

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“Evaluación de la presencia de Células TumORAles
Circulantes en pacientes diagnosticados con Cáncer de
Mama Triple Negativo en el Instituto Nacional de
Enfermedades Neoplásicas (INEN)”**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Julio Martin Polo Fuentes

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

A la mujer más importante en mi vida, mi madre, porque nada de lo que he conseguido hubiera sido posible sin ella, gracias por los valores y por enseñarme que la felicidad esta en los pequeños detalles.

A mi tía Gerty que en paz descanse y a todas las mujeres que no pudieron ganarle a esta enfermedad, paz eterna a todas ellas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carolina Belmar, por la oportunidad que me dio para realizar esta investigación, por la guía, el apoyo y la paciencia.

A la Dra. Verónica Rubín de Celis, que me ayudo en un momento clave para el desarrollo de este proyecto, siempre le estaré agradecido.

A mi familia, porque siempre puedo contar con todos en las buenas y en las malas.

A mi novia María Pía, por el apoyo incondicional en todo momento.

A mis amigos, Vicky, Mauricio, Juan Pablo y Rodrigo, mis hermanos de diferente madre.

DECLARACIÓN DE FINANCIAMIENTO

Tesis financiada por: FONDECyT bajo el contrato N°198-2015 “Biopsia líquida: células tumorales circulantes y ADN circulante tumoral como biomarcadores en cáncer mama triple negativo”.

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE FINANCIAMIENTO	4
ÍNDICE.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	11
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	14
IV. OBJETIVO GENERAL.....	15
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
VI. MARCO TEÓRICO.....	17
6.1 CÁNCER Y CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO (CMTN)	17
6.2 CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTCs).....	19
VII. ANTECEDENTES	23
7.1 CÁNCER DE MAMA.....	23
VIII. HIPÓTESIS	28
IX. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
9.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	29
9.2 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	29
9.3 VARIABLES	29
9.4 FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	30
9.5 ENTREGA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Y ENCUESTA.	30
9.6 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	32
9.7 MUESTREO	34
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA.....	34
LAVADO DE PERLAS	35
LAVADO DE CTCs	36
9.8 ANÁLISIS DE FRAGMENTOS	41
9.9 PREPARACIÓN DEL MIX DEL GEL COL. ORANTE	42
X. ASPECTO ÉTICO.....	44

XI.	RESULTADOS.....	45
XII.	DISCUSIÓN	49
XIII.	CONCLUSIONES	59
XIV.	RECOMENDACIONES	60
XV.	REFERENCIAS CITADAS	61
XVI.	ANEXOS.....	71
	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRA	78

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CTCs BASADOS EN ENSAYOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS (RING, A. Y COL. 2005.).....	20
TABLA 2: CLASIFICACIÓN DE SUBTIPOS DE CM SEGÚN SCHNITT (SCHNITT S, 2009).....	24
TABLA 3. COMPONENTES NECESARIOS PARA RETROTRANSCRIPCIÓN	39
TABLA 4. COMPONENTES NECESARIOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS A EMT-2 Y A CÉLULAS MADRE	40
TABLA 5.: COMPONENTES NECESARIOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ASOCIADOS AL TUMOR.....	41
TABLA 6. CLASIFICACIÓN DE PACIENTES SEGÚN SU RANGO DE EDAD.	71
TABLA7. CIUDAD DE PROCEDENCIA DE LOS PACIENTES.	71
TABLA8. GRADO HISTOLÓGICO DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO.	71
TABLA9. SUBTIPOS HISTOLÓGICOS EN PACIENTES CON CMTN.....	72
TABLA10. TAMAÑO DE TUMOR DE LAS PACIENTES.	72
TABLA11. TIPOS DE CIRUGÍA APLICADAS.	72
TABLA12. ESTADIOS CLÍNICOS DE LAS PACIENTES DIAGNOSTICADAS CON CMTN.	72
TABLA13. PRESENCIA DE CTCs, PORCENTAJE Y PROMEDIO DE CONCENTRACIÓN EN NG/ML.	72
TABLA14. SEGUIMIENTO DE GENES PRESENTES EN EMT-2.	73
TABLA15. SEGUIMIENTO DE GENES RELACIONADOS AL CM.....	73
TABLA 16. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS CON LA DETECCIÓN DE CTC POSITIVAS EN SANGRE PERIFÉRICA ANTES DEL TRATAMIENTO TERAPÉUTICO.	73
TABLA 17. SOBREVIDA GLOBAL.....	75
TABLA 18. SOBREVIDA LIBRE DE PROGRESIÓN	76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA1. ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE CTCs (ADNATEST/SELECT-QIAGEN).....	36
FIGURA2. ESQUEMA DE PROTOCOLO DE CTCs (ADNATEST/SELECT-QIAGEN)	39
FIGURA 3. CORTE HISTOLÓGICO DE SUBTIPO DUCTAL.....	80

RESUMEN

Introducción:

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres de todo el mundo, cada vez hay más mujeres diagnosticadas con esta enfermedad. La necesidad de evaluar la evolución de la enfermedad, la capacidad de producir metástasis, el pronóstico y la respuesta al tratamiento de forma rápida y específica para cada paciente, se convierte en requisito indispensable. Este estudio propone el uso de células tumorales circulantes (CTC) obtenidas de muestras de sangre periférica de pacientes atendidas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), como metodología sencilla, rápida y no invasiva para el estudio de biomarcadores circulantes.

Materiales y métodos:

La población estudiada será compuesta por pacientes mujeres diagnosticadas con cáncer de mama triple negativo (CMTN) atendidos en el INEN en Lima-Perú. Se realizará la selección, detección y posterior análisis de las CTC obtenidas de muestras de sangre periférica, por cada paciente antes y después de la quimioterapia.

Resultados:

Participaron 28 pacientes mujeres mayores de 18 años diagnosticadas con CMTN. La edad media al diagnóstico fue de 52.5 años. Se identificó la presencia de CTC en 11 de los 28 (39.3%) pacientes con CMTN: 45.5% (5/11) neoadyuvantes y 54.5% (6/11) adyuvantes. La mayoría presentó subtipo histológico ductal (90.9%), grado histológico 3 (81.8%), estadio tumoral II (54.5%), estadio ganglionar N1 (54.5%) y estadio clínico I y II (54.5%). Solo 1 (9.1%) tuvo metástasis a distancia (pulmón). Solo 10 tuvieron algún tipo de cirugía: mastectomía (70.0%) o tumorectomía (30.0%). 2 pacientes tuvieron recaída (18.2%) pero solo 1 de estos falleció (9.1%). No se encontró diferencias significativas entre la presencia de CTC con las características clínico-patológicas estudiadas ($p > 0.05$). Dentro de las CTC positivas, el 27.3% fueron positivos para ALDH1 (marcador de células madre tumoral), el 36.4% fueron

positivas para la detección de al menos uno de los marcadores de la EMT (TWIST1, AKT-2 o PI3K α) y 54.5% de al menos uno de los marcadores específicos de cáncer de mama (MUC1, GA733-2 o HER2). Solo a 8 se les tomo nuevamente una muestra de sangre después del tratamiento terapéutico y quirúrgico (4 neoadyuvante y 4 adyuvantes).

Conclusiones:

Se requieren estudios adicionales para determinar el potencial pronóstico de las CTC. Se necesitan más estudios con cohortes más grandes y tiempos de seguimiento más largos para evaluar si un patrón de marcador sistémico puede indicar una reaparición temprana de CTC y, por lo tanto, un proceso progresivo de la enfermedad.

Palabras clave: cáncer de mama, triple negativo, CTC.

I. INTRODUCCIÓN

El Cáncer de Mama (CM) es una enfermedad que no hace distinción entre poblaciones de países desarrollados o en vías de desarrollo y es el tipo de cáncer con mayor presencia en las mujeres a nivel mundial desplazando así al cáncer de cuello uterino (Morán, E., y col. 2009). En cuanto a la mortalidad por esta enfermedad, sí hay diferencias, en países de bajos ingresos ocurren la mayoría de los decesos, ya que generalmente el diagnóstico se realiza en fases avanzadas de la enfermedad, debido a la falta de acceso a servicios de salud y a la poca sensibilización para la detección precoz (conocimiento de signos, de síntomas iniciales y la autoexploración mamaria).

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es una neoplasia maligna caracterizada por la ausencia de la expresión de los receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP) y HER2. Estudios recientes han señalado que el CMTN es un grupo heterogéneo de distintas neoplasias, con pronósticos diferentes. El CMTN es el subtipo más común en mujeres con mutaciones en el gen BRCA1 (BREastCAncer gen tipo 1) y además se caracteriza por tener patrones epidemiológicos con una alta incidencia en poblaciones afroamericanas y latinas, y una menor incidencia en población caucásica y constituye un problema de salud pública por su elevada morbilidad y mortalidad. Ante la ausencia de blancos terapéuticos, la quimioterapia cumple un rol importante en el tratamiento, y muchos esfuerzos están destinándose a buscar otras combinaciones de quimioterapia y nuevos medicamentos, mientras que las actuales guías no especifican un tratamiento efectivo directo para este tipo de cánceres (Zaharia y Gómez. 2013).

Múltiples estudios han determinado que existe un grupo de células tumorales que se desprenden del tumor primario y que se trasladan mediante el torrente sanguíneo a distintos tejidos y/o órganos produciendo metástasis. Estas células llamadas Células Tumorales Circulantes (CTCs) presentan características similares al tumor inicial de donde se asume se desprenden desde estadíos tempranos. Las CTCs no suelen establecerse en un lugar al azar, si no que

dependiendo de sus características bioquímicas y moleculares presentan afinidad con tejidos y/o órganos similares al de su origen (Papasotiriou, I., y col. 2015).

Las CTCs pueden distinguirse de las células normales en sangre periférica mediante sus características físicas y biológicas. Para ello se requieren de técnicas sensibles y específicas que permitan su correcta identificación dado que la concentración de CTC en sangre periférica, incluso en pacientes con enfermedad metastásica, no supera el índice de 1 CTC por cada 105 células leucocitarias; es por ello que la mayoría de los sistemas de detección consisten en una fase de enriquecimiento previa a la detección. (Ring, AE., y col. 2004).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mundialmente el CMTN es el subtipo de CM más agresivo, con mayor índice de mortandad debido en parte a que las pacientes llegan a tratarse en estadíos avanzados de la enfermedad. El CMTN también es un subtipo difícil de diagnosticar con exactitud dada su naturaleza heterogénea y debido a que la realización de perfiles genéticos no es una práctica estándar para el diagnóstico convencional del CM, esto limita una apropiada identificación de este subtipo de CM. Las CTCs al presentar características genéticas derivadas del tumor primario podrían dar a conocer la situación actual de la enfermedad y la toma de decisiones médicas a través de procedimientos clínicos no invasivos para el paciente y permitiendo a su vez una toma de muestra suficiente para los análisis moleculares pertinentes.

Ante esta premisa surge la interrogante ¿Pueden las Células Tumorales Circulantes ser implementadas como marcadores moleculares de pronóstico y determinación de tratamientos específicos que permitan tener mejores resultados en la pacientes peruanas diagnosticados con Cáncer de Mama Triple Negativo?

III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El CM en el Perú es la neoplasia más común en los sectores socioeconómicos A y B, y la segunda en los sectores C, D y E según registros del Ministerio de Salud del 2010-2016. Hasta el 2012 solo en Lima se registró una tasa de mortalidad de 10.72 mujeres por cada 100,000 según el Registro de Cáncer de Lima Metropolitana – Incidencia y mortalidad 2010-2012. MINSa.

Las CTCs pueden ser detectadas en la sangre cuando la enfermedad se encuentra en un estadio avanzado, tiene la capacidad de extravasar los vasos sanguíneos y formar micro metástasis. Debido a esto es que las CTCs se presentan como alternativa (aún estudiada) de pronóstico de enfermedad, de evaluación de la capacidad de metástasis, selección personalizada de tratamiento y seguimiento de la neoplasia en caso no se halle muestra de tumor primario.

Por este motivo es importante que las investigaciones sobre CTCs y marcadores moleculares específicos en CM aumenten, esto permitirá tener una mayor recopilación de información sobre el desarrollo de esta neoplasia en la población peruana, de esta manera se podrán obtener pronósticos más acertados y tratamientos diferenciados para cada paciente.

IV. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Identificar Células Tumorales Circulantes (CTCs), como biomarcadores circulantes durante el tratamiento quimioterapéutico en pacientes mujeres diagnosticadas con Cáncer de Mama Triple Negativo en el Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas (INEN).

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Aislar las CTCs a partir de muestras de sangre de pacientes diagnosticadas con CMTN.
- ✓ Evaluar el uso de CTCs como un monitoreo posterior al tratamiento de la enfermedad de los pacientes con CMTN diagnosticados y tratados en el INEN.
- ✓ Determinar estadísticas relacionadas a las variables clínicas de los pacientes que participaron en la investigación.
- ✓ Analizar la dinámica tumoral y características de las CTCs durante el tratamiento.

VI. MARCO TEÓRICO

6.1 Cáncer y Cáncer de Mama Triple Negativo (CMTN)

El cáncer es la principal causa de muerte debida a enfermedades no transmisibles en todo el mundo, y por lo tanto, es un problema de salud pública importante, tanto en los países desarrollados como en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) señalan que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad. (INAGI 2013). A pesar de ser una enfermedad que detectada a tiempo presenta pronósticos favorables, la tasa de mortalidad por CM en el mundo sigue en aumento. La causa más probable de este hecho es que la enfermedad es aún diagnosticada en etapas avanzadas, y se identifican múltiples barreras en el acceso al diagnóstico y tratamiento para la mayoría de las mujeres que confían en el sistema público de salud (Jemal. y col. 2010).

Las investigaciones enfocadas a la predicción del perfil genético y resultados clínicos de pacientes con CM, proponen este método para identificar tratamientos que sean favorables para la evolución positiva del paciente (Van't Veer y col. 2002). Los estudios preliminares de *Perou* y *Sorlie* basados en microarreglos, identifican cuatro subtipos de CM: I) Luminal A; II) Luminal B; III) Basal o Triple Negativo y IV) HER2/C-erb-2. Esta clasificación fue posteriormente modificada a partir de los distintos patrones de expresión génica relacionados con el pronóstico y riesgo de metástasis. Tiempo después la clasificación dividió el CM en 2 grandes grupos: I) Neoplasias de bajo grado, donde están incluidos los subtipos Luminal A y Luminal B por ser positivos para receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), siendo el primero de un crecimiento más lento y de mejor pronóstico, a diferencia del segundo que prolifera más rápido por ende su pronóstico no es tan favorable; y II) Neoplasias de alto grado, que se caracterizan por no presentar RE y RP pero puede haber sobreexpresión y/o

amplificación de HER2/C-erb-2; en esta categoría están incluidos los tipos HER2/C-erb-2 y Triple Negativo (Sørlie, T., y col/ 2003).

En el caso del subtipo HER2/C-erb-2, constituye el 10-15% de todas las neoplasias de mama y tiende a un crecimiento acelerado por lo que los pronósticos no suelen ser positivos. Este subtipo es resistente a la terapia hormonal debido a la ausencia de receptores hormonales, en cambio los tratamientos basados en el anticuerpo monoclonal recombinante (Trastuzumab/herceptin) producen una mejoría significativa en los pacientes ya que está directamente enfocada al gen HER2/C-erb-2 (Imigo, y col. 2011).

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es una neoplasia que mantiene el interés y la atención de investigadores y clínicos debido a su complejidad y resultados terapéuticos variables en comparación con los descritos para otros tipos de CM. Del millón de casos de cáncer detectados anualmente, aproximadamente 170000 son CMTN (Ismail-Khan, 2010). Al respecto, en la literatura biomédica existe abundante información referente, sin embargo, parece no haber aún un consenso en relación a la apropiada definición del término “triple negativo”. Quizá la descripción más apropiada es la que define al CMTN como “un estado inmunohistoquímico para cánceres con biología y conducta clínica heterogénea” (Campos-Segura M. 2012). Otra propuesta define al CMTN como un grupo de enfermedades con conductas biológicas diferentes, de epidemiología no claramente precisada. Pero que comparten un abordaje diagnóstico y terapéutico similar (Cáceres, G., y col. 2015).

Como se postuló anteriormente, el subtipo basal o triple negativo se compone de tumores ER-, PR- y HER2- con perfiles de expresión imitando a la de las células epiteliales basales de otras partes del cuerpo y las células mioepiteliales normales de mama. Tales patrones de expresión incluyen la falta o baja expresión de los receptores hormonales y HER2, y alta expresión de marcadores basales como queratinas 5, 6, 14, 17, EGFR (Dai, X. y col. 2015).

6.2 Células Tumoraes Circulantes (CTCs)

Las CTCs fueran reportadas por primera vez por Thomas Asworth en 1869 como células tumorales que se encuentran en la sangre de pacientes que presentan una neoplasia temprana o avanzada. Stephen Paget propuso años después, en 1889, la teoría del suelo y la semilla, misma que sostiene que ciertas células tumorales (semillas) tienen afinidad para implantarse en las condiciones de un órgano en particular (suelo), y cuando ambas condiciones se dan, se propicia la metástasis (Saenz, L 2012).

Las CTCs constituyen una subpoblación de células neoplásicas dispersas en el sistema circulatorio por medio de los vasos linfáticos de un tumor primario. Las CTCs se separan del tumor original y circulan a través del torrente sanguíneo, se extienden a otros órganos donde pueden iniciar el proceso de metástasis tumoral en un nuevo microambiente. Sin embargo, los mecanismos del sitio del tumor y el restablecimiento en un sitio diferente son todavía desconocidos (Apostolou, P., y col. 2017).

Las CTCs se diferencian de las células normales de sangre periférica porque presentan diferentes características biológicas y físicas. Para poder aislar las CTCs se requieren de técnicas sensibles y específicas que permitan su correcta identificación dado que la concentración de CTC en sangre periférica, incluso en pacientes con un proceso metastásico en curso, no supera el índice de una CTC por cada 10⁵ células leucocitarias; es por ello que la mayoría de los sistemas de detección consisten en una fase de enriquecimiento seguida del proceso de detección en sí mismo (Graves, H., & Czerniecki, B. J. 2011).

Para la detección de CTCs es necesario un paso previo de enriquecimiento basado en aspectos morfológicos de las CTCs y técnicas de inmunoseparación que mejoren la sensibilidad del ensayo (Gerges, N. y col. 2010). En este sentido podemos diferenciar 2 tipos:

- a) Métodos Directos; basados en reconocer moléculas específicas de la célula tumoral mediante uno o varios anticuerpos monoclonales asociados a una molécula de señal cuantificable. De entre estos métodos el más destacado es el CellSearch® Circulating Tumor System que detecta en sangre periférica una CTC por cada 10^7 células mononucleares por electromagnetismo (Villegas, L. y col. 2011).
- b) Métodos indirectos; se basan en ensayos de ácidos nucleicos. Los más utilizados son PCR, RT-PCR y algunas variaciones de la misma donde se requiere un paso previo a la retrotranscripción a partir de ARNm específicos.

Tabla 1: Métodos de detección de CTCs basados en ensayos de ácidos nucleicos (Ring, A. y col. 2005.)

Técnica	Volumen	Principio	Ventajas	Inconvenientes
PCR	5-10 μ L	DNA	Alta sensibilidad. Fase se enriquecimiento preanalítico corto.	Baja especificidad. No análisis morfológico.
RT-PCR	5-10 μ L	RNA	Alta sensibilidad. Detección de CTCs viable.	No análisis morfológico.
RT-PCR <i>Tiempo Real</i>	5-10 μ L	RNA	Alta sensibilidad. Detección de CTCs viable. Cuantificación celular.	No análisis morfológico.
RT-PCR <i>Tiempo real multimarcaador</i>	5-10 μ L	RNA	Alta sensibilidad y especificidad. Detección de CTCs viable. Cuantificación celular. Significación pronóstica en cáncer de mama precoz.	No análisis morfológico.

Aunque estas técnicas presentan el inconveniente de no poder observar la morfología celular, lo compensan con la posibilidad de usar varios marcadores moleculares en simultáneo aumentando así la sensibilidad y la especificidad significativamente (Ring, A. y col. 2005).

Por otra parte las técnicas de retrotranscripción y posterior amplificación de ADNc permiten la estimación indirecta de CTCs al evaluar la expresión de marcadores específicos en ARNm como por ejemplo el MUC-1, CK19 entre otros; estos marcadores empleados permiten elevar la especificidad de la técnica (Alix-Panabieres, C. *y col.* 2008).

La extravasación de CTCs al torrente sanguíneo, constituye un filtro crucial para el desarrollo de metástasis en zonas distales a la del tumor primario. Para esto deberán invadir la membrana basal, el tejido alrededor y finalmente ingresar al torrente sanguíneo; una vez ahí las CTCs son capaces de sobrevivir, extravasar un tejido distante y algunas tendrán la habilidad de establecer un tumor (Butler TP, 1975). A pesar de esto el destino final de las CTCs aún es controversial ya que la evidencia preclínica y clínica es inconsistente. En algunos modelos experimentales las CTCs en su mayoría son destruidas en el torrente sanguíneo (Wong CW. *y col.* 2001), mientras que en otros sobreviven y extravasan (Podsypanina K. *y col.* 2008). A pesar de esto, el censo común de estas investigaciones es que no todas las CTCs tienen la capacidad de formar un foco metastásico, por lo que estos eventos requieren de un conocimiento más detallado para poder ser definido.

De esta manera, el sistema de detección de CTCs, AdnaTest (AdnaGen, Langenhagen, Alemania) permite el enriquecimiento inmunomagnético de las células tumorales mediante una mezcla de perlas recubiertas con antígenos epitelial y asociado a tumores (Fehm, T. *y col.* 2009). Después del enriquecimiento inmunomagnético, este sistema extrae el ARN mensajero para una posterior retrotranscripción, procedimiento para la detección de la cantidad de ARNm asociados a células epiteliales tales como MUC1, HER2 y la glicoproteína de superficie. El sistema AdnaTest combina técnicas tradicionales de anticuerpos con transcripción reversa de ADN complementario y muestra una sensibilidad más alta en comparación con el sistema CellSearch (Hauch. *y col.* 2007).

a. Linaje Genético

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso conformado por diferentes fases, donde una célula epitelial adquiere un fenotipo mesenquimal. Estos cambios involucran: pérdida de la polaridad celular, adquisición de una capacidad migratoria e invasora, resistencia a la apoptosis y aumento en la producción de componentes de la matriz extracelular (Bidard, F. y *col.* 2008). Estos cambios ocurren como una consecuencia de la activación y/o represión de genes involucrados con rutas de señalización específicas relacionadas con este evento. La EMT está relacionada con procesos fisiológicos y patológicos como el cáncer (Hay ED. 1995). Consta de tres fases: una de células no migratorias, células premigratorias y células migratorias; cada una de ellas producto de diferentes señales intra o extracelulares, factores de transcripción (TGF-B, Snail, TWIST, AKT-2, Slug, ZEB1, entre otras) y proteínas involucradas (E-cadherina, integrina, vimentina, ocludinas y claudinas) (Lee JM. y *col.* 2006).

En el caso de los genes asociados al Cáncer de Mama, trabajamos con 3 específicos genes cuya participación en la expresión de la neoplasia está probada por múltiples investigaciones y han sido ampliamente estudiados. El gen GA733-2 codifica la glicoproteína epitelial 40 (EGP40) que se expresa en la superficie de la mayoría de las células epiteliales. Se ha encontrado que este antígeno está asociado con una variedad de carcinomas humanos como mama, pulmón, pancreático y colon-rectal (Leij L. y *col.* 1994), y ha atraído la atención como un marcador tumoral. Por otro lado, dentro del grupo de las mucinas se incluyen proteínas que cumplen también una función en el sistema inmune atrapando organismos patógenos. La sobreexpresión de mucinas, en especial de la MUC1 se encuentra asociada a muchos tipos de cáncer (Niv Y, 2008). .El gen MUC1, ha sido ampliamente estudiado en relación con su expresión y significado funcional en la progresión maligna (Schroeder, JA. y *col.* 2004).

VII. ANTECEDENTES

7.1 Cáncer de Mama

El CM es el tipo más frecuente de cáncer en las mujeres y la segunda causa de muerte en este grupo de población en todo el mundo (Prolla, y col. 2015). A pesar de ser considerado un tumor con buen pronóstico si se diagnostica y trata a tiempo, el CM sigue estando asociado con una alta tasa de mortalidad en el mundo. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) señalan que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad.

El CM es una enfermedad que depende de factores genéticos y ambientales para contribuir a su aparición. En un pequeño porcentaje de los casos, existe una mutación germinal en algún gen de predisposición al cáncer, es decir, hay pacientes que ya tienen una predisposición genética lo cual es considerado un factor determinante para la aparición de la enfermedad. El CM espontáneo, que no está causado principalmente por una mutación heredada, representa más del 90% de los casos de CM en todo el mundo (Tiezzi DG, 2009). Se estima que, en promedio, las mujeres que viven hasta los 85 años tendrán una probabilidad de 1 en 9 para desarrollar CM (Jemal y col. 2010). Los factores de riesgo establecidos para el CM incluyen factores reproductivos como: menarquia temprana, edad mayor de 30 años en el primer embarazo, uso de anticonceptivos hormonales de alta dosis, menopausia tardía y terapia de reemplazo hormonal, aumento de la edad, alta densidad del tejido mamario y una historia familiar de cáncer, especialmente CM. Otros factores que modulan el riesgo de CM incluyen factores nutricionales, actividad física, la historia clínica y duración de la lactancia materna, la obesidad en la post-menopausia, fumar, consumo de alcohol, exposición a radiación ionizante y nivel socioeconómico sobre todo en países en vías de desarrollo (O'Brien, 2010).

El CM dependiendo de sus características moleculares o fenotipos presenta subtipos con diagnósticos, pronósticos y tratamientos distintos. Dentro de estos

subtipos que pueden ser determinarlos por sus perfiles de expresión génica tenemos (Tabla 2):

Tabla 2: Clasificación de subtipos de CM según Schnitt (Schnitt S, 2009).

Subtipo	Inmunofenotipo	Comportamiento
Luminal A	RE(+) y/0 RP(+); Her2/neu(-)	Subtipo más común y menos agresivo, buen pronóstico. Bajo grado histológico; con respuesta hormonal. Asociado al incremento de edad.
Luminal B	RE(+) y/0 RP(+); Her2/neu(+)	Similar al subtipo Luminal A pero con peor pronóstico. Frecuentemente RE(+)/RP(-).
Basal o TN	RE(-); RP(-); Her2/neu(-)	Subtipo agresivo. Alto grado histológico e índice mitótico. Riesgo en edades menores (<40). Más frecuente en mujeres premenopáusicas afroamericanas.
Her2/neu(+)	RE(-); RP(-); Her2/neu(+)	Menos común, altamente agresivo y alto grado histológico. Riesgo en mujeres menores de 40 años con ascendencia afroamericana.

tendencia a presentar metástasis a distancia, comparada con los otros subtipos de cáncer de mama, predominando las metástasis viscerales (hígado, pulmón y sistema nervioso central), así mismo, tiene un curso clínico más agresivo, con recurrencias tempranas y con mayor riesgo de muerte, con respecto a los tumores dependientes de hormonas (Verma, S. y col. 2011).

Desde un punto de vista epidemiológico, los factores de riesgo que podrían influenciar en el desarrollo del CMTN no están bien establecidos ya que tienen un rango de caracteres bastante amplio. Estudios basados en datos poblacionales en California, indican que entre 1999 y el 2003 de un total de 6370 mujeres que fueron diagnosticadas con CMTN; presentaron un rango de edad promedio al momento del diagnóstico de entre 50-59 años con 1690 mujeres (26.5%), la mayoría presentaba ascendencia afroamericana con 3959 mujeres (62.2%), predominó el nivel socioeconómico más bajo con 1536 mujeres (24.1%) y el grado histológico al momento del diagnóstico que sobresalía fue el grado 2 con 3099 mujeres (48.6%), (Bauer K, y col. 2007). Estudios epidemiológicos realizados por el Centro Consciente de Cáncer de la Universidad de Carolina del Norte, a través del estudio "Cáncer de Mama en Carolina" donde abarcaron una población de 496 pacientes mujeres diagnosticadas con CM; indicaron que en comparación con el subtipo TN (100 casos), los tumores Luminales A y B eran más frecuentes (322 casos); dentro del grupo de casos de TN la mayoría presentaban un grado histológico pobremente diferenciado (82 casos) y un alto

índice mitótico (85 casos), las mujeres con ascendencia afroamericana presentaron una ligera mayoría (52 casos) y fue superior (66 casos) en mujeres con pre menopausia (Carey LA, y col. 2006). Otro estudio encontró que mujeres hispanas afro descendientes diagnosticadas con CMTN, tenían tumores que eran más agresivos, y estas pacientes tenían una supervivencia más pobre independientemente de la etapa. Este grupo de pacientes hispanas afrodescendientes con estadio tardío de CMTN tuvo además, la supervivencia más pobre en comparación a otros grupos de estudio (Bauer K, y col. 2007).

El CMTN es bien conocido por su comportamiento agresivo y se caracteriza por presentar un tamaño tumoral alto y en ocasiones, una mayor tasa de formación de nódulos (Verma, S. y col. 2011). Además, este grupo es también conocido por un pico temprano de recurrencia entre el primer y tercer año después del diagnóstico, y metástasis más agresivas que suelen aparecer con mayor frecuencia a nivel visceral, particularmente en los pulmones y el cerebro, y menos probable que se propague a los huesos (Criscitiello C, y col. 2012). Basado en hallazgos histológicos la mayoría de los CMTNs presentan su origen en el epitelio ductal sin embargo, muchos otros fenotipos agresivos también parecen estar sobre representados, incluyendo metaplásicos, apocrinos y adenoides císticos (Reis-Filho, J. S., y col. 2006).

En lo que tratamientos se refiere, la quimioterapia ha demostrado prolongar la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes; sin embargo, el CMTN carece de los típicos receptores encontrados en los tipos Luminal A y B, o en los asociados al HER-2 y por lo tanto no pueden ser tratados con medicamentos hormonales o agentes tales como SERMS, antagonistas de HER2 (Joensuu H, 2012). Para combatir este problema se han realizado varios estudios a partir de neoadyuvantes que acentuaron la relación entre la sensibilidad a la quimioterapia y los resultados, revelando proporcionalmente una mayor respuesta a la antraciclina, que es un tratamiento de quimioterapia basada en antraciclina/taxano (Carey, L. 2006).

Aunque el CMTN responde al tratamiento de quimioterapia con antraciclina/taxano, aún hay un alto riesgo de recaída si el tumor no está

completamente erradicado. Por otra parte, los estudios clínicos y preclínicos indican que los tumores con genes con mutación en el BRCA1 son sensibles a agentes de platino tales como Cisplatino y Carboplatino que funcionan causando daño al ADN y promueven la apoptosis de células tumorales (Joensuu H, 2012). Estudios han demostrado que p63, es responsable de controlar una vía de supervivencia que influye directamente con la sensibilidad del cisplatino en CMTN; por lo tanto, podría ser utilizado como biomarcador para predecir la respuesta a la terapia con platino en CMTN. Sin embargo, esta conclusión continua en proceso de investigación y actualmente el platino no se recomiendan en adyuvancia para CMTN (Joensuu H, 2012).

b. Células Tumorales Circulantes

De todas las definiciones que pudimos recoger, podríamos definir a las CTCs como células epiteliales tumorales que ya podrían encontrarse en sangre periférica de pacientes con cáncer desde un estadio temprano y que dependiendo del conteo y/o cantidad de estas, se puede inferir el nivel de desarrollo de la neoplasia. Estas células presentan características genéticas específicas a las del tumor inicial y de encontrar afinidad bioquímica con un órgano y/o tejido podrían desencadenar micro metástasis (Aktas, B., y 2009).

En los últimos años, las CTCs han sido el foco de muchos investigadores, ya que han demostrado tener valor en cuanto al pronóstico y diagnóstico. La existencia de CTCs ha sido reportada en la mayoría de los cánceres sólidos, y su uso como recurso de diagnóstico está bien establecido (Kasimir-Bauer, S, y *col.* 2012). Otra subpoblación celular con propiedades de expresión de metástasis tumoral son células madre de cáncer (CSCs). Estas células se han definido como las promotoras del cáncer y propagadoras de metástasis, y son capaces de auto-renovación y la regeneración del tumor (Wu, X.Z. 2008).

El número de CTCs encontradas en un paciente podría servir como un marcador predictivo para la progresión del cáncer. Sin embargo, como estas células son escasas su detección es importante (Banys, M. 2014). Los investigadores han desarrollado varios ensayos para detectar CTCs y utilizarlos como diagnóstico de cáncer. Una plataforma consiste en anticuerpos EpCAM unidos a perlas

magnéticas, por lo que las células son aisladas con un campo magnético. Otra plataforma se basa en el perfil de expresión génica de CTCs, por lo que el aislamiento es realizado dirigiendo genes específicos (Königsberg, R., y *col.* 2011). Existe una controversia entre la comunidad científica sobre la eficacia de cada método. Una de las metas de esta investigación será evaluar la presencia de células tumorales circulantes mediante el método de citometría, que detecta de manera directa las CTCs mediante electromagnetismo.

VIII. HIPÓTESIS

La hipótesis de esta investigación se centró en que la presencia de Células Tumorales Circulantes en pacientes diagnosticados con CMTN en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) pueden ser utilizados como biomarcadores

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este proyecto se trabajó con un tamaño de muestra de 28 pacientes mujeres todas; donde se compararon las variables clínicas del tumor primario, se realizó una caracterización demográfica de los pacientes y se llevó a cabo un análisis de la presencia CTCs en sangre periférica de pacientes mujeres diagnosticadas con CMTN.

9.1 Lugar de ejecución

El proyecto se realizó en el Departamento de Investigación y en el laboratorio ubicado en el área de Biología Molecular de Banco de Tejidos Tumorales del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) durante el año 2017.

9.2 Tipo y diseño de investigación

Este fue un estudio descriptivo y longitudinal, que busco hallar la relación entre las CTCs y el diagnóstico y la prognosis de pacientes mujeres diagnosticadas con CMTN. También se buscó realizar una caracterización socio demográfica de las pacientes a fin de poder conocer aspectos no clínicos de las mismas y su posible relación con la enfermedad. El diseño de este estudio siguió las etapas de una investigación de tipo experimental o de laboratorio.

9.3 Variables

Las variables de la presente investigación fueron obtenidas a partir de encuestas, revisión de las historias clínicas de cada paciente y datos clínicos proporcionados

por el análisis de la data obtenida de las muestras de los pacientes. La información fue obtenida de las encuestas: domicilio, edad, antecedentes familiares, información personal (hábitos); mientras que las variables clínicas obtenidas del historial hospitalario de cada paciente proporcionado por el Sistema de Información interna del INEN: subtipo histológico, grado histológico, edad al diagnóstico, tipo de quimioterapia, tamaño de tumor.

9.4 Ficha de Recolección de datos

Se elaboró una base de datos recolectados de las pacientes según información personal presentada al INEN, como lugar y fecha de nacimiento, lugar de residencia y edad; además se incluyeron también variables clínicas y patológicas, aquellas que llegarán a ser relevantes para la realización del presente estudio descriptivo, como grado histológico, subtipo histológico, tamaño tumoral. Cada paciente fue entrevistado durante la cita para la toma de muestra de biopsia, para consulta y/o previo al tratamiento.

9.5. Entrega de Consentimiento Informado y Encuesta.

Las pacientes que decidieron participar voluntariamente de este proyecto de investigación, fueron informados acerca del motivo y la importancia medico/científica de este estudio. Una vez orientadas y después de despejar cualquier duda que la paciente hubiera tenido sobre la investigación realizada, se procedió a entregarles un consentimiento informado el cual fue previamente revisado, corregido y aprobado por el comité de ética del INEN.

Siguiendo un procedimiento similar se elaboraron encuestas que sirvieron para recopilar datos con información personal de la paciente. Estos datos nos permitieron obtener información confiable acerca de los antecedentes particulares de cada una de las pacientes, lugares de procedencia y domicilio actual, hábitos nocivos en caso los tengan como fumar o beber alcohol en exceso, cantidad de embarazos, automedicación y antecedentes familiares de cáncer.

Los pasos para realizar esta presentación a manera de entrevista fueron; informar el motivo de nuestra presencia y entregar el consentimiento informado a la paciente y/o familiares o acompañantes en caso estén presentes, en el particular caso de que las pacientes no quisieran participar del estudio, no se les tomaba la muestra y solamente se les realizaba la encuesta.

Si la paciente tomó la decisión de participar en el estudio, se procedía a tomar la muestra de sangre que se colectó en tubos con EDTA aproximadamente de 6 a 8 ml. los cuales eran rotulados con el nombre de la paciente, la fecha de la toma de muestra y el número de historia clínica. Las muestras tomadas fueron procesadas en el laboratorio en las primeras horas inmediatamente a la toma de muestra. También se les realizaba la encuesta que tomaba alrededor de 5 a 10 minutos con la información ya antes mencionada.

9.6 Operacionalización de las variables

Variable	Tipo de Variable	Escala de medición	Definición operacional	Registro
Estadio clínico de cáncer de mama	Cualitativa Discreta	Ordinal	Va entre I a IV grado, según clasificación de ACOG (Anexo 1).	I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IV.
Edad	Cuantitativa Discreta	De razón	Edad en años que tiene el paciente al momento del diagnóstico.	Va entre 18 a 90.
Fecha de diagnóstico	Cuantitativa Discreta	De intervalo	En qué día, mes y año fue diagnosticado con cáncer de mama durante consulta con el oncólogo.	Día, mes y año.
Subtipo Histológico	Cualitativa	Nominal	El patrón histológico del CMTN	Ductal, Medular, Papilar, Tubular Mucinoso.
Grado Histológico	Cualitativa	Ordinal	La descripción de un tumor que se basa en la forma como se ven las células y el tejido de un tumor al microscopio.	Bien diferenciado, Medianamente diferenciado, Pobremente diferenciado.
Tamaño tumoral	Cuantitativa continua	De razón	Tamaño máximo del tumor al diagnóstico.	Va desde 0 a 5cm
Fecha de inicio quimioterapia	Cuantitativa Discreta	De intervalo	En qué día, mes y año se inició la quimioterapia.	Día, mes y año.

Esquema de quimioterapia	Cualitativa	Nominal	Combinaciones de 2 o 3 medicamentos de quimioterapia.	Antraciclinas Taxanos Ciclofosfamida Carboplatino 5-fluorouracilo
Fecha última quimioterapia	Cuantitativa Discreta	De intervalo	En qué día, mes y año se culminó la quimioterapia.	Día, mes y año
Fecha de cirugía	Cualitativa	Nominal	Cirugía realizada en el paciente	Tumorectomía Mastectomía Toillete
Tipo de cirugía	Cuantitativa continua	De razón	Cirugía realizada en la paciente.	Tumorectomía Mastectomía Toillete
Genes asociados al tumor	Cualitativa Dicotómica	Nominal	Genes asociados a la expresión de antígenos asociados al tumor de mama (MUC-1, HER-2 y GA733-2).	Negativo Positivo
Gen asociado a células madre	Cualitativa Dicotómica	Nominal	Gen asociado a células madre tumoral (ALDH1).	Negativo Positivo
Gen constitutivo	Cualitativa Dicotómica	Nominal	Gen normalizador o constitutivo, que se expresa siempre en todos los tejidos (β -actina).	Negativo Positivo

9.7 Muestreo

La obtención de la muestra clínica, se llevó a cabo en dos etapas:

Obtención de la muestra biológica

Las biopsias líquidas se realizaron en Banco de Sangre – INEN. El procedimiento para el traslado de la muestra desde el Banco de Sangre al Laboratorio fue el siguiente:

1, primero se seleccionaron a las pacientes teniendo como criterios de inclusión que sean mujeres mayores de 18 años, que el diagnóstico por inmunohistoquímica indique que se trata de CMTN, que los pacientes tengan un historial clínico con información detallada y que firmen el consentimiento informado; **2**, el responsable asignado del procedimiento de toma de muestra debía acercarse a la paciente con 1 tubo con EDTA de marca Vacutest Kima de 6ml para tomar la muestra de sangre; **3**, los tubos deberán ser rotulados con el número de historia clínica de la paciente y las iniciales de su nombre, la fecha y la hora de la toma de muestra; **4**, una vez tomada la muestra los tubos eran trasladados al laboratorio en un cooler con geles fríos y una vez en el laboratorio eran almacenados a 4°C. El procesamiento de la muestra se llevó a cabo posterior a la recepción o a más tardar dentro de las primeras cuatro horas.

Obtención de Células Tumorales Circulantes (CTCs)

Para la extracción de las Células Tumorales Circulantes (CTCs), se empleó el kit comercial *AdnaTest EMT-2/StemCellSelect* (AdnaGen, Germany). Básicamente, el kit permite el enriquecimiento de la muestra en CTCs vía anticuerpos asociados a los antígenos epiteliales y asociados a tumor conjugados a perlas magnéticas que marcan las CTCs en la sangre con un porcentaje de especificidad de 90%. Las perlas son partículas de polímero esféricas supermagnéticas, presentan tamaño uniforme y una superficie consistente que permite la adsorción o acoplamiento con diversas moléculas o células biorreactivas. Las CTCs marcadas fueron extraídas y posteriormente lisadas, siguiendo las especificaciones del proveedor.

Protocolo CTCs (AdnaTest/Select-Qiagen)

Preparación de las perlas de selección

Las perlas magnéticas vienen suspendidas en azida de sodio (NaN_3) por lo que fue necesario remover el líquido de antes del lavado usando el deslizador magnético AdnaMag-S. Las perlas se resuspendieron por pipeteo sin usar vortex. Se calculó el volumen de perlas para todas las muestras a usar, un volumen de 100 μL por muestra que fue transferido a un microtubo de 1.5ml. Se colocó el microtubo en el concentrador AdnaMag-S por 1 minuto y finalmente se eliminó el sobrenadante con una micropipeta con el cuidado de no tocar las perlas durante este proceso.

Lavado de Perlas

Para esto se descartaron los tubos del deslizador magnético AdnaMag-S y se añadió 1ml de PBS (solución fosfato salino) y se resuspendieron las perlas mediante pipeteo repetitivo. Luego se colocaron nuevamente en el deslizador magnético por 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante por completo con una micropipeta repitiendo el proceso 2 veces más. Al final retiró el tubo del concentrador AdnaMag-S y se resuspendieron las perlas en PBS al volumen original (100 μL de PBS por muestra).

Selección de Células Tumorales (CTCs)

Se añadió 5ml de muestra de sangre periférica a un tubo falcon de 15ml. Las perlas fueron resuspendidas por pipeteo y se añadieron los 100 μL de las perlas magnéticas del procedimiento anterior a los tubos con las muestras de sangre. Luego se colocó el tubo en el rotador a velocidad moderada (5 rpm) por 30 minutos a temperatura ambiente. Cumplidos los 30 minutos, los tubos fueron retirados del rotador y colocados dentro del concentrador AdnaMag-L y se incubaron los tubos por 3 minutos a T° ambiente. Finalmente se removió el

sobrenadante de la sangre por completo con una pipeta de 10ml sin tocar las perlas.

Lavado de CTCs

Se removieron los tubos del concentrador AdnaMag-L y se añadió 5ml de solución de lavado; se agitaron los tubos suavemente hasta homogenizar las perlas con las CTCs. Se colocó el tubo nuevamente en el concentrador AdnaMag-L y se incubó 3 minutos a T° ambiente. Se removió el sobrenadante con una pipeta (este proceso se repitió 3 veces en total).

Obtención de RNA

Se retiraron los tubos del AdnaMag-L y el complejo perlas/células fue resuspendido en 1ml de buffer de lavado y el contenido transferido a un nuevo tubo de 1.5ml. Se ubicaron los tubos en el AdnaMag-L por 3 minutos a T°. Se retiró el sobrenadante con una pipeta y retirar los tubos del AdnaMag-L. Resuspender el complejo perlas/células en 1ml de PBS e incubar por 1 minuto en el AdnaMag-L. Nuevamente se retira el sobrenadante con una pipeta (completamente) para optimizar el siguiente paso de lisado de las células. Se retiran los tubos del AdnaMag-L y se agregó 200 µL de buffer de lisis a cada tubo y resuspendiendo por pipeteo cuidadosamente. Los tubos se colocaron en el AdnaMag-L y se incubó por 1 minuto, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de 1.5ml. Se descartó el tubo con perlas y el sobrenadante fue almacenado a -20°C.

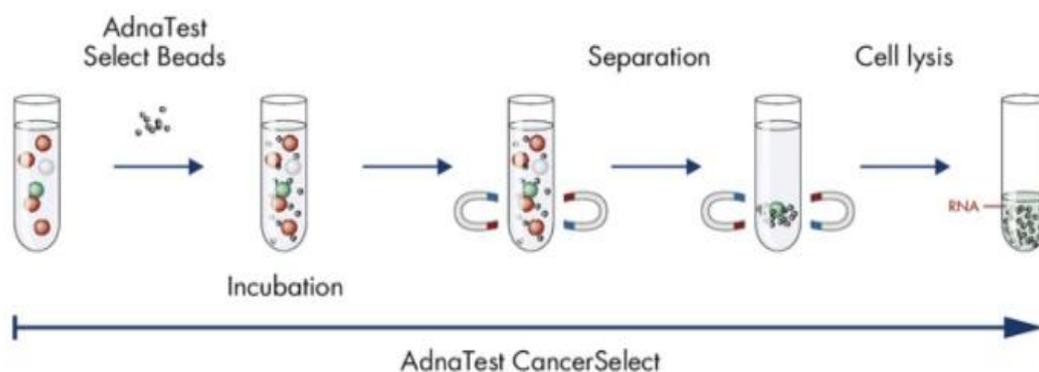


Figura1. Esquema del protocolo de preparación de CTCs (**AdnaTest/Select-Qiagen**).

Protocolo CTCs (AdnaTest/Detect-Qiagen)

Preparación de las perlas Oligo(dT)₂₅:

Las perlas Oligo (dT)₂₅ están diseñadas para el aislamiento rápido de ARNm altamente purificado a partir de ARN total o directamente de extractos crudos de células, tejidos animales o vegetales. Las perlas se equilibraron a T° ambiente revisando que no tenga precipitado. Las perlas Oligo (dT)₂₅ se resuspendieron por pipeteo sin usar vortex. Se calculó el volumen de perlas para el total de muestras (20 µL por muestra, si es más de una agregar el 10%) y se transfirió a tubos de 1.5ml. Los tubos se colocaron en el AdnaMag-S y se incubaron por 1 minuto, el sobrenadante se retiró con una pipeta.

Lavado de perlas Oligo(dT)₂₅

Removimos los tubos del deslizador magnético AdnaMag-S para añadir el volumen original (20 µL.) de buffer de lisis a cada tubo y se resuspendió con cuidado para evitar la espuma, colocamos nuevamente los tubos en el AdnaMag-S por 1 minuto. El sobrenadante se retiró por completo con una pipeta (el proceso se repitió 2 veces más). Al final retiramos los tubos del concentrador AdnaMag-S y se resuspenden las perlas Oligo(dT)₂₅ en buffer de lisis al PBS al volumen original (20 µL Aprox.).

Aislamiento de ARNm

Primero equilibramos el buffer de lavado A y B (kit) a T° ambiente y luego colocamos 10 mM de tris-HCL en hielo. Se descongeló el agua libre de RNAsa. Se programó la estufa para microtubos a 50°C.

Procesamiento de muestras

Añadimos los 20 μL con las perlas Oligo (dT)₂₅ suspendidas en el buffer de lisis a cada tubo que contenía el lisado celular (muestra obtenida del protocolo de Adnatest/Select-Qiagen). Los tubos se colocaron en un rotador a 5 rpm por 10 minutos a T° ambiente. Los tubos se colocaron en el AdnaMag-S y las muestras se incubaron por 1 minuto a T° ambiente. Remover el sobrenadante sin tocar las perlas y retirar los tubos.

Lavado A

Se añadió a cada tubo 100 μL de buffer de lavado A y se resuspendieron las perlas por pipeteo repetitivo, con cuidado para evitar la pérdida de perlas. Se colocaron los tubos en el AdnaMag-S y se incubó por 1 minuto a T° ambiente, remover el sobrenadante (repetir 1 vez más).

Lavado B

Los tubos se removieron del AdnaMag-S y se añadió 100 μL de buffer de lavado B y se resuspendieron las perlas por pipeteo. Se colocaron los tubos en el AdnaMag-S y se incubaron por 1 minuto a T° ambiente. El sobrenadante se retiró por completo con una pipeta cuidadosamente (esto se repitió una vez más). Se extrajeron los tubos del AdnaMag-S y se añadió 10mM Tris-HCL a cada tubo, enseguida se resuspendieron las perlas por pipeteo. Se ubicaron los tubos en el AdnaMag-S y se incubaron por 1 minuto a T° ambiente. Se retiró el sobrenadante por completo con una pipeta y se retiraron los tubos del AdnaMag-S. Una vez formado el complejo perlas/ARNm, este fue resuspendido en 29.5 μL de agua molecular y se colocaron los tubos a incubar en el termobloque a 50°C por 5 minutos.

Terminada la incubación se colocaron los tubos en hielo por 2 minutos para posteriormente continuar con la transcriptasa reversa.

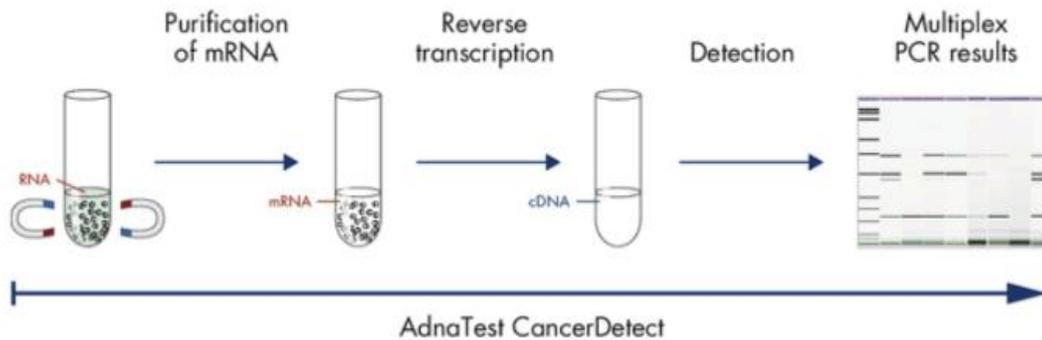


Figura2. Esquema de protocolo de CTCs (**AdnaTest/Select-Qiagen**)

Transcriptasa Reversa

Se descongeló el buffer RT y los dNTPs a T⁰ ambiente y de mezclaron en vortex, se centrifugo brevemente y se almacenó en hielo hasta ser utilizados. Preparamos la master mix para RT en hielo. De acuerdo al número de muestras la Master Mix se preparó de la siguiente manera:

Tabla 3. Componentes necesarios para Retrotranscripción

Component			Volume
RT MASTER MIX	<i>Sensiscript</i> Reverse Transcriptasa Kit (Qiagen)	10x buffer RT	4.0 µL
		dNTPs	4.0 µL
		<i>Sensiscript</i> Reverse Transcriptasa (SRT)	2.0 µL
	RnaseInhibitor, 40ul(Promega)		0.5 µL
Samples	mRNA/bead-complex or RT Control (Rnase-free water)		29.5 µL
Total volume			40.0 µL

Se pasó por vortex la Master Mix de RT, centrifugando brevemente y pipeteando 10.5 µL de la reacción para cada tubo de 0.2 ml de PCR+29.5 µL de la muestra o control. Resuspender el complejo perlas/ARNm (muestra) cuidadosamente con una pipeta y se transfirió el volumen total en el tubo de 0.2 ml que contiene la

Master Mix de RT y se homogenizó. El DNAC se sintetizó en el Termociclador *MastercyclerNexusGradient (Eppendorf)* según las siguientes condiciones de ciclaje: 1 ciclo a 37°C por 60 minutos, 1 ciclo a 93°C por 5 minutos y dejar a 4°C hasta retirar los tubos de termociclador. El DNAC sintetizado será almacenado a -20°C por un tiempo máximo de cuatro semanas.

PCR Multiplex EMT-2

El *PrimerMix EMT-2* permite la detección y caracterización de tres genes relacionados a EMT: PI3K α de 551 pares de bases, Akt-2 de 309 pares de base y TWIST1 de 201 pares de bases y la caracterización de un gen control: β -Actina de 120 pares de bases. El *PrimerMixStemCell* amplifica el gen ALDH1 de 161 pares de bases. El *PrimerMixBreastDetect* permite la detección de tres genes relacionados a cáncer de mama: MUC-1 de 299 pares de bases, HER-2 de 265 pares de bases y GA733-2 de 395 pares de bases y la detección de un gen control: β -Actina de 120 pares de bases.

Para la amplificación de los genes relacionados a la EMT y a células madre del tumor, se realizó la PCR multiplex según la **Tabla 4**.

Tabla 4. Componentes necesarios para la amplificación de genes relacionados a EMT-2 y a células madre

Component		Volume
PCR Master Mix	HotStarTaq Master Mix	12.5 μ L
	Rnase-free water	4.5 μ L
	PrimerMix EMT-2 {11}	4.0 μ L
Samples	cDNA or RT Control or Negative Control (Rnase-free water) or Positive Control EMT-2 {12}	4.0 μ L
Total volume		25.0 μ L

Amplificación de antígenos asociados al cáncer de mama

Para esto se realizara la PCR según las siguientes condiciones.

Tabla 5.: Componentes necesarios para la amplificación de antígenos asociados al tumor

Component		Volume
PCR Master Mix	HotStarTaq Master Mix	25.0 μ L
	Rnase-free water	13.0 μ L
	<i>PrimerMixBreastDetect</i> {8}	4.0 μ L
Samples	cDNA or RT Control or Negative Control (Rnase-free water) or Positive Control Breast (C+) {9}	8.0 μ L
Total volume		50.0 μ L

Se utilizó el Termociclador *Mastercycler Nexus Gradient* (Eppendorf) para la amplificación de los genes siguiendo el siguiente ciclaje de PCR. Para la amplificación del *PrimerMix EMT-2* y del *Primer Mix Breast Detect*: 1 ciclo a 95°C por 15 minutos para la activación de la polimerasa, 35 ciclos a 94°C por 0.5 minutos para la denaturación de las hebras de ADN, 60°C por 0.5 minutos para la hibridación de los cebadores y 72°C por 1 minutos para la extensión del templado, finalmente 1 ciclo a 72°C por 10 minutos para la extensión final. Para la amplificación del *Primer Mix Stem Cell*: 1 ciclo a 95°C por 15 minutos para la activación de la polimerasa, 35 ciclos a 94°C por 0.5 minutos para la denaturación de las hebras de ADN, 51°C por 0.5 minutos para la hibridación de los cebadores y 72°C por 0.5 minutos para la extensión del templado, finalmente 1 ciclo a 72°C por 5 minutos para la extensión final.

9.8 Análisis de fragmentos

El análisis de los fragmentos amplificados se realizó mediante una corrida electroforética de gel de agarosa al 4%. Esta prueba es considerada positiva si el producto de PCR expresa al menos uno de los factores de transcripción asociado al tumor o relacionado al gen de células madre. Para esta prueba será necesario recurrir al uso del Bioanalizador Agilent 2100 (© Agilent Technologies, Inc.), este equipo, a través de un software específico del mismo, nos ayuda a controlar las funciones del bioanalizador y presentar los resultados de los datos generados durante el análisis de ADN, ARN proteínas o células, en nuestro caso ADNc, esto permite que en combinación con el Kit Labchip se incremente la sensibilidad. A continuación se especifican los pasos de preparación del

DNAchip y sus componentes.

9.9 Preparación del mix del gel col. orante

Se equilibró a T° ambiente el colorante de ADN (azul) y la matriz del gel de DNA (tapa roja) por 30 minutos antes de usarlo. Se agregaron 25 µL de col. orantes de ADN (tapa azul) a la matriz del gel de DNA (tapa roja). Se pasó por vortex la solución y se pasó por el homogenizador giratorio. La solución se transfirió a un filtro giratorio y se centrifugó a 2240g+/- 20% por 15 minutos. Almacenar a -4°C.

Carga del mix del gel col. orante al chip (para 12 muestras)

Antes de cargar el chip debemos tener en consideración que dentro de las 12 muestras incluyen los controles +/- y la FRT (falsa retrotranscripción). Se equilibró el gel colorante a T° ambiente y se colocaron 9 µL del gel en el chip de DNA ubicado en el soporte. Ubicamos la jeringa de 1ml en el embolo del soporte presionando y manteniendo la presión por 1 minuto con el fin de expandir el gel en la base del chip de DNA. Se agregaron 9 µL más en cada G no sombreada del chip y así quedó preparado el chip.

Cargar el marcador del chip

Pasar por vortex el marcador (tapa verde) y agregar 5 µL a cada posición del chip menos los pocillos marcados con la letra G, ya que en esos pocillos irán las soluciones de acondicionamiento y decoloración.

Cargar la solución estándar y la muestra al chip

Se agregó 1 µL de solución estándar (tapa amarilla) en el pocillo marcado con una escalera. Posteriormente se agregó 2 µL de cada muestra en los pocillos y se pasó por vortex a 2400 rpm por 1 minuto. Se procedió a correr el chip con el programa.

Cargar el programa del bioanalizador

Se colocó el chip en el puerto 1. Para calibrar el equipo Bioanalizador se completaron los siguientes pasos según software: test >pestaña de diagnóstico >electrodo/diodo test >start>ok

X. ASPECTO ÉTICO

- **Consentimiento Informado;** los pacientes y en caso de ser necesario también sus familiares, fueron informados en forma clara y precisa sobre el estudio del que fueron partícipes, así como de los riesgos y beneficios de la donación voluntaria de una muestra de sangre periférica.
- **Voluntariedad;** para respetar la autonomía de los participantes, enfatizamos en que la participación fue completamente voluntaria. Ellos podían retirarse del estudio en cualquier momento, esta decisión obviamente no estaba condicionada a la atención médica que se les brindó.
- **Protección de las personas con autonomía disminuida;** este estudio no tuvo ningún riesgo físico, dado que es un estudio no invasivo. Las pacientes con cáncer de mama que no pueden dar consentimiento informado, podían ser incluidos en el estudio si su representante legal o familiar responsable autorizaba su participación.

XI. RESULTADOS

a. Variables Sociodemográficas

En este estudio participaron pacientes mujeres mayores de 18 años diagnosticadas con Cáncer de Mama Triple Negativo. A ellas se les tomó la muestra de sangre según lo descrito en la metodología. El promedio de edad de este grupo de pacientes fue de 51 años perteneciente al rango de 50-60 años que fue el rango que presentó mayor cantidad de pacientes (9 pacientes) que significaban el 32.14%. El rango de 20-30 años con 2 pacientes tuvo el 7.14%, de 30-40 años con 4 pacientes representa el 14.29% de la población, el rango de 40-50 fue el segundo con más pacientes con 6, que equivale al 21.43%, de 60-70 años presentaron un porcentaje de 17.86% que incluyen a 5 pacientes, y los rangos más bajos fueron de 70-80 años y 80-90 años con 1 solo paciente cada uno que representan 3.57% del total de pacientes respectivamente.

La edad al momento del diagnóstico solo presenta una diferencia de 1 a 2 años menos que la edad actual de la paciente, manteniendo valores similares a los previamente descritos, la única variación fue el promedio de edad al momento del diagnóstico que fue de 50 años. Esto es debido a que los pacientes incluidos en el estudio son pacientes nuevos, recién diagnosticados que acuden al Instituto.

A su vez, el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, atiende pacientes a nivel nacional. La procedencia de las pacientes que participaron en este estudio, está detallado en el siguiente cuadro:

Según la procedencia, la mayoría de pacientes tratados resultaron residentes de la ciudad de Lima con un 35.71% (10 pacientes), seguidos por Ayacucho y Tacna ambos con el 10.71% (3 pacientes cada ciudad), las ciudades de La Libertad, Arequipa y Piura presentaron el 7.14% del total (2 pacientes cada ciudad) y por último las ciudades de Cajamarca, Ancash, Moquegua, Cusco, Ica y Huancavelica solo representaron el 3.57% cada una (1 paciente cada ciudad).

b. Variables Clínico – Patológicas

Cuando evaluamos el grado histológico (tabla 8), claramente se observa una gran mayoría de tumores en grado 3 (85.72%) indicándonos que las pacientes presentan un tumor pobremente diferenciado con un alto índice de mitosis, por otro lado los grados 1 y 2 presentan 2 pacientes cada uno (que representan el 7.14% c/u) bien y moderadamente diferenciado respectivamente.

Las pacientes con un grado histológico 3, presentan un cáncer en estadio avanzado y usualmente reciben tratamientos agresivos que ayudan a retrasar el avance de la enfermedad. En la mayoría de los casos, los tratamientos tienden a presentar una buena respuesta al inicio del mismo ya que las células tumorales necrosan con rapidez, observando una mejoría en la clínica del paciente.

La mayoría de las pacientes (92.86%) presentó un subtipo histológico de tipo ductal (tabla 9), el cual es una proliferación clonal masiva de células epiteliales que diseminan por el sistema ductal, producen lesiones extensas que afectan toda la mama pero que rara vez producen secreción por el pezón. Por otro lado el 7.14% de las pacientes presento el subtipo histológico Mucinoso, que es de estructura coloide, blanda y elástica, con bordes compresivos bien diferenciados, sus células tumorales se presentan en cúmulos dentro de lagos de mucina.

Respecto al tamaño del tumor al momento de la evaluación clínica al diagnóstico (tabla 10), los datos muestran una mayoría para tumores con un tamaño menor a 3 cm (53.57%), mientras que los tumores con tamaño de 4-6 cm y de 10-12cm representan cada uno el 17.86% de la población de estudio respectivamente. Por último los pacientes con tumores con un tamaño de 7-9 cm tienen una menor participación con el 10.71%. De toda la población analizada, el 35.71% presentó tumores con un tamaño ≥ 5 cm.

El 75% de las pacientes (21) fueron sometidas a cirugía previa al tratamiento (tabla 11); dentro de las cirugías practicadas fueron 9 tumorectomías que corresponden al 32.14% de pacientes, a pesar de que esta cirugía resección parte de tejido sano circundante y algunos ganglios linfáticos siempre se conserva parte del seno. Por otro lado la cirugía más practicada fue la mastectomía con 12 pacientes que equivale al 42.86% de los pacientes; a diferencia de la tumorectomía, la mastectomía resección totalmente el seno incluyendo todo el tejido mamario y en ocasiones otros tejidos cercanos. El 25%

(7 pacientes) no fueron sometidas a cirugía. El 25% no se realizaron ninguna cirugía, pero si recibieron tratamiento con quimioterapia (5) o radioterapia (1), solo 1 no recibió tratamiento terapéutico ni cirugía.

Cuando se revisa el estadio clínico (EC), el 28.6% de las pacientes presentaron un EC IIA, el segundo mayor porcentaje fue el EC IIB con un total de 21.4%. El EC IV (que es un EC metastásico) se presentó en el 17.9% de pacientes. El EC IA (tumor pequeño e invasivo) represento el 14.3%. El EC IIIA (tumor diseminado a los ganglios) se mostró en el 10.7% de pacientes participantes. Por último el EC IIIB (posible diseminación del tumor a otros tejidos) que incluye el 7,1% de las pacientes (tabla 12).

c. Células Circulantes Tumorales

Se identificó la presencia de CTC en 11 de los 28 (39.3%) pacientes con CMTN: 45.5% (5/11) neoadyuvantes y 54.5% (6/11) adyuvantes. El subtipo histológico ductal se presentó en la mayoría de casos (90.9%), excepto en uno. El grado histológico III fue el más frecuente (81.8%). El estadio tumoral II y el estadio ganglionar I se encontró en la mayoría de casos con 54.5% respectivamente. Solo 1 (9.1%) tuvo metástasis a distancia (pulmón). Dentro del grupo de estadio clínico, el I y el II fueron los más frecuentes (54.5%). Solo 10 tuvieron algún tipo de cirugía, mastectomía (70.0%) o tumorectomía (30.0%), el que no se realizó la cirugía fue el que tuvo cáncer de mama avanzado (EC: IV) con metástasis al pulmón. El estadio ganglionar patológico cero (pN0) se obtuvo en el 70% de los casos. En el 90% de los casos no se encontró invasión linfovascular ni perineural, respectivamente. Dos pacientes tuvieron recaída (18.2%) pero solo 1 de estos falleció (9.1%). No se encontró diferencias significativas entre la presencia de CTC con las características clínico-patológicas estudiadas ($p > 0.05$) (Tabla 3).

En el grupo de muestras CTC positivas (11/28), el 27.3% fueron positivos para ALDH1 (marcador de células madre tumoral), el 36.4% fueron positivas para la detección de al menos uno de los marcadores de la EMT (TWIST1, AKT-2 o PI3K α) y 54.5% de al menos uno de los marcadores de cáncer de mama (MUC1, GA733-2 o HER2) (Tabla 15).

De los 28 pacientes solo a 8 se les tomó nuevamente una muestra de sangre después del tratamiento terapéutico y quirúrgico (4 neoadyuvante y 4 adyuvantes). Solo 1 caso se mantuvo negativo para CTC pre y post tratamiento (12.5%) y 3 fueron positivos para CTC pre y post tratamiento (37.5%); de estos

3, todos fueron ductales y de grado histológico III, el estadio clínico II fue el más común y ninguno presentó ganglios positivos ni invasión linfovascular y/o perineural en la cirugía. Solo 1 de ellos tuvo una recaída a nivel locoregional (33.3%), los otros se encuentran en controles en el INEN. Tres casos que fueron negativos para CTC antes del tratamiento resultaron positivos después del tratamiento (37.5%); todos fueron ductales y de grado histológico III, el estadio clínico II fue el más común y ninguno presentó ganglios positivos ni invasión linfovascular y/o perineural en la cirugía. Ninguno tuvo recaída ni falleció, actualmente se encuentran en controles en el INEN. Un caso positivo de CTC antes del tratamiento resultó negativo después del tratamiento (12.5%); fue ductal y de grado histológico III, no se operó debido a que el cáncer estaba muy avanzando (EC: IV).

Las tablas 16 y 17 muestran los análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión (o tiempo libre de progresión). Los datos de seguimiento fueron tomados hasta el momento de la última cita clínica o fecha de muerte. Los análisis estadísticos en la supervivencia global mostraron un tiempo medio de seguimiento de 27.79 meses y una asociación significativa con el tipo de paciente ($p = 0.009$), estadio tumoral ($p = 0.001$), estadio ganglionar ($p < 0.001$), metástasis ($p = 0.002$) y estadio clínico ($p = 0.004$). La detección de CTC en sangre periférica no está correlacionada positivamente con la supervivencia global ($p = 0.433$). Con respecto a la supervivencia libre de progresión, se encontró un tiempo medio de seguimiento de 23.31 meses y una asociación significativa con el estadio ganglionar ($p = 0.003$) y clínico ($p = 0.009$). De esta forma, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró que la presencia de CTC en sangre periférica no estaba asociada a una supervivencia de la población ni la progresión de la enfermedad (Tabla 16 y 17).

XII.DISCUSIÓN

Mundialmente el CMTN corresponde a un grupo heterogéneo de tumores. La principal característica clínica es su agresividad, presentando tasas más altas de recurrencia y una elevada mortalidad sobre todo cuando hay enfermedad residual. Por lo tanto, debido a esto y a la elevada frecuencia de casos de este subtipo en el Perú (Zaharia, M. y col. 2015) es de gran importancia el estudio de biomarcadores. Las CTC como biomarcadores presentan características genéticas derivadas del tumor primario que pueden dar a conocer la situación actual de la enfermedad y la toma de decisiones médicas a través de procedimientos clínicos no invasivos para el paciente (Aktas, B., y 2009).

Diversos estudios sugieren que la diseminación de CTC es más frecuente en pacientes con CMTN (Banys M, y col. 2014 y Fehm T, Hoffmann, y col. 2009). Así mismo, la mayoría de los estudios relacionados con CTC se han realizado en cáncer de mama metastásico donde encuentran diferencias significativas en los porcentajes de detección de CTC entre pacientes metastásicos y no metastásicos. Sólo pocos estudios han evaluado CTC en cáncer de mama en etapa inicial encontrándose entre los mas relevantes los realizados por: Baker, Mk. y col. 2003 , Aktas, B. y col. 2009 y Bidard, F-C y col. 2008.

Por otro lado según Carter, CL. y col. uno de los principales factores de pronóstico para CM es tamaño tumoral, estado fuertemente vinculado al desarrollo y prognosis de la enfermedades así que se puede observar una supervivencia libre de cáncer de hasta 5 años en tumores con tamaño menor a 0.5 cm en el 95% de pacientes y se reduce al 80% en pacientes que presentan un tamaño tumoral de más de 5 cm (Carter CL. y col. 1989) es así que el estudio *“Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence”* de Dent, R. y col. Adquiere relevancia cuando se evalúa a una población de 1.601 pacientes con cáncer de mama, diagnosticadas entre los años 1987 y 1997 en el Women's College Hospital de Toronto. Donde el método usado para la detección fue mediante imágenes (mamografía o ultrasonido) y mediante la

detección clínica (médico o paciente). En este estudio se encontró que los pacientes dentro de la categoría CMTN tuvieron tumores relativamente grandes (dos tercios eran mayores de 2 cm). Hallazgo similar al obtenido en el presente donde el 53.57% de los tumores estuvieron comprendidos en un rango de 1 a 3cm y el resto de la población presentó tumores de 4 a 12 cm.

Las CTC, se estiman presentes en el 70-100% de los pacientes con metástasis, y en el 46-71% de pacientes con afectación local. Además, se ha observado que en estadios tempranos de cáncer pueden encontrarse, en promedio, 16 CTC en 20 mL de sangre (Iakovlev, VV. y col. 2008). Los resultados obtenidos en nuestra población de pacientes con CMTN muestran que la detección de CTC no se produce solo en los pacientes con cáncer avanzado, T4, (17.9%) sino también en pacientes con tumores pequeños, T1, (14.3%), el estadio clínico avanzado (III y IV) se presentó en el 42.9%. El hecho de que los resultados en nuestro estudio no muestren diferencias significativas entre el cáncer de mama metastásico y no metastásico con respecto a la detección de CTC, podría estar influenciado por el hecho de que se incluyó en la población estudiada a pacientes, de origen heterogéneo, es decir, pacientes que habían recibido tratamiento previo como pueden ser: quimioterapia o radioterapia y pacientes que no lo han recibido.

Existen estudios que han intentado demostrar la correlación entre el estado de las CTC y los parámetros clínico-patológicos; los datos reportados son aun controvertidos (Lang, JE, y col. 2009 y Nadal Rios, R, y col. 2015). En nuestro estudio los resultados sugieren que no existe una asociación entre la presencia de CTC en sangre periférica y las características clínico-patológicas analizadas (**Tabla 15**). Esto se puede deber a la falta de datos (el número de pacientes es pequeño para sacar conclusiones significativas). Sin embargo, el tener un tamaño de muestra grande no asegura la correlación entre la presencia de CTC en sangre periférica y las características clínico-patológicas; el estudio realizado por Kasimir-Bauer y colaboradores en el 2012, con una población de 502 pacientes con cáncer de mama primario donde se detectó CTC en 97 de estos, no encontraron ninguna asociación significativa con las variables clínico-patológica (Kasimir-Bauer, S, y col. 2012).

A pesar del impacto pronóstico de la detección de CTC en el cáncer de mama, principalmente utilizando métodos de captura basados en EpCAM, se ha demostrado que este procedimiento no es capaz de detectar toda la población altamente heterogénea de CTC (Königsber, R, y col. 2011). Además, sus características biológicas son poco conocidas y supone que sólo unos pocos CTC pueden convertirse en metástasis clínicamente evidentes (Lianidou, E.S, y col. 2010). En nuestro estudio se detectó 11 muestras con CTC positivas (39.3%). Además, se analizaron 8 muestras pre y post tratamiento terapéutico; se encontró 1 caso positivo de CTC antes del tratamiento, que fue negativo después del tratamiento (12.5%), lo que indicaría que el tratamiento terapéutico fue idóneo y no generó resistencia. No se operó debido a que el cáncer estaba muy avanzando (EC: IV) y actualmente se encuentran en controles en el INEN. En el presente estudio se halló que 3 casos que fueron negativos para CTC antes del tratamiento y resultaron positivos después del tratamiento (37.5%), todos ellos eran cáncer de mama etapa inicial y ninguno tuvo recaída ni falleció. Al realizar la comparativa de estos 3 casos entre las imágenes (radiografías, ecografías, tomografías, etc.) y los resultados de CTC, si bien no se identifica la progresión de la enfermedad en diagnóstico por imágenes, por análisis de CTC se puede observar picos con baja concentración de ADN, no llega a ser significativo. Es posible que estos pacientes se hallan encontrado en estado de dormancia o latencia tumoral: periodo de tiempo, el cual puede ser desde pocos años a décadas, que transcurre desde que un paciente con cáncer se considera curado hasta que aparece la enfermedad metastásica. Es un periodo de restricción del crecimiento tumoral, en el cual existe una enfermedad residual presente pero se mantiene asintomática, es también llamada enfermedad mínima residual y hace referencia a la persistencia de células tumorales tras el tratamiento (Wills, L. y col. 2010 y Aguirre-Ghiso, JA, y col. 2010). Meng y colaboradores demostraron la presencia de CTC en sangre periférica de 36 pacientes con cáncer de mama que no presentaban evidencia clínica de la enfermedad tras 7 a 22 años de haber sido sometidos a mastectomía. Concluyeron que, debido a que las CTC tienen una vida media corta, debe existir un equilibrio entre replicación y muerte celular durante el tiempo de letargo tumoral, y este puede ser uno de los mecanismos que permite la latencia tumoral (Meng, S, y col. 2004).

Por último, 3 casos fueron positivos para CTC antes y después de sometidos a tratamiento (37.5%) pero sólo uno de ellos tuvo recaída a nivel loco-regional, todos ellos eran cáncer de mama etapa inicial y ninguno falleció. Esta positividad de CTC podría deberse a que los pacientes no eliminaron las células cancerosas de su sangre a pesar de la supresión del tumor primario (tratamiento quirúrgico y/o terapéutico), lo cual podría ser considerado un signo de falla y/o resistencia al tratamiento (Aaltonen, KE. Y col. 2017). Esto demuestra que las células cancerosas no siempre se eliminan mediante tratamiento o cirugía, lo cual se puede explicar por la presencia de un sitio secundario de cáncer que libera CTC en la sangre. Todavía quedan muchas preguntas sobre esta recurrencia positiva. La principal preocupación es si las micrometástasis existen mucho tiempo antes de que se detecten por su crecimiento.

La detección de CTC en cáncer de mama se ha establecido en varios estudios clínicos, mostrando una correlación con la sobrevida libre de progresión y la sobrevida global en cáncer de mama metastásico y primario antes del inicio del tratamiento (Cristofanilli, M. y col. 2004. Rack, B. y col. 2010. Pierga, J. y col. 2008). Un estudio prospectivo para evaluar la importancia pronóstica de la detección de CTC en pacientes con cáncer de mama avanzado incluyó 80 pacientes con los siguientes criterios: mujeres con diagnóstico histológico de cáncer de mama, empezando una nueva línea de tratamiento o tratamiento para la enfermedad avanzada, con un máximo de dos líneas de tratamiento. Al inicio del estudio se reportaron 49 pacientes que tenía ≥ 5 CTC en 7.5 mL de sangre total. El número de referencia de CTC se asoció con la sobrevida libre de progresión (HR 2.5, intervalo de confianza del 95%: 1.2 a 5.4). En la última extracción de sangre las pacientes con aumento o CTC persistentemente ≥ 5 demostraron mayor riesgo estadístico significativo de progresión que las pacientes con CTC < 5 (Sandoval, Gr, y col. 2014 y Nole, F, y col. 2007). Cristofanilli y colaboradores demostraron que la detección de CTC en pacientes metastásicos de cáncer de mama, antes de iniciar tratamiento con quimioterapia, es un factor pronóstico independiente de la enfermedad. Por lo tanto, en pacientes sometidos a quimioterapia neoadyuvante para cáncer de mama localmente avanzado, la detección de CTC antes de la quimioterapia es un factor pronóstico independiente para la sobrevida libre de progresión y global (Bidard, F-C. y col. 2008)

En el caso de pacientes metastásicos de cáncer de mama, existen varios estudios que demuestran el valor pronóstico de la detección de CTC, tanto antes como durante el tratamiento administrado, pero en cáncer de mama temprano los estudios son escasos. En cuanto a la detección de CTC en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos, se ha descrito que la presencia de CTC predice la recurrencia temprana y disminuye la supervivencia global (Pierga, J. y col. 2008 y Lucci A, y col. 2012) además el aumento en el recuento de CTC es un predictor de recaída en aquellos pacientes sometidos a quimioterapia adyuvante (Pachmann, K. y col. 2008). Aunque parece predecir la recaída de la enfermedad durante el tratamiento quimioterapéutico (Pierga, J. y col. 2008), es necesario realizar más estudios para estar seguros de su valor pronóstico (Bidard F-C. y col. 2009), así mismo, la cuantificación de CTC durante el tratamiento puede ser una herramienta útil para la estratificación de los pacientes y diseñar tratamientos dirigidos (Pachmann K. y col. 2009. y Hayes DF, y col. 2006).

En nuestra población, la detección de CTC en sangre periférica, no se correlaciona significativamente con la supervivencia global ni la progresión libre de enfermedad. Dado el número limitado de pacientes en cada grupo de tratamiento no se pueden sacar conclusiones definitivas en cuanto a los cambios de estado de las CTC en muestras pre y post tratamiento.

Se cree que es posible identificar pacientes con un peor pronóstico de desarrollo de la enfermedad mediante la detección de CTC (Kasimir-Bauer S, y col. 2016); aunque la cantidad disponible de estudios y datos hace necesario el realizar estudios con poblaciones con un mayor número de pacientes y con seguimientos prolongados para confirmar dicha teoría. Por lo tanto, es imperativo encontrar e identificar nuevos marcadores predictivos y de pronóstico de la enfermedad que puedan soportar la toma de decisiones sobre el tratamiento. Los resultados obtenidos sugieren que, debido al potencial tumorigénico y metastásico que tienen las CTC (Fehm T, y col. 2002 y Pretlow TG, y col. 2000), la detección de CTC en sangre periférica podría ser usado como un buen indicador para poder predecir la diseminación temprana de la enfermedad, pudiendo llevarnos a la identificación de subgrupos de pacientes con cáncer de mama con mayor riesgo.

Las muestras no detectables para CTC se observaron con más frecuencia en pacientes menores a 50 años y/o con alto grado histológico. Igual que en la enfermedad metastásica (excepto un caso), en pacientes con factores de mal pronóstico no se detectaron CTC. Esto podría deberse a que las CTC fueron capturadas, pero no detectadas mediante la metodología *AdnaTest*, y esto puede ser explicado por la baja carga tumoral presente. Es importante recalcar que los pacientes con receptores de hormonas negativos, grado alto de tumor, enfermedad triple negativa y cáncer de mama inflamatorio tienen mayores probabilidades de CTC indetectable (Nadal Rios R, y col. 2015).

Con respecto a la expresión de los genes, diversos estudios han encontrado CTC que presentan características de células madre tumoral en cáncer de mama primario y metastásico. En el estudio de Kasimir-Bauer y colaboradores, el 46% de las muestras de sangre CTC positivas y el 5% de CTC negativas dieron positivo para ALDH1, un marcador común de células madre (Kasimir-Bauer S, y col. 2012). Hallazgos similares han sido mostrados por Aktas y colaboradores en la situación metastásica. Además, demostró que la presencia de CTC similares a células madre en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama se asociaba con la resistencia a la terapia; los marcadores de células madre o factores EMT o ambos se detectaron en el 74% (25/34) de los que no respondieron y en el 10% (2/21) de los pacientes que respondieron al tratamiento sistémico (28). En el ensayo de Raimondi y col. colaboradores, analizaron 92 pacientes con cáncer de mama en cualquier estadio clínico y observaron que una sobreexpresión de marcadores de células madre en CTC se correlaciona con el estadio avanzado de la enfermedad (Raimondi C, y col. 2011). En la actualidad se cree que las células madre de cáncer son la causa de la resistencia a la terapia y el fracaso del tratamiento en el cáncer de mama (Monteiro, J. y col. 2010). Por lo tanto, la expresión alta de ALDH1 en tumores primarios es un predictor general de mal pronóstico, metástasis temprana y progresión en cáncer de mama (recaída) (Tomita H, y col. 2016). . Consecuentemente, las CTC con un fenotipo de célula madre podrían plantear un reto clínico a la hora de erradicar por completo la enfermedad mínima residual (Nadal Rios y col. 2015.) En nuestro estudio, 3 de las 11 muestras positivas para CTC presentaron fenotipo

de célula madre tumoral (ALDH1). De estas 3, sólo a 2 se les realizó la detección de CTC después del tratamiento y resultó negativas para CTC.

También es posible detectar los marcadores de EMT entre las CTC de pacientes con cáncer de mama temprano y metastásico. Mego y col. aboradores demostraron que los marcadores de EMT CTC positivos se pueden detectar en hasta el 26% de los pacientes con cáncer de mama metastásico (n=21). Además, una alta expresión de los marcadores EMT predijo una menor supervivencia libre de progresión en estos pacientes (73). Aktas y colaboradores demostraron en su ensayo en 39 pacientes con cáncer de mama metastásico que los marcadores EMT, como TWIST1, AKT-2 y PI3K α , se pueden detectar en hasta el 62% de las muestras de sangre positivas para CTC. Se deben tomar en cuenta a los marcadores EMT pues estos tenían mayor probabilidad de encontrarse en pacientes resistentes a la terapia, lo que sugirió una mayor invasividad de las células tumorales que se someten a este proceso. Curiosamente, las células sometidas a EMT también detectaron en la sangre del 7% de los pacientes negativos para CTC (Aktas B, y col. 2009). Hallazgos similares en cáncer de mama primario fueron presentados por Kasimir-Bauer y colaboradores; los marcadores de EMT se pudieron detectar en el 72% de los pacientes con CTC positivo y el 18% de los pacientes con CTC negativo (Kasimir-Bauer, S. y col. 2012). Raimondi y col. aboradores demostraron la expresión de los marcadores EMT en hasta el 38% de los pacientes con cáncer de mama con CTC negativo (Raimondi C, y col. 2011). En nuestro estudio, 4 de las 11 muestras positivas para CTC expresaron genes asociado a la EMT, 2 expresaron TWIST1, 1 AKT-2 y 1 PI3K α . En aquellas muestras que se les hizo la detección de CTC pre y post tratamiento (no son las mismas que las 4 anteriores), 7 de 8 sólo se detectaron después del tratamiento, TWIST1 (6) y PI3K (1).

Por último, 6 de las 11 muestras positivas para CTC expresaron genes asociado al cáncer de mama, 4 expresaron MUC1 y 2 GA733-2. De éstas, sólo 2 se les realizó la detección después del tratamiento y resultaron negativas para MUC1 y GA733-2 respectivamente. Se ha visto que MUC1 y GA733-2 también pueden expresarse mediante leucocitos activados, y la expresión del ARNm de este marcador no está, por lo tanto, restringida a CTC. Esto puede conducir a

resultados falsos positivos, en particular, en pacientes sometidos a terapias citotóxicas asociadas con la muerte celular masiva y la inducción de inflamación y otros procesos (como la autofagia) que afectan el estado de activación de los leucocitos (Müller V, y col. 2012). Entonces, podemos decir que la detección de CTC en sangre periférica por técnicas moleculares es controvertida, debido a que son técnicas que obtiene resultados variables, incluidos falsos positivos (Campos-Segura M. 2012). Los datos de expresión génica se obtienen a partir de una mezcla de CTC y leucocitos presentes en cada muestra de sangre periférica después del enriquecimiento de CTC con *AdnaTest*. Por lo tanto, parte de la expresión del gen detectado podría ser el resultado de los leucocitos presentes en la circulación del paciente y no de los CTC, debe tenerse en cuenta la posibilidad de expresión de marcadores derivados de leucocitos (Aaltonen KE, y col. 2017).

Finalmente se puede asumir que la expresión de los marcadores de EMT y células madre en CTC se asocia a la resistencia a las terapias anticancerígenas convencionales y al fracaso del tratamiento, destacando la urgencia de mejorar las herramientas para detectar y eliminar la enfermedad residual mínima (Monteiro J, y col. 2010). Es así que la idea actual es que los procesos de EMT, también en el tumor primario desempeñan un papel clave en los pasos de invasión de la cascada metastásica implicada en la generación de las llamadas células madre de cáncer de mama. (Mani SA, y col. 2008). En consecuencia, la detección de células parecidas a las de células madre tumoral y a las de EMT, junto con las asociadas al tumor primario, son recomendadas dada sus implicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Las vías de señalización que mantienen las células madre del cáncer, así como los factores de transcripción en la EMT son objetivos atractivos para estas terapias. No obstante, la ventaja de aplicar múltiples análisis basados en ADN, ARN y proteínas para estudiar células tumorales en la circulación (las denominadas biopsias líquidas) está actualmente restringida por la necesidad de plataformas complejas de aislamiento celular.

En un estudio "*Evaluating GA733-2 mRNA as a marker for the detection of micrometastatic breast cancer in peripheral blood and bone marrow*" (Zhong, XY

y col. 1999) evaluaron la posibilidad de usar el mRNA del gen GA733-2 como marcador tumoral, analizando muestras de pacientes sanos (medula ósea), y a pacientes afectados por diversos carcinomas, cáncer de mama, col. on-rectal y pulmonar. La detección por medio de la técnica de PCR, dio positivo para todos los pacientes evaluados menos para los pacientes con diagnóstico de CM (100% (8/8) de muestras de medula ósea, 40% (16/40) de muestras de sangre periférica de pacientes sanos y finalmente en el 100% (33/33) de muestras de medula ósea de pacientes con cáncer de mama, sin evidencia metastásico de la enfermedad. Finalmente estableciendo que el Mirna GA733-2 no es un marcador específico para la detección de células de cáncer de mama, estos datos difieren con los datos obtenidos en la presente investigación.

En el estudio *“Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system”* realizado por Andreopoulou E. y col. evaluaron dos sistemas diferentes para la detección de CTCs, siendo estos AdnaTest y CellSearch con un valor de recuperación de 2 CTCs/7.5 ml de sangre se obtuvo un 73% de coincidencia entre el AdnaTest y el CellSearch.

De esta forma encontraron que estos dos sistemas de detección tanto el AdnaTest y CellSearch son equivalentes para la detección de CTCs en pacientes con CM. Los datos indican que se logra la detección de CTCs en altas proporciones en los casos comparados considerando las diferencias tecnológicas entre ambos protocolos. Y esto a pesar que el AdnaTest dio resultados positivos en 9 casos en los que el protocolo de CellSearch no fue capaz de detectar CTCs, y en el caso inverso CellSearch encontró 6 casos positivos los cuales AdnaTest no logro detectar. Basado en los reportes recientes se encontró que la tasa de concordancia entre ambos sistemas tecnológicos fue de un 88%. Esto indica que el método empleado en el estudio presente es un método eficaz y eficiente para la búsqueda de los objetivos establecidos. Y si bien estos métodos de detección de CTCs son prometedores es necesario el realizar más estudios sobre CTC que permitan desarrollar sistemas más sensibles y en los cuales la precisión de detectar cáncer residual mínimo podría incluso incrementarse usando sistemas de captura más eficientes y ampliando

los paneles de marcadores de detección sin perder especificidades de análisis. Sin embargo, dichos estudios se extenderán solo cuando las tecnologías más prometedoras actualmente en desarrollo se comercialicen y estén ampliamente disponibles para la comunidad clínica y de investigación del cáncer.

XIII. CONCLUSIONES

- Se logró aislar células tumorales circulantes en 11 pacientes lo que representa 39.3% del total, pero se necesita una mayor población de estudio que permita perfeccionar la técnicas de detección de CTCs y su uso como biomarcadores.
- La edad promedio de edad en el presente estudio es de 51 años y como era de esperarse la mayor proporción de casos registrados a nivel nacional en el estudio se dio en la región Lima con el 35.71% de los casos totales.
- El grado histológico con mayor representación dentro de este estudio fue el Grado histológico 3 con el 85.72% así mismo el subtipo histológico más común dentro del presente estudio fue del tipo ductal con un 92.86% del total de paciente. El estadio clínico más común dentro del estudio fue el IIA con el 28.6%.
- El 21.43% de las pacientes del presente estudio arrojaron un resultado positivo para los genes MUC1, GA733-2.
- Es necesario realizar, más estudios sobre las biopsias líquidas debido a su conveniencia práctica y a que este procedimiento es menos invasivo para los pacientes y permite realizar seguimientos y evaluaciones sobre el curso de la enfermedad.

XIV. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios similares con un número mayor de pacientes, lo que permita obtener más datos acerca de la prevalencia de CMTN en el país así como la posible detección de CTCs en estos.
- Explorar la posibilidad para la detección de otros genes propios de las CTCs lo que podría permitir aumentar la especificidad y sensibilidad del ensayo de para la detección de CTCs
- Realizar una mayor cantidad de estudios en cuanto a la validez en cuanto al empleo de biopsias líquidas como método de detección de CM debido a que estas son más prácticas y menos invasivas.
- Comparar data con estudios realizados en otros países de similares condiciones a Perú.

XV. REFERENCIAS CITADAS

1. Aaltonen, K.E., Novosadova, V., Bendahl, P., Graffman, C., Larsson, A., & Rydén, L. (2017). Molecular characterization of circulating tumor cells from patients with metastatic breast cancer reflects evolutionary changes in gene expression under the pressure of systemic therapy. *Oncotarget*, 8 (28). doi: 10.18632 / oncotarget.17271
2. Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R., & Kasimir-Bauer, S. (2009). Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 11(4). doi:10.1186/bcr2333.
3. Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), 834-846. doi:10.1038/nrc2256.
4. Alix-Panabieres, C., Riethdorf, S., & Pantel, K. (2008). Circulating Tumor Cells and Bone Marrow Micrometastasis. *Clinical Cancer Research*, 14(16), 5013-5021. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-5125.
5. Andreopoulou, E., Yang, L., Rangel, K. M., Reuben, J. M., Hsu, L., Krishnamurthy, S., Cristofanilli, M. (2011). Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system. *International Journal of Cancer*, 130(7), 1590-1597. doi:10.1002/ijc.26111
6. Apostolou, P., Papadimitriou, M., & Papatotiriou, I. (2017). Stemness Gene Profiles of Circulating Tumor Cells. *Journal of Cancer Therapy*, 08(02), 155-167. doi:10.4236/jct.2017.82013.
7. Desai, K. A. (2012). Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hereditary Genetics*. doi:10.4172/2161-1041.s2-001.
8. Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the

- so-called triple-negative phenotype. *Cancer*, 109(9), 1721-1728. doi:10.1002/cncr.22618.
9. Baker MK, Mikhitarian K, Osta W, Callahan K, Hoda R, Brescia F. (2003). Molecular detection of breast cancer cells in the peripheral blood of advanced-stage breast cancer patients using multimarker real-time reverse transcription-polymerase chain reaction and a novel porous barrier density gradient centrifugation technology. *Clinical Cancer Research*; 9(13):4865-71.
 10. Banys, M., Krawczyk, N., & Fehm, T. (2014). The Role and Clinical Relevance of Disseminated Tumor Cells in Breast Cancer. *Cancers*, 6(1), 143-152. doi:10.3390/cancers6010143.
 11. Bidard, F., Vincent-Salomon, A., Gomme, S., Nos, C., Rycke, Y. D., Thiery, J. P., Pierga, J. (2008). Disseminated Tumor Cells of Breast Cancer Patients: A Strong Prognostic Factor for Distant and Local Relapse. *Clinical Cancer Research*, 14(11), 3306-3311. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-4749.
 12. Butler TP, Gullino PM. (1975). Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer research*; 35(3):512-6.
 13. Cáceres, G., Puskas, J. A., & Magliocco, A. M. (2015). Circulating Tumor Cells: A Window into Tumor Development and Therapeutic Effectiveness. *Cancer Control*, 22(2), 167-176. doi: 10.1177/107327481502200207.
 14. Campos-Segura M. (2012). Utilidad pronóstica de la detección de células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con tumores sólidos de origen epitelial: Jaén: Universidad de Jaén, España.
 15. Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Millikan, R. C. (2006). Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*, 295(21), 2492. doi:10.1001/jama.295.21.2492.
 16. Carter CL, Allen C, Henson DE. (1989). Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer research*; 63:181-187.

17. Jerusalem, G., Collignon, J., Schroeder, H., & Lousberg, L. (2016). Triple-negative breast cancer: Treatment challenges and solutions. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 93. doi:10.2147/bctt.s69488.
18. Criscitiello, C., Azim, H. A., Schouten, P. C., Linn, S. C., & Sotiriou, C. (2012). Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*, 23(Suppl 6), Vi13-Vi18. doi:10.1093/annonc/mds188
19. Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., Hayes, D. F. (2004). Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(8), 781-791. doi:10.1056/nejmoa040766.
20. Leij, L. D., Helrich, W., Stein, R., & Mattes, M. J. (1994). SCLC-cluster-2 antibodies detect the pancarcinoma/epithelial glycoprotein EGP-2. *International Journal of Cancer*, 57(S8), 60-63. doi:10.1002/ijc.2910570713.
21. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429-4434. doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-3045
22. Prolla, C. M., Silva, P. S., Netto, C. B., Goldim, J. R., y Ashton-Prolla, P. (2015). Conocimiento sobre el cáncer de mama y el cáncer de mama hereditario entre las enfermeras de un hospital público. *Revista Latino-Americana De Enfermagem*, 23 (1), 90-97. doi:10.1590/0104-1169.0185.2529
23. Elston CW, Ellis IO (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up. *Histopathology*; 19: 403-410.
24. Fehm, T., Hoffmann, O., Aktas, B., Becker, S., Solomayer, E. F., Wallwiener, D., Kasimir-Bauer, S. (2009). Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Research*, 11(4). doi:10.1186/bcr2349.
25. Lianidou, E. S., Mavroudis, D., Sotiropoulou, G., Agelaki, S., & Pantel, K. (2010). Whats new on circulating tumor cells? A meeting report. *Breast Cancer Research*, 12(4). doi:10.1186/bcr2601.

26. Gerges, N., Rak, J., & Jabado, N. (2010). New technologies for the detection of circulating tumor cells. *British Medical Bulletin*, 94 (1), 49-64. doi: 10.1093 / bmb / Idq011.
27. Giuliano, M., Giordano, A., Jackson, S., Giorgi, U. D., Mego, M., Cohen, E. N., Cristofanilli, M. (2014). Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Research*, 16 (5). doi: 10.1186 / s13058-014-0440-8.
28. Graves, H., & Czerniecki, B. J. (2011). Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients: An Evolving Role in Patient Prognosis and Disease Progression. *Pathology Research International*, 2011, 1-7. doi: 10.4061 / 2011/621090.
29. Greenburg G, Hay ED. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 95:333-9. 3.
30. Hauch, Siegfried & Zimmermann, Silke & Lankiewicz, Silke & Zieglschmid, Veit & Boecher, Oliver & Hans Albert, Winfried. (2007). The Clinical Significance of Circulating Tumour Cells in Breast Cancer and Colorectal Cancer Patients. *Anticancer research.* 27. 1337-41.
31. Hayes, D. F. (2006). Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival. *Clinical Cancer Research*, 12 (14), 4218-4224. doi: 10.1158 / 1078-0432.ccr-05-2821.
32. Hay, E. (1995). Una visión general de la transformación epitelio-mesenquimal. *Cells Tissues Organs*, 154 (1), 8-20. doi: 10.1159 / 000147748.
33. Imigo F., Mansilla E., Delama I., Poblete M., Fonfach C. (2011). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Rev. Cuad. Cir.* 2011; 25: 67-74.
34. Instituto Nacional de Estadística y Geografía {INAGI} (2015). Día Mundial del Cáncer. México.
35. Iakovlev, V. V., Goswami, R. S., Vecchiarelli, J., Arneson, N. C., y Done, S. J. (2007). Detección cuantitativa de células epiteliales circulantes por

- Q-RT-PCR. *Investigación y tratamiento del cáncer de mama*, 107 (1), 145-154. doi: 10.1007 / s10549-007-9532-9.
36. Ismail-Khan, R., & Bui, M. M. (2010). A Review of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Control*, 17 (3), 173-176. doi: 10.1177 / 107327481001700305.
 37. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer Statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60 (5), 277-300. doi: 10.3322 / caac.20073.
 38. Joensuu, H., & Gligorov, J. (2012). Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Annals of Oncology*, 23 (Suppl 6), Vi40-Vi45. doi: 10.1093 /annonc / mds194.
 39. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.*2009; 119(6):1420-8. 5.
 40. Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119 (6), 1420-1428. doi: 10.1172 / jci39104.
 41. Lang, J.E., Mosalpuria, K., Cristofanilli, M., Krishnamurthy, S., Reuben, J., Singh, B., Lucci, A. (2008). HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 113 (3), 501-507. doi: 10.1007 / s10549-008-9951-2.
 42. Lucci, A., Hall, C.S., Lodhi, A.K., Bhattacharyya, A., Anderson, A.E., Dai, L., Krishnamurthy, S. (2012). Circulating tumor cells in non-metastatic breast cancer: A prospective study. *The Lancet Oncology*, 13 (7), 688-695. doi: 10.1016 / s1470-2045 (12) 70209-7.
 43. Kasimir-Bauer, S., Hoffmann, O., Wallwiener, D., Kimmig, R., & Fehm, T. (2012). Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Research*, 14 (1). doi: 10.1186 / bcr3099.
 44. Königsberg, R., Obermayr, E., Bises, G., Pfeiler, G., Gneist, M., Wrba, F., Dittrich, C. (2011). Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncologica*, 50 (5), 700-710. doi: 10.3109 / 0284186x.2010.549151.

45. Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology*, 172 (7), 973-981. doi: 10.1083 / jcb.200601018.
46. Lozano-Ascencio, R., Gómez-Dantés, H., Lewis, S., Torres-Sánchez, L., & López-Carrillo, L. (2009). Tendencias del cáncer de mama en América Latina y el Caribe. *Salud Pública De México*, 51. doi:10.1590/s0036-36342009000800004
47. Villegas, L. F., Perez, N.M., Lazaro, M.V., Maria Luisa Master De Las Casas, Fernandez, S.R., & Castro, S.V. (2011). Current and future techniques in the quantification of circulating tumor cells: Their importance in solid epithelial tumors. *Clinical Laboratory Journal*, 4 (3), 163-169. doi: 10.1016 / j.labcli.2010.11.007.
48. Mani, S.A., Guo, W., Liao, M., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y. , Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133 (4), 704-715. doi: 10.1016 / j.cell.2008.03.027.
49. Meng, S. (2004). Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. *Clinical Cancer Research*, 10 (24), 8152-8162. doi: 10.1158 / 1078-0432.ccr-04-1110.
50. Ministerio de Salud. (2013). Análisis de la situación del cáncer en el Perú. MINSAL 2013.
51. Monteiro, J., & Fodde, R. (2010). Cancer stemness and metastasis: Therapeutic consequences and perspectives. *European Journal of Cancer*, 46 (7), 1198-1203. doi: 10.1016 / j.ejca.2010.02.030.
52. Morán Mendoza E, Rodríguez Gallegos J, Lara Lozano M, Piña Leyva C, Thompson Bonilla MR, Rosas Sandoval G y col. Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico. *RevEspMedQuir* 2014;19:45-51.
53. Müller, V., Riethdorf, S., Rack, B., Janni, W., Fasching, P.A., Solomayer, E., Fehm, T. (2012). Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System [™] and AdnaTest Breast [™] in metastatic breast cancer patients: The DETECT study. *Breast Cancer Research*, 14 (4). doi: 10.1186 / bcr3243.

54. Nadal Rios R, Rosell R, Serrano MJ, Solé F, Esteban R. (2015). Caracterización molecular de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama.
55. Nielsen, T. O.(2004). Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10 (16), 5367-5374. doi: 10.1158 / 1078-0432.ccr-04-0220.
56. Nole, F., Munzone, E., Zorzino, L., Minchella, I., Salvatici, M., Botteri, E., Sandri, M. T. (2008). Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *Annals of Oncology*, 19 (5), 891-897. doi: 10.1093 / annonc / mdm558.
57. Niv, Y. (2008). MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations. *World Journal of Gastroenterology*, 14 (14), 2139. doi: 10.3748 / wjg.14.2139.
58. O'brien, K. M., Cole, S. R., Tse, C., Perou, C. M., Carey, L. A., Foulkes, W. D., Millikan, R. C. (2010). Intrinsic Breast Tumor Subtypes, Race, and Long-Term Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clinical Cancer Research*, 16(24), 6100-6110. doi:10.1158/1078-0432.ccr-10-1533
59. Papatotiriou, I., Chatziioannou, M., Pessiou, K., Retsas, I., Dafouli, G., Kyriazopoulou, A., Apostolou, P. (2015). Detection of Circulating Tumor Cells in Patients with Breast, Prostate, Pancreatic, Colon and Melanoma Cancer: A Blinded Comparative Study Using Healthy Donors. *Journal of Cancer Therapy*, 06 (07), 543-553. doi: 10.4236 / jct.2015.67059.
60. Pachmann, K., Camara, O., Kavallaris, A., Krauspe, S., Malarski, N., Gajda, M., Höffken, K. (2008). Monitoring the Response of Circulating Epithelial Tumor Cells to Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Allows Detection of Patients at Risk of Early Relapse. *Journal of Clinical Oncology*, 26 (8), 1208-1215. doi: 10.1200 / jco.2007.13.6523.
61. Pierga, J., Bidard, F., Mathiot, C., Brain, E., Delaloge, S., Giachetti, S., . . . Marty, M. (2008). Circulating Tumor Cell Detection Predicts Early Metastatic Relapse After Neoadjuvant Chemotherapy in Large Operable and Locally Advanced Breast Cancer in a Phase II Randomized Trial. *Clinical Cancer Research*, 14 (21), 7004-7010. doi: 10.1158 / 1078-0432.ccr-08-0030.

62. Penault-Llorca, F., & Viale, G. (2012). Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: A clinical perspective. *Annals of Oncology*, 23(Suppl 6), Vi19-Vi22. doi:10.1093/annonc/mds190
63. Perou CM, Sørli T, Eisen MB. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*; 406(6797):747–752.
64. Podsypanina, K., Du, Y. N., Jechlinger, M., Beverly, L.J., Hambarzumyan, D., y Varmus, H. (2008). Siembra y propagación de células mamarias de ratón no transformadas en el pulmón. *Science*, 321 (5897), 1841-1844. doi: 10.1126 / science.1161621.
65. Rack, B. K., Schindlbeck, C., Andergassen, U., Schneeweiss, A., Zwingers, T., Lichtenegger, W., Janni, W. (2010). Use of circulating tumor cells (CTC) for blood cancer of patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial. *Journal of Clinical Oncology*, 28 (15_suppl), 1003-1003. doi: 10.1200 / jco.2010.28.15_suppl.1003.
66. Reis-Filho, J. S., & Pusztai, L. (2011). Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction. *The Lancet*, 378 (9805), 1812-1823. doi: 10.1016 / s0140-6736 (11) 61539-0.
67. Riggio, M., Perrone, M.C., Polo, M.L., Rodriguez, M.J., May, M., Abba, M., Novaro, V. (2017). AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Scientific Reports*, 7 (1). doi: 10.1038 / srep44244.
68. Ring, A.E., Smith, I.E., Ashley, S., Fulford, L.G., & Lakhani, S.R. (2004). Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *British Journal of Cancer*, 91 (12), 2012-2017. doi: 10.1038 / sj.bjc.6602235.
69. Quiroz, C. Perfil Epidemiológico de Cáncer de Mama Triple Negativo en pacientes atendidos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue entre Junio del 2012 a Junio del 2015 , <http://repositorio.urp.edu.pe/handle/urp/725>
70. Saenz L. (2012). Importancia de la detección de células tumorales circulantes en cáncer de mama. *Revista Eubacteria*. no28 / issn-1697-0071.

71. Santana-Davila, R., & Perez, E. A. (2010). Treatment options for patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 3 (1), 42. doi: 10.1186 / 1756-8722-3-42.
72. Schnitt, S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology*, 23 (S2). doi: 10.1038 / modpathol.2010.33.
73. Schroeder, J.A., Masri, A.A., Adriance, M.C., Tessier, J.C., Kotlarczyk, K.L., Thompson, M.C., & Gendler, S.J. (2004). MUC1 overexpression results in mammary gland tumorigenesis and prolonged alveolar differentiation. *Oncogene*, 23 (34), 5739-5747. doi: 10.1038 / sj.onc.1207713.
74. Singh, A. P., Chauhan, S.C., Bafna, S., Johansson, S.L., Smith, L.M., Moniaux, N., Batra, S. K. (2006). Aberrant expression of transmembrane mucins, MUC1 and MUC4, in human prostate carcinomas. *The Prostate*, 66 (4), 421-429. doi: 10.1002 / pros.20372.
75. Sørlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (14), 8418-8423. doi: 10.1073 / pnas.0932692100.
76. Tan, T., & Dent, R. (2017). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features. *Triple-Negative Breast Cancer*, 23-32. doi:10.1007/978-3-319-69980-6_2
77. Tiezzi DG. (2009). Epidemiologia do câncer de mama. *Rev Bras Ginecol. Obstet*, 31(5):213-5.
78. Veer, L.J., Dai, H., Vijver, M.J., He, Y. D., Hart, A.A., Mao, M., Friend, S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415 (6871), 530-536. doi: 10.1038 / 415530a.
79. Vallejos, C.S., Gomez, H.L., Cruz, W.R., Pinto, J.A., Dyer, R.R., Velarde, R., Vigil, C. E. (2010). Breast Cancer Classification According to Immunohistochemistry Markers: Subtypes and Association With Clinicopathologic Variables in a Peruvian Hospital Database. *Clinical Breast Cancer*, 10 (4), 294-300. doi: 10.3816 / cbc.2010.n.038.

80. Verma, S., Provencher, L., & Dent, R. (2011). Emerging trends in the treatment of triple-negative breast cancer in Canada: A survey. *Current Oncology*, 18(4). doi:10.3747/co.v18i4.913
81. Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G. (2001). Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer research*, 61(1):333-8.
82. Willis, L., Alarcón, T., Elia, G., Jones, J.L., Wright, N.A., Tomlinson, I. P., Page, K. M. (2010). Breast Cancer Dormancy Can Be Maintained by Small Numbers of Micrometastases. *Cancer Research*, 70 (11), 4310-4317. doi: 10.1158 / 0008-5472.can-09-3144.
83. Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*, 5 (10), 2929-2943.
84. Zaharia M, Gómez H. (2013). Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 30(4):649-56.
85. Zhong, X. Y., Kaul, S., Eichler, A., & Bastert, G. (1999). Evaluating GA733-2 mRNA as a marker for the detection of micrometastatic breast cancer in peripheral blood and bone marrow. *Archives of Gynecol. ogy and Obstetrics*, 263(1-2), 2-6. doi:10.1007/s004040050251

XVI. ANEXOS

Tabla 6. Clasificación de pacientes según su rango de edad.

Rango de edades de pacientes (años)	Pacientes (28)	%
20-30	2	7.14%
30-40	4	14.29%
40-50	6	21.43%
50-60	9	32.14%
60-70	5	17.86%
70-80	1	3.57%
80-90	1	3.57%

Tabla7. Ciudad de procedencia de los pacientes.

Ciudad de procedencia	Pacientes	%
Lima	10	35.71%
Cajamarca	1	3.57%
Ayacucho	3	10.71%
La Libertad	2	7.14%
Ancash	1	3.57%
Arequipa	2	7.14%
Moquegua	1	3.57%
Cusco	1	3.57%
Tacna	3	10.71%
Piura	2	7.14%
Ica	1	3.57%
Huancavelica	1	3.57%

Tabla8. Grado histológico de los pacientes del estudio.

Grado Histológico	Pacientes	%
1	2	7.14%
2	2	7.14%
3	24	85.72%

Tabla9. Subtipos histológicos en pacientes con CMTN.

Subtipo Histológico	Pacientes	%
Ductal	26	92.86%
Mucinoso	2	7.14%

Tabla10. Tamaño de tumor de las pacientes.

Tamaño del Tumor (cm)	Pacientes (28)	%
1-3	15	53.57%
4-6	5	17.86%
7-9	3	10.71%
10-12	5	17.86%

Tabla11. Tipos de cirugía aplicadas.

TIPO DE CIRURÍA	PACIENTES	%
Tumorectomía	9	32.14%
Mastectomía	12	42.86%
Toillete	0	0.00%

Tabla12. Estadios clínicos de las pacientes diagnosticadas con CMTN.

EC	Pacientes	%
IA	4	14.3
IIA	8	28.6
IIIA	3	10.7
IIB	6	21.4
IIIB	2	7.1
IV	5	17.9

Tabla13. Presencia de CTCs, porcentaje y promedio de concentración en ng/μL.

CELULAS MADRE	POSITIVO (casos)	%	PROMEDIO DE []	NEGATIVO (casos)	%	PROMEDIO DE []
STEM CELLS ALDH1	11	39.29%	0.2	17	60.71%	0.01

Tabla14. Seguimiento de genes presentes en EMT-2.

GENES PRESENTES EN EMT-2	POSITIVO (casos)	%	PROMEDIO DE []	NEGATIVO (casos)	%	PROMEDIO DE []
ACTINA EN EMT-2	28	100.00%	1.81	0	0.00%	0
EMT-2 / TWIST1	2	7.14%	1.78	26	92.86%	0.03
EMT-2 / AKT-2	1	3.57%	0.83	27	96.43%	0.02
EMT-2 / PI3K	1	3.57%	0.31	27	96.43%	0.002

Tabla15. Seguimiento de genes relacionados al CM.

GENES RELACIONADOS AL CM	POSITIVO (casos)	%	PROMEDIO DE []	NEGATIVO (casos)	%	PROMEDIO DE []
ACTINA EN BREAST	28	100.00%	1.35	0	0.00%	0
BREAST / GA733-2	2	7.14%	6.72	26	92.86%	0
BREAST / MUC1	4	14.29%	0.18	24	85.71%	0
BREAST / HER2	0	0%	0	28	100%	0.003

Tabla 16. Relación entre las características clínico-patológicas con la detección de CTC positivas en sangre periférica antes del tratamiento terapéutico.

Características	CTC	CTC	Valor <i>p</i>
	Negativo (%)	Positivo (%)	
N° de pacientes	17 (60.7)	11 (39.3)	
Edad al diagnóstico			1
Mediana (rango)	52.5(21-88)		
≤ 52.5	9 (52.9)	5 (45.5)	
> 52.5	8 (47.1)	6 (54.5)	
Tipo de paciente			0.01*
Adyuvante	6 (35.3)	5 (45.5)	
Neoadyuvante	9 (52.9)	6 (54.5)	
Sin tratamiento terapéutico	2 (11.8)	0 (0.0)	
Subtipo histológico			1
Ductal	16 (94.1)	10 (90.9)	
Otro	1 (5.9)	1 (9.1)	
Grado histológico			1
III	15 (88.2)	9 (81.8)	
II	2 (11.8)	2 (18.2)	
I	0 (0.0)	0 (0.0)	

T clínico			0.77*
1	3 (17.6)	1 (9.1)	
2	7 (41.2)	6 (54.5)	
3	7 (41.2)	4 (36.4)	
N clínico			0.27*
0	9 (52.9)	4 (36.4)	
1	4 (23.5)	6 (54.5)	
2	4 (23.5)	1 (9.1)	
M			0.35
0	12 (70.6)	10 (90.9)	
1	5 (29.4)	1 (9.1)	
Estadío clínico			1
I-II	10 (58.8)	6 (54.5)	
III-IV	7 (41.2)	5 (45.5)	
Tipo de cirugía			0.39
Mastectomía	5 (45.5)	7 (70.0)	
Tumorectomía	6 (54.5)	3 (30.0)	
N patológico			0.38*
0	10 (90.9)	7 (70.0)	
1	0 (0.0)	1 (10.0)	
2	1 (9.1)	2 (20.0)	
Invasión linfovascular			0.59
No	9 (75.0)	9 (90.0)	
Si	3 (25.0)	1 (10.0)	
Invasión perineural			0.59
No	9 (75.0)	9 (90.0)	
Si	3 (25.0)	1 (10.0)	
Recaída			0.543
No	16 (94.1)	9 (81.8)	
Si	1 (5.9)	2 (18.2)	
Deceso			1
No	14 (82.4)	10 (90.9)	
Si	3 (17.6)	1 (9.1)	

* No aplica por insuficiencia de tamaño de muestra en las categorías.

Tabla 17. Sobrevida global

Características	Número de pacientes	Porcentaje	Número de muertes a los 60 meses	Sobrevida Global a los 60 meses	Valor <i>p</i>
Edad al diagnóstico					0.351
Mediana (rango)	52.5(21-88)				
≤ 52.5	14	50	1	92.86	
> 52.5	14	50	3	78.57	
Tipo de paciente					0.009
Adyuvante	11	39.29	0	100	
Neoadyuvante	15	53.57	3	80	
Sin tratamiento terapéutico	2	7.14	1	50	
Subtipo histológico					0.374
Ductal	26	92.86	3	88.46	
Otro	2	7.14	1	50	
Grado histológico					0.214
III	24	85.71	3	87.5	
II	4	14.29	1	75	
T clínico					0.001
1	4	14.29	0	100	
2	13	46.43	1	92.31	
3	6	21.43	0	100	
4	5	17.86	3	40	
N clínico					< 0.001
0	13	46.43	0	100	
1	10	35.71	0	100	
2	5	17.86	4	20	
M					0.002
0	22	78.57	1	95.45	
1	6	21.43	3	50	
Estadío clínico					0.004
I-II	16	57.14	0	100	
III-IV	12	42.86	4	66.67	
Tipo de cirugía					0.237
Mastectomía	12	57.14	1	91.67	
Tumorectomía	9	42.86	0	100	
N patológico					0.082

	0	17	80.95	0	100	
	1	1	4.76	0	100	
	2	3	14.29	1	66.67	
Invasión linfoscavascular						0.121
No		18	81.82	1	94.44	
Si		4	18.18	1	75	
Invasión perineural						0.516
No		18	81.82	2	88.89	
Si		4	18.18	0	100	
CTC						0.433
Negativo		17	60.71	3	82.35	
Positivo		11	39.29	1	90.91	

Tabla 18. Sobrevida libre de progresión

Características	Número de pacientes	Porcentaje	Número de muertes a los 60 meses	Sobrevida libre de progresión a los 60 meses	Valor <i>p</i>
Edad al diagnóstico					0.411
Mediana (rango)	52.5(21-88)				
≤ 52.5	14	50	1	92.86	
> 52.5	14	50	2	85.71	
Tipo de paciente					0.834
Adyuvante	11	39.29	1	90.91	
Neoadyuvante	15	53.57	2	86.67	
Sin tratamiento terapéutico	2	7.14	0	100	
Subtipo histológico					0.561
Ductal	26	92.86	3	88.46	
Otro	2	7.14	0	100	
Grado histológico					0.223
III	24	85.71	2	91.67	
II	4	14.29	1	75	
T clínico					0.462
1	4	14.29	0	100	
2	13	46.43	1	92.31	
3	6	21.43	1	83.33	

	4	5	17.86	1	80	
N clínico						0.003
	0	13	46.43	0	100	
	1	10	35.71	1	90	
	2	5	17.86	2	60	
M						0.241
	0	22	78.57	2	90.91	
	1	6	21.43	1	83.33	
Estadío clínico						0.009
I-II		16	57.14	0	100	
III-IV		12	42.86	3	75	
Tipo de cirugía						0.948
Mastectomía		12	57.14	1	91.67	
Tumorectomía		9	42.86	1	88.89	
N patológico						0.361
	0	17	80.95	1	94.12	
	1	1	4.76	0	100	
	2	3	14.29	1	66.67	
Invasión linfovascular						0.559
No		18	81.82	2	88.89	
Si		4	18.18	0	100	
Invasión perineural						0.472
No		18	81.82	2	88.89	
Si		4	18.18	0	100	
CTC						0.4
Negativo		17	60.71	1	94.12	
Positivo		11	39.29	2	81.82	

Consentimiento informado para donación voluntaria de muestra

BIOPSIA LÍQUIDA: CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES Y ADN CIRCULANTE TUMORAL COMO BIOMARCADORES EN CM-TM

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO DEL PROYECTO: " BIOPSIA LÍQUIDA: CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES Y ADN CIRCULANTE TUMORAL COMO BIOMARCADORES EN CÁNCER MAMA TRIPLE NEGATIVO"

Investigador Principal: Dr. Carlos Castañeda Altamirano, MD, MSc

1.- INTRODUCCIÓN

A usted se le está invitando a participar en un estudio que involucra la donación voluntaria de muestras biológicas con fines de investigación. Este documento lo ayudará a comprender por qué se está realizando la investigación, y lo ayudará a decidir si desea participar o no. El mismo, puede contener algunas palabras que usted probablemente no entenderá. Por favor, solicite a uno de los integrantes del equipo de investigación que le explique cualquiera de las palabras o información que usted no comprenda con claridad. Se le entregará una copia en caso acepte participar en el estudio.

2.- IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Durante la intervención a la que va a ser sometido se podrán tomar muestras de tumor o se realizará la toma de 10cc sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente la muestra indicada anteriormente, sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. Dichas muestras biológicas serán utilizadas y almacenadas para este proyecto de investigación.

3.- OBJETIVO

La finalidad de esta investigación es evaluar la presencia de la actividad inmune contra el tumor en muestras de cáncer de mama así como de las células neoplásicas en sangre de pacientes con cáncer de mama.

4.- BENEFICIOS PARA USTED/SOCIEDAD

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, usted estará haciendo una libre y generosa donación para la investigación que podrá ser beneficiosa para futuras generaciones. El estudio de su resultado podrá generar nuevas pruebas clínicas o tratamientos que contribuirán a mejor manejo de la enfermedad neoplásica. Debe saber que será prioritario el uso diagnóstico de la muestra que dona y que se garantizará un remanente de las muestras para este fin.

5.- DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Instituto.

6.- RIESGOS

El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestra sobrante de la intervención.

7.- PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD

Los datos personales y clínico-patológicos obtenidos de su historia clínica serán incorporados y tratados en una base de datos según la codificación designada por el investigador principal. Esto prevendrá que la persona que trabaje con su muestra conozca la identidad del paciente. Los resultados individuales serán anónimos y no serán mostrados (sin su consentimiento) a nadie fuera del proyecto de investigación.

8.- ¿QUIÉN PUEDE RESPONDER MIS PREGUNTAS ACERCA DEL ESTUDIO?

CON LOS CERCIVALES ALTA MIRANO
ARISTIDES DOMINGUEZ SANCHEZ LMON
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
Hospital Nacional de Cáncer de Mama


Dr. ARISTIDES DOMINGUEZ SANCHEZ LMON
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
Hospital Nacional de Cáncer de Mama

INVESTIGADOR PRINCIPAL: CARLOS CASTAÑEDA ALTAMIRANO, MD, MSc

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, por favor comuníquese con el Investigador Principal del proyecto Dr. Carlos Castañeda Altamirano, teléfono 201-6500 anexo 3000 o 3040; o envíar sus preguntas al correo electrónico: Investigación@inen.sld.pe

Si tiene preguntas sobre sus derechos o los aspectos éticos relacionado a este estudio, usted también puede llamar al Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, al teléfono 201-6500 anexo 3001; o envíar sus preguntas al correo electrónico: comité_etica@inen.sld.pe.

He leído este formulario y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Consiento en participar en esta investigación.

Nombre del Participante	Firma	Fecha

Nombre del Acompañante	Firma	Fecha

Nombre del Investigador	Firma	Fecha


CARLOS CASTAÑEDA ALTAMIRANO
MEDICINA ONCOLÓGICA
CARE: 34113 (ext): 3034


D. ARISTIDES JUVENAL SANCHEZ LINDO
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

INVESTIGADOR PRINCIPAL: CARLOS CASTAÑEDA ALTAMIRANO, MD, MS;

Figura 3. Corte histológico de Subtipo Ductal.

