



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**EVALUACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN PIK3CA EN
TUMOR Y PLASMA DE PACIENTES PERUANAS CON CÁNCER
DE MAMA MEDIANTE PCR DIGITAL LIMA 2016-2017: ANÁLISIS
DE SENSIBILIDAD Y NIVEL DE CONCORDANCIA**

**PRESENTADO POR
STEFANO GIANNONI LUZA**

ASESOR

JOSE LUIS BULEJE SONO

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

LIMA – PERÚ

2018



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada
CC BY-NC-ND

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**EVALUACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN PIK3CA EN
TUMOR Y PLASMA DE PACIENTES PERUANAS CON CÁNCER
DE MAMA MEDIANTE PCR DIGITAL LIMA 2016-2017: ANÁLISIS
DE SENSIBILIDAD Y NIVEL DE CONCORDANCIA**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

**PRESENTADA POR
STEFANO GIANNONI LUZA**

**ASESOR
DR. JOSE LUIS BULEJE SONO**

LIMA, PERÚ

2018

JURADO

Presidente: Sixto Sánchez Calderón, doctor en Salud Pública

Miembro: María Luisa Guevara Gil, doctora en Ciencias

Miembro: Nora Espíritu Salazar, doctora en Salud Pública

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Dr. José Luis Buleje, por ofrecerme esta gran oportunidad y a todo el personal del Laboratorio de Genética, en especial al Dr. Ricardo Fujita, a la Dra. Maria Luisa Guevara, al Dr. Oscar Acosta, a Alexis Murillo, Pierina Danos, Estephane Proaño y a la Lic. Yanina Enriquez, por su incondicional apoyo. Al Dr. José Sandoval, Francia Huamán, Lina Laymito, Daisy Obispo y Alejandro Zevallos por su amistad y apoyo.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, por abrirme las puertas para este proyecto, con una mención especial a los doctores: José Manuel Cotrina Concha y al Dr. Manuel Cotrina Diaz, quienes fueron una pieza fundamental del presente estudio. También agradecerle al Dr. Henry Guerra Miller, por su apoyo en la selección de los tacos tumorales, al Dr. Luis Alberto Alvarez, quien me ayudó con el reclutamiento de las pacientes, a la Dra. Claudia Villoslado, por su ayuda con la recolección de las muestras de sangre y al Dr. Luis Taxa, por sus consejos y gran apoyo. Además, un gran agradecimiento para todo el personal técnico de toma de muestra del INEN, al personal técnico de patología, en especial al Sr. Alfredo Castro; a todo el personal del Departamento de cirugía de mama y tejidos blandos del INEN y como no a cada una de las pacientes que desearon participar o no en el estudio, quienes a pesar de todo el sufrimiento por el que estaban pasando me sonrieron y compartieron un hermoso momento conmigo.

Al Dr. Jose Carhuancho, por su asesoría metodológica, al Dr. Rolig Aliaga, por su apoyo al inicio del estudio y a Oncosalud-AUNA, a la Universidad de San Martín de Porres y a Innóvate Perú (Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad) de acuerdo al convenio N°138-PNICP-PIAP-2015, por contribuir en parte de la financiación de este proyecto.

Finalmente, agradecerles a mis padres por su absoluto apoyo y a mi familia y amigos por creer siempre en mí.

ÍNDICE

	Págs.
Portada	i
Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de tablas y figuras	vii
Resumen	ix
Abstract	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1 Antecedentes	4
1.2 Bases teóricas	7
1.3 Definición de términos básicos	21
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	23
2.1 Formulación de la hipótesis	23
2.2 Variables y su operacionalización	23
2.3 Covariables y su operacionalización	24
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	26
3.1 Tipo y diseño	26
3.2 Diseño muestral	26
3.3 Procedimiento de recolección de datos	27
3.4 Procesamiento y análisis de los datos	30
3.5 Aspectos éticos	31
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	32
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	41

CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50
FUENTES DE INFORMACIÓN	51
ANEXOS	68
1. Matriz de consistencia	
2. Tablas suplementarias	
3. Figuras suplementarias	
4. Instrumento de recolección de datos	
5. Consentimiento informado	
6. Constancia de sustentación	

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Variables del estudio y su operacionalización	23
Tabla 2. Co-variables del estudio y su operacionalización	24
Tabla 3. Características demográficas y clínicas de la población de estudio	33
Tabla 4. Análisis de normalidad de caso modelo para FAM y VIC	34
Tabla 5. Promedio y Desviación estándar de los puntos azules inferiores y puntos rojos izquierdos según mutación	34
Tabla 6. Ensayo de diluciones por PCR digital para las mutaciones PIK3CA del estudio	35
Tabla 7. Mutaciones PIK3CA identificadas en tumor por PCR digital y Secuenciación Sanger (H1047R, H1047L y E545K) y plasma por PCR digital (H1047R y E545K)	36
Tabla 8. Asociación entre estatus mutacional PIK3CA y co-variables clínicas	39

TABLAS SUPLEMENTARIAS (ANEXO 2):

Tabla suplementaria 1. Sondas comerciales (ThermoFisher Scientific) usadas para la PCR digital

Tabla suplementaria 2. Cebadores y sondas usadas para amplificar y secuenciar las muestras de tumor y biopsia para el exón 09 y 20

Tabla suplementaria 3. Cantidades y concentraciones de la mezcla para amplificación de exón PIK3CA 20

Tabla suplementaria 4. Cantidades y concentraciones de la mezcla para amplificación de exón PIK3CA 9 y 20

Tabla suplementaria 5. Condiciones de amplificación exón 20 PIK3CA para secuenciación Sanger

Tabla suplementaria 6. Condiciones de amplificación exón 9 PIK3CA para secuenciación Sanger

FIGURAS

- Figura 1.** Flujo de reclutamiento de pacientes y de muestras obtenidas 32
- Figura 2.** Curva ROC de la PCR digital en relación a la Secuenciación Sanger 39

FIGURAS SUPLEMENTARIAS (ANEXO 3):

Figura suplementaria 1. Ejemplo de caso modelo para mutación H1047R
paciente I-28

Figura suplementaria 2. Ejemplo de caso modelo para mutación H1047L
paciente I-35

Figura suplementaria 3. Ejemplo de caso modelo para mutación E545K
paciente I-68

Figura suplementaria 4. Ejemplo de cómo establecer los límites de FAM y
VIC para las mutaciones PIK3CA

Figura suplementaria 5. Ejemplo de electroforesis de amplificación por
PCR punto final o convencional

Figura suplementaria 6. Secuencia mutada para H1047R

Figura suplementaria 7. Secuencia mutada para E545K

Figura suplementaria 8. Histograma casos modelo FAM E545K

Figura suplementaria 9. Histograma casos modelo FAM H1047R

Figura suplementaria 10. Histograma casos modelo FAM H1047L

Figura suplementaria 11. Histograma casos VIC

RESUMEN

Objetivo: Determinar la sensibilidad de la PCR digital para detectar mutaciones en el gen PIK3CA en tumor y su nivel de concordancia en el plasma de pacientes peruanas con cáncer de mama. **Metodología:** Estudio observacional, analítico, transversal, en el que se recolectaron 59 muestras de tumor y 43 de plasma preoperatorio de pacientes con cáncer de mama. Los tumores fueron analizados por secuenciación Sanger y PCR digital para tres mutaciones comunes de PIK3CA (E545K, H1047R y H1047L), mientras que el plasma fue analizado solo por PCR digital para las dos primeras mutaciones. **Resultados:** La secuenciación de los tumores identificó en total siete pacientes (11.8%) con mutaciones en el gen PIK3CA, de las cuales tres corresponden a la mutación H1047R y cuatro a E545K. La PCR digital identificó las mismas, pero detectó 37 pacientes adicionales con por lo menos una mutación, 33 de E545K, diez de H1047R y dos de H1047L. La comparación entre PCR digital y secuenciación presentó una sensibilidad de 100% con una especificidad de 73.53%. Las 43 muestras de plasma preoperatoria fueron analizadas por PCR digital. Se encontraron dos casos mutados, los cuales fueron confirmados por el análisis de tumor. La concordancia de la PCR digital entre tumor y plasma fue débil ($k=0.074$). **Conclusiones:** La PCR digital presenta una alta sensibilidad en detectar mutaciones PIK3CA en tumor respecto a la secuenciación Sanger y una concordancia débil entre tumor y plasma, según el presente estudio.

Palabras clave: biopsia líquida, cáncer de mama, PIK3CA, PCR digital, secuenciación Sanger.

ABSTRACT

Objective: To determine the sensitivity of digital PCR to detect mutations in the PIK3CA gene from tumors of Peruvian patients with breast cancer and its level of concordance in plasma. **Methods:** A cross-sectional study where 59 tumors and 43 presurgery plasma samples from breast cancer patients were collected. Tumors were analyzed by Sanger sequencing and digital PCR for 3 common PIK3CA mutations (E545K, H1047R y H1047L). Matched plasma samples were analyzed only by digital PCR for E545K and H1047R mutations. **Results:** The sequencing of tumor samples identified in total seven patients (11.8%) with PIK3CA mutations from which three correspond to H1047R and four to E545K. Digital PCR confirmed those mutations and identified 37 additional patients with at least one mutation: 33 of E545K, ten of H1047R and two of H1047L. The comparison between the results of digital PCR and Sanger sequencing show a sensitivity of 100% and a specificity of 73.53%. Additionally, 43 presurgical plasma samples were analyzed by digital PCR. Two cases were detected and confirmed by tumor analysis. The concordance of digital PCR between tumor and plasma was weak ($k= 0.074$). **Conclusions:** Digital PCR demonstrated a high sensitivity to detect mutations in tumor samples compared with Sanger sequencing and to have a weak concordance between tumor and plasma according to this study.

Key words: liquid biopsy, breast cancer, PIK3CA, digital PCR, Sanger sequencing.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial y la causa número uno de muerte en el mismo género, tanto en países desarrollados como en desarrollo. En total, se han reportado 1.7 millones de casos y 521 900 de muertes durante 2012.⁽¹⁾

En el Perú, figura como el tercero más frecuente, considerando ambos sexos, pero segundo, si se toma en cuenta solo al sexo femenino,⁽²⁾ con una incidencia de 34 casos al año por cada 100 mil mujeres, con un total de 4300 casos nuevos al año y una tasa de mortalidad de 10.8 por mil mujeres o lo equivalente a 1400 muertes al año.^(2,3)

En estadios tempranos, el cáncer de mama suele ser tratado con terapias locales como la resección quirúrgica del tumor primario.⁽⁴⁾ Sin embargo, al no existir una herramienta confiable que pueda cerciorar la ausencia total a nivel microscópico de enfermedad residual, sea local o a distancia, se debe iniciar una terapia adyuvante sistémica o radioterapia.⁽⁵⁾ Esta puede llevar a consecuencias negativas en el organismo como neuropatías, mayor predisposición a infecciones, fallas cardíacas y leucemias secundarias.⁽⁶⁾ El desarrollo de nuevos métodos y descubrimiento de factores lo suficientemente sensibles para detectar enfermedad residual posquirugía, podría ayudar a estratificar a los pacientes según el riesgo de recurrencia, para evitar innecesarias exposiciones a los fármacos adyuvantes.⁽⁶⁾

Desde su descubrimiento, por Mandel y Métails ⁽⁷⁾, los ácidos nucleicos libres en sangre se han perfilado como una alternativa en proporcionar, a diferencia de las biopsias tumorales, información en tiempo real de los perfiles genéticos de los tumores. Con ello, podrían ayudar en identificar su patogénesis, progresión y respuesta al tratamiento, brindando información de carácter predictiva y/o pronóstica, por ende, una selección personalizada de la terapéutica a seguir por el paciente.⁽⁸⁻¹¹⁾

Nuevas estrategias terapéuticas apuntan a la inhibición de vías moleculares responsables del crecimiento descontrolado celular o de la resistencia a la apoptosis, ^(12,13) tanto en combinación con terapias endocrinas ⁽¹³⁾ como en

monoterapia.⁽¹²⁾ Dentro de estas estrategias terapéuticas, se encuentra la inhibición de la vía de señalización del PI3K/AKT/mTOR. Esto debido a que su activación es común en el cáncer de mama, producen crecimiento celular y proliferación tumoral, además de tener un papel importante en la resistencia al tratamiento endocrino, a la terapia dirigida contra HER2 y a la terapia citotóxica en este tipo de cáncer.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

Uno de los genes encargados de codificar esta vía es el gen PIK3CA ⁽¹⁷⁾ y su mutación está considerada como la segunda más frecuente en el cáncer de mama,⁽¹⁸⁾ con una frecuencia entre 16.4 a 45%.⁽¹⁹⁾ La mayoría de sus mutaciones se concentran en regiones calientes en los exones 9 (E542K y E545K) y 20 (H1047R y H1047L).⁽¹⁹⁾

A pesar de que el rol que cumple este gen mutado en el cáncer de mama es todavía controversial, varios autores coinciden en el gran valor pronóstico y predictivo que tiene su presencia y que puede ayudar en la selección de pacientes para terapias específicas e individualizadas y detectar posibles recidivas.^(5,6,20)

Existen diversas tecnologías, basadas en la reacción en cadena de polimerasa (PCR), capaces de detectar ácidos nucleicos libres en plasma como el caso de la PCR digital. ⁽²¹⁾ Esta es considerada como un método ideal para la identificación de genes y/o mutaciones que se encuentran en pequeñas concentraciones dentro de una muestra, para lo cual realiza una cuantificación absoluta y precisa de las secuencias blanco amplificadas.⁽²⁾

Diversos autores han logrado detectar mutaciones del gen PIK3CA a partir de los ácidos nucleicos libres en plasma por medio de la PCR digital en gotas;^(5,23-25) sin embargo, existen pocos estudios que utilicen el sistema de PCR digital basado en chips para detectar estas mutaciones en pacientes con cáncer de mama.

Es por ello y por la necesidad de identificar nuevos métodos lo suficientemente sensibles para realizar perfiles genéticos a partir de plasma, que se diseñó un estudio observacional, analítico y transversal con el objetivo de determinar la sensibilidad de la PCR digital (basada en chips) en detectar las mutaciones en

el gen PIK3CA en tumor y su nivel de concordancia en el plasma de pacientes peruanas con cáncer de mama.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

En el año 2005, Saal LH et al. publicaron un estudio observacional con el objetivo de investigar la relación entre las mutaciones del gen PTEN y el gen PIK3CA. Se analizaron 292 tumores primarios y 50 líneas celulares por medio de PCR convencional y secuenciación. Se estudiaron los exones 1,2,4,5,7,9,12,13,18 y 20 del gen PIK3CA y en el gen PTEN los exones del 1 al 9. De los 292 tumores, se encontraron 77 casos positivos (26%) para mutaciones en el gen PIK3CA y 14 de las 50 líneas celulares (28%) para la misma mutación. Las mutaciones se agruparon en puntos calientes en el exón 9 y 20. De los casos positivos, 31 provenían del exón 9 y 49 del exón 20; 7 mutaciones fueron encontradas en el exón 7,2 en los exones 1,4 y 13 y solo una mutación en el exón 18. Además, se reportó una asociación significativa entre las mutaciones PIK3CA y la expresión normal del PTEN y una asociación significativa entre la expresión de receptores de estrógeno, progesterona, la presencia metástasis en los nódulos linfáticos y la sobreexpresión de HER2 con las mutaciones PIK3CA.⁽²⁶⁾

Board RE et al. publicaron, en 2010, un estudio tipo observacional, prospectivo, analítico que incluyó como población a 50 pacientes con cáncer de mama metastásico y 30 pacientes con cáncer de mama operable, con la intención de evaluar la factibilidad en detectar mutaciones del gen PIK3CA en cfDNA del plasma o suero de los mencionados pacientes y equipararlos con sus respectivas muestras tumorales utilizando la técnica ARMS (por sus siglas en Ingles). La investigación logró detectar mutaciones de PIK3CA en 13/46 muestras de plasma y 10/46 de suero. Se encontró una concordancia con sus respectivas muestras tumorales del 95% y mutaciones en las muestras tumorales de 14/30 pacientes con cáncer de mama operable, mas no en sus respectivas muestras de sangre. La investigación concluyó que es factible utilizar los cfDNA para detectar mutaciones en PIK3CA en pacientes con cáncer de mama metastásico.

(20)

En el año 2012, una investigación observacional, con un componente retrospectivo y otro prospectivo, fue publicada por Higgins MJ et al, con el objetivo de evaluar si es factible identificar mutaciones del gen PIK3CA en cfDNA de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama metastásico utilizando el método BEAMing. En el estudio retrospectivo, se recolectaron muestras de 49 pacientes, mientras que en el prospectivo fueron enrolados 60 pacientes. La investigación determinó una frecuencia similar en ambas cohortes. En la cohorte retrospectiva, la concordancia del estatus mutacional en plasma y tumor por medio del BEAMing fue del 100%. En la fase prospectiva, la concordancia fue de 72.5% entre BEAMing y secuenciación respecto a las muestras tumorales. Sin embargo, cuando se compararon los resultados de plasma y tumor (ambos evaluados por BEAMing) la concordancia fue de 100%. Se concluyó que es factible detectar la mutación PIK3CA a través del análisis del cfDNA derivado del plasma.⁽²⁷⁾

Además, se publicó, en el año 2012, una investigación retrospectiva, analítica en Brasil por Mangone FR et al. que incluyó 86 muestras de tumor primario de Ca. de mama con el objetivo de identificar mutaciones en los exones 9 y 20 del gen PIK3CA y determinar la relación entre el estatus mutacional, los aspectos clínico-patológicos de los pacientes y su desenlace. La investigación determinó que el 27% (23 pacientes) poseían mutaciones en el gen PIK3CA. No se encontraron diferencias significativas entre las características clínico-patológicas o el estatus del receptor hormonal respecto a los pacientes que poseían o no las mutaciones. Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a la supervivencia específica para el cáncer, pero sí se encontró que la presencia de mutaciones en el exón 20 estaba asociada significativamente a un peor tiempo de supervivencia y libre de enfermedad. Se concluyó que la presencia de mutaciones en el exón 20 del gen PIK3CA está asociada a un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama.⁽¹⁹⁾

Por otro lado, en 2014, se publicó en el repositorio de la Universidad de John Hopkins, la tesis de Maestría de Valda Toro PL, una investigación observacional, prospectiva en la cual se buscaba estudiar la factibilidad en detectar dos tipos comunes de mutaciones en el gen PIK3CA a partir de cfDNA de pacientes con Ca. de mama en estadios iniciales (I-III). Se utilizaron dos métodos de PCR:

BEAMing y ddPCR (por sus siglas en inglés). El estudio contó con la participación de 29 pacientes, de las cuales se obtuvo una muestra de sangre preoperación y la muestra tumoral; sin embargo, tan solo en 17 de ellas se consiguió muestra de sangre postoperación. La investigación demostró que ambos métodos presentan una alta especificidad; sin embargo, el BEAMing presentó una baja sensibilidad de 30% comparado con la alta sensibilidad (93.3%) del ddPCR.⁽⁵⁾

En el Perú, se desarrolló un estudio por Castañeda CA et al. publicado en el año 2014. Su objetivo fue determinar la prevalencia de mutaciones PIK3CA en pacientes peruanas con cáncer de mama con amplificación de HER2 y triple negativo. Se utilizaron 134 tumores primarios provenientes de dos cohortes. El primer cohorte estuvo compuesto por 51 pacientes provenientes del ensayo clínico ALTTO con receptores de estrógeno y o progesterona positivos y HER2 positivos. El segundo cohorte estuvo conformado por 83 pacientes triple negativo que habían recibido previamente neoadyuvancia. El estatus mutacional fue analizado en las muestras de tumor correspondientes a la primera cohorte por el secuenciador de ADN automático ABI Prism 3130, mientras que las del segundo cohorte fueron analizadas por secuenciación de próxima generación. El estudio encontró una prevalencia total de 15.7% correspondientes a 21 casos. Las mutaciones en el exón 20 fueron las más frecuentes, 11 en total de donde 10 correspondieron a la mutación H1047R y tan solo una a H1047L. En el exón 9 la mayoría correspondieron a la mutación E545A: 7, seguido de la mutación E545K: 2 y E545Q: 1. En ningún caso se encontraron mutaciones de ambos exones. Al realizar el análisis de asociación entre el estatus mutacional y las variables clinicopatológicas, solo se encontró que las mutaciones PIK3Ca tendían a estar presentes en los casos HER2 positivo. Con el resto de variables, no se encontró asociación.⁽²⁸⁾

En el año 2015, se publicó un estudio observacional, retrospectivo analítico por Oshiro C et al. que incluyó como población a 313 pacientes con Ca. de mama con estadio I-III con el objetivo de desarrollar un método lo suficientemente sensible y específico para detectar mutaciones PIK3CA a partir de cfDNA (de suero) usando PCR digital en chip (dPCR). La investigación determinó que la dPCR fue altamente sensible y específica en detectar las mutaciones. Por otro lado, la presencia de mutaciones mostró un peor tiempo de supervivencia y libre

de enfermedad. Además, la presencia de un alto número de copias fue un factor pronóstico significativo e independiente de los parámetros convencionales.⁽²⁹⁾

Finalmente, en el año 2017, García-Saenz JA et al. publicaron un estudio observacional, prospectivo analítico con el objetivo de comparar la información clínica proporcionada por la cuantificación de mutaciones PIK3CA en muestras de plasma de pacientes ER positivo con marcadores tumorales 15-3 y CEA y estudios de imágenes. Participaron 49 pacientes y se estudiaron las mutaciones del gen PIK3CA: E542K, E545K y H1047R, las cuales fueron analizadas en tumor por el *COBAS^R PIK3CA mutation test* y confirmadas por *QuantStudio 3D PCR System* arrojando una concordancia del 100% entre ellas. Se encontraron 11 (22.4%) de pacientes con la mutación H1047R, 5 (10,2%) para E545K y 4 (8,1%) para E542K. Las muestras de plasma fueron analizadas también por el *QuantStudio 3D PCR System*. Los autores encontraron una concordancia moderada $K= 0.591$ (IC 95%: 0.371-0.811) entre plasma y tumor; sin embargo, al restringir el análisis a solo pacientes con estadios avanzados (IV) se halló una buena concordancia con una sensibilidad de 77% y especificidad de 100%, valor predictivo positivo (VPP) de 100% y un valor predictivo negativo (VPN) de 86%. Por otro lado, como análisis exploratorio, los autores encontraron una correlación entre las fluctuaciones de los alelos mutados de PIK3CA con los cambios en el tamaño de las lesiones, según estudio de imágenes, mas no con la respuesta al tratamiento.⁽³⁰⁾

1.2 Bases teóricas

Cáncer de mama

El cáncer de mama es una proliferación maligna de células epiteliales provenientes de los ductos o lóbulos de la mama. Su inicio se da en una sola célula transformada, la que termina dando origen a una línea germinal de células mutadas, las cuales pueden existir por un periodo largo de manera oculta como enfermedad *in situ* o invasiva.⁽³¹⁾

La incidencia del cáncer de mama se ha incrementado con la introducción del tamizaje por mamografía y continúa en ascenso conforme envejecen más las

poblaciones.⁽³²⁾ Como parte del tamizaje, las mujeres deberían realizarse un examen mensual de las mamas con la intención de identificar masas o signos a tiempo que puedan indicar la presencia de un carcinoma mamario. Entre las características más relacionadas a este tipo de cáncer están: tener una consistencia dura, irregular, adherida a planos subyacentes y ser indolora.⁽³¹⁾

El uso de las mamografías puede ser de manera diagnóstica o a manera de tamizaje. La primera se realiza para valorar el resto de la mama afectada antes de la biopsia o por lo general suele ser utilizada como parte de la estrategia de evaluación triple, con lo que se podría excluir una biopsia de manera oportuna.⁽³¹⁾ La segunda es utilizada posterior a la detección de una anomalía palpable en la mama o como tamizaje anual o bianual a partir de los 40 años,⁽³¹⁾ la cual ha demostrado una reducción en la mortalidad del grupo etario de 50 a 69 años.⁽³²⁾

Entre los principales factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama, se encuentran: la predisposición genética, la exposición a estrógenos sean exógenos o endógenos, la radiación ionizante, la edad (al menos un cuarto ocurre antes de los 50 años y menos del 5% antes de los 35), el sexo (al ser en varones solo el 1%), una baja paridad e historia de hiperplasia atípica.^(32,33)

Aproximadamente, el 95% de las neoplasias malignas de mama son adenocarcinomas, las cuales se subdividen en carcinomas *in situ* y en carcinomas invasivos. El otro 5% está comprendido por tumores estromales como angiosarcomas, rabdomiosarcomas, entre otros.⁽³³⁾

Los carcinomas *in situ* se caracterizan por limitarse, tanto a los conductos como a los lobulillos, sin atravesar la membrana basal.⁽³³⁾ Estos, son diferentes de los carcinomas invasivos, que atraviesan la membrana basal y suelen asociarse a metástasis ganglionares axilares en más del 50% de pacientes. Estos, además, pueden estar fijos a la pared torácica y causar retracciones en la piel cuando son de gran tamaño. Entre los carcinomas invasivos se encuentran los que no presentan algún tipo especial o sin tipo especial (carcinoma invasivo ductal) que corresponden aproximadamente el 70-80%, los carcinomas lobulillares (10%), los tubulares o cribiformes (6%) y otros de menor frecuencia.^(33,34)

Los carcinomas sin tipo especial (STE) se subclasifican a su vez en 5 tipos de patrones, los cuales tienen relación con el pronóstico y respuesta al tratamiento:

Luminal A

Corresponden al 40-55% de los cánceres STE y están compuestos por cánceres positivos para receptores estrogénicos (RE) y negativos para HER2/neu.^(35,36)

Luminal B

Comprenden aproximadamente el 15 a 20% de los cánceres STE. Son un grupo RE positivo con mayor probabilidad de metástasis a ganglios linfáticos.^(33,37)

Similares a la mama normal

Son el 6 al 10% de cánceres STE, RE positivos, HER2/neu negativos y suelen ser bien diferenciados. Se caracterizan por tener un patrón de expresión genética similar al tejido normal de la mama.⁽³³⁾

Similares al basal

Caracterizados por la ausencia de RE, receptores de prostaglandinas (RP) y HER2/neu (triple negativo) y la expresión de marcadores clásicos de células mioepiteliales como la P-caderina y queratinas basales. Corresponden al 13-25% de los cánceres STE.⁽³³⁾

HER2 positivo

Son el 7 al 12% de cánceres STE y comprende a los carcinomas RE negativos que sobreexpresan HER2/neu.⁽³³⁾

El diagnóstico del cáncer de mama se basa en la combinación del examen clínico con el diagnóstico por imágenes y es confirmado por la evaluación patológica. Dentro de la evaluación clínica, se encuentra la palpación bimanual de las mamas y nódulos linfáticos locales.⁽³²⁾ La evaluación por imágenes está conformada por la mamografía bilateral y ultrasonido, tanto de la mama como de los nódulos linfáticos;⁽³⁷⁾ también se puede realizar una resonancia magnética en los casos que el paciente tenga antecedentes familiares de mutaciones tipo BRCA, implantes mamarios, cánceres lobulares, entre otros.⁽³²⁾

Para el diagnóstico patológico, la muestra debe de obtenerse antes del inicio de algún tipo de tratamiento por medio de biopsia con aguja gruesa de preferencia y en caso no se disponga con aspiración por aguja fina.⁽³²⁾ El diagnóstico patológico final se realizará por medio de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ⁽³⁸⁾ y el sistema de Estadaje Tumor-Nódulo y metástasis (TNM), además de incluirse el tipo histológico, grado, la evaluación inmunohistoquímica (IHC) del estatus de los receptores estrogénicos y para los cánceres invasivos, la evaluación IHC de los receptores de progesterona (PgR) y del receptor humano del factor 2 de crecimiento humano epidermal (HER2).⁽³²⁾

El tratamiento del cáncer de mama varía según si este es localizado o metastásico. En el caso de cáncer de mama localizado el tratamiento suele tener un componente quirúrgico y uno médico.^(31, 39)

Respecto al quirúrgico, actualmente existe una tendencia a realizar el tratamiento conservador de la mama, donde se logra preservar la mama sin comprometer la supervivencia de la paciente, quien, posteriormente, recibe sesiones de radioterapia sea a toda la mama o solo a la región afectada. La combinación de este tipo de cirugía y la radiación ofrece una opción equivalente o incluso mejor a procedimientos quirúrgicos extensos como la mastectomía.⁽³⁹⁾

La mastectomía es básicamente el retiro quirúrgico de la mama y son principalmente tres tipos: La mastectomía radical donde se retira la mama junto con el pectoral mayor, pectoral menor, cierta cantidad de piel suprayacente y la resección en bloque de todo el contenido axilar; la mastectomía radical modificada, en la que, además de la mama, se extraen los ganglios linfáticos de niveles I y II y la mastectomía simple o total, en la que se remueve toda la mama, pero no se retiran los ganglios linfáticos axilares.⁽³⁹⁾

La radioterapia suele ser indicada posterior a la cirugía conservadora de la mama o mastectomía y tiene como objetivo eliminar la enfermedad residual y reducir las tasas de recurrencia.^(31,39)

Por otro lado, la terapia sistémica adyuvante es utilizada en pacientes que ya recibieron una terapia local, pero que tienen riesgo de recidiva.⁽³¹⁾ Esta terapia consiste en la administración de tratamiento hormonal, quimioterapia y/o

trastuzumab. La terapia hormonal se utiliza en pacientes con receptores para estrógenos y/o progesterona positivos para evitar la estimulación de los estrógenos al tumor.^(31,39) La quimioterapia consiste en la combinación de diversos medicamentos como las antraciclinas, agentes alquilantes, taxanos entre otros en forma de esquemas. Finalmente, el trastuzumab, un anticuerpo monoclonal contra los receptores HER2/neu.⁽³⁹⁾

Existe, además, un tipo de terapia sistémica adyuvante denominado quimioterapia neoadyuvante, la cual es básicamente la administración de terapia adyuvante previa a la cirugía con la intención de disminuir el tamaño del tumor y lograr que las pacientes puedan tener una cirugía más conservadora. Sin embargo, a pesar de haber una respuesta mayor al 75%, no se ha demostrado que ella mejore la supervivencia general de las pacientes.⁽³¹⁾

En el caso del cáncer de mama metastásico, al no considerarse curable, sus objetivos se enfocan en obtener una supervivencia prolongada, una buena calidad de vida, control de síntomas y supervivencia libre de progresión.^(31,40) La elección del tratamiento depende del estatus de los receptores estrogénicos y su sensibilidad al tratamiento. La terapia hormonal prima sobre la quimioterapia en el caso de ser sensible; en caso contrario, se optarán por regímenes de quimioterapia que cumplan con los objetivos de tratamiento sin que los efectos tóxicos sobrepasen los beneficios.⁽⁴⁰⁾

Gen PIK3CA y su rol en el cáncer de mama

Las mutaciones en el gen PIK3CA son una de las más frecuentes en el cáncer de mama con una frecuencia de 16.4 a 45%.⁽¹⁹⁾ Sus mutaciones fueron descubiertas por primera vez en el 2004 en una serie de tumores sólidos. Inicialmente, se reportó una baja frecuencia en el cáncer de mama (10%); sin embargo, una serie de estudios posteriores terminaron revelando que en realidad el cáncer de mama es el más afectado respecto a esta mutación (30%).⁽⁴¹⁾

EL gen PIK3CA está encargado de codificar una de las isoformas correspondientes a la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K)

/AKT/mTOR,⁽⁴²⁾ vía que está considerada por tener una gran influencia en procesos celulares como la diferenciación, supervivencia, proliferación y migración celular,⁽²³⁾ además de estar involucrada en la oncogénesis de diversas malignidades, en especial el cáncer de mama.

La fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) es una kinasa lipídica que fosforila el grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo inositol de las enzimas fosfatidilinositol y se agrupa en tres clases: I, II y III. De estas, la clase I-A es la más relacionada con el cáncer y se compone de tres subunidades catalíticas: p110 α , P110 β y p110 δ .^(42,43)

La isoforma P110 α es codificada por el gen PIK3CA el cual está localizado en el cromosoma 3q26.3 y consta de 23 exones.⁽⁴⁴⁾ La mayoría de sus mutaciones se encuentran en dos puntos calientes: E542K o E545K en el exón 9 y H1047R o H1047L en el exón 20.⁽⁴¹⁾ La subunidad catalítica de la P110 α está compuesta por un serie de dominios: un dominio kinasa donde se encuentran las mutaciones del exón 20, un dominio helical donde se encuentran las mutaciones del exón 9, un dominio C2, un dominio RAS, y un dominio N-terminal, el cual corresponde a la subunidad reguladora del p85.⁽⁴⁵⁾

El producto codificado por PIK3CA tiene como función convertir el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol trifosfato (PIP3) para que este último actúe como segundo mensajero activando la tirosina kinasa AKT que a su vez activa una serie de cascadas de regulación celular como crecimiento, adhesión, apoptosis entre otras. La fosforilación de PIP2 es contrarregulada por el homólogo de tensina y fosfatasa (PTEN) quien convierte PIP3 nuevamente a PIP2. Una hiperactividad de PIK3CA y/o una hipoactividad de PTEN son una de las principales formas de sobre-estimular esta vía de regulación celular produciendo la oncogénesis.⁽⁴⁵⁾

No está totalmente claro los mecanismos por los cuales actúan las diferentes mutaciones de este gen; sin embargo, se cree que las mutaciones del exón 9 permitirían un escape de P110 α del efecto inhibitorio del P85 (dominio regulador del PI3K).^(46,47) Por otro lado, Mankoo et al 2009 realizaron la simulación dinámica de Langevin (modelo matemático sobre la dinámica de sistema moleculares) para estudiar los posibles mecanismos moleculares de las mutaciones PIK3CA,

especialmente H1047R/L y P539. Se encontró que las mutantes por H1047R/L presentaba una hendidura catalítica mayor entre los dominios N-kinasa y dominio C comparado con los tipos silvestres, además, una mayor motilidad en el bucle de activación de la kinasa. Esto podría facilitar la entrada de una mayor cantidad de sustratos además de mejorar la relación sustrato-producto promoviendo la oncogenesis. Por otro lado, se encontró una mayor cantidad de puentes de hidrógeno y puentes de sal en los casos mutados 227 (H1047R/L) y 230 (P539R) versus 223 en los casos silvestres, lo cual podría brindar una mayor termoestabilidad de la estructura proteica y con ello, un mayor tiempo de vida media celular. ⁽⁴⁵⁾

Desde su descubrimiento, se ha tenido mucho interés por su potencial uso como biomarcador pronóstico y predictivo en diversos tipos de cáncer, como en el caso de un estudio realizado en el 2013 en Japón, donde se encontró una asociación entre la presencia de mutaciones en el gen PIK3CA y un pronóstico favorable en pacientes con carcinoma de células escamosas de esófago curativamente resecable⁽⁴⁸⁾. Por otro lado, se ha encontrado que la presencia de mutaciones PIK3CA puede tener un pronóstico negativo en pacientes con cáncer de colon curativamente resecable⁽⁴⁹⁾ y en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas⁽⁵⁰⁾ o incluso ningún valor pronóstico en el caso de pacientes con cáncer gástrico.⁽⁵¹⁾

Respecto al cáncer de mama, existe también información controversial respecto a su posible propiedad pronóstica, ya que existen diversos estudios que han reportado una asociación significativa con factores clínicopatológicos de buen pronóstico como la expresión de receptores para estrógeno, tamaño pequeño del tumor y un bajo grado histológico del tumor. ^(25,52,53) Sin embargo, existen algunos estudios en los cuales o no se encuentra valor pronóstico a la presencia de mutaciones o se determina que tienen un mal pronóstico.^(23, 32)

Por otro lado, se tiene la esperanza de poder utilizar la detección de estas mutaciones como herramienta predictiva de terapias hormonales y sobretudo de terapias que tienen como objetivo la vía de señalización PI3K, ya que existe evidencia preclínica que demuestra la sensibilidad, de células con PIK3CA mutado, a los agentes bloqueadores de la vía PI3K.^(54,55)

Diversos autores han encontrado que los tumores estrógeno positivo o HER2 positivo en combinación con mutaciones PIK3CA presentan una menor respuesta al tratamiento sea antiestrogénico o anti-HER2. Actualmente, se están llevando a cabo una serie de ensayos clínicos de fase II y III que utilizan inhibidores de PI3K en combinación con tratamiento hormonal. ^(56, 57) Algunos de ellos han brindado resultados satisfactorios como el caso del ensayo clínico BOLERO-II el cual es un ensayo de fase III en el cual se agregó everolimus al exemestano en pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama avanzado positivo para receptores hormonales con un relapso o progresión de la enfermedad durante el tratamiento con inhibidores de aromatasa; un estudio interino encontró una mejora en la progresión libre de supervivencia de 6.9 versus 2.8 meses. ^(58,59)

Fuentes de obtención de las mutaciones del gen PIK3CA

Tumor

Los tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) son una fuente valiosa de información para la investigación médica utilizada usualmente en el área de diagnósticos oncológicos.⁽⁶⁰⁾ Los tejidos FFPE conservan la morfología y detalles celulares y son considerados como un procedimiento estándar de preservación para diagnósticos patológicos-quirúrgicos. Más aún se popularizó el uso de este método tras la primera publicación realizada por Shi et al. en 1991 tras usar la recuperación antigénica para facilitar la inmunohistoquímica en muestra de tejidos FFPE.⁽⁶¹⁾

Si bien el uso de formalina como fijador es un método utilizado en patología durante muchos años,⁽⁶²⁾ fue Blum F la primera persona en utilizar el formaldehido como fijador tisular, el cual en su forma de formalina neutralizada y tamponada al 10% es, actualmente, el fijador tisular más utilizado, ya que logra preservar una gran variedad de tejidos con sus componentes. Según varios estudios, es posible lograr una extracción satisfactoria de ADN a partir de tejidos FFPE, sin embargo, existen ciertas investigaciones que reportan que el uso de

formalina como fijador tisular reduce significativamente la solubilidad y cantidad de ADN en el tejido e induce la degradación del mismo.⁽⁶³⁾

Entre algunos problemas que presenta el uso del formaldehído es la denaturación del ADN en regiones ricas en adenina y timina del ADN de doble cadena y produce regiones para reacciones químicas.⁽⁶⁴⁾ Por otro lado, al comparar el ADN aislado de tejidos congelados y los fijados en formalina se observa una alta frecuencia de secuencias alteradas no reproducibles. Estos artefactos se podrían deber a interacciones entre los nucleótidos de citosina en cualquiera de las hebras. Como resultado de lo anterior, se ha reportado que en la PCR la DNA-Taq polimerasa falla en reconocer la citosina e incorpora una adenina en lugar de una guanosina creando una mutación artificial C-T o G-A.⁽⁶⁵⁾

El proceso que se requiere para la fijación es de al menos una hora por mm de espesor del tejido. Normalmente, los tejidos son fijados en el lapso de 24 a 48 horas. Este tiempo no interfiere en las características histopatológicas del tejido, pero sí en la calidad del ADN.⁽⁶³⁾

Entre los criterios recomendados en el uso del formaldehído están: tiempo prefijación mínimo (menor a 2 horas), usar formalina neutra al 10% fría, que tenga una concentración baja en sal, mantener una fijación fría a 4°C, duración de la fijación de 3 a 6 horas, utilizar el ácido ethylene diamino tetra acético (EDTA) como aditivo y evitar un pH bajo.⁽⁶³⁾

Una vez fijados con formalina, los tejidos pasan a ser almacenados en bloques de parafina que sirven como una fuente de investigación muy valiosa para futuros estudios del tejido.⁽⁶³⁾

Ácidos nucleicos libres en plasma

La respuesta al tratamiento del cáncer de mama es usualmente evaluada a través de criterios en cierta forma subjetivos, al depender de la experiencia del ejecutor como los clínicos y radiológicos (mamografía y sonografía). Por otro lado, si es posible, se pueden utilizar biomarcadores séricos como el antígeno CA 15-3 o el sistema CellSearch que realiza un conteo de las células tumorales

circulantes. Con estos últimos, se estima un pronóstico malo cuando el conteo de células tumorales es mayor o igual a 5 por cada 7,5 ml de sangre o cuando se encuentran valores incrementados del CA 15-3; sin embargo, se les ha atribuido a ambos una sensibilidad de 60 a 70%.^(66,67) Es por ello, y teniendo en cuenta que las imágenes no permiten detectar oportunamente los posibles cambios tumorales, la necesidad de mejorar la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores con la intención de un mejor monitoreo de la terapéutica.⁽⁶⁷⁾

En el año 1948, Mandel y Métais describieron por primera vez la presencia de cfDNA en sangre.⁽⁷⁾ Posteriormente, Leon et al. demostraron por medio de radioinmunoensayos una cantidad elevada en los niveles de cfDNA en sangre de pacientes con Cáncer de mama con un rango de 0 a 2 µg/ml.⁽⁹⁾

El origen de los cfDNA proviene de diferentes fuentes entre ellas, los tumores primarios, células tumorales circulantes en sangre periférica, depósitos metastásicos y de células normales.^(8,68) Su tamaño puede indicar la fuente de origen, ya que las células apoptóticas producen fragmentos de ADN de 180-200 pares de base o múltiples de estas unidades mientras que las células necróticas liberan fragmentos con un peso molecular más pesado sobre las 10 000 pares de bases.⁽⁸⁾

Los cfDNA circulan en sangre en forma de nucleosomas (complejos nucleares de histonas y ADN).⁽⁸⁾ Los nucleosomas no son específicos de patologías oncológicas al encontrarse, también, elevados en patologías benignas. Sin embargo, existe una diferencia significativa respecto a sus valores entre los pacientes sanos, pacientes con patologías benignas, malignas localizadas y malignas avanzadas.⁽⁶⁹⁾ Es por ello que, diversos autores sugieren su uso en el monitoreo de terapias citotóxicas del cáncer, especialmente en la estimación temprana de la eficacia terapéutica en los pacientes,⁽⁶⁹⁾ como se demostró en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado junto con otros marcadores de apoptosis.^(70,71)

La posibilidad de utilizar la concentración de los cfDNAs de plasma o sangre como indicador de cáncer de mama ha sido estudiada por diversos autores. Por ejemplo, Tangvarasittichai et al., por medio de fluorimetría, demostraron la variación de las concentraciones de cfDNAs en plasma dependiendo del estadio

de la enfermedad y su disminución tras la cirugía. La concentración media hallada de cfDNAs fue de 0.5, 235, 422, 1280 y 0.5 ng/ml en pacientes con cáncer de mama clasificados con estadio I, II, III, IV y post cirugía respectivamente.⁽⁷²⁾

Es por ello que los cfDNA tienen el potencial de ser biopsias líquidas para monitorizar el cáncer en tiempo real y servir como diagnóstico de diversos tipos de cáncer al evidenciarse sus valores elevados sobre todo en los estadios más avanzados;⁽⁷³⁾ además de permitir la detección específica de alteraciones genéticas tumorales en los cfDNAs como mutaciones, pérdida de la heterocigocidad e hipermetilación.⁽⁶⁷⁾

Métodos para la detección de mutaciones del gen PIK3CA

PCR digital en chip

Los cfNAs o cfDNAs que se originan en los tumores representan una minoría respecto al total de cfNAs o cfDNAs circulantes en el plasma; es por ello que solo métodos altamente precisos podrán ser capaces de detectar y cuantificar los minoritarios cfNAs en el plasma. La PCR es una técnica utilizada para amplificar secuencias específicas de ADN que utiliza primers o cebadores en múltiples ciclos de síntesis de ADN.⁽⁷⁴⁾ El concepto de la PCR digital fue descrito por primera vez en 1992 por Sykes et al. cuando lograron cuantificar el gen de la cadena pesada de una inmunoglobulina derivada de un clon leucémico en un ambiente con un exceso de genes de la misma inmunoglobulina, pero de linfocitos normales.⁽⁷⁵⁾ Posteriormente, fueron Vogelstein y Kinzler quienes le colocaron nombre a la técnica y demostraron su uso para cuantificar las mutaciones asociadas a enfermedad en las heces de pacientes con cáncer colorrectal.⁽⁷⁶⁾

La PCR digital se basa en el principio de divide y conquistarás, puesto que en ella se produce una dilución y división de las moléculas objetivo de la muestra en numerosos compartimientos permitiendo una cuantificación absoluta y precisa. La división automatizada se puede realizar por medio de emulsiones de agua en aceite o utilizando chips con microcanales.⁽²²⁾

Se le conoce como digital, debido a que tiene una cuantificación binaria (positivo o negativo). Su principio básico involucra la dilución y división de la muestra en millones de unidades separadas con la idea que cada una de ellas contenga al menos una partícula objetivo. Cada una de ellas contiene los agentes necesarios para que una reacción de PCR convencional se lleve a cabo. Si la unidad contiene la plantilla objetivo, la amplificación del PCR generará una señal positiva. En caso no exista la plantilla, no se producirá señal alguna. Al conocerse las unidades divididas, la cantidad de moléculas objetivo inicial se puede estimar para conocer el número total de señales positivas y negativas.^(22, 77)

Cuando se trabaja con muestras con mayores concentraciones de las moléculas objetivo, existe la posibilidad de encontrar múltiples moléculas objetivo en cada unidad. Para esto, se utiliza un factor de ajuste: análisis de distribución de Poisson, en donde el número de moléculas objetivo están determinadas por la ecuación:

$$\lambda = -\ln(1-p)$$

λ : número promedio de moléculas objetivo por unidad

p : proporción del número de unidades con señal positiva con el número total de unidades partidas.

Conforme haya un número mayor de divisiones, existe una mayor precisión de la prueba.^(22, 78)

La PCR digital se utilizó inicialmente con 384 pocillos basado en la cuantificación de la PCR cuantitativa. Actualmente existen una serie de microsistemas capaces de realizar una PCR digital entre ellos: formatos microfluídicos, plataformas tipo disco, PCR en emulsión, micro gotas, slip-chip. Todos ellos se pueden reagrupar en dos modalidades: PCR digital en gotas y PCR digital en chip. La primera está basada en la creación de gotas de emulsiones acuosas en un medio aceitoso donde cada gota funciona como unidad de PCR. La segunda modalidad involucra un sistema microfluídico donde las particiones se dan en un sistema físico de microcanales diseñado sobre placas o arrays.^(22,79)

La PCR digital basada en chips de ThermoFisher: QuantStudio 3D Digital PCR (utilizada en el presente estudio) cuenta con 20 000 pocillos de reacción por chip permitiendo una gran cantidad de reacciones separadas por muestra.⁽⁸⁰⁾ A cada uno de los chips se les agrega, por medio de una dispensadora o de manera manual, una mezcla de 15 ul como máximo en el cual está contenido: el master mix, una mezcla proporcionada por el fabricante (ThermoFisher) que contiene todos los elementos necesarios para que se dé la PCR; el ADN por estudiar; el cebador promotor y reverso específico para la mutación o secuencia blanco, ambos marcados con un colorante fluorescente correspondiente a VIC para alelos silvestres o no mutados y FAM para los alelos mutados; además se le puede agregar agua en caso que sea necesario para completar los 15 ul. Luego, los chips son colocados en un termociclador donde se realizarán las fases de desnaturalización, anillamiento y extensión para crear múltiples moléculas blanco.

Finalmente, los chips son analizados por el QuantStudio Analysis Suite Software en el que el sistema detecta las señales de fluorescencia emitidas por cada pocillo en caso se haya dado alguna amplificación. El software producirá una gráfica de dispersión, así como un histograma reflejando las señales de fluorescencia captadas. Ambos graficarán cuatro conjuntos de puntos o histogramas: uno de color amarillo que representará a los pocillos donde no se produjo amplificación; el color rojo (VIC), a aquellos con amplificación de moléculas silvestres y servirá como control de la reacción; un grupo de azul (FAM), a la mutación blanco y una de color verde, a aquellos pocillos donde hubo tanto una amplificación de moléculas silvestres como mutadas.⁽⁸⁰⁾ El sistema calcula automáticamente los límites entre estos grupos, sin embargo, es posible graduar estos límites, así como la calidad de los resultados en caso sea necesario. Finalmente, el software brinda los resultados tanto de porcentaje de frecuencia alélica encontrada tanto para VIC y FAM además del número de copias por microlitro.⁽⁸⁰⁾

Existen diversas ventajas de la PCR digital comparado con otras técnicas de PCR, por ejemplo, la PCR digital puede detectar moléculas objetivo en una muestra con muy baja frecuencia (1 en 100 000) comparada con la PCR

cuantitativa (qPCR). Por otro lado, provee una cuantificación absoluta de los ácidos nucleicos con mayor rapidez, precisión y reproducibilidad que la qPCR.⁽²²⁾

Entre las aplicaciones que posee la PCR digital, se encuentran: diagnósticos de cáncer en donde se incluye la detección de mutaciones raras, análisis de número de copias como del gen HER2 y del EGFR, usos en la identificación microbiológica y cuantificación de bacterias y virus; además ha demostrado tener una mayor sensibilidad en las pruebas del ADN proveniente de células fetales libres para determinar desórdenes hereditarios.⁽²²⁾

Secuenciación tipo Sanger

La secuenciación del ADN es el proceso por el cual se leen los pares de bases de nucleótidos en el ADN.⁽⁸¹⁾ La capacidad y velocidad para realizar una secuenciación de ADN ha avanzado a pasos agigantados desde la primera secuenciación del pequeño genoma de un bacteriófago con un tamaño de 5386 pares de bases hasta la secuenciación del Genoma Humano con más o menos 3 billones de pares de bases.⁽⁸²⁾

El primer método descrito por et al. para secuenciar ADN fue llamado el método Plus and minus o de más y menos. Se utilizó una polimerasa I del ADN de una E.coli y una ADN polimerasa de un bacteriófago T4. El método quedó en desuso y dos años después Sanger et al. describieron un nuevo método conocido como terminación de cadena o el método dideoxynucleósido.⁽⁸³⁾

El método de Sanger o dideoxynucleósido es considerado como la técnica gold standard respecto a secuenciación de ADN y se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica.⁽⁸²⁾ Durante la secuenciación, la ADN polimerasa copia la plantilla de una hebra del ADN agregando nucleósidos y por lo tanto elongando la nueva cadena. La elongación se produce en la terminación 3' del cebador y el crecimiento de la nueva hebra de ADN se da en dirección de 5' a 3'. Esta extensión se da gracias a la formación de puentes o enlaces fosfodiéster entre la terminación 3' del grupo hidroxilo en el primer o cebador y el grupo 5'fosfato del siguiente deoxinucleósido. Si bien la ADN polimerasa agrega nucleósidos para elongar la

hebra de ADN copiada, esta también puede incorporar análogos de los nucleósidos siendo la pieza angular en el método de Sanger.⁽⁸²⁾

El uso de los 2'-3'dideoxynucleótidos (ddNTPs), como substratos, producen la terminación del proceso de elongación por medio de la ADN polimerasa, debido que estos carecen de la terminación 3'.⁽⁷⁴⁾

Para determinar la secuencia del ADN por este método, primero se divide la doble cadena de ADN en dos simples y una de ellas se utiliza como plantilla para la secuencia. Se utilizan cuatro diferentes dideoxiribonucleósidos trifosfatos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) en cuatro diferentes reacciones para la síntesis de ADN. Cada reacción produce un conjunto de copias de ADN que terminan en diferentes puntos de la secuencia.⁽⁷⁴⁾ Posteriormente, los productos de estas cuatro reacciones son colocadas separadamente en electroforesis en cuatro columnas paralelas en un gel de poliacrilamida. Los fragmentos sintetizados son luego detectados gracias a un marcador radioactivo o fluorescente incorporado o en el cebador en uno de los deoxiribonucleosidos trifosfatos. En la electroforesis, cada banda en cada columna, representa los fragmentos que han sido detenidos en un nucleótido específico, por ende, en diferentes posiciones del ADN. La secuencia del ADN procesado se puede determinar tras leer las bandas en orden desde la parte inferior del gel y a través de las columnas del gel.⁽⁷⁴⁾

1.3 Definición de términos básicos

Vía PI3K: vía de señalización del fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) /AKT. Posee un rol importante en proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular.⁽²³⁾

Gen PIK3CA: Gen localizado en el cromosoma 3q26.3,⁽⁴⁶⁾ encargado de codificar el dominio catalítico P100 α de la vía PI3K.⁽⁴²⁾

Mutación E545K: Mutación localizada en el exón 9 del gen PIK3CA.⁽⁴⁷⁾

Mutación H1047R: Mutación localizada en el exón 20 del gen PIK3CA.⁽⁴⁷⁾

Mutación H1047L: Mutación localizada en el exón 20 del gen PIK3CA.⁽⁴⁷⁾

PCR (reacción en cadena de polimerasa): técnica utilizada para amplificar secuencias específicas de ADN cebador en múltiples ciclos de síntesis de ADN.⁽⁷⁴⁾

PCR digital: Modalidad de PCR que utiliza un sistema binario basado en múltiples reacciones compartimentalizadas.⁽²⁹⁾

PCR digital chip: Modalidad de PCR digital que utiliza un sistema multifluídico.⁽²⁹⁾

Ácidos nucleicos libres en plasma: Ácidos nucleicos provenientes de células normales o tumorales circulantes libres en plasma sanguíneo.⁽⁸⁴⁾

Secuenciación de ADN: Método por el cual se leen los pares de bases del ADN.⁽⁷⁴⁾

Secuenciación tipo Sanger: Método de secuenciación de ADN descrito por Sanger et al. en 1977 el cual se basa en el uso de dideoxinucleósidos trifosfatos derivados de los deoxiribonucleósidos trifosfatos normales, los cuales carecen del grupo hidroxilo 3' y producen la terminación de la elongación de la cadena cuando son agregados en la cadena de ADN por la ADN polimerasa.⁽⁷⁴⁾

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 Formulación de la hipótesis

La PCR digital tiene una sensibilidad igual o superior a la secuenciación Sanger y es concordante en el plasma al detectar las mutaciones en el gen PIK3CA en las pacientes peruanas con cáncer de mama en Lima, 2016-2017.

2.2 Variables y su operacionalización

Tabla 1. Variables del estudio y su operacionalización

Variable	Definición	Tipo de variable según su naturaleza y su relación	Indicador o definición operativa	Escala de medición	Categoría y valores	Medio de verificación
Mutación gen PIK3CA por PCR digital en Tumor	Detección de mutación E545 y/o H1047 en Tumor del paciente por medio de PCR digital.	Cualitativa e independiente	Presencia de mutación E545 y/o H1047 en tumor, estimado por la lectora 3D de PCR digital	Nominal	0. Presente 1.No presente	PCR digital.
Mutación gen PIK3CA por Secuenciación Sanger en tumor	Detección de mutación E545 y/o H1047 en Tumor del paciente por medio de secuenciación Sanger.	Cualitativa e independiente	Presencia de mutación E545 y/o H1047 en tumor, estimado por la secuenciación Sanger	Nominal	0. Presente 1.No presente	Secuenciación Sanger.
Mutación en gen PIK3CA por PCR digital en Plasma	Detección de mutación E545 y/o H1047 en Plasma del paciente por medio de PCR digital.	Cualitativa y dependiente	Presencia de mutación E545 y/o H1047 en Plasma, estimado por la lectora 3D de PCR digital	Nominal	0. Presente 1.No presente	PCR digital

2.3 Covariables y su operacionalización

Tabla 2. Covariables del estudio y su operacionalización

Co- variable	Definición	Tipo de variable según su naturaleza	Indicador o definición operativa	Escala de medición	Categoría y valores	Medio de verificación
Edad	Edad de la paciente al diagnóstico	Cuantitativa y dependiente	años	Continua		Historia clínica
Lugar de origen	Lugar de nacimiento	Cualitativa y dependiente	Departamentos del Perú	Nominal	Costa Sierra Selva Lima	Historia clínica
Estadio cáncer	Clasificación en grados de la extensión del cáncer. ⁽³⁷⁾	Cualitativa y dependiente	TNM	Nominal	0, I, II, III, IV, No evaluable	Historia clínica
Tipo histológico	Tipo Histológico	Cualitativa y dependiente	Tipo histológico según clasificación OMS. ⁽⁷³⁾	Nominal	Ductal Lobulillar Otros	Historia clínica
Her 2	Presencia o ausencia del receptor HER2	Cualitativa y dependiente	Tinción de membrana intensa y uniforme en > 30% de células neoplásicas. ⁽⁸⁵⁾	Nominal	Positivo Negativo No evaluable	Historia clínica
Receptor estrógeno	Presencia o ausencia del receptor para estrógeno.	Cualitativa y dependiente	Expresión en más de 1% de células neoplásicas independientemente de la intensidad ⁽⁷³⁾	Nominal	Positivo Negativo No evaluable	Historia clínica
Receptor progesterona	Presencia o ausencia del receptor para progesterona.	Cualitativa y dependiente	Expresión en más de 1% de células neoplásicas independientemente de la intensidad ⁽⁸⁵⁾	Nominal	Positivo Negativo No evaluable	Historia clínica

Co-variable	Definición	Tipo de variable según su naturaleza y relación	Indicador o definición operativa	Escala de medición	Categoría y valores	Medio de verificación
Tamaño tumor	Tamaño del tumor primario	Cualitativa y dependiente	Tamaño del diámetro mayor del tumor primario.	Nominal	Mayor o igual a 4cm Menor a 4cm	Historia clínica
Nódulo linfáticos	Presencia de metástasis a por lo menos un nódulo linfático.	Cualitativa y dependiente	Presencia de metástasis a por lo menos un nódulo linfático.	Nominal	Positivo Negativo	Historia clínica
Metástasis	Metástasis a distancia (otro órgano)	Cualitativa y dependiente	Metástasis a distancia (otro órgano)	Nominal	Positivo Negativo	Historia clínica
Estatus Hormonal	Estado menstrual de la paciente al momento del diagnóstico.	Cualitativa y dependiente	Estado menstrual	Nominal	Premenopausia Posmenopausia	Historia clínica

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño

Se realizó un estudio cuantitativo, observacional, analítico y transversal.

3.2 Diseño muestral

El presente estudio tomó lugar, entre enero de 2016 y marzo de 2018, en el Departamento de Cirugía de Mamas y Tejidos Blandos del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) y Oncosalud - AUNA para el reclutamiento de pacientes y obtención de muestras; y en el Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres para el análisis de las mismas. El periodo de reclutamiento estuvo comprendido entre el primero de enero de 2016 y el 31 de agosto de 2017.

La población de estudio estuvo definida como toda paciente peruana mayor de 18 años con diagnóstico de cáncer de mama que aceptara participar en el estudio por medio del consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron: no contar con muestra tumoral o de biopsia para el análisis, presentar concomitantemente otra neoplasia maligna y/o presentar algún tipo de coagulopatía o linfocitosis.

El tamaño muestral fue calculado en relación a las tablas publicadas por Bujang MA y Adnan TH en el 2016 para estudios de sensibilidad y especificidad ⁽⁸⁶⁾, para lo cual, esperando una prevalencia de 40% con un poder estadístico de 80%, la muestra mínima necesaria fue estimada en 78 pacientes.

Posteriormente, se calculó la muestra ajustada a las pérdidas, por lo cual tomando en consideración una proporción esperada de pérdidas de 10% se obtuvo un tamaño muestral final de 87 pacientes. La técnica de muestreo utilizada fue no probabilística continua.

La unidad de análisis estuvo definida como cada ensayo de PCR digital o de secuenciación realizado por paciente. En total fueron tres ensayos de PCR digital por paciente en tumor (uno por cada mutación), dos de PCR digital en plasma

(mutación H1047R y E545K) y dos ensayos de secuenciación Sanger por paciente (uno por cada exón).

3.3 Procedimiento de recolección de datos

Las pacientes fueron reclutadas, previamente a su cirugía, en las Instituciones de referencia INEN y Oncosalud - AUNA a través del consentimiento informado (ver anexo 3).

A cada participante, se le extrajo una muestra de sangre periférica de 9ml por flebotomía previa a la operación. Las muestras fueron refrigeradas a 4°C y centrifugadas en un plazo máximo de tres horas posterior a su extracción.

Para lograr la separación del plasma, se realizó una primera centrifugación a 1200 rcf (fuerza centrífuga relativa) por 10 minutos a 4°C y una segunda centrifugación a 16 000 rcf por 10 minutos a 4°C; se almacenó luego a -20°C en tubos de 1.5 ml.

El aislamiento del ADN proveniente del plasma se realizó por medio del kit Nucleo Spin Plasma XS (Macherey-Nagel) donde se utilizaron 480ul de plasma. Finalmente, se eluyó con 40 ul de buffer de elución.

La obtención de los tumores o biopsias, en el caso de las pacientes con respuesta total a la neoadjuvancia, fue por medio de la colaboración de un médico patólogo, el cual seleccionó los tacos y delimitó, en las láminas correspondientes, el área con tejido tumoral viable.

A cada uno de los tacos tumorales seleccionados se les realizaron ocho cortes de 4mm cada uno. Los cortes fueron almacenados en tubos de 1.5ml a 4°C en la espera de su correspondiente aislamiento de ADN.

El aislamiento de ADN en los tumores o biopsias se realizó siguiendo el protocolo del kit GeneJet FFPE DNA purification Kit. La elución se realizó con 80 ul de buffer de elución. Todas las muestras de ADN aislado, tanto plasma como tumor, fueron cuantificadas por espectrofotometría y almacenadas a -20°C.

Las muestras de tumor fueron analizadas por PCR digital usando el análisis de mutaciones raras del QuantStudio 3D Digital PCR System para las mutaciones PIK3CA: E545K, H1047R y H1047L, mientras que las de plasma solo para las dos primeras.

Para la reacción de PCR digital, en las muestras de tumor, se mezclaron 1.5 ul de ADN con 0.75 ul de la sonda correspondiente a la mutación (marcadas con el fluorescente FAM para alelos mutados y fluorescente VIC para alelos silvestres) (ver anexo 1), 7.5 ul del QuantStudio 3D Master Mix y 5.25 ul de agua, obteniéndose un volumen total de 15 ul. En el caso de las muestras de plasma, al tener menor cantidad de ADN por microlitro, se mezclaron 12 ul de ADN con 0.5 ul de la sonda y 7.5 ul del QuantStudio 3D Master Mix, se obtuvo un volumen total de 20 ul.

Por medio de una dispensadora especial del sistema (QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader), se cargaron 15 ul del volumen total de la mezcla, tanto de los tumores como de plasma, en los QuantStudio 3D Digital PCR 20K chips. Estos fueron colocados en un termociclador que se programó para iniciar con una fase de denaturación de 10 minutos a 96°C, seguida de 39 ciclos a 60°C por 2 minutos, 30 segundos a 98°C y luego 2 minutos a 60°C. Finalmente, las muestras fueron dejadas a 10°C durante, por lo menos, 20 minutos. Luego, los chips fueron procesados por la lectora 3D del QuantStudio 3D Digital PCR System. Los resultados fueron analizados por el QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software.

El QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software produce, al analizar los chips, una gráfica de dispersión, así como un histograma que refleja las señales de fluorescencia captadas. En total grafica cuatro conjuntos de puntos: uno de color amarillo que representará a los pocillos donde no se produjo amplificación localizado en el cuadrante inferior izquierdo de la gráfica, el color rojo (marcados con el fluorescente VIC) representará aquellos con amplificación de moléculas silvestres (cuadrante inferior derecho de la gráfica) y servirá como control de la reacción, un grupo de azul (marcados con fluorescente FAM) que representa a la mutación blanco (cuadrante superior izquierdo) y una de color verde que representa aquellos pocillos donde hubo tanto una amplificación de moléculas

silvestres como mutadas (cuadrante superior derecho) (anexo 2: figura suplementaria 1). El sistema calcula automáticamente los límites entre estos grupos, sin embargo, para disminuir posibles falsos positivos y aumentar la uniformidad de los resultados se establecieron valores fijos para los ejes o límites correspondientes a FAM (eje horizontal) y VIC (eje vertical) en las gráficas presentadas por el QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software.

El eje de FAM fue establecido utilizando casos modelo para cada una de las mutaciones en las muestras de tumor. Un caso modelo era aquel que contenía 5 o más puntos correspondientes a FAM aglomerados en el cuadrante superior izquierdo de la gráfica (ver anexo 2). El eje de VIC fue establecido utilizando todas las muestras de tumor.

La frecuencia total de alelos mutados (FTA) es la proporción de alelos mutados respecto a la suma de los alelos silvestres y mutados. Se estableció que las pacientes sean consideradas como positivas, si tenían un porcentaje de FTA mayor a 0.1%, además de tener por lo menos un punto azul correspondiente a FAM (alelos mutados) en la gráfica presentadas por el QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software.

El límite de la frecuencia total de alelos mutados fue establecido por medio de un ensayo de diluciones, donde se cuantificó el número exacto de copias de un ADN control proveniente de un paciente sano (sin mutación) y un caso modelo de cada mutación. Luego, se pasó a realizar diluciones al 1, 0.1 y 0.01% del ADN mutado con el control.

Por otro lado, las muestras de tumor y de biopsia fueron analizadas también por secuenciación Sanger para las mismas mutaciones PIK3CA: E545K, H1047R y H1047L. Para ello se realizó primero una amplificación de los exones estudiados por medio de PCR convencional (ver cebadores y condiciones en anexo 2). La amplificación de los exones se confirmó por electroforesis (ver anexo 3). La purificación de las muestras amplificadas se realizó por medio del *GeneJet PCR Purification Kit* (Thermo Scientific), siendo eluidas con 35 ul de buffer de elución (previamente calentado por lo menos por 10 minutos a 60°C, para mejorar la separación del ADN de la columna). Las muestras se cuantificaron, luego, por espectrofotometría. Las secuencias fueron leídas por dos operadores de los

cuales uno estuvo cegado a los resultados por PCR digital. Se buscó en la posición 3140 del exón 20 un cambio de adenina por guanina correspondiente a la mutación H1047R o un cambio de adenina por timina en la misma posición para la mutación H1047L. En el caso de la mutación E545K en el exón 09, se buscó un cambio de guanina por adenina en la posición 1633 (ver Anexo 3).

Los datos clínicopatológicos de las pacientes fueron obtenidos de sus historias clínicas, a través de la ficha de recolección de datos desarrollada por el autor del estudio (ver anexo 4).

3.4 Procesamiento y análisis de los datos

La sensibilidad y especificidad de la PCR digital-chip respecto a la secuenciación se calculó por medio de la curva ROC o curva de Característica Operativa del Receptor. Para ello, se comparó el número total de mutaciones detectadas por la PCR digital en tumor con aquellas detectadas por la secuenciación tipo Sanger. Se considera que una prueba es no discriminatoria cuando el área bajo la curva es de 0.5, aceptable entre 0.7 y 0.8, excelente entre 0.8 y 0.9 y sobresaliente valores superiores a 0.9.⁽⁸⁷⁾ Tanto el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) fueron calculados por medio de Java Stat.⁽⁸⁸⁾

El nivel de concordancia de la PCR digital en detectar mutaciones del gen PIK3CA en plasma y tumor fue estimado por medio del coeficiente kappa de Cohen (IC 95%) y se utilizó también las tablas 2x2 de contingencia de Java Stat⁽⁸⁸⁾, donde se considera una pobre concordancia cuando los valores de K se encuentran entre 0.00 y 0.20; débil entre 0.21 y 0.40; moderada entre 0.41 y 0.60; buena entre 0.61 y 0.80 y muy buena entre 0.81 y 1.00.⁽⁸⁹⁾

Para establecer el eje de FAM, primero se tomó como punto de referencia, en cada caso modelo, el punto azul más inferior de FAM y se calculó el promedio y desviación estándar (DS) para cada mutación. En el caso de VIC, se tomó como punto de referencia el punto rojo más a la izquierda de VIC. El promedio y desviación estándar, en este caso, se calculó utilizando todos los ensayos correspondientes a los tumores. Se realizaron previamente las pruebas de Shapiro-Wilk y Skewness-Kurtosis para estudiar la normalidad de la data.

La prueba exacta de Fisher fue utilizada con las covariables cualitativas para estimar la asociación entre la presencia de mutaciones y las características clínico-patológicas de las pacientes; mientras que para las covariables continuas se utilizó la prueba t de student. Se consideró un valor de $p < 0.05$ para indicar diferencia estadísticamente significativa.

Se utilizó el software estadístico STATA versión 12 para el análisis estadístico respectivo.

3.5 Aspectos éticos

El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de San Martín de Porres y por el Comité Revisor de Protocolos del Departamento de Investigación del INEN.

Se contó con la autorización de los pacientes a través de un consentimiento informado previamente aprobado por los comités mencionados anteriormente (ver anexo 3). Cabe resaltar que el presente estudio está englobado dentro de un proyecto de investigación titulado: Test genético – epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento, el cual se está realizando en el Centro de investigación de Genética y Biología Molecular de la Universidad de San Martín de Porres, razón por la cual se utilizó su consentimiento informado para la realización de la presente investigación.

Para salvaguardar la confidencialidad de las participantes, se utilizó la codificación de cada una de las muestras.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

Se reclutaron, en total, 95 pacientes que aceptaron participar por medio del consentimiento informado, de las cuales, solo 59 pacientes, provenientes del INEN, fueron elegibles finalmente para el estudio (ver figura 1). Las características demográficas y clínicas de las pacientes se encuentran resumidas en la tabla 3. Las fuentes de las muestras tumorales fueron de: tumor residual (post neoadyuvancia) con 33 casos (55.9%), tumor primario 16 casos (27.12%), biopsias 7 casos (11.9%) y ganglio linfático 3 casos (5.08%). Se contaron con 47 muestras de plasma en total de las cuales solo se analizaron 43.

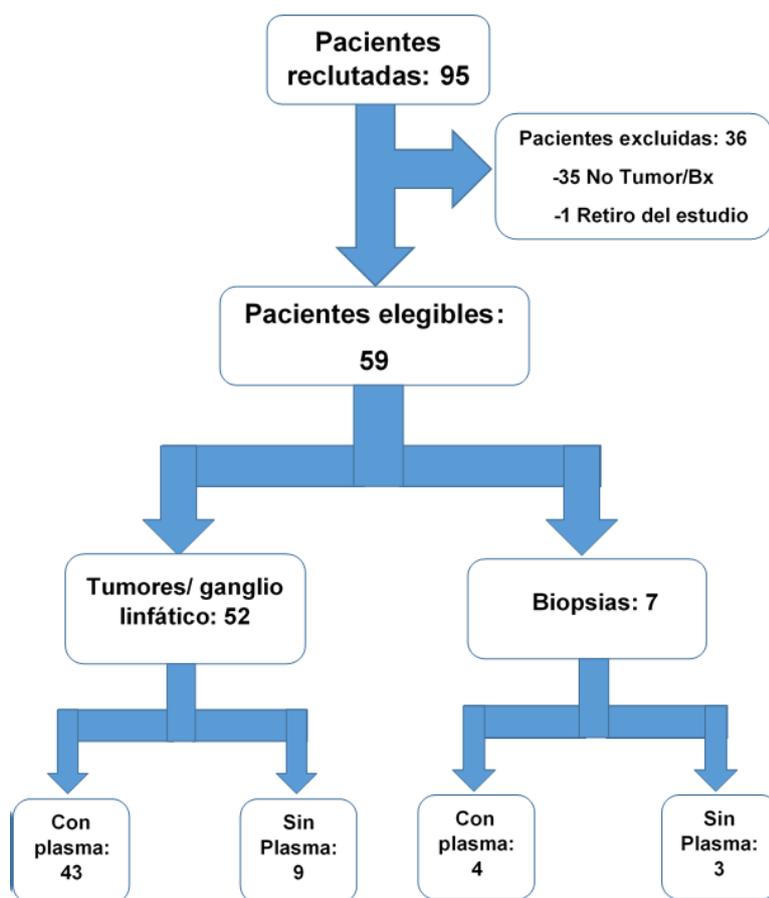


Figura 1. Flujo de reclutamiento de pacientes y de muestras obtenidas

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de la población de estudio (N=59)

Características clínicas	N	%
Neoadyuvancia previa		
SI	40	67.7
NO	19	32.2
Edad (promedio en años)	53.49 +/- 1.53	
Lugar de nacimiento		
Costa	16	27.12
Sierra	19	32.2
Selva	5	8.5
Lima	19	32.2
Estadio del cáncer		
0	1	1.7
I	3	5.1
II	10	16.9
III	37	62.71
IV	7	11.9
No evaluable	1	1.7
Tipo histológico		
Ductal	48	81.4
Lobular	4	6.8
Otros	7	11.8
Receptores HER-2		
Positivo	20	33.8
Negativo	35	59.3
No evaluable	4	6.7
Receptores estrógeno		
Positivo	38	64.4
Negativo	20	33.8
No evaluable	1	1.7
Receptores progesterona		
Positivo	32	54.2
Negativo	26	44.1
No evaluable	1	1.7
Tamaño tumor		
< 4cm	16	27.1
≥ 4cm	43	72.9
Nódulo linfático		
Positivo	42	71.2
Negativo	17	28.8
Metástasis		
Positivo	7	11.9
Negativo	52	88.1
Estado hormonal		
Premenopausia	13	22
Posmenopausia	46	78

El análisis de normalidad de los casos modelo para FAM y VIC se encuentran en la tabla 4, los histogramas respectivos se encuentran en el anexo 3.

Tabla 4. Análisis de normalidad de caso modelo para FAM y VIC

	Mutaciones	Shapiro-Wilk	Skewness	Kurtosis	Mediana
FAM	E545K	0.12	0.33	1.56	1361.34
	H1047R	0.96	-0.39	2.5	6339.5
	H1047L	0.13	-0.13	1.93	4947.52
VIC*		0.008	-0.23	2.72	2331.62

(*): Todos los casos fueron utilizados para determinar sus valores.

Los promedios de los puntos azules (FAM) según mutación y de los puntos rojos (VIC) se encuentran resumidos en la tabla 5.

Tabla 5. Promedio y Desviación estándar de los puntos azules inferiores y puntos rojos izquierdos según mutación

Mutación PIK3CA	Punto azul inferior (FAM)	Punto rojo izquierdo (VIC)
H1047R	6399.46 +/- 843.82	
E545K	1427.58 +/- 251.91	2193.42 +/- 647.48
H1047L	4883.89 +/- 1597.22	

Los ejes de FAM fueron establecidos utilizando el valor correspondiente a una desviación estándar sobre el promedio, definiéndose los ejes de FAM en 7243.28, 6481.41 y 1679.49 para H1047R, H1047L y E545K, respectivamente. El eje de VIC fue establecido en 2193.42, utilizando el promedio de los puntos rojos para las mutaciones H1047R y L. Para la mutación E545K, el eje de VIC

fue establecido restando una desviación estándar al promedio de puntos de VIC obteniendo: 1545.94.

Por medio del ensayo de diluciones, la PCR digital detectó las tres mutaciones del gen PIK3CA hasta una dilución de 0.1% y se estableció ese valor como el mínimo de FTAs requerido (tabla 6).

Tabla 6. Ensayo de diluciones por PCR digital para las mutaciones PIK3CA del estudio.

Mutación	Porcentaje de dilución teórico	Porcentaje cuantificado por dPCR	Intervalo de confianza (95%)
H1047R	1%	0.33%	0.22- 0.49%
	0.1%	0.01%	0.004- 0.05%
	0.01%	0%	-
E545K	1%	1.03%	0.85- 1.29%
	0.1%	-	-
	0.01%	0.27%	0.19- 0.38%
H1047L	1%	1.02%	0.74- 1.4%
	0.1%	0.04%	0.018- 0.1%
	0.01%	0%	-

(-): datos no disponibles.

En base a estos criterios, se analizó el ADN de las muestras tumorales por PCR digital y se encontró una frecuencia de 44 casos (74.6%) considerando todas las mutaciones. La más predominante fue la mutación E545K con 37 casos (62,7%), seguida de la H1047R con 13 casos (22%) y la H1047L con 2 casos (3.4%). Además, cinco pacientes presentaron simultáneamente dos mutaciones PIK3CA (cuatro con H1047R y E545K y uno con H1047R y H1047L) y una presentó simultáneamente las tres mutaciones. Por otro lado, la secuenciación Sanger identificó una frecuencia total de 7 mutaciones (11.8%), de las cuales 4

(6.7%) corresponden a la mutación E545K y 3 (5.1%) a la mutación H1047R (tabla 7). La secuenciación Sanger no identificó ninguna mutación H1047L.

Tabla 7. Mutaciones PIK3CA identificadas en tumor por PCR digital y Secuenciación Sanger (H1047R, H1047L y E545K) y plasma por PCR digital (H1047R y E545K)

Paciente	Estadio	PCR digital tejido tumoral	Secuenciación Sanger tejido tumoral	PCR digital Plasma
1	III	WT	WT	WT
2	III	H1047R (56.54%)	H1047R	WT
3	III	H1047R (4.04%)	WT	H1047R
4	III	E545K (0.12%)	WT	WT
5	III	H1047R (0.21%)	WT	WT
6	III	E545K (0.34%)	WT	WT
7	IV	WT	WT	WT
8	II	E545K (1.03%)	WT	WT
9	III	WT	WT	WT
10	III	WT	WT	WT
12	III	WT	WT	WT
15	I	E545K (0.11%)	WT	WT
16	II	E545K (3.02%)	WT	E545K
17	IV	E545K (1.13%)	WT	-
18	II	H1047R (0.15%) E545K (12.34%)	WT E545K	WT WT

Paciente	Estadio	PCR digital tejido tumoral	Secuenciación Sanger tejido tumoral	PCR digital Plasma
19	III	H1047R (0.23%)	WT	-
		E545K (0.14%)	WT	-
21	IV	E545K (0.77%)	WT	WT
22	III	E545K (0.11%)	WT	WT
23	II	WT	WT	WT
24	III	E545K (50.26%)	E545K	WT
25	II	<i>EK45K</i> (0.13%)	WT	WT
26	-	E545K (0.26%)	WT	WT
28	II	H1047R (39.61%)	H1047R	WT
			WT	WT
		E545K (0.27%)		
29	III	WT	WT	WT
30	III	E545K (0.25%)	WT	-
32	III	WT	WT	WT
33	IV	E545K (0.5%)	WT	WT
34	III	H1047R (13.05%)	WT	WT
			WT	WT
		E545K (0.25%)		
35	III	H1047R (0.17%)	WT	WT
		H1047L (1%)	WT	-
36	II	E545K (0.77%)	WT	WT
39	III	WT	WT	WT
40	II	E545K (0.4%)	WT	WT
41	III	WT	WT	WT
42	III	H1047R (11.10%)	WT	WT
43	III	E545K (3.23%)	WT	WT
44	III	E545K (0.24%)	WT	WT
45	III	E545K (5.26%)	WT	WT

Paciente	Estadio	PCR digital tejido tumoral	Secuenciación Sanger tejido tumoral	PCR digital Plasma
46	I	H1047R (9.52%)	WT	WT
47*	III	WT	WT	WT
49	III	E545K (0.95%)	WT	WT
50	III	E545K (6.84%)	WT	WT
52	II	E545K (4.22%)	WT	-
53*	III	WT	WT	-
56	III	E545K (0.10%)	WT	-
58	III	E545K (5.45%)	WT	-
59	IV	H1047R (37.09%)	H1047R	-
		E545K (1.76%)	^	-
60	III	E545K (0.14%)	WT	-
61	I	E545K (0.31%)	WT	-
62	III	E545K (36.27%)	E545K	-
64	IV	WT	WT	WT
65	III	E545K (0.13%)	WT	WT
66	0	WT	WT	-
67	III	E545K (0.21%)	WT	WT
68*	III	E545K (26.67%)	E545K	WT
69	IV	H1047R (11.21%)	WT	WT
70	II	H1047R (2.14%)	WT	-
		E545K (0.23%)	WT	-
		H1047L (5%)	WT	-
71	III	WT	WT	-
72	III	E545K (0.33%)	WT	-
73	III	E545K (0.19%)	WT	-

WT: wild type o tipo silvestre.

(-) paciente sin muestra de plasma.

(*) tejido proveniente de ganglio linfático.

(^): resultados no disponibles.

Al realizar el análisis de sensibilidad entre PCR digital y la secuenciación Sanger por medio de la curva ROC, se obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad de 73.53% para un punto de corte al 0.1% de FTA y un área bajo la curva de 0.99% IC 95%: 0.98- 100% (figura 2). El VPP fue de 13.7% y el VPP de 100%. Por otro lado, el análisis de la curva ROC indicó como punto de corte ideal una FTA de 12.34%, donde la sensibilidad fue de 100% y la especificidad de 99.41%.

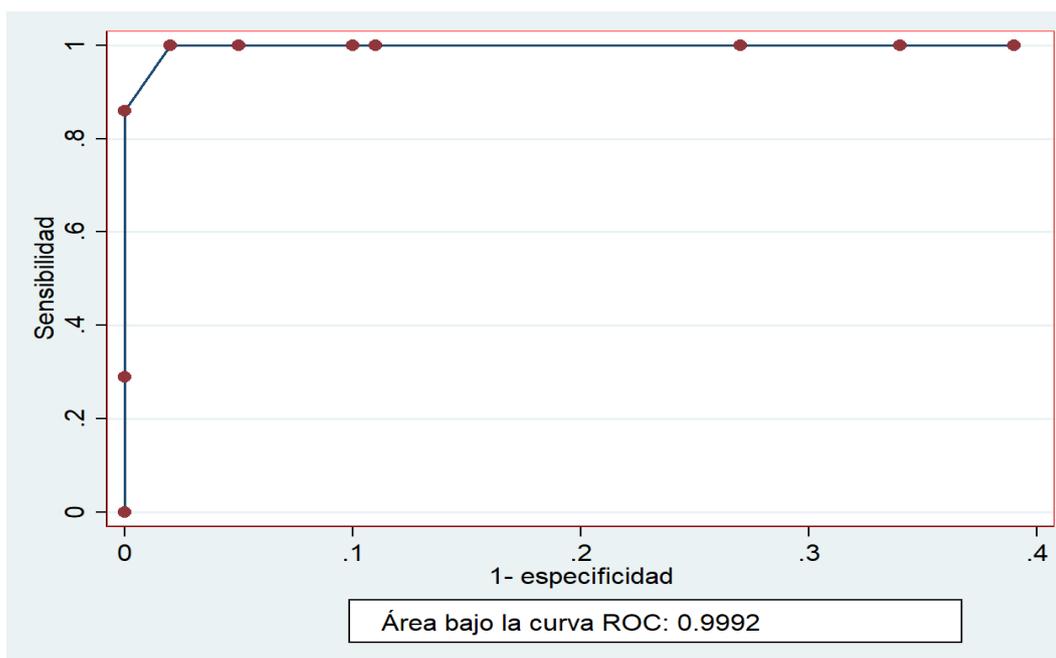


Figura 2. Curva ROC de la PCR digital en relación a la Secuenciación Sanger

Luego, se realizó el análisis de ADN proveniente del plasma por PCR digital, donde se detectaron en total dos casos mutados, los cuales fueron confirmados por el análisis en tumor (tabla 7). La PCR digital mostró una concordancia débil entre tumor y plasma con un kappa de 0.074 (IC 95%: -0.022 - 0.074).

Posteriormente, se hizo un análisis comparando los casos mutados para cualquiera de las tres mutaciones PIK3CA y las covariables clínicas de las pacientes (tabla 8), sin encontrarse asociación. Sin embargo, al realizar el análisis según mutación se encontró asociación significativa entre la presencia de la mutación H1047R y la expresión de receptores para HER2 ($p= 0.038$); el resto de variables no mostraron asociación.

Tabla 8: Asociación entre estatus mutacional PIK3CA según PCR digital y covariables clínicas

Características clínicas	Casos mutados	Casos no mutados	p
Edad (promedio en años)	54.07 +/- 1.69	51.94 +/- 3.38	0.54
Lugar de nacimiento			0.67
Costa	13 (22.0%)	3 (5.1%)	
Sierra	14 (23.7%)	5 (8.8%)	
Selva	4 (6.7%)	1 (1.7%)	
Lima	12 (20.3%)	7 (11.9%)	
Estadio del cáncer			0.28
0	0 (0.0%)	1 (1.7%)	
I	3 (5.1%)	0 (0.0%)	
II	9 (15.3%)	1 (1.7%)	
III	26 (44.1%)	11 (18.6%)	
IV	4 (6.8%)	3 (5.1%)	
No evaluable	1 (1.7%)	0 (0.0%)	
Tipo histológico			0.39
Ductal	33 (55.9%)	15 (25.4%)	
Lobular	4 (6.8%)	0 (0.0%)	
Otros	6 (10.2%)	1 (1.7%)	
Receptores HER-2			0.79
Positivo	16 (27.1%)	4 (6.7%)	
Negativo	24 (40.7%)	11 (18.6%)	
No evaluable	3 (5.1%)	1 (1.7%)	
Receptores estrógeno			0.30
Positivo	25 (42.4%)	13 (22%)	
Negativo	17 (28.8%)	3 (5.1%)	
No evaluable	1 (1.7%)	0 (0.0%)	
Receptores progesterona			0.45
Positivo	21 (35.6%)	11 (18.6%)	
Negativo	21 (35.6%)	5 (8.5%)	
No evaluable	1 (1.7%)	0 (0.0%)	
Tamaño tumor			0.19
< 4cm	14 (23.7%)	2 (3.4%)	
≥ 4cm	29 (49.2%)	14 (23.7%)	
Nódulo linfático			0.76
Positivo	30 (50.9%)	12 (20.3%)	
Negativo	13 (22.0%)	4 (6.78%)	
Metástasis			0.38
Positivo	4 (6.8%)	3 (5.1%)	
Negativo	39 (66.1%)	13 (22.0%)	
Estado hormonal			1.00
Premenopausia	10 (16.9%)	3 (5.1%)	
Posmenopausia	33 (55.9%)	13 (22.0%)	

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló con el objetivo de determinar la sensibilidad de la PCR digital en tumor respecto a la secuenciación Sanger y su concordancia en plasma. Se decidió comparar esta plataforma con la secuenciación Sanger, al ser esta última un método considerado como el patrón de oro (gold standard), en la detección de mutaciones en muestras tumorales y análisis genético en general.

Al realizar el análisis de sensibilidad y especificidad por medio de la curva ROC, se encontró que la PCR digital, para un punto de corte de 0.1 % de Frecuencia total de alelos mutados (FTA), establecido en el presente estudio por el ensayo de diluciones, presenta una sensibilidad de 100 % respecto a la secuenciación Sanger en detectar las mutaciones del gen PIK3CA y una especificidad de 73.53 %, además de un área bajo la curva de 0.99, lo cual indicaría que la PCR digital tiene una precisión casi perfecta, según este estudio, en detectar mutaciones PIK3CA respecto a la secuenciación Sanger. Esta alta sensibilidad se debe a que la PCR digital logró detectar exactamente las mismas mutaciones que la secuenciación había detectado (siete casos). Sin embargo, es importante destacar que la PCR digital identificó 37 casos adicionales con por lo menos una mutación; casos con porcentajes de frecuencia total de alelos mutados inferiores a 5% en su mayoría, los cuales no fueron detectados por la secuenciación Sanger. Esto se puede deber a un umbral límite de detección que presenta la secuenciación Sanger, el cual fue de aproximadamente 12% en el presente estudio, ya que logró reconocer un caso para la mutación E545K con 12.34% pero no logró detectar casos con valores similares en la mutación H1047R. Algo similar fue reportado por Beaver et al.,⁽⁶⁾ donde la PCR digital en gotas había identificado un caso mutado para E545K con 28.9% de frecuencia alélica mas no había podido ser identificado por la secuenciación Sanger.

Además de lo anterior, la PCR digital identificó seis casos donde coexistían la mutación H1047R y E545K (casos: 18,19, 28, 34 y 59), hallazgo raro, pero que también ha sido reportado por otros autores,^(6, 27, 90) con excepción del caso 70 en el cual coexistían las tres mutaciones y el 35 donde coexistían las mutaciones

H1047R y H1047L, lo cual según nuestro conocimiento no ha sido reportado en otros estudios.

Por otro lado, cabe destacar que al realizar la amplificación de las muestras se utilizó la combinación de un cebador diseñado para PCR digital junto con otro para PCR convencional (ambos brindaban productos de 195 a 200 pares de base) en todas las muestras para el exón 09, pero en solo 19 muestras para el exón 20. El resto de muestras para el exón 20 fueron amplificadas con los cebadores para PCR convencional. La razón de la diferencia fue el tamaño del producto de la PCR, ya que al ser este último de 80 pares de base, era demasiado pequeño para leerse correctamente luego de la secuenciación, al estar la posición de la mutación muy limítrofe sea al inicio o al final de la secuencia (donde existía mucha interferencia). Es por ello que se optó en esos casos por un producto de mayor tamaño. El resto de muestras del exón 20 sí lograron leerse correctamente con los productos de 80 pares de base. Además, es importante resaltar que no se logró realizar la amplificación de la muestra correspondiente a la paciente 59 para el exón 09 y por ello su secuenciación. Si bien no se saben las razones exactas por las cuales no se logró amplificar, a pesar de los intentos reiterados con diferentes concentraciones de cloruro de magnesio y diferentes programas en el termociclador, se sospecha que se podría deber a la presencia de inhibidores en la mezcla o a una degradación del ADN.

Más aun, es importante resaltar que para el cálculo de la sensibilidad y especificidad se compararon los resultados de los 176 ensayos realizados en la PCR digital, tres ensayos por paciente (uno por mutación) versus los resultados de los 117 ensayos realizados por la secuenciación Sanger, dos por paciente (uno por exón). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el exón 20 se encuentran dos mutaciones en la misma posición (H1047R y H1047L), por lo cual la búsqueda y tabulación de los resultados de estas mutaciones fue considerada por separado.

La prevalencia de mutaciones PIK3CA en nuestra población de estudio, según la secuenciación Sanger, fue de 11.86%, valor bajo, aunque cercano al rango de prevalencias reportadas por otros autores que va de 16.4 a 45%⁽¹⁹⁾ y en cierto modo cercano a la prevalencia reportada por Castañeda et al⁽²⁸⁾ de 15.7% en

población peruana. Por otro lado, García-Saenz et al.⁽³⁰⁾ reportó una prevalencia de 40.8% determinada con la misma plataforma de la presente investigación (QuantStudio 3D Digital PCR). Sin embargo, en nuestro estudio la PCR digital arrojó una prevalencia de 74.6%, la cual podría considerarse como la prevalencia más alta de esta mutación en ser reportada. Los altos valores de prevalencia reportados en nuestro estudio y en el de García-Saenz et al.⁽³⁰⁾ por PCR digital podrían sugerir un infradiagnóstico de las mutaciones PIK3CA en otras poblaciones de estudio. La diferencia entre nuestro resultado y aquel reportado por García-Saenz et al.⁽³⁰⁾ se podría deber a la metodología utilizada al momento de analizar las muestras.

En el presente trabajo, se definieron límites fijos para VIC y FAM en base a casos modelos identificados para cada mutación mientras que en el estudio de García-Saenz et al.⁽³⁰⁾ se utilizaron los mismos valores evocados por el sistema salvo algunas excepciones, donde estos fueron ajustados manualmente. La razón principal para establecer límites para VIC y FAM en el presente estudio radicó en la presencia, en algunas muestras, de puntos azules o de FAM (en la mayoría de casos en poca cantidad, por ejemplo, uno o dos puntos) limítrofes a los no amplificados (amarillos) produciendo dudas si se estos eran casos falsos positivos o puntos que debían ser considerados como indeterminados. El discernimiento final de este dilema hubiera terminado en una modificación manual de los casos, sin embargo, esta, al estar basada en decisiones subjetivas, disminuiría la reproducibilidad de los datos afectando finalmente la validez externa del estudio. Por otro lado, el uso de los valores evocados directamente por el sistema, sin modificaciones manuales, duplicaba los casos de las mutaciones en el exón 20 (H1047R y H1047L), principalmente por casos con puntos FAM limítrofes a los no amplificados como antes mencionado.

Es debido a esta problemática, que se decidió establecer límites fijos para VIC y FAM basado en casos modelos con puntos abundantes de FAM y bien delimitados del área de los no amplificados, ya que se observó que cada una de las mutaciones tenía un espectro diferente de fluorescencia, que permitió un discernimiento más objetivo entre si un punto limítrofe de FAM era un verdadero positivo o un probable falso positivo. Para ello, se seleccionó el punto más inferior para cada uno de los casos modelo (en FAM) y el punto más extremo a la

izquierda de VIC y se calcularon sus medias con sus respectivas desviaciones estándar. Previamente, se realizó un análisis de normalidad, a partir del cual se decidió utilizar la media como medida de tendencia central, a pesar de que el histograma no demostraba una distribución normal de los datos, ya que las pruebas de shapiro-wilk para data con menos de 60 casos y la prueba de kurtosis y de skewness para normalidad presentaron valores dentro de los rangos aceptables (un valor mayor a 0.05 para shapiro-wilk⁽⁹¹⁾, un valor dentro del rango de +/-3 para kurtosis⁽⁹²⁾ y un valor dentro del rango de +/-2 para skewness.⁽⁹²⁾ Los valores de VIC fueron una excepción ya que la prueba de shapiro-wilk indicaba que la data correspondía a una distribución no normal, sin embargo, hay que recordar que esta prueba es usada para data con menos de 60 casos y el análisis de VIC se realizó usando todos los casos de tumor (177 casos) y los valores de kurtosis y skewness se encontraron dentro de los rangos aceptables.

A pesar del establecimiento de límites en base a la media, el grupo correspondiente a FAM, en la mutación E545K, aún permanecía limítrofe a los puntos amarillos o no amplificados; es por ello, que, con la intención de disminuir falsos positivos, se decidió tomar como límite la media más una desviación estándar superior. Los casos mutados de H0147R y H1047L se vieron mínimamente afectados con la elevación del límite al tener un espectro de fluorescencia mayor que la mutación E545K.

Respecto a la concordancia, el principal motivo de estudio fue evaluar la capacidad de la PCR digital en identificar las mismas mutaciones detectadas en tumor, pero en plasma, al perfilarse como un método capaz de realizar biopsias líquidas por su propiedad de identificar moléculas objetivo de manera absoluta. A pesar de ello, la PCR digital mostró tener una concordancia débil ($k=0.074$) entre tumor y plasma, lo cual contrasta con el resultado reportado por García-Saenz. et al.⁽³⁰⁾ donde se encontró una concordancia moderada (0.591; IC: 95%= 0.371- 0.811) y los estudios realizados por Beaver et al. ⁽⁶⁾ y Oshiro et al. ⁽²⁹⁾ donde encontraron índices de detección entre tumor y plasma de 93% y 22.7%, respectivamente.

Es probable que nuestro resultado negativo se deba más a que las condiciones utilizadas no hayan sido las ideales, que a una incompetencia de la PCR digital

en detectar mutaciones en plasma. Esto se podría deber a que el ADN de plasma haya estado muy diluido como para lograr ser detectable, ya que con el pasar del tiempo los leucocitos se lisan y liberan ADN genómico silvestre que termina diluyendo al ADN circulante libre en sangre.⁽⁹³⁾ Esto se podría prevenir utilizando los tubos Cell-Free DNA BCT de la compañía Streck,⁽⁹⁴⁾ los cuales estabilizan a las células nucleadas sanguíneas como los leucocitos previniendo su lisis, manteniendo el ADN circulante libre aislado. Además, facilitan el transporte de las muestras y se pueden mantener a temperatura ambiente sin perder la calidad y cantidad de ADN circulante libre, como lo demostró Medina Diaz et al.,⁽⁹³⁾ al comparar el uso de los tubos EDTA (usados en el presente estudio) con los tubos de Streck. Si bien el uso de los mencionados tubos podría facilitar el almacenamiento y transporte de las muestras, no existe diferencia entre el presente estudio y otros autores como García-Saenz et al.⁽³⁰⁾ y Beaver et al.,⁽⁶⁾ ya que todos utilizaron los tubos EDTA para extraer y transportar las muestras de sangre.

Sin embargo, existen por lo menos dos diferencias entre el presente estudio y otros autores que podrían explicar nuestros resultados negativos. Primero y principalmente la cantidad de plasma utilizado al momento de realizar la extracción de ADN, en el que nosotros utilizamos 480 ul de plasma comparado con Beaver et al.⁽⁶⁾ y García-Saenz et al.,⁽³⁰⁾ quienes utilizaron 2 y 3 ml de plasma respectivamente. La razón por la cual se utilizó menos plasma en el presente estudio es básicamente por el protocolo del kit utilizado para la extracción, el cual recomendaba volúmenes de 240ul. Sin embargo, daba la posibilidad de poder utilizar mayor cantidad de plasma para aumentar la cantidad de ADN extraído, razón por la cual se decidió duplicar el volumen recomendado. La segunda causa posible es el kit utilizado, que podría tener cierta influencia en la concentración y calidad del ADN extraído, como se demostró en el estudio realizado por Sorber et al.,⁽⁹⁵⁾ donde se compararon cuatro kits para el aislamiento de ADN circulante, a partir del plasma, encontrando diferencias entre los kits en términos de eficiencia. Entre los kits comparados, no se encuentra el utilizado por el presente estudio, pero sí el kit utilizado por Beaver et al. ⁽⁶⁾ y García-Saenz et al.,⁽³⁰⁾ (QIAmp circulating nucleic acid kit), el cual demostró tener la más alta eficiencia

de aislamiento junto con el Maxwell RSC cfDNA Plasma kit de Promega en comparación con los otros dos kits.⁽⁹⁵⁾

Por otro lado, el uso de dos o más chips por paciente pudo haber ayudado en mejorar los resultados en plasma reduciendo o eliminando el posible error de pipeteo, ya que el sistema de PCR digital QuantStudio permite utilizar más de un chip por muestra para aumentar las posibilidades de encontrar la molécula blanco.⁽⁸⁰⁾

Al comparar el estatus mutacional global con las covariables clínicopatológicas no se logró encontrar ninguna asociación significativa, lo que se podría deber al bajo número de nuestra población de estudio que contrasta con los estudios de Oshiro et al.⁽²⁹⁾ y Saal et al.,⁽²⁶⁾ en el que se utilizaron poblaciones de 313 y 292 respectivamente y sí se encontraron asociaciones significativas entre el estatus mutacional y la presencia de receptores hormonales. A pesar de ello, el presente estudio si logró identificar una asociación significativa al analizar cada una de las mutaciones por separado y se encontró una asociación entre la mutación H1047R del exón 20 con la sobreexpresión de receptores HER-2 ($p= 0.038$), lo cual guarda cierta relación con lo reportado por Castañeda et al.⁽²⁸⁾ en población peruana, quien encontró una asociación entre el estatus mutacional general y la sobreexpresión de receptores HER-2 ($p= 0.034$).⁽²⁸⁾

La principal limitación del presente estudio ha sido la gran pérdida de pacientes, la cual pudo afectar al poder estadístico y con ello el análisis de variables clínicopatológicas con el estatus mutacional. Al realizar el diseño del estudio, se contempló como posible limitación la pérdida de pacientes al no poder contar con sus respectivas muestras tumorales, principalmente por respuestas totales o parciales a la neoadyuvancia ya que las pacientes no desearan continuar participando en el estudio. En respuesta a ello, se decidió el uso alternativo de las biopsias cuando las muestras tumorales no estuviesen disponibles, minimizando las pérdidas. Sin embargo, se presentó una pérdida del 38% de pacientes al no poder conseguir ni las muestras tumorales ni de biopsia a tiempo; debido, principalmente, a problemas burocráticos con unas de las instituciones participantes de la investigación.

En el caso de las fortalezas, se podría considerar al ensayo de diluciones y al establecimiento de límites fijos para VIC y FAM como las principales fortalezas de la presente investigación.

El ensayo de diluciones (tabla 6), por su parte, ha permitido darles respaldo a los resultados de la PCR digital en tumor, específicamente a aquellos 37 casos que la PCR digital detectó, mas no la secuenciación Sanger. Teóricamente dichos casos serían considerados como falsos positivos, sin embargo, hay que tener en consideración el fundamento básico de la PCR digital en obtener una detección absoluta y precisa de las moléculas blanco al compartimentalizar las reacciones en hasta 20 000 pocillos. A pesar de ello, la posibilidad de falsos positivos existía, más aún al tener algunos casos en los cuales solo se apreciaba un punto azul (FAM) y los porcentajes de FTA eran muy bajos. Es en base a ello, se decidió realizar el ensayo de diluciones para poder determinar el límite de FTA para considerar a una paciente como positiva para una mutación.

Se eligió un caso modelo positivo para cada mutación y se realizaron diluciones de este en un ADN control (no mutado) a diferentes diluciones. Lamentablemente, no se pudo realizar la PCR digital para detectar la mutación E545K a una dilución de 0.1%, debido a que no se contaba con la cantidad suficiente de ADN para realizar el ensayo. Sin embargo, se logró detectar copias de ADN mutados para la misma mutación a una dilución teórica menor (0.01%) a diferencia de las otras mutaciones donde no se detectó mutación. Es debido a esto y a la detección satisfactoria de mutaciones al 0.1% de dilución teórica en el caso de las mutaciones en el exón 20 que se estableció la FTA de 0.1% como límite de detección de la PCR digital en el presente estudio, límite similar a los reportados por García-Saenz et al.⁽³⁰⁾ por medio de diluciones con líneas germinales donde sus límites de cuantificación eran 0.15% y 0.18% para E545K y H1047R, respectivamente.

Por otro lado, el uso de límites fijos para VIC y FAM ha logrado dar uniformidad al análisis de los tumores por PCR digital permitiendo su reproducibilidad y es hasta donde sabemos, la primera vez que se reporta su uso en esta plataforma. Además de ello, su implementación ha permitido disminuir los posibles falsos positivos al utilizar una desviación estándar superior a la media calculada para

los límites. Resulta que en algunos casos (especialmente en la mutación E545K) las áreas pertenecientes a FAM se encontraban muy limítrofes al área correspondiente a las no amplificadas (anexo 2, figura suplementaria 3) poniendo en duda si los puntos limítrofes fueran falsos positivos o no, lo cual se solucionó con la elevación del límite de FAM.

Si bien la PCR digital no ha demostrado una concordancia adecuada en identificar las mutaciones PIK3CA en plasma, sí ha logrado demostrar una alta sensibilidad en relación a la secuenciación Sanger en tumor y ha demostrado poder detectar una mayor cantidad de pacientes afectados que la secuenciación Sanger. Esto podría tener una gran implicancia en la práctica clínica oncológica o en futuros ensayos clínicos dirigidos a la vía PI3K/AKT/mTOR al poder identificar más pacientes afectados con estas mutaciones y poder determinar a través de esta, la frecuencia de alelos mutados mínimamente necesaria para que los pacientes obtengan algún beneficio de los medicamentos contra esta vía, ya que algunos ensayos clínicos publicados recientemente reportan utilizar métodos cualitativos o con margen de detección mínimo de hasta 5% para las mutaciones; como el caso de Martin et al.⁽⁹⁶⁾ Ellos desarrollaron un ensayo clínico de fase II evaluando la efectividad del buparlisib (un pan-inhibidor de la vía PI3K de clase I) donde utilizaron la secuenciación Sanger para discernir si la paciente presentaba o no la mutación PIK3CA, o el caso de Dickler et al.,⁽⁹⁷⁾ en el que utilizaron la prueba para mutaciones PIK3CA Cobas, la cual si bien tiene un mejor índice de detección que la secuenciación Sanger pudiendo detectar casos con hasta 5% de alelos mutados, brinda un resultado cualitativo.⁽⁹⁸⁾ En ambos casos, la PCR digital no solo hubiera identificado una mayor cantidad de casos que las técnicas mencionadas, sino que también hubiera brindado un valor cuantitativo.

CONCLUSIONES

La PCR digital ha demostrado tener una alta sensibilidad para detectar mutaciones PIK3CA en tumor respecto a la secuenciación Sanger.

La frecuencia de mutaciones PIK3CA detectada por la PCR digital, en este estudio, ha sido la más alta registrada (74.6%) en comparación con otros estudios.

La PCR digital tiene, según este estudio, una concordancia débil entre la identificación de mutaciones PIK3CA de tumor con plasma.

Existe una asociación significativa entre la presencia de la mutación H1047R y el estatus del receptor HER-2.

El establecimiento de ejes fijos para los eventos de VIC y FAM en las gráficas de la PCR digital brindan una mayor uniformidad de los resultados y disminución de falsos positivos.

El ensayo de diluciones brinda respaldo a los resultados reportados por la PCR digital.

RECOMENDACIONES

Para futuros estudios, se recomienda utilizar un tamaño muestral mayor para obtener un mejor análisis estadístico respecto a las covariables clínicopatológicas y el estatus de mutaciones, así como para confirmar los límites de VIC y FAM establecidos en el presente estudio.

Para mejorar las condiciones previas al análisis (respecto a la PCR digital en plasma) y simplificar el transporte y almacenamiento de la muestra de sangre, se recomienda utilizar los tubos Cell-Free DNA BCT de Streck en vez de los tubos de EDTA. Por otro lado, se recomienda, en base a otros autores, utilizar un mayor volumen de plasma al realizar la extracción de ADN. Además, se sugiere utilizar más de un chip por paciente para garantizar la identificación de por lo menos una molécula objetivo (mutado) al momento de realizar la PCR digital en plasma.

Finalmente, para próximos estudios, sería interesante realizar el seguimiento a las pacientes y obtener muestras de sangre posoperatorias, para, de esa manera, evaluar el valor pronóstico de las mutaciones PIK3CA.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet- Tieulent J, Jemel A. Global Cancer Statistics, 2012. *Ca Cancer J CLIN*. 2015; 65(2):87-108. [Internet] Extraído en marzo de 2016. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21262>
2. Ramos Muñoz WC, Venegas Ojeda DR, Medina Osis JL, Guerrero León PC, Cruz Martinez A. Análisis de la situación del cáncer en el Perú, 2013. Lima: Ministerio de Salud del Perú; 2013. [Internet] Extraído en marzo de 2016. Disponible en: http://www.dge.gob.pe/portal/docs/asis_cancer.pdf
3. Carrasco M, Gomez H, Vigil C. Factores pronósticos en cáncer de mama, estadio clínico temprano (I-IIa) sometidos a cirugía como tratamiento de inicio. *Carcinos*. 2013; 3(2): 12-8. [Internet] Extraído en marzo de 2016. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/carcinos/v3n2_2013/pdf/a03v3n2.pdf
4. Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC et al. Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomized trials. *Lancet*. 2012; 379(9814): 432- 44. [Internet] Extraído en marzo de 2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3273723/>
5. Valda Toro PL. Detection of PIK3CA Mutations in Plasma Tumor DNA Circulating in Peripheral Blood of Breast Cancer Patients [Tesis de Maestría]. Baltimore: Sheridan Libraries, John Hopkins University; 2014. [Internet] Extraído en febrero de 2016. Disponible en: <https://jscholarship.library.jhu.edu/handle/1774.2/37105>
6. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, Cochran RL, Croessmann S, Zabransky DJ et al. Detection of Cancer DNA in Plasma of Patients with

- Early-Stage Breast Cancer. CLIN CANCER RES. 2014; 20(10): 2631-42.[Internet] Extraído en febrero de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4024333/>
7. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme (Nucleic acids in human blood plasma). C R Acad Sci Paris.1948; 142: 241-3.
 8. Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating DNA as biomarker in breast cancer. Breast Cancer Res. 2015; 17(1):136. [Internet] Extraído en febrero de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4599311/>
 9. Schwarzenbach H. Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer. Breast Cancer Res. 2013; 15(5): 211. [Internet] Extraído en febrero de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3978696/>
 10. Gonzales- Masiá A, García- Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. Onco Targets There. 2013; 6: 819-32. [Internet] Extraído en febrero de 2016. Disponible en:
<https://www.dovepress.com/circulating-nucleic-acids-in-plasma-and-serum-cnaps-applications-in-on-peer-reviewed-article-OTT>
 11. De Mattos- Arruda L, Caldas C. Cell- free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. Mol Oncol. 2016; 10(3): 464-74. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5528975/>
 12. Zardavas D, Phillips WA, Loi S. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data. Breast Cancer Res. 2014; 16(1): 201. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4054885/>

13. Dixon JM. Endocrine Resistance in Breast Cancer. *New Journal of Science*. 2014; 2014: 1-27. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/njos/2014/390618/abs/>
14. Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu Rev Med*. 2016;67:11-28.[Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:
<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-062913-051343>
15. Paplomata E, O'Regan R. The PI3K/AKT/Mtor pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol*. 2014 Jul; 6(4): 154–166. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4107712/>
16. Lee JJX, Loh K, Yap YS. PI3K/Akt/Mtor inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol Med*. 2015 Dec; 12(4): 342–354. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4706528/>
17. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8(8): 627-44. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142564/>
18. Pang B, Cheng S, Sun SP, An C, Liu ZY, Feng X et al. Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2014; 4; 6255. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4150110/>
19. Mangone FR, Bobrovnitchaia IG, Salaorni S, Manuli E, Nagai MA. PIK3CA exon 20 mutations are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Clinics*. 2012; 57(11): 1285-90. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488987/>

20. Board RE, Wardley AM, Dixon JM, Armstrong AC, Howell S, Renshaw L et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Treat.* 2010; 120: 461-67. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10549-010-0747-9>
21. Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell- free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer.* 2016; 35: 36. [Internet] Extraído en abril de 2017. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4823888/>
22. Luthra R, Singh RR, Patel KP, editors. *Clinical Applications of PCR.* 3era ed. Nueva York: Humana Press; 2016.
23. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S et al. Prognostic role of PIK3CA mutations of cell-free DNA in early-stage triple negative breast cáncer. *Cancer Sci.* 2015; 106(11): 1582-89. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4714688/>
24. Kim ST, Lira M, Deng S, Lee S, Park YS, Lim HY et al. PIK3CA mutation detection in metastatic biliary cancer using cell-free DNA. *Oncotarget.* 2015; 6:40026-35. [Internet] Extraído en octubre de 2017. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4741877/>
25. García-Murillas I, Pearson A, Lambros M, Natrajan R, Segal C, Dowsett M, et al. Analysis of PIK3CA mutation abundance in primary breast cancer with droplet digital PCR identifies frequent sub-clonal PIK3CA mutations in ER negative and/ or HER2 positive breast cancer. *Cancer Res* 2013;73(24 Suppl): Abstract nr P2-08-01. [Internet] Extraído en octubre de 2017. Disponible en:
http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/24_Supplement/P2-08-01

26. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 2005 Apr 1;65(7):2554-9. [Internet] Extraído en diciembre de 2017. Disponible en:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/7/2554.long>
27. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, Blair B, Slater S, Power P et al. Detection of Tumor PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer Using Peripheral Blood. *Cancer Res.* 2012; 18(12): 3462-3469. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3533370/>
28. Castaneda CA, Lopez-Illasaca M, Pinto JA, Chirinos-Arias M, Doimi F, Neciosup SP et al. PIK3CA mutations in Peruvian patients with HER2-amplified and triple negative non-metastatic breast cancers. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2014; 7(4): 142-48. [Internet] Extraído en octubre de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25467032>
29. Oshiro C, Kagara N, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N et al. PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015; 150(2):299- 307. [Internet] Extraído en abril de 2016. Disponible:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10549-015-3322-6>
30. García-Saenz JA, Ayllón P, Laig M, Acosta-Eyzaguirre D, García-Esquinas M, Montes Myriam, et al. Tumor burden monitoring using cell-free tumor DNA could be limited by tumor heterogeneity in advanced breast cancer and should be evaluated together with radiographic imaging. *BMC Cancer.* 2017;17:210. [Internet] Extraído en octubre de 2017 Disponible:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5362993/pdf/12885_2017_Article_3185.pdf

31. Lippman ME. Breast Cancer. En Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, editores. Harrison's Principles of Internal Medicine. 18^{va} ed. EEUU: Mc Graw Hill; 2012. p. 754-63.
32. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2015; 26(suplemento 5). [Internet] Extraído en enero de 2018 Disponible: <http://www.esmo.org/Guidelines/Breast-Cancer/Primary-Breast-Cancer>
33. Lester SC. Mama. En: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, Fariña Gonzales J, Fernandez-Aceñero J, editores. Robbins y Cotran Patología estructural y funcional. 8^{va} ed. Barcelona: Elsevier; 2010.p. 1065-95.
34. Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L, Maisonneuve P, Rotmensz N, Galimberti V, et al. Clinicopathological characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. Cancer. 2008; 113(7):1511-20. [Internet] Extraído en enero de 2018 Disponible: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cncr.23811>
35. Fan C, Oh D, Wessels L, Weigelt B, Nuyten D, Nobel A, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. N Engl J Med. 2006; 355(6):560-9. [Internet] Extraído en mayo de 2017 Disponible: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa052933?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov&
36. Voduc K, Cheang M, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen T, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. J Clin

- Oncol. 2010; 28(10): 1684-91. [Internet] Extraído en mayo de 2017 Disponible:
http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2009.24.9284?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed
37. Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. 4^{ta} ed. Bélgica: Luxembourg: European Commission Office for Official Publications of the European Communities 2006; 2006. [Internet] Extraído en mayo de 2017 Disponible:
<https://academic.oup.com/annonc/article/19/4/614/217783>
38. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, Tan P, van de Vijver M. WHO classification of Tumours of the Breast. Cuarta ed. Lyon: IARC Press; 2012. [Internet] Extraído en mayo de 2017 Disponible: <http://drzafariqbal.com/wp-content/uploads/2017/07/Tumours-of-the-Breast-World-Health-Organization-2012.pdf>
39. Moy B. Cáncer de mama localizado. En Chabner BA, Lynch TJ Jr, Longo DL, editores. Harrison Manual de Oncología. Primera edición. Mexico: Mc Graw Hill; 2009. p. 520-26.
40. Isakoff SJ, Ryan PD. Cáncer de mama metastásico. En Chabner BA, Lynch TJ Jr, Longo DL, editores. Harrison Manual de Oncología. Primera edición. Mexico: Mc Graw Hill; 2009. p.527-36.
41. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science. 2004; 304(5670): 554. [Internet] Extraído en enero de 2018 Disponible: <http://science.sciencemag.org/content/304/5670/554.long>
42. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. Nat Rev Drug Discov. 2009; 8(8): 627-44. [Internet] Extraído en enero de 2018 Disponible:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142564/>

43. Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;347:21-41. [Internet] Extraído en enero de 2018 Disponible:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3164550/>

44. Online Mendelian Inheritance in Man [Sede Web]. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore: Dr. Ada Hamosh (Director); 1992[22 de febrero del 2016; acceso 23 de junio del 2016]. PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE, CATALYTIC, ALPHA; PIK3CA . Disponible en: <http://omim.org/entry/171834>.

45. Mankoo PK, Sukumar S, Karchin R. PIK3CA somatic mutations in breast cancer: Mechanistic insights from langenn dynamic simulation. *Proteins*. 2009 May 1; 75(2): 499–508. [Internet] Extraído en enero de 2018 Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3094910/>

46. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2015; 7: 111-23. [Internet] Extraído en enero de 2018 Disponible: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2009.24.9284?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed

47. Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y et al. Mechanism of Two Classes of Cancer Mutations in the Phosphoinositide Kinase Catalytic Subunit. *Science*. 2007; 317(5835): 239-42. [Internet] Extraído en enero de 2018 Disponible: <http://science.sciencemag.org/content/317/5835/239.long>

48. Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Murata A, Ishimoto T, Iwagami S et al. PIK3CA mutation is associated with a favorable prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2013; 19 (9): 2451-9. [Internet] Extraído en octubre de 2017. Disponible: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/19/9/2451.long>
49. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S et al. PIK3CA Mutation is Associated With Poor Prognosis Among Patients With Curatively Resected Colon Cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27(9): 1477-84. [Internet] Extraído en octubre de 2017. Disponible: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/19/9/2451.long>
50. Wang L, Hu H, Pan Y, Wang R, Li Y, Shen L et al. PIK3CA Mutations Frequently Coexist with EGFR/KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer and Suggest Poor Prognosis in EGFR/KRAS Wildtype Subgroup. *PLoS One.* 2014; 12(9). [Internet] Extraído en enero de 2018. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3922761/>
51. Harada K, Baba Y, Shigaki H, Ishimoto T, Miyake K, Kosumi K et al. Prognostic and clinical impact of PIK3CA mutation in gastric cancer: pyrosequencing technology and literature review. *BMC Cancer.* 2016; 16: 400. [Internet] Extraído en octubre de 2017. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4936296/>
52. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER. *Breast Cancer Research.* 2012; 14(1). [Internet] Extraído en octubre de 2017. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3496146/>
53. Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Ahnström Waltersson M, Nordenskjöld B, Rutqvist LE et al. PIK3CA Mutations and PTEN Loss Correlate with Similar Prognostic Factors and Are Not Mutually Exclusive

- in Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2007; 13(12): 3577-84. [Internet] Extraído en octubre de 2017. Disponible: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/13/12/3577.long>
54. She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR et al. Breast Tumor Cells with PI3K Mutation or HER2 Amplification Are Selectively Addicted to Akt Signaling. PLoS One. 2008; 3(8). [Internet] Extraído en enero de 2018. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2516933/>
55. Crowder RJ, Phommaly C, Tao Y, Hoog J, Luo J, Perou CM et al. PIK3CA and PIK3CB inhibition produce synthetic lethality when combined with estrogen deprivation in estrogen receptor positive breast cancer. Cancer Res. 2009; 119(9): 3955-62. [Internet] Extraído en enero de 2018. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2811393/>
56. Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. Annu Rev Med. 2016;67:11-28. [Internet] Extraído en mayo de 2017. Disponible: https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-062913-051343?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=med
57. Paplomata E, O'Reagan R. The PI3K/AKT/Mtor pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. Ther Adv Med Oncol. 2014 Jul; 6(4): 154–166. [Internet] Extraído en mayo de 2017. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4107712/>
58. Baselga J, Campone M, Burris HA 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. N Engl J Med. 2012 Feb 9;366(6):520-9. [Internet] Extraído en mayo de 2017. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5705195/>

59. Beaver Ja, Park BH. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Future Oncol.* 2012 Jun;8(6):651-7. [Internet] Extraído en mayo de 2017. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466807/>
60. Roberts L, Bowers J, Sensinger K, Lisowski A, Getts R, Anderson MG. Identification of methods for use of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples in RNA expression profiling. *Genomics.* 2009; 109(5): 342-348. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088875430900175X?via%3Dihub>
61. Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi VA, Baloch ZW. Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein. *Biopreservation and Biobanking.* 2013; 11(2): 101-06. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4077003/>
62. Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y et al. DNA Extraction from Archival Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections Based on the Antigen Retrieval Principle: Heating Under the Influence of pH. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(8): 999-1003. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/002215540205000802?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&
63. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *Am J Pathol.* 2002; 161(6): 1961-71. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1850907/>

64. McGhee JD, von Hippel PH. Formaldehyde as a probe of DNA structure. 3. Equilibrium denaturation of DNA and synthetic polynucleotides. *Biochemistry*. 1977; 16(15): 3267-76. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00634a001>
65. Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathology*. 1999; 155(5): 1467-71. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1866966/>
66. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 33(25): 5287-312. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2007.14.2364?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed
67. Shaw JA, Stebbing J. Circulating free DNA in the management of breast cancer. *Ann Transl Med*. 2014; 2(1): 3. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4200656/>
68. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*. 2014; 24(6): 766-9. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4042169/>
69. Stoetzer OJ, Fersching DM, Salat C, Steinkohl O, Gabka CJ, Hamann U et al. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients by circulating apoptotic biomarkers nucleosomes, DNase,

- cytokeratin-18 fragments and survivin. *Cancer Lett.* 2013; 326(1): 140-8. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: [https://www.cancerletters.info/article/S0304-3835\(13\)00347-9/fulltext](https://www.cancerletters.info/article/S0304-3835(13)00347-9/fulltext)
70. Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, Seidel D. Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 5981-5987. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/10/18/5981.long>
71. Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, Seidel D. Early and specific prediction of the therapeutic efficacy in lung cancer by nucleosomal DNA and cytokeratin 19 fragments. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2006; 1075: 244-275. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1196/annals.1368.033>
72. Tangvarasittichai O, Jaiwang W, Tangvarasittichai S. The plasma DNA concentration as a potential breast cancer screening marker. *Indian J Clin Biochem.* 2015; 30(1): 55-8. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310844/>
73. 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; 243(1): 64-70. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: [https://www.cancerletters.info/article/S0304-3835\(05\)01028-1/fulltext](https://www.cancerletters.info/article/S0304-3835(05)01028-1/fulltext)
74. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Methods: Manipulating Proteins, DNA, and RNA. In Anderson M, Granum S, editores. *Molecular Biology of The Cell*. 5ta ed. Estado Unidos: Garland Science; 2008. P. 501-78.

75. Arsenic R, Treue D, Lehmann A, Hummel M, Dietel M, Denkert C et al. Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer. *BMC Clinical Pathology*. 2015; 15: 20. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4652376/>
76. Baker M. Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*. 2012; 9(6): 541-4. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.nature.com/articles/nmeth.2027>
77. Brunstein J. Digital PCR: Theory and applications. *MLO Med Lab Obs*. 2013; 45: 34-35. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.mlo-online.com/digital-pcr-theory-and-applications.php>
78. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewics AJ et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantification of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011; 83(22): 8604-10. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3216358/>
79. Zhu Q, Qiu L, Yu B, Xu Y, Gao Y, Pan T et al. Digital PCR on an integrated self-priming compartmentalization chip. *Lab Chip*. 2014; 14(6): 1176-85. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/LC/C3LC51327K#!divAbstract>
80. Thermo Fisher Scientific [sede web]. Thermo Fisher Scientific; 2018 [acceso Marzo 07 de 2018]. QuantStudio 3D Digital PCR System. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/pcr/digital-pcr/quantstudio-3d-digital-pcr-system.html>
81. Thermo Fisher Scientific [sede web]. Thermo Fisher Scientific; 2016 [acceso Junio 23 de 2016]. Sanger Sequencing Method. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life->

science/sequencing/sanger-sequencing/sanger_sequencing_method.html.

82. Hutchinson CA. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(18): 6227-37. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094077/>
83. Franca LTC, Carrilho E, Kist TB. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys.* 2002; 25(2): 169-200. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible:
<https://www.semanticscholar.org/paper/A-review-of-DNA-sequencing-techniques.-Fran%C3%A7a-Carrilho/76690918d1ac6df349d6ffb0cf8ccc066d2f126d>
84. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer res.* 1977; 37: 646-50. [Internet] Extraído en mayo de 2016. Disponible:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/37/3/646.long>
85. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA DE CÁNCER DE MAMA. Lima: INEN; 2013. N° 650-2013-J/INEN.
86. Bujang MA, Adnan TH. Requirements for Minimum Sample Size for Sensitivity and Specificity Analysis. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(10): YE01–YE06. [Internet] Extraído en marzo de 2017. Disponible:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5121784/>
87. Mandrekar JN. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assesment. *J Thorac Oncol.* 2010; 5(9): 1315-16. [Internet] Extraído en febrero de 2018. Disponible:
[https://www.jto.org/article/S1556-0864\(15\)30604-3/fulltext](https://www.jto.org/article/S1556-0864(15)30604-3/fulltext)

88. Statpages [acceso marzo 2018]. Disponible en:
<http://statpages.info/index.html>.
89. Stata [Sede Web]. Stata; 2017 [acceso septiembre 2017]. Klein D. Assessing inter-rater agreement in Stata. Universidad de Kassel, Alemania 2017. Disponible en:
https://www.stata.com/meeting/germany17/slides/Germany17_Klein.pdf
90. Stemke-Hale K, Gonzales-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M et al. An Integrative Genomic and Proteomic Analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT Mutations in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(15): 6084-91. [Internet] Extraído en marzo de 2018. Disponible:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2680495/>
91. Kim HY. Statistical notes for clinical researchers: assessing distribution (1). *Resto Dent Endod.* 2012; 37 (4): 245-48. [Internet] Extraído en marzo de 2018. Disponible:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3568647/>
92. Kim HY. Statistical notes for clinical researchers: assessing normal distribution (2) using skewness and kurtosis. *Resto Dent Endod.* 2013; 38(1): 52-4. [Internet] Extraído en marzo de 2018. Disponible:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591587/>
93. Medina Diaz I, Nocon A, Mehnert DH, Fredebohm J, Diehl F, Holtrup F. Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *Plos One.* 2016;11(11): e0166354. [Internet] Extraído en marzo de 2018. Disponible:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5104415/>
94. Streck [Sede Web]. Estados Unidos; 2018 [acceso 04 de marzo de 2018]. Cell-Free DNA BCT®. Disponible en:
<https://www.streck.com/collection/cell-free-dna-bct/>

95. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, Pauwels P. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *J Mol Diagn.* 2017; 19(1):162-8. [Internet] Extraído en marzo de 2018. Disponible: [https://jmd.amjpathol.org/article/S1525-1578\(16\)30221-5/fulltext](https://jmd.amjpathol.org/article/S1525-1578(16)30221-5/fulltext)
96. Martin M, Chan A, Dirix L, O'Shaughnessy J, Hegg R, Manikhas A et al. A randomized adaptive phase II/III study of buparlisib, a pan-Class I PI3K inhibitor, combined with paclitaxel for the treatment of HER2- advanced breast cancer (BELLE-4). *Ann Oncol.* 2017; 28(2): 313-20. [Internet] Extraído en marzo de 2018. Disponible: <https://academic.oup.com/annonc/article/28/2/313/2676884>
97. Dickler, M.N., Tolaney, S.M., Rugo, H.S., Cortes, J., Diéras, V., Patt, D.A. et al, MONARCH1: results from a phase II study of abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor, as monotherapy, in patients with HR+/HER2- breast cancer, after chemotherapy for advanced disease. 2016 ASCO Annual Meeting, Abstract 510. *J Clin Oncol.* 2016;34. [Internet] Extraído en marzo de 2018. Disponible: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.510
98. Roche [Sede Web]. España; 2017 [acceso 03 de marzo de 2018]. Cobas® PIK3CA mutation test. Disponible en: http://www.roche.es/Diagnostics/Productos/Diagnostico_de_laboratorio/diagnostico_molecular/oncologia_molecular/cobas_PIK3CA_mutation_test.html.

ANEXOS

1. Matriz de consistencia

Título	Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Tipo y diseño	Población	Instrumento
Evaluación de mutaciones en el gen <i>PIK3CA</i> en tumor y plasma de pacientes peruanas con cáncer de mama mediante PCR digital, Lima 2016-2017: Análisis de sensibilidad y nivel de concordancia	¿Cuál es la sensibilidad de la PCR digital para detectar la presencia de mutaciones del gen <i>PIK3CA</i> en tumor y su nivel de concordancia en el plasma de pacientes peruanas con cáncer de mama en Lima, 2016 - 2017?	<p>Objetivo general:</p> <p>Determinar la sensibilidad de la PCR digital para detectar mutaciones en el gen <i>PIK3CA</i> en tumor y su nivel de concordancia en el plasma de pacientes peruanas con cáncer de mama en Lima, 2016 - 2017.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <p>Identificar la presencia de mutaciones en el gen <i>PIK3CA</i> en plasma y tumor por medio de la PCR digital en pacientes peruanas con cáncer de mama en Lima, 2016 - 2017.</p> <p>Identificar la presencia de mutaciones en el gen <i>PIK3CA</i> en tumor por medio de la secuenciación tipo Sanger en pacientes peruanas con cáncer de mama en Lima, 2016-2017.</p> <p>Describir las características clínico-patológicas en las pacientes peruanas con cáncer de mama en Lima 2016- 2017.</p>	La PCR digital tiene una sensibilidad igual o superior a la secuenciación Sanger y es concordante en el plasma al detectar las mutaciones en el gen <i>PIK3CA</i> en las pacientes peruanas con cáncer de mama en Lima, 2016-2017.	Cuantitativo Observacional Analítico transversal Prospectivo	Paciente mujer con diagnóstico de cáncer de mama mayor de 18 años.	Ficha de recolección de datos realizada por el autor.
					<p>Tipo muestreo:</p> <p>Muestreo no probabilístico continuo</p>	

2. Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1. Sondas comerciales (ThermoFisher Scientific) usadas para la PCR digital

Gen	Exón	Código comercial de identificación del ensayo
PIK3CA		
E545K	9	Hs000000086_rm
H1047R	20	Hs000000088_rm
H1407L	20	Hs000000089_rm

Tabla suplementaria 2. Cebadores y sondas usadas para amplificar y secuenciar las muestras de tumor y biopsia para el exón 09 y 20

Gen	Exón	Tamaño (pb)	Cebador Promotor 5´-3´	Cebador reverso 5´-3´
	9 ^(*)	195 pb	CTGTGAATCCAGAGGGGAAA	ACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATC ^(**)
PIK3CA	20	80 pb	GAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTT ^(**)	ATCCAATCCATTTTTGTTGTCC ^(**)
	20 ^(***)	200 pb	GAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTT ^(**)	CCTATGCAATCGGTCTTTGC

pb: pares de base

(*): Todas las muestras fueron amplificadas y secuenciadas con los mencionados cebadores.

(**): sonda diseñada para PCR digital.

(***) : Solo 19 muestras fueron amplificadas y secuenciadas con los mencionados cebadores (pacientes: 03, 06, 08, 21, 28, 29, 34, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 50, 61, 62, 67, 69 y 72).

Tabla suplementaria 3. Cantidades y concentraciones de la mezcla para amplificación de exón 20 PIK3CA

Reactivos	Cantidad para una muestra (ul)
Buffer (KCl) 10X	2.5
Taq polimerasa 5U/UI	0.25
MgCl ₂ (25Mm)	2
Primer forward 20X	1
Primer reverse 20X	1
ADN	3
Agua	14.4
dNTPs	0.85

Tabla suplementaria 4. Cantidades y concentraciones de la mezcla para amplificación de exón 9 y 20 PIK3CA^(*)

Reactivos	Cantidad para un muestra (ul)
Buffer KCl 10X	2.5
Taq polimerasa 5U/UI	0.2
MgCl ₂ 25Mm	1.5
Primer forward 20X	1.25
Primer reverse 20X	1.25
ADN	4
Agua	13.8
dNTPs	0.5

(*): Solo 19 pacientes fueron analizadas para el exón 20 bajo las presentes condiciones (pacientes: 03, 06, 08, 21, 28, 29, 34, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 50, 61, 62, 67, 69 y 72).

Tabla suplementaria 5. Condiciones de amplificación exón 20 PIK3CA para secuenciación Sanger

Fases	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95°C	5 minutos
Desnaturalización		95°C	15 segundos
Anillamiento	45	56°C	30 segundos
Extensión		72°C	20 segundos
Extensión final	1	72°C	7 minutos

Tabla suplementaria 6. Condiciones de amplificación exón 9 PIK3CA para secuenciación Sanger

Fases	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95°C	5 minutos
Desnaturalización		95°C	15 segundos
Anillamiento	45	57°C	15 segundos
Extensión		72°C	20 segundos
Extensión final	1	72°C	7 minutos

3. Figuras suplementarias

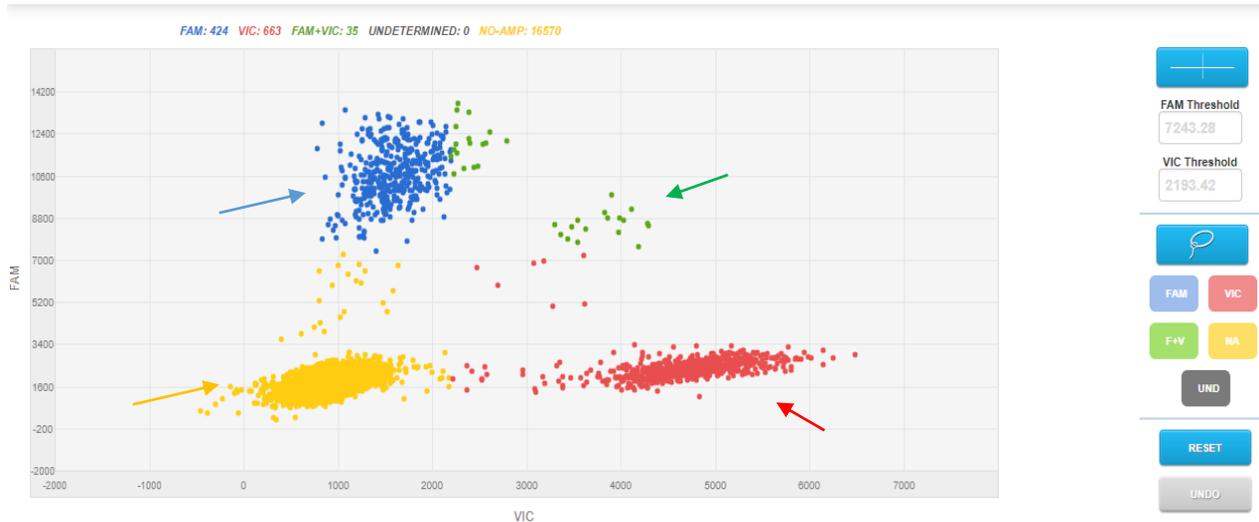


Figura suplementaria 1. Ejemplo de caso modelo para mutación H1047R paciente I-

Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite[™] Cloud Software correspondiente al análisis de la paciente N°28 para la mutación H1047R. Los puntos azules señalados por la flecha del mismo color corresponden a FAM o alelos mutados homocigotos, los puntos verdes corresponden a casos heterocigotos (alelos mutados y silvestres), los puntos rojos corresponden a VIC o alelos silvestres homocigotos y los puntos amarillos a los no amplificados.

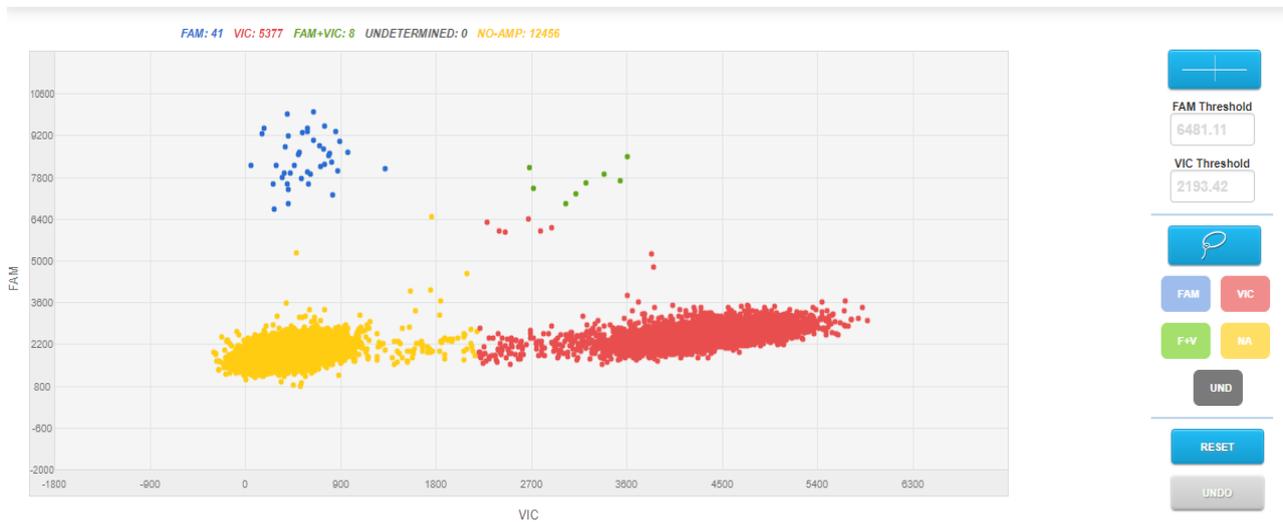


Figura suplementaria 2. Ejemplo de caso modelo para mutación H1047L paciente I-35.

Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite[™] Cloud Software correspondiente al análisis de la paciente N°35 para la mutación H1047L.

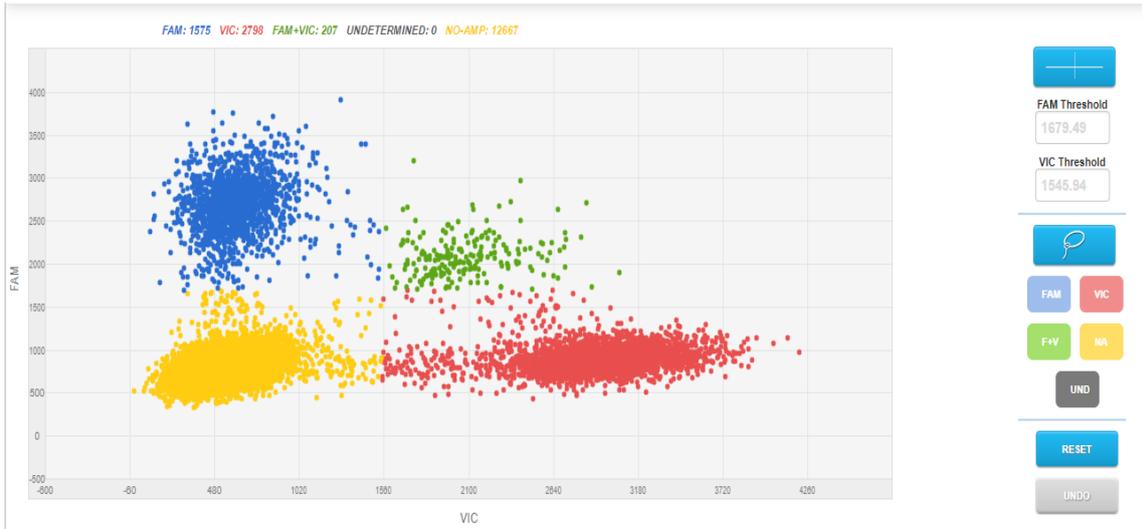


Figura suplementaria 3. Ejemplo de caso modelo para mutación E545K paciente I-68.

Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software correspondiente al análisis de la paciente N°68 para la mutación E545K. Los puntos correspondientes a FAM se encuentran limítrofes o cercanos a los no amplificados.

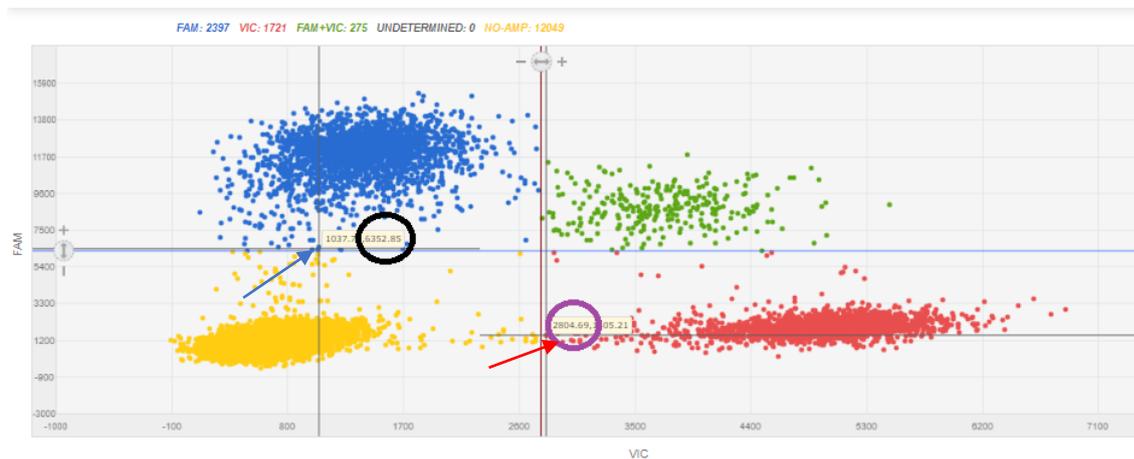


Figura suplementaria 4. Ejemplo de cómo establecer los límites de FAM y VIC para las mutaciones PIK3CA.

Gráfica emitida por QuantStudio 3D Analysis Suite™ Cloud Software correspondiente al análisis de la paciente N°02 para la mutación H1047R. Para calcular el eje de FAM para cada mutación, se utilizó el valor (dentro de círculo negro) del punto más inferior del grupo de FAM (flecha azul). Para VIC se obtuvo el valor (dentro del círculo morado) del punto más a la izquierda del grupo de VIC (flecha roja).

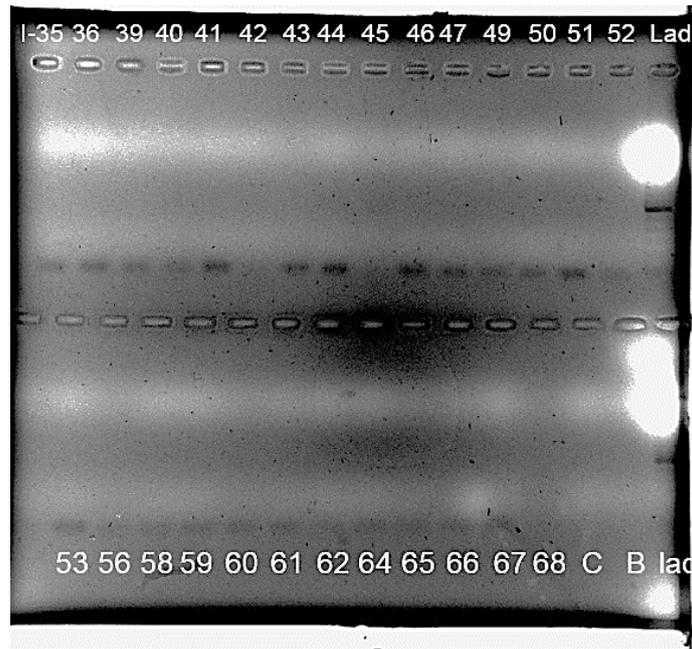


Figura suplementaria 5. Ejemplo de electroforesis de amplificación por PCR punto final o convencional.

Gel de agarosa al 1.5% de concentración con el cual se realizó la electroforesis de algunas muestras del estudio. Las bandas corresponden a un producto de 80 pares de base correspondiente al exón 20 del gen estudiado.

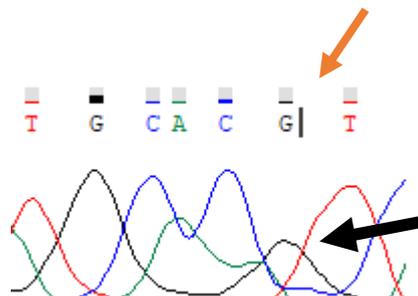


Figura suplementaria 6. Secuencia mutada para H1047R.

Extracto de la secuencia de la paciente N° 02 (PCRd: 56.54%) donde se evidencia en la posición 3140 (señalada por la flecha roja) un cambio de nucleótido de adenina por guanina; siendo la secuencia normal: TGCACAT. La flecha negra señala el pico correspondiente a guanina en vez de adenina.

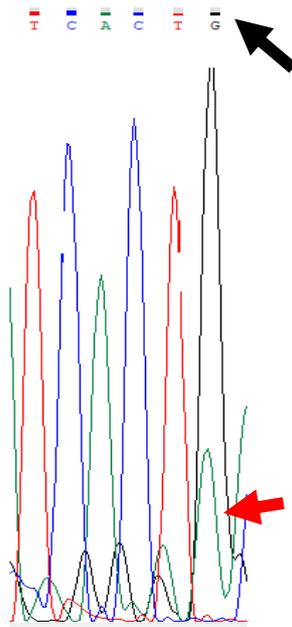


Figura suplementaria 7. Secuencia mutada para E545K.

Extracto de la secuencia de la paciente N° 24 (PCRd: 50.25%) donde se evidencia en la posición 1633 (señalada por la flecha negra) un doble pico correspondiente a adenina. La flecha roja señala el pico verde correspondiente a la mutación 1633 G>A.

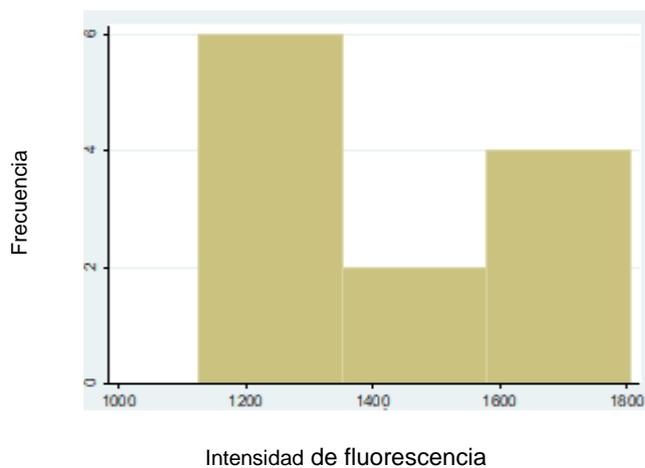


Figura suplementaria 8. Histograma casos modelo FAM E545K.

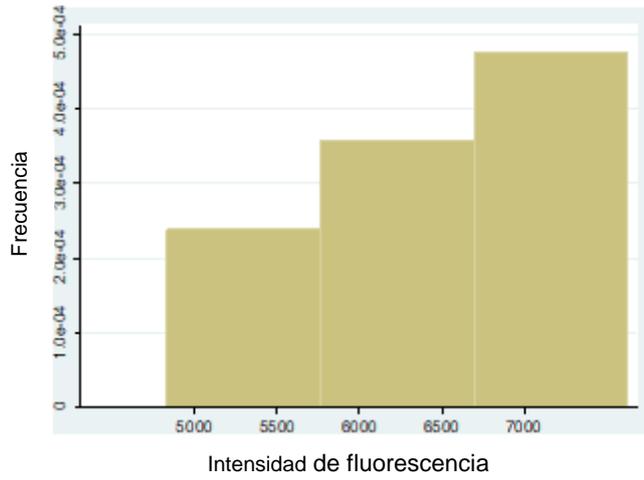


Figura suplementaria 9. Histograma casos modelo FAM H1047R.

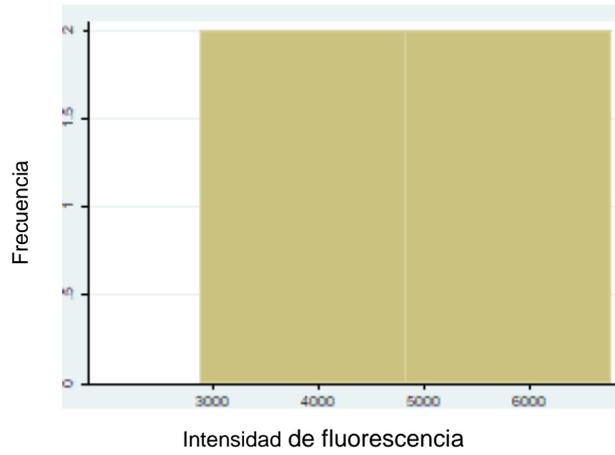


Figura suplementaria 10. Histograma casos modelo FAM H1047L.

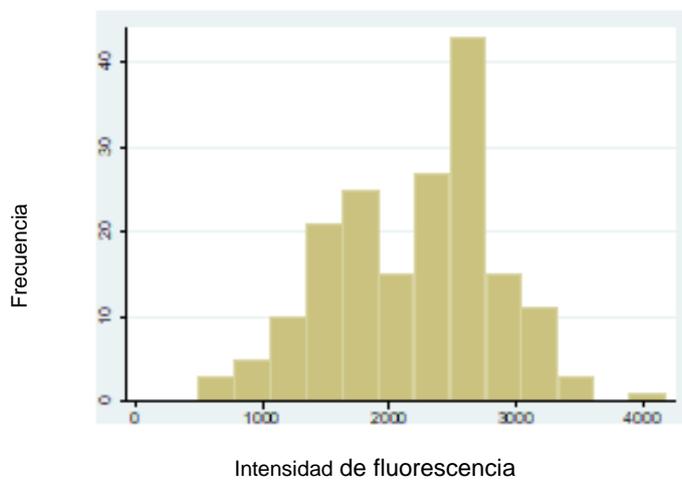


Figura suplementaria 11. Histograma casos VIC.

4. Instrumento de recolección de datos

EVALUACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN PIK3CA EN TUMOR Y PLASMA DE PACIENTES PERUANAS CON CÁNCER DE MAMA MEDIANTE PCR DIGITAL, LIMA 2016-2017: ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y NIVEL DE CONCORDANCIA

Giannoni Luza, Stefano

1 N.º Historia clínica: _____

2 Edad al diagnóstico: _____

3 Fecha del diagnóstico: _____

4 Lugar de nacimiento: _____

5. Hemograma: patológico No patológico:

6. Tipo histológico: _____

6 Estadío del cáncer de mama:

0	<input type="checkbox"/>	IA	<input type="checkbox"/>	IB	<input type="checkbox"/>	IIA	<input type="checkbox"/>
IIB	<input type="checkbox"/>	IIIA	<input type="checkbox"/>	IIIB	<input type="checkbox"/>	IIIC	<input type="checkbox"/>
		IV	<input type="checkbox"/>	No evaluable	<input type="checkbox"/>		

7 Inmunohistoquímica:

HER2 (+)	<input type="checkbox"/>	HER2 (-)	<input type="checkbox"/>	ER (+)	<input type="checkbox"/>	ER (-)	<input type="checkbox"/>
PR (+)	<input type="checkbox"/>	PR (-)	<input type="checkbox"/>				

8. Tamaño del tumor (cm): > 4cm < 4cm

9. Nódulo linfático: Positivo Negativo

10. Metástasis: Positivo Negativo

11. Estatus hormonal premenopausia posmenopausia

	Presente	No presente
14. Mutación E545 en plasma detectada por PCR digital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. Mutación H1047 en plasma detectada por PCR digital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16. Mutación E545 en tumor detectada por PCR digital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17. Mutación H1407 en tumor detectada por PCR digital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18. Mutación E545 en tumor detectada por Secuenciación tipo Sanger	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19. Mutación H1047 en tumor detectada por Secuenciación tipo Sanger	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

5. Consentimiento informado



La Molina, 23 de junio de 2015

Oficio No. 826 - 2015 - CIEI-USMP-CCM

Señor Doctor
José Luis Buleje Sono
Laboratorio de Genética y Biología Moleculas
Facultad de Medicina Humana - USMP
Presente

Ref. Proyecto: "Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento."

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que en cumplimiento de las buenas prácticas clínicas y la legislación peruana vigente en materia de investigación científica en el campo de la salud, el Comité de mi presidencia, en la sesión del 22 de junio evaluó y aprobó los siguientes documentos:

- Proyecto: "Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento."
- Hoja Informativa para el Paciente

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines que correspondan.

Atentamente,



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica Cazorla

HOJA INFORMATIVA PARA EL PACIENTE

Nombre del estudio:

TEST GENÉTICO - EPIGENÉTICO NO INVASIVO PARA CÁNCER DE MAMA UTILIZANDO ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTES (cfNAs) COMO BIOMARCADORES, PREDICTORES DE PRONÓSTICO Y RESPUESTA A TRATAMIENTO.

Patrocinadores del estudio: Universidad de San Martín de Porres, Oncosalud-AUNA.

Investigador principal: José Luis Buleje Sono

Investigador responsable en la USMP: Ricardo Miguel Fujita Alarcón

Investigador responsable en Oncosalud-AUNA: Alfredo Aguilar Cartagena

Sedes de estudio: Laboratorio de Genética y Biología Molecular. Facultad de Medicina Humana. Universidad de San Martín de Porres; Unidad de Mama, Oncosalud-AUNA

Estimado Señor(a):

Estamos realizando un trabajo científico que servirá en el futuro para el mejor tratamiento de cáncer y queremos invitarlo a participar. Este documento conocido como *Consentimiento Informado*, sirve para informarle de los alcances y detalles de nuestro proyecto y le ayudará en su decisión de participar en el estudio. Lea cuidadosamente el presente documento y haga las preguntas a los médicos y miembros del equipo para realizar un estudio genético. Ud. debe firmar solo si ha entendido toda la información.

Los patrocinadores del estudio son Universidad de San Martín de Porres y Oncosalud-AUNA, que tienen como algunas de sus metas, la investigación científica en las poblaciones peruanas, así como y la extensión universitaria a la sociedad en colaboración con Oncosalud-AUNA.

Acerca del estudio

La información científica indica que en el cáncer es una enfermedad donde se encuentran involucrados una serie de genes. Los genes portan las características que recibimos de nuestros padres, abuelos y otros ancestros y que transmitimos a nuestros hijos como es el caso de los rasgos físicos, el color de la piel, de los ojos, del tipo de cabello y otros como el funcionamiento normal de las células. En muchos tipos de cáncer las células sufren cambios de la información genética (mutaciones y alteraciones epigenéticas) y hacen que se expresen de manera anormal y proliferen sin control. Estos cambios pueden ser detectados por las técnicas usadas en esta investigación y esa información puede servir para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del cáncer. El ADN de las células del cuerpo pueden ser detectadas en el plasma sanguíneo y eso ocurre también para las células tumorales.

Este proyecto involucra el estudio de pacientes con cáncer de mama (n=100) y sus respectivos controles sanos (n=100) y tiene una duración de 30 meses; siendo los criterios de inclusión y exclusión los siguientes:

Criterios de Inclusión

Pacientes recientemente diagnosticados con cáncer de mama. Mayores de 18 años y sin tratamiento previo. Firma de consentimiento informado. Controles: Pacientes sin cáncer de mama.




Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente



Criterios de Exclusión

Paciente con tratamiento previo; no aceptación de consentimiento informado.

Le invitamos a participar porque nos ayudará a conocer las variantes genéticas asociadas con cáncer de mama en nuestra población. Este es un trabajo de investigación científica y su participación va a ser importante, por ahora no obtendrá un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de posibles factores genéticos relacionados con la forma cómo las células cancerosas escapan del control de la proliferación, será de suma importancia. Además, permitirá establecer el pronóstico de la enfermedad de acuerdo a los tipos de alteraciones encontradas. Esto podría beneficiar en un futuro a otros pacientes porque permitirá identificar a la enfermedad antes que se pueda detectar clínicamente. Ello también contribuirá a un mejor conocimiento y tratamiento del cáncer de mama en las mujeres peruanas.

¿Por qué hacer el estudio?

En un futuro próximo, conociendo las variantes genéticas de los tumores se les podrán detectar oportunamente y escoger desde un principio el mejor medicamento de acuerdo a su constitución genética.

El estudio se realizará en el laboratorio mediante el análisis de la molécula de ADN. Dichos análisis buscan determinar la presencia de variaciones en el ADN que puedan ser causales de la enfermedad y/o ser susceptibles a tratamiento.

¿Qué se me pedirá?

Si usted decide participar se le solicitará 10 ml de sangre obtenido por venopunción y una muestra de tumor fresco y/o tumor conservado en parafina (lo que no influirá en el estudio patológico de su enfermedad). Usted puede donar el sobrante de su muestra para que en lugar de ser destruido, sea utilizado en investigación relacionada con el cáncer.

Su participación en este estudio es voluntaria. Por otra parte, la realización del estudio genético será gratuita, y no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación. Si decide no participar en este estudio, esto no cambiará la calidad de la atención recibida.

¿Qué riesgos de salud implica este estudio?

La muestra será de sangre intravenosa por lo que las dificultades son el pinchazo y algunas veces se forma hematomas.

Se le pedirá su consentimiento para que con su muestra se haga:

1.- Estudio de genes específicos de este proyecto (HER2, PIK3CA, TP53, RASSF1A, MAL, SFRP1, GSTP1, RARB2 y varios miRNAs, etc.) que pueden estar involucrados en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad que usted padece. Si usted lo solicita, su muestra solo servirá para este proyecto y una vez finalizado el estudio, será destruida.

2.- Autorizar al Investigador a almacenar su muestra de ADN para futuros estudios que asocien otros genes relacionados con el desarrollo y tratamiento de cáncer, puedan ser procesados.

¿Qué se harán con los resultados del estudio?


Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres, Lima, Perú

Su resultado será analizado junto con los de otras pacientes para realizar el análisis del efecto de diferentes variantes en el tratamiento de cáncer. Los resultados del estudio no influirán en el manejo de su enfermedad.

Confidencialidad

Por tratarse de un estudio genético de participación confidencial, su identidad siempre será preservada de forma confidencial. Su nombre será cambiado por un código de números y letras para uso de laboratorio, así sus datos personales no serán conocidos fuera de este trabajo. Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y tratada de acuerdo a las leyes peruanas de Protección de Datos Personales (Ley N 29733).

Preguntas o quejas

Para cualquier duda usted puede comunicarse con:

Dr. José Buleje Sono, Investigador del CGBM, FMH-USMP, investigador principal del proyecto, teléfono oficina: 3652300 anexo 152, celular 985225663. Correo electrónico: jbulejes@usmp.pe, Av. Alameda del Corregidor No 1531 Urb. Los Sirius, La Molina.

Dr. Alfredo Aguilar, Médico oncólogo, Director Científico de Oncosalud-AUNA. Teléfono oficina: 5137900 anexo 1292, Correo electrónico: aaguilar@oncosalud.pe, Av. Guardia Civil 571, San Borja.

Dr. Ricardo Fujita A., Director CGBM, FMH-USMP, investigador responsable del estudio, teléfono oficina: 3652300 anexo 152, celular 997054985. Correo electrónico: rfujitaa@usmp.pe, Av. Alameda del Corregidor No 1531 Urb. Los Sirius, La Molina.

En caso de duda puede resolverla con:

Dr. Amador Vargas Guerra, Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de San Martín de Porres- Clínica CadaMujer, quien vigila que la ejecución del proyecto sea bajo las normas éticas establecidas en el Perú. Teléfono: 3350483 anexo160, celular 999098514. Correo electrónico: etica_fmh@usmp.pe, Av. Alameda del Corregidor No 1531 Urb. Los Sirius, La Molina.

Declaración del Paciente

"He leído y entendido la información prestada y escrita en este documento. También afirmo que he tenido la oportunidad de hacer algunas preguntas y resolver algunas dudas. Por lo que acepto libre y voluntariamente participar en esta investigación"


Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica CadaMujer

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE ESTUDIO GENÉTICO:

Test genético - epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento.

Nombre:
Fecha: Edad:
DNI: Teléfono: No de Registro:
Médico tratante:
Hospital Referencia:

He recibido información de forma verbal y escrita sobre el proyecto **Test genético - epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento.**

De acuerdo a esta información he entendido que:

- 1.- Se me va a extraer una muestra de sangre periférica para realizar un estudio genético.
- 2.- El objetivo de dicho estudio es analizar los genes que están implicados en el cáncer, su respuesta a tratamiento y pronóstico.
- 3.- Los resultados del estudio no influirán en el manejo de la enfermedad.
- 4.- Se guardará la confidencialidad de los resultados del estudio, pudiéndose utilizar los datos de forma anónima para estudios epidemiológicos.
- 5.- Si creo conveniente, puedo anular el consentimiento así como solicitar que se destruyan las muestras extraídas.

Leído el documento **CONSIENTO** que se me extraiga una muestra para realizar el estudio genético.

Lima, _____ de _____ del 201_

Firma del paciente

Firma del Investigador



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica Casalta

