

Evaluación del ADN circulante tumoral en cáncer de mama

Evaluation of Circulating Tumor DNA in Breast Cancer

Carlos A. Castañeda^{1,a;2,c} , Miluska Castillo^{2,d} , Ximena Quiroz-Gil^{1,b,e} ,
Alexandra Granda-Oblitas^{3,c,e} , Javier Enciso^{1,f} 

¹ Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.

² Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, Lima, Perú.

³ Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

^a Profesor

^b Estudiante

^c Oncólogo clínico, Doctor en Medicina.

^d Químico farmacéutico.

^e Médico cirujano.

^f Veterinario, Maestro en Ciencias Veterinarias.

Citar como:

Castañeda CA, Castillo M, Quiroz-Gil X, Granda-Oblitas A, Enciso J. Evaluación del ADN circulante tumoral en cáncer de mama. Rev Méd Hered. 2025; 36(1): 59-70. DOI: 10.20453/rmh.v36i1.5441

Recibido: 21/05/2024

Aceptado: 10/01/2025

Contribución de autoría:

CAC: concibió la idea original del artículo y diseñó el artículo. MC, XQG y AGO: participaron en la recolección de datos. CAC, MC, XQG, AGO, JE: participaron en el análisis e interpretación de datos y redacción del artículo.

Correspondencia:

Carlos Arturo Castañeda
Correo electrónico:
ccastaneda@gecoperu.org



Artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

© Los autores

© Revista Médica Herediana

RESUMEN

El ADN circulante tumoral (ADNct) evalúa componentes celulares de las neoplasias a través del plasma. El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más frecuente y el estudio del ADNct permite obtener información de la neoplasia de forma mínimamente invasiva. Los pacientes con CM tienen niveles más altos de ADNct que los sujetos sin diagnóstico de cáncer. La detección y los niveles altos de ADNct son más frecuentes en los pacientes con enfermedad metastásica con mayor volumen tumoral y con enfermedad agresiva, como el fenotipo triple negativo y HER2+. El ADNct permite seleccionar el tratamiento dirigido adecuado en la enfermedad metastásica. En el CM temprano, la eliminación del ADNct durante la quimioterapia neoadyuvante se ha asociado con tasas más altas de respuesta patológica completa y una sobrevida prolongada; además, predice la recaída con varios meses de antelación.

PALABRAS CLAVE: ADN, neoplasias de la mama, sobrevida, pronóstico.

SUMMARY

Circulating tumor DNA (ctDNA) evaluates cellular components of cancer cells in plasma. Breast cancer (BC) is the most frequent one. Studying ctDNA is a non-invasive method to assess BC. Patients with BC have higher levels of ctDNA than those without. High ctDNA levels are more frequent in patients with metastatic disease with high tumor burden and with more aggressive disease, such as those with triple-negative phenotype and HER2+. ctDNA allows the selection of target treatment for metastatic disease. Elimination of ctDNA during neoadjuvant chemotherapy in early BC is associated with higher complete response rates and longer survival and also predicts relapses well in advance.

KEYWORDS: DNA, breast neoplasms, survival, prognosis.

INTRODUCCIÓN

Las biopsias líquidas obtenidas de sangre periférica y otros fluidos corporales permiten evaluar el material originado de tumores y examinar biomarcadores circulantes como Células Tumorales Circulantes (CTC), ADN circulante tumoral (ADNct), ARN libre de células, microARN, exosomas, vesículas extracelulares y genes metilados. ⁽¹⁾

El ADN circulante se encuentra en estado fragmentado en el componente sanguíneo libre de células (ADNlc). La utilidad más exitosa de esta investigación ha sido la detección de ADN fetal en la circulación de las mujeres embarazadas, y así descubrir cambios fetales en la línea germinal semanas después de la concepción, incluyendo mutaciones puntuales y aneuploidía ⁽²⁾. Los niveles de ADNlc aumentan cuando existen altos niveles de lesión celular o necrosis y son mucho más altos en pacientes con cáncer que en individuos saludables ⁽¹⁾. El ADNct representa una fracción del ADNlc y puede ser generado por necrosis producida por la infiltración tumoral por fagocitos, apoptosis o liberación activa de las células tumorales. La apoptosis es el fenómeno más común que lo genera y por ello su longitud usual es de 140 a 180 pb. Este proceso produce la liberación pasiva de ADNct en el torrente sanguíneo que depende de la ubicación, tamaño y vascularización del tumor ⁽³⁾. El ADNct tiene una vida media de aproximadamente sólo 2 horas, lo que permite evaluar la respuesta tumoral en forma temprana. Varios estudios de investigación han demostrado que la detección y los niveles de ADNct puede ser un marcador sustituto de la carga tumoral y que la variación en sus niveles se corresponde con la evolución clínica. ^(4,5)

La detección de ADNct requiere superar tres dificultades: la discriminación de ADNct del ADNlc normales y de la hematopoyesis clonal de significado incierto que son mutaciones en las células progenitoras hematopoyéticas (CHIPS de sus siglas en inglés); la presencia de niveles extremadamente bajos de ADNct (hasta el 1,0% del total ADNlc) y la cuantificación precisa del número de fragmentos mutantes en una muestra. ⁽⁶⁾

La discriminación entre ADNct y ADNlc normal se logra al identificar las mutaciones que sólo están en el ADN del tumor. Estas mutaciones somáticas comúnmente son sustituciones individuales de pares de bases. Los métodos más comúnmente utilizados para detectar ADNct son la tecnología basada en secuenciamiento de siguiente generación (NGS) ⁽⁷⁻⁹⁾

y aquella basada en reacción en cadena de polimerasa (PCR). Dentro de la metodología de PCR se incluyen la PCR de tipo gota digital (ddPCR) y la técnica con perlas, emulsión, amplificación y magnetismo (BEAMing). La mutación se informa comúnmente como la fracción (o frecuencia) de alelos variantes para un locus (VAF del término en inglés). El límite de VAF tumoral a partir del cual se puede detectar una alteración es el límite de detección (LoD) de la prueba seleccionada ⁽¹⁰⁻¹⁴⁾. El análisis de ADNct se puede realizar a través de dos procesos potenciales. El primero requiere la identificación de una mutación específica en el tejido tumoral para buscarla y cuantificar el nivel de ADNct en un momento determinado, siendo Signatera™ una prueba comercial disponible que evalúa el tejido tumoral y selecciona las 16 variantes clonales somáticas más relevantes que se utilizan para encontrar ADNct mediante secuenciación de nueva generación (NGS) basada en amplicones en el contexto de la detección de enfermedad residual molecular (ERM) ^(4,5). El enfoque alternativo es evaluar ADNlc para las mutaciones de interés en forma ciega sin evaluar el tejido tumoral. Esta estrategia incluye pruebas comerciales como FoundationOne Liquid CDx, que evalúa más de 300 genes, incluidas las mutaciones de *PIK3CA*, mediante NGS de hibridación/captura ⁽¹⁵⁾, y Guardant360® CDx, que evalúa más de 70 genes, incluidas las mutaciones puntuales en *ESR1* ⁽¹⁶⁾, ambas pruebas cuentan con aprobación de la FDA para enfermedad avanzada ⁽⁷⁻⁹⁾. Además, pruebas como GuardantINFINITY™ demuestran que la adición del análisis de patrones de metilación a las mutaciones somáticas mejora la sensibilidad en la detección de enfermedad residual molecular sin necesidad de analizar el primario. ⁽¹⁷⁾

El CM es el más común y la causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres, y se clasifica según el estado de los receptores hormonales (RH) y HER2 en los siguientes subtipos: Luminal (RH positivo-HER2 positivo y RH positivo-HER2 negativo), HER2 enriquecido (RH negativo-HER2 positivo), y triple-negativo (TNBC de las siglas en inglés, RH negativo-HER2 negativo). ⁽¹⁴⁾

El objetivo de esta revisión fue analizar los estudios más relevantes que han evaluado el papel del ADNct en los diversos subtipos de CM, primero como un biomarcador temprano de respuesta al tratamiento y supervivencia, y posteriormente como un biomarcador para la selección de tratamientos en el cáncer avanzado. Finalmente, se evaluará el papel del ADNct

en la evaluación del riesgo de recurrencia en el CM en etapas tempranas. La información se presenta en forma ordenada por área del conocimiento generado e indicando los resultados relacionados a ADNct que se obtuvieron en cada estudio.

METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda sistemática para identificar todos los registros elegibles; se revisaron las bases de datos PubMed/MEDLINE, Scopus y SciELO hasta diciembre de 2024. Además, para obtener la información más reciente se recuperaron resúmenes de las principales conferencias en cáncer de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO), la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO), el Simposio sobre Cáncer de Mama de San Antonio (SABCS), y la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer (AACR) desde enero de 2023 hasta diciembre de 2024. Se incluyeron solo artículos redactados en inglés o español, y que pertenecían a las categorías de estudios descriptivos retrospectivos, prospectivos o ensayos clínicos. La búsqueda de literatura fue realizada por dos investigadores. Se identificaron los artículos relacionados con ADNct (y biopsia líquida) en pacientes con CM utilizando los términos MeSH “Circulating Tumor DNA”, “DNA, Neoplasm”, “Prognosis”, “Survival Analysis”. Adicionalmente se incluyeron artículos originales referenciados en los artículos encontrados que tenían información relevante pero publicado previamente a los años incluidos en la búsqueda.

Luego de la filtración en las bases de datos, se obtuvo un total de 298 estudios: 111 en PubMed/MEDLINE, 156 en Scopus y 31 de conferencias internacionales. Se descartaron los estudios que no cumplían con los criterios de selección y aquellos que se encontraban duplicados en más de una base de datos. Finalmente, se incluyeron 39 artículos (17 en PubMed, 14 en Scopus y un estudio referenciado) y siete resúmenes (cuatro de AACR, dos de ASCO y uno de SABCS).

Valor pronóstico de ADNct en cáncer de mama metastásico: series clínicas

Las mutaciones más frecuentes encontradas en tejido tumoral y en plasma en pacientes con CM incluyen las que ocurren en los genes *TP53* y *PIK3CA*, así como amplificaciones en *ERBB2* y *EGFR*. En el año 2016, Liang DH et al. ⁽⁴⁾, evaluaron tejido tumoral y plasma a través de NGS en 100 pacientes con CM avanzado y encontraron un buen nivel de correlación entre el tejido tumoral y el ADNct para distintas mutaciones

como variantes de nucleótido único (SNV de las siglas en inglés) y un moderado nivel de correlación para la amplificación de *ERBB2* con un nivel kappa de Cohen de 0,77. Además, encontraron que los cambios en VAF de *TP53* y *PIK3CA* se relacionan directamente con la respuesta tumoral. Finalmente, la presencia de mutación en *TP53* ($p<0,001$) y los niveles altos de *PIK3CA* ($p=0,010$) se asociaron con una menor sobrevida libre de progresión (SLP).

Dos análisis detallados de la concordancia de alteraciones genómicas en ADNct y tejido tumoral de 45 y 41 pacientes con CM evaluado con NGS describen que el tejido tumoral tiene más del doble de alteraciones que el ADNct y que los casos con altas VAF en ADNct tuvieron la mejor concordancia con el tejido. ^(5,13)

El estudio AURORA (NCT02102165) compara el perfilamiento genómico del tumor primario de mama y de la metástasis, así como en ADNct. Un reporte inicial que incluyó 99 pacientes con muestra de plasma encontró al menos una mutación en ADNct en el 60% de los casos y esta se asoció con la frecuencia de variante alélica en el tejido tumoral. Adicionalmente se identificó una alteración con blanco terapéutico de eficacia demostrada (TIER I-II) (*PIK3CA*, *ESR1*, *AKT1* y *ERB2*) en el ADNct y no en los tejidos tumorales en el 11% de los casos. ⁽¹⁸⁾

Una serie retrospectiva con un mayor número de pacientes con CM metastásico ($n=255$) encontró ADNct en el 89% de las pacientes a través de la prueba de NGS Guardant360. Encontró alta concordancia entre la lesión tumoral y el plasma (entre el 79 y 91%). La detección de mutaciones en *ESR1* se asoció al uso previo de inhibidores de aromatasa (IA) ($p<0,001$). La mayoría de las mutaciones en *ERBB2* fueron amplificaciones y se concentraron en el grupo de pacientes HER2 positivo; mientras que los otros tipos de mutación *ERBB2* se presentaron en el grupo Luminal HER2-. La VAF y el número de alteraciones detectadas se asociaron significativamente con el número de lugares metastásicos ($p<0,001$). Los pacientes con tumores TNBC tuvieron las VAF más altas ($p<0,05$). ⁽¹⁹⁾

Algunos estudios han evaluado específicamente la detección del gen *ESR1* en ADNct debido a ser un blanco terapéutico de diferentes agentes. ⁽²⁰⁾

Urso L et al. ⁽²¹⁾, evaluaron 43 tumores metastásicos RH+ HER2- en que se tomó muestras pareadas de la

lesión tumoral metastásica y del plasma (con ddPCR) al momento de la progresión. Encontraron la mutación *ESR1* en 6 de las lesiones metastásicas y en 4 de estos casos se detectó también en ADNct, adicionalmente se logró obtener la mutación en ADNct de 3 casos sin la mutación en la lesión tumoral. La concordancia entre tejido tumoral y plasma fue de 91%.

Finalmente, Gerratana L et al. ⁽²²⁾, evaluaron la asociación entre la mutación *ESR1* y otras mutaciones a través de NGS en ADNct en una serie de 703 pacientes con CM metastásico luminal. Ellos encontraron que la mutación *ESR1* 537 se asoció a SNV en vías de RE y RAF, así como con variantes en número de copias (CNV de las siglas en inglés) en la vía MYC y a metástasis óseas, mientras que mutación en *ESR1* 538 se asoció con SNV en vía del ciclo celular y metástasis hepáticas. Asimismo, mutaciones en *PIK3CA* 1047 y 542 se asociaron con metástasis óseas y con CNV en la vía de PI3K.

En nuestro país se ha realizado el análisis de ADNct a través de Droplet PCR en plasma de 183 pacientes evaluados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Se detectó la presencia de mutaciones en *PIK3CA* en ADNct en 35% de los casos y esta se asoció a niveles bajos de linfocitos intratumorales, tuvo tendencia a asociarse con estadios clínicos avanzados ($p=0,090$) y con altas tasas de recurrencia ($p=0,053$) en casos no metastásicos. Se encontró también que el número de copias y la fracción alélica fue mayor en los casos con recaída. ⁽²³⁾

Adicionalmente en un subgrupo de 24 tumores TNBC se determinó en simultáneo la presencia de CTC a través del análisis de genes y se encontró que la co-presencia de ADNct (29%) y CTC+ se asoció con un peor pronóstico ⁽²⁴⁾. Estos trabajos indican la factibilidad de realizar detección de ADNct en nuestro país y la utilidad que pueden tener en el manejo de los pacientes. ⁽²³⁾

Valor pronóstico de ADNct en cáncer de mama metastásico: ensayos clínicos

Los ensayos clínicos que evalúan inhibidores de ciclinas asociados con la terapia hormonal incluyeron la recolección y almacenamiento de muestras de plasma para análisis posterior de ADNct. Estos estudios coinciden en que el estudio del ADNct predice el pronóstico de las pacientes, a continuación, se describen las peculiaridades de estos. El ensayo PALOMA-3 es un ensayo clínico fase III que encontró que agregar palbociclib a fulvestrant incrementó la sobrevida libre de progresión (SLP) en CM Avanzado

Luminal HER2- pretratado con terapia anti hormonal. El estudio de ADNct mediante NGS en plasma tomado previo al inicio del tratamiento en 459 de estos pacientes encontró que una $VAF \geq 10\%$ de ADNct (38,9%) se asoció a una menor SLP en el análisis univariado ($p=0,004$) y en el multivariado ($p<0,001$) ⁽²⁵⁾. La reducción en los niveles de *PIK3CA* analizado a través de ddPCR en ADNct en los primeros 15 días predijo una mayor SLP en los pacientes que recibieron fulvestrant y palbociclib ($p=0,001$). ⁽²⁶⁾

Pascual J et al. ⁽²⁷⁾ evaluaron ADNct en forma seriada en 201 pacientes con CM avanzado Luminal HER2- que ingresaron al ensayo PEARL, y no encontraron diferencias en SLP entre la combinación palbociclib y fulvestrant versus capecitabina. Se detectó ADNct a través de NGS en el 73% de muestras basales, y confirmó que este se asocia a una menor SLP (mediana de 7,23 meses vs. 14,75; $p<0,01$) y global (SG) (mediana de 23,26 meses vs. no alcanzada; $p<0,01$). La detección de la mutación *TP53* se asoció a una menor SLP. La negativización temprana de ADNct se asoció a una mayor SLP.

Arpino G et al. ⁽⁷⁾ evaluaron ADNct a través de NGS en muestras seriadas de plasma de 287 mujeres postmenopáusicas con CM avanzado Luminal HER2- incluidas en el ensayo BioltaLEE con ribociclib-letrozole como terapia inicial. Encontraron ADNct en las muestras basales en 43% y apareció recién en muestras posteriores en otros 22,7% de los pacientes. Su presencia nuevamente se asoció a una menor SLP, mientras que los casos con negativización rápida de ADNct se asociaron con mayor sobrevida.

Un análisis reciente evaluó más de 550 genes en ADNct en muestras seriadas de plasma de pacientes incluidos en los ensayos clínicos MONALEESA-2, -3 y -7 que demostraron la eficacia de agregar ribociclib al manejo hormonal en CM avanzado Luminal HER2- ($n=1674$) y detectó ADNct con $VAF \geq 1\%$ en 62% de las muestras basales, lo cual se asoció a menor SLP. Encontraron que las alteraciones basales en *ERBB2*, *FAT3*, *FRS2*, *MDM2*, *SFRP1* y *ZNF217* identificaron los casos que se benefician de ribociclib y con pobre pronóstico con el placebo. Las alteraciones en *ANO1* (14%), *CDKN2* (3%) y *RB1* (3%) se asociaron a resistencia a ribociclib. Los pacientes con alteraciones en *ESR1*, *BRCA1* y *NF1* también obtuvieron beneficio del uso de ribociclib ⁽²⁸⁾. El análisis de las muestras seriadas encontró un incremento en las alteraciones en *RB1* y *SPEN* en las muestras al momento de la progresión vs el estudio inicial en el brazo de ribociclib. Se encontró un

acumulo en alteraciones de *ESR1* (30,9% vs 8,8%), *RB1* (10% vs 1,6%), *SPEN* (8% vs 3,6%), *TPR*, *PCDH15*, y *FGFR2* en las muestras a la progresión en comparación con las basales en el brazo de ribociclib. Aunque el acumulo para *ESR1* fue mayor en el grupo placebo (32,5% vs 6,6%).⁽²⁹⁾

El estudio de ADNct a través de la prueba Guardant360 en muestras de plasma seriadas de pacientes incluidos en MONARCH-3 y NextMONARCH-1 que demostraron beneficio del uso de abemaciclib asociado o no con un IA en CM avanzado Luminal HER2-, detectan ADNct en 81% y 90% de las muestras iniciales. Los pacientes que recibieron abemaciclib desarrollaron más alteraciones en *RB1* (5-9%), *MYC* (5-9%) y *AR* (5%) a la progresión y menos mutaciones en *ESR1* que los pacientes que recibieron placebo⁽⁹⁾. En forma similar, el análisis de la información del ensayo MONARCH-2, encontró que la presencia (utilizando ddPCR) de mutaciones en *ESR1* (59,3%) y *PIK3CA* (43,8%) en plasma no alteran la sensibilidad a abemaciclib.⁽³⁰⁾

Algunas series también muestran la utilidad del monitoreo de ADNct en tumores HER2+. Guan X et al.⁽³¹⁾ describieron una serie de 105 pacientes (31 en seguimiento) con CM avanzado y encontraron que el 77% de los 57 casos HER2+ presentaron amplificación en plasma (con un umbral de $\geq 2,22$) mediante NGS. Se observó que una amplificación de alto nivel (con un umbral de ≥ 4) en el número de copias de *ERBB2* en plasma se asoció con una mayor respuesta a la terapia anti-HER2, y la persistencia de la amplificación a las 6 semanas de terapia predijo una menor SLP. De manera similar, Jacobs SA et al.⁽³²⁾ encontraron mayor supervivencia con la amplificación basal de *ERBB2* (con un umbral de $\geq 2,14$) determinada mediante el ensayo Guardant360 y una menor supervivencia con la persistencia de la amplificación de ADNct durante el tratamiento de rescate con TDM1-Neratinib en 42 pacientes con CM metastásico previamente tratados con trastuzumab y pertuzumab.

Ma CX et al.⁽³³⁾ evaluaron 16 pacientes con CM avanzado con mutaciones en *ERBB2* distintas a la amplificación (la más frecuente fue L755S) en tejido tumoral que recibieron neratinib y obtuvieron beneficio clínico en 31%. Adicionalmente, se detectó la misma mutación en el plasma de 11/14 casos a través de la prueba Guardant360 y se encontró una concordancia del 93,5% con el tejido tumoral y la reducción en la frecuencia alélica de ADNct durante el tratamiento (e incremento durante progresión).

Rol de ADNct para seleccionar el tratamiento en cáncer de mama metastásico

Ensayos clínicos más recientes incluyen ADNct para seleccionar los pacientes que ingresarán a randomización o aleatorización y así definir el beneficio de terapias en subgrupos identificados a través de ADNct.

En el estudio SOLAR-1 se encontró incremento en la SLP y de la SG al agregar alpelisib a fulvestrant en 341 pacientes con CM avanzado Luminal HER2-, que progresaron a IA y tenían mutaciones en *PIK3CA* detectadas en el tumor primario. El beneficio en la SLP se mantuvo en los pacientes con presencia de la mutación en ADNct evaluado por NGS, así como en los que se logró encontrar la mutación por ddPCR (n=88 de 168) (HR= 0,44). El beneficio también se encontró en la SG en aquellos pacientes con presencia de ADNct (HR= 0,72)⁽³⁴⁾. Esto llevó a que la FDA aprobara la prueba FoundationOne Liquid CDx en octubre de 2020 para identificar pacientes con CM HR positivo y HER2 negativo que presentan mutaciones en *PIK3CA*⁽³⁵⁾.

Un análisis similar se realizó en el ensayo BYLieve que evaluó la combinación de alpelisib con fulvestrant (Cohorte A) o IA (Cohorte B) en pacientes con CM avanzado Luminal HER2- y mutación para *PIK3CA* que había recibido inhibidores CDK4/6 con el agente hormonal contrario. Se corroboró las mutaciones en *PIK3CA* en todas las muestras de plasma (ADNct), mientras que la mutación *ESR1* se detectó en el 26% de las muestras. La mutación *ESR1* se asoció a una menor SLP en la cohorte B (que utilizó IA) mas no en la cohorte A⁽³⁶⁾. Encuentran también una relación entre baja VAF de ADNct y sobrevida.⁽³⁷⁾

El ensayo de fase 3 INAVO120 demostró que la adición de inavolisib (un inhibidor selectivo de la isoforma alfa de la subunidad p110) a palbociclib y fulvestrant en CM luminal avanzado con mutación en *PIK3CA*, que progresó tras IA, mejora la supervivencia libre de progresión (PFS) (15 meses vs 7,3 meses, $p < 0,001$) y la tasa de respuesta objetiva (58,4% vs 25%). La mayoría de las determinaciones de mutación en *PIK3CA* se realizaron en ADNct⁽³⁸⁾, lo que llevó a que la FDA aprobara FoundationOne Liquid CDx en octubre de 2024 para identificar pacientes con CM HR positivo y HER2 negativo con mutaciones en *PIK3CA*.⁽³⁹⁾

Recientemente, el ensayo de fase 3 CAPItello-291 demostró que la adición de capivasertib (un inhibidor pan-AKT) a fulvestrant mejora la SLP en CM

avanzado HR+ HER2- con alteraciones en la vía AKT (*PIK3CA*, *AKT1* o *PTEN*) que progresaron tras tratamiento con IA con o sin inhibidores de ciclinas. Aunque el ensayo evaluó el estado de la vía en muestras de tejido utilizando FoundationOne CDx, una presentación de póster en la Reunión Anual de ASCO 2024 describió que el estado de la vía AKT evaluado con FoundationOneLiquidCDx basado en sangre mostró una alta concordancia en casos con una fracción tumoral de ADNct $\geq 1\%$.⁽⁴⁰⁾

La utilidad de fulvestrant en tumores luminales con mutación de *ESR1* en ADNct ha sido evaluado en muestras de plasma de pacientes ingresados a los ensayos clínicos fase III EFACT y SoFEA. Se incluyeron pacientes con CM metastásico RH+ que han progresado a IA no esteroideos y fueron randomizadas a fulvestrant 250 mg versus exemestane. Encuentran mutación de *ESR1* a través de ddPCR en 30% y en este grupo la SLP fue superior para fulvestrant que para exemestane (3,9 versus 2,4 meses, $p=0,01$) sin diferencia en el grupo sin mutaciones ($p=0,69$).⁽⁴¹⁾

Recientemente, el ensayo PADA-1 ($n=1\,017$) fue diseñado para evaluar si la detección de mutación en *ESR1* en ADNct puede seleccionar pacientes con CM Luminal HER2- que reciben IA asociado con palbociclib se beneficien de cambiar a fulvestrant. Las pacientes con la mutación en el ADNct sin evidencia de metástasis en las imágenes fueron randomizadas a continuar con el IA o cambiar a fulvestrant siempre asociado con palbociclib VO hasta la progresión por imágenes. Se encontró que la mediana de SLP incrementó de 5,7 a 11,9 meses al cambiar a fulvestrant ($p=0,004$).⁽⁴²⁾ La detección de mutación en *ESR1* se realizó con ddPCR y la tipificación se realizó con NGS. Se incluyeron 172 pacientes que desarrollaron aparición de *ESR1* sin progresión por imágenes. El tipo de mutación más frecuente en *ESR1* fue Y537S ($n=36$, 37,9%). Luego del cambio a fulvestrant se encontró un incremento en la tasa de negativización de *ESR1* a los 2 meses (70,9% vs 32,8%, $p<0,001$), en la duración del periodo que se mantiene con la negativización ($p<0,001$) y la duración de la SLP al cambio a fulvestrant comparado con el grupo que se mantuvo en IA ($p<0,001$).⁽⁴³⁾

En el ensayo clínico plasmaMATCH se evaluaron mutaciones en ADNct con blancos terapéuticos y se clasificó en 4 cohortes a 1 034 pacientes avanzados luego de progresión al menos a una línea previa: Cohorte A (mutaciones en *ESR1* asignados a tratamiento con fulvestrant), B (mutaciones en *ERBB2* asignados a

neratinib +/- fulvestrant), C (mutaciones en *AKT1* en RH positivo, asignados a capivasertib + fulvestrant) y D (mutaciones en *AKT1* o en *PTEN* en RH negativo). El análisis de ADNct mostró que la metodología ddPCR detectó de 93 a 98% de las mutaciones encontradas por secuenciamiento en biopsias tumorales. Las cohortes B y C obtuvieron tasas de respuesta de 22- 25%, mientras que la cohorte A obtuvo respuestas de 8%⁽⁴⁴⁾. Un análisis extenso de las muestras de plasma de la cohorte A ha sido recientemente publicado y demuestran que mutaciones específicas como F404 en *ESR1* en ADNct generan resistencia a fulvestrant y son blanco terapéutico en el desarrollo de nuevas drogas.⁽⁴⁵⁾

Finalmente, Bardia A et al.⁽⁴⁶⁾ presentaron en el congreso anual de San Antonio 2023 los resultados del estudio EMERALD ($n=478$) que encuentra una mayor SLP con el uso de elacestrant vs terapia endocrina estándar en pacientes que han progresado a terapia endocrina e inhibidores de ciclina previos en la población total y en el subgrupo con mutaciones en *ESR1* en plasma a través de la prueba Guardant360 donde obtuvo un mejor Hazard ratio⁽⁴⁶⁾. Por lo tanto, la FDA aprobó en enero de 2023 la prueba de biopsia líquida Guardant360® CDx para la detección de mutaciones *ESR1* en pacientes con CM avanzado ER+ HER2-.⁽⁴⁷⁾

Evaluación de ADNct en cáncer de mama no-metastásico

La cirugía de resección cura más de la mitad de los pacientes con enfermedad localizada y se administra terapia sistémica complementaria en los casos con presencia de factores clínicos, patológicos y moleculares de alto riesgo. Uno de los factores asociados con la recurrencia es la ausencia de respuesta patológica completa (RCp) luego de la quimioterapia neoadyuvante (NAC de las siglas en inglés). Sin embargo, no tenemos medios actuales eficaces para identificar qué pacientes tienen enfermedad micrometastásica no detectable con estudios de imágenes que eventualmente desarrollaran recurrencia de la enfermedad. Diferentes series describen el rol de la detección de ADNct como predictor de recurrencia en pacientes operados de inicio o en aquellos que no obtienen RCp luego de NAC.

Garcia-Murillas I et al.⁽¹⁰⁾ evaluaron una cohorte prospectiva de 144 pacientes con CM temprano que previamente recibieron NAC o adyuvante. Se secuenció las muestras tumorales, se seleccionó algunas mutaciones y se realizó estudio de ddPCR en muestras

de plasma en el momento del diagnóstico, luego de la cirugía y durante el seguimiento (cada 3 meses en el primer año y cada 6 meses luego). Los tumores TNBC seguidos de los que tenían HER2+ tenían los niveles basales más altos de ADNct. La presencia de ADNct en la muestra basal se asoció a tamaño tumoral mayor y alto grado histológico, así como mayor tasa de recurrencia. Encontraron que la detección de ADNct durante el seguimiento predice la detección de recurrencia clínica ($p < 0,001$) con una mediana de 10,7 meses de anticipación a la lesión clínica.

Coombes RC et al. ⁽⁴⁸⁾ evaluaron el ADNct mediante el ensayo Signatera™ en 49 pacientes con CM temprano que se sometieron a cirugía y tratamiento adyuvante. El ADNct se evaluó cada 6 meses durante 4 años y fue positivo en 16 de los 18 pacientes que recayeron, pero en ninguno de los casos sin recaída (tiempo medio desde el ADNct positivo hasta la detección de la recurrencia por imágenes: 8,9 meses).

De manera similar, la serie recientemente publicada EBLIS ⁽⁴⁹⁾ evalúa el ADNct seriado (Signatera™) en 156 pacientes con CM que se sometieron a cirugía y quimioterapia adyuvante. El ADNct positivo se asoció con una menor supervivencia libre de recaída (SLR) y una menor SG ($p < 0,0001$). Todos los casos con recaída ($n=7$) (pero ninguno de los 16 sin recaída) de TNBC tuvieron un resultado positivo de ADNct. En el grupo Luminal, cuatro casos con recaída no presentaron ADNct positivo y 5 casos sin recaída ($n=122$) tuvieron al menos un resultado positivo de ADNct.

Loi S et al. ⁽⁵⁰⁾ presentaron el análisis de ADNct (Signatera™) en 910 casos de CM temprano que participaron en el ensayo monarchE. El ensayo monarchE demostró que la adición de 2 años de abemaciclib adyuvante en pacientes con CM luminal de alto riesgo resecado conduce a un aumento en la supervivencia libre de enfermedad invasiva. El ADNct se analizó periódicamente durante 24 meses, se detectó en 152 casos (17%), y estos presentaron tasas más altas de eventos invasivos en comparación con los casos ADNct negativos (87% frente a 15%). Los casos que lograron negativización del ADNct durante el seguimiento tuvieron una supervivencia libre de enfermedad invasiva más baja en comparación con aquellos que permanecieron positivos (42% frente a 100%).

Riva F et al. ⁽¹¹⁾, realizaron un análisis por secuenciamiento en 38 tumores TNBC localmente avanzado que recibieron NAC con antraciclinas y

taxanos y evaluaron mutaciones en *TP53* en ADNct a través de ddPCR en muestras pre-NAC, durante NAC y luego de cirugía. Detectaron ADNct en 75% en las muestras preNAC y la caída lenta en los niveles de ADNct durante la NAC se asoció a una menor SLR.

Chen YH et al. ⁽⁵¹⁾ secuenciaron 33 tumores de pacientes con CM TNBC que recibió NAC y no obtuvo RCp. Se detectó ADNct en 4 pacientes y todos ellos desarrollaron recurrencias, sin embargo, 9 pacientes adicionales desarrollaron recurrencia sin haberse detectado ADNct. Los pacientes con presencia de ADNct tuvieron una menor SLR ($p < 0,0001$).

Zhou Q et al. ⁽⁵²⁾ secuenciaron muestras tumorales y de plasma de 145 pacientes con CM RH+/HER2- y TNBC temprano ingresadas al ensayo clínico ABCSG34 que recibieron NAC con antraciclinas y taxanos vs IA. Se detectó ADNct en 43,4% en las muestras antes del inicio de la neoadyuvancia y en 23,8% de las muestras de plasma al culminar ésta. La presencia y niveles altos basales de ADNct se asoció con estadios clínicos mayores de T y N, con niveles altos de linfocitos infiltrantes tumorales y con alto ki67, así como con una tendencia a altos scores en la prueba EndoPredict. De 31 pacientes con presencia de ADNct a la mitad de la NAC, el 97% no tenían respuesta patológica (Residual Cancer Burden (RCB) II o III). Ninguno de los pacientes con RCp y solo 6,7% de aquellos con RCB I tuvieron presencia de ADNct a la mitad de la NAC.

Rothe F et al. ⁽⁵³⁾ evaluaron la presencia de ADNct en 455 pacientes con CM HER2+ localmente avanzados que recibieron neoadyuvancia con trastuzumab-lapatinib en el ensayo clínico NeoALTTO. Evaluaron mutaciones en *PIK3CA* y *TP53* en el tumor basal y en muestras consecutivas de plasma. La presencia de ADNct fue detectada en 41%, 20%, and 5% de los casos antes del inicio, durante y al término de NAC. La presencia de ADNct antes del inicio de NAC se asoció a mayor edad, RH-negativo y menores tasas de RCp ($p=0,0089$).

Finalmente, diferentes ensayos clínicos que evalúan terapias dirigidas en escenario neoadyuvante han incorporado la toma de muestras de plasma para evaluar el valor pronóstico de ADNct en enfermedad temprana.

Magbanua MJM et al. ⁽⁵⁴⁾ aislaron ADNct del plasma (antes, durante y después de la NAC) en los pacientes con CM temprano HER2- de alto riesgo tratados en el ensayo neoadyuvante I-SPY 2 TRIAL con NAC

(paclitaxel semanal en la mayoría de casos) sólo o combinado con el agente de investigación. Realizaron una publicación inicial con 84 pacientes en el que el agente que se adiciona fue un inhibidor de AKT (MK-2206) y recientemente un análisis de 283 pacientes incluidos en la cohorte de expansión del ensayo en que se agregó distintos agentes a los taxanos base. En la cohorte de expansión se encontró ADNct a través de la prueba Signatera™ en 69% de las muestras iniciales en RH+ y en 91% de los 137 casos TNBC ingresados. La presencia de ADNct se asoció a factores de agresividad como mayor tamaño tumoral, compromiso ganglionar, alto grado y altos scores en la prueba MammaPrint (en el grupo RH+). La tasa de detección disminuyó progresivamente durante la NAC y predijo RCp en el grupo TNBC. La casi totalidad de los casos que alcanzaron RCp tuvieron ausencia de ADNct después de NAC. Para los pacientes que no alcanzaron RCp, la presencia de ADNct se asoció con recurrencia y su ausencia se asoció a un excelente pronóstico.

Radovich M et al. ⁽⁵⁵⁾ evaluaron 196 pacientes incluidas en el ensayo fase-2 BRE12-158 que evaluó el uso de terapia blanco versus terapia de elección en pacientes con TNBC con enfermedad residual luego de NAC. La presencia de ADNct se detectó con la prueba FoundationOne®Liquid y se asoció a una menor SLR a distancia (32,5 meses vs no alcanzado, $p=0,006$). Adicionalmente evaluaron CTC en las muestras de plasma y encontraron que los pacientes que tuvieron ambas características tuvieron una menor mediana de SLR a distancia que los que eran ADNct negativo y CTC negativo (32,5 meses vs no alcanzada; $p=0,009$). Esta misma asociación se encontró para SLR ($p=0,04$) y sobrevida global ($p=0,007$).

Turner NC et al. ⁽⁵⁶⁾ incluyeron 161 pacientes con TNBC EC II-III que recibieron quimioterapia adyuvante o NAC y no alcanzaron RCp en el ensayo c-TRAK TN. Una cohorte de las pacientes recibió pembrolizumab adyuvante. Se realizó secuenciamiento en el tumor y se seleccionó uno o dos genes para realizar el estudio seriado de ADNct a través de ddPCR cada 3 meses durante al menos 12 meses. Se detectó ADNct en 44 casos (27%). Ninguno de los pacientes con presencia de ADNct que recibieron pembrolizumab obtuvieron desaparición de ADNct. Los pacientes con presencia de ADNct tuvieron una alta probabilidad de desarrollar metástasis.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El ADNct representa una fracción del ADNcl y su análisis permite conocer características de las células

malignas. Su análisis se puede realizar a través de NGS o técnicas de PCR. Los genes más frecuentemente mutados en el ADNct son *TP53*, *PIK3CA*, amplificación de *ERBB2* (más frecuente en HER2 enriquecido) y *ESR1* (más frecuente en pacientes tratados con IA). Diferentes estudios describen una alta correlación entre la presencia de mutaciones en ADNct y biopsias de lesiones tumorales. Sin embargo, la presencia de mutaciones en ADNct y no en la biopsia tumoral representaría la presencia de subclonas con mutaciones específicas en alguna de las lesiones metastásicas diferentes a la de la biopsia. ^(14,17)

Los diferentes ensayos clínicos que lograron demostrar beneficio de agregar inhibidores de ciclinas a hormonoterapia describen que los niveles bajos de ADNct previos al inicio de la terapia y su reducción o desaparición en el plasma se asociaron con una mayor SLP. La aparición de algunas mutaciones en ADNct como *RBI* a la progresión a inhibidores de ciclinas identifican mecanismos de resistencia. La asociación fue similar al utilizar terapia blanco antiHER2 en pacientes con mutación en la vía molecular. ^(26,27,30)

Ensayos clínicos recientes encuentran que la presencia de mutación en *PIK3CA* o *ESR1* en ADNct permite identificar pacientes que se benefician del uso de terapia blanco, y logran obtener la aprobación del uso de alpelisib ^(37,57), inavolisib ⁽³⁸⁾ y elacestrant por la agencia FDA solo en los que se demuestre la mutación en el ADNct ^(46,58,59). Sin embargo, el beneficio asociado con la detección de la mutación requiere ser analizado en el escenario de clonas y subclonas, y la presencia en plasma de al menos dos tipos de mutaciones distintas en *PIK3CA* podría seleccionar pacientes con el mayor beneficio a terapia dirigida contra este gen. ⁽⁶⁰⁾

El estudio de ADNct en CM temprano permite también identificar aquellos casos que responderán más a NAC y aquellos con menor riesgo de recurrencia. Sin embargo, sus niveles de precisión no son exactos y aun casos en que se detecta su presencia no desarrollan metástasis. La mejora en técnicas moleculares para su detección y caracterización permitirán mejorar su sensibilidad y especificidad. ^(10,52)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

2. Lo YMD, Chiu RWK. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012; 13:285–306. doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163806
3. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PloS One.* 2011;6(9):e23418. doi: 10.1371/journal.pone.0023418
4. Liang DH, Ensor JE, Liu Z bin, Patel A, Patel TA, Chang JC, et al. Cell-free DNA as a molecular tool for monitoring disease progression and response to therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2016; 155:139–49. doi: 10.1007/s10549-015-3635-5
5. Xu B, Shan G, Wu Q, Li W, Wang H, Li H, et al. Concordance of genomic alterations between circulating tumor DNA and matched tumor tissue in Chinese patients with breast cancer. *J Oncol.* 2020 Aug 27; 2020:4259293.. doi: 10.1155/2020/4259293
6. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985–90. doi: 10.1038/nm.1789.
7. Arpino G, Bianchini G, Malorni L, Caputo R, Zambelli A, Puglisi F, et al. 199P Correlation of circulating tumor DNA (ctDNA) or thymidine kinase activity (TKa) dynamic patterns with tumor response in patients (pts) with hormone receptor (HR)+ human epidermal growth factor 2 (HER2)–advanced breast cancer (ABC) on ribociclib (RIB)+ letrozole (LET) in BioItaLEE trial. *ESMO Open.* 2023;8(1): 101388. DOI: 10.1016/j.esmoop.2023.101388
8. Andre F, Solovieff N, Su F, Bardia A, Neven P, Yap YS, et al. Abstract P5-02-14: Identification of mechanisms of acquired resistance to ribociclib plus endocrine therapy using baseline and end-of-treatment circulating tumor DNA samples in the MONALEESA-2,-3, and-7 trials. *Cancer Res.* 2023;83(5_Supplement):P5-02.
9. Goetz MP, Hamilton EP, Campone M, Hurvitz SA, Cortes J, Johnston S, et al. Landscape of baseline and acquired genomic alterations in circulating tumor DNA with abemaciclib alone or with endocrine therapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2023;OF1–12. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-3573.
10. Garcia-Murillas I, Chopra N, Comino-Méndez I, Beaney M, Tovey H, Cutts RJ, et al. Assessment of molecular relapse detection in early-stage breast cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5(10):1473–8. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.6325.
11. Riva F, Bidard FC, Houy A, Saliou A, Madic J, Rampanou A, et al. Patient-specific circulating tumor DNA detection during neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Clin Chem.* 2017;63(3):691–9. doi: 10.1373/clinchem.2016.262337.
12. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(15):8817–22. doi: 10.1073/pnas.1133470100.
13. Chae YK, Davis AA, Jain S, Santa-Maria C, Flaum L, Beaubier N, et al. Concordance of genomic alterations by next-generation sequencing in tumor tissue versus circulating tumor DNA in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(7):1412–20. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0061.
14. Payet-Meza E, Peerez-Mejia P, Poquioma-Rojas E, Díaz Nava E, Rojas Vilca J. Registro de cáncer de lima metropolitana. incidencia y mortalidad 2013–2015 [Internet]. Lima: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplasicas; [citado 6 de julio 2022]. Disponible en: <https://portal.inen.sld.pe/wp-content/uploads/2022/01/REGISTRO-DE-CANCER-DE-LIMA-METROPOLITANA-2013-2015.pdf>
15. Woodhouse R, Li M, Hughes J, Delfosse D, Skoletsky J, Ma P, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PloS One.* 2020;15(9):e0237802. doi: 10.1371/journal.pone.0237802.
16. Abbasi HQ, Maryyum A, Khan AM, Shahnoor S, Oduoye MO, Wechuli PN. Advancing precision oncology in breast cancer: the FDA approval of elacestrant and Guardant360 CDx: a correspondence. *Int J Surg.* 2023;109(7):2157–8. doi: 10.1097/JS9.0000000000000334
17. Janni W, Friedl T, Rack B, Fasching PA, Hartkopf A, Tesch H, et al. Abstract PS06-06: Analysis of ctDNA for the detection of minimal residual disease (MRD) using a tissue-free, multiomic assay in patients with early-stage breast cancer. *Cancer Res.* 2024;84(9_Supplement):PS06-06.
18. Aftimos P, Oliveira M, Irrthum A, Fumagalli D, Sotiriou C, Gal-Yam EN, et al. Genomic and Transcriptomic Analyses of Breast Cancer Primaries and Matched Metastases in AURORA,

- the Breast International Group (BIG) Molecular Screening Initiative. *Cancer Discov.* 2021 Nov 1;11(11):2796–811. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1647.
19. Davis AA, Jacob S, Gerratana L, Shah AN, Wehbe F, Katam N, et al. Landscape of circulating tumour DNA in metastatic breast cancer. *EBioMedicine.* 2020;58: 102914. doi: 10.1016/j.ebiom.2020..
20. Li X, Lu J, Zhang L, Luo Y, Zhao Z, Li M. Clinical implications of monitoring ESR1 mutations by circulating tumor DNA in estrogen receptor positive metastatic breast cancer: a pilot study. *Transl Oncol.* 2020;13(2):321–8. doi: 10.1016/j.tranon.2019.11.007.
21. Urso L, Vernaci G, Carlet J, Lo Mele M, Fassan M, Zulato E, et al. ESR1 gene mutation in hormone receptor-positive HER2-negative metastatic breast cancer patients: concordance between tumor tissue and circulating tumor DNA analysis. *Front Oncol.* 2021;11:625636. doi: 10.3389/fonc.2021.625636.
22. Gerratana L, Davis AA, Velimirovic M, Clifton K, Hensing WL, Shah AN, et al. Interplay between ESR1/PIK3CA codon variants, oncogenic pathway alterations and clinical phenotype in patients with metastatic breast cancer (MBC): comprehensive circulating tumor DNA (ctDNA) analysis. *Breast Cancer Res.* 2023;25(1):112. doi: 10.3389/fonc.2021.625636.
23. Castaneda CA, Castillo M, Bernabe LA, Suarez N, Romero A, Sanchez J, et al. Association between PIK3CA Mutations in Blood and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Peruvian Breast Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2022;23(10):3331-3337. doi: 10.31557/APJCP.2022.23.10.3331
24. Gomez HL, Castaneda CA, Castillo M, Reuben J, Gao H, Suarez N, et al. Concurrent Detection of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Triple-negative Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Care.* 2021;6(4):373–7. doi: 10.31557/apjcc.2021.6.4.373-377
25. O'Leary B, Cutts RJ, Huang X, Hrebien S, Liu Y, André F, et al. Circulating tumor DNA markers for early progression on fulvestrant with or without palbociclib in ER+ advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2021;113(3):309–17. doi: 10.1093/jnci/djaa087.
26. O'Leary B, Hrebien S, Morden JP, Beaney M, Friibens C, Huang X, et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat Commun.* 2018; 9(1):896. doi: 10.1038/s41467-018-03215-x.
27. Pascual J, Gil-Gil M, Proszek P, Zielinski C, Reay A, Ruiz-Borrego M, et al. Baseline mutations and ctDNA dynamics as prognostic and predictive factors in ER-positive/HER2-negative metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2023; 29(20):4166-4177. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-23-0956.
28. André F, Su F, Solovieff N, Hortobagyi G, Chia S, Neven P, et al. Pooled ctDNA analysis of MONALEESA phase III advanced breast cancer trials. *Ann Oncol.* 2023;34(11):1003–14. doi: 10.1016/j.annonc.2023.08.011.
29. André F, Solovieff N, Su F, Bardia A, Neven P, Yap Y, et al. Acquired gene alterations in patients treated with ribociclib plus endocrine therapy or endocrine therapy alone using baseline and end-of-treatment circulating tumor DNA samples in the MONALEESA-2, -3, and-7 trials. *Ann Oncol.* 2025 Jan;36(1):54-64. doi: 10.1016/j.annonc.2024.09.010. Epub 2024 Sep 21.
30. Tolaney SM, Toi M, Neven P, Sohn J, Grischke EM, Llombart-Cussac A, et al. Clinical significance of PIK3CA and ESR1 mutations in circulating tumor DNA: analysis from the MONARCH 2 study of abemaciclib plus fulvestrant. *Clin Cancer Res.* 2022;28(8):1500–6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-3276.
31. Guan X, Liu B, Niu Y, Dong X, Zhu X, Li C, et al. Longitudinal HER2 amplification tracked in circulating tumor DNA for therapeutic effect monitoring and prognostic evaluation in patients with breast cancer. *The Breast.* 2020;49:261–6. doi: 10.1016/j.breast.2019.12.010.
32. Jacob S, Davis AA, Gerratana L, Velimirovic M, Shah AN, Wehbe F, et al. The use of serial circulating tumor DNA to detect resistance alterations in progressive metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2021;27(5):1361–70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1566.
33. Ma CX, Bose R, Gao F, Freedman RA, Telli ML, Kimmick G, et al. Neratinib efficacy and circulating tumor DNA detection of HER2 mutations in HER2 nonamplified metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(19):5687–95.
34. André F, Ciruelos E, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer I, et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol.* 2021;32(2):208–17.

35. FDA Approves New FoundationOne®Liquid CDx Companion Diagnostic Indications for Three Targeted Therapies That Treat Advanced Ovarian, Breast and Non-Small Cell Lung Cancer | Foundation Medicine [Internet]. [cited 2024 Dec 27]. Available from: <https://www.foundationmedicine.com/press-releases/fda-approves-new-foundationone%C2%AEliquid-cdx-companion-diagnostic-indications-for-three-targeted-therapies-that-treat-advanced-ovarian%2C-breast-and-non-small-cell-lung-cancer>
36. Juric D, Turner N, Loi S, Andre F, Chia SK, Jhaveri K, et al. Abstract P4-09-12: Baseline and End-of-Treatment Biomarkers in Patients With PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer From BYLieve Study Cohorts A and B. *Cancer Res.* 2023;83(5_Supplement):P4-09.
37. Jacobson A. Alpelisib Plus Fulvestrant or Letrozole Demonstrates Sustained Benefits Across Subgroups of Patients with PIK3CA-Mutated HR+/HER2-Advanced Breast Cancer. *The Oncologist.* 2022;27(Supplement_1):S13-4.
38. Turner NC, Im SA, Saura C, Juric D, Loibl S, Kalinsky K, et al. Inavolisib-Based Therapy in PIK3CA-Mutated Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2024;391(17):1584-96.
39. LabPulse.com [Internet]. 2024 [cited 2024 Dec 27]. FDA approves Genentech's breast cancer therapy, Foundation Medicine's CDx. Available from: <https://www.labpulse.com/business-insights/policy-and-regulation/regulatory-approval/article/15705831/fda-approves-genentechs-breast-cancer-therapy-foundation-medicines-cdx>
40. Vasan N, Chaki M, Benrashid M, Puri S, Sivakumar S, Sokol E. Concordance between tissue (tumor DNA) and liquid (ctDNA) biopsy next-generation sequencing (NGS) data in detection of PIK3CA, AKT1, and PTEN alterations in breast cancer: A retrospective analysis. 2024;
41. Turner NC, Swift C, Kilburn L, Fribbens C, Beaney M, Garcia-Murillas I, et al. ESR1 mutations and overall survival on fulvestrant versus exemestane in advanced hormone receptor-positive breast cancer: a combined analysis of the phase III SoFEA and efect trials. *Clin Cancer Res.* 2020;26(19):5172-7.
42. Bidard FC, Hardy-Bessard AC, Dalenc F, Bachelot T, Pierga JY, de la Motte Rouge T, et al. Switch to fulvestrant and palbociclib versus no switch in advanced breast cancer with rising ESR1 mutation during aromatase inhibitor and palbociclib therapy (PADA-1): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2022;23(11):1367-77.
43. Cabel L, Delaloge S, Hardy-Bessard AC, Andre F, Bachelot T, Bieche I, et al. Dynamics and type of ESR1 mutations under aromatase inhibitor or fulvestrant combined with palbociclib after randomization in the PADA-1 trial. 2023;
44. Turner NC, Kingston B, Kilburn LS, Kernaghan S, Wardley AM, Macpherson IR, et al. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(10):1296-308.
45. Kingston B, Pearson A, Herrera-Abreu MT, Sim LX, Cutts RJ, Shah H, et al. ESR1 F404 Mutations and Acquired Resistance to Fulvestrant in ESR1-Mutant Breast Cancer. *Cancer Discov.* 2024;14(2):274-89.
46. Bardia A, Bidard FC, Neven P, Streich G, Montero AJ, Forget F, et al. Abstract GS3-01: GS3-01 EMERALD phase 3 trial of elacestrant versus standard of care endocrine therapy in patients with ER+/HER2-metastatic breast cancer: Updated results by duration of prior CDK4/6i in metastatic setting. *Cancer Res.* 2023;83(5_Supplement):GS3-01.
47. FDA Approves Blood Tests That Can Help Guide Cancer Treatment - NCI [Internet]. 2020 [cited 2024 Dec 27]. Available from: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2020/fda-guardant-360-foundation-one-cancer-liquid-biopsy>
48. Coombes RC, Page K, Salari R, Hastings RK, Armstrong A, Ahmed S, et al. Personalized detection of circulating tumor DNA antedates breast cancer metastatic recurrence. *Clin Cancer Res.* 2019;25(14):4255-63.
49. Shaw JA, Page K, Wren E, De Bruin EC, Kalashnikova E, Hastings R, et al. Serial postoperative circulating tumor dna assessment has strong prognostic value during long-term follow-up in patients with breast cancer. *JCO Precis Oncol.* 2024;8:e2300456.
50. Loi S, Johnston SR, Arteaga CL, Graff SL, Chandarlapaty S, Goetz MP, et al. Prognostic utility of ctDNA detection in the monarchE trial of adjuvant abemaciclib plus endocrine therapy (ET) in HR+, HER2-, node-positive, high-risk early breast cancer (EBC). 2024;

51. Zhou Q, Gampenrieder SP, Frantal S, Rinnerthaler G, Singer CF, Egle D, et al. Persistence of ctDNA in patients with breast cancer during neoadjuvant treatment is a significant predictor of poor tumor response. *Clin Cancer Res*. 2022;28(4):697–707.
52. Chen YH, Hancock BA, Solzak JP, Brinza D, Scafe C, Miller KD, et al. Next-generation sequencing of circulating tumor DNA to predict recurrence in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy. *NPJ Breast Cancer*. 2017;3(1):24.
53. Rothé F, Silva MJ, Venet D, Campbell C, Bradburry I, Rouas G, et al. Circulating tumor DNA in HER2-amplified breast cancer: a translational research substudy of the NeoALTTO phase III trial. *Clin Cancer Res*. 2019;25(12):3581–8.
54. Magbanua MJM, Swigart LB, Wu HT, Hirst GL, Yau C, Wolf DM, et al. Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. *Ann Oncol*. 2021;32(2):229–39.
55. Radovich M, Jiang G, Hancock BA, Chitambar C, Nanda R, Falkson C, et al. Association of circulating tumor DNA and circulating tumor cells after neoadjuvant chemotherapy with disease recurrence in patients with triple-negative breast cancer: preplanned secondary analysis of the BRE12-158 randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(9):1410–5.
56. Turner NC, Swift C, Jenkins B, Kilburn L, Coakley M, Beaney M, et al. Results of the c-TRAK TN trial: a clinical trial utilising ctDNA mutation tracking to detect molecular residual disease and trigger intervention in patients with moderate- and high-risk early-stage triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2023;34(2):200–11.
57. Research C for DE and. FDA approves alpelisib for metastatic breast cancer. FDA [Internet]. 2019 Dec 20 [cited 2024 Feb 26]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-alpelisib-metastatic-breast-cancer>
58. Hoy SM. Elacestrant: First Approval. *Drugs*. 2023;83(6):555–61.
59. Guardant Health. Guardant Health receives FDA approval for Guardant360 CDx as companion diagnostic for Menarini Group's ORSERDU for treatment of patients with ESR1 mutations in ER+, HER2- advanced or metastatic breast cancer [Internet]. [cited 2024 Feb 23]. Available from: <https://investors.guardanthealth.com/press-releases/press-releases/2023/Guardant-Health-receives-FDA-approval-for-Guardant360-CDx-as-companion-diagnostic-for-Menarini-Groups-ORSERDU-for-treatment-of-patients-with-ESR1-mutations-in-ER-HER2--advanced-or-metastatic-breast-cancer/default.aspx>
60. Hutchinson KE, Chen JW, Savage HM, Stout TJ, Schimmoller F, Cortés J, et al. Multiple PIK3CA mutation clonality correlates with outcomes in taselisib+ fulvestrant-treated ER+/HER2-, PIK3CA-mutated breast cancers. *Genome Med*. 2023;15(1):28.