

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA  
MOLECULAR



**“Evaluación de la citología líquida y el  
plasma sanguíneo  
para la detección oportuna de cánceres de  
ovario y endometrio”**

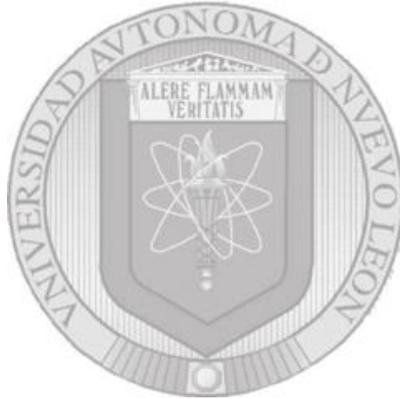
**POR**

**M.C. IRMA G. DOMÍNGUEZ VIGIL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

**DICIEMBRE, 2019**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA  
MOLECULAR



**“Evaluación de la citología líquida y el  
plasma sanguíneo  
para la detección oportuna de cánceres de  
ovario y endometrio”**

POR

**M.C. IRMA G. DOMÍNGUEZ VIGIL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

**DICIEMBRE, 2019**

**“Evaluación de la citología líquida y el plasma sanguíneo  
para la detección oportuna de cánceres de ovario y endometrio”**

Revisión de tesis:



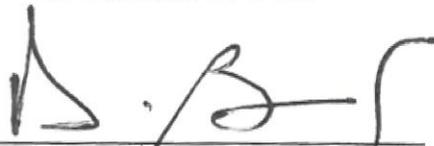
---

**Dr. C. Antonio Alí Pérez Maya**  
Director de Tesis



---

**Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez**  
Co-Director de Tesis



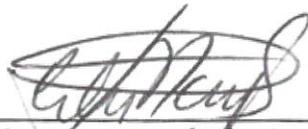
---

**Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña**  
Miembro de la comisión



---

**Dr. med. Oscar Vidal Gutiérrez**  
Miembro de la comisión



---

**Dra. C. Celia Noemí Sánchez Domínguez**  
Miembro de la comisión



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

Diciembre de 2019

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Antonio Alí Pérez Maya y el Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña; en el Laboratorio de Genómica de la Red de Apoyo a la Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la dirección de la Dra. Rosa Rebollar Vega y el Dr. Inti A. De La Rosa Velázquez; y en el Laboratory for Translational Research del Western Connecticut Health Network bajo la dirección del PhD. John A. Martignetti profesor del Icahn School of Medicine del Mount Sinai.

## DEDICATORIA

A mis hijos, Andrea y Román, por aprender conmigo durante este largo camino. Por brindarme siempre una sonrisa después de un largo día y ser mi motivación para comenzar y terminar este camino.

A mi esposo, Alejandro, por ayudarme en los momentos en lo que más necesité, ya que sin tu ayuda no podría realizarme como científica, mamá, y esposa; por aprender conmigo mientras formamos nuestra pequeña familia.

A mi mamá, María Irma, por ayudarme con mis pequeños cuando las noches en el laboratorio se extendían; por orar por nosotros en los momentos difíciles y apoyarnos en todo momento.

A mi abuelita, Rica, por ver por mis niños cuando más lo necesité y recibirnos siempre con un plato de comida caliente. Por los valores que desde pequeña me enseñaste y que no se aprenden con un doctorado. Qué gran suerte tuve de tenerte como abuela.

A todos, gracias por esperarme y acompañarme a lo largo de estos cuatro años dedicados a este proyecto, recuerden que mis logros son sus logros también.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su apoyo y facilidades brindadas en la formación de investigadores.

A la Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, y al Hospital Universitario “José E González” por el apoyo brindado para llevar a cabo mi programa de doctorado.

Al Hospital Universitario (HU), Instituto Nacional de Cancerología (INCan), y a los Hospitales Zambrano Hellion y San José de la red TECSalud pertenecientes al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), por facilitar el apoyo para la recolecta de muestras de interés para el protocolo.

A la Red de Apoyo a la Investigación Científica (RAI) y al Western Connecticut Health Network (WCHN) por el apoyo brindado para realizar el análisis por secuenciación de los genes a estudiar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado con la beca 558058, y al financiamiento de este proyecto en la categoría Problemas Nacionales 2014 mediante el número #247850.

A mis asesores, Dr. Hugo A. Barrera-Saldaña por su guía y persistencia en que siempre tenemos que dar más de nosotros mismos para sobresalir; y al Dr. Antonio A. Pérez-Maya por sus valiosos consejos y supervisión.

A mi comisión de tesis, Dra. Lourdes, Dra. Celia, y Dr. Oscar, por siempre brindarme de su tiempo para mi trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	PÁGINA
Desarrollo experimental	4
Dedicatoria	5
Agradecimientos	6
Tabla de Contenido	7
Lista de Tablas	9
Lista de Figuras	10
Lista de Abreviaturas	11
Resumen	12
1. Introducción	13
1.1 Cánceres ginecológicos	13
1.1.1 El cáncer de endometrio y sus características clínico-patológicas	13
1.1.2 El cáncer de ovario y sus características clínico-patológicas	14
1.2 Epidemiología	17
1.3 Sintomatología, Diagnóstico y Tratamiento	17
1.4 Biopsia líquida	25
1.4.1 Plasma sanguíneo	25
1.4.2 Citología en base líquida (Papanicolaou)	28
2. Antecedentes	33
3. Justificación	37
4. Hipótesis	38
5. Objetivos	39
5.1 Objetivo general	39
5.2 Objetivos específicos	39
6. Materiales y Métodos	40
6.1 Diseño del estudio	40
6.2 Aspectos éticos	40
6.3 Estrategia general	40
6.4 Pacientes y muestras	41
6.5 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	41
6.6 Proceso de obtención de muestras	42
6.7 Métodos	43
6.7.1 Recolección y análisis histopatológico de muestras de tumores	43
6.7.2 Extracción de ácidos nucleicos	44
6.7.3 Generación del biobanco y archivo electrónico	44
6.7.4 Detección de mutaciones asociadas a los CO y CE	45
6.7.4.1 Preparación de las librerías	45
a) Generación de librerías de los exones de 21 genes: 66 muestras	45
b) Generación de librerías: hotspot de 56 genes: 12 muestras	49
6.7.4.2 Secuenciación	49
6.7.4.3 Análisis bioinformático	49
6.7.5 Validación de mutaciones asociadas a los CO y CE	50
a) Sanger	50
c) qPCR	51
d) ddPCR	51
6.7.6 Análisis de datos	52
6.7.7 Aplicación de la prueba de la citología líquida	52
7. Resultados y Discusión	53
7.1 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 1	53

a) Características de la población de estudio	53
b) Extracción, purificación y control de calidad de los ácidos nucleicos de las muestras obtenidas	55
7.2 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 2	57
7.3 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 3	59
7.4 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 4	61
a) Secuenciación de las muestras de FFPE mediante NGS	61
b) Análisis bioinformático de variantes genéticas	64
c) Validación de mutaciones conductoras mediante Sanger	67
7.5 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 5	70
7.6 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 6	72
8. Conclusiones	73
9. Perspectivas	75
10. Bibliografía	76
Anexos	81
Anexo 1: Extracción de ácidos nucleicos de FFPE	81
Anexo 2: Extracción de ácidos nucleicos circulantes (cf-DNA)	82
Anexo 3: Extracción de ácidos nucleicos de sangre	83
Anexo 4: Extracción de ácidos nucleicos de citología en base líquida	84
Anexo 5: PCR punto final como control de calidad de ácidos nucleicos	85
Anexo 6: Diseño del panel de secuenciación	86
Anexo 7: qPCR como control de calidad de muestras FFPE	87
Anexo 8: Generación de librerías	88
Anexo 9: PCR punto final previo a Sanger	89
Anexo 10: Extracción de DNA de productos de PCR	90
Anexo 11: qPCR para el rastreo de mutaciones en las citologías en base líquida	91
Anexo 12: ddPCR para el rastreo de mutaciones en las citologías en base líquida	92
Apéndice A: Artículos	93
a. Artículo de revisión (publicado)	93
b. Artículo original (publicado)	104

## Lista de Tablas

<b>Tabla</b>	<b>Pagina</b>
Tabla 1. Epidemiología de neoplasias ginecológicas más frecuentes en la mujer	17
Tabla 2. Flujo de trabajo para el proceso de las librerías	46
Tabla 3. Grupos de estudio y sus características clínicas	54
Tabla 4. Evaluación del rendimiento y calidad (espectrofotometría) de los ácidos nucleicos extraídos de FFPE, citologías en base líquida y sangre	55
Tabla 5. Comparación de rendimiento del DNA proveniente de Papanicolaou, basados en el tipo de aislamiento (manual o automatizado) y el tipo de cepillo citológico utilizado.	57
Tabla 6. Muestras analizadas mediante qPCR para NGS	62

## Lista de Figuras

<b>Figura</b>	<b>Pagina</b>
Figura 1. Opciones quirúrgicas y quimioterapéuticas para los cánceres ginecológicos CE y CO	24
Figura 2. Biopsia quirúrgica vs Biopsia Líquida	26
Figura 3. Figura representativa del procedimiento para la toma de la citología líquida	31
Figura 4. Estrategia general del proyecto	41
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%	56
Figura 6. Capacidad de amplificación del gen control B-globina	56
Figura 7. Rendimiento del cf-DNA	60
Figura 8. Micro electroforesis capilar para el análisis del cf-DNA	61
Figura 9. Ejemplo de qPCR como control de calidad de las muestras de FFPE	62
Figura 10. Preparación de librerías y su validación	63
Figura 11. CC de la primera corrida de secuenciación	64
Figura 12. Tipos de variantes encontradas en las patologías del ovario	65
Figura 13. Tipos de variantes encontradas en las patologías del endometrio	66
Figura 14 Selección de variantes conductoras de cáncer	67
Figura 15. Electroferogramas de PIK3CA y KRAS	69
Figura 16. Análisis de la mutación KRAS mediante ddPCR.	70
Figura 17. Mutaciones conductoras en la cohorte de pacientes del presente estudio	71
Figura 18. Aplicación clínica (prueba piloto) del biomarcador KRAS G12V en muestras de citologías en base líquida	72

## Lista de Abreviaturas

%	Porcentaje
<	Menor a
>	Mayor a
≤	Menor o igual a
≥	Mayor o igual a
°C	grados centígrados
µg	microgramos
E.U.A.	Estados Unidos de América
<i>et al</i>	y colaboradores
g	gramos
h	horas
s	segundos
L	Litros
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
BL	Biopsia Liquida
CO	Cáncer de Ovario
CE	Cáncer de Endometrio
CM	Cáncer de Mama
CaCU	Cáncer Cervicouterino
CU	Cáncer de Útero
USTV	Ultrasonido transvaginal
NGS	Next Generation Sequencing, Secuenciación de Nueva Generación
ddPCR	Droplet PCR, PCR digital
FFPE	Formalin Fixed Parafin Embeded, Tejido embebido en parafina
PBO	Patologías Benignas del Ovario
PBE	Patologías Benignas del Endometrio
qPCR	Real Time PCR, PCR en tiempo real
ΔCT	Diferencia del ciclo umbral
bp	Base pairs, pares de bases
SW1	Stringent Wash 1
SPB	Sample Purification Beads
RSB	Resuspension Buffer
IVA	Ingenuity Variant Analysis
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
Br-Et	Bromuro de Etidio
CC	Control de Calidad
EtOH	Etanol
T°	Temperatura
RR	Riesgo Relativo
FW	Reacción forward
RV	Reacción reverse
PAP	Papanicolaou
SNV	Single-Nucleotide Polymorphism

## 1. Resumen

Irma G. Domínguez Vigil  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Obtención de Grado: Diciembre 2019

**Título del estudio:** "Evaluación de la citología líquida y el plasma sanguíneo para la detección oportuna de cánceres de ovario y endometrio"

**Número de páginas:** 110

**Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con  
Orientación en Biología Molecular e  
Ingeniería Genética**

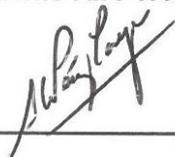
**Área de Estudio:** Biología Molecular, Ginecología Oncológica

**Propósito y Método del Estudio:** En la actualidad, no siempre es posible diagnosticar oportunamente a la mayoría de los diferentes tipos de cánceres, debido principalmente a que durante sus primeras etapas son asintomáticos. Ejemplo de ello son el Cáncer de Ovario (CO) y el Cáncer de Endometrio (CE) los cuales afectan a mujeres en los años más productivos para la sociedad. Este trabajo busca beneficiarse de las innovaciones tecnológicas actuales, como la biopsia líquida (específicamente cf-DNA de sangre periférica) y el Papanicolaou (PAP) en su versión llamada citología líquida y la secuenciación de nueva generación (NGS) con un enfoque diagnóstico, como la nueva propuesta de la medicina genómica para la detección oportuna de estos cánceres ginecológicos. Para ello, identificamos las mutaciones somáticas en el DNA aislado de los tumores de las pacientes con CO y CE, y posteriormente evaluamos las mutaciones conductoras en sus citologías líquidas (también llamadas PAP), a fin de proponer al rastreo de las mutaciones emblemáticas en la citología líquida un método diagnóstico oportuno de estas neoplasias. Mientras que los niveles del cf-DNA de plasma sanguíneo permitirán establecer un diagnóstico diferencial entre las diversas patologías ginecológicas (cancerígenas y benignas).

**Contribuciones y Conclusiones:** En nuestra cohorte de pacientes, la epidemiología de los CO y CE, indicaron que los estados con mayor incidencia son la Ciudad de México, el Estado de México y Nuevo León. La mayoría de ellas presenta sobrepeso u obesidad y predominan estadios tempranos (I-II). La diabetes mellitus tipo 2 predominó en un 22 % en CE, siendo la comorbilidad de mayor frecuencia en este grupo. Respecto a la optimización técnica del aislamiento de DNA de las citologías, el método manual presentó mayor rendimiento. Los genes más frecuentemente mutados en las muestras analizadas fueron *PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS* y *TP53*. Se encontraron mutaciones que no habían sido reportadas como asociadas a estos cánceres (aporte científico). Concluimos además que la qPCR es una opción económicamente factible para la detección de mutaciones en muestras de citologías en base líquida. El potencial biomarcador molecular *KRAS G12V* puede ser utilizado para la detección del CE de tipo endometriode. Este trabajo representa uno de los primeros esfuerzos en el análisis de los niveles del cf-DNA de patologías ginecológicas benignas y cáncer.

**Firma del Asesor**

**Dr. Antonio Ali Pérez Maya**



---

## 1. Introducción

### 1.1 Cánceres ginecológicos

El cáncer es una enfermedad en la cual las células del cuerpo comienzan a multiplicarse sin control. Los cánceres se identifican de acuerdo con la parte del cuerpo en que aparecen primero. Cuando el cáncer se origina en los órganos reproductores de la mujer, se denomina cáncer ginecológico [1].

Los cánceres ginecológicos más frecuentes son:

- 🦋 El cáncer de cuello uterino o Cáncer Cervicouterino (CaCU).
- 🦋 El cáncer de ovario (CO).
- 🦋 El cáncer de útero (CU). El tipo de CU más frecuente es el Cáncer de Endometrio (CE).
- 🦋 El cáncer de vagina.
- 🦋 El cáncer de vulva.

En México, en los últimos 30 años, el CaCU ha disminuido considerablemente tras la implementación masiva del Papanicolaou y ante la baja de éste, los cánceres de ovario (CO) y endometrio (CE) han retomado mayor importancia[1,2] .

#### 1.1.1 El cáncer de endometrio y sus características clínico-patológicas

Los carcinomas endometriales se originan en las células del revestimiento interno del útero (el endometrio). Casi todos los cánceres de útero son de este tipo y se dividen en tipos histológicos:

- 🦋 Adenocarcinoma (90%)
- 🦋 Carcinosarcoma
- 🦋 Carcinoma de células escamosas
- 🦋 Carcinoma indiferenciado
- 🦋 Carcinoma de células pequeñas
- 🦋 Carcinoma transicional

El CE se puede clasificar por grados, basado en la cantidad de glándulas que forma el cáncer que lucen similares a las encontradas en el endometrio normal y saludable.

Existen 3 grados de CE:

🔥 Los tumores de grado 1 tienen 95% o más de tejido canceroso que forma glándulas.

🔥 Los tumores de grado 2 tienen entre 50% y 94% de tejido canceroso que forma glándulas.

🔥 Los tumores de grado 3 tienen menos de la mitad de tejido canceroso que forma glándulas, tienden a ser agresivos y a tener un pronóstico menos favorable que los cánceres de menor grado. Además, la mayoría de las células cancerosas están agrupadas de manera irregular o desorganizada y no forman glándulas.

Los cánceres endometrioides en grados 1 y 2 son cánceres endometriales tipo 1. Por lo general, los cánceres tipo 1 no son muy agresivos y no se propagan rápidamente a otros tejidos. Se cree que el exceso de estrógeno causa los cánceres endometriales tipo 1. A veces se desarrollan a partir de la hiperplasia atípica, un crecimiento anormal de células en el endometrio [3,4].

### **1.1.2 El cáncer de ovario y sus características clínico-patológicas**

En el pasado se creía que los CO comenzaban solamente en los ovarios, pero la evidencia reciente sugiere que muchos casos de cáncer ovárico en realidad pueden originarse en las células del extremo más distante (distal) de las trompas de Falopio [5,6]. El aparato reproductor femenino comprende dos ovarios, uno a cada lado del útero. Los ovarios (cada uno del tamaño de una almendra aproximadamente) producen óvulos, así como también las hormonas estrógeno y progesterona [7].

El cáncer epitelial de ovario es frecuente en los países industrializados, con excepción de Japón, lo que sugiere la relación de múltiples factores físicos, químicos y dietéticos. Aunque no se ha identificado ningún carcinógeno específico, se han documentado los

siguientes factores de riesgo: antecedentes familiares de cáncer de ovario, nuliparidad, infecundidad y uso de inductores de ovulación; raza blanca, dieta rica en grasas, antecedentes personales de cáncer de mama, colon o endometrio y exposición a radiación; talco o asbesto [8].

El tipo de célula en la que se origine el cáncer determina el tipo de cáncer de ovario. Los tipos de cáncer de ovario son [5,7]:

🔗 *Tumores epiteliales.* Se originan en la capa delgada de tejido que recubre el exterior de los ovarios. Aproximadamente, el 90% de los tipos de cáncer de ovario son tumores epiteliales. Estos tumores pueden ser:

- 🔗 Benignos (no cáncer): Estos tumores no se propagan y generalmente no conducen a enfermedades graves. Existen varios tipos de tumores epiteliales benignos, incluyendo los cistoadenomas serosos, los cistoadenomas mucinosos y los tumores de Brenner.
- 🔗 De escasa malignidad (bajo potencial maligno): Estos tumores no se ven claramente como cancerosos y se conocen como cáncer ovárico epitelial de escasa malignidad (límitrofe). Los dos tipos más comunes son carcinoma seroso proliferativo atípico y carcinoma mucinoso proliferativo atípico; tienden a afectar a las mujeres más jóvenes en comparación con los cánceres ováricos típicos. Estos tumores crecen lentamente y tienen menos probabilidades de causar la muerte que la mayoría de los cánceres de ovario.
- 🔗 Maligno (cáncer): Estos tumores reciben el nombre de *carcinomas*.
  - Carcinomas serosos (52%): es por mucho el más común y puede incluir tumores de bajo grado y de alto grado
  - Carcinoma de células claras (6%)
  - Carcinoma mucinoso (6%)
  - Carcinoma endometriode (10%)

🔗 *Tumores estromales.* Se originan en el tejido ovárico que contiene células que producen hormonas. Alrededor del 7% de los tumores ováricos son estromales. Entre los

tumores del estroma malignos (cancerosos) se encuentran los tumores de células granulosa (el tipo más común), los tumores de teca-granulosa y los tumores de células de Sertoli-Leydig, los cuales, por lo general, se consideran cánceres de bajo grado. Los tecomas y los fibromas son tumores del estroma benignos. A menudo, los tumores estromales cancerosos se encuentran en etapa temprana y tienen un buen pronóstico (con más del 75% de las pacientes con larga sobrevivida).

**⚠** *Tumores de células germinativas.* Se originan en las células productoras de óvulos. Estos tipos de cáncer poco frecuentes tienden a ocurrir en las mujeres más jóvenes. Menos del 2% de los cánceres de ovario son de origen de células germinales. En general, tienen un buen pronóstico, con más de nueve de cada 10 pacientes sobreviviendo al menos 5 años después del diagnóstico. Existen varios subtipos de tumores de células germinales. Los tumores germinales más comunes son:

- Teratomas o quiste dermoide: se asemejan a cada una de las tres capas de un embrión en desarrollo: el endodermo (la capa más profunda), el mesodermo (la capa intermedia) y el ectodermo (la capa exterior). Estos tumores o quistes contienen diversas clases de tejidos benignos incluyendo huesos, pelo y dientes; tiene una forma benigna llamada teratoma maduro (afecta a mujeres en edad de procreación) y una forma cancerosa llamada teratoma inmaduro (un tipo de cáncer; se presentan en niñas y mujeres jóvenes, por lo general menores de 18 años; son poco frecuentes).
- Disgerminomas: se consideran malignos (cancerosos), pero la mayoría no crece ni se extiende con mucha rapidez. Por lo general afecta a mujeres adolescentes o de entre 20 y 29 años.
- Tumores del seno endodérmico y coriocarcinomas. Son tumores infrecuentes que afectan generalmente a niñas y a mujeres jóvenes. Suelen crecer y extenderse con rapidez, pero, por lo general, son muy sensibles a la quimioterapia.

En esta sección añadiremos a los quistes ováricos, los cuales son acumulación de líquido dentro de un ovario, ocurren como una parte normal del proceso de ovulación (llamados

quistes funcionales), indoloros generalmente; sin embargo, el 30% exhiben características sospechosas de malignidad como áreas sólidas o masas [9], por lo que adicionalmente muchas mujeres son sometidas a cirugías innecesarias debido a quistes no malignos o no responsables de los síntomas que presentan; solo un número pequeño de casos son causados por CO, de allí su importancia clínica en los cánceres ginecológicos [10].

## 1.2 Epidemiología

La epidemiología de las neoplasias más frecuentes en la mujer se describe en la Tabla I, y además se denota la relación de éstas versus el Cáncer de Mama (CM) y el CaCU, otras de las neoplasias ginecológicas que afectan a nuestra población.

<b>Tabla 1. Epidemiología de neoplasias ginecológicas más frecuentes en la mujer [11]</b>						
Cáncer ginecológico	Mundial			Nacional		
	Incidencia	Mortalidad	Prevalencia a 5 años	Incidencia	Mortalidad	Prevalencia a 5 años
CM	2,088,849	626,679	6,875,099	27,283	6,884	<b>83,287</b>
CaCU	569,847	311,365	1,474,265	7,869	4,121	<b>22,769</b>
CE	382,069	89,929	1,283,348	7,226	1,128	<b>21,940</b>
CO	<b>295,414</b>	<b>184,799</b>	<b>762,663</b>	<b>4,759</b>	<b>2,765</b>	<b>12,942</b>

El cáncer de ovario es la segunda neoplasia maligna ginecológica a nivel mundial, sólo después del cáncer de mama, se calcula que del 1 al 2% de las mujeres desarrollarán cáncer de ovario a lo largo de su vida [8]. En México, el cáncer de ovario constituye el 4% de todas las neoplasias [8]. En el 2011 Rivas y colaboradores [12] reportaron que los estados con mayor incidencia de CO son Nuevo León, Estado de México y Ciudad de México.

## 1.3 Sintomatología, Diagnóstico y Tratamiento

En la mayoría de los casos de los cánceres CE y CO, el diagnóstico final se realiza hasta el momento de la cirugía, por lo que en esta sección se abarcaran en conjunto sus síntomas (inespecíficos), diagnóstico y tratamiento.

Aproximadamente el 90% de las mujeres diagnosticadas con CE presenta sangrado vaginal anormal, como un cambio en sus periodos menstruales o sangrado entre periodos o después de la menopausia. La secreción vaginal sin sangre también puede ser una señal de cáncer de endometrio. Un dolor en la pelvis, sentir una masa (tumor) y perder peso inesperadamente también pueden ser síntomas de cáncer de endometrio. Estos síntomas suelen ser más comunes en las últimas etapas de la enfermedad [13]. En el 75% de los casos, las pacientes con CE se presentan con sangrado uterino anormal, flujo o dolor pélvico. La biopsia endometrial nos proporciona un diagnóstico inicial, considerando a los estudios de imagen como la tomografía o resonancia magnética para evaluar la metástasis.

Por su parte, en el 95% de las pacientes que presentan CO, los síntomas son inespecíficos, entre estos se encuentran: aumento del volumen abdominal (61%), flatulencia (57%), fatiga (47%), dolor abdominal (36%), indigestión (31%), incremento de la frecuencia urinaria (27%), dolor pélvico (26%), constipación (25%), dolor lumbar (23%), dispareunia (17%), anorexia (16%), masa pélvica (14%), sangrado transvaginal (13%), pérdida de peso (11%), diarrea (1%), trombosis venosa profunda (1%), o simplemente no presentar ningún síntoma (5%) [14].

Toda paciente con alguno de los síntomas mencionados, deberá realizarse una historia clínica detallada en búsqueda de historia familiar de carcinoma mamario y/o ovárico, exploración física completa, exámenes de rutina, ultrasonido transvaginal (USTV) según sea la indicación y Ca-125/Ca 19.9 [15]. El biomarcador más ampliamente utilizado es el Ca-125, el cual es de utilidad para la orientación en el diagnóstico, sin embargo, es importante mencionar que es inespecífico ya que otras patologías tanto benignas como malignas lo pueden elevar (>35 U/ml). Este antígeno se eleva en etapas clínicas tempranas en menos de la mitad de los casos y se encuentra elevado en más de 80% de las etapas avanzadas [16]. El USTV parece tener una mejor capacidad para visualizar los ovarios, independiente del índice de masa corporal, y requiere menor tiempo. Se considera un volumen normal de 10 cc en mujeres posmenopáusicas [17]. Además, es importante tomar en cuenta la morfología (presencia de septos, bilateralidad, componente sólido y

ascitis) para tener la sospecha de CO. Su sensibilidad va del 80-100% por ciento con una especificidad del 94-99%, dependiendo del operador [18]. Actualmente, no existe una prueba específica para la detección oportuna del CO[19]. El tratamiento depende de la extensión de la enfermedad (estadio) y del estado general de la paciente (además de la consideración de la edad).

La etapa es uno de los factores más importantes para decidir cómo tratar el cáncer y determinar cuán eficaz pudiera ser el tratamiento. Los dos sistemas usados para clasificar las etapas de estos cánceres son, el sistema FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) y el sistema de clasificación del cáncer TNM del AJCC (American Joint Committee on Cancer) son básicamente los mismos. Ambos sistemas estadifican (clasifican) este cáncer en base a tres factores: la extensión (tamaño) del tumor (T), la propagación a los ganglios (nódulos) linfáticos adyacentes (N) y la propagación (metástasis) a sitios distantes (M). Los números y las letras después de la T, N y M proporcionan más detalles sobre cada uno de estos factores. Los números más altos significan que el cáncer está más avanzado. Una vez que se han determinado las categorías T, N y M de una persona, esta información se combina en un proceso llamado agrupación por etapas para asignar una etapa general. El sistema de estadificación en la tabla que sigue utiliza la etapa patológica, la cual se determina mediante el examen del tejido extraído durante una operación.

Referente al CO [20]:

- ⚡ Estadio I: El cáncer está solamente en el ovario (u ovarios) o la(s) trompa(s) de Falopio (T1). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ⚡ Estadio IA: El cáncer está en un ovario y el tumor está restringido al interior del ovario; o el cáncer está en una trompa de Falopio y solo se encuentran dentro de la trompa de Falopio. No hay cáncer en las superficies externas del ovario o de la trompa de Falopio. No hay células cancerosas en el líquido (ascitis) o en los lavados del abdomen y la pelvis (T1a). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).

- ⚡ Estadio IB: El cáncer está en ambos ovarios o en las trompas de Falopio, pero no en sus superficies externas. No hay células cancerosas en el líquido (ascitis) o en los lavados del abdomen y la pelvis (T1b). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ⚡ Estadio IC: El cáncer está en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio, y tiene cualquiera de las siguientes características:
  - ⚡ El tejido (cápsula) que rodea el tumor se reventó durante la cirugía, lo que podría permitir que las células cancerosas se derramen hacia el abdomen y la pelvis (llamado derrame quirúrgico). Esta etapa se identifica como IC1.
  - ⚡ El cáncer se encuentra en la superficie exterior de al menos uno de los ovarios o trompas de Falopio, o la cápsula (tejido que rodea el tumor) se reventó antes de la cirugía (lo que podría permitir que las células cancerosas se derramen hacia el abdomen y la pelvis). Esta etapa se identifica como IC2.
  - ⚡ Hay células cancerosas en el líquido (ascitis) o en los lavados del abdomen y la pelvis. Esta etapa se identifica como IC3. No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ⚡ Estadio II: El cáncer se encuentra en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio y se ha propagado a otros órganos (como el útero, la vejiga, el colon sigmoide, o el recto) de la pelvis o hay cáncer peritoneal primario (T2). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
  - ⚡ Estadio IIA: El cáncer se ha propagado o ha invadido (ha crecido en) el útero, o las trompas de Falopio, o los ovarios. (T2a) No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
  - ⚡ Estadio IIB: El cáncer está en la superficie externa o ha crecido hacia otros órganos cercanos en la pelvis, como la vejiga, el colon sigmoide o el recto (T2b). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ⚡ Estadio III: El cáncer se encuentra en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio.
  - ⚡ Estadio IIIA: El cáncer se encuentra en uno o ambos ovarios o en las

trompas de Falopio, o hay cáncer peritoneal primario (T1) y pudo haberse propagado o crecido hacia órganos cercanos en la pelvis (T2). Se ha extendido a los ganglios linfáticos retroperitoneales (pélvicos y/o para aórticos) solamente. No se ha propagado a sitios distantes (M0).

⚡ Estadio IIIA2: El cáncer está en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio, o hay cáncer peritoneal primario y se ha propagado o ha crecido hacia órganos fuera de la pelvis. Durante la cirugía, el cáncer no se puede observar a simple vista en el abdomen (fuera de la pelvis), pero se detectan depósitos diminutos de cáncer en el revestimiento del abdomen cuando se examinó en el laboratorio (T3a). El cáncer pudo o no haberse propagado a los ganglios linfáticos retroperitoneales (N0 o N1), pero no se ha propagado a partes distantes (M0).

⚡ Estadio IIIB: Hay cáncer en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio, o hay cáncer peritoneal primario y se ha propagado o ha crecido hacia órganos fuera de la pelvis. Los depósitos de cáncer son lo suficientemente grandes como para que el cirujano pueda verlos, pero no miden más de 2 cm (aproximadamente 3/4 de pulgada) de ancho. (T3b) Puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos retroperitoneales (N0 o N1), pero no se ha extendido al interior del hígado o al bazo ni a sitios distantes (M0).

⚡ Estadio IIIC: El cáncer está en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio, o hay cáncer peritoneal primario y se ha propagado o ha crecido hacia órganos fuera de la pelvis. Los depósitos de cáncer miden más de 2 cm (aproximadamente 3/4 de pulgada) de ancho, y estos pueden estar por fuera (la cápsula) del hígado o el bazo (T3c).

⚡ Puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos retroperitoneales (N0 o N1), pero no se ha extendido al interior del hígado o al bazo ni a sitios distantes (M0).

⚡ Estadio IV: Metástasis a distancia

⚡ Estadio IVA: Hay células cancerosas en el líquido que rodea a los pulmones (a esto se le llama un derrame pleural maligno) sin ninguna otra área de

propagación del cáncer, como al hígado, el bazo, el intestino, o los ganglios linfáticos fuera del abdomen (M1a).

- ✚ Estadio IVB: El cáncer se propagó al interior del bazo o el hígado, a los ganglios linfáticos aparte de los ganglios linfáticos retroperitoneales, y/o a otros órganos o tejidos fuera de la cavidad peritoneal, tal como los pulmones y los huesos (M1b).

Referente al CE [21]:

- ✚ Estadio I: El cáncer crece dentro del útero. Puede que también crezca hacia las glándulas cervicales, pero no hacia el tejido conectivo de soporte del cuello uterino (T1). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ✚ Estadio IA: El cáncer se encuentra en el endometrio (revestimiento interior del útero) y puede que haya crecido a menos de la mitad de la capa muscular subyacente del útero (el miometrio) (T1a). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ✚ Estadio IB: El cáncer ha crecido desde el endometrio hacia el miometrio. Ha invadido a más de la mitad del camino a través del miometrio, pero no se ha propagado más allá del cuerpo del útero (T1b). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ✚ Estadio II: El cáncer se ha propagado desde el cuerpo del útero y crece hacia el tejido conectivo de soporte del cuello uterino (conocido como estroma cervical). Pero no se ha propagado fuera del útero (T2). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ✚ Estadio III: El cáncer se ha propagado fuera del útero, pero no hacia el revestimiento interior del recto o de la vejiga urinaria (T3). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ✚ Estadio IIIA: El cáncer se ha propagado hacia la superficie exterior del útero (la serosa) y/o a las trompas de Falopio o los ovarios (los anexos) (T3a). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
- ✚ Estadio IIIB: El cáncer se ha propagado a la vagina o a los tejidos alrededor del

útero (el parametrio) (T3b). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).

✂ Etapa IIIC1: El cáncer crece en el cuerpo del útero. Puede que se haya propagado hacia algunos tejidos cercanos, pero no crece hacia el interior de la vejiga o el recto (T1 a T3). También se ha propagado a los ganglios linfáticos de la pelvis (N1, N1mi, o N1a), pero no hacia los que están alrededor de la aorta, ni a sitios distantes (M0).

✂ Etapa IIIC2: El cáncer crece en el cuerpo del útero. Puede que se haya propagado hacia algunos tejidos cercanos, pero no crece hacia el interior de la vejiga o el recto (T1 a T3). También se ha propagado a los ganglios linfáticos alrededor de la aorta (ganglios linfáticos para aórticos) (N2, N2mi, o N2a), pero no a sitios distantes (M0).

✂ Etapa IV: Metástasis a distancia

✂ Etapa IVA: El cáncer se ha propagado al revestimiento interior del recto o de la vejiga urinaria (referida como la mucosa) (T4). Puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos cercanos (cualquier N), pero no se ha propagado a sitios distantes (M0).

✂ Etapa IVB: El cáncer se ha propagado a ganglios linfáticos inguinales (ingle), a la parte superior del abdomen, al epiplón o a órganos distantes del útero, tal como los pulmones, el hígado, o los huesos (M1). El cáncer puede ser de cualquier tamaño (Cualquier T) y podría o no haberse propagado a otros ganglios linfáticos (Cualquier N).

En la Figura 1 se esquematiza las opciones de tratamiento para ambos tipos de cáncer, que por lo general, para estos cánceres es una combinación de cirugía y quimioterapia.

✂ Cirugía: El médico extirpa el tejido canceroso por medio de una operación.

✂ Quimioterapia: Tratamiento que utiliza medicinas especiales para reducir el tamaño del tumor o eliminarlo. Estos medicamentos pueden administrarse en píldoras o por vía intravenosa y, en ocasiones, de ambas maneras.

✂ Los mecanismos de acción de los medicamentos principalmente utilizados

para estos cánceres se describen a continuación:

- ✂ Paclitaxel: Estimula el ensamblaje de microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos impidiendo la despolimerización. Inhibe la formación del huso mitótico en la división celular, bloqueando el proceso de mitosis.
- ✂ Carboplatino: Produce enlaces cruzados en las cadenas de DNA.
- ✂ Cisplatino: Inhibe la síntesis del ADN produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas de ADN. La síntesis de proteínas y RNA es inhibida en menor grado.

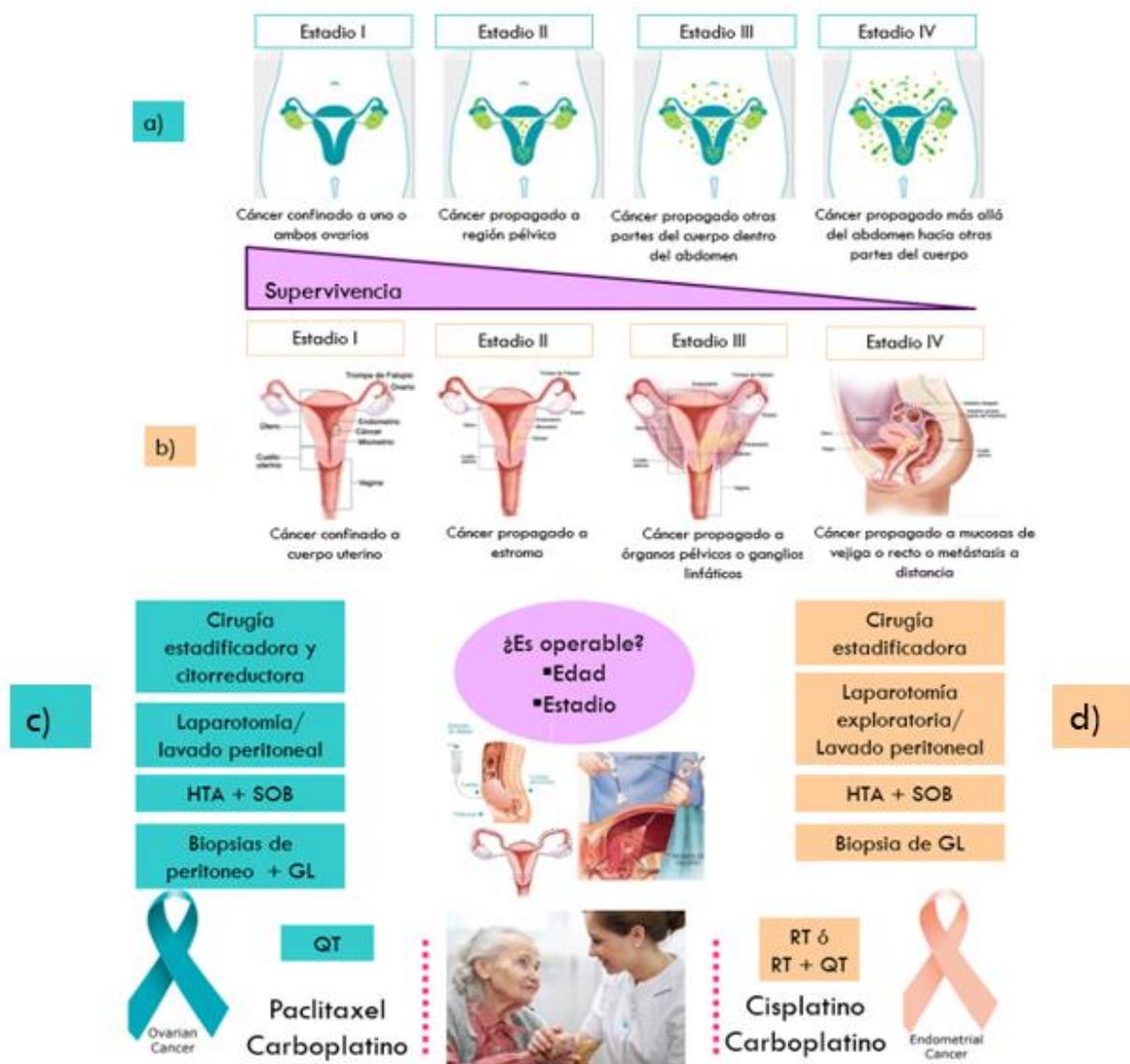


Figura 1 Opciones quirúrgicas y quimioterapéuticas para los cánceres ginecológicos CE y CO. a) Estadios de CO; b) Estados de CE; c) Opciones terapéuticas de CO; d) Opciones terapéuticas de CE. HTA= Histerectomía; SOB= Salpingooforectomía bilateral; GL= Ganglios linfáticos; QT= Quimioterapia.

## 1.4 Biopsia líquida

Confirmar y detectar la presencia de anomalías genéticas en tumores sólidos es de gran utilidad para el diagnóstico, la selección de la terapia adecuada y el monitoreo de la enfermedad [22]; Sin embargo, la invasividad de una biopsia quirúrgica, que involucre remover una pieza de tejido o células del cuerpo y que está limitado a la localización del tumor, es de alto costo y puede requerir de hospitalización y un tiempo largo de recuperación, por lo que es necesario considerar a la biopsia líquida (BL) como la nueva alternativa para la detección y monitoreo del cáncer.

La BL, es una técnica no invasiva que permite detectar biomarcadores de enfermedad en sangre y otros fluidos del cuerpo. Por lo cual se puede considerar a la citología en base líquida, también llamada Papanicolaou (PAP), como un método no invasivo con potencial para rastrear a estos biomarcadores.

La relación entre la etapa de presentación clínica y la supervivencia a la enfermedad ha proporcionado una clara justificación de los esfuerzos para mejorar los métodos de detección en estadios tempranos, de igual manera los riesgos de los métodos invasivos para su diagnóstico definitivo justifican la búsqueda de métodos menos invasivos, como la BL.

### 1.4.1 Plasma sanguíneo

El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América define a la BL como una “Prueba que se realiza en una muestra de sangre con el fin de buscar células cancerosas tumorales que están circulando en ella o fragmentos de ADN de las células tumorales que circulan por la sangre” [23,24].

La BL presenta ventajas sobre otras técnicas de diagnóstico ya que la forma de obtención de los fluidos se realiza de una forma no invasiva o estresantes como las biopsias quirúrgicas y estudios de imagen [25]. Los primeros avances de BL se dieron en 1948, cuando se realizaron las primeras publicaciones del DNA libre circulante (cf-DNA) y RNA

presentes en sangre de humanos, lo que permitió discriminar entre pacientes con cáncer e individuos sanos. La BL o los biomarcadores tumorales en sangre tienen un gran valor en la detección temprana, predicción y pronóstico del cáncer.

La biopsia quirúrgica (BQ) es el “Gold estándar” para la investigación clínica y de secuenciación, pero presenta grandes inconvenientes (invasividad, la información obtenida depende del sitio de toma de muestra, largo tiempo de recuperación, alto costo, información limitada a la experiencia del patólogo), que pueden ser resueltos con la implementación de la BL, misma que brinda información genómica relacionada con múltiples sitios de metástasis. Presenta además la ventaja de poder ser fuente de diferentes fluidos corporales (plasma, suero, sangre, orina, etc.). Además, al ser representativa de la heterogeneidad del tumor que la origina, facilita los análisis moleculares de éste. Las comparaciones de la BL y la BQ se pueden ver en la Figura 2.

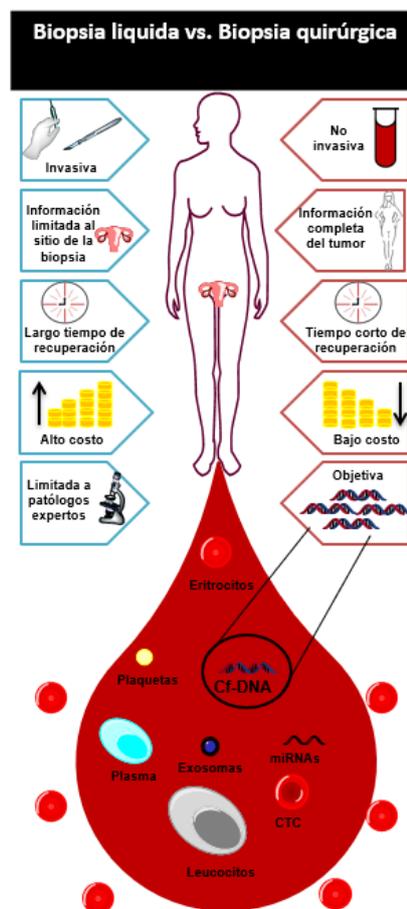


Figura 2 Biopsia quirúrgica vs Biopsia líquida. Dominguez-Vigil et al, Oncotarget 2018

## **cf-DNA y ct-DNA**

El cf-DNA es liberado fragmentado hacia la circulación mediante procesos como apoptosis y necrosis por parte de las células normales y cancerosas [26,27]. Cuando son liberados específicamente por células normales se le conoce como cf-DNA. Mientras que cuando son liberados por parte de las células cancerosas se les conoce como ct-DNA. Dentro de las características moleculares del ct-DNA se encuentran que éste puede estar asociado a mutaciones, metilaciones y secuencias virales derivadas del tumor [28]. El cf-DNA se encuentra principalmente en plasma y suero, sin embargo, puede ser aislado de ascitis, leche materna, fluido linfático y peritoneal, aspirado de médula ósea, orina, fluido prostático, lavado peritoneal, esputo, fluido cerebroespinal, jugo gástrico y biliar e inclusive muestras de heces [29]. Los ácidos nucleicos circulantes se eliminan de la sangre por el hígado y el riñón y tienen una vida media variable en la circulación que van desde 15 minutos hasta varias horas [27,30]. Las concentraciones del ct-DNA en pacientes con cáncer oscila en un rango de 0 a 1,000 ng/ml de sangre, con un promedio de 180 ng/ml de ct-DNA; mientras que el cf-DNA en sujetos sanos oscila en un rango de 0 a 100 ng/ml de sangre, con un promedio de 30 ng/ml [27].

El ct-DNA es detectado hasta en un 75% de los cánceres pancreático, de ovario, colorrectal, de vejiga, mama, cuello, hepatocelular, gastroesofágico y melanoma en estados avanzados; y en los casos de cáncer primario cerebral, renal, prostático y tiroideo, hasta en un 50%. [31].

Todos estos descubrimientos han originado un gran interés de los investigadores en el potencial que posee el cf-DNA para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de distintas condiciones clínicas. Dicho interés se ha enfocado principalmente en pacientes con cáncer, ya que presentan aumentos considerables de cf-DNA en comparación con los niveles observados en las personas sanas. A su vez, estos incrementos son mayores cuando la persona presenta metástasis, que es la diseminación del tumor primario a zonas distintas de la original en estados avanzados de la enfermedad.

Dentro del potencial clínico del cf-DNA, su medición cuantitativa se ha planteado como un marcador que permitiría detectar tumores después de demostrarse que las concentraciones de cf-DNA son mayores en personas con cáncer que en personas sanas, y significativamente mayores en personas con metástasis. Además de que en muchos casos estos niveles disminuyen en respuesta a una terapia anti cáncer exitosa y que cuando dichas concentraciones no disminuyen después de la terapia, refleja una falta de respuesta del tumor a la terapia.

Sin embargo, se pueden encontrar niveles elevados de cf-DNA en distintas condiciones fisiológicas y patológicas distintas al cáncer, como ya anteriormente se ha mencionado. Por ello, el esfuerzo emprendido para desarrollar pruebas sanguíneas poco invasivas, suficientemente sensibles y específicas para aplicarse en la evaluación clínica de personas con cáncer se ha concentrado en la detección de alteraciones moleculares características del cáncer en el cf-DNA [32].

Varios estudios han propuesto el uso de la cuantificación del cf-DNA en plasma como un método de tamizaje para cánceres como colon, mama y pulmón. Huang y colaboradores, reportaron que las concentraciones de cf-DNA en plasma de pacientes con cáncer de mama fue mayor que en tumores benignos, indicando la capacidad de discriminación entre lesiones malignas y benignas [33].

#### **1.4.2 Citología en base líquida (Papanicolaou)**

La prueba de Papanicolaou, también conocida como prueba de PAP, Papanicolaou, citología cervicovaginal y citología líquida, fue desarrollada en 1940 por Georgios Papanicolaou [34]. La prueba de Papanicolaou es un procedimiento que se usa para la obtención de células del cuello uterino con el fin de observarlas con un microscopio y así detectar si hay cáncer y pre-cáncer. Una prueba de Papanicolaou también puede ayudar a encontrar otras afecciones como infecciones o inflamaciones. A veces, se realiza al mismo tiempo que un examen pélvico o un examen para detectar ciertos tipos de virus del papiloma humano (VPH) [35].

Existen dos modalidades de Papanicolaou, convencional y en base líquida.

- ✘ Papanicolaou convencional: el médico primero coloca un espéculo dentro de la vagina. Este instrumento de metal o plástico mantiene la vagina abierta, de manera que el cuello uterino pueda verse bien. Seguidamente se obtiene, mediante raspado ligero, una muestra de células y mucosidad del ectocérvix con una pequeña espátula. Se inserta en la abertura del cuello uterino un pequeño cepillo o una torunda de algodón para tomar una muestra del endocérvix. Si se extirpó su cuello uterino (debido a cervicectomía o histerectomía) como parte del tratamiento del cáncer de cuello uterino o precáncer, la muestra se tomará de las células de la parte superior de la vagina [35]. Entonces, las muestras se preparan para que se puedan observar al microscopio en el laboratorio, como se puede apreciar en la Figura 3.
- ✘ Papanicolaou en base líquida: actualmente y para una mayor visualización y mayores especificidades en la detección de las lesiones, se utiliza esta modalidad de Papanicolaou, debido a que el Papanicolaou convencional se ha considerado subóptima por la alta tasa de falsos negativos, ocasionado probablemente por una pobre calidad de muestreo, errores en la preparación o interpretación. La citología en base líquida fue desarrollada como una alternativa para mejorar estos inconvenientes. Las células se enjuagan en un envase pequeño que contiene líquido, se colocan sobre el portaobjetos con una máquina especial y se examinan bajo un microscopio para ver si las células son anormales [36]. Con la técnica antes mencionada a detalle, se obtienen las células en forma directa en un líquido fijador. Las células se fijan al instante y se evita el daño por contacto con el portaobjetos seco, se minimiza la degeneración y el secado al medio ambiente después de obtener la muestra. Después se realiza una mezcla mecánica, quedando una muestra homogénea en la que las células están distribuidas uniformemente. Se hace pasar por una membrana semipermeable que retiene las células epiteliales y microorganismos, permitiendo el paso de gran parte de los desechos y también de algunas células inflamatorias. Luego se transfieren las células a un portaobjetos mediante un gradiente líquido, en el cual la muestra se separa en capas después de someterlas a centrifugación y se concentran las células eliminando cuerpos

extraños. Posteriormente se permite que la muestra se asiente por gravedad en el portaobjetos.

Idealmente, la muestra de Papanicolaou debe ser programada cuando la paciente no esté menstruando o con sangrado transvaginal. Se deben evitar duchas vaginales, relaciones sexuales, uso de tampones o cremas vaginales 24 a 48 horas previas a la toma de muestra. En caso de cervicitis, es necesario dar tratamiento previo. La paciente se debe colocar en posición supina en litotomía dorsal para poder tomar adecuadamente la muestra. El cóxis de la paciente debe estar en la orilla de la mesa de exploración para poder colocar adecuadamente el espejo vaginal y poder observar todo el cérvix (Figura 3). Se coloca el espejo vaginal y se realiza una revisión general del cérvix. No se recomienda el uso de lubricantes porque pueden contaminar u oscurecer la muestra. Se puede utilizar agua para lubricar un poco el espejo vaginal. Según los fabricantes de los insumos para toma de base líquida, los lubricantes no interfieren con las pruebas de base líquida. Para asegurar una adecuada toma de muestra, la superficie de la anatomía del cérvix debe ser visualizada completamente, incluyendo el epitelio escamoso exocervical y la unión escamocolumnar. Se debe retirar cualquier moco o flujo visible. Para la toma de la muestra se puede usar una brocha cervical, citobrush o una espátula, las cual serán aplicadas en la superficie del cérvix y rotada en una sola dirección para una toma adecuada, asegurándose de rotar al menos 360 grado la espátula o 5 rotaciones de la brocha (Figura 3) [37].

Para la transferencia del espécimen, dependerá del tipo de citología que se realizará. En el caso de la citología con base líquida, si se usa la marca comercial SurePath, tanto la cabeza de la brocha el citobrush o la espátula deben ser colocadas en el vial de la citología y posteriormente el vial debe ser etiquetado adecuadamente. En el caso del ThinPrep, la espátula o el citobrush son agitados vigorosamente 10 veces para poder liberar el espécimen y luego deben ser eliminados. En el caso de las citologías convencionales, los especímenes deben ser aplicados en la laminilla y posteriormente fijados con alcohol al 90% o bien con spray [38,39].

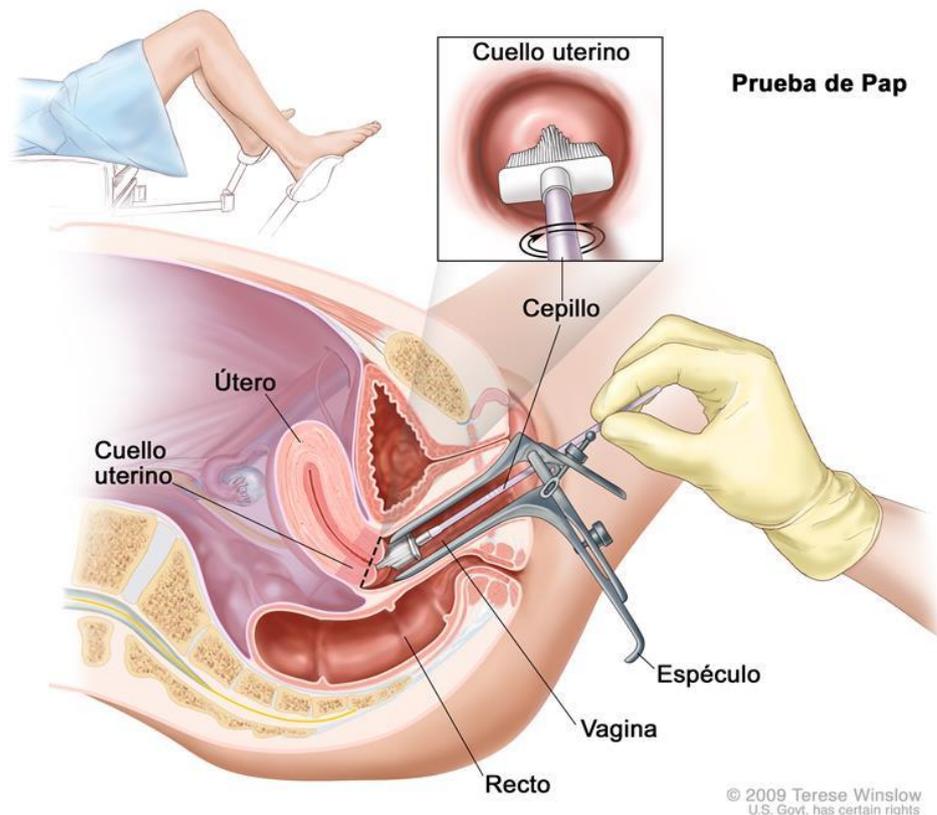


Figura 3 Figura representativa del procedimiento para la toma de la citología líquida.

Se han hecho múltiples estudios que evalúan la probabilidad de encontrar CE en citologías cérvicouterinas. Actualmente hay una distinción especial llamada células glandulares atípicas (AGC). Las AGC de la citología cervical generalmente se originan del epitelio glandular del endocérvidx o del endometrio. Estas son encontradas con menor frecuencia en las células escamosas anormales. Las anomalías glandulares se encuentran aproximadamente en un 0.1 a 2.1 por ciento de todas las muestras de citología cervical [40]. Según un estudio en donde se analizaron 75,000 muestras cérvicovaginal, las AGC se encontraron más frecuentemente en mujeres mayores de 40 años que en menores de 40 años (1.1 a 2.4 contra 0 a 0.8 o cada 1000 mujeres) [39]. Esto contrastó con los hallazgos citológicos con anomalías escamosas, las cuales se encontraron más frecuentemente en mujeres entre 15 y 29 años. Las AGC están asociadas con lesiones premalignas o malignas en aproximadamente un 30% de los casos [42,43]. A pesar de esto, la mayoría de las veces este tipo de lesiones se tratan en realidad de lesiones

escamosas y no glandulares [44,45]. Las glándulas en la citología cérvico vaginal se puede originar del endocérvix o del endometrio y en muy raras ocasiones de otros sitios.

En algunas ocasiones, el origen de la neoplasia sospechada por la citología cervicovaginal es diferente al cérvix o al de útero. Las AGC se han asociado ocasionalmente al CO o al cáncer de trompas de Falopio [46]. El CO se ha reportado en un 0.1 a 6.4% de las veces en mujeres con AGC y altamente relacionado con el hallazgo incidental de cuerpos de psamomma [43].

Aunque la prueba de citología fue introducida para el tamizaje del CaCU y sus precursores, como ya se vio previamente, en algunas ocasiones el CEO y el CE pueden ser detectadas por una citología cérvico vaginal anormal. Sin embargo, la sensibilidad de la citología sola es muy baja como para tener una repercusión citológica.

Al parecer es realmente prometedor el poder detectar algún cáncer de origen pélvico por medio de la detección de DNA en las células cervicovaginales. Gracias a nueva tecnología de la secuenciación del DNA, es posible identificar estas anomalías en la citología en base líquida. Kinde y colaboradores identificaron la presencia de las mutaciones del tumor primario en comparación con la citología en 100% de los casos del CE y 41% de los CO [47].

## **2. Antecedentes**

En la actualidad, no siempre es posible diagnosticar oportunamente a la mayoría de los diferentes tipos de cánceres, debido a que durante sus primeras fases son asintomáticos, además de que hasta hace muy poco, los métodos para su detección actuales no presentan ni la sensibilidad ni la especificidad adecuadas, por lo que se dependía de cirugías invasivas para tomar una biopsia y lograr confirmar/descartar sospechas.

Las neoplasias ginecológicas que este proyecto busca unificar en su enfoque diagnóstico afectan a nuestras mujeres en los años de mayor dependencia de sus familias y más productivos para el resto de la sociedad.

En México y el mundo no existen, a la fecha, metodologías cuyas sensibilidades y especificidades sean lo suficientemente efectivas para la detección oportuna de los cánceres ginecológicos, por lo cual en estas neoplasias que están en aumento, los diagnósticos se realizan en estadios avanzados y ello resulta en alta mortalidad.

Por lo que este trabajo, busca beneficiarse de las innovaciones tecnológicas actuales, como la biopsia líquida, una técnica no invasiva que permite detectar biomarcadores de enfermedad en sangre y otros fluidos del cuerpo, aunado de su mínima invasividad y fácil obtención para el diagnóstico oportuno de dichas neoplasias, lo que sin duda abre una gran posibilidad de combatir más efectiva y oportunamente a estos cánceres ginecológicos, que tanto sufrimiento y deterioro económico imponen a las familias y sociedad mexicanas.

La aplicación de las nuevas tecnologías genómicas para el rastreo de mutaciones emblemáticas en un panel de genes a las muestras de biopsias líquidas de sangre se usa ya en nuestro país para combatir el cáncer de pulmón, por lo que a futuro permitirá este prometedor enfoque diagnóstico, como la nueva propuesta de la medicina genómica para la detección oportuna de estos cánceres ginecológicos.

La evolución de los métodos de secuenciación nucleotídica masiva (NGS, del inglés Next

Generation Sequencing) y de PCR de tercera generación (ddPCR, del inglés Droplet digital Polimerasa Chain Reaction), nos han provisto de herramientas altamente sensibles y novedosas que combinadas con un método no invasivo de diagnóstico de anomalías genéticas como la biopsia líquida, contempla la posibilidad de utilizarle para el diagnóstico oportuno de cánceres ginecológicos.

La prevención y el diagnóstico temprano en el cáncer ginecológico se ha convertido en una realidad debido al reconocimiento de la génesis del cáncer en general, así como de su progresión, dados por un proceso caracterizado por una serie de eventos moleculares y genéticos.

En el CE y el CO, estos procesos originan un crecimiento descontrolado de las células anormales de los respectivos tejidos.

Es importante destacar que hasta hace un par de décadas, el CaCU se encontraba como una de las primeras causas de muerte de la mujer por cáncer. En los últimos 50 años la reducción en su mortalidad en los países desarrollados se ha atribuido a programas de prevención y control bien organizados, basados en la incorporación del cribado empleando la prueba de Papanicolaou [48].

Entre las herramientas estudiadas para la detección de CO en etapas tempranas como tamizaje se encuentran el interrogatorio y la exploración ginecológica, los marcadores tumorales, entre los que destaca el Ca125, el uso de métodos de imagen como el ultrasonido, y diversas herramientas multimodales [49,50]. Los marcadores tumorales son los que más atención han recibido debido a su bajo costo, fácil reproducibilidad y porque no son métodos invasivos. Sin embargo, el Ca125 presenta una especificidad limitada. Debido a la presencia de ciclos menstruales, así como a la presencia de una mayor cantidad de condiciones benignas, la tasa de falsos positivos para detectar CO es mayor en mujeres premenopáusicas; debido a que se puede elevar en muchas condiciones benignas como endometriosis, miomatosis uterina, cirrosis, enfermedad pélvica inflamatoria, menstruación o cualquier causa que ocasione irritación peritoneal. Por esto

mismo, el estudio del Ca125 se ha limitado a mujeres postmenopáusicas, encontrando valores de corte  $\geq 30$  U/ml como un predictor para riesgo de CO [51].

## **NGS en la detección de mutaciones**

Actualmente, las complejas preguntas de investigación genómica exigen una profundidad de información más allá de la capacidad de las tecnologías tradicionales de secuenciación del DNA. Con su rendimiento, escalabilidad y velocidad sin precedentes, la NGS (también conocida como secuenciación masiva paralela, del inglés massive parallel sequencing) permite a los investigadores estudiar sistemas biológicos a un nivel nunca antes posible, además tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y translocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones).

El esquema principal de trabajo es conceptualmente similar para todos ellos: el DNA se fragmenta y mediante ligación se le añaden secuencias adaptadoras a los extremos; los fragmentos de DNA se amplifican clonalmente y se agrupan juntos (clustering) para ser utilizados como entidades a secuenciar; la secuenciación se realiza alternando ciclos de terminación reversible cíclica mediante terminadores reversibles para incorporar nucleótidos marcados fluorescentemente que a continuación son «fotografiados» y posteriormente son procesado. Finalmente las secuencias cortas producidas por el instrumento se denominan lecturas o reads, las cuales se analizan bioinformáticamente [52].

Hoy en día, la NGS se está convirtiendo en una herramienta clave para los programas de detección molecular de enfermedades. La identificación de pacientes con mutaciones oncogénicas proporciona la oportunidad de utilizar la información genómica de los tumores individuales para guiar la selección de terapias en un intento de mejorar el resultado de los pacientes con cáncer [53].

Las opciones innovadoras de NGS y el análisis de datos permiten una amplia gama de aplicaciones, por ejemplo, la secuencia rápida de genomas completos, secuenciar profundamente regiones blanco, descubrir nuevas variantes de RNA y sitios de empalme, analizar factores epigenéticos como la metilación del DNA en todo el genoma, caracterizar las interacciones DNA-proteína, investigar la diversidad microbiana en los seres humanos, y estudiar variantes somáticas raras en cáncer [54].

### **3. Justificación**

En la actualidad, no existen pruebas diagnósticas para la detección temprana de los CE y CO, por lo que la incidencia de estos ha aumentado considerablemente y la detección se realiza en etapas del cáncer muy avanzadas.

En nuestro país, estas neoplasias han sido clasificadas como problema nacional a atender, por lo que es imperativa la búsqueda de técnicas que puedan conducir a su detección.

El poder diagnóstico de las herramientas genómicas actuales podría conducir a detectar oportunamente los CE y CO.

#### **4. Hipótesis**

La detección de mutaciones asociadas a los CO y CE en la citología líquida, y los niveles del cf-DNA del plasma sanguíneo son potenciales biomarcadores para la detección oportuna de dichas neoplasias.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar la citología líquida y el plasma sanguíneo de pacientes con cáncer de ovario o endometrio, en busca de biomarcadores moleculares diagnósticos para la detección oportuna de dichas neoplasias.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Integrar un biobanco de muestras tumorales, citológicas y de plasma de pacientes diagnosticadas con patologías ginecológicas, complementado con sus datos y características clínicas, epidemiológicas y factores de riesgo.
2. Comparar procedimientos para el aislamiento de DNA proveniente de citología líquida.
3. Determinar los niveles del cf-DNA del plasma sanguíneo en pacientes con patologías ginecológicas.
4. Identificar y validar el perfil de mutaciones en genes asociados al desarrollo de los cánceres de ovario y endometrio en muestras tumorales.
5. Rastrear mutaciones tumorales en las citologías líquidas empleando secuenciación Sanger y qPCR.
6. Implementar una prueba rápida para detectar mutaciones en muestras de citología en base líquida

## **6. Materiales y Métodos**

**6.1 Diseño del estudio:** prospectivo, observacional, transversal y descriptivo.

**6.2 Aspectos éticos:** el estudio se llevó a cabo de acuerdo con lo señalado en Declaración de Helsinki, Buenas Prácticas Clínicas, y las normas establecidas en la Ley General de Salud.

Para la recolección de muestras de las instituciones participantes, el proyecto contó con las aprobaciones de sus respectivos Comités de Ética. A saber:

*Comité de Ética en Investigación del H.U.*

**BI13-005**

*Comité de Ética en Investigación del INCan*

**CEI/1031/16**

*Comité de Ética en Investigación de TECSALUD*

**CEI/19039/0139**

### **6.3 Esquema de estrategia general**

Pacientes con diagnóstico clínico de cáncer de ovario, cáncer de endometrio, patología benigna de ovario o de endometrio, que cumplieran con los criterios de inclusión y que aceptaran participar en el protocolo en alguna de las tres instituciones antes mencionadas, se les procedió a tomar muestras de sangre (biopsia líquida), citología en base líquida y un fragmento del tejido embebido en parafina (biopsia quirúrgica) (tras cirugía), se analizó y determinó mediante secuenciación de nueva generación el perfil de mutaciones en los tejidos y posteriormente se rastrearon dichas mutaciones en las citologías líquidas y se determinaron los niveles de cf-DNA en las biopsias líquidas de las mismas mediante fluorometría, PCR en tiempo real y PCR digital.

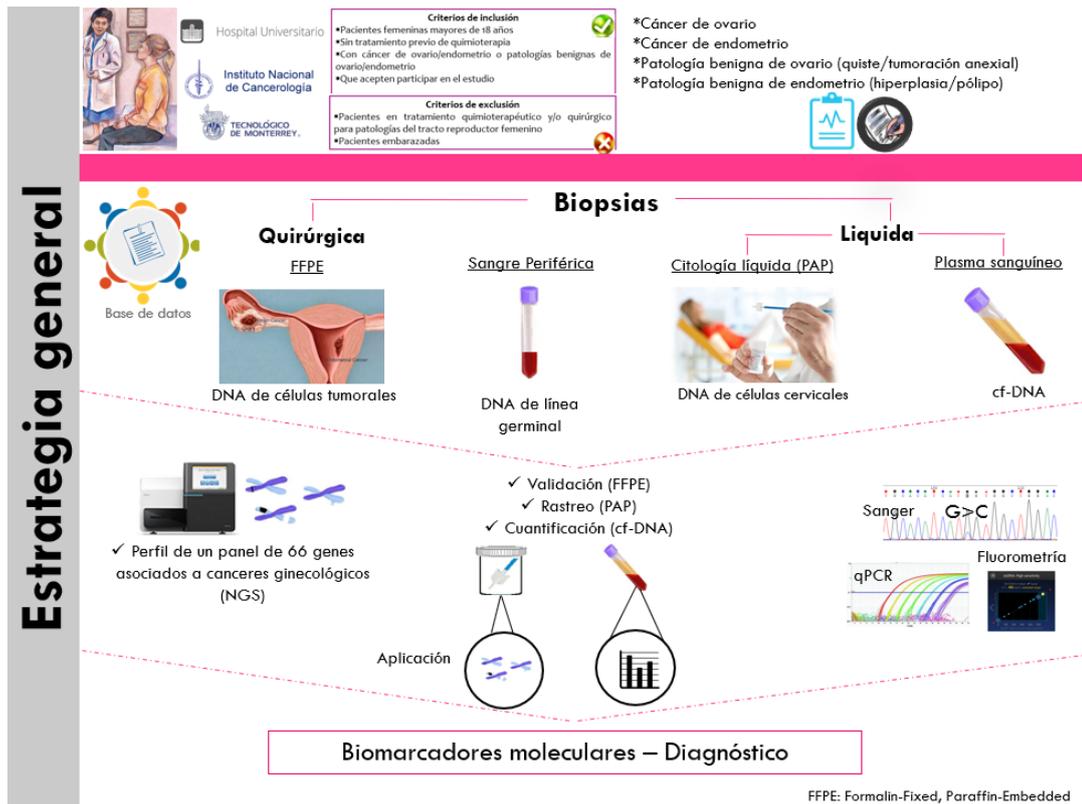


Figura 4 Estrategia general del proyecto

## 6.4 Pacientes y muestras

Este proyecto contempló recolectar un total de 200 muestras (totales) de pacientes con diagnóstico o sospecha clínicos de los siguientes grupos de estudio:

- ♀ Grupo I: muestras de pacientes diagnosticadas con CE
- ♀ Grupo II: muestras de pacientes con CO
- ♀ Grupo III: muestras de pacientes con diagnóstico de lesión anexial tales como quistes, teratomas, cistoadenomas (patologías benignas del ovario (PBO))
- ♀ Grupo IV: muestras de pacientes con diagnóstico de lesión endometrial tales como hiperplasia, pólipo (patologías benignas del endometrio (PBE))

## 6.5 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

### a) Criterios de inclusión (grupos I-IV)

- ♀ Pacientes femeninas mayores de 18 años.
- ♀ Sin tratamiento previo a su diagnóstico clínico.
- ♀ Con lesión anexial y/o endometrial (patologías benignas del ovario o del

endometrio) que requiera confirmación histológica mediante biopsia incisional o excisional.

⌘ Que acudan a consulta ginecológica por una biopsia de endometrio, o presenten períodos menstruales anormales (sangrado profuso, prolongado o irregular), sangrado después de la menopausia, sangrado por tomar medicamentos de hormonoterapia, engrosamiento del revestimiento uterino observado en una ecografía o en el diagnóstico de cáncer endometrial, u ovárico.

⌘ Que acepten participar en el estudio mediante la firma del Consentimiento Informado.

### **b) Criterios de exclusión (todos los grupos)**

⌘ Pacientes que hayan estado en tratamiento quimioterapéutico y/o quirúrgico para los diagnósticos antes mencionados.

⌘ Pacientes con VIH o hepatitis C.

### **c) Criterios de eliminación (todos los grupos)**

⌘ Muestras cuya cantidad o calidad de sus ácidos nucleicos no sea la adecuada para llevar a cabo los experimentos.

## **6.6 Proceso de obtención de muestras**

Una vez llevado a cabo el proceso de Consentimiento Informado se procedió a la obtención de las siguientes muestras:

1. Citología en base líquida: obtenido en una camilla especial para las tomas cervicovaginales en un área adecuada para ello, previo a cirugía. Fue realizado por una enfermera o medico ginecólogo especializados, mediante la ayuda de un cepillo especializado que puede colectar células del canal endo y exocervical (contamos con dos marcas diferentes de cepillos: Colpotre, una marca nacional; y Rover cervex brush, una marca extranjera)

2. Sangre: obtenida mediante punción venosa, previo a cirugía, en un área adecuada para ello. Colectada por enfermeras capacitadas. En tubos con EDTA, tubos especiales para suero y tubos especializados para la recolección y almacenamiento de ácidos nucleicos circulantes.

3. Tejido embebido en parafina: obtenido solo para aquellas pacientes que se encuentren programadas para cirugía como parte de su tratamiento, posterior a cirugía, el patólogo otorga una pieza del tejido embebido en parafina, que contenga más del 80% de

células tumorales.

## **6.7 Métodos**

En este estudio se realizaron pruebas de biología molecular y genómica para el rastreo de mutaciones en genes que se han asociado al desarrollo de los cánceres de ovario y endometrio. Las pruebas se realizaron tanto en tejidos embebidos en parafina (grupos I-IV), citología en base líquida, así como en DNA libre circulante de sangre (específicamente plasma o suero) obtenidos mediante biopsia líquida. Todas las muestras se obtuvieron de la misma paciente.

Las muestras fueron fraccionadas en alícuotas con el fin de maximizar su aprovechamiento y fueron almacenadas para su posterior extracción de ácidos nucleicos. A la vez, se generó un archivo electrónico con los datos relevantes de cada paciente (base de datos). A cada paciente o voluntaria se le aplicó una encuesta de percepción del dolor durante procedimientos ginecológicos de mayor frecuencia (ver anexos), misma que también se aplicó a otras mujeres, dicha encuesta es anónima y de riesgo menor al mínimo, por lo que se pudo aplicar a cualquier voluntaria. La aplicación de la encuesta fue llevada a cabo con el objetivo de complementar el estudio respecto al tema de invasividad de la técnica (BL modalidad sangre y citología líquida versus el estándar de oro, la biopsia quirúrgica).

### **6.7.1 Recolección y análisis histopatológico de muestras de tumores**

Las pacientes que por tratamiento médico fueran programadas para cirugía, se solicitó al patólogo una porción del tejido embebido en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) (30 mg), así como el diagnóstico (reporte) histopatológico del mismo. Como parte del procedimiento, se les pidió a los patólogos que indicaran el área donde se encontraba la mayor concentración de células cancerosas, para tomar una pequeña alícuota con un punch para biopsia y posteriormente cortarlo en fragmentos más pequeños para procesarlo. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento (extracción de ácidos nucleicos).

### **6.7.2 Extracción de ácidos nucleicos**

La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo utilizando con el kit comercial DNA/RNA FFPE kit (QIAGEN), el cual garantiza la extracción de ácidos nucleicos a partir de biopsias embebidas en parafina (aún si está fragmentado), ver anexo 1; para la obtención de ácidos nucleicos de plasma o suero, o ácidos nucleicos circulantes, se utilizó el kit QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen), ver anexo 2; para la extracción de ácidos nucleicos de sangre total se utilizó el kit DNA Blood and Tissue Midi Kit (Qiagen), ver anexo 3; y, finalmente para citología líquida se utilizó un kit comercial DNA/RNA All Prep (Qiagen), ver anexo 4, mediante una metodología manual y automatizada utilizando el equipo Qiacube de Qiagen. La cantidad de los ácidos nucleicos fue analizada en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific) utilizando 1 µl de la muestra, o mediante un fluorómetro (Qubit, Thermo Scientific) utilizando 2 µl de la muestra, finalmente el grado de integridad o de la degradación del DNA se evaluó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% tenido con bromuro de etidio (Br-Et), utilizando en promedio 400 ng de la muestra. Además, se realizó PCR punto final para el gen de la β-globina a fin de comprobar la capacidad de amplificación de un fragmento de al menos 268 bp, ver anexo 5. Cabe destacar que algunos protocolos en los anexos se encuentran en el idioma inglés con el objetivo de indicar los procedimientos originales y facilitar su reproducción.

### **6.7.3 Generación del Biobanco y archivo electrónico**

Las muestras fueron procesadas con material nuevo y estéril para evitar la contaminación cruzada entre las mismas. Los ácidos nucleicos extraídos de las muestras de tejidos se conservarán en 2 alícuotas a -20°C (DNA), la primer alícuota se utilizó en la NGS para la identificación de mutaciones que hubiesen sido encontradas en el tejido embebido en parafina (FFPE) y la segunda alícuota se utilizó para confirmar o validar las mutaciones detectadas mediante Sanger o PCR digital (ddPCR, del inglés digital PCR), dependiendo de la fracción alélica mutante. Cada paciente cuenta con un archivo electrónico en donde se almacena toda la información relevante generada en la hoja de recolección de datos, contando, además, con una clave de seguridad para garantizar la confidencialidad de los datos de identidad. La información es almacenada en archivos confidenciales, a los cuales sólo tienen acceso los investigadores del proyecto. Por medio de estas herramientas

garantiza un manejo de muestras clínicas y sus datos asociados de manera institucional y ética.

#### **6.7.4 Detección de mutaciones asociadas a los CO y CE**

En este estudio se realizaron pruebas moleculares basadas en NGS para la detección de las principales mutaciones conocidas a la fecha como causa de estos tumores, en genes relacionados al desarrollo de estos; a saber: *TP53*, *BRAF*, *CTNNB1*, *KRAS*, *PPP2R1A*, *PIK3CA*, *PTEN*, *FBXW7*, *APC*, *AKT1*, *EGFR* y *NRAS* inicialmente, contemplándose también genes que se han asociado a sobrevida como *BRCA1*, *BRCA2*, *CHST5*, *CNTN5*, *MACF1*, *OR10G4*, *SESTD1*, *TOP2A* y *ARID1A*.

Primero se realizó la detección de las mutaciones en los exones de los genes seleccionados en las muestras de FFPE, mediante NGS, utilizando el equipo Mi-Seq de Illumina. Esta tecnología fue elegida por ser altamente sensible y específica para los estudios genómicos. En la primera fase de la NGS, realizada durante la primera estancia de investigación en el laboratorio de la RAI, se secuenciaron 66 muestras de pacientes con patologías ginecológicas (CE, CO, PBO y PBE) en un rastreo general de al menos 96 X. Posteriormente, se tuvo la oportunidad de utilizar un panel de 56 genes (hotspots de genes clínicamente relevantes: *ABL1*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *DDR2*, *DNMT3A*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *EZH2*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGRF2*, *FGRF3*, *FLT3*, *FOXL2*, *GNA11*, *GNAQ*, *GNAS*, *HNF1A*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *JAK3*, *KDR*, *KIT*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MDL*, *MET*, *MLH1*, *MSH6*, *NOTCH1*, *NPM1*, *NRAS*, *PDGRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *RB1*, *RET*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TP53*, *TSC1*, y *VHL*) durante la segunda estancia de investigación en el laboratorio WCHN donde se secuenciaron 12 muestras de pacientes con CE a una profundidad de al menos 3,000 X.

##### **6.7.4.1 Preparación de las librerías**

###### **a) Generación de librerías de los exones de 21 genes: 66 muestras**

Para la NGS de las 66 muestras de FFPE se utilizó el kit TruSeq Custom Amplicon Low Input, el diseño utilizado en este proyecto se encuentra en el anexo 6.

Illumina recomienda analizar la calidad del DNA debido a que las muestras de FFPE

generalmente se encuentran fragmentadas, por lo que recomiendan realizar el control de calidad mediante qPCR (PCR tiempo real) evaluando el gen ACD1 (asociado a muerte celular) y posteriormente por la diferencia de la media del  $\Delta CT$  de la muestra menos el  $\Delta CT$  (diferencia del ciclo umbral, del inglés threshold cycle, que es el ciclo en el cual una muestra atraviesa el umbral de detección) de la muestra de referencia. Para ello, las muestras se ajustaron a una concentración de 0.25 ng/ $\mu$ l las muestras para adicionar el mismo volumen de reacción a cada uno, ver anexo 7. Este control de calidad generó información acerca de la cantidad necesaria para la secuenciación dependiendo del grado de degradación, en la cual, de una muestra FFPE poco degradada se utilizó menos DNA para la reacción de secuenciación, mientras que de una muestra degradada se utilizó más cantidad.

Una vez identificada la calidad del DNA proveniente del tejido FFPE, se llevó a cabo el siguiente flujo de trabajo para llevar a cabo las librerías, como se indica en la tabla 2:

<b>1</b>	Cuantificación y dilución del DNA
<b>2</b>	Hibridación del pool de oligos
<b>3</b>	Eliminación de oligos no unidos
<b>4</b>	Extensión y ligación de oligos
<b>5</b>	Amplificación de las librerías
<b>6</b>	Limpieza de las librerías
<b>7</b>	Normalización de las librerías
<b>8</b>	Realización del pool de las librerías

A continuación, se detallan un poco más los pasos del flujo de trabajo realizado:

\*El protocolo original y en inglés se detalla en el anexo 8. Todas las soluciones de etanol o NaOH se realizaron frescas o recién preparadas. Se utilizó agua comercial ultra pura para todos los procesos, así como puntillas con filtro para evitar contaminación cruzada.

*Paso 1. Cuantificación y dilución del DNA:* en este paso se utilizó un método preciso de cuantificación (fluorescencia), el Qubit, dependiendo de la cantidad inicial de la muestra, se

diluyó hasta una concentración de 10-25 ng/μl con el buffer RS1 en un volumen total de 4 μl, para posteriormente adicionar 1 μl de buffer SS1.

*Paso 2. Hibridación del pool de oligos:* En este paso se añadieron los oligos (o primers) específicos para nuestra región de interés mencionados en el anexo 6. Para ello, se llevó a cabo una PCR punto final siguiendo las condiciones:

Se mezcló nuestra muestra del paso anterior con los oligos (CAT), además se utilizó una reacción control interna denominada ACP3. Posteriormente se llevó al termociclador bajo las siguientes condiciones:

- a) La tapa del termociclador fue precalentada a 100°C.
- b) Paso 1: 95°C por 3 min
- c) Paso 2: Desde 90°C, decremente la temperatura por 0.5°C, manteniendo por 30 s, con rampaje a 0.1°C por s
- d) Paso 3: El paso 2 se repitió por 59 ciclos
- e) Paso 4: Desde 60°C, decremente la temperatura por 0.5°C, manteniendo por 1 min, con un rampaje a 0.1°C por s
- f) Paso 5: El paso 4 se repitió por 19 ciclos
- g) Paso 6: Desde 50°C, decremente la temperatura por 1°C, manteniendo por 2 min, con un rampaje a 0.1°C por s
- h) Paso 7: El paso 6 se repitió 9 ciclos
- i) Paso 8: Desde 40°C, mantener por 10 min, con un rampaje a 0.1°C por s.

*Paso 3. Eliminación de oligos no unidos:* para este paso se utilizaron 25 μl de SPB o perlas magnéticas (del inglés Sample Purification Beads) a cada muestra para la remoción de los oligos no unidos al DNA. Además, se realizaron 3 pasos de lavado con las soluciones de lavado SW1 (del inglés Stringent Wash 1) y un paso de lavado con etanol al 60%. Todo esto en un magneto para placa de 96 pozos.

*Paso 4. Extensión y ligación de oligos:* En este paso la enzima DNA polimerasa (la cual se contiene en la mezcla de ELB/ELE) extiende la región de interés seguida de una ligación del extremo 5' usando una ligasa. El resultado es la formación de un producto que

contiene la región de interés flanqueado por secuencias requeridas para amplificación. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador:

- a) La tapa del termociclador fue precalentada a 100°C.
- b) Incube a 37°C por 45 min
- c) Incube a 70°C por 20 min
- d) Mantenga a 4 °C

*Paso 5. Amplificación de las librerías:* En este paso a los productos amplificados anteriormente se les añadieron los índices o marcajes, que son las secuencias requeridas para la formación de clústeres. Estos marcajes son únicos pues ayudaran a diferenciar cada muestra en el pool de muestras que al final llevamos a secuenciar.

Después de añadir los índices a las muestras se utilizó el siguiente programa en el termociclador:

- a) 95°C por 3 min
- b) 26 ciclos de los siguientes pasos
- c) 98°C por 20 s
- d) 67°C por 20 s
- e) 72°C por 40 s
- f) 72°C por 1 min
- g) Mantener a 10°C

*Paso 6. Limpieza de las librerías:* En este paso se purificaron las muestras de los otros componentes de la reacción mediante el uso de perlas magnéticas o SPB. Se realizaron lavados con etanol al 80% y al final se resuspendieron las librerías en el buffer RSB o buffer de Re-suspensión (del inglés Resuspension Buffer). En este paso se realizó un control de calidad verificando el tamaño del amplicón deseado donde se utilizó el bioanalyzer DNA chip 1000 siguiendo las instrucciones del fabricante.

*Paso 7. Normalización de las librerías:* En este paso se consigue que las muestras sean unificadas a la misma concentración de manera equilibrada para su perfecta

representación al momento de la secuenciación. Para ello, se trabajó en el magneto de placa y se realizaron al menos dos lavados especiales y uno final con NaOH.

*Paso 8. Realización del pool de las librerías:* Este paso combina volúmenes equitativos para la normalización de las muestras en un solo tubo de reacción.

#### **b) Generación de librerías: hotspot de 56 genes: 12 muestras**

Para las 12 muestras (hotspot) se utilizó el kit Accel-Amplicon 56G Oncology Panel v2, el cual utiliza 263 amplicones (138 bp) diseñados para cubrir las 16,000 mutaciones clínicamente COSMIC (Forbes *et al.* Oxford Journals. 2014), siendo compatible con muestras de FFPE y el cual utilizó una cantidad mínima de DNA (10 ng), siendo capaz de generar las librerías en un mismo tubo de reacción en menos de 2 h, ver el protocolo original y en inglés que se detalla en el anexo 8.

#### **6.7.4.2 Secuenciación**

La secuenciación se llevó a cabo en una Flow cell v3 de 600 ciclos (Panel de 21 genes para las 66 muestras) y una Flow cell Micro v2 de 300 ciclos PE (Panel de hotspot de 56 genes para las 12 muestras) pareadas en el equipo Mi-Seq de Illumina.

#### **6.7.4.3 Análisis bioinformático**

Una vez terminada la secuenciación se generaron los archivos. fastq, se trimaron las secuencias con el programa Trimmomatic, se alinearon con el programa BWA, se utilizó el programa Primerclip para el clipping, finalmente el llamado de variantes se realizó con los programas BaseSpace (Illumina), HaplotypeCaller (GATK, Broad Institute) y LoFreq (Genome Institute of Singapore) donde se generaron archivos que pudieran ser leídos o codificados por los programas posteriores para el análisis de variantes, en archivos denominados .vcf. Finalmente, los .vcf se analizaron en el programa Ingenuity Variant Analysis (IVA) de Qiagen para consecutivamente asociar las variantes encontradas con algún efecto (patológico o no) biológico, mediante los programas COSMIC (base de datos-catálogo de mutaciones somáticas asociadas a cáncer), dbSNP (base de datos de SNP),

ClinVar (base de datos que asocia las variantes genéticas con la salud humana), PROVEAN y SIFT (base de datos que permite analizar el efecto de las variantes encontradas con las proteínas). Se encontraron  $\geq 50$  mutaciones por muestra, sin embargo, solo se filtraron bioinformáticamente las variantes conductoras (del inglés, cancer driven mutations), es decir, aquellas que le confieren una pequeña ventaja selectiva de crecer al tumor.

### 6.7.5 Validación de mutaciones asociadas a los CO y CE

Una vez establecidas las mutaciones emblemáticas mediante NGS, se procedió a validarlas mediante una tecnología diversa (validación ortogonal, es decir, una tecnología con un tipo de error totalmente diferente al de la metodología original -en este caso en particular, la NGS- de forma que si una mutación encontrada mediante NGS es artificial este podría ser un error intrínseco del método, pero si la nueva metodología confirma la mutación, significa que la mutación es real y no un artefacto). Actualmente, la sensibilidad de las herramientas genómicas actuales permite identificar variantes raras “mutantes” (del inglés, mutant) dentro de cientos de variantes “silvestre” (del inglés, wildtype), sin embargo, por orden de sensibilidad respecto a la frecuencia alélica mutante (FA, o AF del inglés Allelic Frequency), se tiene a la secuenciación Sanger ( $\geq 10\%$  FA), NGS ( $\geq 2\%$  FA), qPCR ( $\geq 1\%$  FA), y la ddPCR ( $\leq 0.01\%$ ).

La validación se llevó a cabo mediante:

a) **Sanger:** Para la realización de los primers se utilizaron las plataformas en línea Primer Quest Tool de IDT (Integrated DNA Technologies, por sus siglas en inglés) y Primer-BLAST de la NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés), y el nucleotide BLAST de la NCBI para alinear los primers diseñados con la región deseada, así como Genome Browser y la herramienta In-Silico PCR de la UCSC (University of California Santa Cruz, por sus siglas en inglés). Una vez bioinformáticamente diseñados y validados los primers, estos fueron obtenidos de Invitrogen, Thermo Scientific. Posteriormente, se procedió a probarlos en un DNA previamente conocido, utilizando la enzima Platinum SuperFi DNA Polymerase (Invitrogen) bajo las condiciones del fabricante

para una reacción de 25 µl con 10 ng de DNA como material inicial, en un termociclador de PCR punto final Bulldog (LifeECO). Una vez estandarizadas las PCR, se realizaron las reacciones con las muestras de FFPE, sangre y citología en base líquida de cada paciente. Se visualizaron y analizaron los productos de PCR en un gel de agarosa ultra pura (Invitrogen) al 1% teñido con bromuro de etidio, la electroforesis se llevó a cabo a 120 volts por 45 min, se excisionó el amplicón con la ayuda de un bisturí y se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml el cual posteriormente fue purificado utilizando el kit comercial QIAquick® Spin (Qiagen) (ver anexo 10) conforme a lo indicado en el Handbook, eluyendo el DNA en 55 µl totales de buffer EB. Se cuantificó el DNA con el espectrofotómetro Nanodrop 2,000 y se corroboró que el valor de la relación de la absorbancia 260/280 fuera  $\geq 1.80$ . El producto de PCR se colocó por duplicado (10 µl) a una concentración de 1-5 ng/µl, en tubos de 0.2 ml los cuales, cada uno contenía 5 µl del oligo (primer o reverse, en tubos diferentes, por ello el duplicado) a una concentración de 5 µM para de esta manera enviarse a un Laboratorio tercero especializado donde secuencio con el equipo ABI 3730xl DNA Analyzer y posteriormente se generaron los archivos .abi los cuales se analizaron mediante el programa SnapGene Viewer/Chromas-Pro para identificar las variantes deseadas validando (ya sea confirmando o descartando) la presencia de éstas variantes en las muestra en cuestión.

b) **qPCR (genotipificación):** se diseñaron los primers necesarios para las variantes en cuestión mediante herramientas gratuitas en línea como NCBI nucleotide o la página web de IDT, para la variante wild type y la variante mutada. Para la qPCR se utilizaron reactivos TaqMan, y se llevó a cabo en el equipo QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System de Applied Biosystems™, en una reacción de 10 µl y condiciones establecidas según el inserto de AmpliTaq Gold DNA Polymerase (ver anexo 11).

c) **ddPCR:** se diseñaron los primers necesarios para las variantes genómicas en cuestión mediante herramientas gratuitas en línea como NCBI nucleotide o la página web de IDT, para la variante wild type y la variante mutada. Posteriormente se siguieron las indicaciones del fabricante, Raindance (RainDance Technologies, Billerica, Mass), ver

anexo 12.

### **6.7.6 Análisis de datos**

A todas las variaciones genéticas encontradas se les determino su posible significancia patogénica bioinformáticamente tras ser comparadas con las reportadas en las bases de datos, principalmente la base de datos COSMIC.

Respecto a las comparaciones del cf-DNA, se analizaron mediante ANOVA de 1 vía y los resultados se compararon directamente con el estándar de oro por la FDA, la medición del antígeno CA 125.

### **6.7.7 Aplicación de la prueba de la citología líquida**

A fin de realizar la aplicación clínica de un potencial biomarcador de respuesta temprana, se realizó una prueba piloto en muestras de citología en base líquida mediante qPCR, ver anexo 11.

## 7. Resultados y Discusiones

### 7.1 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 1

Como parte de los resultados del objetivo 1, que fue integrar un biobanco de muestras tumorales, citológicas y de plasma de pacientes diagnosticadas con CO o CE y controles, complementado con sus datos y características clínicas, epidemiológicas y factores de riesgo, se detallan a continuación los hallazgos:

#### a) Características de la población de estudio

Participaron 348 pacientes femeninas, con un rango de edad de 18-85 años y una edad promedio de 49 años, con Índice de Masa Corporal (IMC) promedio de 29.9, el cual se asocia con sobrepeso. Schmandt *et al* reportaron que pacientes con un IMC  $\geq 30$  presentan un riesgo relativo (RR) de 2.62 veces de presentar CE; mientras que pacientes con un IMC  $\geq 25$  presentan un RR de 1.13 veces de presentar CO [55].

De las 348 pacientes, 106 pacientes participaron en el HU, 4 pacientes participaron en el TECSALUD y 238 pacientes en el INCAn.

Por grupos de estudio, el número de pacientes y sus características clínicas, se denotan en la tabla 2. Cabe destacar que las patologías del ovario y endometrio cuentan con una amplia gama de categorías; sin embargo, para simplificar estos resultados, se describen sólo como benignos o cáncer.

	CE (n=134)	PBE (n=24)	CO (n=61)	PBO (n=63)
EDAD (AÑOS) 	55 (33-78)	49 (32-69) <i>p= 0.007</i>	46 (19-85)	43 (19-67)
IMC NP=Normopeso SP=Sobrepeso O=Obesidad 	NP=18 % SP=29 % O=51%	NP=21 % SP=29 % O=46%	NP=28 % SP=39 % O=31%	NP=35 % SP=35 % O=25 %
ESTADIO (FIGO,2009) 	I: 60% II: 16% III: 19% IV:5%	N/A	I: 54% II: 5% III: 36% IV: 5%	N/A
MENOPAUSIA (%) 	76%	38 %	34 %	33 %
DIABETES(%) 	22 %	8 %	11.5 %	8 %
FUMA (%) 	9 %	8%	5 %	12 %
NA= no aplica CE=Cáncer de Endometrio PBE=Patologías Benignas del Endometrio CO=Cáncer de Ovario PBO=Patologías Benignas del Ovario				

Tabla 3. Grupos de estudio y sus características clínicas

Respecto a las patologías del endometrio, las patologías benignas de este tejido se presentan dentro del rango de edad similar a las pacientes con cáncer, siendo esto estadísticamente significativo. Además, la mayoría de las pacientes presentan sobrepeso u obesidad, lo cual previamente se ha asociado con estas patologías. Los estadios clínicos predominantes en el CE son estadios tempranos, lo cual puede conducir a una mayor supervivencia de las pacientes. Tal como lo indica la literatura, la menopausia es frecuente en las pacientes con CE (78%). Además, la comorbilidad más predominante es la diabetes, con un 22%, Friberg *et al* reportaron previamente que pacientes con diabetes presentan un RR de 1.94 de presentar CE, y un RR de 6.39 si presentan diabetes y obesidad conjuntamente [56,57].

Respecto al grupo de las pacientes con patologías del ovario, la edad en la que se presentan las patologías benignas tiende a ser en edades más tempranas respecto al CO. Gran porcentaje de las pacientes se encontraban en sobrepeso u obesidad.

⌘ Cabe destacar que, dentro de las características epidemiológicas de la población, se tomó en cuenta el estado de nacimiento de las pacientes; la mayoría de las pacientes nacieron en la Ciudad de México, Estado de México y Nuevo León (84, 72 y 50, respectivamente). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rivas *et al* donde mencionan que los estados con mayor incidencia del CO son Nuevo León, Ciudad de México y el Estado de México [12].

## **b) Extracción, purificación y control de calidad de los ácidos nucleicos de las muestras obtenidas**

A todas las muestras biológicas se les aislaron y purificaron los ácidos nucleicos con estuches comerciales. En la siguiente tabla se pueden observar los rendimientos totales y calidad (relación de la absorbancia 260/280nm y 260/230nm) evaluada mediante espectrofotometría (Nanodrop) de los ácidos nucleicos extraídos.

Tabla 4. Evaluación del rendimiento y calidad (espectrofotometría) de los ácidos nucleicos extraídos de FFPE, Citología en base líquida y Sangre

	Fuente biológica		
	FFPE	Citología en base líquida	Sangre
<b>n</b>	142	296	106
<b>Rendimiento (µg)</b>	28.60	25.00	31.16
<b>RELACIÓN 260/280</b>	1.86	1.83	1.88
<b>RELACIÓN 260/230</b>	1.94	1.31	1.18

Además, como parte del control de calidad, se evaluó la integridad del DNA de las muestras de sangre periférica, FFPE y citología en base líquida, mediante un gel de agarosa (electroforesis). En la figura 5, se observa una banda definida y alto peso molecular sin evidencia de degradación del DNA de sangre periférica, o una banda definida y de alto peso molecular pero con evidencia de degradación del DNA de citología en base líquida debido a que las células cervicales son de tipo escamoso. Finalmente, en el caso del FFPE se observa un barrido (desde los 1,500 bp hasta aproximadamente los 200 pb) o degradación del DNA como parte del proceso de parafinización el cual daña la muestra; así mismo, se analizó la capacidad de amplificación (PCR punto final) de el gen

de referencia B-globina, como se aprecia en la figura 6, donde todas las muestras amplificaron el fragmento esperado de 268 bp.

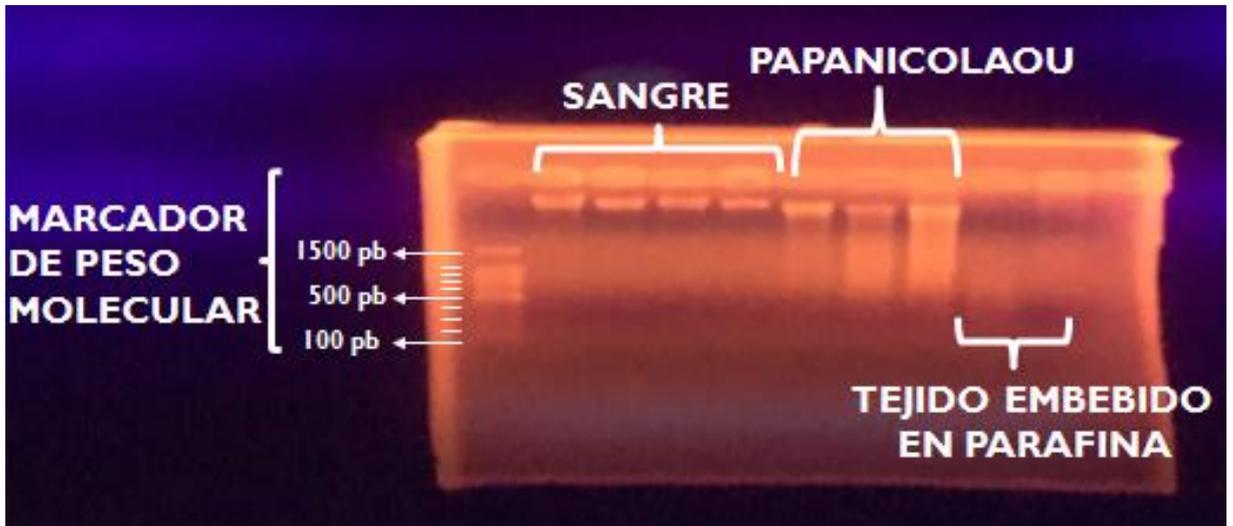


Figura 5 Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos extraídos. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 bp (promega); Carriles 2-5: DNA de sangre periférica; Carriles 6-8 DNA de citología en base líquida (Papanicolaou); Carriles 9-10 Gel de agarosa al 1%, 400 ng de muestra.

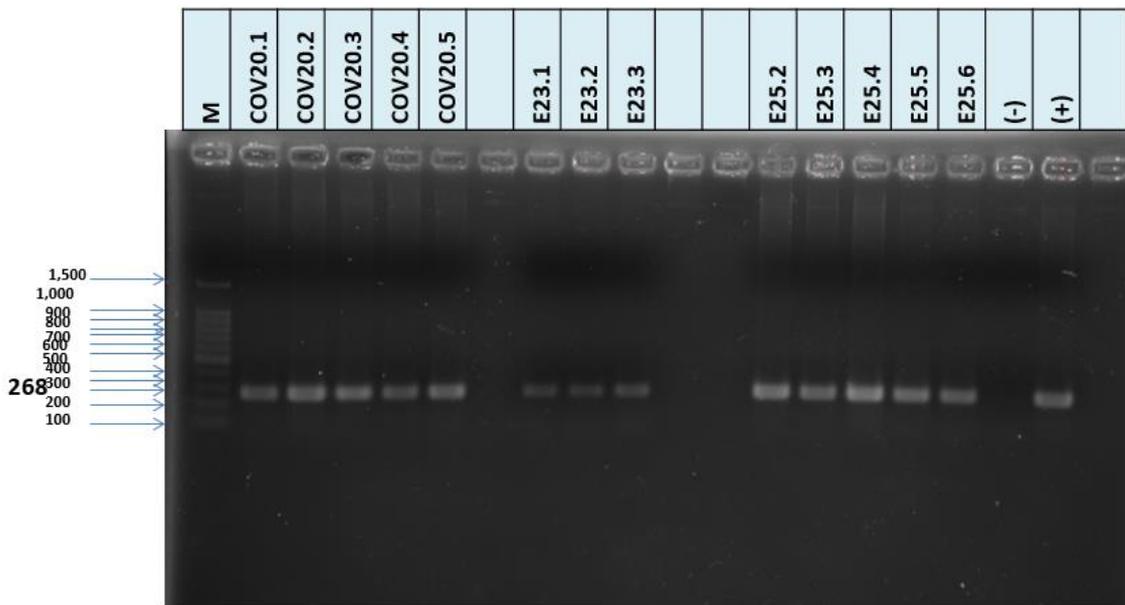


Figura 6 Evaluación del DNA como sustrato para PCR. Se midió la capacidad de amplificación del gen control B-GLOBINA. Gel de agarosa al 2% del producto de PCR, Carril 1: Marcador de peso molecular 100 bp (promega); Carriles 2-6, 8-10, 13-17: DNA de sangre periférica; Carril 18: Control negativo (agua); Carril 19: Control positivo. 10 µl del producto de PCR.

## 7.2 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 2

Respecto a la optimización de la técnica para el aislamiento de DNA de citología en base líquida, se recolectaron las células con dos diferentes marcas de cepillos, una nacional (Colpotre) y una extranjera (Rovers), y además las citologías en base líquida fueron procesadas de manera manual en columna o de manera automatizado en columna. Las comparaciones de los resultados se denotan en la tabla 5, los cuales son valores obtenidos del equipo Qubit (fluorometría) y los kits ds DNA High sensitivity (4 de 296 muestras) y el ds Broad Range (292 de 296 muestras). Estos resultados nos permitieron elaborar el primer manuscrito original (Apéndice A, inciso b) el cual fue publicado en la revista Biopreservation and Biobanking.

Tabla 5. Comparación del rendimiento de DNA proveniente de papanicolaou, basados en el tipo de aislamiento (manual o automatizado) y el tipo de cepillo citológico utilizado.			
<b>a) Tipo de aislamiento: Manual vs Automatizado</b>	<b>Manual (n=233)</b>	<b>Automatizado (n=63)</b>	<b>p value</b>
Rendimiento de DNA (µg)	22.81 ± 1.92	9.96 ± 1.11	< 0.0003***
Pureza 260/280	1.83 ± 0.02	1.81 ± 0.02	< 0.6144
Pureza 260/230	1.29 ± 0.04	1.41 ± 0.09	< 0.2219
<b>b) Tipo de cepillo: Colpotre vs Rovers</b>	<b>Colpotre (n=261)</b>	<b>Rovers (n=35)</b>	<b>p value</b>
Rendimiento de DNA (µg)	20.11 ± 1.67	18.04 ± 4.55	< 0.6711
Pureza 260/280	1.83 ± 0.02	1.81 ± 0.03	< 0.7181
Pureza 260/230	1.32 ± 0.04	1.26 ± 0.11	< 0.6353
<b>c) Cepillo Colpotre: Manual vs Automatizado</b>	<b>Manual (n=209)</b>	<b>Automatizado (n=52)</b>	<b>p value</b>
Rendimiento de DNA (µg)	22.75 ± 2.03	9.88 ± 1.28	< 0.0022**
<b>d) Cepillo Rovers: Manual vs Automatizado</b>	<b>Manual (n=24)</b>	<b>Automatizado (n=11)</b>	<b>p value</b>
Rendimiento de DNA (µg)	24.18 ± 6.25	4.62 ± 1.37	< 0.0445*

Estos resultados indican que existe una diferencia estadísticamente significativa en el rendimiento del DNA respecto al tipo de extracción, resultando la extracción manual con un mayor rendimiento.

Asimismo, se analizaron comparaciones de parámetros como la pureza del DNA (relación de la absorbancia 260/280 y 260/230) mediante espectrofotometría (Nanodrop), lo cual no resultó estadísticamente significativa respecto al tipo de extracción. En nuestro estudio, el tipo de cepillo utilizado no generó un resultado estadísticamente significativo respecto a la pureza o rendimiento, sólo cuando el DNA fue aislado de manera manual (inciso c y d de la tabla 5).

Aunado a ello y con motivo de recuperar la mayor cantidad de DNA, se realizaron dos elusiones de las cuales la primera se utilizó para el presente estudio, y la segunda de reserva (biobanco) para futuras investigaciones.

Finalmente, se comparó el promedio de rendimiento total del DNA de nuestro estudio (> 20.00 µg) vs lo obtenido por Kinde *et al* (9.65 µg) [47], por lo que nuestro estudio, independientemente del tipo de cepillo o método utilizado, presenta un mayor rendimiento del DNA, pudiendo esto significar que al coleccionar mayor cantidad de DNA se pudieran abarcar más células asociadas a las patologías en estudio.

Esta optimización de metodologías nos permite concluir que, con el método manual se obtiene mayor rendimiento de DNA de citología en base líquida (estadísticamente significativo, tabla 5, inciso a). Sin embargo, con ambas metodologías (manual y automatizada) es posible recuperar altos rendimientos de DNA de este tipo de muestras, lo que a grandes escalas y proyectando estos resultados en la práctica clínica, específicamente en hospitales de referencia donde existe un alto procesamiento de muestras, aislar el DNA de citología en base líquida de manera manual resultaría conveniente.

### 7.3 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 3

El cf-DNA, fue aislado de 1-2 ml de plasma y el análisis de los resultados se ejemplifica en la figura 7. Como se comentó anteriormente, agrupa las abundantes patologías ginecológicas puede resultar complicado. En el caso de las patologías del endometrio se consideró sin neoplasia a todos aquellos quistes de naboth o endometrio proliferativo, y neoplasia a los CE; sin neoplasia a todos aquellos quistes, tumores benignos a los cistoadenomas (seroso o mucinoso), neoplasias I a los teratomas, y finalmente neoplasias II a los CO. En nuestro estudio no encontramos una correlación estadísticamente significativa entre el rendimiento total del cf-DNA y las patologías anteriormente mencionadas en términos de un diagnóstico diferencial al analizar los niveles del cf-DNA; sin embargo, se logra observar una tendencia de mayor rendimiento en las neoplasias vs el grupo no neoplásico.

De la misma manera, en la figura 7, en el inciso c) y a manera de contraste con los resultados obtenidos mediante el análisis de los niveles del cf-DNA, podemos observar que de nuestra cohorte de pacientes (n=96), analizar sólo los valores del CA-125 puede ser no específico en términos de un diagnóstico diferencial, semejante a los valores del cf-DNA. Los valores normales del antígeno glucoproteico CA-125 de una persona sana son menores a 35 U/ml; sin embargo, en la mayoría de las pacientes aquí analizadas (pacientes con y sin cáncer) estos niveles no resultaron estadísticamente significativos, por lo que patologías benignas como quistes, como un ejemplo, pudieran ser indicativos de algún proceso patológico asociado a CO y requerirían de cirugías innecesarias sólo para diagnosticar mediante análisis histopatológico (reporte patológico, diagnóstico definitivo) que el quiste carece de malignidad.

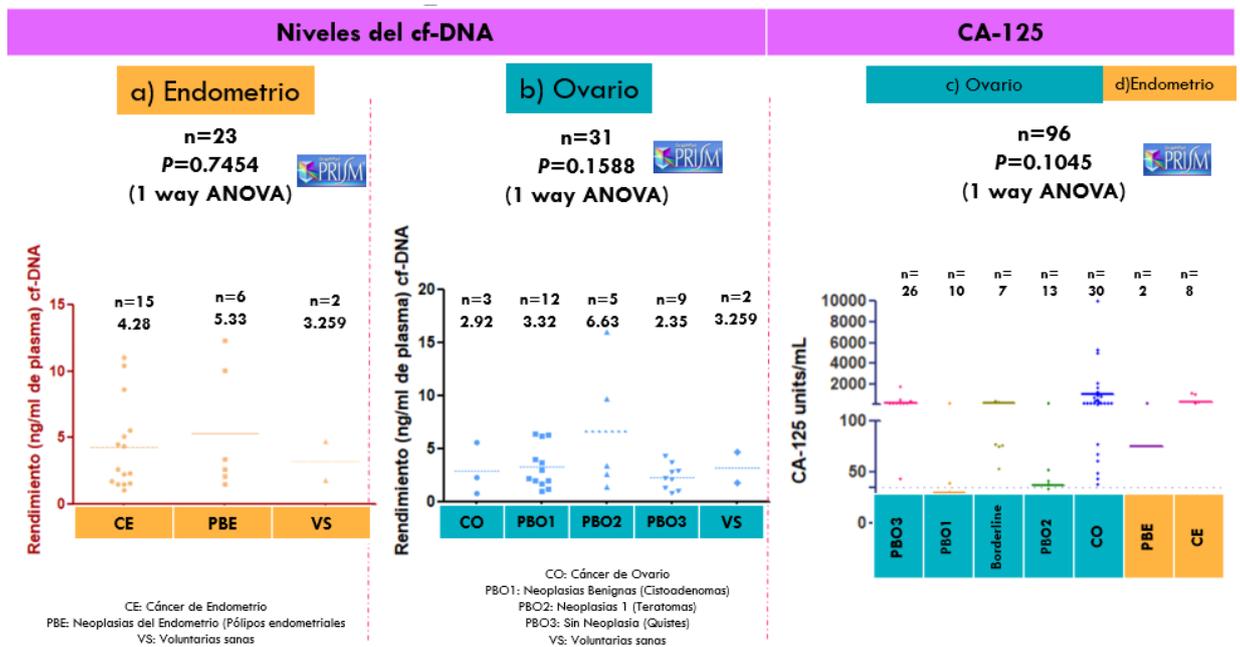


Figura 7 Rendimiento del cf-DNA a) Análisis del rendimiento del cf-DNA en las patologías del endometrio; b) Análisis del rendimiento del cf-DNA en las patologías del ovario; c) Niveles de CA-125

En la figura 8 se aprecia una micro electroforesis capilar de 12 muestras de cf-DNA, de las cuales, las primeras 10 pertenecen a pacientes con CE, mientras que las últimas dos muestras a pacientes con CO. Elshimali y colaboradores (antes decias et al pero es mejor así: uniformiza) reportaron que el cf-DNA separado en un gel de electroforesis tiende a formar un Ladder -escalera- parecido a un barrido, pero los fragmentos de entre 180-1,000 bp suelen asociarse a apoptosis (proceso normal celular), mientras que los fragmentos de hasta 10,000 bp se suelen asociar a necrosis celular (proceso liderado principalmente por patologías cancerígenas) [58]. En nuestro proyecto encontramos que dichos procesos (fragmentación) están asociados cáncer.

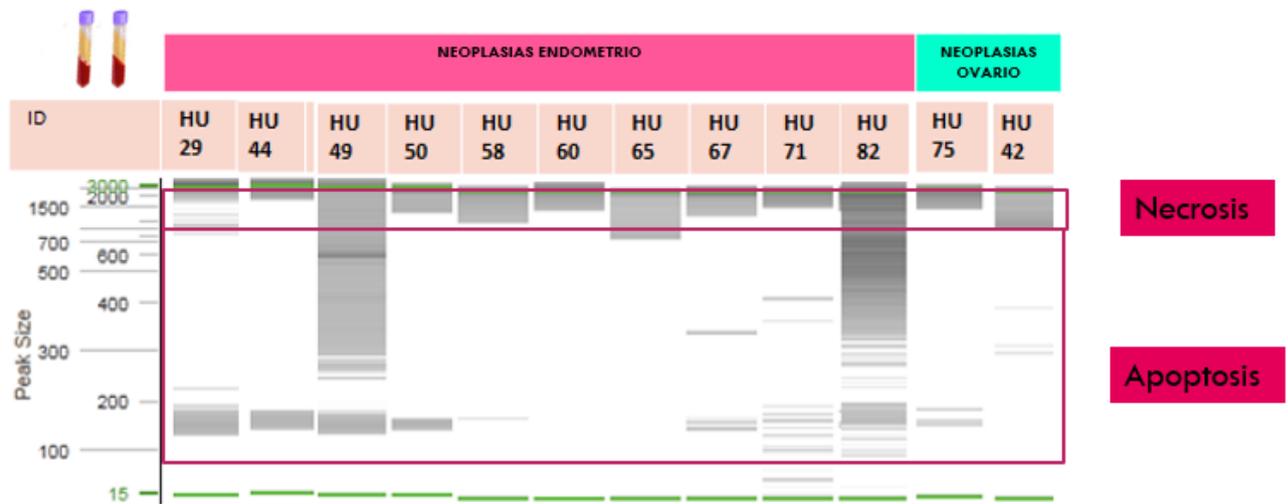


Figura 8 Microelectroforesis capilar para el análisis del cf-DNA Carril 1-10 cf-DNA de pacientes con CE; Carriles 11-12 cf-DNA de pacientes con CO

## 7.4 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 4

### a) Secuenciación de las muestras de FFPE mediante NGS

A fin de determinar el grado de degradación del DNA proveniente de un tejido FFPE y a su vez determinar la cantidad de DNA a requerir para la secuenciación, considerando que entre más fragmentado se encuentre el DNA más cantidad se requerirá para llevar a cabo la secuenciación, se procedió a realizar el análisis de calidad mediante la comparación de muestras DNA versus un DNA de referencia.

Cabe destacar que todas las muestras se analizaron por triplicado. Se utilizó el gen *ACD1* como control positivo y buffer como control negativo. Para la evaluación de la calidad se consideró la diferencia del promedio del delta Cq versus el promedio del delta Cq del *ACD1*.

En la Figura 9 se muestra un ejemplo de las muestras analizadas con sus respectivos triplicados y controles. Se partió de la premisa de que un delta Cq de una muestra de DNA de -1 a 1 se considera de alta calidad y se requerirán 10 ng para la preparación de las librerías, en tanto que para las muestras con un delta Cq de una muestra de DNA de 1 a 2.5 se considera de media calidad y se requerirán de 20-50 ng para la preparación de las

librerías y, finalmente, un delta Cq de una muestra de DNA de 2.5 a 4 se considera de baja calidad y se requerirán de 50-100 ng para la preparación de las librerías.

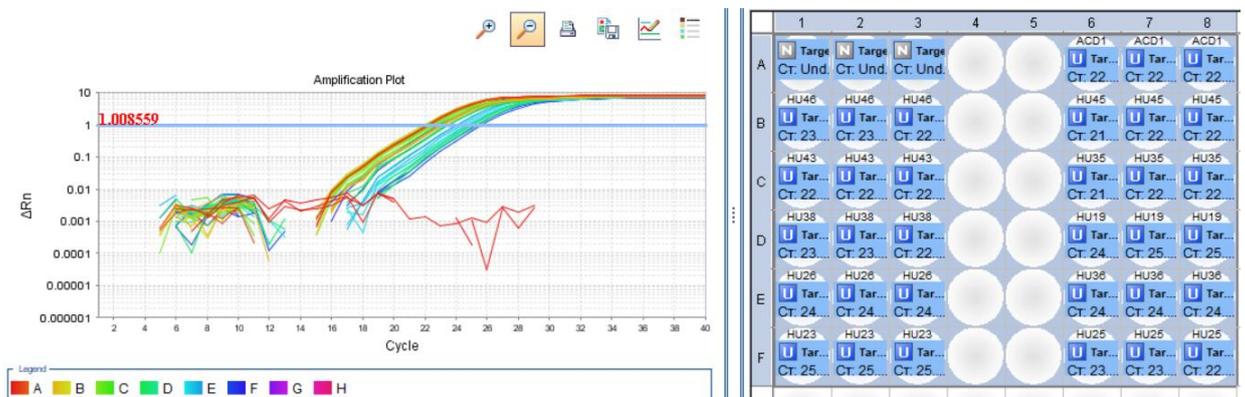


Figura 9 Ejemplo de qPCR como control de calidad de las muestras de FFPE

En total se analizó el Control de Calidad (CC) de 103 muestras de DNA proveniente de FFPE (ver tabla 5). De ellas, se seleccionaron solo 66 muestras para la corrida de secuenciación, ya que es la cantidad de muestras necesarias para obtener la profundidad deseada.

Tabla 6. Muestras analizadas mediante qPCR para NGS

Control de calidad mediante qPCR		
Calidad	n(total)=103	
	n	%
Alta	45	45%
Media	40	39%
Baja	18	17%

PASO	PASO 1										PASO 2	PASO 3	PASO 4				
	CUANTIFICAR Y DILUIR DNA										HIBRIDACIÓN DE OLIGOS	REMOVER OLIGOS NO HIBRIDADOS	EXTENSION Y LIGACION DE OLIGOS (ADAPTADORES)				
ID	qubit BR (ng/µl)	CALIDAD (qPCR)	INPUT (ng)	DILUCIÓN	INPUT TEÓRICO	QUEJUA DILUCIÓN	VOL. ALIJA AÑADIR	RS1(UL)	SS1	INPUT PRÁCTICO			17	15			
HU50	174.5	ALTO	50	STOCK	0.6	DL 17	2.0	2.0	1	49.9	PCR HYB (METHOD HYB (RMA 2) EN THERMOCICLADOR YERTI)	LAVADOS	PCR EXT-LISE EN THERMOCICLADOR YERTI	705	501		
HU60	555	ALTO	50	STOCK	0.2	DL 110	1.0	3.0	1	55.5				705	502		
HU82	47.75	ALTO	50	STOCK	2.1	DL 11	2.0	2.0	1	47.8				705	503		
I 167	45.5	ALTO	50	STOCK	2.2	DL 11	2.0	2.0	1	45.5				705	504		
I 161	27.7	ALTO	50	ALICUOTA	3.6	DL 22	2.2	1.8	1	30.5				705	505		
I 120	38.75	ALTO	50	ALICUOTA	2.6	DIRECTO ALICUOTA	2.6	1.4	1	100.8				705	506		
HU 53	302	ALTO	50	STOCK	0.3	DL 16	1.0	3.0	1	50.3				705	507		
HU 43	17.5	ALTO	50	ALICUOTA	5.7	DIRECTO STOCK	3.0	1.0	1	52.5				705	508		
I 154	26.5	MEDIO	100	ALICUOTA	3.8	DIRECTO STOCK	4.0	0.0	1	106.0				706	501		
I 15	24.25	MEDIO	100	ALICUOTA	4.1	DIRECTO STOCK	4.0	0.0	1	37.0				706	502		
I 179	24.45	MEDIO	100	ALICUOTA	4.1	DIRECTO STOCK	4.0	0.0	1	37.8				706	503		
I 137	23	MEDIO	100	ALICUOTA	4.3	DIRECTO STOCK	4.0	0.0	1	32.0				706	504		
I 126	32.75	MEDIO	100	STOCK	3.1	DIRECTO STOCK	3	1.0	1	38.3				706	505		
HU 20	520	MEDIO	100	STOCK	0.2	DL 110	2.0	2.0	1	104.0				706	506		
I 43	26	MEDIO	100	ALICUOTA	3.8	DIRECTO STOCK	4	0.0	1	104.0				706	507		
(+)	2 UL 2800M + 2 UL RS1 + 1 UL SS1 + 5 UL CAT PARA CONTROL POSITIVO 2800M (2.5 UL ACP3 + 2.5 UL RS1)															703	501

PASO	PASO 6	PASO 7	PASO 8	PASO 9
OBSERVACIÓN	AMPLIFICACIÓN DE LIBRERÍAS	LIMPIEZA DE LIBRERÍAS Y VALIDACIÓN	NORMALIZACIÓN DE LIBRERÍAS	POOL DE LIBRERÍAS Y CARGA DE MI-SEQ
ID	QUBITHS (ng/µl)	BIOANALYZER	NORMALIZACIÓN	MI-SEQ FLOW CELL
HU50	28	VALIDADA	MANUAL	✓
HU60	42.85	VALIDADA	MANUAL	✓
HU82	47.3	VALIDADA	MANUAL	✓
I 167	44.6	VALIDADA	MANUAL	✓
I 161	37.35	VALIDADA	MANUAL	✓
I 120	31.8	VALIDADA	MANUAL	✓
HU 53	33.6	NO	MANUAL	✓
HU 43	39.8	NO	MANUAL	✓
I 154	13.35	VALIDADA	MANUAL	✓
I 15	34.3	VALIDADA	MANUAL	✓
I 179	34	VALIDADA	MANUAL	✓
I 137	36.8	VALIDADA	MANUAL	✓
I 126	28.95	VALIDADA	MANUAL	✓
HU 20	30.1	NO	MANUAL	✓
I 43	31.8	NO	NO SE CORRIÓ	(-)
(+)	37.3	VALIDADA	NO SE CORRIÓ	(-)

Ilustración 1 Validación de las librerías mediante electroforesis capilar Bioanalyzer DNA 1000 (muestras representativas)

Figura 10 Preparación de librerías y su validación. Ejemplo esquemático de los pasos realizados desde la cuantificación de la muestra mediante fluorometría (Qubit) y su CC mediante qPCR, hasta la validación de los tamaños de las librerías mediante electroforesis capilar (Bioanalyzer).

Una vez validadas las librerías, se procedió a normalizarlas a la misma concentración (4 nM) para introducir la misma cantidad de ellas a la Flow cell donde se secuenciaron. En este particular caso de la Flow cell utilizada (Micro v2 de 300 ciclos PE) y con un tamaño promedio de librerías de 300 bp, Illumina recomienda utilizar un pool (pool de muestras donde cada una de ellas se encuentren en la misma concentración) a una concentración final de 7.5 pM en dicha Flow cell.

Una vez cargada la Flow cell se procedió a secuenciar en el equipo Mi-Seq de Illumina y se obtuvieron los siguientes parámetros de calidad, ver Figura 11.

	CYCLES	YIELD	PROJECTED YIELD	ALIGNED (%)	ERROR RATE (%)	INTENSITY CYCLE 1	%Q30
Read 1	151	293.04 Mbp	293.04 Mbp	31.25	0.47	202	94.34
Read 2 (I)	8	13.68 Mbp	13.68 Mbp	0.00	0.00	903	70.46
Read 3 (I)	8	13.68 Mbp	13.68 Mbp	0.00	0.00	110	96.94
Read 4	151	293.04 Mbp	293.04 Mbp	30.99	0.56	159	93.03
Non-Index Reads Total	302	586.08 Mbp	586.08 Mbp	31.12	0.52	180	93.69
<b>Totals</b>	<b>318</b>	<b>613.43 Mbp</b>	<b>613.43 Mbp</b>	<b>31.12</b>	<b>0.52</b>	<b>343</b>	<b>93.24</b>

LANE	READ	TILES	DENSITY (K / MM <sup>2</sup> )	CLUSTER PF (%)	PHAS/PREPHAS (%)	READS	READS PF	%Q30	YIELD	CYCLES ERR RATED	ALIGNED (%)	ERROR RATE (%)	ERROR RATE 35 CYCLES (%)	ERROR RATE 75 CYCLES (%)	ERROR RATE 100 CYCLES (%)	INTENSITY CYCLE 1	COMMENTS	STATUS
1	1	8	363 ±13	97.36 ±0.53	0.086 / 0.093	2,006,277	1,953,606	94.34	293.04 Mbp	150	31.25 ±0.23	0.47 ±0.03	0.10 ±0.00	0.13 ±0.02	0.17 ±0.02	202 ±20		QC Passed
	2 (I)	8	363 ±13	97.36 ±0.53	0.000 / 0.000	2,006,277	1,953,606	70.46	13.68 Mbp	0	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	903 ±127		
	3 (I)	8	363 ±13	97.36 ±0.53	0.000 / 0.000	2,006,277	1,953,606	96.94	13.68 Mbp	0	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	110 ±17		
	4	8	363 ±13	97.36 ±0.53	0.080 / 0.080	2,006,277	1,953,606	93.03	293.04 Mbp	150	30.99 ±0.20	0.56 ±0.04	0.13 ±0.02	0.21 ±0.03	0.27 ±0.04	159 ±16		

Figura 11 Control de calidad de la primera corrida de secuenciación. Ejemplo esquemático.

La calidad en la corrida (Q30) es una métrica usada para valorar la probabilidad de que una base nitrogenada sea identificada (llamada) incorrectamente. Q30 es la probabilidad de 1 en 1000, es decir, se tiene una posibilidad de error en el llamado de bases de 0.001. Las bases que tienen un error mayor al esperado no son filtradas en los resultados finales. El 93.24% de las lecturas tienen bases que cumplieron este parámetro. Adicionalmente, las muestras contaron con una profundidad  $\geq 96X$  (promedio) para el análisis de los exones de los 21 genes, mientras que para el análisis de los sitios hotspot de los 56 genes, se obtuvo  $\geq 2,000 X$  (promedio).

## b) Análisis bioinformático de variantes genéticas

Posterior a la secuenciación, se obtuvieron los archivos .fastq los cuales fueron revisados mediante el flujo de trabajo establecido en la metodología y para finalmente ser analizados mediante el programa comercial IVA de Qiagen [59].

La NGS genera abundantes datos, los cuales en nuestro estudio agrupamos por patologías del ovario y endometrio, y a su vez las diferentes patologías de esos tejidos, para poder generar un panorama general de las variantes. En la figura 12 se pueden apreciar las diferentes variantes (SNP, Indels o sitios de Splicing) encontradas en las

patologías del ovario. En el caso de los SNVs, existe una diferencia significativa de las neoplasias II (CO) vs las neoplasias I (teratomas), tumores benignos (Cistoadenomas) y patologías no neoplásicas (quistes). Respecto a las deleciones y sitios de splicing, existe una diferencia significativa entre las variantes encontradas entre los grupos Neoplasias II (CO) vs Neoplasias I (teratomas). En el caso de las inserciones, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos de patologías del ovario.

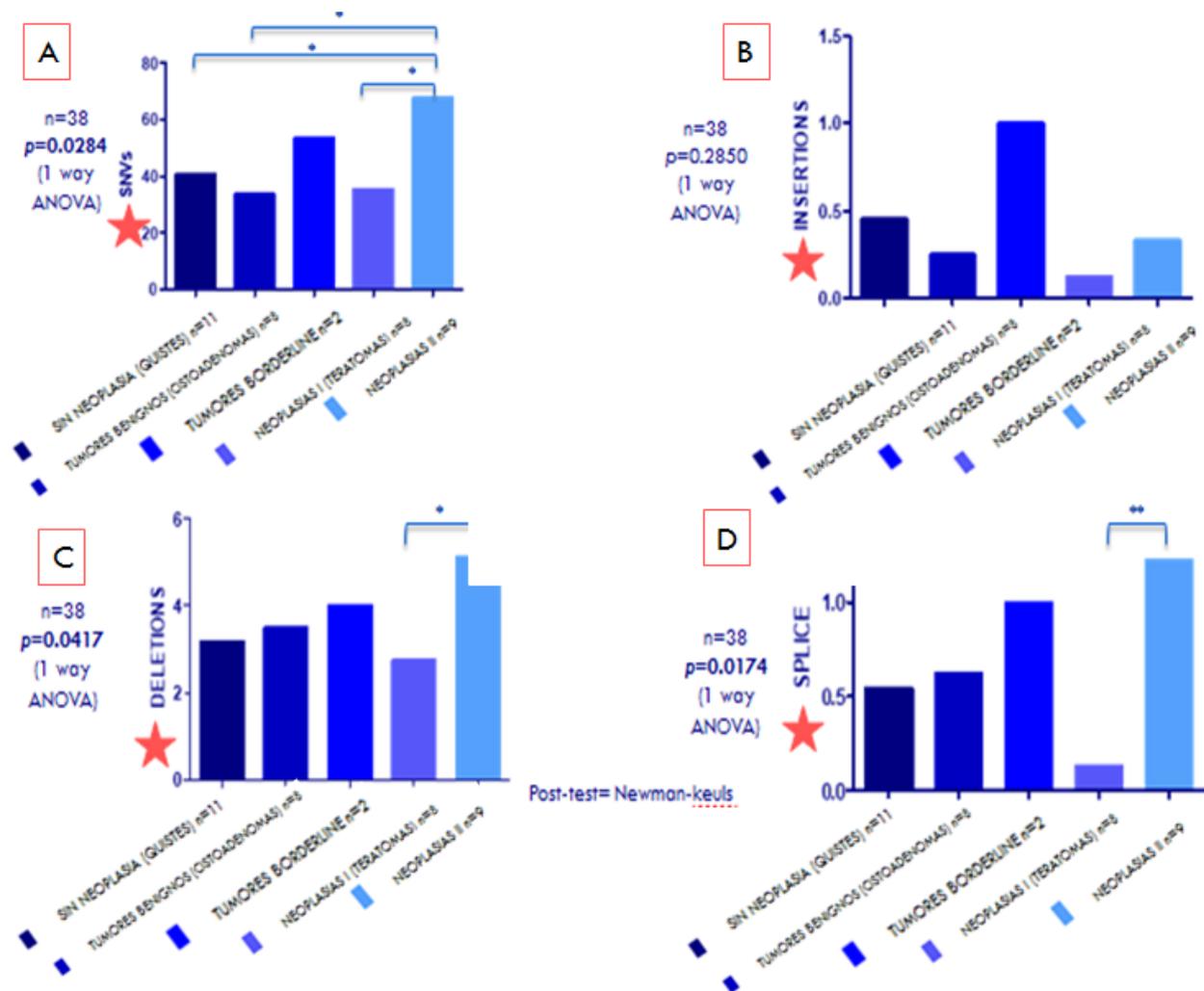


Figura 12 Tipos de variantes encontradas en las patologías del ovario. Graficas que demuestran la cantidad de alteraciones o variantes A=SNVs, B=Inserciones, C=Deleciones, D= Sitios en el splicing de los diferentes tipos de patologías ginecológicas del ovario.

Por otra parte, en las patologías del endometrio, el grupo de Neoplasias (CE) era el mayor grupo respecto a los demás grupos los cuales solo cuentan con 1 ó 2 casos de dichas patologías, por lo que realizar asociaciones estadísticas no es posible con un número limitado de muestras.

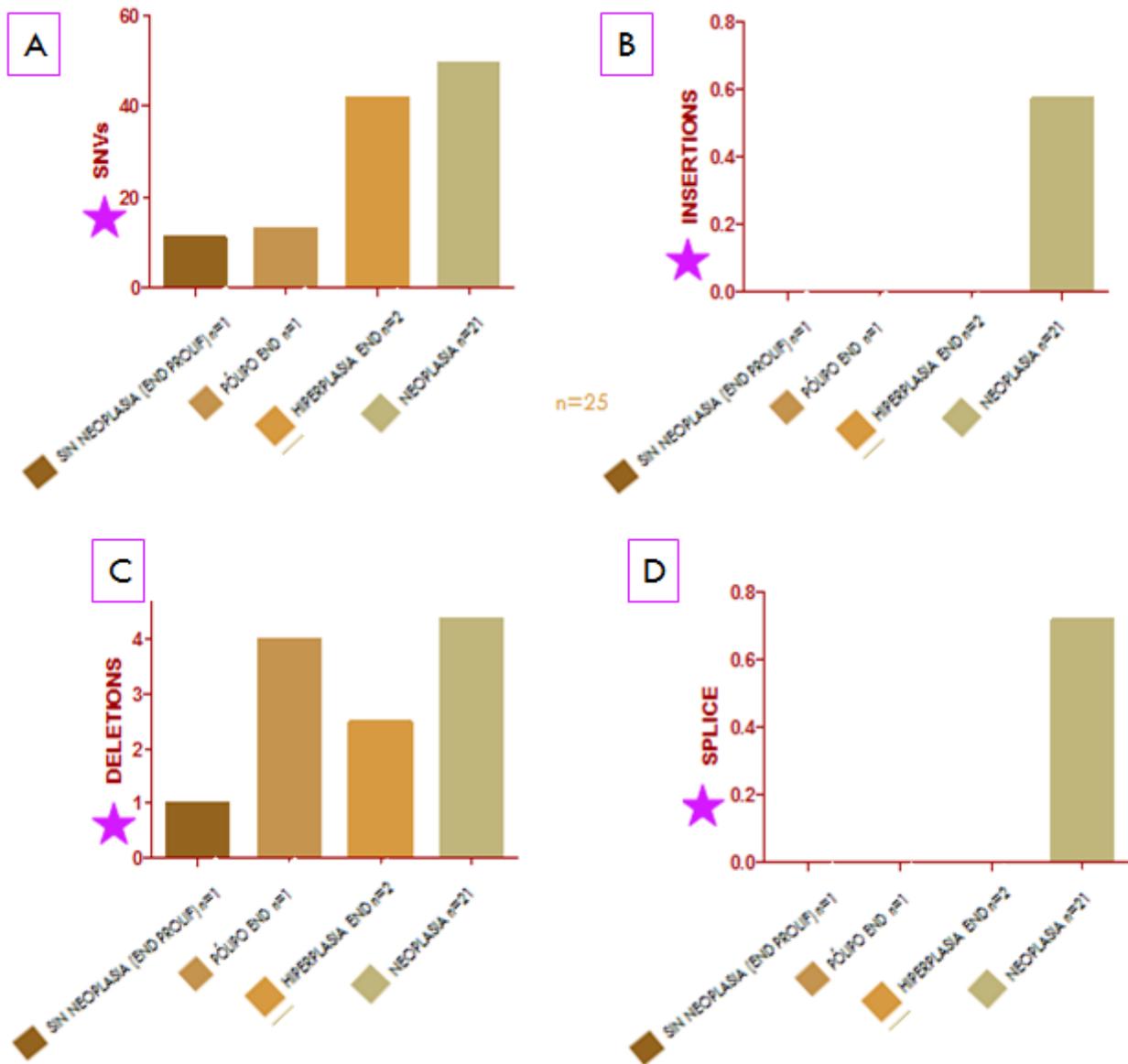


Figura 13 Tipos de variantes encontradas en las patologías del endometrio. Graficas que demuestran la cantidad de alteraciones o variantes A=SNVs, B=Insertiones, C=Deleciones, D= Sitios en el splicing de los diferentes tipos de patologías ginecológicas del endometrio.

Como se mencionó en la metodología, se seleccionaron solo las mutaciones conductoras para finalidades representativas (ya que es una amplia tabla de resultados), mismas que se muestran en la Figura 14 para poder seleccionar su flujo de trabajo respecto a la validación.

Cabe destacar que ninguna mutación conductora se encontró en las muestras de patologías benignas, lo cual las hace específicas de cáncer.

Sample	Gene Symbol	Variation Type	Ref Allele	Sample Allele	Protein Variant	Translation Impact	Classification	SIFT Function Prediction	PolyPhen-2 Function Prediction
1	PIK3CA APC	SNV Deletion	G CT	C	p.G1049R p.Q1284fs*10;	missense frameshift	Pathogenic Likely Pathogenic	Tolerated	Benign
2	PTEN FGFR2	SNV SNV	C G	T C	p.Q344*; p.S24W;	stop gain missense	Pathogenic Uncertain Significance	Tolerated	Probably Damaging
3	CTNNB1	SNV	C	T	p.S26F; p.S33F	missense	Pathogenic	Damaging	Probably Damaging
4	PTEN PTEN	Deletion Deletion	TGAAGATGACAATCATGT CA		p.E114_V119del p.A294fs*4 p.Y149*;	in-frame frameshift	Likely Pathogenic Pathogenic		
5	PTEN	SNV	C	G	p.Y346*; p.Y519*	stop gain	Pathogenic		
9	PTEN	SNV	C	T	p.R303*; p.R130*	stop gain	Uncertain Significance		
10	PTEN	Deletion	ACCTGTAAAGAATC		p.L355_L359del; p.L182_L186del	in-frame	Likely Pathogenic		
11	PTEN	Deletion	AAAGCAAATAAAGACAAAGCCAACCGAT		p.K327fs*8;	frameshift	Likely Pathogenic		
12	PIK3CA PTEN KRAS	SNV SNV SNV	G C C	A G A	p.R88Q p.R130G p.G12V	missense missense missense	Pathogenic Pathogenic Pathogenic	Tolerated Damaging Damaging	Probably Damaging Probably Damaging Probably Damaging

Figura 14 Selección de variantes conductoras de cáncer (cancer driver)

En dicha tabla, se pueden apreciar cómo fueron seleccionadas bioinformáticamente las variantes conductoras, es decir, que tuvieran un impacto importante en la traducción de la proteína, entre otros filtros bioinformáticos.

### c) Validación de mutaciones conductoras mediante Sanger

Como se indicó en la sección 6.7.5, Validación de mutaciones asociadas a los CO y CE, se generaron los primers para las variantes conductoras del cáncer, utilizando como genoma de referencia al GRCh37/hg19 Feb.2009.

En la figura 15 se muestra a manera de ejemplo representativo el análisis de las mutaciones emblemáticas, donde se analizaron dos variantes:

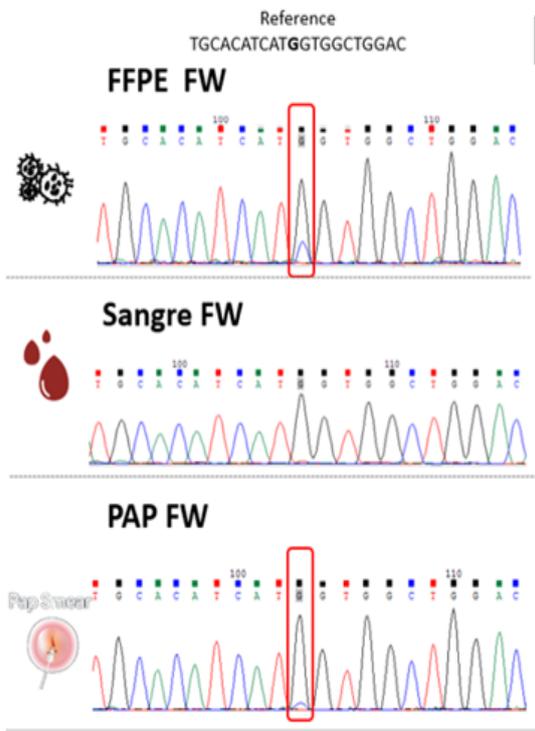
a) 'I 167', se rastrea una mutación en el gen *PIK3CA* donde se busca la variación de un solo nucleótido, G>C (ver secuencia de referencia en la figura).

- En la parte superior del esquema representativo, se analiza la muestra de FFPE, seguido de la muestra de sangre (parte media) y la citología en base líquida (PAP) de la paciente (parte inferior).
- Se analizaron las reacciones forward (FW) y reverse (RV) (en este ejemplo representativo solo se muestra la reacción forward por cuestiones gráficas). Se remarca el cambio de G>C en el tumor FFPE y en la citología en base líquida de la paciente.
- Además, se comprueba que es una mutación somática (no se presenta en el DNA de línea germinal o sangre periférica de la paciente).

b) I 69 se rastrea una mutación en el gen *KRAS* donde se busca una variación de un solo nucleótido, C>A (ver secuencia de referencia en la figura)-

- Se analizaron las reacciones FW y RV (en la imagen solo se muestra reacción FW por cuestiones gráficas).
- Se validó la mutación en el tumor y en la citología en base líquida de la paciente.
- Se demostró que la mutación es somática (no se presenta en el DNA de sangre).

a) | 167: PIK3CA G>C



b) | 69: KRAS C>A (p.G12V)



Figura 15. Electroferogramas de secuenciaciones (Sanger) en los genes PIK3CA y KRAS. Ejemplos representativos del análisis de todas las mutaciones conductoras validadas en el gen PIK3CA (panel izquierdo, a) y en el gen KRAS (panel derecho, b) donde las mutaciones previamente encontradas en el tejido embebido en parafina (FFPE) fueron encontradas en las citologías en base líquida (PAP) de la misma paciente..

Debido a que la muestra de la citología en base líquida de la paciente b) I69 se encontró que la mutación KRAS (p.G12V) aparecía mutada en mayor proporción que en el propio tejido FFPE de la paciente, se validó la mutación por una tercera metodología más sensible, como la ddPCR (metodología descrita en el anexo 12), la cual puede detectar el número de copias del alelo mutado en una gran cantidad de alelos silvestres o no mutados (wildtype), ver Figura 16.

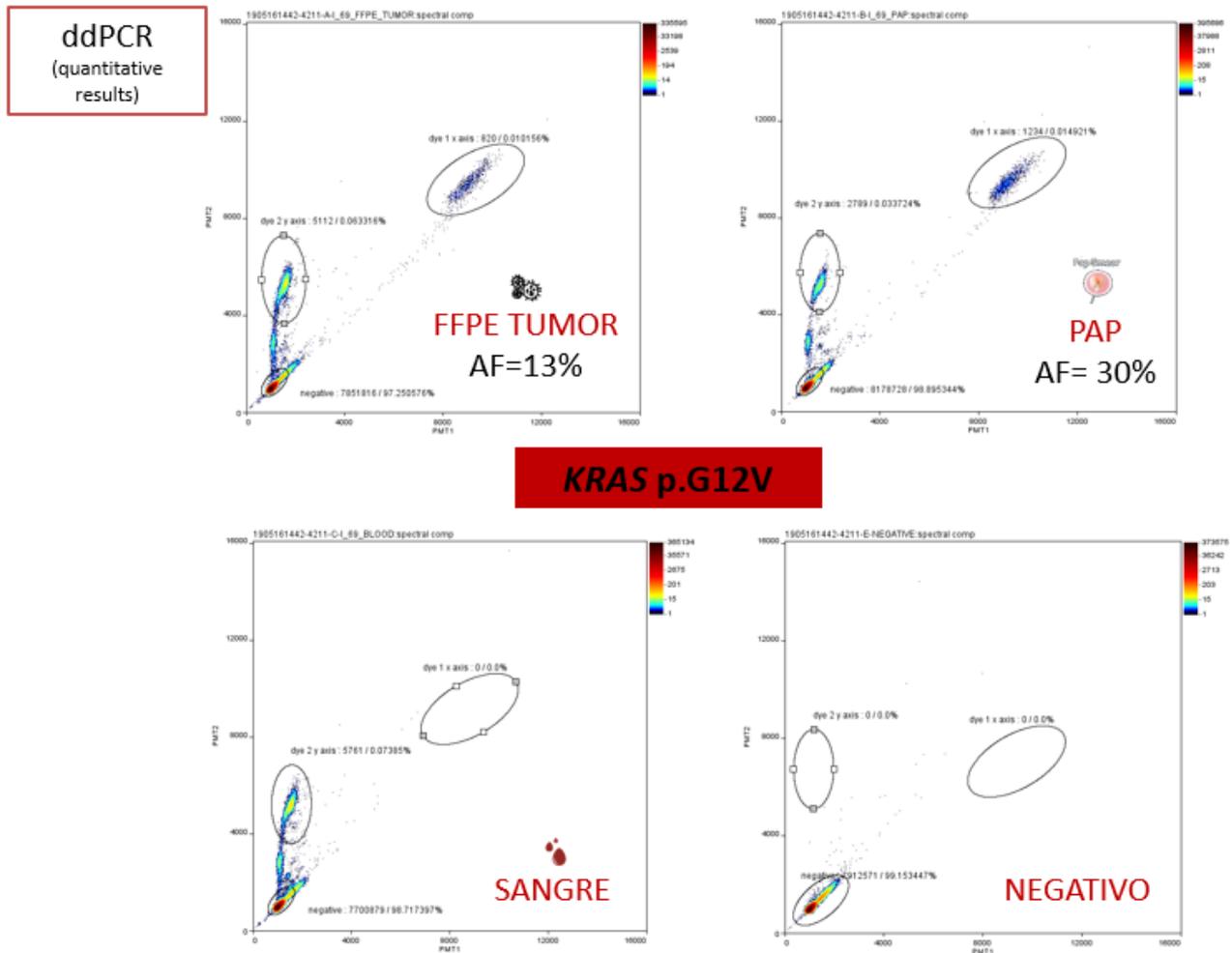


Figura 16. Análisis de la mutación *KRAS* mediante ddPCR. Panel superior izquierdo: análisis del FFPE de la paciente 69, con una fracción alélica mutada del 13%; Panel superior derecho: análisis de la citología en base líquida (PAP) de la paciente 169, con una fracción alélica mutada del 30%; Panel inferior izquierdo: análisis de la sangre de la paciente 169, en la cual se demuestra que la mutación somática (no se presenta en línea germinal-sangre-); Panel inferior derecho: Control negativo.

### 7.5 Resultados y discusiones asociados al Objetivo 5

Finalmente, en la Figura 17, se muestra a manera de tabla general la validación mediante Sanger de las mutaciones conductoras encontradas en los FFPEs (resumen del objetivo 4) y en las citologías en base líquida (Objetivo 5). La secuenciación Sanger nos permitió

validar las mutaciones encontradas mediante NGS en los tejidos FFPE, y además encontrarlas en algunas de las muestras de citología en base líquida; incluso cuando la frecuencia alélica necesaria para el rastreo por esta técnica sea mayor al 10% [60]. Además, resulta claro que todas las mutaciones conductoras son mutaciones somáticas, es decir, específicas del tumor. Todas aquellas mutaciones que no pudieron ser rastreadas y/o validadas mediante secuenciación Sanger, son candidatas ideales para ddPCR: esto como perspectiva científica.

	Instituto	#	Histología	Estadio	Gen	FFPE		gDNA	PAP
						NGS	Sanger		
Endometrio	HU	44	CE de Tipo Endometriode	IA	PTEN	•	•	(-)	◦
					PTEN	•	•	(-)	◦
	HU	49	CE de Tipo Endometriode	IA	PTEN	•	•	(-)	◦
					HU	65	CE de Tipo Endometriode	IA	PIK3CA
	HU	82	CE de Tipo Endometriode	IA					PTEN
					HU	35	CE de Tipo Endometriode	IB	PTEN
	INCan	175	CE de Tipo Endometriode	IB					PTEN
					FGFR2	•	•	(-)	◦
	INCan	126	CE de Tipo Endometriode	IC	CTNNB1	•	•	(-)	◦
	INCan	167	CE de Tipo Endometriode	II	PIK3CA	•	•	(-)	•
					APC	•	•	(-)	◦
	INCan	61	CE de Tipo Endometriode	II	PTEN	•	•	(-)	•
	INCan	120	CE de Tipo Endometriode	II	PTEN	•	•	(-)	◦
	HU	32	CE de Tipo Endometriode	II	TP53	•	•	(-)	SM
	INCan	69	CE de Tipo Endometriode	IVB	PTEN	•	•	(-)	•
PIK3CA					•	•	(-)	•	
KRAS					•	•	(-)	•	
Ovario	INCan	108	Cancer de Ovario de Alto Grado Seroso	IIIA	TP53	•	•	(-)	◦
	HU	75	Cancer de Ovario de Alto Grado Seroso	IIIA	TP53	•	•	(-)	SM
	HU	105	Tumor mucinoso de bajo grado (Borderline)	III	KRAS	•	•	(-)	SM

Figura 17. Mutaciones conductoras en la cohorte de pacientes del presente estudio. SM= Sin muestra; •= Validada por Sanger; ◦=Muestra analizada por Sanger, candidata para ddPCR.

## 7.6 Resultados y discusiones asociados al objetivo 6

### Detección de un gen asociado a manifestación temprana del CE en las muestras de citología en base líquida.

A fin de realizar una prueba clínica (prueba piloto) del potencial biomarcador KRAS (gen de manifestación temprana en CE) [61] en muestras de citologías en base líquida, se analizaron (mediante qPCR, metodología descrita en el anexo 11) 87 citologías en base líquida de pacientes con CE de tipo histológico endometriode, encontrándose en el 9% de ellas, es decir, 8 de 87 citologías, la mutación del potencial biomarcador KRAS, y que 6 de esas 8 pacientes se encontraban en estadios tempranos (I y II).

Estos resultados demuestran que el potencial biomarcador molecular KRAS G12V puede ser utilizado para la detección de los cánceres ginecológicos de endometrio en estadios tempranos de la enfermedad, mediante la citología en base líquida.

Según se reporta en la literatura, mutaciones en KRAS han sido asociadas a un subtipo de cáncer de endometrio en particular: CE tipo endometriode, el cual es el más frecuente a nivel mundial y también en nuestra población de estudio. Además, la participación de KRAS sucede en estadios tempranos en CE tipo endometriode [62,63]. Lo cual genera una oportunidad de diagnóstico oportuno.

Finalmente, herramientas moleculares como la qPCR, pueden ser una opción económicamente factible en la búsqueda de biomarcadores moleculares en las citologías.

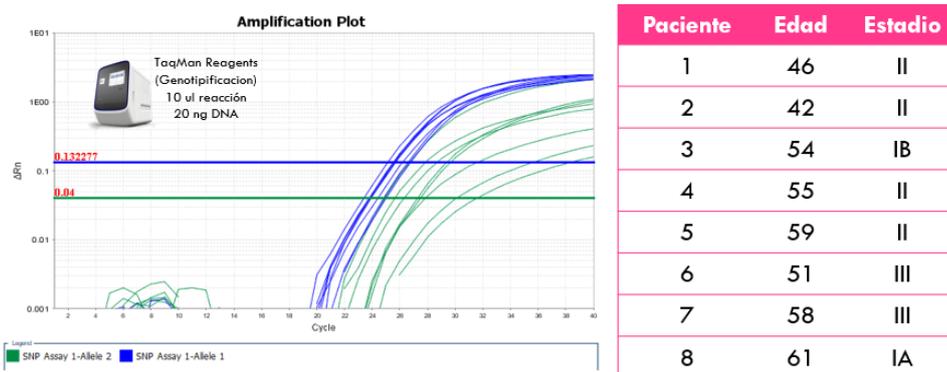


Figura 18. Aplicación clínica (prueba piloto) del potencial biomarcador KRAS G12V en muestras de citologías en base líquida.

## 8. Conclusiones

- ✧ Integramos un biobanco de 348 pacientes (objetivo 1), donde se colectaron muestras de diversas fuentes biológicas como suero, plasma, citologías líquidas y FFPEs, y de los cuales se obtuvieron los ácidos nucleicos requeridos para llevar a cabo este proyecto.
  
- ✧ En nuestra cohorte de pacientes, encontramos las siguientes características epidemiológicas (objetivo 1):
  - ✧ La epidemiología indica que los estados con mayor incidencia de CO y CE son la Ciudad de México, el Estado de México y Nuevo León, lo cual concuerda con la epidemiología nacional descrita.
  - ✧ La mayoría de ellas presenta sobrepeso u obesidad.
  - ✧ Predominan estadios tempranos (I-II) de dichos cánceres.
  - ✧ La diabetes predominó en un 22% en CE, siendo la comorbilidad de mayor frecuencia en este grupo.
  
- ✧ Con respecto a la extracción de los ácidos nucleicos de las citologías líquidas (objetivo 2):
  - ✧ El rendimiento promedio de extracción del DNA de citologías en base líquida fue de 25.00 µg.
  - ✧ El método manual fue el más eficiente (rendimiento) para el aislamiento de DNA proveniente de las citologías. Sin embargo, con ambos métodos se obtienen cantidades suficientes para el análisis molecular.
  
- ✧ Con respecto a los niveles del cf-DNA de sangre (objetivo 3):
  - ✧ Este trabajo representa uno de los primeros trabajos en el análisis de los niveles del cf-DNA de patologías ginecológicas (benignas y malignas)
  - ✧ En esta cohorte de pacientes (n=54), los niveles del cf-DNA no resultaron estadísticamente significativos entre las diferentes patologías ginecológicas.

- ⌘ Con respecto a los análisis de secuenciación (objetivo 4):
  - ⌘ Se encontraron  $\geq 50$  alteraciones genéticas por muestra.
  - ⌘ Los SNVs fueron las variantes genéticas más frecuentes encontradas en todos los grupos del estudio.
  - ⌘ Particularmente en los grupos de patologías del ovario, los SNV, deleciones y sitios de splicing fueron asociados estadísticamente específicamente al grupo de CO, mayor que en las patologías ováricas no cancerosas.
  - ⌘ Los genes más frecuentemente mutados son PTEN, PIK3CA, TP53 y KRAS en pacientes con cánceres ginecológicos.
  
- ⌘ Con respecto al análisis genéticos de las citologías líquidas (objetivo 5):
  - ⌘ Es posible detectar mutaciones en las citologías en base líquida mediante diferentes herramientas genómicas, específicamente la qPCR, la cual además es una opción factible.
  
- ⌘ Con respecto a la implementación de una prueba rápida en el análisis de las citologías líquidas (objetivo 6):
  - ⌘ El potencial biomarcador molecular KRAS G12V puede ser utilizado para la detección del CE en muestras de citologías líquidas mediante la prueba de qPCR.
  
- ⌘ Se comprueba que el análisis del CA-125 no es específico e indicativo de la presencia de estos cánceres.
  
- ⌘ La citología líquida posee la ventaja de ser realizada fácilmente, es considerada como tolerable para las pacientes (no invasiva), es factible de realizar a gran escala, y es costo-eficiente en el concepto de poder detectar más de un cáncer ginecológico de importancia nacional.

## **9. Perspectivas**

Se propone rastrear más mutaciones conductoras derivadas de este trabajo, además de KRAS, en las citologías en base líquida mediante una tecnología como la qPCR, a fin de generar un panel de biomarcadores (principalmente PTEN, PIK3CA, y TP53; genes destacados en este proyecto) a fin de abarcar una mayor sensibilidad y la aplicación clínica-diagnóstica de las citologías en base líquida.

Este trabajo generó una de las primeras aportaciones científicas en la comparación de los niveles del cf-DNA en pacientes con patologías ginecológicas benignas y cánceres ginecológicos, y ante la evidencia de que estos niveles se presentaron en una tendencia mayor en pacientes con cáncer, se propone rastrear las mutaciones conductoras derivadas de este proyecto, en el cf-DNA mediante una tecnología altamente sensible como la ddPCR.

## 10. Bibliografía

1. CDC. CDC - Información básica sobre los cánceres ginecológicos. 2013.
2. CDC. Concientización sobre el cáncer ginecológico - Especiales CDC - CDC en Español. 2016.
3. Mayo Clinic. Endometrial cancer - Symptoms and causes - Mayo Clinic. 2018.
4. The American Cancer Society. What Is Endometrial Cancer? 2016.
5. American Cancer Society. ¿Qué es el cáncer de ovario? 2018.
6. Labidi-Galy SI, Papp E, Hallberg D, Niknafs N, Adleff V, Noe M, *et al.* High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun.* 2017 Dec 23;8(1):1093.
7. Clinic M. Cáncer de ovario - Síntomas y causas - Mayo Clinic. 2018.
8. Gómez ACA, González DM. Cáncer de ovario diagnóstico y tratamiento: Guía de Práctica Clínica Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia. *Comego.* 2011;395–414.
9. Pavlik EJ, Ueland FR, Miller RW, Ubellacker JM, Desimone CP, Elder J, *et al.* Frequency and Disposition of Ovarian Abnormalities Followed With Serial Transvaginal Ultrasonography. *Obs Gynecol.* 2013;122:210–7.
10. Wang Y, Sundfeldt K, Mateoiu C, Shih I-M, Kurman RJ, Schaefer J, *et al.* Diagnostic potential of tumor DNA from ovarian cyst fluid. *Elife .* 2016;5:1–18. 11.
11. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin .* 2018;68(6):394–424.
12. Rivas-Corchado LM, González-Geroniz M, Hernández-Herrera RJ. Perfil epidemiológico del cáncer de ovario. *Ginecol Obs Mex.* 2011;79(9):558–64.
13. American Cancer Society. Endometrial Cancer Symptoms | Signs of Endometrial Cancer. 2016.
14. Goff B. Symptoms Associated With Ovarian Cancer. *Clin Obstet Gynecol.* 2012;55(1):36}42.
15. Programa de Cáncer de Ovario del INCan. Oncoguía: Cáncer Epitelial de Ovario. 2013.
16. Gallardo D, Montalvo G, Gonzales A, Cantú de Leon D, Isla D, Muñoz D, *et al.*

- Oncoguía: Cáncer Epitelial de Ovario. *Cancerologia*. 2011;6(6):53–60.
17. Menon U, Skates SJ, Lewis S, Rosenthal AN, Rufford B, Sibley K, *et al*. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(31):7919–26.
  18. Cragun JM. Screening for ovarian cancer. *Cancer Control*. 2011;18(1):16–21.
  19. Esparza-Argüello EY. Cáncer de la Mujer: CENTRO NACIONAL DE EQUIDAD DE GÉNERO Y SALUD REPRODUCTIVA. Programa Cáncer de la Mujer. 2015.
  20. American Cancer Society. Etapas del cáncer de ovario . 2018.
  21. American Cancer Society. Etapas del cáncer de endometrio . 2019.
  22. Mehrotra M, Singh RR, Chen W, Huang RSP, Almohammedsalim AA, Barkoh BA, *et al*. Study of Preanalytic and Analytic Variables for Clinical Next-Generation Sequencing of Circulating Cell-Free Nucleic Acid. *J Mol Diagnostics* . 2017;(May):1–12.
  23. Institute NC. Definición de biopsia líquida - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute .
  24. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*. 2018;9(2).
  25. Rolfo C, Castiglia M, Hong D, Alessandro R, Mertens I, Baggerman G, *et al*. Liquid biopsies in lung cancer: The new ambrosia of researchers. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2014;1846(2):539–46.
  26. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov* . 2016;6(5):479–91.
  27. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* . 2011;11(6):426–37.
  28. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA : a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*. 2016;30:48832–41.
  29. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-A survey. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2007;1775(1):181–232.
  30. Siravegna G, Bardelli A. Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance. *Genome Biol*. 2014;15(8):449.
  31. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin*

- Chem. 2015;61(1):112–23.
32. Martínez-Ezquerro JD, Trejo-Becerril C, Duenas-Gonzalez A. El ADN circulante y su potencial clínico. *Ciencia*. 2007;64–73.
  33. Huang ZH, Li LH, Hua D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett*. 2006 Nov 8;243(1):64–70.
  34. Traut HF, Papanicolaou GN. Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. *Cal West Med*. 1943 Aug;59(2):121–2.
  35. National Cancer Institute. Definition of Papanicolaou test - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. 2018.
  36. National Cancer Institute. Definición de prueba de Papanicolaou de base líquida . 2019.
  37. De Palo G, Dexeus S, Chanen W. Patología y tratamiento del tracto genital inferior. Elsevier Masson; 2007.
  38. Day SJ, O’Shaughnessy DL, O’Connor JC, Freund GG. Additional collection devices used in conjunction with the SurePath Liquid-Based Pap Test broom device do not enhance diagnostic utility. *BMC Womens Health*. 2004 Dec 13;4(1):6.
  39. Cannon JM, Blythe JG. Comparison of the Cytobrush plus plastic spatula with the Cervex Brush for obtaining endocervical cells. *Obstet Gynecol*. 1993 Oct;82(4 Pt 1):569–72.
  40. Marques JP de H, Costa LB, Pinto AP de SE, Lima AF de, Duarte MEL, Barbosa APF, *et al*. Atypical glandular cells and cervical cancer: systematic review. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57(2):234–8.
  41. Insinga RP, Glass AG, Rush BB. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: A population-based study. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(1):105–13.
  42. Cenci M, Chieppa A, Vecchione A. Controversial categories in cytopathology of the uterine cervix. II. AGUS: atypical glandular cells of undetermined significance. *Minerva Ginecol*. 2001;53(1):57–62.
  43. Zhao C, Florea A, Onisko A, Austin RM. Histologic follow-up results in 662 patients with Pap test findings of atypical glandular cells: Results from a large academic womens hospital laboratory employing sensitive screening methods. *Gynecol Oncol*.

- 2009;114(3):383–9.
44. Lojindarat S, Luengmettakul J, Puangsa-art S. Clinical significance of atypical glandular cells in cervical Papanicolaou smears. Vol. 95, Journal of the Medical Association of Thailand. 2012. p. 975–82.
  45. Chan CW, Cheung KB. Clinical significance and management of cervical atypical glandular cells of undetermined significance. Hong Kong Med J. 2003;9(5):346–51.
  46. Schnatz P, Guile M, O'Sullivan D, Sorosky J. Clinical significance of atypical glandular cells on cervical cytology. Obs Gynecol. 2006;107(3):701.
  47. Kinde I, Bettegowda C, Wang Y, Wu J, Agrawal N, Shih I-M, *et al.* Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers. Sci Transl Med. 2013;5(167):167ra4.
  48. Denny L. Cytological screening for cervical cancer prevention. Best Pract Res Obstet Gynaecol. 2012;26:189–96.
  49. Goff BA, Mandel LS, Drescher CW, Urban N, Gough S, Schurman KM, *et al.* Development of an ovarian cancer symptom index: Possibilities for earlier detection. Cancer. 2007;109(2):221–7.
  50. Gilbert L, Basso O, Sampalis J, Karp I, Martins C, Feng J, *et al.* Assessment of symptomatic women for early diagnosis of ovarian cancer: Results from the prospective DOvE pilot project. Lancet Oncol. 2012;13(3):285–91.
  51. Jacobs IJ, Skates S, Davies AP, Woolas RP, Jeyerajah A, Weidemann P, *et al.* Risk of diagnosis of ovarian cancer after raised serum CA 125 concentration: a prospective cohort study. Vol. 313, BMJ. 1996. p. 1355–8.
  52. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. Diagnostico Prenat. 2012;23(2):56–66.
  53. Frenel JS, Carreira S, Goodall J, Roda D, Perez-Lopez R, Tunariu N, *et al.* Serial next-generation sequencing of circulating cell-free DNA evaluating tumor clone response to molecularly targeted drug administration. Clin Cancer Res. 2015;21(20):4586–96.
  54. Illumina. Next-Generation Sequencing (NGS) | Explore the technology . 2017 .
  55. Schmandt RE, Iglesias DA, Co NN, Lu KH. Understanding obesity and endometrial

- cancer risk: Opportunities for prevention. Vol. 205, American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2011. p. 518–25.
56. Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia* . 2007 Jun 5 ;50(7):1365–74.
  57. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. Vol. 366, *The Lancet*. 2005. p. 491–505.
  58. Elshimali YI, Khaddour H, Sarkissyan M, Wu Y, Vadgama J V. The clinical Utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):18925–58.
  59. Qiagen. Ingenuity Variant Analysis - QIAGEN Bioinformatics . 2019.
  60. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. Vol. 32, *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 2014. p. 579–86.
  61. Sideris M, Emin EI, Abdullah Z, Hanrahan J, Stefatou KM, Sevas V, *et al*. The Role of KRAS in Endometrial Cancer: A Mini-Review. *Anticancer Res* . 2019 Feb 1 ;39(2):533–9.
  62. Berg A, Hoivik EA, Mjøs S, Holst F, Werner HMJ, Tangen IL, *et al*. Molecular profiling of endometrial carcinoma precursor, primary and metastatic lesions suggests different targets for treatment in obese compared to non-obese patients. *Oncotarget* . 2015 Jan 20 ;6(2):1327–39.
  63. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tsao JL, Shibata DK. Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Cancer Res* . 1994 Mar 15 ;54(6):1604–7.

## Anexos

### Anexo 1: Extracción de ácidos nucleicos de FFPE

#### *Protocolo: Purificación de DNA a partir de FFPE (tejidos embebidos en parafina) mediante All prep DNA/RNA FFPE*

##### Pasos a realizar antes de comenzar:

- En caso de que se reciba la muestra en bloque, punchar un fragmento, cortar con un escalpelo nuevo. Colocar en un tubo de 1.5 ml.
- Desparafinizar utilizando 1 ml de xileno, agitar vigorosamente por 10 s y centrifugar 2 min a máxima velocidad. Remover el supernadante cuidadosamente. Añadir 1 ml de EtOH 96%, vortex y centrifugar 2 min a máxima velocidad. Remover el supernadante cuidadosamente. Evaporar el EtOH a T° ambiente o a 37° C

##### Procedimiento:

1	Resuspender el pellet formado en 150 µl de PKD y agitar. Añadir 10 µl de proteinasa K y dar vortex.
2	Incubar a 56° toda la noche.
3	Incubar en hielo por 3 min.
4	Centrifugar por 15 min a 20,000 g.
5	*** Transferir el supernadante a un nuevo tubo, se utilizara para el aislamiento de RNA total.
6	Al pellet añadir 180 µl de buffer ATL, 40 µl de proteinasa K y mezclar por vortex.
7	Incubar a 56° por 1 h a 300 rpm.
8	Incubar a 90° por 2 h sin agitación.
9	Genere un spin para bajar la muestra que pueda quedar en la tapa
10	Añadir 200 µl de AL y mezclar por vortex. Añada 200 µl de EtOH al 96% y dar vortex.
11	Transfiera toda la muestra a la columna de DNA y centrifugue a 8,000 g por 1 min
12	Coloque la columna en un nuevo tubo de colecta y añada 700 µl de buffer AW1. Centrifugue 30 s a 8,000 g. Deseche el flujo de trabajo.
13	Añada 700 µl de buffer AW2 y centrifugue 30 s a 8,000 g. Deseche el flujo de trabajo.
14	Añada 700 µl de buffer EtOH al 96%. Centrifugue 30 s a 8,000 g. Deseche el flujo con el tubo de colecta y coloque un la columna en un nuevo tubo de colecta.
15	Centrifugar a máxima velocidad (17,000 g) por 5 min. Deseche el flujo con el tubo de colecta.
16	En un nuevo tubo de colecta, añada 60 µl de buffer EB, incube 5 min a T° ambiente y centrifuge a máxima velocidad (17,000 g) durante 1 min para eluir el DNA, esto será la primera elusión. Colocar el eluato en un tubo eppendorf de 1.5 ml previamente rotulado.
17	Para un mejor rendimiento, realizar una segunda elusión añadiendo a la columna 30 µl de buffer EB, incube 5 min a T° ambiente y centrifuge a máxima velocidad (17,000 g) durante 1 min para eluir el DNA, esto será la segunda elusión. Colocar el eluato en un tubo eppendorf de 1.5 ml previamente rotulado.

## Anexo 2: Extracción de ácidos nucleicos circulantes (cf-DNA)

### Protocolo: Purificación de Ácidos Nucleicos Circulantes, a partir de 2 ml de plasma (protocolo en QIAvac)

#### Fases a realizar antes de comenzar:

- Rotular las muestras (tapa y tubo)
- Hielo
- Tubos falcon 50 ml (1 por muestra; rotular el tubo y la tapa)
- 2 ml de Plasma (en caso de ser menor, ajustar con PBS 1X)
- Thermoblock a 55°C
- Baño de agua a 60°C

#### Procedimiento:

1	Añadir 200 µl de Proteinasa K QIAGEN a un tubo falcon de 50 ml.
2	Añadir 2 ml de plasma en el tubo falcon.
3	Añadir 1.6 ml de Buffer ACL. Darvórtax por 30 s.
4	Incubar el líquido 30 minutos en el baño de agua a 60°C. **En este tiempo armar el QIAvac, rotular los tubos de elusión (600 µl), rotular las columnas y los tubos extendedores
5	Retirar el líquido del baño de agua.
6	Añadir 3.6 ml de Buffer ACB al líquido. Darvórtax por 30 s.
7	Incubar en hielo por 5 minutos.
8	Insertar las columnas QIAamp mini column en el manifold del VacConnector y QIAvac 24 Plus. Insertar el tubo extendedor en la columna. Guardar los tubos de colecta para la elusión final.
9	Añadir CUIDADOSAMENTE la muestra (del paso 7) en el tubo extendedor. Encender la bomba de vacío. Cuando la muestra haya atravesado la columna completamente, apagar la bomba. Cuidadosamente remover el tubo extendedor.
10	Añadir 600 µl del Buffer ACW1 a la columna. Encender la bomba de vacío. Cuando la muestra haya atravesado la columna completamente, apagar la bomba.
11	Añadir 750 µl del Buffer ACW2 a la columna. Encender la bomba de vacío. Cuando la muestra haya atravesado la columna completamente, apagar la bomba.
12	Añadir 750 µl del Etanol 96-100% a la columna. Encender la bomba de vacío. Cuando la muestra haya atravesado la columna completamente, apagar la bomba.
13	Cerrar la tapa de la columna, retirar del manifold y colocarla en el tubo de colecta, y centrifugar a máxima velocidad (20,000 g; 14,000 rpm) durante 3 min.
14	Colocar la columna en un nuevo tubo de colecta. Abrir la tapa de la columna e incubar por exactamente 10 minutos a 55°C en el thermoblock (sin agitación), con la finalidad de secar la columna.
15	Colocar la columna en un nuevo tubo de colecta y añadir 80 µl de Buffer AVE en el centro de la columna. Cerrar la tapa e incubar por 3 min a T° amb.
16	Centrifugar a máxima velocidad (20,000 g; 14,000 rpm) durante 1 min para eluir los ácidos nucleicos, esto será la primera elusión. Colocar el eluato en un tubo de 600 µl previamente rotulado.
17	Para un mejor rendimiento, recibir una segunda elusión colocando la columna en un nuevo tubo de colecta y añadir 15 µl de Buffer AVE en el centro de la columna. Cerrar la tapa e incubar por 3 min a T° amb.
18	Centrifugar a máxima velocidad (20,000 g; 14,000 rpm) durante 1 min para eluir los ácidos nucleicos. Colocar el eluato en un tubo de 600 µl.

QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, versión 2ª edición, Enero 2011

Proyecto Cáncer de Ovario y Endometrio

Bobarré M.C., Irma Vigil Junio 2017

### Anexo 3: Extracción de ácidos nucleicos de sangre

---

## Protocolo: Extracción de DNA de Sangre Periférica

---

#### **Pasos a realizar antes de comenzar:**

- Preparar el baño de agua a 70°C
- Utilizar 2 ml de sangre total. Solo en caso necesario, ajustar el volumen a 2 ml con PBS 1 X

#### **Procedimiento:**

<b>1</b>	Añada 200 µl de Proteasa a un tubo falcon de 15 ml.
<b>2</b>	Añada 2 ml de muestra.
<b>3</b>	Añada 2.4 ml de buffer AL y mezcle por inversión 15 veces. Vortex por al menos 1 min.
<b>4</b>	Incube 10 min a 70°C en un baño de agua.
<b>5</b>	Añada 2 ml de EtOH al 96% y mezcle por inversión 10 veces, seguido de vortex por 30 s.
<b>6</b>	Transferir la mitad de la muestra (3.3 ml) a la columna y centrifugar 1,900 x g por 3 min.
<b>7</b>	Desechar el filtrado, añadir el resto de la muestra y centrifugar 1,900 x g por 3 min.
<b>8</b>	Desechar el filtrado, añadir 2 ml de AW1 y centrifugar a 4,500 x g por 1 min.
<b>9</b>	Añadir 2 ml de AW2 y centrifugar a 4,500 x g por 15 min.
<b>10</b>	Desechar el filtrado y centrifugar la columna sola a 4,500 x g por 3 min.
<b>11</b>	Añadir 300 µl de buffer AE, incubar 5 min y centrifugar 4,500 x g por 2 min. Esta será la primera elusión.
<b>12</b>	Añadir 150 µl de buffer AE, incubar 5 min y centrifugar 4,500 x g por 2 min. Esta será la segunda elusión.

QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi Handbook, Fourth edition, February 2015	Proyecto Cáncer de Ovario y Endometrio	Elaboró M.C. Irma Vigil
---	--	-------------------------

**Anexo 4: Extracción de ácidos nucleicos de citología en base líquida**

**Protocolo: Purificación de DNA a partir de citología en base líquida utilizando el estuche comercial AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal**

**Pasos a realizar antes de comenzar:**

- Se dará vórtex a la citología en base líquida durante 30 seg y se transferirá cuidadosamente a un tubo falcon de 15 ml
- Se centrifugará por 10 min a 300 G a 4°C
- Se removerá el sobrenadante y se procederá a trabajar con el pellet
- Se añadirán 600 µl de Buffer RLT plus recién preparado (RLT plus con β-mercapto, donde se añadirán 10 µl de β-mercapto por cada 1 ml de RLT plus) y se homogenizarán mecánicamente mediante TissueRuptor por 30 seg a velocidad media.

**Procedimiento:**

1	Transferir 600 µl del lisado a una columna de DNA y centrifugar 30 seg a 15,000 G. * Si la muestra no atraviesa durante esta centrifugación, repetir la centrifugación hasta que haya atravesado la membrana.
2	Transferir el flujo de trabajo a un tubo de 2 ml y congelar a -80°C para su posterior extracción de RNA y miRNAs
3	Añadir 350 µl de Buffer AW1 a la columna de DNA y centrifugar 30 seg a 15,000 G. Desecchar el flujo de trabajo.
4	Realizar un mix de 20 µl de proteinasa K y 60 µl de Buffer AW1 por cada muestra en un tubo de 2 ml de mayor capacidad según sea el caso, y añadir 80 µl de este mix a cada muestra. *Ejemplo: si se procesan 12 muestras a la vez, se realizará un mix de 240 µl de proteinasa K y 720 µl de Buffer AW1 en un tubo de 2 ml, se dará vórtex ligero y se añadirán 80 µl a cada muestra.
5	Incubar por 5 min en la mesa de trabajo.
6	Añadir 350 µl de Buffer AW1 a la columna de DNA y centrifugar 30 seg a 15,000 G. Desecchar el flujo de trabajo.
7	Añadir 500 µl de Buffer AW2 a la columna de DNA y centrifugar 2 min a 15,000 G. Desecchar el tubo de colecta con el flujo de trabajo.
8	Colocar la columna en un nuevo tubo de colecta y centrifugar nuevamente 2 min a 15,000 G. Desecchar el tubo de colecta con el flujo de trabajo.
9	Añadir 100 µl de Buffer EB directamente en la columna e incubar por 1 minuto en la mesa de trabajo.
10	Centrifugar la columna durante 1 min a 8,000 G. Transferir el flujo de trabajo que contiene el DNA en un tubo de 1.5 ml. Esto será la elusión 1.
11	Añadir 50 µl de Buffer EB directamente en la columna e incubar por 1 minuto en la mesa de trabajo.
12	Centrifugar la columna durante 1 min a 8,000 G. Transferir el flujo de trabajo que contiene el DNA en un tubo de 1.5 ml. Esto será la elusión 2.

AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Handbook, edición febrero 2016	Proyecto Cáncer de Ovario y Endometrio	Bobroš M.C. Irma Vigil Junio 2016
--	--	-----------------------------------

## Anexo 5: PCR punto final como control de calidad de ácidos nucleicos

### *Protocolo: PCR punto final de beta globina, como control de calidad de DNA*

#### **Pasos a realizar antes de comenzar:**

- Asegurarse de que las muestras que se van a amplificar se encuentren en una concentración de 50 ng/μL (realizar los cálculos correspondientes).
- Vórtex y spin, excepto la GoTaq

Master Mix			
Orden de adición de los reactivos	Reactivo:	Volumen (μL) para 1 rx'n:	Cálculos para "n" rx'nes
1	Agua MBG	4.75	
2	Primer B-globina 1 (0.2 μM) 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'	0.25	
3	Primer B-globina 2 (0.2 μM) 5'-GAAGAGCCAAAGGACAGGTAC-3'	0.25	
4	Go Taq Master Mix *Homogenizar	6.25	
	Volumen total	11.5	
5	Control (-): Agua GBM	2	
6	DNA (muestra)	2	
7	Control (+): DNA que amplifica	2	

\*Contemplar en los cálculos una reacción extra por cada 10 muestras.

#### **Procedimiento:**

	Initial denaturation at 94°C for 5 min
X	Denaturation at 94°C for 30 s
30	Annealing at 57°C for 30 s
	Elongation at 72°C for 2 min
	Final extension at 72°C for 10 min

Protocolo PCR beta globina: control de calidad. Febrero 2018	Proyecto Cáncer de Ovario y Endometrio	Elaboró M.C. Irma Vigil Febrero 2018
---	---	---

# Anexo 6: Diseño del panel de secuenciación

175 pb irma TSCA I (121095)

Coverage: 96%

**Design Summary**

Project ID:	121095	Species:	Homo sapiens (UCSC hg19)
Assay Type:	TruSeq Custom Amplicon	Variant Source:	1000 Genomes
Amplicon Size:	175 bp	Population:	AFR_AMRAS_EUR
Selected Amplicons:	1,480 / 1,480	Cumulative Targets:	140,456 bp
Number of Gaps:	43	Undesignable Targets:	0 bp

Manage Charts | 
 Sort By: Region Name | 
 Sort Order: Ascending | 
 Page No.: 1: 1-69

**Target Region Coverage % Summary** (Click chart to drill-down.)

**Region Summary**

Region Name	Target Type	Targets	Chr	Start	End	Length	Padding	Base Added(+)	Base Added(-)	Coverage%	Amplicons	Gaps	SNPs	Avoid SNP	Labels	Selected
+ AKT1	EXON	9/9	14	105,235,687	105,262,080	26,394 bp	5 bp	0 bp	0 bp	88 %	22/22	2	11 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ AKT1 Merged	FULLREGION	1/1	14	105,236,210	105,236,922	713 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	8/8	0	0 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ AKT1 Merged	FULLREGION	1/1	14	105,241,270	105,241,549	280 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	3/3	0	2 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ AKT1 Merged	FULLREGION	1/1	14	105,259,450	105,259,943	495 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	4/4	0	0 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ APC	EXON	18/18	5	112,043,202	112,181,930	138,735 bp	5 bp	0 bp	0 bp	90 %	124/124	2	20 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ ARID1A	EXON	12/12	1	27,022,522	27,108,001	86,080 bp	0 bp	0 bp	0 bp	92 %	66/66	6	10 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ ARID1A Merged	FULLREGION	1/1	1	27,062,707	27,063,082	356 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	3/3	0	0 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ ARID1A Merged	FULLREGION	1/1	1	27,096,989	27,099,493	499 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	4/4	0	0 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ ARID1A Merged	FULLREGION	1/1	1	27,099,832	27,100,394	563 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	5/5	0	1 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ ARID1A Merged	FULLREGION	1/1	1	27,100,815	27,101,716	902 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	10/10	0	0 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF	EXON	18/18	7	140,433,813	140,624,504	190,752 bp	5 bp	0 bp	0 bp	100 %	40/40	0	4 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF1	EXON	18/18	17	41,168,312	41,277,500	81,189 bp	0 bp	0 bp	0 bp	88 %	34/34	1	6 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF1 Merged	FULLREGION	1/1	17	41,228,500	41,229,636	1,137 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	2/2	0	0 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF1 Merged	FULLREGION	1/1	17	41,243,447	41,246,882	3,436 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	36/36	0	4 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF1 Merged	FULLREGION	1/1	17	41,251,797	41,251,902	116 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	2/2	0	0 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF1 Merged	FULLREGION	1/1	17	41,258,498	41,258,555	88 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	1/1	0	1 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF1 Merged	FULLREGION	1/1	17	41,277,194	41,277,505	312 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	3/3	0	1 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF2	EXON	23/23	13	32,896,817	32,973,809	84,193 bp	5 bp	0 bp	0 bp	97 %	120/120	4	33 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF2 Merged	FULLREGION	1/1	13	32,900,233	32,900,424	192 bp	0 bp	0 bp	0 bp	78 %	2/2	1	1 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ BRAF2 Merged	FULLREGION	1/1	13	32,953,882	32,954,287	406 bp	0 bp	0 bp	0 bp	100 %	4/4	0	0 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ CNTN5	EXON	9/9	18	75,862,428	75,869,058	6,441 bp	5 bp	0 bp	0 bp	78 %	27/27	2	7 bp	Yes	"Merged"	Yes
+ CNTN5	EXON	22/22	11	98,991,708	100,229,616	1,337,911 bp	5 bp	0 bp	0 bp	100 %	71/71	0	22 bp	Yes	"Merged"	Yes

## Anexo 7: qPCR como control de calidad de muestras FFPE

# TruSeq FFPE DNA Library Prep QC Kit

Save the following FFPEQC program on the qPCR instrument:

- ▶ 95°C for 3 minutes
- ▶ 40 cycles of:
  - ▶ 95°C for 3 seconds
  - ▶ 66°C for 20 seconds
  - ▶ 72°C for 10 seconds

### Quantify DNA

- 1 Flick the ACD1 and FFPE gDNA tubes to mix, and then centrifuge briefly. Do not vortex the tubes, which can further degrade the DNA.
- 2 Quantify ACD1 and FFPE gDNA using a fluorometric method, such as PicoGreen or Qubit dsDNA assays.

### Dilute and Requantify ACD1

- 1 Flick the ACD1 tube to mix, and then centrifuge briefly.
- 2 Dilute ACD1 to 2 ng/μl in Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 with 0.1% Tween 20. Prepare enough volume for quantification and assay use.
- 3 Flick to mix, and then centrifuge briefly. Do not vortex.
- 4 In triplicate, quantify the diluted ACD1 using a Qubit dsDNA HS Assay Kit.
- 5 Based on the actual concentration, further dilute the ACD1 to 0.25 ng/μl in Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 with 0.1% Tween 20. Prepare 30 μl.
- 6 Flick to mix, and then centrifuge briefly. Do not vortex.

### Dilute and Requantify FFPE gDNA

- 1 Dilute FFPE gDNA to 2 ng/μl in Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 with 0.1% Tween 20. Prepare enough volume for quantification and assay use.
- 2 Flick to mix, and then centrifuge briefly. Do not vortex.
- 3 In triplicate, quantify the diluted FFPE gDNA using a Qubit dsDNA HS Assay Kit.
- 4 Based on the actual concentration, further dilute the FFPE gDNA to 0.25 ng/μl in Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 with 0.1% Tween 20. Prepare 30 μl.
- 5 Flick to mix, and then centrifuge briefly. Do not vortex.

### Prepare Master Mix

- 1 Prepare a qPCR master mix in a sterile, nuclease-free microcentrifuge tube on ice. Make 10% excess.



**NOTE**  
All samples, ACD1, and the No Template Control (NTC) are run in triplicate.

Reagent	Volume per 20 μl reaction	Volume per 10 μl reaction
QCP	1 μl	0.5 μl
KAPA SYBR Fast Master Mix Universal (2x)	10 μl	5 μl
Nuclease-free water	1 μl	0.5 μl

- 2 Pipette to mix, and then centrifuge briefly.
- 3 Place the tube on ice and protect it from light.

### Prepare qPCR Plate

- 1 Determine the qPCR plate layout to run the FFPE gDNA samples, ACD1, and NTC in triplicate.

### Quantify by qPCR

- 1 Place the plate on the preprogrammed qPCR instrument and run the FFPEQC program.
- 2 Collect the Cq value of ACD1 and each FFPE gDNA sample.



**NOTE**  
Make sure that there is good amplification of the ACD1 and remove outliers from a triplicate group that are > 0.5 Cq different from the rest of the group.

- 3 Using auto baseline correction, subtract the average Cq value of ACD1 from the average Cq value of each sample to yield the ΔCq value of each sample (Average Cq sample - Average Cq ACD1 = ΔCq sample).
- 4 Place ACD1, QCP, and FFPE gDNA in -25°C to -15°C storage.

## Anexo 8: Generación de librerías.



### TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit Checklist

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

#### Quantify and Dilute DNA

- 1 Quantify DNA using a fluorometric method.
- 2 Dilute DNA to 10–25 ng/μl in RS1.
- 3 Requantify the diluted DNA.
- 4 Further dilute DNA in a LoBind tube as follows. For the dual strand protocol, prepare ~10% extra DNA.
  - a Dilute the desired input DNA amount in RS1 to result in a final volume of 4 μl.
  - b Add 1 μl SS1.
- 5 [Dual strand protocol] Skip to *Hybridize Oligo Pool (Dual Strand)* on page 1.

#### Hybridize Oligo Pool

- 1 Dilute 2.5 μl CAT with 2.5 μl RS1 per sample well. Pulse vortex to mix, and then centrifuge briefly.
- 2 Dilute 2.5 μl ACP3 with 2.5 μl RS1. Pulse vortex to mix, and then centrifuge briefly.
- 3 Dilute 2 μl 2800M with 2 μl RS1 and 1 μl SS1. Pulse vortex to mix, and then centrifuge briefly.
- 4 Add 5 μl diluted 2800M to one well.
- 5 Add 5 μl diluted ACP3 to the well that contains diluted 2800M.
- 6 Add 5 μl RS1 to 1 well.
- 7 Add 5 μl diluted DNA to remaining wells.
- 8 Add 5 μl diluted CAT to all wells except the well containing 2800M.
- 9 Add 15 μl OHS2 to each well. Pipette slowly to mix.
- 10 If bubbles form, centrifuge the plate at 100 x g for 20 seconds.
- 11 Place on the thermal cycler and run the HYB program.
- 12 Combine ELE and ELB as follows.
  - [16-sample kit] Transfer 18 μl ELE to the ELB tube. Flick and invert to mix.
  - [96-sample kit] Transfer 137 μl ELE to the ELB tube. Flick and invert to mix.
- 13 Place the ELB/ELE mixture on ice.

#### Hybridize Oligo Pool (Dual Strand)

- 1 Dilute 2.5 μl CAT A with 2.5 μl RS1 per sample well. Pulse vortex to mix, and then centrifuge briefly.
- 2 Dilute 2.5 μl CAT B with 2.5 μl RS1 per sample well. Pulse vortex to mix, and then centrifuge briefly.
- 3 Dilute 2.5 μl ACP3 with 2.5 μl RS1. Pulse vortex to mix, and then centrifuge briefly.
- 4 Dilute 2 μl 2800M with 2 μl RS1 and 1 μl SS1. Pulse vortex to mix, and then centrifuge briefly.
- 5 Add 5 μl diluted 2800M to one well.
- 6 Add 5 μl diluted ACP3 to the well that contains diluted 2800M.
- 7 Add 5 μl RS1 to one well.
- 8 Add 5 μl diluted DNA to the left half of the plate.
- 9 Add 5 μl diluted DNA to the right half of the plate. Do not add DNA to the well containing 2800M.
- 10 Add 5 μl diluted CAT A to each well containing DNA.
- 11 Add 5 μl diluted CAT B to each well containing DNA.
- 12 Add 15 μl OHS2. Pipette slowly to mix.
- 13 If bubbles form, centrifuge the plate at 100 x g for 20 seconds.
- 14 Place on the preprogrammed thermal cycler and run the HYB program.
- 15 Combine ELE and ELB as follows.
  - [16 sample] Transfer 18 μl ELE to the ELB tube. Flick and invert to mix.
  - [96 sample] Transfer 137 μl ELE to the ELB tube. Flick and invert to mix.
- 16 Place the ELB/ELE mixture on ice.

#### Remove Unbound Oligos

- 1 Add 25 μl SPB. Pipette slowly to mix.
- 2 Incubate at room temperature for 5 minutes.
- 3 Place on the magnetic stand until liquid is clear.
- 4 Remove and discard all supernatant.
- 5 Wash three times with 80 μl SW1.
- 6 Use a 20 μl pipette to remove residual SW1.
- 7 Add 80 μl of 60% EtOH.
- 8 Incubate at room temperature for 30 seconds.
- 9 Remove and discard all supernatant.
- 10 Use a 20 μl pipette to remove residual EtOH.
- 11 Air-dry for up to 5 minutes.

#### Extend and Ligate Bound Oligos

- 1 Remove plate from the magnetic stand.
- 2 Add 22 μl ELB/ELE mixture to each well.
- 3 Pipette to mix.
- 4 If bubbles form, centrifuge at 100 x g for 20 seconds.
- 5 Place on the thermal cycler and run the EXT\_LIG program.
- 6 Combine EDP and EMM as follows.
 

Number of Samples	EDP (μl)	EMM (μl)
1	1.1	21
16	17.6	334
48	53	1003
96	106	2006
- 7 Pipette to mix, and then centrifuge briefly. Place on ice.

#### Amplify Libraries

- 1 Arrange the Index 1 adapters in columns 1–12.
- 2 Arrange the Index 2 adapters in rows A–H.
- 3 Place the HYP plate on a TruSeq Index Plate Fixture.
- 4 Add 4 μl of each Index 1 adapter down each column.
- 5 Add 4 μl of each Index 2 adapter across each row.
- 6 Place the plate on ice or iceless cooler.
- 7 Add 20 μl EDP/EMM mixture. Pipette to mix.
- 8 Centrifuge at 280 x g for 1 minute.
- 9 Place the plate on ice or iceless cooler.
- 10 Immediately transfer to the post-PCR area.
- 11 Place on the thermal cycler and run the PCR program for the appropriate number of cycles.

#### SAFE STOPPING POINT

If you are stopping, seal the plate and store at 2°C to 8°C for up to 2 days. Alternatively, leave on the thermal cycler overnight.

#### Clean Up Libraries

- 1 Centrifuge the HYP plate at 280 x g for 1 minute.
- 2 Transfer 15 μl supernatant from the HYP plate to the CLP plate.
- 3 Add 36 μl SPB to the CLP plate.
- 4 Shake the plate at 1800 rpm for 2 minutes.
- 5 Incubate at room temperature for 5 minutes.
- 6 Centrifuge at 280 x g for 1 minute.
- 7 Place on a magnetic stand until liquid is clear.
- 8 Remove and discard all supernatant.
- 9 Wash two times with 200 μl 80% EtOH.
- 10 Using a 20 μl pipette, remove residual EtOH.
- 11 Remove from the magnetic stand and air-dry.
- 12 Add 25 μl RSB.
- 13 Shake the plate at 1800 rpm for 2 minutes.
- 14 Incubate at room temperature for 2 minutes.
- 15 Centrifuge at 280 x g for 1 minute.
- 16 Place on a magnetic stand until liquid is clear.
- 17 Transfer 20 μl purified library from the CLP plate to the LNP plate.
- 18 From the liquid in the CLP plate, run an aliquot of the samples and control to confirm the PCR product sizes.

#### SAFE STOPPING POINT

If you are stopping, seal the plate and store at -25°C to -15°C for up to 6 months.

#### Normalize Libraries

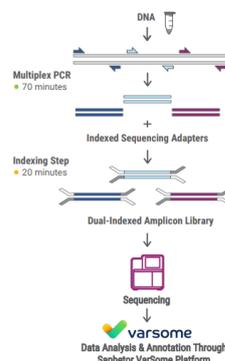
- 1 Add 44 μl LNA1 per library to a new 15 ml conical tube.
- 2 Use a P1000 pipette to resuspend LNB1.
- 3 Transfer 8 μl LNB1 per library to the tube of LNA1. Invert to mix.
- 4 Add 45 μl LNA1/LNB1 to the LNP plate.
- 5 Shake at 1800 rpm for 30 minutes.
- 6 Place on a magnetic stand until liquid is clear.
- 7 Remove and discard all supernatant.
- 8 Remove from the magnetic stand.
- 9 Wash two times with 45 μl LNW1. Shake at 1800 rpm for 5 minutes per wash.
- 10 Use a 20 μl pipette to remove residual LNW1.
- 11 Remove from the magnetic stand.
- 12 Add 30 μl fresh 0.1 N NaOH.
- 13 Shake at 1800 rpm for 5 minutes.
- 14 Place on a magnetic stand until liquid is clear.
- 15 Add 30 μl LNS2 to the SGP plate.
- 16 Transfer 30 μl supernatant from the LNP plate to the SGP plate.
- 17 Centrifuge at 1000 x g for 1 minute.

#### SAFE STOPPING POINT

If you are stopping, seal the plate and store at -25°C to -15°C for up to 30 days.

Accel-Amplicon 56G Oncology Panel v2 (continued)

#### Single-Tube, 2-Hour Workflow



The single-tube workflow includes two brief incubations to generate the multiplex amplicon targets and add a unique combination of Illumina-compatible indexed adapters, creating up to 288 uniquely indexed libraries for multiplexing on a single sequencing run.

## Anexo 9: PCR punto final previo a Sanger

### Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase

USER GUIDE

Pub. No. MAN0014882

Rev. B

invitrogen

Master Mix para cada reacción de PCR punto final, utilizando la enzima Platinum SuperFi DNA Polimerasa

Componente	1X (25- $\mu$ L Reacción)
5X Super Fi Buffer	5 $\mu$ L
10 mM dNTP mix	0.5 $\mu$ L
10 $\mu$ M forward primer	1.25 $\mu$ L
10 $\mu$ M reverse primer	1.25 $\mu$ L
5X Super Fi GC Enhancer	5 $\mu$ L
Platinum Super Fi DNA polimerasa	0.25 $\mu$ L
DNA a 10 ng/ $\mu$ l	2 $\mu$ L
DNase-free, RNasefree water	9.75 $\mu$ L

### Procedimiento

1. Calcular el número de reacciones para cada ensayo, incluyendo una extra por cada 10 reacciones. Incluir al menos una reacción negativa y un DNA conocido de amplificación.
2. Calcular los volúmenes de componentes necesarios de la reacción de PCR.
3. Vórtex y spin rápido a cada reactivo.
4. Realizar el mix de reacción cuidando que los reactivos estén todo el tiempo a 4°C.
5. Pipetear el mix en tiras de 8 tubos para PCR y colocar en el termociclador con los siguientes parámetros indicados en la siguiente tabla. \*La temperatura de alineamiento es diferente para cada set de primers, por lo cual se recurrió a la calculadora en línea de Thermo.com específica para la enzima.

Procedure details			
Step		2-step protocol (<10kb)	
		Temp.	Time
Initial denaturation		98°C	30 sec
25–35 PCR cycles	Denature	98°C	5–10 sec
	Anneal <sup>1</sup>	—	—
	Extend	72°C	15–30 sec/kb
Final extension		72°C	5 min
		4°C	hold

## Anexo 10: Extracción de DNA de productos de PCR

### Protocolo: Extracción de DNA de productos de PCR

#### Pasos a realizar antes de comenzar:

- En todos los casos, las centrifugaciones serán a T° ambiente y a 17,900 x g

#### Procedimiento:

1	Corte el fragmento de PCR deseado del gel de agarosa utilizando un escalpelo limpio.
2	Pese la muestra en una balanza analítica. Añada 3 volúmenes de buffer QG a un volumen del gel (ejemplo: por cada 100 mg de la muestra, añada 100 µl del buffer).
3	Incube a 50°C por 10 min o hasta que la muestra se haya disuelto por completo. Generar vortex cada 2-3 min durante la incubación.
4	Revisar que el color de la muestra sea color Amarillo (esto indica que el pH de la muestra es la adecuada, en caso de que sea de un color diferente, agregue acetato de sodio al 3M (10 µl).
5	Añada un volumen de isopropanol a la muestra y mezcle por vortex.
6	Transferir la muestra a la columna y centrifugar por 1 min. *Se recomienda transferir de 800 µl por vez.
7	Descarte el flujo de trabajo y añada 500 µl de buffer QG a la columna y centrifugue por 1 min.
8	Descarte el flujo de trabajo, añada 750 µl de buffer PE a la columna, incube a T° ambiente por 5 min y centrifugue por 1 min. Deseche el flujo de trabajo con el tubo de colecta.
9	Descarte el flujo de trabajo y centrifugue por 1 min. Deseche el flujo de trabajo con el tubo de colecta.
10	Añada 50 µl de buffer EB en el centro de la columna, incube por 5 min y centrifugue por 1 min. El eluato será la primera elusión.
11	Añada 30 µl de buffer EB en el centro de la columna, incube por 5 min y centrifugue por 1 min. El eluato será la segunda elusión.

QIAquick® Spin Handbook, Noviembre 2018

Proyecto Cáncer de Ovario y Endometrio

Elaboró M.C. Irma Vigil

## Anexo 11: qPCR para el rastreo de mutaciones en las citologías en base líquida

Master Mix para cada reacción de qPCR, utilizando el TaqMan™ Genotyping Master Mix (Código de catálogo: 4371355)	
Componente	10-µL Reacción (96-well fast plate) 1X
TaqMan Genotyping Master Mix (2X)	5 µL
TaqMan genotyping assay mix (20X) *	0.5 µL
DNA at 10 ng/ µL	2 µL
DNase-free, RNasefree water	2.5 µL

### Procedimiento

1. Calcular el número de reacciones para cada ensayo, incluyendo una extra por cada 10 reacciones. Incluir al menos una reacción negativa y un DNA conocido de amplificación o gblock de la mutante y/o wildtype control.
2. Calcular los volúmenes de componentes necesarios de la reacción de PCR.
3. Vórtex y spin rápido a cada reactivo.
4. Realizar el mix de reacción cuidando que los reactivos estén todo el tiempo a 4°C, según la tabla superior.
5. Pipetear el mix en una placa óptica fast de 96 pozos, cubrir con el film óptico y generar spin y colocar en el equipo Quantstudio 7 e indicar los pasos de la tabla siguiente.

Step	Temp (°C)	Duration	Cycles
AmpliTaq Gold, UP Enzyme Activation	95	10 min	HOLD
Denature	95	15 sec	40
Anneal/Extend	60	1 min	

## Anexo 12: ddPCR para el rastreo de mutaciones en las citologías en base líquida

Master Mix para cada reacción de ddPCR, utilizando el TaqMan™ Genotyping Master Mix (Código de catálogo: 4371355), para la generación de 10 millones de gotas	
Componente	50-µL Reacción 1X
TaqMan Genotyping Master Mix (2X)	10 µL
Droplet stabilizator 25X	2 µL
TaqMan genotyping assay mix (40X)	0.5 µL
DNA at 10 ng total	20 µL
DNase-free, RNasefree water	17.5 µL

### Procedimiento

1. Calcular el número de reacciones para cada ensayo, incluyendo una extra por cada 8 reacciones. Incluir al menos una reacción negativa y un DNA conocido de amplificación o gblock de la mutante y/o wildtype control.
2. Calcular los volúmenes de componentes necesarios de la reacción de PCR. No generar burbujas (solo mezclar con la micropipeta lentamente).
3. Realizar el mix de reacción cuidando que los reactivos estén todo el tiempo a 4°C, según la tabla superior.
4. Pipetear el mix en una tira de 8 tubos, y colocar en el equipo Raindance (generador de gotas), seleccionando la generación de 10 millones de gotas.
5. Una vez finalizada la generación de gotas (droplets), colocar la tapa de la tira de tubos y llevar al termociclador de PCR punto final indicando los pasos de la tabla siguiente
6. Una vez llevada a cabo la PCR punto final, colocar en el sensor (detector de fluorescencia) Raindance.

Hold Stage	95°C por 10 min
PCR stage x 45 cycles	95°C por 15 s
	60°C por 1 min
Hold	98°C por 10 min

## The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer

Irma G. Domínguez-Vigil<sup>1</sup>, Ana K. Moreno-Martínez<sup>1,2</sup>, Julia Y. Wang<sup>3</sup>, Michael H. A. Roehrl<sup>4</sup> and Hugo A. Barrera-Saldaña<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

<sup>2</sup>Genetics Laboratory, Vitagénesis, Monterrey, Nuevo León, México

<sup>3</sup>Curandis Laboratories, New York, NY, USA

<sup>4</sup>Department of Pathology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

<sup>5</sup>TecSalud, Tecnológico de Monterrey, San Pedro Garza García, Nuevo León, México

**Correspondence to:** Michael H. A. Roehrl, **email:** roehrlm@mskcc.org  
Hugo A. Barrera-Saldaña, **email:** habarrera@gmail.com

**Keywords:** liquid biopsy; cfDNA; ctDNA; early detection; diagnostics

**Received:** October 17, 2017

**Accepted:** November 10, 2017

**Published:** December 08, 2017

**Copyright:** Domínguez-Vigil et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

**Cancer is a molecular disease associated with alterations in the genome, which, thanks to the highly improved sensitivity of mutation detection techniques, can be identified in cell-free DNA (cfDNA) circulating in blood, a method also called liquid biopsy. This is a non-invasive alternative to surgical biopsy and has the potential of revealing the molecular signature of tumors to aid in the individualization of treatments. In this review, we focus on cfDNA analysis, its advantages, and clinical applications employing genomic tools (NGS and dPCR) particularly in the field of oncology, and highlight its valuable contributions to early detection, prognosis, and prediction of treatment response.**

### INTRODUCTION

The U.S. National Cancer Institute (NCI) defines liquid biopsy (LB) as “a test done on a sample of blood to look for cancer cells from a tumor that are circulating in the blood or for pieces of DNA from tumor cells that are in the blood” [1]. In this review, we will primarily focus on the second part of this definition, i.e., the detection of circulating DNA.

The first steps to explore the potential of cell free DNA for genetic testing of cancer were made in 1948, when the first publication of cell-free DNA (cfDNA) and free RNA circulating in human blood appeared [2]. Fast forwarding to today shows that numerous tests based on circulating nucleic acids are in development that – so is the hope – will help to opportunistically discriminate patients with cancer from healthy individuals [3] (Figure 1).

In its beginnings, the application of LB did not generate much attention on the part of the scientific community. A review of the PubMed (NCBI) database, using the search term “liquid biopsy” from 1975 onwards, shows a recent increase in the number of publications, denoting rapidly growing interest in LB (Figure 2).

### Rediscovering LB for diagnostic purposes

To the surprise of many, Osborne *et al.* reported in 2013 the case of a 37-year-old pregnant woman with a normal medical history but a non-invasive prenatal testing (NIPT) result suggestive of aneuploidy for chromosomes 18 and 13. NIPT searches for fetal cfDNA (3–13%) among the maternal cfDNA [4]. After spontaneous labor, a male fetus was born without dimorphic characteristics. The patient’s vaginal biopsy revealed a small cell carcinoma with evidence of aneuploidy in 80% of analyzed cells, including alterations in chromosomes 18 and 13 that were consistent with the NIPT test performed previously. This was the first reported case of detection of cancer in a pregnant woman by cfDNA [5].

### Genome alterations of cancer

Cancer is a pathological condition that encompasses more than 100 distinct disease entities with diverse risk factors and epidemiologic features and that can originate from essentially all cell types and organs of the human body. It is characterized by

a relatively unrestrained proliferation of cells that can invade beyond normal tissue boundaries and metastasize to distant organs [6]. A hallmark of cancer is alterations in the genome. These alterations may be single nucleotide variants (SNVs), promoter methylation, copy number variation (CNVs), chromosomal structural rearrangements, and alterations in sites relevant for transcription, splicing, RNA maturation, or translational efficiency [7].

The International Cancer Genome Consortium (ICGC) and The Genomic Atlas of Cancer (TCGA), which aim to catalog the genomic information of the various types of cancer and foster discoveries that could allow better understanding of cancer origins and development [8], have carried out large-scale research into many different types of cancers in order to determine the genomic signatures of each. For example, mutations in the genes *ERBB2*, *PIK3R1*, *TP53*, and *NF1* stand out in glioblastoma [9]; *TP53*, *NF1*, *BRCAl*, *BRCA2*, *RBI*, *GABRA6*, *CSMD3*, *FAT3*, and *CDK12* alterations characterize ovarian cancer [10]; *TP53*, *P TEN*, *CTN NB1*, *PIK3CA*, *ARID1A*, *KRAS*, *ARID5B*, and *POLE* mutations are features of endometrial cancer [11]; *TP53*, *RAS*, *EGFR*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MET*, *RIT1*, *STK11*, *KEAP1*, *NF1*, *RBI*, *CDKN2A*, *SETD2*, *ARID1A*, *SMARCA4*, *RBM10*, *U2AF1*, and *MGA* are hallmarks of lung cancer [12]. These studies were made possible with next generation sequencing (NGS) technology that has the advantage of simultaneously analyzing a large number of genes related to a specific phenotype, allowing the identification of mutations that are otherwise not easily detected [13]. One of the main advantages of NGS is that it allows global determination the molecular subtype of the disease (via large gene panel, exome, or even whole genome sequencing). It also makes monitoring progression of the disease and assigning targeted molecular therapies easier [8].

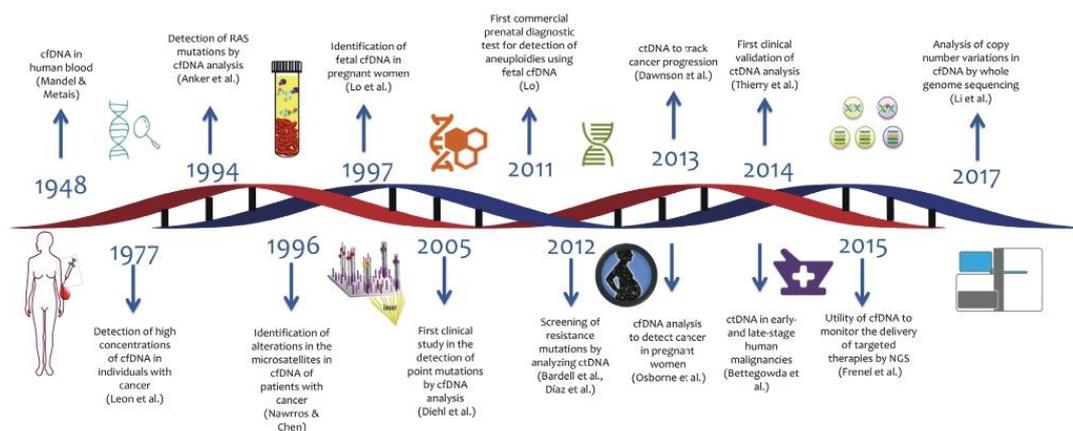
## Liquid biopsy in cancer

Cancer is often found in organs or tissues of the body that are difficult to access, such as brain, ovaries, or pancreas. Thus measurements of tissue-resident biomarkers for such cancers may be difficult or associated with significant clinical risk, such as bleeding or infection as consequence of an invasive biopsy or excisional procedure [14].

Surgical biopsies (SB) continue to dominate as the “gold standard” for diagnosis and choice of treatment for diseases of genetic and contagious origin. However, they also present disadvantages. Among them is the fact that tumor tissue sampling delivers only a static and spatially limited representation from the time of the surgical procedure. Cancers, however, vary over time due to continuous changes that result in genetic heterogeneity within the tumor and between the primary and metastatic sites (a characteristic typical of cancers in advanced stages). In addition, the majority of biopsies are commonly fixed in formalin and embedded in paraffin for routine pathology, which can reduce their utility for advanced molecular analyses [15]. Some of these disadvantages can be addressed with the implementation of LB.

LB holds great promise for detection, prognosis, and prediction of response to cancer treatment [16–18]. Among the main sources of LB-based biomarkers are circulating tumor DNA (ctDNA), circulating tumor cells (CTCs), exosomes, and microRNAs. ctDNA currently leads applications for diagnostic purposes, and, for this reason, it is the main subject of this review.

While we do not anticipate that LB will fully replace or directly compete with SB for most diagnostic purposes any time soon, we do very much foresee that LB will complement SB rapidly within the next 3–5 years and will become a tool of choice for dynamic monitoring of patients on treatment or under active surveillance. In



**Figure 1: Timeline of liquid biopsy development.**

many instances, LB will also prompt further imaging workup and/or re-biopsy of tissue lesions. A frequently cited advantage is that obtaining LB fluids is much less invasive than SB or even imaging studies [19]. Scientific studies have increasingly provided evidence of the utility of LB for early diagnosis. ctDNA has been detected in up to 75% of pancreatic, ovarian, colorectal, bladder, breast, neck, hepatocellular, and gastroesophageal cancers and melanomas and in up to 50% of primary CNS, renal, prostatic, and thyroid cancers [17]. It has also been associated with metastatic burden in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC), among other tumors [19].

LB has thus, a wide potential of clinical applications and affords physicians a new tool for clinical management of difficult to treat patients with advanced stage cancers, prediction of treatment response, detection of recurrence, and traceability of tumor genome evolution over time [20, 21]. Studies demonstrate that ctDNA can be used in the routine management of lung cancer to monitor clonal evolution and identify treatment resistance [19, 22], particularly in patients with NSCLC who are treated with specific tyrosine kinase inhibitors (TKIs, such as gefitinib, erlotinib, crizotinib, and ceritinib) [19]. Nearly half of NSCLC patients acquire resistance to TKIs and present *EGFR* T790M mutations; consequently, a second biopsy is required. Indeed, the European Society for Medical Oncology (ESMO) suggested LB as an alternative to tissue re-biopsy and

presented LB as a validated method for monitoring progression of *EGFR* mutated patients [23, 24].

Figure 3 contrasts some of the advantages of LB relative to SB. LB can meaningfully augment SB by potentially sampling tumor heterogeneity more comprehensively and by revealing the dynamics of molecular changes of cancer cells while the patient is undergoing treatment [21].

LB has thus a wide potential of clinical applications and affords physicians with a new tool for clinical management of difficult to treat patients with advanced stage cancers, for prediction of response to treatment, for detection of recurrence, and for traceability of tumor genome evolution over time [20, 21].

### Circulating tumor DNA (ctDNA)

DNA is continuously released in fragments into the circulation through processes such as apoptosis and necrosis by both normal and cancerous cells [21, 25–27]. When released irrespective of cell of origin, it is typically referred to as cfDNA (cell-free DNA); but when released specifically by cancer cells, it is mostly referred to as ctDNA (circulating tumor DNA). Among the molecular characteristics of ctDNA are that it may harbor mutations, CNVs, methylation changes, or integrated viral sequences associated with the tumor [28–32]. ctDNA is mainly found in plasma and serum; however, it can also be isolated from ascites, breast

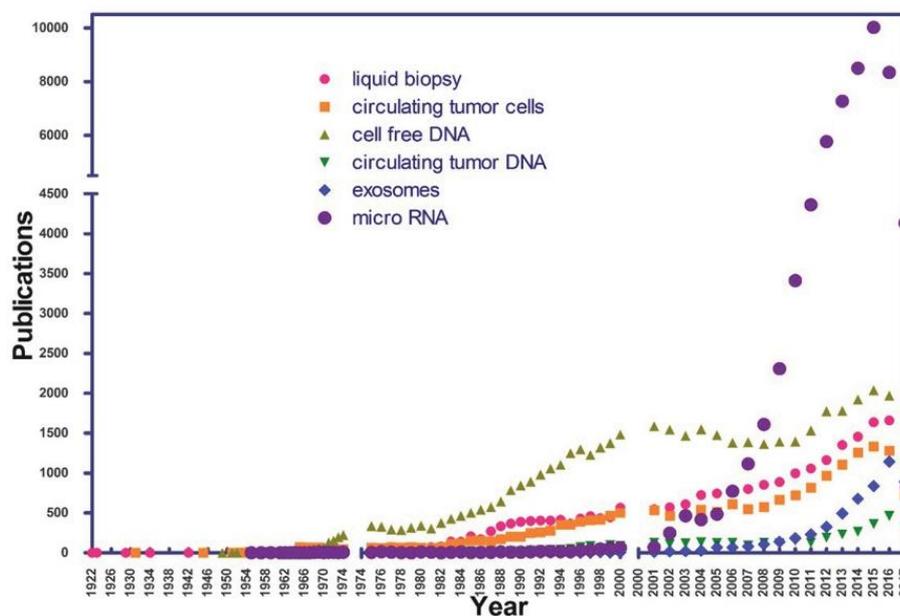


Figure 2: Number of publications per year in PubMed, using the terms “liquid biopsy”, “cell free DNA”, “circulating tumor DNA”, “exosomes”, “micro RNA”, and “circulating tumor cells” as of July 1, 2017.

milk, lymphatic and peritoneal fluids, bone marrow aspirates, urine, prostatic fluid, peritoneal lavage, sputum, cerebrospinal fluid, gastric juice, and biliary and even stool samples [33]. Circulating nucleic acids are removed from the blood by the liver and kidney and have variable circulating half-lives ranging from 15 minutes to several hours [27, 34]. The concentrations of this genetic material in patients with cancer range from 0 to 1,000 ng/mL of blood, with an average of 180 ng/mL. In contrast, cfDNA in healthy subjects ranges from 0 to 100 ng/mL of blood, with an average of 30 ng/mL [27]. As a reference, a patient with a tumor burden of 100 g released 3.3% of ctDNA into the circulation [35].

In colorectal cancer, it has been found that ctDNA is more sensitive than the detection of serum protein biomarkers such as carcinoembryonic antigen (CEA), showing tighter changes in response to tumor resection and a greater predictive capacity for recurrence. In 2014, Bettgowda *et al.* [36] detected mutations in the *KRAS* gene of plasma ctDNA in a group of 206 patients with colorectal cancer, with a sensitivity of 87.2% and a specificity of 99.2%.

#### Other source of LB-based biomarkers

##### Circulating tumor cells (CTCs)

CTCs have been discovered for Asworth in 1869 during an autopsy of a patient who had metastatic cancer [37]. They are cancer cells that detach from a primary or metastatic tumor site and are present in the circulation. Clinical evidence indicates that patients with metastases have 1–10 CTCs per mL of blood and they are rarely found in clinically healthy people or in people with non-malignant tumors. CTCs have been detected in different types of cancers, such as breast, ovarian, prostate, lung, colorectal, hepatocellular, pancreatic, head and neck, bladder, and melanoma [38]. There are commercial systems for their detection and isolation, of which the most used is the CellSearch® system, an automated detection system for CTCs that uses anti-EpCAM antibodies, anti-CK antibodies, and anti-CD45 antibodies. CTCs are associated with a poor prognosis and are predictive of shorter progression-free survival and overall survival in patients treated with metastatic breast, colorectal, or prostate cancers who have CTC counts of  $\geq 5$ ,  $\geq 3$ , or  $\geq 5$ , respectively, per 7.5 mL of blood at any time during the course of the disease [39–41]. However, CTCs are often not detectable in patients with dysplastic or early malignant lesions, thus limiting their utility for early diagnosis or surveillance [42]. Besides their detection and isolation, CTCs can be cultured *in vitro* and to expand *ex vivo* for further analyses [43–46].

##### Exosomes

Exosomes are small round vesicles, 30–120 nm in diameter, and of endosomal origin carrying RNA,

miRNAs, DNA, and proteins that are released by multiple cell types (including tumor cells) into the extracellular environment. Exosomes may mediate some form of communication between cells, being internalized by other cells [42, 47, 48]. They are found in biological fluids like blood, urine, saliva, pleural effusions, amniotic fluid, nasal secretions, bronchoalveolar lavages, cerebrospinal fluid, breast milk, and ascites [49–51]. Special features of exosomes have been associated with several types of cancer, such as pancreatic [52, 53], breast [54], gastric [55] colon [56], and ovarian [57].

##### miRNAs

MicroRNAs or miRNAs are small molecules of non-coding RNA, between 19 and 24 nucleotides in length, that act as regulatory molecules of gene expression, exerting function by hybridizing to inhibit the translation of mRNAs of its target genes [58–60]. Differential expression of miRNAs in patients with cancer has been described. miRNAs like those of the Let-7 family have been associated with lung cancer [61, 62]; miR15a/miR16a with chronic lymphocyte leukemia [63]; miR-34 family to neuroblastoma and colon cancer [64, 65]; miR-17–92 cluster with B-cell lymphoma, breast, colon, lung, stomach, prostate, and pancreatic cancers [66–68]; miR-21 with hepatocellular and breast cancer [69, 70]; miR-155 with diffuse large B-cell lymphoma and colorectal cancer [71, 72]; miR372/miR373 with testicular germ cell tumor [73]; and the miR-200 family with ovarian cancer [74]. In 2008, Mitchell *et al.* [75] showed that miRNAs may be ideal blood-based cancer biomarkers for three main reasons: 1) Expression of miRNAs is found frequently deregulated in cancer; 2) the expression patterns of miRNAs in cancer appear to be specific; and 3) miRNAs are usually highly stable in tissues fixed with formalin and, possibly, also in plasma or serum.

Based on this evidence as a whole, the expression levels of individual miRNAs and miRNA signatures are now linked to classification and prognosis of several human cancers.

#### LB technology in the market

Several companies have been adapting genetic variation identification panels to include LB-based ctDNA as an input option. Boreal Genomics [76], Trovogene [77], RainDance Technologies [78, 79], Invitae [80], and Pathway Genomics [81] are examples of companies working on this technology (Table 1). Another example is Illumina's spin-off Grail that started in 2016 with the aim of developing an LB-based pan-cancer "molecular stethoscope."

##### Pre-analytical considerations of LB

In 2013, Messaoudi *et al.* [82] indicated that one of the main obstacles for the use of cfDNA in clinical

**Table 1: Examples of LB panels in the market**

Name of Panel	Company	Genes Analyzed	Reference
OnTarget	Boreal Genomics	Can include up to 100 mutations across multiple genes ( <i>not listed</i> )	76
Trovera	Trovogene	<i>EGFR, KRAS, and BRAF</i>	77
ThunderBolts Cancer Panel	RainDance Technologies	<i>ABL1, EGFR, GNAQ, KRAS, PTPN11, RBL1, MET, GNAS, ERBB2, AKT1, ALK, ERBB4, HNF1A, MLH1, RET, APC, EXH2, HRAS, MPL, SMAD4, ATM, FBXW7, IDH1, NOTCH1, SMARCB1, SMO, NPM1, IDH2, FGFR1, BRAF, CDH1, FGFR2, JAK2, NRAS, SRC, SKT11, PDGFRA, JAK3, FGFR3, CDKN2A, CSF1R, FLT3, KDR, PIK3CA, TP53, VHL, PTEN, KIT, GNA11, and CTNNB1</i>	78
ThunderBolts Myeloid Panel	RainDance Technologies	<i>ASXL1, BCOR, BCOR1, BRAF, CALR, CBL, CBLB, GATA1, FLT3, EZH2, ETV6, DNMT3A, CSF3R, CEBPA, GATA2, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KDM6A, KIT, KMT2A/MLL-PTD, KRAS, MEK1, MPL, PTEN, PML, PHF6, NRAS, NPM1, NOTCH1, MYD88, PTPN11, RAD21, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SMC1A, MSC3, ZRSR2, WT1, U2AF1, TP53, TET2, STAG2, and SRSF2</i>	79
InVision	Inviata	<i>AKT1, ALK, BRAF, CCND1, CDKN2A, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFG3, GATA3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, MYC, NFE2L2, NRAS, NTRK1, PDGFRA, PIK3CA, PPP2R1A, PTEN, STK11, TP53, and U2AF1</i>	80
CancerIntercept Detect/ Monitor	Pathway Genomics	<i>BRAF, CTNNB1, EGFR, FOXL2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA, and TP53</i>	81

practice is the heterogeneity of the various protocols for the manipulation and analysis of cfDNA. There are complex pre-analytical and analytical considerations to be taken into account when planning cfDNA analyses. Such considerations range from sample collection to interpretation of findings.

Among pre-analytical variables, the blood collection tube used is an important consideration, as it needs to provide the necessary conditions for the stability of the cfDNA [83]. There are several collection tubes on the market as illustrated in Figure 3A. One of the applications in which this is especially critical, because of the need for long-term stable cfDNA, is in studies (such as multicenter clinical trials) in which blood samples are sent for analysis to a laboratory in another region.

Plasma processing is another pre-analytical factor to consider. Messaoudi and colleagues report that performing a double centrifugation during plasma isolation is ideal for minimizing contaminating nuclear DNA from white

cells that otherwise would contaminate and dilute true cfDNA [82]. Double centrifugation has thus become the current gold standard for prospective plasma biobanking (Figure 3B).

The choice of procedure for the extraction and purification of cfDNA is, however, the most important pre-analytical factor to be taken into account. For this, a wide variety of kits exist that allow isolating cfDNA from several sources, particularly from plasma. In Figure 3C, some of the popular commercially available kits for the extraction and purification of cfDNA, based on the separation by silica columns or by magnetic beads, are listed. Once the genetic material is isolated, it is necessary to perform an analysis to confirm the quality of the sample. For this, the companies producing the extraction and purification kits offer various quality control methodologies as indicated in Figure 3D. The choice of reagents and equipment to be used will depend to a great extent on availability, accessibility, budget,

analytical sensitivity, and final readout desired (such as end-point PCR, real-time PCR, digital PCR (dPCR), microarrays, or NGS).

Finally, storage and freezing conditions of ctDNA need to be considered (Figure 3E). Our own data shows that storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ , and in vapor phase liquid nitrogen (below  $-150^{\circ}\text{C}$ ) are equivalent once the DNA has been extracted. Long-term stability of ctDNA in plasma and serum that is frozen prior to extraction remains to be studied.

### Analytical possibilities of LB

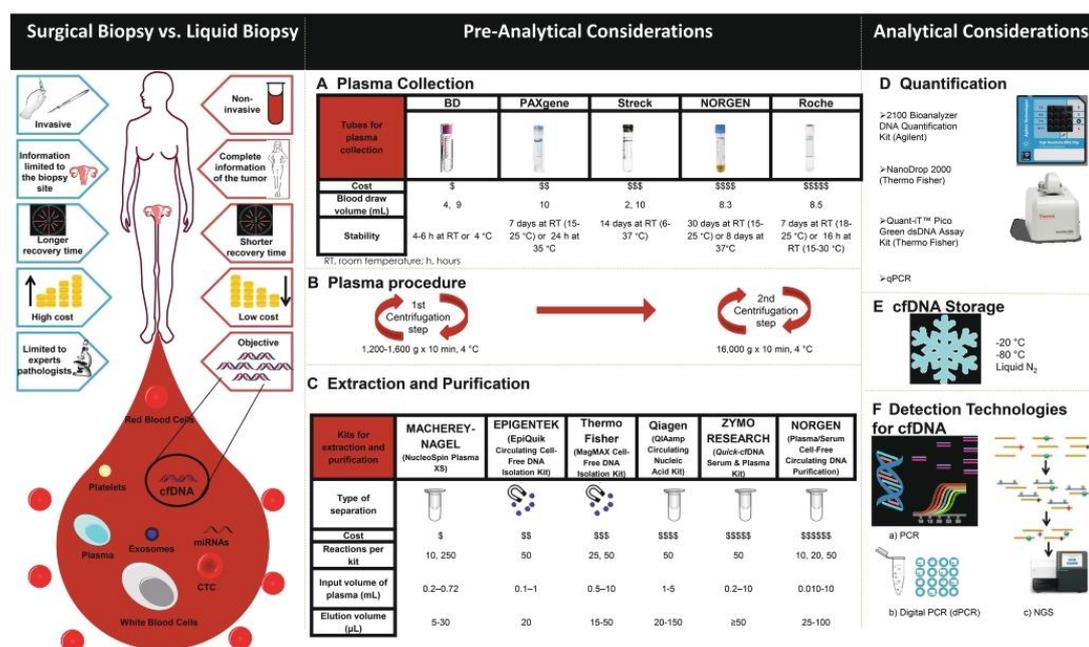
The methods for ctDNA analysis can be divided into point mutations analysis; detection of somatic mutations as biomarkers and whole genome analysis (WGA); and detection of rearrangements and chromosomal copy-number changes (Table 2; Figure 3F) [84].

In point mutations analysis, qPCR, dPCR, and targeted sequencing can be included; these technologies are highly sensitive ( $< 1\%$ ) and allow detection of a low tumor fraction in plasma DNA, while WGA can be used in high tumor fraction situations (sensitivity  $> 10\%$ ) [17]. In this sense, the best options for diagnosis are methodologies based on PCR since they allow detection of low levels of ctDNA. NGS methodologies are increasing the sensitivity and throughput necessary for diagnostic ctDNA analysis [85].

### Potential limitations of LB

While LB is doubtlessly an extremely powerful addition to the diagnostic tool set, the approach also suffers from several technology-inherent limitations that need to be discussed and considered.

First, LB may have lower sensitivity than SB for rare variants. This is because LB attempts detection of alterations in peripheral fluids rather than the tumor itself (volume dilution) and in a background of non-altered ctDNA from cellular sources other than the tumor (for example, in a patient with other co-morbidities such as sepsis, abundant ctDNA may be circulating that is derived from non-cancerous cell compartments). Second, while LB may be able to pick up heterogeneity (via ultra-deep NGS of ctDNA), tracing tumor heterogeneity back to multiple simultaneous lesions (e.g., primary vs. multiple metastatic sites) and pinpointing which clones dominate which site may be close to impossible without combining LB with smartly targeted SB procedures. In addition, it is plausible that various distinct lesions in a patient would each shed variable amounts of ctDNA and thus LB would not just be a volume-proportional mixture of contributing lesions (thus making the heterogeneity problem even harder to untangle). Some lesions, e.g., brain metastases, may shed little to no ctDNA into the circulation. Finally, LB could potentially pick up physiologically continuously occurring



**Figure 3:** Comparison of features between surgical (tissue-based) and liquid biopsies (left) and overview of the various elements of the liquid biopsy workflow (A-F, right).

**Table 2: Comparison of methodologies for ctDNA analysis**

Method	Technology	Sensitivity	Type of Alteration
qPCR	ARMS-Scorpions PCR	0.05–0.1%	Known point mutation
	Clamping PCR	0.1–1%	
	TaqMan	0.1–1%	
Digital PCR	Beaming	0.01%	
	ddPCR	0.001%	
Target sequencing	TAm-Seq	>2%	Point mutations in gene regions; structural alterations in gene regions
	SAFE-SeqS	0.1%	
	CAPP-Seq	0.01%	
Whole genome sequencing	Digital karyotyping	0.001%	Genome-wide copy-number changes; personalized genome-wide rearrangements
	PARE	0.001%	

ARMS, amplification refractory mutation system; BEAMing, beads, emulsion, amplification, magnetics; CAPP-Seq, cancer personalized profiling by deep sequencing; ddPCR, droplet digital PCR; PARE, parallel analysis of RNA ends; qPCR, quantitative PCR; SAFE-SeqS, safe-sequencing system; TAm-Seq, tagged-amplicon deep sequencing.

but clinically inconsequential mutational events in other high turnover compartments, such as the bone marrow. This would further complicate the interpretation of rare alleles detected by ultra-deep sequencing of ctDNA.

#### Evolutional analysis of cancer by ctDNA

Besides the benefits mentioned previously, LB may also allow for evolutional analysis of cancer in real time. The subclonal dynamics of ctDNA has been characterized in several studies, which demonstrate that ctDNA can be used to detect emergence of resistance to treatment [86–88]. LB has allowed to carry out studies on frequency, identity, and evolution of subclonal genetic alterations that had previously been very limited due to the difficulty of serially accessing tumor tissue [88, 89]. Abbosh *et al.* performed a phylogenetic subclone analysis in NSCLC employing ctDNA over a period of 231 days and identified single nucleotide variations (SNV) that had not been identified in the primary tumor, suggesting that ctDNA can be used when subclones of the primary tumor are found in low quantities. In addition they analyzed patients who had liver metastases in which subclones were identified originating in the primary pulmonary tumor [88]. Furthermore, they were able to associate the ctDNA with the histological type of the tumor. Imamura *et al.* determined that ctDNA is a specific tumor marker for assessing the response to treatment and the molecular dynamics of NSCLC-related oncogenes [90].

#### Summary

LB is at the dawn of a new era of cancer “theranostics”, being a non-invasive addition to SB. LB is capable of generating valuable information about cancer almost in real time that can be used to reveal the

genetic features of individual tumors, thus improving early detection, prognostication, and monitoring treatment responses and eventual resistance. We have reviewed the current state of the art of LB-related analytics and provide an outlook of its clinical utility.

#### Author contributions

Ima Guadalupe Domínguez-Vígil: Conceptualization, writing – review and editing. Ana Karen Moreno-Martínez: Writing – review and editing. Julia Y. Wang: Writing – review and editing. Michael H. A. Roehrl: Writing – review and editing, funding acquisition, and responsible for the overall content. Hugo Alberto Barrera-Saldaña: Conceptualization, writing – review and editing, funding acquisition, and responsible for the overall content.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Victor Hugo Barajas Olmos for structural design of this review and Sergio Lozano-Rodríguez, M.D., and Michael Dean, Ph.D., for their critical reading of the manuscript.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors have no disclosures.

#### FUNDING

This work was supported by the CONACYT's Great National Health Problems Grant (#247850) to HABS. MHAR acknowledges research funding from Memorial Sloan Kettering Cancer Center, the Farmer Family Foundation, and the Parker Institute for Cancer

Immunotherapy. This research was funded in part through the NIH/NCI Cancer Center Support Grant P30 CA008748.

## REFERENCES

1. National Cancer Institute. Definition of liquid biopsy - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute.
2. Mandel P, Metais P. [Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme]. [Article in French]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948; 142:241–3.
3. McLarty JL, Yeh CH. Circulating cell-free DNA: The blood biopsy in cancer management. *Cell Sci Rep.* 2015; 2:00021.
4. Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. *Obs Gynecol.* 2015; 126: e31–e37.
5. Osborne CM, Hardisty E, Devers P, Kaiser-Rogers K, Hayden MA, Goodnight W, Vora NL. Discordant noninvasive prenatal testing results in a patient subsequently diagnosed with metastatic disease. *Prenat Diagn.* 2013; 33:609–11.
6. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009; 458:719–24.
7. Russo A, Rolfo C, Passiglia F, Rosell R. Targeted Therapies for Non-Small Cell Lung Cancer. In: Russo A, Rosell R, Rolfo C, Editors. *Targeted Therapies for Solid Tumors: A Handbook for Moving Toward New Frontiers in Cancer Treatment.* New York: Humana Press; 2015. pp. 89–101.
8. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-Generation Sequencing for Cancer Diagnostics: a Practical Perspective. *Clin Biochem Rev.* 2011; 32:177–95.
9. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008; 455:1061–8.
10. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011; 474:609–15.
11. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013; 497:67–73.
12. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014; 511:543–50.
13. Chin EL, da Silva C, Hegde M. Assessment of clinical analytical sensitivity and specificity of next-generation sequencing for detection of simple and complex mutations. *BMC Genet.* 2013; 14:6.
14. Ko J, Carpenter E, Issadore D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *Analyst.* 2015; 141:450–60.
15. Kerick M, Isau M, Timmermann B, Stültmann H, Herwig R, Krobtsch S, Schaefer G, Verdorfer I, Bartsch G, Klocker H, Lehrach H, Schweiger R. Targeted high throughput sequencing in clinical cancer Settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. *BMC Med Genomics.* 2011; 4: 68.
16. Cree IA. Liquid biopsy for cancer patients: Principles and practice. *Pathogenesis.* 2015; 2:1–4.
17. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem.* 2015; 61:112–23.
18. Lewis AR, Valle JW, McNamara MG. Pancreatic cancer: Are “liquid biopsies” ready for prime-time? *World J Gastroenterol.* 2016; 22:7175–85.
19. Rolfo C, Castiglia M, Hong D, Alessandro R, Mertens I, Baggerman G, Zwaenepoel K, Gil-Bazo I, Passiglia F, Carreca AP, Taverna S, Vento R, Santini D, et al. Liquid biopsies in lung cancer: The new ambrosia of researchers. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1846:539–46.
20. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013; 10:472–84.
21. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology.* 2014; 32:579–86.
22. Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, James D, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017; 17:223–38.
23. Zheng D, Ye X, Zhang MZ, Sun Y, Wang JY, Ni J, Zhang HP, Zhang L, Luo J, Zhang J, Tang L, Su B, Chen G, et al. Plasma EGFR T790M cDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Sci Rep.* 2016; 6:20913.
24. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, Kerr K, Popat S, Reck M, Senan S, Simo GV, Vansteenkiste J, Peters S. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016; 27(Suppl 5): v1–v27.
25. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 906:161–8.
26. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov.* 2016; 6:479–91.
27. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11:426–37.
28. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget.* 2016; 7:48832–41. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9453>.
29. Li J, Dittmar RL, Xia S, Zhang H, Du M, Huang CC, Druliner BR, Boardman L, Wang L. Cell-free DNA copy number variations in plasma from colorectal cancer patients. *Mol Oncol.* 2017; 11:1099–111.
30. Soave A, Chun FK, Hillebrand T, Rink M, Weisbach L, Steinbach B, Fisch M, Pantel K, Schwarzenbach H.

- Copy number variations of circulating, cell-free DNA in urothelial carcinoma of the bladder patients treated with radical cystectomy: A prospective study. *Oncotarget*. 2017; 8:56398–407. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17657>.
31. Husain H, Nykin D, Bui N, Quan D, Gomez G, Woodward B, Venkatapathy S, Duttagupta R, Fung E, Lippman SM, Kurzrock R. Cell-free DNA from ascites and pleural effusions: Molecular insights into genomic aberrations and disease biology. *Mol Cancer Ther*. 2017; 16:948–55.
  32. Li Z, Guo X, Tang L, Peng L, Chen M, Luo X, Wang S, Xiao Z, Deng Z, Dai L, Xia K, Wang J. Methylation analysis of plasma cell-free DNA for breast cancer early detection using bisulfite next-generation sequencing. *Tumour Biol*. 2016; 37:13111–9.
  33. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-A survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1775:181–232.
  34. Siravegna G, Bardelli A. Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance. *Genome Biol*. 2014; 15:449.
  35. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:16368–73.
  36. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubner B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014; 6:224ra24.
  37. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *The Australian Medical Journal*. 1869; 14:146–9.
  38. Lianidou ES, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014; 51:160–71.
  39. Pantel K, Alix-Panabières C. Detection methods of circulating tumor cells. *J Thorac Dis*. 2012; 4:446–7.
  40. Park Y, Kitahara T, Urita T, Yoshida Y, Kato R. Expected clinical applications of circulating tumor cells in breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2011; 2:303–10.
  41. CellSearch. CellSearch Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial) User's Guide. 2013.
  42. Brock G, Castellanos-Rizaldos E, Hu L, Coticchia C, Skog J. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Transl Cancer Res*. 2015; 4:280–90.
  43. Pantel K, Alix-Panabières C. Cell lines from circulating tumor cells. *Oncoscience*. 2015; 2:1–2. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.195>.
  44. Kolostova K, Spicka J, Matkowski R, Bobek V. Isolation, primary culture, morphological and molecular characterization of circulating tumor cells in gynecological cancers. *Am J Transl Res*. 2015; 7:1203–13.
  45. Kolostova K, Zhang Y, Hoffman RM, Bobek V. *In vitro* culture and characterization of human lung cancer circulating tumor cells isolated by size exclusion from an orthotopic nude-mouse model expressing fluorescent protein. *J Fluoresc*. 2014; 24:1531–6.
  46. Maheswaran S, Haber DA. Ex vivo culture of CTCs: An emerging resource to guide cancer therapy. *Cancer Res*. 2015; 75:2411–5.
  47. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9:654–9.
  48. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen XM, Xu YM, Huang LF, Wang XZ. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *Sci World J*. 2015; 2015:657086.
  49. Sheridan C. Exosome cancer diagnostic reaches market. *Nat Biotechnol*. 2016; 34:359–60.
  50. Vami I, Alama A, Grossi F, Dal Bello MG, Coco S. Exosomes: A new horizon in lung cancer. *Drug Discov Today*. 2017; 22:927–36.
  51. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2:20360.
  52. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, Reissfelder C, Pilarsky C, Fraga MF, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015; 523:177–82.
  53. An M, Lohse I, Tan Z, Zhu J, Wu J, Kurapati H, Morgan MA, Lawrence TS, Cuneo KC, Lubman DM. Quantitative proteomic analysis of serum exosomes from patients with locally advanced pancreatic cancer undergoing chemoradiotherapy. *J Proteome Res*. 2017; 16:1763–72.
  54. Ning K, Wang T, Sun X, Zhang P, Chen Y, Jin J, Hua D. UCH-L1-containing exosomes mediate chemotherapeutic resistance transfer in breast cancer. *J Surg Oncol*. 2017; 115:932–40.
  55. Pan L, Liang W, Fu M, Huang ZH, Li X, Zhang W, Zhang P, Qian H, Jiang PC, Xu WR, Zhang X. Exosomes-mediated transfer of long noncoding RNA ZFAS1 promotes gastric cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017; 143:991–1004.
  56. Tsukamoto M, Iinuma H, Yagi T, Matsuda K, Hashiguchi Y. Circulating exosomal microRNA-21 as a biomarker in each tumor stage of colorectal cancer. *Oncology*. 2017; 92:360–70.
  57. Hu Y, Li D, Wu A, Qiu X, Di W, Huang L, Qiu L. TWEAK-stimulated macrophages inhibit metastasis of epithelial ovarian cancer via exosomal shuttling of microRNA. *Cancer Lett*. 2017; 393:60–7.
  58. Frontela Noda M. [MicroRNAs in cancer: from research to clinical practice]. [Article in Spanish]. *Rev Cubana Med*. 2012; 51:325–35.

59. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res.* 2011; 717:85–90.
60. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol.* 2009; 112:55–9.
61. Xie P, Li X, Tan X, Sun X, Wang C, Yu J. Sequential serum let-7 is a novel biomarker to predict accelerated repopulation during fractional radiotherapy in lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2016; 17: e95–e101.
62. Shen LQ, Xie YZ, Qian XF, Zhuang ZX, Jiao Y, Qi XF. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of let-7 family is associated with lung cancer risk in Chinese. *Genet Mol Res.* 2015; 14:4505–12.
63. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:13944–9.
64. Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2007; 26:5017–22.
65. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:15472–7.
66. Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell.* 2008; 133:217–22.
67. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005; 65:9628–32.
68. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hemando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005; 435:828–33.
69. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology.* 2007; 133:647–58.
70. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008; 283:1026–33.
71. Zhu FQ, Zeng L, Tang N, Tang YP, Zhou BP, Li FF, Wu WG, Zeng XB, Peng SS. MicroRNA-155 downregulation promotes cell cycle arrest and apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Res.* 2016; 24:415–27.
72. Zhang XF, Tu R, Li K, Ye P, Cui X. Tumor suppressor PTPRJ is a target of miR-155 in colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2017; 118:3391–400.
73. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell.* 2006; 124:1169–81.
74. Kan CW, Hahn MA, Gard GB, Maidens J, Huh JY, Marsh DJ, Howell VM. Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2012; 12:627.
75. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:10513–8.
76. Boreal Genomics. OnTarget Mutation Detection Panels. 2017.
77. Trovogene Diagnostics. Trovera. 2017.
78. RainDance Technologies. ThunderBolts Cancer Panel. 2017.
79. RainDance Technologies. ThunderBolts Myeloid Panel. 2017.
80. Inviata. Invision. 2017.
81. Pathway Genomics. Cancer Monitoring Liquid Biopsy Blood Testing. 2017.
82. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta.* 2013; 424:222–30.
83. Spindler KL. Methodological, biological and clinical aspects of circulating free DNA in metastatic colorectal cancer. *Acta Oncol (Madr).* 2017; 56:7–16.
84. Haber D, Velculescu V. Blood-based analysis of cancer: Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov.* 2014; 4:650–61.
85. He Q, Johnston J, Zeitlinger J, City K, City K. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2015; 33:395–401.
86. Wang W, Song Z, Zhang Y. A comparison of ddPCR and ARMS for detecting EGFR T790M status in ctDNA from advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Cancer Med.* 2017; 6:154–62.
87. Imamura F, Uchida J, Kukita Y, Kumagai T, Nishino K, Inoue T, Kimura M, Oba S, Kato K. Monitoring of treatment responses and clonal evolution of tumor cells by circulating tumor DNA of heterogeneous mutant EGFR genes in lung cancer. *Lung Cancer.* 2016; 94:68–73.
88. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, Le Quesne J, Moore DA, Veeriah S, Rosenthal R, Marafioti T, Kirkizlar E, Watkins TB, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early stage lung cancer evolution. *Nature.* 2017; 545:446–51.
89. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, et al. Evolution

- and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013; 152:714–26.
90. Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Arita T, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Ikoma H, Okamoto K, et al. Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol*. 2016; 22:5627–41.

## Comparison of Automated and Manual DNA Isolation Methods of Liquid-Based Cytology Samples

Irma G. Domínguez-Vigil,<sup>1,2</sup> Víctor H. Barajas-Olmos,<sup>1</sup> Lenny Gallardo-Alvarado,<sup>3</sup>  
Antonio A. Pérez-Maya,<sup>1</sup> María L. Garza-Rodríguez,<sup>4</sup> Gerardo I. Magallanes-Garza,<sup>5</sup>  
Servando Cardona-Huerta,<sup>5</sup> Daniel H. Méndez-Lozano,<sup>6</sup> Oscar Vidal-Gutiérrez,<sup>4</sup>  
David F. Cantú De León,<sup>3</sup> and Hugo A. Barrera-Saldaña<sup>1,7,8</sup>

Liquid-based cytology (LBC) has been used as a diagnostic tool for cervical cancer for years and is now being adopted for other gynecological cancers. LBC represents an important challenge to ensure that the process yields representative biospecimens for quality control (QC) of diagnostic procedures. In this study, we compare QC parameters (integrity, yield and purity, and polymerase chain reaction [PCR] amplification) of DNA isolated from LBC ( $N=296$ ) using two different nucleic acid isolation methods, manual ( $n=233$ ) or automated ( $n=63$ ). We also evaluated two different types of cytological brushes for sampling from the cervix. Our results suggest that manual isolation (yield  $22.81 \pm 1.92 \mu\text{g}$ ) resulted in increased DNA recovery when compared with automated isolation (yield  $9.96 \pm 1.11 \mu\text{g}$ ) from LBC samples, with a  $p$ -value of  $<0.0003$ . We estimated that 98% (53/54) of the samples preserved the integrity of DNA and were suitable for standard molecular biology analyses. The  $\beta$ -globin gene was amplified in 100% (296/296) of the DNA samples by endpoint PCR. We found no significant difference between the performance of the cytological brushes ( $p$  value of  $<0.6711$ ) in a general overview. However, when looking at the results from using each brush individually, the manual isolation method was statistically superior to the automated method. Our work illustrates the impact of good QC of preanalytic conditions, which will be important for the application of LBC for developing early detection methods for gynecological cancers.

**Keywords:** cervical cancer, liquid-based cytology, nucleic acids, quality control, biobank, biomarker

### Introduction

THE PAP SMEAR HAS been a highly effective screening tool in the diagnosis of cervical cancer (CC)<sup>1</sup> since its development by George Papanicolaou more than 70 years ago.<sup>2</sup> More recently, this technique has been modified into a liquid-based Pap smear or liquid-based cytology (LBC) to improve early detection, reduce false-negative rates, and simplify quality control (QC) that is demanded by conventional cervical cytology.<sup>3</sup> These modifications also offer advantages extending to multiple slide preparation, the in-

corporation of special stains (immunohistochemistry), human papillomavirus (HPV) detection through DNA testing,<sup>1</sup> and even the potential to detect other gynecological malignancies, most notably, endometrial and ovarian cancers.<sup>4,5</sup>

QC represents an important challenge in ensuring representative biospecimens for diagnostic purposes and is a prerequisite for performing biomarker discovery.<sup>6,7</sup> Currently, the scientific community is not focused solely on the final results of investigations based on biospecimens but is more concerned with preanalytical conditions.<sup>8</sup> QC in both the preanalytical and analytical phases is critical to guarantee reproducible and

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL, Mexico.

<sup>2</sup>Laboratory for Translational Research, Rudy L. Ruggles Biomedical Research Institute, Western Connecticut Health Network, Danbury, Connecticut.

<sup>3</sup>Subdirección de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, Mexico.

<sup>4</sup>Servicio de Oncología, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González," Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico.

<sup>5</sup>Tecnológico de Monterrey, Hospital San José, Monterrey, NL, Mexico.

<sup>6</sup>Tecnológico de Monterrey, Hospital Zambrano Hellion, San Pedro Garza García, NL, Mexico.

<sup>7</sup>Mexican Biobanks Network at Vitagenesis, SA.

<sup>8</sup>National Laboratory of Specialized Services of Research, Development, and Innovation for Chemical and Biotechnological Drugs at Innbiogem, SC, Monterrey, Mexico.

© Irma G. Domínguez-Vigil et al., 2019; Published by Mary Ann Liebert, Inc. This Open Access article is distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

reliable results. Procedures have been developed to guarantee the quality of conventional biopsies, such as blood (including plasma and serum), saliva, cerebrospinal fluid, synovial fluid, urine, semen, and surgical tissues.<sup>9</sup>

The field of gynecologic oncology is now poised to experience a further diagnostic revolution following the seminal work of Kinde et al., who merged next-generation sequencing (NGS) with LBC for early disease detection.<sup>4</sup> Since LBC is a noninvasive sampling method with minimal inconvenience for the patients, it offers advantages over more invasive methods, with the overarching potential of using LBC as a preliminary material for biomarker discovery/validation in endometrial and ovarian cancers.

The objective of this study was to compare QC parameters of the DNA extracted and purified from LBC samples obtained using two types of cervical brushes in common use and treated with two different nucleic acid isolation methods.

## Materials and Methods

### Patient enrollment and consent

All women were invited to participate in the research project and an interview was performed. Once the patients agreed to participate, an informed consent form was signed and study enrollment proceeded. All LBC samples were collected over a 2-year period from July 2015 to September 2017 according to protocols approved by the Institutional Ethical and Research Committees of the participants' respective institutes (Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José E. González" [HU] de la Universidad Autónoma de Nuevo León [UANL], registration number B113005; Instituto Nacional de Cancerología [INCan], registration number CEI/1031/16; and San José [HSJ] and Zambrano Hellion [HZH] Hospitals of Tecnológico de Monterrey, registration number 3CEI190390139).

### Sample collection

Cervical sampling was performed by experienced gynecologists and nurses belonging to the staff of their respective institutes using either of two types of brushes available at the time in the clinical settings: (a) Colpotre<sup>®</sup> (Uileben, Mexico City, Mexico) ( $n=261$ ), with the cells collected by five clockwise rotations (360°), and (b) Rovers<sup>®</sup> Cervex-Brush-Combi (Puritan, Guilford, ME) ( $n=35$ ), with the cells collected by two clockwise rotations (360°). Both preparations of brush-collected cells were immediately transferred into a 50 mL conical tube (CORNING<sup>®</sup>, San Nicolas de los Garza, Nuevo León, Mexico) containing 7.5 mL of PreservCyt<sup>®</sup> solution (ThinPrep<sup>®</sup>; Hologic<sup>®</sup>, Marlborough, MA) for nucleic acid suspension and preservation. All samples were stored at 4°C until processed for nucleic acid isolation within the following 1–52 days. Samples from INCan (Mexico City, Mexico) were transported to the laboratory at the Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular at the UANL (Monterrey, Mexico) in a cooler container with gel packs by priority shipping such that delivery occurred within 24 hours (FedEx, Mexico City, Mexico) with an average of 10 LBCs (range 5–15) per shipment.

### DNA isolation

Each sample was vortexed for 30 seconds, centrifuged at 300 g for 10 minutes at 4°C, and the supernatant was dis-

carded. The pelleted cells were lysed by adding 600  $\mu$ L of lysis buffer RLT Plus (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Germany) (cells were counted to establish the amount of RLT Plus buffer) and homogenized for 30 seconds with a TissueRuptor<sup>™</sup> (Qiagen) at medium velocity. Each sample was extracted by either a manual or an automated (Qiacube<sup>™</sup>; Qiagen, Germantown, MD) method available at the time, following in both cases the protocol of AllPrep DNA/RNA/microRNA Universal Kit<sup>™</sup> (Qiagen) as indicated in Figure 1, using 600  $\mu$ L of homogenized lysate as a starting material. Both manual and automated extractions were performed in the same laboratory and the DNA quantified on the same instrument. Purified nucleic acids were eluted in 100  $\mu$ L initially, and a second backup elution with an extra 50  $\mu$ L from the final step of the protocol was biobanked in 1 mL special DNase and RNase free cryotubes (Nunc<sup>™</sup>; Thermo<sup>®</sup>, Waltham, MA). The data from QC were generated from the first 100  $\mu$ L eluted nucleic acids.

### QC of DNA

DNA was analyzed for integrity, yield, and purity. Suitability of DNA for gene variation analysis was further analyzed by using it as a substrate for amplification of a region of the  $\beta$ -globin gene by endpoint polymerase chain reaction (PCR).

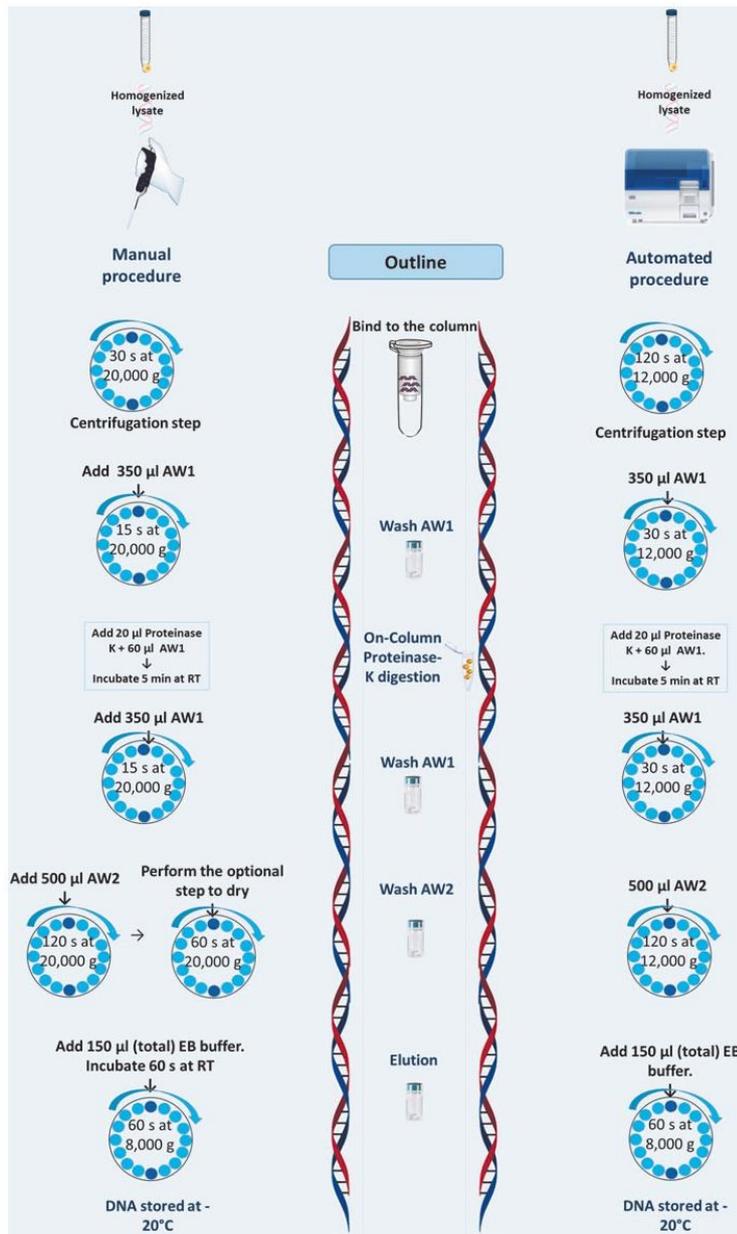
**Integrity of DNA.** The integrity was analyzed by agarose gel electrophoresis. For this purpose, up to 400 ng of DNA, quantified by spectrophotometer, was used and the average size (as an index of integrity) was estimated using a 100 base pairs (bp) DNA ladder (Promega<sup>®</sup>, Fitchburg, WI, and Invitrogen<sup>™</sup>, Waltham, MA).

**Measurement of DNA yield and purity.** DNA yields were quantified by using a Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer, with the Qubit<sup>™</sup> dsDNA BR Assay Kit for 292 of 296 samples and Qubit<sup>™</sup> dsDNA HS Assay Kit for the rest of the four samples. Purity was judged by the  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  and  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  absorbance ratios by using a UV-Vis NanoDrop<sup>™</sup> 2000 spectrophotometer (Thermo).

**PCR amplification as a functional assay of DNA quality.** The  $\beta$ -globin gene (*HBB*) was amplified using GoTaq Colorless Master Mix (Promega), following the manufacturer's instructions. The reaction mixture of 0.2  $\mu$ M for each of the  $\beta$ -globin gene primers (forward: 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3' and reverse: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'; IDT, Skokie, IL), 100 ng of DNA quantified by spectrophotometer (seven samples contained less than 100 ng), and GoTaq Colorless Master Mix. The reaction volume was adjusted with Milli-Q water to a final volume of 13.5  $\mu$ L. After an initial denaturation step at 94°C for 5 minutes, amplification was carried out for 30 cycles, comprising each of the following successive steps of incubation at 94°C (denaturation) for 30 seconds, incubation (annealing) at 57°C for 30 seconds, and at 72°C (elongation) for 2 minutes. Cycling concluded with a final extension step at 72°C for 10 minutes. Amplification was performed using a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA). The expected prominent PCR product of 268 bp was confirmed following electrophoresis of amplification product in 2% agarose gel.

### Statistical analysis

Considering the variables of brush types, isolation protocols used, and storage time before processing/nucleic acid isolation, we compared the yield based on fluorescence



**FIG. 1.** Schematic representation of DNA procedure from LBC samples. *Left side:* manual procedure; *middle side:* outline procedure; *right side:* automated procedure. RT = room temperature; EB = elution buffer; AW1 and AW2 = buffer concentrate provided from AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit. LBC, liquid-based cytology.

of dsDNA preparations. Quantitative results obtained were analyzed using the GraphPad Prism 5 Software package (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. Unpaired data were compared using the unpaired Student's *t*-test. A *p*-value of  $<0.05$  was considered significant. One-way analysis of variance was used to compare the yield of nucleic acids versus time until the isolation process.

## Results

Two hundred ninety-six women were enrolled for this study, with a mean age of 49 ( $\pm 13$  standard deviation) years and range of 19–85 years. Sixty-one LBCs from participants were collected and processed within 24 hours. Two hundred thirty-five biospecimens from study participants at the other centers were collected, stored at 4°C for transport to our

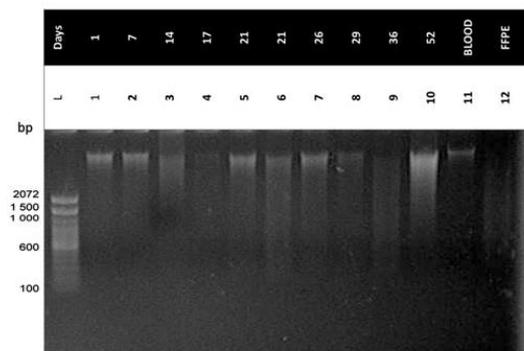
processing center. DNA from the samples was isolated by either manual ( $n=233$ ) or automated ( $n=63$ ) procedure as indicated in Figure 1. Samples were assigned to either processing procedure available at the time. Ninety-six percent (226/235) of samples from out of town were processed between 1 and 35 days. Four samples were isolated at later time points, between 36 and 52 days.

#### *The integrity of DNA is suitable for standard molecular biology analyses*

DNA integrity was investigated by electrophoresis in 1% agarose gel and was judged by the proportion of high-versus low-molecular-weight DNA as suggested by evidence of smearing (Fig. 2). Based on this qualitative assessment, it was estimated that 98% (53/54) of the samples tested were of sufficient quality.

#### *DNA yield from LBC samples is more efficient by manual isolation*

The efficiency of DNA extraction was compared between the two isolation methods and the type of brushes (Rovers vs. Colpotre) used by evaluating their impact on the QC parameters of the characterized samples (Table 1). In this study, the manual isolation method resulted in increased DNA recovery when compared with the automated isolation method ( $p<0.0003^{***}$ ), regardless of the type of brush used: Colpotre ( $p<0.0022^{**}$ ) or Rovers ( $p<0.0445^*$ ). Additionally, the variable of time between sample collection and processing was analyzed to determine if it impacted the nucleic acid yield from the PreservCyt solution-stored cells (Fig. 3). Most of the INCAN samples, 71% (168/235), were isolated within the 1–14 days after collection; the effect of the time in these samples' yield was not significant ( $p<0.3128$ ).



**FIG. 2.** Integrity assessment of isolated nucleic acids. Lane L: DNA ladder 100 bp; Lanes 1–10: DNA of LBC samples taken by Colpotre<sup>®</sup> and isolated by manual method; Lane 11: DNA of blood sample; Lane 12: DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue; Conditions: 400 ng of DNA in agarose gel at 1% at 110 volts during 60 minutes. *First row* indicates sample storage time (days) before isolate DNA.

#### *Amplifiability of DNA isolated from LBC samples*

The 268 bp band of the  $\beta$ -globin gene was amplified in 100% (296/296) of the DNA samples by endpoint PCR (Fig. 4).

#### **Discussion**

In this study, two DNA isolation methods from LBC samples were tested to compare their efficacies to yield good quality and quantity of DNA. Results demonstrated that the manual isolation of DNA from LBC is more effective than automated isolation under those conditions.

Initial handling and proper conservation of valuable DNA samples represent critical steps for the efficient utilization of LBC samples as the starting material for biomarker discovery.<sup>10</sup> Biobanking and biospecimen science studies have emerged as a global priority in view of the critical importance of preanalytical precautions and their relevance in omics research for biomarker discovery.<sup>11</sup> Nevertheless, studies addressing the QC of LBC samples are limited.<sup>12–17</sup>

Boulet et al. in 2008 demonstrated that the recovery of nucleic acids from cytology was possible even when a cytology sample had been stored for up to 10 years (archival smears), with all samples providing DNA suitable for PCR amplification with amplicons up to 400 bp.<sup>14</sup> These studies demonstrated that long-term stored LBC samples are stable for the isolation of these nucleic acids. In this study, we chose a short amplicon; however, a long-range PCR should be designed for those downstream applications where less degraded DNA is required.

Serrano et al.<sup>18</sup> isolated DNA, RNA, and proteins from LBC resuspended in saline solution buffer and concluded that preservation solutions (PAXgene<sup>™</sup> or PreservCyt) can influence integrity and yield. In addition, the suitability of archived LBC cytological samples for molecular biology analyses has been investigated. In a study of 8-year-old samples stored at room temperature in PreservCyt solution, degradation of DNA by analysis of  $\beta$ -globin amplification and cytological nuclear preservation features were time-dependent, declining with increasing storage time.<sup>19</sup> In this study, we demonstrated that storage time of LBC samples in PreservCyt for several weeks is safe at 4°C. This methanol-based preservation solution is intended for ThinPrep Pap<sup>™</sup> testing, even if kept between 15°C (59°F) and 30°C (86°F) and for up to 6 weeks.<sup>20</sup> Notably, PreservCyt is used in routine clinical practice with the Hybrid Capture 2 (HC2) for CC screening, and it is also provided by Mexico's National Health Social Security System.<sup>21</sup>

The nucleic acid degradation evidenced by the smears in the gel lanes in Figure 2 can be explained by autolysis that occurs during normal epithelial cell maturation and changes that occurred after exfoliation.<sup>12,15,22</sup>

More recently, LBC studies have focused on differences between sampling devices, such as Cervex Brush<sup>®</sup> versus Cervex Brush<sup>®</sup> Combi, without having identified differences in DNA yield.<sup>23</sup> Similarly, in this study, we did not identify significant differences in overall yield between two different brush types (comparison for DNA yield  $p<0.6711$ ; Table 1, section b); significance was established when the manual versus automated DNA isolation from an LBC using the Colpotre ( $p<0.0022^{**}$ ; Table 1, section c) and the Rovers ( $p<0.0445$ ; Table 1, section d). Colpotre is a Mexican-made brush, similar to the Cervex Brush, but is approximately

TABLE 1. DNA YIELD FROM LIQUID-BASED CYTOLOGY SAMPLES

(a) Type of isolation: manual vs. automated	Manual (n=233)	Automated (n=63)	p-Value			
DNA yield (µg)	22.81 ± 1.92	9.96 ± 1.11	<0.0003***			
Purity 260/280	1.83 ± 0.02	1.81 ± 0.02	<0.6144			
Purity 260/230	1.29 ± 0.04	1.41 ± 0.09	<0.2219			
(b) Type of brush: Colpotre <sup>®</sup> vs. Rovers <sup>®</sup>	Colpotre (n=261)	Rovers (n=35)	p-Value			
DNA yield (µg)	20.11 ± 1.67	18.04 ± 4.55	<0.6711			
Purity 260/280	1.83 ± 0.02	1.81 ± 0.03	<0.7181			
Purity 260/230	1.32 ± 0.04	1.26 ± 0.11	<0.6353			
(c) Colpotre brush: manual vs. automated	Manual (n=209)	Automated (n=52)	p-Value			
DNA yield (µg)	22.75 ± 2.03	9.88 ± 1.28	<0.0022**			
(d) Rovers brush: manual vs. automated	Manual (n=24)	Automated (n=11)	p-Value			
DNA yield (µg)	24.18 ± 6.25	4.62 ± 1.37	<0.0445*			
(e) Type of isolation and brushes	Manual (n=233)			Automated (n=63)		
	Colpotre (n=209)	Rovers (n=24)	p value	Colpotre (n=52)	Rovers (n=11)	p-Value
DNA yield (µg)	22.65 ± 2.03	24.18 ± 6.25	<0.8094	9.88 ± 1.28	4.62 ± 1.37	<0.0735
Purity 260/280	1.83 ± 0.02	1.83 ± 0.02	<0.9709	1.82 ± 0.02	1.76 ± 0.05	<0.4083
Purity 260/230	1.29 ± 0.04	1.31 ± 0.14	<0.8646	1.46 ± 0.10	1.15 ± 0.17	<0.2232

Data are presented as the MEAN ± SEM. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , and \*\*\* $p \leq 0.001$  values were considered statistically significant. The yield was generated from the first 100 µl eluted nucleic acids.

10 times less expensive than the Rovers Cervix Brush (retail cost in Mexico 0.25 USD and 2.57 USD, respectively). Therefore, according to this study, we believe that the two brushes were equally effective with regard to DNA yields, despite the differences in price.

To reduce operator-induced variations and more readily standardize throughput, we also tested a benchtop automated sample preparation machine (Qiacube; Qiagen), a low-throughput instrument that processes up to 12 samples per run. Automated protocols can be an alternative for more standardized, reproducible, and efficient protocols designated especially for high-throughput analyses, reducing hands-on time.

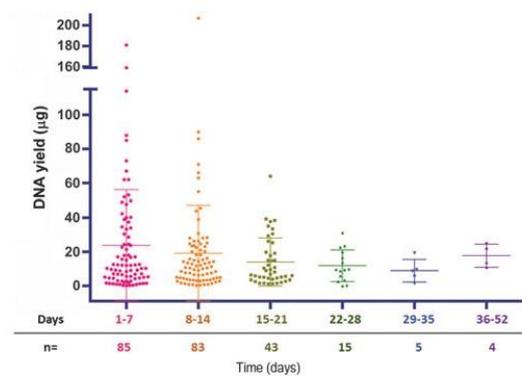


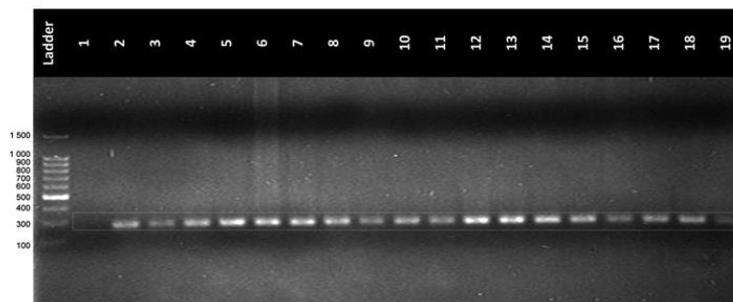
FIG. 3. Effect of storage time before isolation of DNA from LBC samples. No significant differences were observed ( $p < 0.3128$ ).

As illustrated in Figure 1, the standard protocol for the automated method does not include the optional centrifugation spin to dry the column and prevent the carryover of ethanol in the DNA elution step; moreover, we did not find a statistically significant difference between manual and automated methods with respect to DNA purity. Furthermore, in the automated protocol, there is no incubation time before the DNA elution, which can result in low nucleic acid yield because DNA is still bound to the column membrane.<sup>24</sup> Additionally, the centrifugation speed on the Qiacube automated method was only 12,000 g, whereas in the manual method, centrifugation was performed at 20,000 g. Even though the incubation step could not be performed by the automated method, a considerable amount of DNA was obtained. It is important to mention if the user needs a specific protocol for the automated method, the company can design it based on the user's requirements.

In this study, and as judged by DNA yield measurements, manual isolation resulted in greater yields, and this finding is in agreement with previous reports.<sup>25,26</sup> However, the difference in yields may be attributed to the larger sample size for the manual method versus the automated method. Even if this method was superior, the advantages of the automation cannot be ignored and the choice of the DNA isolation method should be based on the workflow of each biobank.

Spectrophotometry is a traditional and economically convenient method of quantifying DNA in molecular biology laboratories due to its accessibility and also in biobank studies.<sup>27</sup> However, other methods such as fluorometry by Qubit<sup>™</sup>, have proven more reliable due to the specificity for double-stranded DNA. All the yield comparisons shown in Table 1 were performed based on fluorometry, and all the

**FIG. 4.** Amplification of  $\beta$ -globin gene region from DNA isolated from LBC samples. Lane L: DNA ladder; Lane 1: negative control; Lanes 2–18: amplicon DNA of LBC samples; Lane 19: positive control amplicon DNAg previously known; Conditions: 8  $\mu$ L of amplicon DNA in agarose gel at 2% at 95 volts during 90 minutes.



purity comparisons were performed based on spectrophotometry.

In this study, we obtained average DNA yields of 22.81  $\mu$ g ( $\pm 1.92$ ) and 9.96  $\mu$ g ( $\pm 1.11$ ) using the manual and automated isolation methods, respectively, from an LBC sample, and reasonable integrity of DNA was verified, as seen in the prominence of a high molecular band (Fig. 2). Most traditional clinical molecular pathology assays are designed considering the degradation of DNA, rendering fragments of lengths varying between 100 and 400 bp, and typically require less than 50 ng per analysis. However, the new technologies use significantly less DNA. In this study, we were able to obtain a considerable amount of DNA with both isolation methods.

Other general considerations on the isolation of nucleic acids are the dependent variables of the patient, such as the phase of her menstrual cycle, and those on the nurse/doctor, such as her/his skill to collect the sample.

The primary responsibility of biobanks is to collect biospecimens that truly represents features of the local population.<sup>28</sup> CC is the fourth leading cause of cancer death in women, with 311,000 worldwide deaths, and is the second leading cause of cancer death in women in Mexico with 4,121 deaths.<sup>29</sup> Europe has a Cervical Cytology Biobank, which is a resource for molecular epidemiology and for evaluating CC screening and intervention approaches.<sup>16,28,30</sup> Currently, LBC is used for CC screening. When LBC is used in combination with NGS technology, it can be beneficial in developing early detection methods in other gynecological cancers. Since there are no early detection biomarkers currently known that are specific enough to detect ovarian and endometrial cancers, these two cancers have started to gain more attention given their lethality.

For these reasons, our work represents a guide to QC for collecting LBC samples and stresses the impact of good control of preanalytical conditions while obtaining samples (i.e., LBCs) in clinics far from a laboratory, to favor their quality as starting material for biomarkers discovery in the fight against the feared gynecological cancers.

#### Authors' Contributions

I.G.D.-V.: Conceptualization, patient recruitment, writing—review and editing, design of figures and table, data analysis, and interpretation; V.H.B.-O.: Patient recruitment, writing—review and editing; L.G.-A.: review and editing; A.A.P.-M.: review and editing; M.L.G.-R.: review and editing; G.I.M.-G.: Patient recruitment, review and editing; S.C.-H.: Patient

recruitment, review and editing; D.H.M.-L.: Patient recruitment, review and editing; O.V.-G.: Patient recruitment, review and editing; D.F.C.: Patient recruitment, writing—review and editing; H.A.B.S.: Conceptualization, writing—review and editing, funding, and responsible for the overall content.

#### Acknowledgments

The authors express their appreciation thanks to Minerva Conejo and Tania Melchor for their assistance in sample collection, to Dr. Victor M. Treviño-Alvarado for assistance with statistical analysis, and John A. Martignetti and Lisa Arrigo for their insightful advice to improve the article.

#### Author Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interest in carrying out this research.

#### Funding Information

This work was partially supported by Mexico's National Council of Science and Technology (CONACYT) to our National Laboratory of Specialized Services of Research, Development, and Innovation for Pharma and Biotech Industries (LANDSEIDI); CONACYT Great National Health Problems Grant #247850 and CONACYT Nationals Laboratories #LN132017-271386 to H.A.B.S.

#### References

- Mulford D. Alternatives to the traditional Papanicolaou (Pap) Smear - Liquid Based Cytology (LBC). *Lab Med* 2003;34: 129–131.
- Traut HF, Papanicolaou GN. Cancer of the uterus: The vaginal smear in its diagnosis. *Cal West Med* 1943;59:121–122.
- Haghighi F, Ghanbarzadeh N, Ataee M, Sharifzadeh G, Mojarad JS, Najafi-Semnani F. A comparison of liquid-based cytology with conventional Papanicolaou smears in cervical dysplasia diagnosis. *Adv Biomed Res* 2016;5:162.
- Kinde I, Bettegowda C, Wang Y, et al. Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers. *Sci Transl Med* 2013;5:167ra4.
- Wang Y, Li L, Douville C, et al. Evaluation of liquid from the Papanicolaou test and other liquid biopsies for the detection of endometrial and ovarian cancers. *Sci Transl Med* 2018;10: pii: eaap8793.
- Garza-Rodríguez ML, Pérez-Maya AA, Monsivais-Ovalle DE, Velázquez-Vadillo JF, Barrera-Saldaña HA. El Bio-

- banco Institucional como pilar de las ciencias médicas. *Salud Publica Mex* 2016;58:483–489.
7. Mendy M, Lawlor RT, van Kappel AL, et al. Biospecimens and biobanking in global health. *Clin Lab Med* 2017;38: 183–207.
  8. Bongiovanni A, Colotti G, Liguori GL, et al. Applying quality and project management methodologies in biomedical research laboratories: A public research network's case study. *Accredit Qual Assur* 2015;20:203–213.
  9. Ravagnani FG, Saidemberd DM, Faria ALC, Sartor SB, Oliveira D, Catharino RR. Quality control of biomarkers: From the samples to data interpretation. In: *Latest Research into Quality Control*. London, United Kingdom, InTech; 2012. p. 514.
  10. Haque K, Pfeiffer R, Beerman M, Struewing J, Chanock S, Bergen A. Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnol* 2003;3:20.
  11. Krishnamurthy S. Biospecimen repositories and cytopathology. *Cancer Cytopathol* 2015;123:152–161.
  12. Klaassen I, Copper MP, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Snow GB, Braakhuis BJM. Exfoliated oral cell messenger RNA: Suitability for biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:469–472.
  13. Tomomi F, Asano A, Shimada K, Tatsumi Y, Obayashi C, Konishi N. Evaluation of RNA and DNA extraction from liquid-based cytology specimens. *Mol Cytopathol Eval* 2016; 44:833–840.
  14. Boulet GA, Horvath CA, Berghmans S, et al. Cervical cytology biobanking: Quality of DNA from archival cervical Pap-stained smears. *J Clin Pathol* 2008;61:637–641.
  15. Habis AH, Vernon SD, Lee DR, Verma M, Unger ER. Molecular quality of exfoliated cervical cells: Implications for molecular epidemiology and biomarker discovery. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:492–496.
  16. Arbyn M, Van Veen E Ben, Andersson K, et al. Cervical cytology biobanking in Europe. *Int J Biol Markers* 2010;25: 117–125.
  17. Tarkowski TA, Rajeevan MS, Lee DR, Unger ER. Improved detection of viral RNA isolated from liquid-based cytology samples. *Mol Diagnosis* 2001;6:125–130.
  18. Serrano ML, Romero Rojas AE, Sánchez Gómez M, Bravo MM. Extracción de ADN, ARN proteínas de células cervicales provenientes de cepillados cervicales tomados para citología cérvico-uterina. *Rev Colomb Cancerol* 2006;10: 117–124.
  19. Castle PE, Solomon D, Hildesheim A, et al. Stability of archived liquid-based cervical cytologic specimens. *Cancer Cytopathol* 2003;99:89–96.
  20. Hologic. ThinPrep 2000 System, Instructions for use. Marlborough, USA: Hologic; 2018.
  21. PAHO. Integrating HPV Testing in Cervical Cancer Screening Program: A Manual for Program Managers. Washington, DC: PAHO; 2016: 68.
  22. Bhattacharya P, Pappelis A. Changes in nucleic acid and protein content in nuclei of human. *Mech Ageing Dev* 1984; 27:135–142.
  23. Depuydt CE, Benoy IH, Bailleul EJ, Vandepitte J, Ver-ecken AJ, Bogers JJ. Improved endocervical sampling and HPV viral load detection by Cervex-Brush® Combi. *Cytopathology* 2006;17:374–381.
  24. Qiagen AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Handbook. USA: Qiagen; 2016.
  25. Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S, et al. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *J Clin Lab Anal* 2007;21: 244–248.
  26. Mathieson W, Guljar N, Sanchez I, Sroya M, Thomas GA. Extracting DNA from FFPE tissue biospecimens using user-Friendly automated technology: Is there an impact on yield or quality? *Biopreserv Biobank* 2018;16: 191–199.
  27. Guadagni F, Morte D Della, Ludovici G, et al. Preanalytical procedures for DNA studies: The experience of the inter-institutional multidisciplinary BioBank (BioBIM). *Biopreserv Biobank* 2011;9:35–45.
  28. Perskvist N, Björklund C, Dillner J. A Complex intervention for workflow enhancement at the swedish cervical cytology biobank. *Biopreserv Biobank* 2014;12: 69–73.
  29. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424.
  30. Perskvist N, Norman I, Eklund C, Litton J-E, Dillner J. The swedish cervical cytology biobank: Sample handling and storage process. *Biopreserv Biobank* 2013;11:19–24.

Address correspondence to:

*Hugo A. Barrera Saldaña, PhD  
National Laboratory of Specialized Services of Research,  
Development, and Innovation for Chemical  
and Biotechnological Drugs at Innbiogem, SC  
Boulevard  
Puerta del Sol #1005  
Colinas de San Jerónimo  
C.P. 64630 Monterrey N.L.  
México*

*E-mail: habarrera@gmail.com*

*David F. Cantú De León, MD, MSc, PhD  
Subdirección de Investigación Clínica  
Instituto Nacional de Cancerología  
Av. San Fernando  
No 22. Belisario Domínguez Secc 16  
CP 14080 Ciudad de México  
México*

*E-mail: dcantude@gmail.com*