

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**  
**CONCORDANCIA ENTRE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN TEJIDO DE CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO Y ADN CIRCULANTE TUMORAL**

**MEMORIA CIENTÍFICA**

**Introducción**

El cáncer de mama (CM) es la enfermedad más común en mujeres [1]. A pesar de todos los avances realizados en los últimos años en el diagnóstico y tratamiento de este cáncer, alrededor de un 5-6% de las pacientes presentan metástasis en el momento de diagnóstico [2] y un 30% de las diagnosticadas en estadios precoces recaerán a distancia [3]. Dependiendo de los factores pronósticos, hasta el 30% de las mujeres con ganglios negativos y el 70% de las pacientes con ganglios positivos presentarán una recaída [4]. El desarrollo de las nuevas técnicas de secuenciación masiva (NGS) ha supuesto una revolución en el terreno de la investigación en cáncer ya que ha permitido una obtención de mayor cantidad de datos, en un menor tiempo y a un menor coste. Los genes que más frecuentemente están mutados en los estudios de NGS publicados en cáncer de mama son:

PIK3CA (31–41%), TP53 (30–36%), KMT2C (7–11%), GATA3 (10–11%), MAP3K1 (7–10%), and CDH1 (10–11%). En estos estudios se observó también que mientras que las mutaciones en MAP3K1/TP53, GATA3/TP53, CDH1/TP53, y CDH1/GATA3 eran mutuamente excluyentes, las mutaciones de MAP3K1/PIK3CA, CDH1/PIK3CA se vieron frecuentemente asociadas [5–10].

Para este tipo de estudios de secuenciación podríamos basarnos tanto en el DNA de tejido como en el material de biopsia líquida.

El concepto de “biopsia líquida” hace referencia al ADN tumoral circulante (ctADN), este se deriva de una combinación de apoptosis, necrosis y secreción activa de las células cancerosas y se encuentra en niveles más altos en pacientes con cáncer avanzado que en individuos sanos [11] o pacientes con enfermedad en estadio temprano [12]. El ctADN permite detectar en sangre la presencia de alteraciones de utilidad para el pronóstico, respuesta al tratamiento y la determinación de resistencias tempranas a los fármacos, lo que resulta de gran interés y muy novedoso en pacientes con cáncer.

En CM, el ctADN detectado en plasma puede usarse para analizar genomas tumorales de forma no invasiva y cuantificar la carga tumoral. Las aplicaciones del ctADN en plasma incluyen la identificación de alteraciones genómicas accionables, el seguimiento de las respuestas al tratamiento, la resolución de la resistencia terapéutica y la detección potencial de la progresión de la enfermedad antes de la confirmación clínica y radiológica. El ctADN puede usarse para caracterizar la heterogeneidad tumoral y las mutaciones específicas de metástasis proporcionando información para adaptar el

manejo terapéutico de los pacientes. Existe una buena correlación entre un tumor metastásico y los perfiles de mutación del ctADN, lo que hace que el ctADN sea un material atractivo y práctico para el uso clínico habitual [13]. Sin embargo, no se ha estudiado la correlación entre el ctADN y todas las metástasis en cada paciente.

Basándonos en todo lo anteriormente descrito, proponemos realizar un proyecto de secuenciación utilizando NGS en pacientes de CM con metástasis que puedan ser biopsiadas.

Se secuenciará el ADN tumoral de las muestras de parafina de todas las lesiones metastásicas para cada paciente. En paralelo, realizaremos el mismo análisis de secuenciación en ADN circulante aislado de muestras de plasma y comprobaremos la concordancia entre las alteraciones moleculares tanto de la biopsia líquida como de la sólida. El propósito de este estudio es comparar directamente los perfiles de mutación en todas las metástasis sólidas y ctADN aislado de las muestras de sangre tomadas de pacientes con CM metastásico. Nuestro objetivo es determinar si el ctADN refleja la heterogeneidad observada en diferentes metástasis de los casos de BC y si refleja la presencia de micrometástasis.

## Referencias

1. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int. J. Cancer* 2015, 136, E359–E386, doi:10.1002/ijc.29210.
2. American Cancer Society Global Cancer Facts & Figures - 2nd Edition. 60. Atlanta: American Cancer Society. 2011.
3. Effects of Chemotherapy and Hormonal Therapy for Early Breast Cancer on Recurrence and 15-Year Survival: An Overview of the Randomised Trials. *The Lancet* 2005, 365, 1687–1717, doi:10.1016/S0140-6736(05)66544-0.
4. Cardoso, F.; Harbeck, N.; Fallowfield, L.; Kyriakides, S.; Senkus, E. Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Annals of Oncology* 2012, 23, vii11–vii19, doi:10.1093/annonc/mds232.
5. Cornen, S.; Guille, A.; Adélaïde, J.; Addou-Klouche, L.; Finetti, P.; Saade, M.-R.; Manai, M.; Carbuccion, N.; Bekhouche, I.; Letessier, A.; et al. Candidate Luminal B Breast Cancer Genes Identified by Genome, Gene Expression and DNA Methylation Profiling. *PLoS ONE* 2014, 9, e81843, doi:10.1371/journal.pone.0081843.
6. The Cancer Genome Atlas Network Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* 2012, 490, 61–70, doi:10.1038/nature11412.
7. Desmedt, C.; Zoppoli, G.; Gundem, G.; Pruneri, G.; Larsimont, D.; Fornili, M.; Fumagalli, D.; Brown, D.; Rothé, F.; Vincent, D.; et al. Genomic Characterization of Primary Invasive Lobular Breast Cancer. *JCO* 2016, 34, 1872–1881, doi:10.1200/JCO.2015.64.0334.
8. The Oslo Breast Cancer Consortium (OSBREAC); Stephens, P.J.; Tarpey, P.S.; Davies, H.; Van Loo, P.; Greenman, C.; Wedge, D.C.; Nik-Zainal, S.; Martin, S.; Varela, I.; et al. The Landscape of Cancer Genes and Mutational Processes in Breast Cancer. *Nature* 2012, 486, 400–404, doi:10.1038/nature11017.

9. Banerji, S.; Cibulskis, K.; Rangel-Escareno, C.; Brown, K.K.; Carter, S.L.; Frederick, A.M.; Lawrence, M.S.; Sivachenko, A.Y.; Sougnez, C.; Zou, L.; et al. Sequence Analysis of Mutations and Translocations across Breast Cancer Subtypes. *Nature* 2012, 486, 405–409, doi:10.1038/nature11154.
10. Pereira, B.; Chin, S.-F.; Rueda, O.M.; Vollandt, H.-K.M.; Provenzano, E.; Bardwell, H.A.; Pugh, M.; Jones, L.; Russell, R.; Sammut, S.-J.; et al. The Somatic Mutation Profiles of 2,433 Breast Cancers Refine Their Genomic and Transcriptomic Landscapes. *Nat Commun* 2016, 7, 11479, doi:10.1038/ncomms11479.
11. Leon, S.A.; Shapiro, B.; Sklaroff, D.M.; Yaros, M.J. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res* 1977, 37, 646.
12. Newman, A.M.; Bratman, S.V.; To, J.; Wynne, J.F.; Eclov, N.C.W.; Modlin, L.A.; Liu, C.L.; Neal, J.W.; Wakelee, H.A.; Merritt, R.E.; et al. An Ultrasensitive Method for Quantitating Circulating Tumor DNA with Broad Patient Coverage. *Nat Med* 2014, 20, 548–554, doi:10.1038/nm.3519.
13. Moreno, F.; Gayarre, J.; López-Tarruella, S.; del Monte-Millán, M.; Picornell, A.C.; Álvarez, E.; García-Saenz, J.Á.; Jerez, Y.; Márquez-Rodas, I.; Echavarría, I.; et al. Concordance of Genomic Variants in Matched Primary Breast Cancer, Metastatic Tumor, and Circulating Tumor DNA: The MIRROR Study. *JCO Precision Oncology* 2019, 1–16, doi:10.1200/PO.18.00263.

## **Hipótesis**

### **Hipótesis principal**

En pacientes con CM metastásico con múltiples metástasis existen alteraciones moleculares (mutaciones, reordenamientos cromosómicos, etc.) en el ctADN que se correlacionan más con las alteraciones de una metástasis sólida concreta.

### **Hipótesis secundaria**

Se pueden encontrar nuevas alteraciones moleculares en el ctADN asociadas con micrometástasis que no se encuentran en biopsias sólidas de metástasis.

## **Objetivos**

### **Objetivo principal**

El objetivo principal de este estudio es determinar si las alteraciones identificadas en todas las lesiones metastásicas son detectadas en el ctADN y si hay otras alteraciones en el ctADN que no se observan en las lesiones metastásicas.

### **Objetivos específicos**

1. Identificación de alteraciones génicas (mutaciones, CNV, reordenamientos, etc.) en el ADN de todas las metástasis sólidas y en el ctADN aislado de muestras de plasma mediante un panel de secuenciación en pacientes con CM metastásico.
2. Correlacionar las alteraciones moleculares encontradas en el ctADN del plasma con las encontradas en las biopsias en parafina sólida de las metástasis.
3. Identificar nuevas alteraciones en la biopsia líquida, no encontradas en muestras sólidas.

## Metodología

1. Identificación de alteraciones génicas (mutaciones, CNV, reordenamientos, etc.) en el ADN de todas las metástasis sólidas y en el ctADN aislado de muestras de plasma mediante un panel de secuenciación en pacientes con CM metastásico.

Cohorte de pacientes:

Se incluirán 20 pacientes con CM metastásico en progresión que hayan desarrollado de 2 a 5 metástasis, o al menos 1 en caso de que dispongamos de biopsia del tumor primario. Todas las lesiones deben ser biopsiables antes de iniciar una nueva línea de tratamiento.

- Tras obtener la aprobación ética del estudio, se reclutará a los pacientes y se recogerán muestras, tanto de sangre periférica como de tejidos, en colaboración con diferentes hospitales.
- Variables de cohorte: edad del paciente, expresión de receptores hormonales, expresión del receptor HER2 y sitios de metástasis. Los datos demográficos y clínico-patológicos de los pacientes se recopilarán de la base de datos de la institución.
- Análisis de secuenciación: a partir de muestras de sangre periférica, el ctADN se aislará del plasma utilizando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp. Las muestras de tejido se examinarán con secciones tumorales teñidas con hematoxilina-eosina para identificar regiones que contienen células tumorales. El ADN se extraerá de tejido tumoral fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE) con el kit de tejido QIAamp DNA FFPE. Se realizará un estudio cuantitativo y cualitativo de las muestras de ADN. Esto se hará utilizando Qubit y TapeStation (Agilent 2200 TapeStation) respectivamente. Se diseñará un panel de genes para cumplir con los objetivos de este proyecto, que incluirá genes que se sabe están involucrados en la reparación del ADN y el CM. La preparación de librerías para su posterior secuenciación consiste en la creación de una colección de fragmentos de ADN de interés. En este proyecto utilizaremos el protocolo Agilent SureSelect XT, que se basa en un enriquecimiento de regiones de interés del genoma para secuencias repetidas y para secuencias no relacionadas.
- Análisis Bioinformático. Haremos un análisis Pipeline desarrollado por el equipo, el cual consta de diferentes etapas. La primera es un control de calidad para verificar que la secuencia haya sido correcta y sin errores instrumentales u otros. Posteriormente, es necesario un alineamiento de las secuencias con un genoma de referencia, lo cual haremos utilizando el programa Novoalign. Una vez terminada la alineación, el archivo obtenido es un archivo Bam y para la manipulación de archivos que contienen alineamientos se utilizará BAMTools, PicardTools, SAMTools o GATK. El siguiente paso será la llamada de variante, la haremos a través de VarScan2 obteniendo un archivoVCF. Por otro lado, usaremos el archivo BAM para visualizar datos de alineación y variantes usando la herramienta de visualización interactiva IGV. Además, de esta forma analizaremos la cobertura. Una vez obtengamos el archivo VCF, utilizaremos la versión del genoma público hg38 frente a Ensembl versión 88 para incluir información relevante y hacer una anotación funcional de las

variantes genómicas que detectemos mediante el uso de diferentes bases de datos públicas, como COSMIC, 1000 Genomes, Ensemble, NCBI o CIBERER Spanish Variant Server. Finalmente haremos un filtrado siguiendo estos criterios: Consecuencia, variante de frecuencia y frecuencia alelo menor global (GMAF). También haremos paralelamente un análisis de la variación del número de copias usando el programa Contra, el resultado de este programa es un dato global de cobertura por cromosoma en el cual son nuestros genes de interés.

2. Correlacionar las alteraciones moleculares encontradas en el ctADN en plasma con las encontradas en las biopsias en parafina sólida de las metástasis.

- Haremos una comparación de las alteraciones moleculares encontradas en el ctADN con las encontradas en cada uno de los tejidos de las metástasis de cada paciente, buscando si hay mayor coincidencia entre las alteraciones del ctADN y una metástasis concreta respecto al resto.

3. Identificar nuevas alteraciones en la biopsia líquida, no encontradas en muestras sólidas.

- Buscaremos alteraciones moleculares únicas en el ctADN que nos den una información adicional a la que podamos tener únicamente con las biopsias de tejido, pudiendo relacionar así estas alteraciones con las de micrometástasis.

### **Plan de trabajo**

1. Identificación de alteraciones génicas (mutaciones, CNV, reordenamientos, etc.) en el ADN de todas las metástasis sólidas y en el ctADN aislado de muestras de plasma mediante un panel de secuenciación en pacientes con CM metastásico.

Esta parte del estudio traslacional se realizará en colaboración con el servicio de Anatomía Patológica del IRYCIS (Instituto Ramón Y Cajal de Investigación Sanitaria) durante los primeros 18 meses del período efectivo del proyecto.

Primero, procederemos a la identificación de pacientes y recogida del material biológico (3 meses). Para llevar a cabo el proceso de secuenciación masiva primero prepararemos las librerías/genotecas usando el protocolo SureSelect XT de “Agilent Technologies” en el Laboratorio de Patología, y luego la secuenciación se realizará mediante la plataforma Illumina MiSeq en la UCA de Genómica en el Hospital Ramón y Cajal. Finalmente, realizaremos el análisis bioinformático y estadístico.

2. Correlacionar las alteraciones moleculares encontradas en el ctADN en plasma con las encontradas en las biopsias en parafina sólida de las metástasis.

3. Identificar nuevas alteraciones en la biopsia líquida, no encontradas en muestras sólidas.

Analizaremos las alteraciones y buscaremos coincidencias entre los resultados de las alteraciones en todas las muestras de cada paciente, además de alteraciones moleculares de novo en el ctADN aislado de plasma, sacando conclusiones durante los últimos 3 meses.

## **Presupuesto**

### **Gastos de Ejecución**

A) Adquisición de bienes y contratación de servicios (Bienes inventariable, material fungible y otros gastos para 100 muestras)

- Gestión de material, almacenamiento y manipulación de muestras tumorales (Anatomía Patológica), tinciones, etc. 4,090 €
- Gestión de bases de datos muestras / clínicos, etc. 2,000 €
- Extracción ctADN en plasma y ADN de muestras FFPE. 2,100 €
- Cuantificación ADN (QUBIT y TapeStation). 650 €
- Cuantificación Tape Station Check point. 580 €
- Material Covaris. 869 €
- Creación de librerías y cuantificaciones. 24,000 €
- Gastos de servicio de secuenciación. 14,700 €
- Análisis bioinformático y estadístico. 3,700 €

Subtotal gastos de bienes y servicios: 52,689 €

B) Gastos totales de trabajador

- Phd. 35,500 €

C) Gastos de Viajes

- Viajes congresos. 2,000 €

D) Overheads. 19,326 €

**Presupuesto total: 109,515 €**