




Análisis del ADN nuclear y mitocondrial libre de células circulantes en plasma de pacientes mexicanas con cáncer de mama

Dalia E. Rodríguez-Torres,¹ Anilu M. Saucedo-Sariñana,²  Alejandra Palacios-Ramírez,³ Miriam Y. Godínez-Rodríguez,¹ Efraín Salas-González,⁴ Aldo A. Alcaraz-Wong,⁵ José E. García-Ortiz⁶  y Mónica A. Rosales-Reynoso^{1*} 

¹División de Medicina Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara; ²Departamento Académico de Aparatos y Sistemas I, Universidad Autónoma de Guadalajara, Zapopan; ³Servicio de Ginecología Oncológica, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Ginecología y Obstetricia, Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara; ⁴Servicio de Oncología Médica, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Ginecología y Obstetricia, Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara; ⁵Servicio de Patología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara; ⁶División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara. Jalisco, México

Resumen

Antecedentes: La utilidad del ADN circulante libre (ADNcl), el ADN nuclear (ADNn) y mitocondrial (ADNmt) como posibles biomarcadores en cáncer aún sigue siendo controvertida. **Objetivo:** Determinar la concentración del ADNcl y los niveles de ADNn y ADNmt en plasma en pacientes con cáncer de mama (CM). **Material y métodos:** Se incluyeron 86 mujeres (69 pacientes con CM y 17 mujeres como grupo de control). La concentración del ADNcl se determinó por medio de fluorometría y los niveles de ADNmt y ADNn, por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). **Resultados:** La concentración de ADNcl fue mayor en las pacientes con CM versus el grupo de control ($p = 0.001$). La concentración de ADNcl se asoció en pacientes mayores de 50 años ($p = 0.001$). El nivel del ADNn fue mayor en las pacientes con CM versus el grupo de control ($p = 0.004$). Los niveles de ADNmt no mostraron diferencias significativas. Las concentraciones de ADNcl y ADNn mostraron un poder discriminatorio significativo (área bajo la curva [AUC] = 0.968, $p = 0.001$, y AUC = 0.724, $p = 0.004$, respectivamente). **Conclusiones:** La concentración de ADNcl y la combinación de este y ADNn son marcadores útiles para el diagnóstico de pacientes con CM.

PALABRAS CLAVE: ADN mitocondrial. ADN nuclear. Biomarcador. Cáncer de mama. Diagnóstico.

Analysis of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in plasma of Mexican patients with breast cancer

Abstract

Background: The usefulness of circulating free DNA (cfDNA), nuclear DNA (nDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA) as potential biomarkers in cancer remains controversial. **Objective:** To determine the concentration of cfDNA and plasma nDNA and mtDNA levels in breast cancer (BC) patients. **Material and methods:** This study included a total of 86 women (69 patients with BC and 17 women as a control group). The cfDNA was determined using fluorometry, and the levels of mtDNA and nDNA were quantified using real-time polymerase chain reaction (qPCR). **Results:** The concentration of cfDNA was higher in patients with BC compared to the control group ($p = 0.001$). A higher concentration of cfDNA was also associated with patients over 50 years old ($p = 0.001$). The level of nDNA was higher in patients with CM compared to the control group ($p = 0.004$). Levels of mtDNA

*Correspondencia:

Mónica A. Rosales-Reynoso

E-mail: mareynoso77@yahoo.com.mx

0016-3813/© 2024 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 13-05-2024

Fecha de aceptación: 07-08-2024

DOI: 10.24875/GMM.24000153

Gac Med Mex. 2024;160:425-434

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

did not show significant differences ($p > 0.005$). The concentration of cfDNA and nDNA showed significant discriminatory power (AUC = 0.968, CI = 0.93-1.00, $p = 0.001$; and AUC = 0.724, CI = 0.59-0.85, $p = 0.004$, respectively). **Conclusions:** The concentration of cfDNA and the combination of cfDNA and nDNA are useful biomarkers for diagnosing patients with BC.

KEYWORDS: Mitochondrial DNA. Nuclear DNA. Diagnostic biomarker. Breast cancer. Diagnosis.

Introducción

El cáncer de mama (CM) es un problema de salud en el mundo. En México se diagnosticaron 27 859 casos nuevos de CM en 2022, lo que indica una tasa de incidencia de 37.9/100 000, con una tasa de mortalidad de 9.2/100 000 habitantes.¹ En países de ingresos bajos o medianos, el diagnóstico de CM se realiza en etapas tardías, lo cual genera un tratamiento subóptimo posterior a la detección que conduce a una alta tasa de mortalidad.² En cuanto a las técnicas de diagnóstico, actualmente la biopsia tisular es considerada el estándar de oro en CM; sin embargo, presenta desventajas debido a su invasividad, la obtención de resultados tardíos y el incremento de los costos. La mastografía tiene un sensibilidad que varía de 71 a 44 % en mamas densas; la especificidad oscila entre 71 y 92 %.³

En los últimos años, los estudios enfocados en el ADN circulante libre (ADNcl) representan un campo de investigación prometedor en la práctica clínica debido a que es posible obtenerlos mediante biopsias líquidas, método que resuelve las limitaciones de la biopsia de tejido, ya que el procedimiento del muestreo en la biopsia líquida es fácil, económico y repetible.⁴

Se ha vinculado la concentración del ADNcl con diversos tipos de cáncer, incluido CM, en el cual se ha utilizado para detección temprana, pronóstico, respuesta a tratamiento y detección de mutaciones asociadas a resistencia.⁵ Por otro lado, también se han estudiado los niveles de ADN nuclear (ADNn) y ADN mitocondrial (ADNmt), tanto en muestras de tejido como en plasma;⁶ sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios respecto a su relevancia clínica y valor diagnóstico. El objetivo de este estudio transversal fue evaluar la cantidad de ADNcl, los niveles de ADNmt y ADNn circulantes en plasma de pacientes con CM, para determinar su posible utilidad como biomarcadores diagnósticos.

Material y métodos

Población de estudio

Se incluyeron 86 mujeres, de las cuales 69 fueron pacientes clínicamente diagnosticadas e histológicamente confirmadas con CM subtipos luminal A,

luminal B y triple negativo de acuerdo con los criterios histopatológicos establecidos por la Organización Mundial de la Salud y considerados en el Hospital de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico de Nacional de Occidente, del Instituto Mexicano del Seguro Social en Guadalajara, Jalisco, México. El estudio fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto (R-2020-785-130) y se realizó de acuerdo con los estándares éticos nacionales e internacionales. El grupo de control incluyó a 17 mujeres aparentemente sanas. Todas las participantes incluidas firmaron carta de consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron enfermedad viral (VIH, hepatitis, etcétera), enfermedad inflamatoria y síndrome de CM hereditario. En el grupo de control, los criterios de exclusión fueron presencia de tumores benignos de mama y enfermedades virales. Los datos clínicos y anatomopatológicos de las pacientes con CM y del grupo de control fueron obtenidos de los expedientes electrónicos.

Purificación y medición de la concentración de ADNcl

De todas las mujeres incluidas en el estudio se recolectaron muestras de sangre completa en tubos EDTA; en las pacientes con CM, las muestras se obtuvieron antes de iniciar el tratamiento (radioterapia, cirugía o quimioterapia). Posteriormente, el plasma se separó mediante dos pasos de centrifugación a $1000 \times g$ durante 10 minutos. A continuación se purificó 1 mL de plasma con QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADNcl se midió mediante Qubit Fluorometer 3.0 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), con el kit QubitTM dsDNA HS Assay Kit (rango de cuantificación de 10 pg/ μ L-100 ng/ μ L).

PCR cuantitativa (qPCR)

Para medir los niveles de ADNmt se realizó la amplificación de los genes *MTND1* y *MTND2* y para ADNn, del gen *RPS18*. Para la amplificación de *MTND1* se utilizó el cebador *forward* 5'-ACGCCATAAACTCTTCACCAAAG-3' y el *reverse* 5'-GGGTTCATAGTAGAAGAGCGATGG-3'.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de las pacientes con cáncer de mama y del grupo de control

Característica	Grupo CM n = 69 (100 %)		Grupo de control n = 17 (100 %)		p
	Media		Media		
Edad (años)	57.23		33.47		0.001
Peso (kilogramos)	71.01		64.94		0.084
Talla (metros)	1.56		1.62		0.002
Índice de masa corporal	28.85		24.65		0.002
	n	%	n	%	
Grupo de edad					
> 50 años	52	75	1	6	0.001
< 50 años	17	25	16	94	
Antecedentes positivos oncológicos	31	44.92	10	58.82	0.304
Diabetes mellitus 2	21	30.4	1	5.8	0.059
Hipertensión arterial	39	56.5	0	0	0.001
Hipotiroidismo	8	11.6	1	5.8	0.681
Obesidad	27	13.1	0	0	0.001

Los valores de p se calcularon mediante la prueba χ^2 . CM: cáncer de mama.

Para la amplificación de *MTND2*, el cebador *forward* 5'-CACACTCATCACAGCGCTAA-3' y el *reverse* 5'-GGATTATGGATGCGGTTGCT-3'. Para la amplificación de *RPS18* se empleó el cebador *forward* 5'-CGATGGGCGGCGGAAAA-3' y el *reverse* 5'-CAGTCGCTCCAGGTCTTCACGG-3'.

Se realizaron curvas estándar para el análisis de los genes mitocondriales y nuclear. La cuantificación se llevó a cabo mediante el instrumento Light Cycler® 96 (Roche, Mannheim, Alemania), con el kit FastStart SYBR Green Master Kit (Roche, Mannheim, Alemania). La reacción de qPCR se efectuó con un volumen final de 10 μ L que contenía 5 μ L de FastStart SYBR Green Master Mix, 0.1 μ L de cada cebador, 2.8 μ L de H₂O grado PCR y 2 μ L de la muestra de ADNcl. Se usaron diluciones seriales con un factor de dilución 1:10. Todas las reacciones se analizaron por duplicado y en cada experimento se incluyó un control negativo. Los valores de punto de cruce obtenidos de las muestras desconocidas se compararon con la curva estándar y se calculó el número correspondiente de unidades mitocondriales y nucleares.

Análisis estadístico

Los resultados de las concentraciones del ADNcl y los niveles de ADNmt y ADNn se muestran como medianas con rango intercuartílico (RIC, percentiles

25 a 75). Se realizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar dos grupos y la de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos. Para evaluar la utilidad diagnóstica como biomarcador del ADNcl, ADNmt y ADNn se efectuó análisis de curvas ROC (*receiver-operating-characteristic*). Los análisis se llevaron a cabo con SPSS 25.0 y los gráficos con GraphPad Prism 8.

Resultados

Características de las mujeres incluidas en el estudio

En la Tabla 1 se describen las características demográficas y clínicas de las mujeres incluidas en el estudio. Se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados. En la Tabla 2 se detallan las características clínicas y anatomopatológicas de las pacientes con CM; más de 50 % de las pacientes se diagnosticaron en estadios TNM avanzados.

Concentración de ADNcl, ADNmt y ADNn entre los grupos

Los resultados de la concentración de ADNcl y los niveles de ADNn y ADNmt en pacientes con CM y el

Tabla 2. Características clínicas y anatomopatológicas de las pacientes con cáncer de mama

Característica	Grupo CM n = 69 (100 %)	
	Media \pm DE	
Edad a la menarca (años)	13.57 \pm 1.55	
Edad a la menopausia (años)	47.29 \pm 3.98	
Edad a la primera gesta (años)	22.29 \pm 5.23	
	Media	
Numero de gestas (media)	4	
Receptor de estrógenos (%)	48.91	
Receptor de progesterona (%)	34.32	
Ki 67 (%)	28.42	
	n	%
Lactancia positiva	30	43.47
Terapia de reemplazo hormonal	46	66.66
Etapas clínicas		
I	14	20
II	19	28
III	30	43
IV	6	9
Subtipo molecular		
Luminal A	20	29
Luminal B	25	36
Triple negativo	24	35
Histología		
Ductal	63	91.3
Lobular	2	2.8
Ducto-lobulillar	2	2.8
Mucinoso	1	1.4
Medular	1	1.4
Her2/neu positivo	8	11.59
Tratamiento recibido		
Mastectomía	19	27.53
Quimioterapia	21	30.43
Radioterapia	41	59.42
Terapia endocrina	33	47.82

CM: cáncer de mama; DE: desviación estándar; Her2/neu: human epidermal growth factor receptor 2; Ki67: marcador de proliferación Ki-67.

grupo de control se muestran en la Tabla 3. En las pacientes con CM se observó una cuantificación mayor de ADNcl total mayor en comparación con el grupo de control ($p = 0.001$). En la cuantificación del ADNmt no se observaron diferencias significativas para *MTND1* y *MTND2* ($p = 0.123$ y 0.849 , respectivamente). En la cuantificación del gen nuclear *RPS18* se observó significación entre los grupos analizados ($p = 0.004$).

En la Tabla 4 se muestra la asociación de las características demográficas y clínicas de las pacientes con

CM con las concentraciones de ADNcl, ADNmt y ADNn. Se observó que las pacientes mayores de 50 años presentaron una mayor concentración de ADNcl en comparación con las pacientes de menor edad ($p = 0.002$). Para el resto de las características clínicas no se encontró significación estadística ($p > 0.005$). Se observó una mayor concentración de ADNmt en las pacientes que no recibieron terapia *versus* las pacientes con terapia de reemplazo hormonal ($p = 0.029$, Tabla 5).

Análisis de curvas ROC

Para evaluar el potencial diagnóstico de ADNcl, ADNmt y ADNn como posibles biomarcadores diagnósticos, se empleó el análisis de curvas ROC. ADNcl y ADNn mostraron un buen poder de discriminación entre las pacientes con CM y el grupo de control ($p = 0.001$ y $p = 0.004$, respectivamente, Figuras 1A y 1B); su combinación también mostró valores óptimos como biomarcador ($p = 0.001$, Figura 1C). Sin embargo, el ADNmt no mostró utilidad como biomarcador para CM (Figuras 1D y 1E).

Discusión

Actualmente, las técnicas invasivas para diagnosticar el cáncer están siendo reemplazadas por métodos con mínima invasividad, como la biopsia líquida, técnica de fácil manejo que permite evaluar tumores benignos y malignos. El ADNcl se encuentra en fluidos corporales, tanto en condiciones fisiológicas como en trastornos patológicos. Se libera por medio de apoptosis, necrosis y liberación activa de ADN.⁷ En células tumorales dichos procesos ocurren de manera más acelerada, por lo tanto, se ha informado en estudios que la concentración del ADNcl se incrementa en varios tipos de cáncer.⁸

En nuestro estudio, la edad media de las pacientes con CM fue de 57.23 años, consistente con las tendencias establecidas de que todos los CM ocurren en mujeres mayores de 50 años, con una media de aparición de hasta 61.8 años.⁹ Sin embargo, la tendencia actual indica que existe una incidencia ascendente de casos en mujeres jóvenes (menores de 50 años) con peor pronóstico;¹⁰ además, para este grupo de pacientes actualmente no se dispone de una alternativa de detección sensible, como la mastografía para las mujeres en edades de 40 a 50 años, por lo cual su detección tiende a ser tardía.¹¹ A pesar del amplio uso de la mastografía para la detección de CM, se han planteado serias dudas sobre su valor, ya que un estudio

Tabla 3. Comparación de la concentración de ADNcl, ADNn y ADNmt en pacientes con CM y grupo de control

Concentración por fluorometría	Grupo CM (n = 69)	Grupo de control (n = 17)	p
	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-P75)	
ADNcl, ng/mL	614 (530-764)	392 (631-431)	0.001
MTND1 (ADNmt), ng/mL	524.34 (126.53-2118.19)	345.77 (145.98-716.39)	0.123
MTND2 (ADNmt), ng/mL	647.65 (133.04-1670.91)	323.02 (222.65-878.36)	0.849
RSP18 (ADNn), ng/mL	84.03 (43.06-146.77)	38.19 (25.61-66.32)	0.004

Los valores de p se calcularon mediante U de Mann-Whitney. ADNcl: ADN circulante libre; ADNmt: ADN mitocondrial; ADNn: ADN nuclear; CM: cáncer de mama; MTND1: mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1; MTND2: mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2; P25-P75: percentiles 25 y 75; RPS18: ribosomal protein S18.

prospectivo realizado en Canadá estimó que 22 % de las mastografías detecta CM invasivos sobrediagnosticados.¹² De aquí la importancia de investigar nuevos biomarcadores diagnósticos para el CM.

El análisis de asociación entre la concentración de ADNcl y las características clínicas de las pacientes mayores de 50 años indicó una concentración significativa de ADNcl ($p = 0.002$). Este hallazgo es coherente con la evidencia de que en personas mayores es liberada una mayor cantidad de ADNcl, ya que durante el envejecimiento a nivel celular predominan procesos catabólicos como la apoptosis y la lisis celular.¹³

La única característica clínica asociada fue con la hormona liberadora de tiotropina: las pacientes que no recibieron este tipo de tratamiento tuvieron niveles mayores de ADNmt en comparación con quienes sí lo recibieron ($p = 0.029$). El medicamento hormonal utilizado en las pacientes incluidas fue la tibolona. Recientemente se realizó un estudio de casos y controles en Corea, donde el riesgo de CM disminuyó con el uso de tibolona; por otro lado, se observó mayor nivel de proliferación de células mamarias en mujeres con terapia estrogénica.¹⁴ Además, en nuestra análisis se observó que la mayoría de las pacientes con CM que no recibieron hormona liberadora de tiotropina se encontraban en etapas clínicas avanzadas (III y IV). En promedio, los niveles de ADNmt en estas pacientes se encuentran elevados, lo cual es congruente con lo reportado en investigaciones anteriores: el contenido de ADNmt en pacientes con CM en estadio inicial (estadio I) fue menor que en otros estadios.¹⁵ Por lo tanto, los resultados obtenidos fueron afectados por el tipo de tratamiento hormonal recibido, la duración de este y la etapa clínica en la que se encontraban las pacientes.

Por otro lado, la concentración de ADNcl fue significativamente mayor en las pacientes con CM, lo que

coincide con los registros de otros estudios en los cuales se empleó la misma metodología de cuantificación; sin embargo, las concentraciones fueron más bajas a las de esta investigación,¹⁶ lo cual puede deberse al tiempo de procesamiento de las muestras: en nuestro estudio fueron procesadas a la brevedad, lo cual garantiza una mayor integridad del ADNcl. En otras investigaciones, la concentración del ADNcl ha sido diferente debido al método de extracción.^{17,18} Los resultados previos más consistentes con nuestros hallazgos en la concentración del ADNcl fueron los de un grupo de investigadores en Bangladesh, quienes utilizaron fluorometría Quantus y qPCR.¹⁹

Se ha propuesto que la cuantificación del ADNcl por qPCR puede mejorarse con dos o más genes con diferentes longitudes del amplicón.^{20,21} En la investigación que presentamos se emplearon tres genes con la finalidad de discriminar el origen mitocondrial (*MND1* y *MND2*) y nuclear (*RPS18*) del ADNcl.

En el análisis del ADNmt, los resultados no fueron significativamente diferentes entre los grupos. Diversos autores han empleado otros genes; sin embargo, sus resultados han sido contradictorios con los nuestros, ya que se han reportado niveles elevados de ADNmt en el grupo de control y disminución considerable en pacientes con CM (20 5013 GE/mL en el grupo con CM versus 52 2115 GE/mL en el grupo de control;¹⁶ así como 654.85 ng/mL en el grupo con CM versus 1374.79 ng/mL en el grupo de control²²). Por otra parte, nuestros resultados coinciden con los de un análisis de mujeres sirias en el que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en relación con los niveles de ADNmt y ADNn.⁶

Respecto a la cuantificación del ADNn, las diferencias significativas entre los grupos coincidió con lo reportado por diversos autores respecto a la elevación de los niveles de ADNn en CM, incluso con el uso de

Tabla 4. Asociación de la concentración de ADNcl, niveles de ADNmt y ADNn, con las variables demográficas y clínicas en pacientes con cáncer de mama

Característica	ADNcl (ng/mL)		MTND1		MTND2		RPS18	
	Mediana (P25-P75)	p	Mediana (P25-P75)	p	Mediana (P25-P75)	p	Mediana (P25-P75)	p
Grupo de edad	496 (389-630) 614 (536-780)	0.002	524.34 (232.34-1181.97) 417.02 (103.56-2038.88)	0.759	647.55 (232.88-1084.31) 618.80 (124.44-1759.47)	0.709	65.32 (36.63-131.98) 79.14 (40.31-138.65)	0.611
Antecedentes oncológicos positivos	555 (457-718) 565 (477.5-699.5)	0.484	490.83 (108.41-1509.46) 383.12 (216.67-1801.85)	0.634	622.59 (130.10-1145.86) 583.43 (203.61-1676.29)	0.731	76.12 (40.34-137.91) 62.94 (36.35-134.45)	0.835
Diabetes mellitus 2	632 (546.50-962) 540 (431-660)	0.111	365.73 (185.76-2180.31) 457.32 (124.74-1162.07)	0.686	261.84 (65.98-2330.26) 690.31 (216.71-1315.60)	0.304	106.72 (37.62-197.29) 67.31 (39.19-129.41)	0.295
Hipertensión	630 (540-981.50) 519 (408-618.50)	0.102	444.59 (146.73-2277.86) 386.12 (125.64-1026.75)	0.986	494.56 (81.68-2899.08) 637.01 (219.51-998.59)	0.785	95.74 (42.49-181.68) 62.07 (35.75-117.39)	0.490
Hipotiroidismo	600 (528-736) 558 (556-688)	0.666	402.69 (206.72-2334.80) 431.87 (122.96-1157.53)	0.666	967.13 (168.71-3303.35) 618.80 (147.07-1174.68)	0.722	45.18 (35.18-134.74) 75.21 (39.0-135.77)	0.629
Obesidad	643 (545.50-928) 537 (418-653)	0.421	399.87 (139.27-1404.88) 593.59 (125.64-1736.32)	0.180	413.05 (120.72-1509.94) 700.96 (211.1-1137.44)	0.313	87.44 (42.49-203.93) 66.32 (36.65-129.41)	0.407

ADNcl: ADN libre circulante; ADNmt: AND mitochondrial; ADNn: ADN nuclear; MTND1: mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1; MTND2: mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2; P25-P75: percentiles 25 y 75; RPS18: ribosomal protein S18.

Tabla 5. Asociación de la concentración de ADNcl, ADNmt y ADNn con las características clínicas y anatomopatológicas

Característica	ADNcl (ng/mL) Mediana (P25-P75)	p	MTND1 (ADNmt) Mediana (P25-P75)	p	MTND2 (ADNmt) Mediana (P25-P75)	p	RPS18 (ADNn) Mediana (P25-P75)	p
Etapas clínicas								
I	560 (521-659)	0.430	618.63 (267.38-2350.86)	0.898	626.37 (135.76-842.25)	0.817	83.28 (27.71-137.21)	0.601
II	664 (534-780)		524.34 (91.48-2477.54)		690.31 (69.03-2791.96)		71.47 (33.47-134.55)	
III	624 (547.5-962)		373.30 (139.37-2102.40)		859.75 (127.17-2310.84)		89.11 (48.48-187.00)	
IV	552 (515-605)		457.32 (349.52-1871.87)		512.58 (354.25-2230.14)		163.50 (56.32-196.26)	
Subtipo molecular								
Triple negativo								
Luminal A	614 (535.5-684.5)	0.415	385.24 (81.95-2685.45)	0.430	546.23 (127.41-1925.99)	0.556	87.44 (41.33-186.12)	0.262
Luminal B	578 (471-950)		227.20 (118.11-1262.10)		429.17 (88.91-152.83)		76.12 (17.48-127.85)	
	632 (551-880)		923.56 (259.74-2126.76)		729.11 (216.54-2354.86)		87.37 (55.83-170.92)	
Histología								
Ductal	616 (533-800)	0.539	524.34 (143.83-2091.59)	0.767	647.65 (128.74-1715.19)	0.927	87.37 (43.84-143.34)	0.150
Lobulillar	592 (530)		1539.19 (267.17)		1362.85 (231.97)		108.95 (54.40)	
Ducto-lobulillar	468 (576)		1333.54 (103.56)		347.70 (69.)		22.04 (10.61)	
Terapia de reemplazo hormonal								
No	628 (556-182)	0.345	1117.74 (527.34-2584.08)	0.029	729.11 (494.96-2354.85)	0.135	87.37 (55.83-137.23)	0.658
Sí	537 (418-681.5)		329.05 (88.30-1026.75)		518.42 (130.89-1024.02)		57.75 (34.08-126.49)	
Tratamiento recibido								
Mastectomía								
No	614 (531-771)	0.840	573.66 (108.41-2170.70)	0.778	658.34 (98.54-1384.99)	0.265	83.16 (40.43-135.46)	0.095
Sí	614 (512-774)		431.87 (227.17-2118.19)		647.65 (280.89-3269.72)		110.06 (50.17-214.16)	
Quimioterapia								
No	614 (531-740)	0.779	490.83 (94.5-2483.02)	0.927	679.63 (113.26-2050)	0.606	85.20 (42.96-174.64)	0.661
Sí	570 (516-1300)		597.36 (173.73-2000.34)		626.37 (147.07-907.36)		84.03 (45.18-129.41)	
Radioterapia								
No	632 (512-850)	0.728	444.59 (161.65-1311.49)	0.599	569.47 (147.41-1041.36)	0.621	106.55 (43.63-146.42)	0.954
Sí	614 (532-736)		549.96 (97.52-2681.35)		729.11 (96.73-2206.52)		83.91 (42.49-155.14)	
Terapia endocrina								
No	598 (511-950)	0.848	560.85 (118.11-1274.84)	0.428	730.36 (104.63-1362.49)	0.829	78.09 (40.66-126.26)	0.115
Sí	616 (537-708)		457.32 (220.17-2681.35)		512.58 (173.72-2206.62)		110.06 (43.32-199.74)	

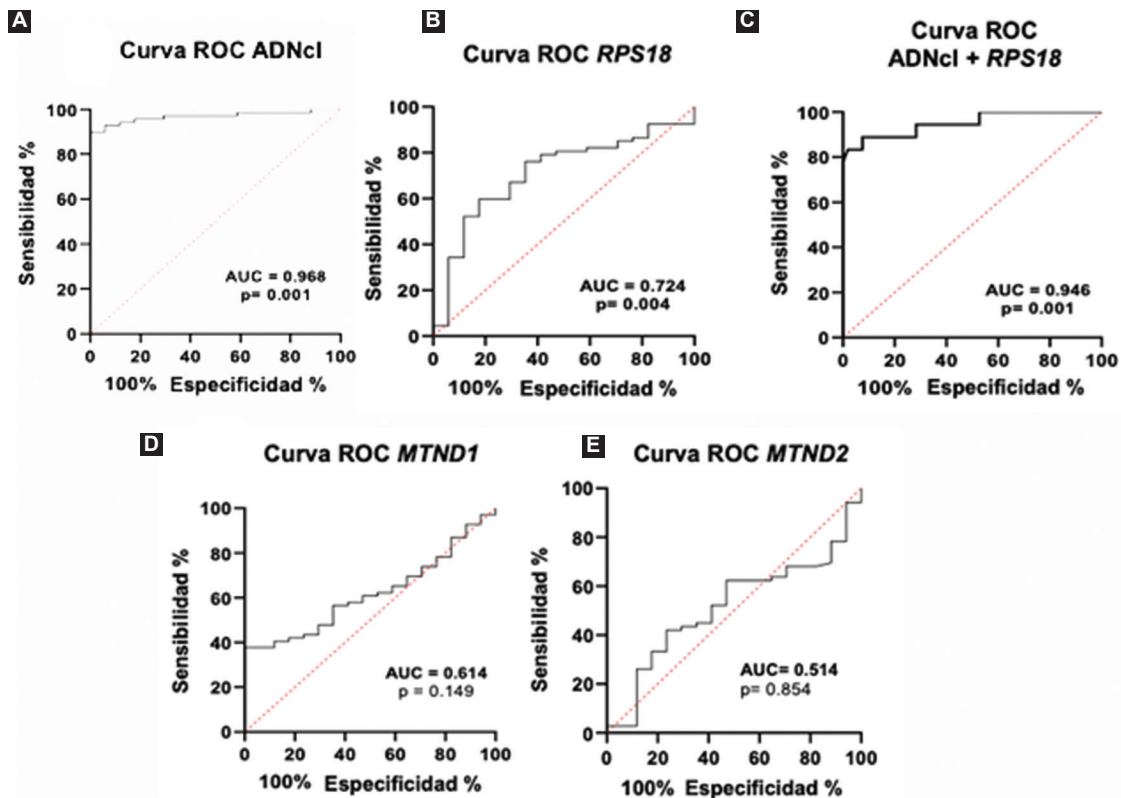


Figura 1. Evaluación de la utilidad diagnóstica por curvas ROC. A: concentración de ADNcl. B: concentración de RPS18. C: concentración de ADNcl y RPS18. D: concentración de MTND1. E: concentración de MTND2. El grupo de control se utilizó como comparación.

diferentes genes de referencia como *GAPDH*: 4678 GE/mL en pacientes con CM *versus* 1298 GE/mL en el grupo de control;¹⁶ 3453.2 copias/ μ L en pacientes con CM *versus* 90 copias/ μ L en el grupo de control;²³ y *B2M*: 6448 copias/ μ L en pacientes con CM *versus* 6071 copias/mL en el grupo de control.⁶ Los niveles elevados de ADNn se han relacionado con la destrucción celular y la apoptosis que ocurren en el tumor, procesos que representan una fuente importante de liberación de ADNcl en el plasma.²³

En la actualidad, una amplia variedad de biomarcadores séricos en las secreciones ductales mamarias son utilizados en CM, si bien no son completamente adecuados para el diagnóstico, control y terapia del CM.²⁴ El más empleado es el antígeno CA 15-3, el cual no es recomendado como marcador para el diagnóstico del CM, ya que sus niveles en etapas tempranas rara vez son más altos de lo normal; su uso está más orientado a la vigilancia y seguimiento de la respuesta al tratamiento, ya que tiene sensibilidad y especificidad subóptimas (77.15 a 47.3 %, respectivamente)²⁵ y se ha reportado AUC (*area under the curve*) = 0.84.²⁶

Otro biomarcador utilizado es el antígeno carcinoembrionario, que si bien no es específico de este tipo de cáncer, se ha relacionado directamente con la etapa clínica de CM;²⁷ sin embargo, también presenta una sensibilidad y especificidad de 82.0 y 38.3 %, respectivamente, y AUC = 0.61.²⁸

En el presente estudio, se encontró un alto valor diagnóstico en la concentración de ADNcl, cuya sensibilidad y especificidad alcanzaron 92.75 y 94.11 %, respectivamente (Figura 1A). Además, se considera que un AUC > 0.90 es indicativa de buena utilidad diagnóstica.²⁹ Por lo tanto, el valor de 0.968 que se identificó en nuestro estudio indicó que la concentración de ADNcl tiene buena precisión diagnóstica para CM. La combinación de ADNcl y ADNn también obtuvo resultados óptimos, ya que la sensibilidad se incrementó hasta 98.03 % y la especificidad alcanzó 81.25 %; además, AUC obtuvo un valor de 0.946 (Figura 1C), por lo tanto, se podría emplear también como biomarcador diagnóstico en CM.

Consideraciones importantes son que la concentración de ADNcl puede incrementarse ante algunas condiciones como inflamación, traumatismos o ejercicio

excesivo;³⁰ que no disponer de pacientes con subtipo molecular HER2 también constituyó una limitación y que un tamaño de muestra mayor puede incrementar el valor en la búsqueda de nuevos biomarcadores para su aplicación futura en la práctica clínica.

Conclusiones

El presente estudio indica que la concentración de ADNcl y el análisis combinado de ADNcl y ADNn tienen un valor diagnóstico potencial para CM por su alta sensibilidad, especificidad y AUC y pueden constituir herramientas de detección óptima para ese tipo de cáncer.

Agradecimientos

Agradecemos a todas las pacientes y controles por su participación en este estudio.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Financiamiento

Este estudio fue apoyado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2020-785-130), el cual proporcionó el recurso económico para su realización.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no realizaron experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes. Además, los autores reconocieron y siguieron las recomendaciones según las guías SAGER dependiendo del tipo y naturaleza del estudio.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores obtuvieron el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Uso de inteligencia artificial para generar textos. Los autores declaran que no utilizaron ningún tipo de inteligencia artificial generativa en la redacción de este manuscrito ni para la creación de figuras, gráficos, tablas o sus correspondientes pies o leyendas.

Bibliografía

1. International Agency for Research of Cancer [Internet]. Globocan. Mexico. Word Health Organization; 2022. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1
2. Manson EN, Achel DG. Fighting breast cancer in low-and-middle-income countries – What must we do to get every woman screened on regular basis? *Sci African*. 2023;21:e01848. DOI: 10.1016/j.sciaf.2023.e01848
3. Uematsu T. Sensitivity and specificity of screening mammography without clinical breast examination among Japanese women aged 40–49 years: analysis of data from the J-START results. *Breast Cancer*. 2022;29(5):928-931. DOI: 10.1007/s12282-022-01353-1
4. Ranucci R. Cell free DNA: applications in different diseases. En: Casadio V, Salvi S, editoras. *Cell-free DNA as diagnostic markers: methods and protocols*. New York: Humana Press; 2019. p. 3-12.
5. Téllez-Gabriel M, Knutsen E, Perander M. Current status of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes in breast cancer liquid biopsies. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9457. DOI: 10.3390/ijms21249457
6. Safi M, Najib AR. Evaluation of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA levels in Syrian patients with breast tumor. *Exp Ther Med*. 2020;21(1):1-7. DOI: 10.3892/etm.2020.9497
7. De Miranda FS, Barauna VG, Dos Santos L, Costa G, Vassallo PF, Campos LCG. Properties and application of cell-free DNA as a clinical biomarker. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17):9110. DOI: 10.3390/ijms22179110
8. Gao Q, Zeng Q, Wang Z, Li C, Xu Y, Cui P, et al. Circulating cell-free DNA for cancer early detection. *Innovation (Camb)*. 2022;3(4):100259. DOI: 10.1016/j.xinn.2022
9. Bidoli E, Virdone S, Hamdi-Cherif M, Toffolutti F, Taborelli Martina, Panato C, et al. Worldwide age at onset of female breast cancer: a 25-year population-based Cancer Registry Study. *Sci Rep*. 2019;9:1-8. DOI: 10.1038/s41598-019-50680-5
10. Hassaine Y, Jacquet E, Seigneurin A, Delafosse P. Evolution of breast cancer incidence in young women in a French registry from 1990 to 2018: towards a change in screening strategy? *Breast Cancer Res*. 2022;24(1):14111. DOI: 10.1186/s13058-022-01581-5
11. Costa L, Kumar R, Villarreal-Garza C, Sinha S, Saini S, Semwal J, et al. Diagnostic delays in breast cancer among young women: an emphasis on healthcare providers. *Breast*. 2024;73:103623. DOI:10.1016/j.breast.2023.103623
12. Miller AB, Wall C, Baines CJ, Sun P, To T, Narod SA. Twenty five year follow-up for breast cancer incidence and mortality of the Canadian National Breast Screening Study: randomised screening trial. *BMJ*. 2014;348:g366. DOI: 10.1136/bmj.g366
13. Jylhävä J, Nevalainen T, Marttila S, Jylhä M, Hervonen A, Hurme M. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. *Aging Cell*. 2013;12(2):388-397. DOI: 10.1111/accel.12058
14. Baek JK, Kim HI, Kang MJ, Seon KE, Kim EH, Seo SK. Relationship between the type of hormone replacement therapy and incidence of breast cancer in Korea. *Climacteric*. 2022;25(5):516-522. DOI: 10.1080/13697137.2022.2077096
15. Weerts MJA, Sleijfer S, Martens JWM. The role of mitochondrial DNA in breast tumors. *Drug Discov Today*. 2019;24(5):1202-1208. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.03.019
16. Kohler C, Radpour R, Barekati Z, Asadollahi R, Bitzer J, Wight E, et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer*. 2009;8:105. DOI: 10.1186/1476-4598-8-105
17. Bukhari A, Khan Z, Ahmad N, Yousafzai Y, Siraj NS, Munir KM, et al. Comparison of methods of isolation and quantification of cell free dna from plasma of patients whit breast cancer. *PJMLS*. 2021;4(4):359-366. DOI: 10.31580/pjmls.v4i4.2435
18. Purnomosari D, Indrayani UD, Irianiwati, Sulistyoningrum DC. Plasma DNA as a potential biomarker for breast cancer detection. *J Thee Med Sci (Berkala Ilmu Kedokteran)*. 2016;48(4):200-205. DOI: 10.19106/JMedSci004804201603
19. Sultana GNN, Akter F, Israfil SMH, Ray UC, Jahan RA, Ali MS, et al. Quantitative analysis of serum cell-free DNA as a predictive and prognostic marker in breast cancer patients. *Front Oncol*. 2023;13:1171412. DOI: 10.3389/fonc.2023.1171412
20. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*. 2019;17:100087. DOI: 10.1016/j.bdq.2019.100087
21. Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Ungerer V, Peters DL, Aucamp J, de Villiers EP, et al. Sequence analysis of cell-free DNA derived from cultured human bone osteosarcoma (143B) cells. *Tumour Biol*. 2018;40(9):1010428318801190. DOI: 10.1177/1010428318801190
22. Xia P, An HX, Dang CX, Radpour R, Kohler C, Fokas E, et al. Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer*. 2009;9:454. DOI: 10.1186/1471-2407-9-454

23. Mahmoud EH, Fawzy A, Ahmad OK, Ali AM. Plasma circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers in the peripheral blood of breast cancer patients. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(18):8299-8305. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.18.8299
24. Tang Z, Li L, Shen L, Shen X, Ju S, Cong H. Diagnostic value of serum concentration and integrity of circulating cell-free DNA in breast cancer: a comparative study with CEA and CA15-3. *Lab Med.* 2018;49(4):323-328. DOI: 10.1093/labmed/lmy019
25. Uygur MM, Gümüş M. The utility of serum tumor markers CEA and CA 15-3 for breast cancer prognosis and their association with clinicopathological parameters. *Cancer Treat Res Commun.* 2021;28:100402. DOI: 10.1016/j.ctarc.2021.100402
26. Hing JX, Mok CW, Tan PT, Sudhakar SS, Seah CM, Lee WP, et al. Clinical utility of tumour marker velocity of cancer antigen 15-3 (CA 15-3) and carcinoembryonic antigen (CEA) in breast cancer surveillance. *Breast.* 2020;52:95-101. DOI: 10.1016/j.breast.2020.05.005
27. Khushk M, Khan A, Rehman A, Sheraz S, Tunio YM, Rehman K, et al. The role of tumor markers: carcinoembryonic antigen and cancer antigen 15-3 in patients with breast cancer. *Cureus.* 2021;13(7):5-10. DOI: 10.7759/cureus.16298
28. Imamura M, Morimoto T, Nomura T, Michishita S, Nishimukai A, Higuchi T, et al. Independent prognostic impact of preoperative serum carcinoembryonic antigen and cancer antigen 15-3 levels for early breast cancer subtypes. *World J Surg Oncol.* 2018;16(1):26. DOI: 10.1186/s12957-018-1325-6
29. Sox HC, Higgins MC, Owens DK. Measuring the accuracy of diagnostic information. En: *Medical decision making.* Wiley-Blackwell; 2013. p. 93-142.
30. Bedin C, Enzo MV, Del Bianco P, Pucciarelli S, Nitti D, Agostini M. Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Int J cancer.* 2017;140(8):1888-1898. DOI: 10.1002/ijc.30565