* 2009;20(9):1499–504.

108. Amir E, Miller N, Geddie W, et al. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(6):587–92.

109. Lindström LS, Karlsson E, Wilking UM, et al. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol*. 2012;30(21):2601–8.

110. Jensen JD, Knoop A, Ewertz M, et al. ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(2):511–21.
111. Heitz F, Barinoff J, du Bois O, et al. Differences in the receptor status between primary and recurrent breast cancer--the frequency of and the reasons for discordance. *Oncology.* 2013;84(6):319–25.
112. Curtit E, Nerich V, Mansi L, et al. Discordances in estrogen receptor status, progesterone receptor status, and HER2 status between primary breast cancer and metastasis. *The Oncologist.* 2013;18(6):667–74.
113. Aurilio G, Monfardini L, Rizzo S, et al. Discordant hormone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status in bone metastases compared to primary breast cancer. *Acta Oncol Stockh Swed.* 2013;52(8):1649–56.
114. Ibrahim T, Farolfi A, Scarpi E, et al. Hormonal receptor, human epidermal growth factor receptor-2, and Ki67 discordance between primary breast cancer and paired metastases: clinical impact. *Oncology.* 2013;84(3):150–7.
115. Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, et al. A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer.* 2014;50(2):277–89.
116. Yang Y-F, Liao Y-Y, Yang M, et al. Discordances in ER, PR and HER2 receptors between primary and recurrent/metastatic lesions and their impact on survival in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2014;31(10):214.
117. Qu Q, Zong Y, Fei X, et al. The importance of biopsy in clinically diagnosed metastatic lesions in patients with breast cancer. *World J Surg Oncol.* 2014 ;12:93.
118. Yates LR, Knappskog S, Wedge D, et al. Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse. *Cancer Cell.* 2017;32(2):169–184.e7.
119. Goswami RS, Patel KP, Singh RR, et al. Hotspot mutation panel testing reveals clonal evolution in a study of 265 paired primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res.* 2015;21(11):2644–51.
120. Bertucci F, Finetti P, Guille A, et al. Comparative genomic analysis of primary tumors and metastases in breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(19):27208–19.
121. Meric-Bernstam F, Frampton GM, Ferrer-Lozano J, et al. Concordance of genomic alterations between primary and recurrent breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(5):1382–9.

122. Fujii T, Matsuda N, Kono M, et al. Prior systemic treatment increased the incidence of somatic mutations in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 2018;89:64–71.
123. Fribbens C, O’Leary B, Kilburn L, et al. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2016 ;34(25):2961–8.
124. 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*. 2014;25(9):1729–35.
125. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Horswell S, et al. Detection of ubiquitous and heterogeneous mutations in cell-free DNA from patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(5):862–7.
126. de Bruin EC, McGranahan N, Mitter R, et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science*. 2014 ;346(6206):251–6.
127. Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*. 2014;346(6206):256–9.
128. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(28):3375–82.
129. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med*. 2015;21(7):795–801.
130. Yi Z, Ma F, Li C, et al. Landscape of somatic mutations in different subtypes of advanced breast cancer with circulating tumor DNA analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):5995.
131. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(313):313ra182.
132. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, et al. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(8):1014–22.
133. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*. 2014

;20(4):430–5.

134. Kuo Y-B, Chen J-S, Fan C-W, et al. Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clin Chim Acta*. 2014;433:284–9.

135. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(28):3375–82.

136. Tie J, Kinde I, Wang Y, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1715–22.

137. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, et al. Corrigendum: Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun*. 2016;7:13513.

138. Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, et al. Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA Oncol*. 2015;1(2):149–57.

139. Reck M, Hagiwara K, Han B, et al. ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with Advanced NSCLC: The ASSESS Study. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1682–9.

140. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol*. 2014;9(9):1345–53.

141. Janku F, Angenendt P, Tsimberidou AM, et al. Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget*. 2015;6(14):12809–21.

142. Kim ST, Lee W-S, Lanman RB, et al. Prospective blinded study of somatic mutation detection in cell-free DNA utilizing a targeted 54-gene next generation sequencing panel in metastatic solid tumor patients. *Oncotarget*. 2015;6(37):40360–9.

143. Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, et al. 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*. 2015;9(4):783–90.

144. 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*. 2014;25(9):1729–35.

145. Rothé F, Laes J-F, Lambrechts D, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Ann Oncol* 1. 2014;25(10):1959–65.
146. Chae YK, Davis AA, Jain S, et al. Concordance of Genomic Alterations by Next-Generation Sequencing in Tumor Tissue versus Circulating Tumor DNA in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(7):1412–20.
147. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3462–9.
148. Castle J, Shaker H, Morris K, et al. The significance of circulating tumour cells in breast cancer: a review. *Breast*. 2014;23(5):552–60.
149. Cardoso F, Costa A, Senkus E, et al. 3rd ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). *Ann Oncol*. 2017;28(1):16–33.
150. Weis KE, Ekena K, Thomas JA, et al. Constitutively active human estrogen receptors containing amino acid substitutions for tyrosine 537 in the receptor protein. *Mol Endocrinol*. 1996;10(11):1388–98.
151. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, et al. Emergence of constitutively active estrogen receptor- $\alpha$  mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(7):1757–67.
152. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, et al. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(10):573–83.
153. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, et al. D538G mutation in estrogen receptor- $\alpha$ : A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res*. 2013;73(23):6856–64.
154. Toy W, Shen Y, Won H, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet*. 2013;45(12):1439–45.
155. Chandarlapaty S, Chen D, He W, et al. Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2016;2(10):1310–5.
156. Clatot F, Perdrix A, Augusto L, et al. Kinetics, prognostic and predictive values of ESR1 circulating mutations in metastatic breast cancer patients progressing on aromatase inhibitor. *Oncotarget*. 2016;7(46):74448–59.
157. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast

- cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(313):313ra182.
158. Spoerke JM, Gendreau S, Walter K, et al. Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant. *Nat Commun*. 2016;7:11579.
159. Reinert T, Saad ED, Barrios CH, et al. Clinical Implications of ESR1 Mutations in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *Front Oncol*. 2017;7:26.
160. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, et al. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(10):573–83.
161. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(313):313ra182.
162. Schiff R, Massarweh S, Shou J, et al. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res*. 2003;9:447–54.
163. Li S, Shen D, Shao J, et al. Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. *Cell Rep*. 2013;4(6):1116–30.
164. Fribbens C, O’Leary B, Kilburn L, et al. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(25):2961–8.
165. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):61–70.
166. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4452–61.
167. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(16):5049–59.
168. Loi S, Haibe-Kains B, Majjaj S, et al. PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(22):10208–13.
169. Liu Y-R, Jiang Y-Z, Zuo W-J, et al. PIK3CA mutations define favorable prognostic biomarkers in operable breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *OncoTargets Ther*. 2014;7:543–52.
170. Jensen JD, Knoop A, Laenkholm AV, et al. PIK3CA mutations, PTEN, and

pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol.* 2012 ;23(8):2034–42.

171. Razis E, Bobos M, Kotoula V, et al. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(2):447–56.

172. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene.* 2008;27(41):5486–96.

173. Arthur LM, Turnbull AK, Renshaw L, et al. Changes in PIK3CA mutation status are not associated with recurrence, metastatic disease or progression in endocrine-treated breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;147(1):211–9.

174. Schleifman EB, Desai R, Spoerke JM, et al. Targeted biomarker profiling of matched primary and metastatic estrogen receptor positive breast cancers. *PloS One.* 2014;9(2):e88401.

175. Moynahan ME, Chen D, He W, Sung P, et al. Correlation between PIK3CA mutations in cell-free DNA and everolimus efficacy in HR(+), HER2(-) advanced breast cancer: results from BOLERO-2. *Br J Cancer.* 2017;116(6):726–30.

176. Baselga J, Im S-A, H I, et al. PIK3CA status in circulating tumor DNA predicts efficacy of buparlisib plus fulvestrant in postmenopausal women with endocrine-resistant HER+/HER2- advanced breast cancer: First results from the randomized, phase III BELLE-2 trial. Presented at: San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) 2015. Abstract S6-01.

177. Di Leo A, K SL, Ciruelos E. BELLE-3: A phase III study of buparlisib + fulvestrant in postmenopausal women with HR+, HER2-, aromatase inhibitor-treated, locally advanced or metastatic breast cancer, who progressed on or after mTOR inhibitor-based treatment. Presented at: San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) 2016. Abstract S4-07.

178. Baselga J, Cortés J, DeLaurentiis M, et al. SANDPIPER: Phase III study of the PI3-kinase (PI3K) inhibitor tselisib (GDC-0032) plus fulvestrant in patients (pts) with estrogen receptor (ER)-positive, HER2-negative locally advanced or metastatic breast cancer (BC) enriched for pts with PIK3CA-mutant tumors. *J Clin Oncol.* 2017 ;35(15\_suppl):TPS1119

179. Sun Z, Shi Y, Shen Y, Cao L, et al. Analysis of different HER2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. *J Cell Mol Med.* 2015;19(12):2691–701.

180. Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov.* 2013;3(2):224–37.
181. Ma CX, Bose R, Gao F, Freedman RA, et al. Neratinib Efficacy and Circulating Tumor DNA Detection of HER2 Mutations in HER2 Nonamplified Metastatic Breast Cancer. 2017;23(19):5687-95.
182. Ma CX, Bose R, F G, et al. Phase II trial of neratinib for HER2 mutated, non-amplified metastatic breast cancer (HER2mut MBC). *J Clin Oncol.* 2016;34(15\_suppl):516.
183. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007;25(11):1329–33.
184. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA.* 2017 20;317(23):2402–16.
185. Bayraktar S, Arun B. BRCA mutation genetic testing implications in the United States. *Breast.* 2017;31:224–32.
186. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nat Med.* 2018;24(5):628–37.
187. Robson M, Im S-A, Senkus E, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med.* 2017;377(6):523–33.
188. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, et al. A phase 3 trial comparing talazoparib, an oral PARP inhibitor, to physician’s choice of therapy in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA-mutation. Presented at: San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) 2017; Abstract S6-07.
189. Nakauchi C, Kagara N, Shimazu K, et al. Detection of TP53/PIK3CA Mutations in Cell-Free Plasma DNA From Metastatic Breast Cancer Patients Using Next Generation Sequencing. *Clin Breast Cancer.* 2016;16(5):418–23.
190. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(4):1157–67.
191. Fernández-Cuesta L, Anaganti S, Hainaut P, et al. Estrogen levels act as a rheostat on p53 levels and modulate p53-dependent responses in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(1):35–42.
192. Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment.

Eur J Cancer. 2017;83:258–65.

193. Carpten JD, Faber AL, Horn C, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007;448(7152):439–44.

194. Kim MS, Jeong EG, Yoo NJ, et al. Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Br J Cancer*. 2008;98(9):1533–5.

195. Vogiatzi P, Giordano A. Following the tracks of AKT1 gene. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(10):1521–4.

196. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6084–91.

197. Rudolph M, Anzeneder T, Schulz A, et al. AKT1 (E17K) mutation profiling in breast cancer: prevalence, concurrent oncogenic alterations, and blood-based detection. *BMC Cancer*. 2016 11;16:622.

198. Saal LH, Holm K, Maurer M, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65(7):2554–9.

199. Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, et al. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res*. 2004;64(9):3171–8.

200. Albanell J, Elvin JA, Ali SM, et al. BRAF: An emerging target for triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35(15\_suppl):1099–1099.

201. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med*. 2015;372(1):30–9.

202. André F, Bachelot T, Commo F, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol*. 2014;15(3):267–74.

203. Von Hoff DD, Stephenson JJ, Rosen P, et al. Pilot study using molecular profiling of patients' tumors to find potential targets and select treatments for their refractory cancers. *J Clin Oncol*. 2010;28(33):4877–83.

204. Le Tourneau C, Delord J-P, Gonçalves A, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(13):1324–34.

# ANEXOS

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo 1. Aprobación por el comité ético del Hospital Gregorio Marañón



Hospital General Universitario  
Gregorio Marañón  
Comunidad de Madrid



#### DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. Fernando Díaz Otero, Secretario del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**  
**HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN**

#### CERTIFICA

Que se ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**Código** GOMHGUGM092013

**TÍTULO:** "Caracterización y comparación de mutaciones en tumores primarios, tejido metastásico, células tumorales circulantes y DNA circulante en pacientes de cáncer de mama metastásico"

**Protocolo** versión 3.0. **Hoja de Información al paciente y Consentimiento Informado** versión 2.0.

**Promotor:** Investigador

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Además, el citado CEIC cumple las normas de BPC (CPMP / ICH / 135 / 95).

Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado por el investigador principal:

Dr. Miguel Martín Jiménez / Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Lo que firmo en Madrid, a 30 de octubre de 2013

Fdo.: Dr. Fernando Díaz Otero

273/13

C/ Dr. Esquerdo 46, Pabellón de Gobierno, Planta baja, 28007 Madrid  
[ceic.hugm@salud.madrid.org](mailto:ceic.hugm@salud.madrid.org) Tel. 91 586 7007 – Fax. 91 400 8156

## 8.2 Anexo 2. Aprobación por el comité ético del Hospital Clínico San Carlos



CEIC Area 7 - Hospital Clínico San Carlos

### COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

**DÑA M<sup>a</sup> DEL MAR GARCÍA ARENILLAS**, SECRETARIA DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID.

#### CERTIFICA

Que se ha recibido el proyecto: **“CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE MUTACIONES EN TUMORES PRIMARIOS, TEJIDO METASTÁSICO, CELULAS TUMORALES CIRCULANTES Y DNA CIRCULANTE EN PACIENTES DE CANCER DE MAMA METASTÁSICO”**, con código interno nº 14/036-E, cuyo promotor es el Dr. Miguel Martín y el investigador principal es el **Dr. Fernando Moreno Antón**, del Servicio de Oncología del Hospital Clínico San Carlos.

Que la documentación requerida es la adecuada.

Que dentro de la documentación, se incluye el informe favorable del CEIC Hospital General Universitario Gregorio Marañón, con fecha 30 de octubre de 2013, por ello el Ceic del Hospital Clínico San Carlos, **informa favorablemente** sobre la realización de dicho Proyecto.

Que se procede al registro de la documentación recibida, para realizar el posterior seguimiento del mismo.

Lo que firmo en Madrid, a 06 de febrero de 2014



Fdo: Dra. Mar García Arenillas  
Secretaria del CEIC Area 7 - Hospital Clínico San Carlos

### 8.3. Anexo 3. Aprobacion por el comité de investigación del Hospital Infanta Cristina de Parla



**DE:** COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN. HOSPITAL UNIVERSITARIO INFANTA CRISTINA

**A:** CORALIA BUENO MUIÑO

La Comisión de Investigación del Hospital Universitario Infanta Cristina de Parla, en su reunión del día 1 de julio de 2015, Acta nº 35, acordó:

APROBAR                       RECHAZAR

SOLICITAR LAS SIGUIENTES ACLARACIONES:

(La respuesta a esta información deberá remitirse a [investigacion.hsur@salud.madrid.org](mailto:investigacion.hsur@salud.madrid.org) en un plazo máximo de 30 días. De no recibir contestación en el plazo señalado, se emitirá un informe de rechazo.)

**El estudio titulado:** 161/2015. Caracterización y comparación de mutaciones en tumor primario, tejido metastásico, células tumorales circulantes y DNA circulante en pacientes de cáncer de mama metastásico. Código estudio gom-hgugm-092013.

Parla, a 2 de julio de 2015

Firmado: Dr. Juan José Granizo Martínez  
 Presidente Comisión Investigación  
 Hospital Universitario Infanta Cristina

## 8.4 Anexo 4. Consentimiento informado del estudio



Hospital General Universitario  
Gregorio Marañón

Comunidad de Madrid

**HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**“CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE MUTACIONES EN TUMOR PRIMARIO, TEJIDO METASTÁSICO, CELULAS TUMORALES CIRCULANTES Y DNA CIRCULANTE EN PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO”**

**Código Estudio GOM-HGUGM-092013**

**Centro: HGU Gregorio Marañón**

**Investigador Principal:**

Este formulario forma parte del proceso del consentimiento informado. Usted no tiene por qué tomar parte en este estudio si no lo desea, y su atención médica no va a depender del hecho de que tome parte en él o no. Este estudio podría no ayudarle directamente a usted, pero esperamos que nos permitan ampliar nuestros conocimientos para poder ayudar a otras pacientes en el futuro.

### INFORMACIÓN GENERAL

Desde un punto de vista farmacológico, las variaciones genéticas interindividuales pueden explicar las diferencias encontradas en la respuesta a tratamiento o la aparición de diferentes respuestas tóxicas a un tratamiento farmacológico determinado. De ahí, que una de las metas dentro de la genética molecular es conocer la relación que existe entre variación genética (o polimorfismo) y tratamiento que nos permita predecir la respuesta de cada individuo, de modo que cada paciente sea tratado con el fármaco más eficaz y con menos toxicidad en base a su perfil genético.

Por ello, solicitamos su colaboración en este estudio farmacogenético en el que analizaremos el perfil genético de muestras de procedentes del tumor primario y del tejido metastásico en tejido tumoral y sangre (CTCs y DNA circulante) de pacientes de cáncer de mama que hayan desarrollado metástasis como usted. Pretendemos confirmar la presencia de alteraciones genómicas relevantes en el tejido metastásico que no estaban presentes en el tejido tumoral primario y, además, optimizar una nueva técnica accesible y no invasiva para el análisis genómico en muestras de sangre.

### DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los objetivos de este estudio son estudiar e identificar cambios que ocurren en los genes en pacientes con cáncer de mama que hayan desarrollado metástasis, de forma que en un futuro próximo podamos seleccionar mejor a las pacientes candidatas a determinados tratamientos.

Para ello se compararán los perfiles genómicos entre muestras del tumor primario, de las metástasis y del DNA circulante, para una misma paciente y dentro de un grupo amplio de pacientes de cáncer de mama.

Se utilizará una pequeña parte de las muestras de sangre obtenida en uno de los análisis de control rutinario de su enfermedad. La muestra de tejido se tomará del excedente de las biopsias del tumor primario y de las metástasis realizadas para su diagnóstico y sin que esto pueda en ningún momento comprometerlo.

Código Estudio GOM-HGUGM-092013 Versión 2.0

1 de 5



### **BENEFICIOS POTENCIALES, INDIVIDUALES Y COLECTIVOS**

Este estudio permitirá obtener información para poder plantear estudios en el futuro con el fin de realizar una terapia individualizada para cada paciente como reto de la "medicina personalizada".

Como la mayoría de los casos, pueden no existir beneficios potenciales para usted por su participación en este estudio. Sin embargo, un mayor conocimiento de los factores en el desarrollo del cáncer de mama, podrá facilitar que se administre en un futuro un tratamiento individual para cada paciente, que minimice el impacto de los efectos secundarios y aumente las probabilidades de éxito del mismo.

### **POSIBLES RIESGO PERSONALES**

La toma de **muestras de su sangre** se hará de forma similar a otros análisis de sangre que a usted le hayan sido realizados. Para minimizar las molestias, la muestra se obtendrá de una venopunción realizada para las determinaciones analíticas de rutina.

Como probablemente conoce, la extracción puede provocar una ligera molestia en el punto en que la aguja se introduce en la piel y, a veces, le puede formar un pequeño hematoma que suele desaparecer en pocos días. En algún caso aislado, puede producirse un breve mareo o sudoración durante la extracción de sangre o al retirar la aguja.

En la recogida de **muestra de tejido**, el único riesgo médico, es el riesgo asociado a la propia toma de una biopsia tumoral, que se realizará con aguja de trucut antes de iniciar el tratamiento o para la constatación del proceso metastásico (por indicación médica). Requerirá, previa anestesia local, una incisión cutánea con bisturí de aproximadamente ½ cm para permitir el paso de la aguja de trucut. Este procedimiento es usualmente indoloro. Aunque se procederá a hemostasia por aplicación de hielo, en ocasiones este procedimiento puede generar equimosis locales que se resuelven espontáneamente.

### **VOLUNTARIEDAD DE LA PARTICIPACIÓN Y POSIBILIDAD DE RETIRADA**

Su participación en este estudio es voluntaria. Si decidiera usted participar pero luego cambiara de opinión, sería libre de hacerlo así, sin tener que dar ningún tipo de explicación. No obstante de ser así, deberá comunicárselo a su médico, quien se ocupará de que las muestras de sangre obtenidas sean destruidas.

### **PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO**

Si usted decide participar sólo tendrá que otorgar su consentimiento.

### **MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras, desde el momento de su extracción, estarán anonimizadas e identificadas con un código de números y letras que no permitirán su identificación salvo al investigador principal y al equipo investigador del estudio. Ni su nombre ni sus iniciales o número de historia médica aparecerán en las bases de datos que genere el estudio.

Las muestras obtenidas serán almacenadas en el centro del Investigador Principal, Dr. Miguel Martín Jiménez, ubicado en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, aunque pueden ser enviadas



a otros centros para su análisis siendo en todo momento devueltas al HGUGM a la finalización de los mismos.

Atendiendo al destino de las muestras cuando finalice el estudio, se le informa de que se solicita su consentimiento para que las muestras sean almacenadas y puedan integrarse en la **colección C.0000188** ("Investigación en Cáncer", Registro de Colección de Muestras del ISCIII) y ubicada en el HGUGM de manera permanente como parte de un conjunto de muestras prospectivas del cáncer de mama únicamente con fines de investigación biomédica. La base de datos se haya debidamente registrada en la Agencia Española de Protección de Datos

Usted tiene derecho a retirar su consentimiento para que las muestras sean almacenadas e integradas una vez haya finalizado el proyecto de investigación inicial. Los efectos de esta revocación será la destrucción de las mismas.

En el caso de que sus muestras se incorporen a la colección C.0000188 y de que se produzca un eventual cierre del mismo, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica.

Sus datos personales se tratarán de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre. Si desea ejercer en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación, u oponerse al tratamiento de sus datos personales para las finalidades indicadas, deberá hacerlo poniéndose en contacto con su médico responsable o con el investigador principal de este proyecto.

#### **INFORMACIÓN GENÉTICA. DERECHO DEL PACIENTE AL ACCESO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA.**

Como se ha comentado anteriormente sus muestras se utilizarán para el estudio de las alteraciones genéticas asociadas al tumor 1º y a las metástasis.

Así mismo, se recogerán sus datos de salud relacionados con la patología. No tendrá acceso a la información durante el transcurso del estudio. La información obtenida permanecerá confidencial y codificada hasta el final del estudio, tras lo cual se convertirá en definitivamente anónima.

#### **INTERESES COMERCIALES Y PATENTES DERIVADOS DEL ESTUDIO**

Este estudio no conlleva ningún interés comercial, todos los intereses son puramente científicos. Sin embargo, se le recuerda que si estudio diese lugar a alguna patente industrial o comercial usted no obtendría ningún beneficio de la misma.

#### **CONFIDENCIALIDAD**

Usted debe saber que en todo momento se mantendrá la confidencialidad de sus datos personales si decide participar en el estudio. La información que recojamos será compartida por otros investigadores y doctores. Sin embargo, se mantendrá una estricta confidencialidad y usted no será identificada por su nombre en ninguno de los datos y materiales recopilados durante el estudio, y estos informes se utilizarán únicamente con fines de investigación.

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra se van a archivar, el tratamiento de los datos de carácter personal se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de



Carácter Personal. Según la citada Ley, el consentimiento para el tratamiento de sus datos personales y para su cesión es revocable. Por lo tanto, en cualquier momento usted puede ejercer su derecho de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos dirigiéndose al Investigador Principal (Dr. Martín Jiménez) o a sus co-investigadores en el proyecto.

Si tiene alguna duda o pregunta sobre su participación en este estudio y sobre sus derechos, debe contactar con:

**Dr. Miguel Martín Jiménez (HGU Gregorio Marañón) Teléfono: 91 5868115**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO. FIRMAS**

**HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO  
“CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE MUTACIONES EN TUMOR PRIMARIO, TEJIDO  
METASTÁSICO, CELULAS TUMORALES CIRCULANTES Y DNA CIRCULANTE EN PACIENTES  
DE CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO”**

**Código Estudio**

**Centro:**

**Investigador Principal:**

Yo, \_\_\_\_\_  
(nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado, he podido realizar preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información. Comprendo que mi participación en el estudio es voluntaria y puedo retirarme cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que repercuta en mis cuidados médicos.
- Acepto que las muestras de tejido procedentes de mis biopsias y de sangre obtenidas para este estudio puedan ser analizadas con la finalidad de para estudiar e identificar cambios que ocurren en los genes en pacientes con cáncer de mama que hayan desarrollado metástasis.
- Acepto que las muestras obtenidas para este estudio sean almacenadas en el HGU Gregorio Marañón con el objetivo de poder realizar un adecuado control y manejo de las mismas, asegurando en todo momento cumplir los criterios de anonimización de las pacientes.
- Acepto que las muestras obtenidas, una vez concluido el estudio para el que fueron recogidas, sean integradas como parte de la colección de Muestras del ISCIII número de registro C.0000188 localizada en el HGUGM con fines de investigación biomédica, para que se empleen en otros estudios dentro de la misma línea de investigación, en los términos establecidos por la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica del 3 de julio y al Real Decreto 1716/2011 del 18 de noviembre
- Comprendo que mis consentimientos para el análisis y almacenamiento de las muestras son voluntarios y que puedo retirarlos en cualquier momento. Los efectos de esta revocación será la destrucción de las muestras.

Se expiden tres copias del presente documento tal y como recoge el RD1716/2011, por el que se establecen los requisitos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, de las cuales una se entregará a usted como sujeto fuente, otra será conservada en el centro en el que se recogió la muestra y la tercera será conservada por el Dr. Martín Jiménez como responsable de la colección.

Firma del participante

.....Fecha.....

Firma del investigador

.....Fecha.....






























**Código Estudio GOM-HGUGM-092013 Versión 2.0**





























**5 de 5**

































## 8.5. Anexo 5. Comparativa Ion Torrent e Illumina

































 Variante identificada  Variante no identificada





























NSA: Muestra insuficiente












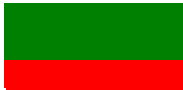












PACIENTE	GEN	PROTEINA	MUESTRA	ION TORRENT	ILLUMINA
HUGM-MUT-005	PIK3CA	p.His1047Arg	primario metástasis plasma		NSA 
	TP53	p.Cys135Arg	primario metástasis plasma		NSA  
	FOXP1	p.Ala590Thr	primario metástasis plasma		NSA 
	KMT2C	p.Ile823Thr	primario metástasis plasma		NSA 
HUGM-MUT-006	TP53	p.Arg248Gln	primario metástasis plasma		 
	RB1	p.Ser576Ter	primario metástasis plasma		 
	LRP1B	p.Asn4372Tyr	primario metástasis plasma		 
	LRP1B	p.Gly3743Ser	primario metástasis plasma		
HUGM-MUT-007	TP53	p.Gly266Glu	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Cys459Ter	primario metástasis plasma		
	CDH5	p.Arg402Ser	primario metástasis plasma	 	
	KMT2C	p.Glu1689fs	primario metástasis plasma		





























<b>HUGM-MUT-009</b>	ERBB2	p.Pro562Leu	primario metástasis plasma		
	TP53	p.Cys176Ser	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-011</b>	AKT1	p.Asp46Glu	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-012</b>	GATA3	p.Ser437fs	primario metástasis plasma		
	PTPRD	p.Ala722Ser	primario metástasis plasma		
	AFF2	p.Arg597His	primario metástasis plasma		
	CTNNA1	p.Ala128Ser	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-013</b>	TP53	p.Asn239Ter	primario metástasis plasma		
	PTPN14	p.Ala742Asp	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Ile823Thr	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-014</b>	PIK3CA	p.Ala511Thr	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Ile331Val	primario metástasis plasma		
	PIK3CA	p.His1047Arg	primario metástasis plasma		
	PIK3CA	p.Val344Gly	primario metástasis plasma		

































<b>HUGM-MUT-016</b>	PTPN14	p.His360Pro	primario metástasis plasma		
	TBX3	p.Leu731fs	primario metástasis plasma		
	KRAS	p.Gly12Cys	primario metástasis plasma		
	CDH1	p.Pro277fs	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Gly2483Ter	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-019</b>	TBX5	p.Ser372Leu	primario metástasis plasma		
	MYC	p.Ser362Phe	primario metástasis plasma		
	PIK3CA	p.His1047Arg	primario metástasis plasma		
	PIK3CA	p.Val346Gly	primario metástasis plasma		
	CTNNA1	p.Val527fs	primario metástasis plasma		
	NF1	p.Ser1932Cys	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Val1264Ala	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-020</b>	PTPN14	p.Arg668Cys	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-021</b>	PTPN14	p.Arg668Cys	primario metástasis plasma		
	AKT1	p.Glu17Lys	primario metástasis plasma		
	ESR1	p.Leu536Arg	primario metástasis plasma		



















<b>HUGM-MUT-022</b>	PIK3CA	p.His1047Arg	primario metástasis plasma		
	ESR1	p.Asp538Gly	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-023</b>	PIK3CA	p.His1047Arg	primario metástasis plasma		
	TP53	p.Gln317Ter	primario metástasis plasma		
	PTEN	p.Phe278Leu	primario metástasis plasma		
	CCND3	p.Glu253Asp	primario metástasis plasma		
	NF1	p.Asp2474His	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-028</b>	TP53	p.Cys242fs	primario metástasis plasma		
	TBX3	p.Asn297Thr	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-029</b>	TP53	p.Asp207fs	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Ile823Thr	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-030</b>	HERC1	p.Ala3165Ser	primario metástasis plasma		
	EGFR	p.Thr6Ala	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-031</b>	NCOR1	p.Met2290Ile	primario metástasis plasma		
	TP53	p.Cys238fs	primario metástasis plasma		
	PIK3CA	p.Gly106Val	primario metástasis plasma		

<b>HUGM-MUT-036</b>	CDH5	p.Arg621del	primario metástasis plasma		
	BRCA1	p.Arg756Thr	primario metástasis plasma		
	TP53	p.Arg342Pro	primario metástasis plasma		
	PIK3CA	p.His1047Arg	primario metástasis plasma		
	CTNNA1	p.Ser133Cys	primario metástasis plasma		
	BRAF	p.Asp594Asn	primario metástasis plasma		
	PTPRD	p.Trp1444Ter	primario metástasis plasma		
	PTPRD	p.His1025Tyr	primario metástasis plasma		
	CDH5	p.Ile517fs	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-37</b>	PIK3CA	p.His1047Arg	primario metástasis plasma		
	TP53	p.Glu224Asp	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-38</b>	KMT2C	p.Gln2177Arg	primario metástasis plasma		
	ESR1	p.Asp538Gly	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-39</b>	PIK3CA	p.Thr462Ala	primario metástasis plasma		

<b>HUGM-MUT-40</b>	TP53	p.Arg337His	primario metástasis plasma		
	PTPN14	p.Arg728Gln	primario metástasis plasma		
	HERC1	p.Asp3415Gly	primario metástasis plasma		
	GATA3	p.Leu404fs	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-42</b>	NF1	p.Gly515Arg	primario metástasis plasma		
	TP53	p.Arg273His	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-45</b>	ERBB2	p.Val777Leu	primario metástasis plasma		
	RB1	p.Ser397Ala	primario metástasis plasma		
	ARAF1	p.Thr184Asn	primario metástasis plasma		
	TP53	p.Tyr205fs	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-48</b>	LRP1B	p.Ala1912Thr	primario metástasis plasma		 NSA
	NF1	p.Glu1387Lys	primario metástasis plasma		 NSA

<b>HUGM-MUT-52</b>	LRP1B	p.Gly2474Ser	primario metástasis plasma		
	NCOR1	p.Gln120Ter	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Asp274Asn	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Glu267Lys	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Gln264His	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-53</b>	NF1	p.Cys124fs	primario metástasis plasma		
	NF1	p.Arg1534Ter	primario metástasis plasma		
	PIK3R1	p.Glu451Ala	primario metástasis plasma		
	PIK3R1	p.Asn453del	primario metástasis plasma		
	TP53	p.Trp91Ter	primario metástasis plasma		
<b>HUGM-MUT-56</b>	CDKN1B	p.Ile119Thr	primario metástasis plasma		
	MAP3K1	p.Glu1187Ala	primario metástasis plasma		
	ESR1	p.Asp538Gly	primario metástasis plasma		
	CPQ	p.Gly10Cys	primario metástasis plasma		

<b>HCSC-MUT-19</b>	GATA3	p.Ser398Cys	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Asn3505Asp	primario metástasis plasma		
	PIK3CA	p.Gly451_Asp454del	primario metástasis plasma		
<b>HCSC-MUT-20</b>	BRCA2	p.Lys1828stop	primario metástasis plasma		
	BRCA2	p.Ile1827fs	primario metástasis plasma		
	ARAF	p.Arg5Pro	primario metástasis plasma		
<b>HCSC-MUT-21</b>	BRCA2	p.Arg3128Ter	primario metástasis plasma		
	WT1	p.Cys350Arg	primario metástasis plasma		
<b>HCSC-MUT-23</b>	BRCA2	p.Ala3029Val	primario metástasis plasma		
	KMT2C	p.Glu2389Ter	primario metástasis plasma		
<b>HCSC-MUT-35</b>	CDH1	p.Gln23Ter	primario metástasis plasma		
	PIK3CA	p.Cys420Arg	primario metástasis plasma		
<b>HCSC-MUT-0037</b>	KMT2C	p.Ser1889Ala	primario metástasis plasma		
	FOXA1	p.Asp226His	primario metástasis plasma		
	ERBB2	p.Val777_Gly778ins	primario metástasis plasma		
	RUNX1	p.Met133fs	primario metástasis plasma		

<b>HCSC-MUT-0038</b>	KMT2C	p.Leu4219Val	primario metástasis plasma		
	GATA3	p.Ser427fs	primario metástasis plasma		
	CTCF	p.Lys205Glu	primario metástasis plasma		
<b>HUIC-MUT-0001</b>	TP53	p.Arg213Ter	primario metástasis plasma		 NSA
	CTCF	p.Lys205Glu	primario metástasis plasma		 NSA
	PTPRD	p.Pro516Gln	primario metástasis plasma		 NSA
<b>HUIC-MUT-009</b>	PTPN14	p.Pro1115Leu	primario metástasis plasma		
	BRCA2	p.Lys1729Thr	primario metástasis plasma		
	TP53	p.Arg342Pro	primario metástasis plasma		

**8.6. Anexo 6. Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral**

-Ramos-Medina R, Moreno F, López-Tarruella S, Del Monte-Millán M, Marquez-Rodas I, Durán E, Jérez Y, García-Saenz JA, Ocaña I, Andrés S, Massarrah T, González-Rivera M, Martín M. Review: circulating tumor cells in the practice of breast cancer oncology. Clin Transl Oncol 2016;18(8):749-59.

-Fernando Moreno, Sara Lopez-Tarruella, Yolanda Jerez, Jose Angel Garcia-Saenz, Antonio C. Picornell, Coralia Bueno, Rocío Ramos- Medina, María del Monte-Millán, Javier Gayarre, Miguel Martín. Resultados del análisis de mutaciones en tumor primario, metastásico y biopsia líquida: Estudio MIRROR. Congreso SEOM 2017. P.EXP-45.