



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**Marcadores moleculares para ayuda diagnóstica para el cáncer
de mama**

**Trabajo de Titulación para optar al título de Licenciada en
Laboratorio Clínico**

Autora:

Caiza Moya Sulay Maricela

Tutor:

Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda

Riobamba, Ecuador. 2026

DECLARATORIA DE AUTORÍA

Yo, Sulay Maricela Caiza Moya, con cédula de ciudadanía 1803983236, autora del trabajo de investigación titulado: Marcadores moleculares para ayuda diagnóstica para el cáncer de mama, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas, son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autora de la obra referida será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 28 de abril del 2026.



Sulay Maricela Caiza Moya

CI: 1803983236

DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR

Quien suscribe, Félix Atair Falconí Ontaneda catedrático adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud, por medio del presente documento certifico haber asesorado y revisado el desarrollo del trabajo de investigación titulado: Marcadores moleculares para ayuda diagnóstica para el cáncer de mama, bajo la autoría de Sulay Maricela Caiza Moya; por lo que se autoriza ejecutar los trámites legales para su sustentación.

Es todo cuanto informar en honor a la verdad; en Riobamba, a los 28 días del mes de abril de 2026.



Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda

C.I. 0702782020

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación Marcadores moleculares para ayuda diagnóstica para el cáncer de mama, presentado por Sulay Maricela Caiza Moya, con cédula de identidad número 1803983236, bajo la tutoría de Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 28 de abril de 2026.

Mercedes Balladares Mgs.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO



Eliana Martínez Mgs.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Celio García MsC.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO





Dirección
Académica
VICERRECTORADO ACADÉMICO



UNACH-RGF-01-04-08.17
VERSIÓN 01: 06-09-2021

CERTIFICACIÓN

Que, **CAIZA MOYA SULAY MARICELA** con CC: **1803983236**, estudiante de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, Facultad de **CIENCIAS DE LA SALUD**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**MARCADORES MOLECULARES PARA AYUDA DIAGNÓSTICA PARA CÁNCER DE MAMA**", cumple con el **5%** de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **COMPILATIO**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 14 de abril de 2026.

Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda
TUTOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, por darme la vida y la fuerza para seguir adelante, incluso cuando los caminos se tornaban difíciles.

A mí, por la perseverancia y la valentía de no rendirme nunca y por creer siempre en mis posibilidades.

A mis padres, Marisol y Marcelo, a mi hermano Jean Pierre, y a mi abuela Luz, cuyo amor, guía y apoyo han iluminado cada paso de mi camino.

Y a mi querido gatito Cieguito, por su compañía silenciosa y su consuelo que ha llenado de calma los momentos de esfuerzo y estudio.

Sulay Maricela Caiza Moya

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis. Gracias a mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A la Universidad Nacional de Chimborazo, por brindarme la oportunidad de adquirir los conocimientos necesarios para enfrentar los nuevos retos de la vida profesional.

A mis docentes, por compartir sus experiencias, conocimientos y apoyo en mi formación académica.

A todos ustedes, mi gratitud sincera y profunda, porque cada uno ha dejado una huella importante en esta etapa de mi vida.

Sulay Maricela Caiza Moya

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	17
Marcadores moleculares en el cáncer de mama	17
Receptores hormonales	17
Clasificación molecular del cáncer de mama	18
Marcadores de amplificación génica	20
Marcadores de proliferación celular	20
Marcadores supresores tumorales.....	21
Marcadores genéticos de susceptibilidad	21
Firmas génicas y paneles multigénicos.....	22
Técnicas de laboratorio para la determinación de marcadores moleculares	23
Tipos de PCR utilizados en cáncer de mama	26
Aplicación de la PCR en marcadores moleculares del cáncer de mama	27
Glándula mamaria.....	37
Función biológica de la glándula mamaria	37
Anatomía macroscópica de la glándula mamaria	38
Anatomía histológica de la glándula mamaria	39
Unidades ducto-lobulillares terminales (TDLU).....	39
Cáncer de mama	40
Etiopatogenia del cáncer de mama	41
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	43
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers y probes utilizados para la detección de mutaciones ESR1 mediante PCR.	28
Tabla 2. Primers y probes utilizados para la detección de mutaciones PGR mediante PCR.	29
Tabla 3. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen MKI67 en PCR cuantitativa (qPCR).	30
Tabla 4. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen TP53 en PCR	31
Tabla 5. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen BRCA1 en PCR .	32
Tabla 6. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen BRCA2 en PCR .	33
Tabla 7. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen PIK3CA en PCR	34
Tabla 8. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen PTEN en PCR.....	35
Tabla 9. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen AKT1 en PCR ...	36
Tabla 10. Principales marcadores moleculares utilizados para la detección de cáncer de mama.	48
Tabla 11. Utilidad de las pruebas de laboratorio empleadas dentro del área de biología molecular para la valoración de los marcadores moleculares en el diagnóstico del cáncer de mama.	55
Tabla 12. Comparación de técnicas de laboratorio en cáncer de mama según sensibilidad, especificidad.	61

RESUMEN

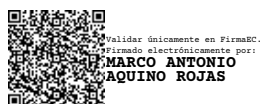
El cáncer de mama constituye la neoplasia de mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial, con una carga significativa en países en desarrollo medio como Ecuador, donde el diagnóstico tardío y el acceso limitado a tecnologías especializadas dificultan su control. En este contexto, los marcadores moleculares emergen como herramientas clave para mejorar la detección, clasificación y seguimiento de la enfermedad, sin embargo, la diversidad de técnicas disponibles y la variabilidad en su rendimiento diagnóstico hacen necesario evaluar su utilidad en el laboratorio clínico. El objetivo del estudio fue analizar de forma minuciosa los marcadores moleculares utilizados para la ayuda en el diagnóstico en el cáncer de mama. La presente investigación se elaboró a través de un enfoque cualitativo, de nivel descriptivo y diseño documental no experimental. Se revisaron 70 artículos científicos publicados entre el año 2015 y 2025, seleccionando una muestra de 43 estudios usando criterios de inclusión y exclusión. Los hallazgos fueron obtenidos de bases de datos científicas y analizada por medio de técnicas de observación y síntesis teórica. Los datos resultantes evidencian que el diagnóstico del cáncer de mama se basa en un análisis global que incluye biomarcadores genéticos, de expresión tisular, firmas multigénicas y marcadores circulantes. En base al tipo de muestra y objetivo clínico, técnicas como la inmunohistoquímica (IHC), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR), PCR digital de gotas (ddPCR) y secuenciación de nueva generación (NGS), presentan distintos niveles de sensibilidad y especificidad. Se demuestra que la integración de múltiples técnicas y marcadores permite optimizar el diagnóstico y avanzar hacia una medicina personalizada, mejorando la toma de decisiones clínicas y el pronóstico de las pacientes.

Palabras clave: marcadores moleculares, cáncer de mama, diagnóstico, laboratorio clínico, RT-qPCR, IHC, ddPCR, NG, BRCA1/BRCA2, HER2, Ki-67.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common and deadly cancer in women worldwide, with a significant burden in middle-income countries like Ecuador, where late diagnosis and limited access to specialized technologies hinder its control. In this context, molecular markers are emerging as key tools to improve the detection, classification, and monitoring of the disease. However, the diversity of available techniques and the variability in their diagnostic performance necessitate evaluating their usefulness in the clinical laboratory. The objective of this study was to thoroughly analyze the molecular markers used to aid in the diagnosis of breast cancer. This research was conducted using a qualitative, descriptive, and non-experimental documentary design. Seventy scientific articles published between 2015 and 2025 were reviewed, and a sample of 43 studies was selected using inclusion and exclusion criteria. The findings were obtained from scientific databases and analyzed using observational techniques and theoretical synthesis. The resulting data demonstrate that breast cancer diagnosis is based on a comprehensive analysis that includes genetic biomarkers, tissue expression markers, multigene signatures, and circulating markers. Depending on the sample type and clinical objective, techniques such as immunohistochemistry (IHC), reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), droplet digital PCR (ddPCR), and next-generation sequencing (NGS) exhibit varying levels of sensitivity and specificity. The integration of multiple techniques and markers is shown to optimize diagnosis and advance personalized medicine, improving clinical decision-making and patient prognosis.

Keywords: molecular markers, breast cancer, diagnosis, clinical laboratory, RT-qPCR, IHC, ddPCR, NGS, BRCA1/BRCA2, HER2, Ki-67.



Reviewed by:
Marco Antonio Aquino
ENGLISH PROFESSOR
C.C. 1753456134

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

Actualmente el cáncer de mama (CM) es la neoplasia maligna de mayor incidencia mundial en la mujer. De acuerdo con información de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) a través del Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN 2022), se calcula que cada año se diagnostican más de 2,3 millones de casos nuevos a nivel mundial, lo que equivale aproximadamente al 23,8 % de todos los cánceres femeninos. En el mismo período, la enfermedad provocó más de 670 000 muertes, consolidando su posición como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial, por encima del cáncer de pulmón y el colorrectal¹.

La OPS advierte que el CM afecta desproporcionadamente a mujeres en países de ingresos bajos y medios, donde la mayoría de las muertes ocurren antes de los 70 años debido a diagnósticos tardíos, acceso limitado a tecnologías de detección y cobertura insuficiente de tratamientos especializados². La supervivencia a cinco años es mayor del 85 % en países de ingresos altos, pero puede ser inferior al 40 % en países en desarrollo, lo que pone de aliviar una brecha estructural de equidad en salud que trasciende lo exclusivamente clínico².

Desde el punto de vista histórico, el CM es conocido como enfermedad desde la antigüedad: ya está descrito en el Papiro Edwin Smith entre los años 3000 y 2500 a. C³., y desde entonces, su manejo ha sufrido una completa revolución. La primera mastectomía radical la realizó William Halsted en 1882⁴ iniciando así la era moderna de la cirugía. El siglo XX introdujo la radioterapia, los tratamientos sistémicos y, en las últimas décadas, la terapia molecular dirigida. Esta trayectoria histórica subraya que el avance en el manejo del CM no es lineal ni aislada, sino que es el resultado acumulado de desarrollos tecnológicos, epidemiológicos y políticos a escala internacional.

A nivel molecular el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, con varios subtipos biológicos que presentan conductas clínicas, respuestas terapéuticas y pronósticos muy diferentes entre sí. La clasificación molecular Luminal A, Luminal B, HER2 enriquecido y basallike o triple negativo ha redefinido el paradigma diagnóstico, pasando de estudiar la morfología a analizar las características genómicas y proteicas del tumor.

En este ámbito, los marcadores moleculares se han consolidado como recursos para definir con mayor exactitud el subtipo tumoral, orientar elección del tratamiento más adecuado, hacer seguimiento de la respuesta terapéutica y anticipar posibles mecanismos de resistencia, contribuyendo así a mejorar los resultados clínicos de las pacientes.

El avance rápido de herramientas analíticas, desde la inmunohistoquímica (IHC) convencional hasta la secuenciación de nueva generación (NGS), la PCR digital por gotas (ddPCR) y la biopsia líquida sobre ADN tumoral circulante (ctDNA/cfDNA), ha dado lugar a un nuevo enfoque en el diagnóstico. No obstante, la misma abundancia de técnicas obliga a analizar de forma sistémica su sensibilidad, especificidad y aplicabilidad clínica, ya que el rendimiento de cada método depende del marcador estudiado, del tipo de muestra procesada y del comparador metodológico empleado, lo que constituye el punto de partida del presente trabajo.

El caso latinoamericano y Caribe en el periodo 2022–2024 exigieron aproximadamente 210 000 casos nuevos lo que equivale al 14 % de todos los cánceres en la región⁵. Ecuador repite con fuerza particular las tendencias globales descritas. CM se afirma como la neoplasia de mayor prevalencia en las ecuatorianas, con una incidencia estandarizada que se proyecta en aproximadamente 3900 casos nuevos por año lo que corresponde al 23% en cánceres en mujeres con una tasa de incidencia de 38 – 42 casos por cada 100 000 mujeres, según datos del Observatorio GLOBOCAN (2022–2024) e INEC⁵; un crecimiento sostenido que exige respuestas sistemáticas y basadas en evidencia.

A nivel nacional, de acuerdo al Registro Nacional de Tumores (RNT), los cánceres que más afectan a las mujeres son el de mama (2 787 casos anuales), cuello uterino (1 612), tiroides (1 374), estómago (1 225) y colorrectal (1 123)⁶, lo cual sitúa al CM muy por debajo como la primera prioridad de la oncología ginecológica del país.

La situación se vuelve más compleja cuando se consideran las barreras estructurales que condicionan el acceso a tecnologías de diagnóstico avanzado en el sistema de salud pública ecuatoriana. La distribución desigual de recursos humanos especializados y de equipamiento de alta complejidad, según la ubicación geográfica, limita la posibilidad de implementar herramientas moleculares en establecimientos de segundo nivel, el escenario se contrapone

directamente con el mandato constitucional: El Artículo 32 de la Constitución de la República del Ecuador define a la salud como un derecho fundamental que el Estado debe garantizar sin exclusiones⁷, el Artículo 50 obliga a brindar atención especializada y gratuita a todas las personas con enfermedades catastróficas o de alta complejidad⁷. La incorporación de pruebas diagnósticas moleculares no es, pues, una opción sino una exigencia legal y ética.

En la provincia de Chimborazo, las estadísticas del Servicio de Oncología del Hospital de SOLCA muestran un patrón epidemiológico que refleja la tendencia nacional, con grandes fluctuaciones en la última década⁸. Luego del descenso observado desde el año 2014 (40 casos) hasta 2019 (12 casos), la pandemia de COVID-19 (2020–2021) alteró la detección por limitaciones en el acceso al sistema de salud, no obstante, entre 2022 y 2024 se evidencia un incremento de aproximadamente 80 casos nuevos, continuo y sostenido de nuevos diagnósticos⁸, coincidente con las proyecciones del Registro Nacional de Tumores⁶.

Resulta particularmente preocupante el incremento incipiente de casos en mujeres menores de 40 años registrado en 2024⁸, lo que señala la necesidad de programas de tamizaje más tempranos y de protocolos diagnósticos de mayor precisión molecular en la región.

El rango etario predominante de las pacientes en Chimborazo continúa en el rango de 36 a 65 años⁸, este dato resalta no sólo la carga clínica, sino también el impacto socioeconómico y familiar que genera el CM en las comunidades de la sierra central ecuatoriana, reforzando la urgencia de contar con herramientas diagnósticas que permitan la detección en estadios tempranos, cuando la probabilidad de curación es mayor.

A escala individual y de laboratorio clínico, el diagnóstico del CM ha sobrepasado la histología convencional para apoyarse crecientemente en la caracterización molecular del tumor. Un marcador molecular es una molécula biológica que se encuentra en la sangre, los tejidos u otros fluidos corporales y que es capaz de indicar la existencia de un proceso fisiopatológico concreto.

Dentro del CM, estos marcadores sirven como indicadores de la actividad tumoral, la predisposición genética, la respuesta terapéutica y el riesgo de recurrencia, y son fundamentales para el manejo oncológico personalizado.

La expresión o alteraciones de cada uno de estos marcadores definen un subtipo biomédico con implicaciones terapéuticas específicas e intransferibles entre subgrupos. En la última década las plataformas analíticas disponibles para evaluar estos marcadores han sufrido una importante transformación. Esta interdependencia hace indispensable una evaluación sistemática y comparativa de las diferentes plataformas frente a los marcadores más relevantes, tarea que requiere integrar la evidencia disponible en la literatura científica más reciente.

Los resultados de esta revisión no solo aportan al conocimiento teórico sino también a la capacitación del recurso humano en salud y a la toma de decisiones clínicas basadas en evidencias en los laboratorios de biología molecular del Ecuador. Los marcadores que en la actualidad tienen mayor relevancia clínica y mejor evidencia científica son el receptor de estrógenos, el receptor de progesterona, HER2 codificada por el gen ERBB2, Ki-67 y BRCA1 y BRCA2. A estas mutaciones se añaden las adquiridas de forma somática en genes como PIK3CA. La expresión o alteración de cada uno de estos marcadores define un subtipo biomédico con implicaciones terapéuticas específicas e intransferibles entre subgrupos.

La última década las plataformas analíticas disponibles para evaluar estos marcadores han sufrido una importante transformación. La inmunohistoquímica (IHC) es todavía el patrón de primera línea en tejido tumoral, con valores de sensibilidad y especificidad mayores del 87% para HER2 según Thanasan y cols⁹. Sin embargo, la RT-qPCR permite la cuantificación directa de la expresión génica, y Albanyahyati et al¹⁰ demostraron una especificidad del 100 % para HER2, mientras que la NGS puede analizar múltiples variantes simultáneamente, con sensibilidades del 83 % para PIK3CA y del 100 % para BRCA1¹¹.

Por su parte, la PCR digital por gotas (ddPCR) y la PCR digital múltiplex han demostrado especificidades del 100 % para ESR1 y PIK3CA en biopsia líquida^{12,13}, siendo las plataformas de mayor precisión para el seguimiento longitudinal no invasivo.

No obstante, la capacidad diagnóstica de cada técnica no es una propiedad absoluta sino relacional: depende del tipo de muestra empleada, la carga tumoral circulante y del objetivo clínico de detección inicial, selección terapéutica o monitoreo de resistencias. La interdependencia hace indispensable una evaluación sistemática y comparativa de las

diferentes plataformas frente a los marcadores más relevantes, tarea que requiere integrar la evidencia disponible en la literatura científica más reciente.

A partir de la realidad multidimensional que abarca la carga epidemiológica mundial, situación sanitaria nacional, regional y complejidad técnica del diagnóstico molecular surge la pregunta que guía este trabajo: ¿Los marcadores moleculares son importantes para la ayuda diagnóstica del cancer de mama en el contexto del laboratorio clínico en Ecuador? Como respuesta, el objetivo de este estudio fue analizar los marcadores moleculares empleados como herramientas diagnósticas en el cáncer de mama mediante una revisión de la literatura científica, para establecer su importancia en el diagnóstico de la enfermedad, con el fin de orientar la práctica del laboratorio clínico hacia estrategias más precisas, eficientes y accesibles en el contexto ecuatoriano.

Con el fin de cumplir con este objetivo general se establece tres objetivos específicos, los cuales son:

- Describir los principales marcadores moleculares relacionados con el cáncer de mama mediante la revisión de estudios bibliográficos recientes para proporcionar una base teórica sólida que facilite la comprensión de su relevancia en la práctica clínica y su impacto en el manejo de esta enfermedad.
- Categorizar la utilidad de las técnicas más relevantes en la valoración del cáncer de mama mediante la búsqueda de información en bases de datos.
- Comparar las técnicas de laboratorio utilizadas en la detección del cáncer de mama mediante el análisis de datos extraídos de documentos científicos para la identificación de la sensibilidad y especificidad.

Los hallazgos de esta revisión contribuyen no solo al conocimiento académico sino también a la formación del talento humano en salud y a la toma de decisiones clínicas basadas en evidencia en los laboratorios de biología molecular del Ecuador.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

Marcadores moleculares en el cáncer de mama

Un marcador molecular se define como una molécula biológica medible (ADN, ARN, proteína o metabolito) cuya presencia, ausencia o nivel de expresión permite identificar procesos fisiológicos o patológicos específicos. En el cáncer de mama, los marcadores moleculares se utilizan para el diagnóstico, clasificación, pronóstico y selección de estrategias terapéuticas, al reflejar alteraciones genéticas y epigenéticas propias de la célula tumoral¹⁴.

Limitaciones diagnósticas

A pesar de su utilidad, los marcadores moleculares presentan limitaciones diagnósticas importantes. La heterogeneidad intratumoral puede generar variabilidad en la expresión de los marcadores, lo que condiciona resultados discordantes según el área tumoral analizada y el método empleado. Esta situación puede afectar la precisión diagnóstica y la correcta clasificación molecular del tumor¹⁵.

Receptores hormonales

Receptor de estrógeno

Gen ESR1

El receptor de estrógeno es codificado por el gen ESR1, localizado en el cromosoma 6q25.1, y pertenece a la familia de receptores nucleares activados por ligando. Este gen regula la transcripción de múltiples genes implicados en proliferación, diferenciación y supervivencia celular del epitelio mamario, siendo un componente clave en la fisiología normal y en la carcinogénesis mamaria¹⁶.

Expresión en cáncer de mama

En el cáncer de mama, la expresión del receptor de estrógeno define un subgrupo biológico con implicaciones pronósticas y terapéuticas. Los tumores ER positivos suelen presentar un curso clínico más favorable y una alta respuesta a terapias endocrinas. La determinación de

su expresión constituye un marcador molecular esencial en la clasificación y manejo del cáncer de mama¹⁷.

Receptor de progesterona

Gen PGR

El receptor de progesterona es codificado por el gen PGR, localizado en el cromosoma 11q22-q23. Su expresión está regulada, en gran medida, por la activación previa del receptor de estrógeno, por lo que constituye un marcador indirecto de funcionalidad de la vía estrogénica en el tejido mamario tumoral¹⁸.

Importancia diagnóstica

Desde el punto de vista diagnóstico y pronóstico, la expresión del receptor de progesterona se asocia a una mayor diferenciación tumoral y a una mejor respuesta a la hormonoterapia. Su evaluación conjunta con el receptor de estrógeno permite una clasificación molecular más precisa y contribuye a la toma de decisiones referente al tratamiento en pacientes con cáncer de mama¹⁹.

Clasificación molecular del cáncer de mama

Luminal A

Se caracteriza por la expresión positiva de receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR), ausencia de sobreexpresión de HER2 y baja actividad proliferativa, generalmente evaluada mediante Ki-67. Este subtipo presenta el mejor pronóstico y una alta respuesta a terapias hormonales²⁰.

Los tumores Luminal A muestran perfiles de expresión génica asociados a diferenciación celular y regulación hormonal, lo que explica su comportamiento menos agresivo y menor tasa de recurrencia en comparación con otros subtipos

Luminal B

El subtipo Luminal B también expresa receptores hormonales, pero se diferencia del Luminal A por presentar mayor índice proliferativo, menor expresión de PR y, en algunos casos, sobreexpresión de HER2. En la práctica, suele ubicarse en un pronóstico “a la mitad” y con más chances de que la enfermedad reaparezca

Los tumores Luminal B exhiben una activación aumentada de genes relacionados con el ciclo celular y proliferación, lo que justifica la necesidad de estrategias terapéuticas combinadas que incluyan hormonoterapia y quimioterapia

HER2 positivo

El subtipo HER2 positivo se caracteriza por la amplificación del gen ERBB2 y la sobreexpresión de la proteína HER2, independientemente del estado de los receptores hormonales. Este subtipo se asocia a un crecimiento tumoral agresivo, aunque su pronóstico ha mejorado significativamente con el desarrollo de terapias dirigidas.

La activación constitutiva de la vía HER2 promueve proliferación celular, supervivencia tumoral y capacidad metastásica, lo que convierte a este oncogén en un biomarcador clave para el diagnóstico y la selección terapéutica²¹.

Triple negativo

El cáncer de mama triple negativo se define por la ausencia de expresión de ER, PR y HER2. Este subtipo presenta un comportamiento clínico agresivo, mayor riesgo de metástasis temprana y opciones terapéuticas limitadas, debido a la falta de blancos moleculares hormonales o HER2

Molecularmente, el subtipo triple negativo muestra una alta heterogeneidad genética y suele asociarse a alteraciones en genes de reparación del ADN, como BRCA1, así como a una elevada inestabilidad genómica, lo que ha impulsado la investigación de nuevos biomarcadores y estrategias terapéuticas dirigidas.

Marcadores de amplificación génica

Gen ERBB2 (HER2)

El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano es codificado por el gen ERBB2, localizado en el cromosoma 17q12. Este gen pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa ERBB y desempeña un papel fundamental en la regulación del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. En el tejido mamario, la activación anómala de ERBB2 se asocia con transformación neoplásica y progresión tumoral²².

Amplificación génica

La amplificación génica de ERBB2 consiste en el aumento del número de copias del gen, lo que conduce a una activación constitutiva de vías de señalización intracelular relacionadas con proliferación celular, angiogénesis y resistencia a la apoptosis. En el cáncer de mama, esta alteración se presenta aproximadamente en el 15–20 % de los casos y se asocia a un comportamiento clínico más agresivo²³.

Sobreexpresión de HER2

La sobreexpresión de la proteína HER2 es consecuencia directa de la amplificación del gen ERBB2 y se manifiesta como un aumento significativo de receptores HER2 en la membrana celular. Este fenómeno favorece la activación continua de rutas de señalización oncogénica, como PI3K/AKT y MAPK, promoviendo crecimiento tumoral acelerado y mayor potencial metastásico²⁴.

Marcadores de proliferación celular

Antígeno Ki-67 - Gen MKI67

El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear codificada por el gen MKI67, localizado en el cromosoma 10q26.2. Este gen se expresa exclusivamente en células en proliferación activa y está ausente en células en fase de reposo (G0), lo que lo convierte en un marcador específico de actividad proliferativa celular. En el cáncer de mama, su expresión refleja la fracción de células tumorales en división²⁵.

Relación con el ciclo celular

La proteína Ki-67 se expresa durante las fases G1, S, G2 y mitosis del ciclo celular, con un pico máximo durante la fase M, y desaparece rápidamente tras la división celular. Su función está relacionada con la organización de la cromatina y la progresión del ciclo celular, lo que explica su utilidad como indicador de agresividad tumoral²⁶.

Marcadores supresores tumorales

Proteína p53 - Gen TP53

La proteína p53 es codificada por el gen TP53, localizado en el cromosoma 17p13.1, y cumple una función central como regulador del ciclo celular y guardián de la estabilidad genómica. En condiciones normales, p53 participa en la detención del ciclo celular, la reparación del ADN y la inducción de apoptosis ante daño genético²⁷.

Mutaciones y desregulación celular

Las mutaciones en el gen TP53 constituyen una de las alteraciones genéticas más frecuentes en el cáncer de mama y conducen a la pérdida de la función supresora tumoral de p53. Esta desregulación favorece la acumulación de daño genético, la proliferación celular descontrolada y la progresión tumoral, asociándose a fenotipos más agresivos y peor pronóstico clínico²⁸.

Marcadores genéticos de susceptibilidad

Gen BRCA1

El gen BRCA1 (Breast Cancer gene 1) se localiza en el cromosoma 17q21 y codifica una proteína supresora tumoral esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica. Su función principal está relacionada con la reparación del ADN por recombinación homóloga, el control del ciclo celular y la regulación de la transcripción génica. La pérdida de su función favorece la acumulación de daño genético y la transformación maligna de las células mamarias²⁹.

Las mutaciones germinales en BRCA1 confieren un riesgo elevado de desarrollar cáncer de mama y ovario a lo largo de la vida. En el cáncer de mama, los tumores asociados a mutaciones en BRCA1 suelen presentar fenotipos de alto grado histológico, elevada tasa proliferativa y características moleculares compatibles con el subtipo triple negativo, lo que condiciona un comportamiento clínico más agresivo²⁹.

Gen BRCA2

BRCA2, ubicado en 13q13.1, es un gen supresor tumoral clave para reparar el ADN por recombinación homóloga. A diferencia de BRCA1, actúa más directo al estabilizar y regular a RAD51, esencial para corregir rupturas de doble cadena²⁹.

Las mutaciones en BRCA2 elevan mucho el riesgo de cáncer de mama en mujeres y hombres. Suelen asociarse a tumores luminales con receptores hormonales, lo que los diferencia de los vinculados a BRCA1³⁰.

Firmas génicas y paneles multigénicos

Las firmas génicas y paneles multigénicos constituyen herramientas de diagnóstico molecular que analizan la expresión simultánea de múltiples genes asociados a proliferación, invasión, respuesta hormonal y riesgo de recurrencia en cáncer de mama. Su principal utilidad clínica radica en la estratificación pronóstica y en la toma de decisiones terapéuticas, especialmente en tumores hormonales en estadios tempranos³¹.

Oncotype DX (21 genes)

Oncotype DX es una firma génica que evalúa la expresión de 21 genes (16 genes relacionados con el cáncer y 5 genes de referencia) mediante RT-PCR en tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina. Está indicada principalmente en pacientes con cáncer de mama ER positivo, HER2 negativo y ganglios negativos o con afectación mínima, con el objetivo de estimar el riesgo de recurrencia a 10 años^{32,33}.

MammaPrint (70 genes)

MammaPrint es una firma génica basada en la evaluación de la expresión de 70 genes, diseñada para clasificar a pacientes con cáncer de mama temprano en grupos de alto o bajo riesgo de recurrencia, independientemente del estado de los receptores hormonales. Se aplica tanto en tumores con ganglios negativos como en aquellos con hasta tres ganglios positivos³⁴.

PAM50 / Prosigna (50 genes)

El panel PAM50, comercializado como Prosigna, analiza la expresión de 50 genes relacionados con proliferación, señalización hormonal y diferenciación celular. Su principal fortaleza es la clasificación intrínseca del cáncer de mama en subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, HER2 enriquecido y basal-like, además de proporcionar un puntaje de riesgo de recurrencia³⁵.

Existen otros marcadores moleculares emergentes que también contribuyen al diagnóstico del cancer de mama.

Técnicas de laboratorio para la determinación de marcadores moleculares

Inmunohistoquímica (IHC)

Es una técnica que permite ver si ciertas proteínas están presentes en un corte de tejido mediante anticuerpos marcados, conservando la arquitectura histológica. En cáncer de mama, la IHC es súper importante porque permite medir ER, PR, HER2, Ki-67 y p53, y con eso se define mejor el tipo de tumor y se guía el tratamiento³⁶.

La IHC tiene un plus enorme: está disponible en muchos sitios y no es tan cara. Pero también tiene su lado complicado: cambios en cómo se procesa la muestra, cómo se hace la técnica y cómo se interpreta (porque suele ser semicuantitativa) pueden terminar en diagnósticos distintos entre laboratorios³⁷.

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

La hibridación in situ fluorescente (FISH) es una técnica citogenética que utiliza sondas fluorescentes para detectar amplificación o delección génica directamente en el núcleo celular. En el cáncer de mama, FISH se emplea principalmente para confirmar la amplificación del gen ERBB2 (HER2) en casos con resultados equívocos por IHC³⁸.

FISH ofrece alta especificidad y reproducibilidad, siendo considerada el estándar de referencia para la evaluación del estado HER2. No obstante, su implementación está limitada por el costo, la necesidad de equipamiento especializado y personal altamente capacitado³⁹.

Secuenciación de nueva generación (NGS)

Comprende un conjunto de tecnologías que permiten analizar simultáneamente múltiples genes o regiones genómicas con alta sensibilidad y precisión. En el cáncer de mama, NGS se utiliza para identificar mutaciones en genes como BRCA1, BRCA2, TP53 y PIK3CA, facilitando el diagnóstico molecular, la evaluación del riesgo hereditario y la selección de terapias dirigidas⁴⁰.

A pesar de su alto valor diagnóstico, la NGS presenta limitaciones relacionadas con el costo, la complejidad bioinformática y la interpretación clínica de variantes de significado incierto, lo que representa un desafío para su implementación rutinaria en sistemas de salud con recursos limitados⁴¹.

Biopsia líquida

La biopsia líquida es una técnica mínimamente invasiva que permite detectar biomarcadores tumorales en fluidos biológicos, principalmente sangre periférica, mediante el análisis de ADN tumoral circulante (ctDNA), ARN y células tumorales circulantes. En el cáncer de mama, esta técnica ha emergido como una herramienta prometedora para el seguimiento de la enfermedad y la detección de resistencia terapéutica⁴².

Entre sus principales ventajas se encuentran la posibilidad de realizar evaluaciones seriadas y la reducción del riesgo asociado a procedimientos invasivos; sin embargo, su uso clínico

aún enfrenta limitaciones técnicas relacionadas con la sensibilidad analítica y la estandarización de los métodos⁴³.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica que multiplica fragmentos específicos de ADN millones de veces, incluso cuando se parte de poquísimos material genético. Su fundamento radica en la replicación in vitro del ADN mediante ciclos térmicos repetidos, lo que la convierte en una herramienta esencial para el análisis de marcadores moleculares en oncología⁴⁴.

En el cáncer de mama, la PCR se emplea para la detección y cuantificación de genes asociados a receptores hormonales, amplificación génica, mutaciones somáticas y susceptibilidad genética, constituyendo un método clave en el diagnóstico molecular y la investigación clínica⁴⁵.

Principios de la PCR

La PCR se fundamenta en ciclos repetidos que incluyen tres fases esenciales: desnaturalización, alineamiento (hibridación) y extensión, las cuales permiten la duplicación progresiva del fragmento de ADN de interés bajo condiciones controladas de temperatura⁴⁶.

Desnaturalización

La etapa de desnaturalización consiste en la separación de las dos cadenas complementarias de ADN mediante el aumento de la temperatura, generalmente entre 94 y 95 °C. Este proceso rompe los enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, permitiendo que cada hebra actúe como molde para la síntesis de nuevas cadenas⁴⁷.

Hibridación

Durante el alineamiento, la temperatura se reduce (50–65 °C) para permitir que los cebadores (primers) se unan de manera específica a las secuencias complementarias del ADN molde. La especificidad de esta etapa depende del diseño de los primers, siendo un factor crítico para evitar amplificaciones inespecíficas⁴⁷.

Extensión

En la fase de extensión, la ADN polimerasa termoestable (generalmente Taq polimerasa) sintetiza nuevas cadenas de ADN a partir de los primers, incorporando nucleótidos complementarios en dirección 5'→3'. Esta etapa ocurre usualmente a 72 °C y determina la eficiencia global de la amplificación⁴⁷.

Tipos de PCR utilizados en cáncer de mama

PCR convencional

La PCR convencional sirve para saber si un fragmento de ADN está o no está, y luego se ven los resultados corriendo los productos en un gel (electroforesis). En cáncer de mama, se utiliza principalmente en estudios exploratorios y de investigación para identificar genes asociados a susceptibilidad genética o alteraciones estructurales⁴⁸.

PCR en tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real (qPCR) permite la cuantificación relativa o absoluta del ADN amplificado mediante señales fluorescentes emitidas durante cada ciclo. En cáncer de mama, la qPCR se emplea ampliamente para evaluar niveles de expresión génica (ER, PR, HER2, Ki-67) y validar resultados obtenidos por otras técnicas moleculares. Esta técnica ofrece alta sensibilidad, rapidez y reproducibilidad, aunque su exactitud depende de una adecuada normalización y selección de genes de referencia⁴⁹.

PCR digital (ddPCR)

La PCR digital (ddPCR) es una variante avanzada que permite la cuantificación absoluta de copias de ADN mediante la partición de la muestra en miles de microreacciones independientes. Esta técnica ha demostrado alta precisión para la detección de mutaciones de baja frecuencia y análisis de ADN tumoral circulante en cáncer de mama⁵⁰.

Aplicación de la PCR en marcadores moleculares del cáncer de mama

Gen ESR1

El gen ESR1 codifica el receptor de estrógeno alfa (ER α), eje biológico central del cáncer de mama ER+ / luminal; en enfermedad avanzada, la presión de la terapia endocrina favorece clones con mutaciones activadoras en ESR1 que mantienen señalización estrogénica aun con deprivación hormonal, convirtiéndose en un marcador molecular clave de resistencia adquirida⁵¹.

En ESR1, la PCR se aplica de dos formas. En tejido, la RT-qPCR mide la expresión del mRNA y ayuda a definir el perfil hormonal del tumor. En sangre, la PCR digital detecta mutaciones en ctDNA con alta sensibilidad, es muy útil para vigilar la enfermedad y ajustar el tratamiento conforme evoluciona⁵².

Las mutaciones de ESR1 que más pesan en clínica suelen aparecer en el dominio de unión al ligando, como Y537S, Y537C, Y537N y D538G. En ctDNA se buscan con ddPCR porque detecta VAF muy bajas y permite ver cómo cambian los clones durante la terapia endocrina, con o sin inhibidores de CDK4/6⁵³.

PADA-1 demostró que seguir mutaciones de ESR1 en ctDNA con PCR puede cambiar decisiones a tiempo. Cuando aparecían, se probó cambiar temprano a fulvestrant más palbociclib, adelantándose a la progresión⁵⁴.

EMERALD confirmó que cuando en ctDNA aparece ESR1 mutado en pacientes ER+/HER2- metastásicas, elacestrant funciona mejor que la terapia endocrina estándar para frenar la progresión.⁵⁵

Primers reportados para la detección de mutaciones del gen ESR1 mediante PCR

Las mutaciones más relevantes de ESR1 se localizan en el dominio de unión al ligando, particularmente en los codones E380, Y537 y D538. Para su detección específica, Ahn et al. diseñaron ensayos de ddPCR empleando primers flanqueantes comunes y sondas alelo-específicas, que permiten discriminar entre alelos silvestres y mutados en una sola reacción. En dichos ensayos se utilizaron primers forward y reverse específicos para ESR1, junto con

sondas diferenciadas para las variantes E380Q, Y537S, Y537C, Y537N y D538G, optimizadas para ctDNA de cáncer de mama ER+ ⁶⁸.

Tabla 1. Primers y probes utilizados para la detección de mutaciones ESR1 mediante PCR.

Target	ddPCR primers/probes	Sequence (5'–3')
E380Q	Forward primer	TGCATTTGACCCCTCCATGATCAG
	Reverse primer	AGACGAGACCAATCATCAGGATCT
	WT probe	CCACCTTCTAGAATGTG
	Mutant probe	CCACCTTCTACAAATGTG
Y537S	Forward primer	GCATGAAGTGCAAGAACGTG
	Reverse primer	AAGTGCTTTGGTCGCTT
	WT probe	TCTATGACCTGCTGCTGGAGATGCT
	Mutant probe	TCTCTGACCTGCTGCTGGAGATGCT
Y537C	Forward primer	GCATGAAGTGCAAGAACGTG
	Reverse primer	AAGTGCTTTGGTCGCTT
	WT probe	TCTATGACCTGCTGCTGGAGATGCT
	Mutant probe	TCTGTGACCTGCTGCTGGAGATGCT
Y537N	Forward primer	GCATGAAGTGCAAGAACGTG
	Reverse primer	AAGTGCTTTGGTCGCTT
	WT probe	TCTATGACCTGCTGCTGGAGATGCT
	Mutant probe	TCAATGACCTGCTGCTGGAGATGCT
D538G	Forward primer	GCATGAAGTGCAAGAACGTG
	Reverse primer	AAGTGGCTTTGGTCCGTCT
	WT probe	TCTATGACCTGCTGCTGGAGATGCT
	Mutant probe	TCTATGGCCTGCTGCTGGAGATGCT

Fuente: Ahn SG, Bae SJ, Kim Y, et al. *NPJ Breast Cancer*. 2022;8:67 ⁶⁸.

Gen PGR

El gen PGR codifica el receptor de progesterona (PR), una proteína regulada directamente por la señalización estrogénica mediada por ESR1, por lo que su expresión se considera un indicador funcional de actividad hormonal intacta en el cáncer de mama. La presencia de PR se asocia con tumores luminales de mejor pronóstico y mayor sensibilidad a la terapia

endocrina, mientras que su pérdida puede reflejar desregulación del eje ER–PR y mayor agresividad tumoral⁶⁹.

Primers reportados para la detección de mutaciones del gen PGR mediante PCR

En los estudios de expresión génica del gen PGR mediante PCR en tiempo real, se emplean con frecuencia probes TaqMan®, especialmente en análisis multiplex que permiten la cuantificación simultánea de ESR1 y PGR para evaluar el eje hormonal en cáncer de mama. Estas sondas, marcadas con fluoróforos como FAM o VIC, mejoran la especificidad y reproducibilidad analítica al reducir la amplificación inespecífica. La mayoría de los estudios utilizan ensayos comerciales TaqMan®, cuyos primers y probes son de diseño propietario y están dirigidos a regiones conservadas del transcrito de PGR⁷⁰.

Tabla 2. Primers y probes utilizados para la detección de mutaciones PGR mediante PCR.

Gen	Secuencia	Tipo
PGR (qPCR)	Forward primer: 5'- ACTACGTGTGTGGCTGTGCT	Primer
PGR (qPCR)	Reverse primer: 5'- GCAGTTGGTGTCTGAGAAGC	Primer
PGR (qPCR)	Probe (TaqMan, FAM/BHQ1): 5'- FAM-ACGTCACAGGAGCAGCATCG	Probe
ACTB (control)	Forward primer: 5'- CGTGACATTAAGGAGAAGCTG	Primer
ACTB (control)	Reverse primer: 5'- CTAGAAGCATTGCGGTGGAC	Primer
ACTB (control)	Probe (VIC/BHQ2): 5'- VIC-CAGCCTTCGTTGCCGGTCCA-BHQ2	Probe
PGK1 (control)	Forward primer: 5'- CAAGCTGTTGAGGAGTTCCA	Primer
PGK1 (control)	Reverse primer: 5'- GTGGCATAGGACATGGTGAG	Primer
PGK1 (control)	Probe (Cy5/BHQ2): 5'- Cy5-TCTCGACGACGACTTCCTGAG-BHQ2	Probe

Fuente: Zhang W, Liu F, Chen H; Beijing Genetron Health Technology Co., Ltd. *Primer, probe, kit and detection method for detecting PGR gene expression*. Chinese patent CN112725444A, 2021 ⁷¹.

Gen MKI67

Además de inmunohistoquímica para la proteína Ki-67, se emplea **RT-qPCR** para cuantificar la expresión de **MKI67 mRNA** en tejido o muestras clínicas (por ejemplo, FFPE), como parte de perfiles moleculares que ayudan en la subtipificación del cáncer de mama. Ensayos como el comercial **MammaTyper®** incluyen MKI67 junto con ESR1, PGR y ERBB2 para determinar subtipos clínicamente relevantes⁷².

Primers reportados para la detección de mutaciones del gen MKI67 mediante PCR

Para la medición de expresión de MKI67 mediante PCR cuantitativa, existen primers validados comercialmente diseñados para amplificar regiones del transcrito humano de MKI67 (accesión NM_002417). Estos primers se emplean en ensayos de qPCR para evaluar niveles de mRNA relativos entre muestras, siendo útiles tanto en modelos investigativos como en estudios clínicos de proliferación tumoral⁷³.

Tabla 3. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen MKI67 en PCR cuantitativa (qPCR).

Gen	Tipo de oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
MKI67	Primer forward	GAAAGAGTGGCAACCTGCCTTC
MKI67	Primer reverse	GCACCAAGTTTTACTACATCTGCC

Fuente: OriGene Technologies. Ki67 (MKI67) Human qPCR Primer Pair (NM_002417) product datasheet. Disponible en: <https://cdn.origene.com/datasheet/hp206104.pdf>

Gen TP53

TP53 es el gen que produce p53, el famoso “guardián del genoma”: el que frena el ciclo celular, ayuda a reparar el ADN y, si toca, activa apoptosis. Cuando TP53 se muta algo súper común en muchos cánceres, incluido el de mama esa información suele relacionarse con cómo responde al tratamiento y con el pronóstico.⁷⁴.

La PCR se usa para mirar TP53 por dos vías: con PCR cuantitativa se estima su nivel de expresión, y con PCR digital se detectan mutaciones específicas que pueden “dañar” su función⁷⁴.

Primers reportados para la detección de mutaciones del gen TP53 mediante PCR

El análisis molecular del gen TP53 mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) requiere el uso de primers y sondas altamente específicas, debido a la elevada heterogeneidad genética de este gen y a la diversidad de mutaciones descritas en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. En este contexto, los ensayos de PCR

cuantitativa (qPCR) y PCR digital (ddPCR) han sido ampliamente empleados para evaluar tanto la expresión génica como la detección de mutaciones puntuales de TP53 en muestras de tejido tumoral y ADN tumoral circulante⁷³.

Tabla 4. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen TP53 en PCR

Gen	Tipo	Secuencia (5'→3')	Marca Fluoróforo /
TP53	Primer forward (qPCR)	CGACAGGGTCGAAAACGACA	—
TP53	Primer reverse (qPCR)	TCTCGGAACATCTCGAAGCG	—
TP53	Probe TaqMan (qPCR)	FAM-CGTGACCTGGTCCTCTGACTGCTGTTC-BHQ1	FAM/BHQ1
TP53 R175H	Primer forward (ddPCR)	GGCAGCTACGGTTTCCGGGTCA	—
TP53 R175H	Primer reverse (ddPCR)	CCTGCTTCTTGCAGGACAGTCAGG	—
TP53 R175H	Probe (wt)	HEX-CAGCGCTCATGGTGCAATCTGTCCC-BHQ1	HEX/BHQ1
TP53 R175H	Probe (mut)	FAM-CAGCGCTCATGGTGCAATCTGTCCA-BHQ1	FAM/BHQ1

Fuente: OriGene Technologies. p53 (TP53) Primer Pair humano qPCR (NM_000546) Disponible en: <https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp200518-p53-tp53-human-qpcr-primer-pair-nm-000546>

Gen BRCA1

Desde el punto de vista metodológico, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea en el análisis de BRCA1 tanto para la detección de mutaciones específicas como para la evaluación de expresión génica en estudios de investigación. En particular, la PCR en tiempo real (qPCR) y la PCR digital (ddPCR) permiten detectar variantes puntuales y

cuantificar copias génicas con alta sensibilidad, incluso en muestras con bajo contenido tumoral, como el ADN tumoral circulante (ctDNA)⁷⁵.

Primers reportados para la detección de mutaciones del gen BRCA1 mediante PCR

Para la detección dirigida de BRCA1 mediante PCR, diversos estudios y desarrollos técnicos han descrito primers y sondas específicas orientadas a regiones exónicas frecuentemente mutadas. Estos diseños se utilizan principalmente en ensayos de qPCR o ddPCR alelo-específicos, donde la combinación de primers flanqueantes y probes TaqMan marcadas con fluoróforos permite discriminar entre alelos normales y mutados con alta precisión analítica.

Tabla 5. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen BRCA1 en PCR

Gen	Tipo de oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Fluoróforo / Quencher
BRCA1	Primer forward	CCTGGGTAGTTGGTGATGGA	—
BRCA1	Primer reverse	AGGTTCTGAGGTGGTTGCTT	—
BRCA1	Probe TaqMan	FAM-TGCTGCTTTGCTGCTGCTGC-BHQ1	FAM / BHQ1
GAPDH	Primer forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	—
GAPDH	Primer reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC	—
GAPDH	Probe TaqMan	VIC-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-BHQ2	VIC / BHQ2

Fuente: Xiujuan W, Yanlin Z, Weitao D, Pingfeng Z. Primer, probe and kit for detecting BRCA1 gene expression. Chinese patent CN105420393A. 2015. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/CN105420393A/en>⁷⁶.

Gen BRCA2

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para el estudio de BRCA2 en contextos específicos, como la detección dirigida de mutaciones y la cuantificación génica,

especialmente cuando se requiere validar hallazgos obtenidos por secuenciación de nueva generación (NGS). Técnicas como la PCR en tiempo real (qPCR) y la PCR digital (ddPCR) permiten detectar variantes con alta sensibilidad, incluso en muestras con bajo contenido tumoral, como el ADN tumoral circulante⁷⁷.

Primers reportados para la detección de mutaciones del gen BRCA2 mediante PCR

Diversos desarrollos técnicos han descrito primers y sondas específicas para BRCA2 orientadas a regiones del gen con relevancia clínica, las cuales se utilizan en ensayos de qPCR o ddPCR alelo-específicos. Estos diseños combinan primers flanqueantes con probes TaqMan marcadas con fluoróforos, lo que permite discriminar de manera precisa entre alelos normales y variantes mutadas en estudios de investigación molecular⁷⁸.

Tabla 6. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen BRCA2 en PCR

Gen	Tipo de oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Fluoróforo / Quencher
BRCA2	Primer forward	GCTTTGGAAGGTTGCTTTGA	—
BRCA2	Primer reverse	TCTGGGCTCTGCTTCTTGAT	—
BRCA2	Probe TaqMan	FAM- AGCTCAGGTTGCTGCTGCTG- BHQ1	FAM / BHQ1
GAPDH	Primer forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	—
GAPDH	Primer reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC	—
GAPDH	Probe TaqMan	VIC- CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC- BHQ2	VIC / BHQ2

Fuente: Tu Zehua, Lin Qinghua, Weng Yingkang, Ya Jun, Ge Huijuan, Li Xuchao, Ruan Li, Zheng Limou. Primers, kit and method for detecting human BRCA1 and BRCA2 gene mutation. Chinese patent CN105586427B. 2016. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/CN105586427B/en>⁷⁹.

Gen PIK3CA

PIK3CA produce p110 α , la parte activa de PI3K. Esta enzima es clave en la ruta PI3K/AKT/mTOR, que empuja procesos como proliferación, supervivencia celular y metabolismo. En cáncer de mama, las mutaciones activadoras de PIK3CA son frecuentes, especialmente en tumores luminales ER+, y se asocian con resistencia a la terapia endocrina y con la selección de terapias dirigidas, como los inhibidores de PI3K⁸⁰.

Primers reportados para la detección de mutaciones del gen PIK3CA mediante PCR

En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para el estudio de PIK3CA principalmente en la detección dirigida de mutaciones hotspot, localizadas en los exones 9 (E542K, E545K) y 20 (H1047R, H1047L). Técnicas como la PCR en tiempo real (qPCR), la PCR alelo-específica y la PCR digital (ddPCR) permiten identificar estas variantes con alta sensibilidad en tejido tumoral y en ADN tumoral circulante (ctDNA)⁸¹.

Tabla 7. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen PIK3CA en PCR

Gen	Mutación / Región	Tipo de oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Fluoróforo / Quencher	Aplicación
PIK3CA	Exón 20 (H1047R)	Primer forward	TGCTTTTCTGTAAATCATC TGTGA	—	Amplificación específica exón 20
PIK3CA	Exón 20 (H1047R)	Primer reverse	CAGTGTGGAATCCAGAGT GAG	—	Amplificación específica exón 20
PIK3CA	H1047R	Probe WT	HEX- CTGAAATCATCTGTGAAT CCAGAG-BHQ1	HEX / BHQ1	Detección alelo silvestre
PIK3CA	H1047R	Probe Mut	FAM- CTGAAATCATCTGTAAAT CCAGAG-BHQ1	FAM / BHQ1	Detección alelo mutante
PIK3CA	Exón 9 (E545K)	Primer forward	TGAAAATGTATTTGCTTT GCTC	—	Amplificación exón 9

PIK3 CA	Exón 9 (E545 K)	Primer reverse	CATTTTAGCACTTACCTGT GACT	—	Amplifica ción exón 9
PIK3 CA	E545K	Probe Mut	FAM- AGCTGCTGAGTATGTGG- BHQ1	FAM / BHQ1	Detección alelo mutante

Fuente: Bio-Rad Laboratories, Inc. ddPCR™ Mutation Assay: PIK3CA WT for p.H1047R (c.3140A>G), Human. Hercules (CA): Bio-Rad; [citado 2026 Jan]. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/digital-assays/assay-detail/dHsaCP2000078>⁸².

Gen PTEN

PTEN es un gen supresor tumoral que produce una fosfatasa “freno”: baja la señal de la vía PI3K/AKT/mTOR al transformar PIP3 en PIP2. La pérdida de función de PTEN por deleciones, mutaciones o regulación epigenética está asociada con progresión tumoral, aumento de invasividad y resistencia a terapias dirigidas en diversos cánceres, incluido el cáncer de mama⁸³.

Primers reportados para la detección de mutaciones del gen PTEN mediante PCR

La PCR en tiempo real (qPCR) y técnicas como PCR digital (ddPCR) se utilizan para cuantificar expresión de PTEN mRNA y para detectar mutaciones puntuales o deleciones en el gen, respectivamente.

Tabla 8. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen PTEN en PCR

Gen	Tipo de oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Fluoróforo / Quencher	Aplicación
PTEN	Primer forward	GACAGCCATCATCAAAGAGATCAG	—	Amplificación de PTEN mRNA
PTEN	Primer reverse	TCCAGACTTTTGTAATTTGTGTGGA	—	Amplificación de PTEN mRNA
PTEN	Probe TaqMan	FAM- TTTGCTTAATGACTGGAACAGTGCC ACA-BHQ1	FAM / BHQ1	Detección específica de PTEN

GAPD H	Primer forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	—	Gen de referencia
GAPD H	Primer reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC	—	Gen de referencia
GAPD H	Probe TaqMan	VIC-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC- BHQ2	VIC / BHQ2	Normalizaci ón

Fuente: OriGene Technologies. PTEN Human qPCR Primer Pair (NM_000314) Disponible en: <https://cdn.origene.com/datasheet/hp200295.pdf>⁸⁴.

Gen AKT1

AKT1 produce una quinasa serina/treonina que es como un “centro de mando” en la vía PI3K/AKT/mTOR, influyendo en proliferación, supervivencia, metabolismo y migración celular. cáncer de mama, mutaciones activadoras de AKT1, especialmente la E17K (exón 2), generan activación constitutiva de la vía, contribuyendo a progresión tumoral y resistencia terapéutica, lo que convierte a AKT1 en un biomarcador molecular relevante y potencial diana terapéutica⁸⁵.

Primers reportados para la detección de mutaciones del gen AKT1 mediante PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza para el análisis de AKT1 principalmente en la detección dirigida de mutaciones hotspot, siendo la E17K la más estudiada en cáncer de mama. Técnicas como la PCR en tiempo real (qPCR), la PCR alelo-específica y la PCR digital (ddPCR) permiten identificar esta mutación con alta sensibilidad tanto en tejido tumoral como en ADN tumoral circulante (ctDNA)⁸⁶.

Tabla 9. Primers diseñados para cuantificación de la expresión del gen AKT1 en PCR

Gen	Región / Mutación	Tipo de oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Fluoróforo / Quencher	Aplicación
AKT1	Exón 2 (E17K)	Primer forward	GGTGC GTGGCTCTTCTTC TA	—	Amplificación región exón 2
AKT1	Exón 2 (E17K)	Primer reverse	AGGGTGCCAGGTTGTTC TTA	—	Amplificación región exón 2

AKT 1	E17K	Probe WT	HEX- CTGCCATCATCTTCTTCT GCTG-BHQ1	HEX / BHQ1	Detección alelo silvestre
AKT 1	E17K	Probe Mut	FAM- CTGCCATCATCTTCTTCT ACTG-BHQ1	FAM / BHQ1	Detección alelo mutante
ACT B	—	Primer forward	CGTGACATTAAGGAGAA GCTG	—	Gen de referencia
ACT B	—	Primer reverse	CTAGAAGCATTGCGGT GGAC	—	Gen de referencia

Fuente: OriGene Technologies. AKT1 Human qPCR Primer Pair (NM_005163). Disponible en: <https://cdn.origene.com/datasheet/hp230218.pdf>.

Glándula mamaria

La glándula mamaria es una glándula exocrina cutánea altamente dinámica, cuyo desarrollo y arquitectura cambian por ciclos (pubertad–embarazo–lactancia–involución). Su unidad funcional se organiza en un sistema ducto-lobulillar capaz de diferenciarse hacia estructuras secretoras (alvéolos) cuando el entorno hormonal lo exige. Funcionalmente, su objetivo biológico central es producir y secretar leche para la nutrición neonatal, lo que implica no solo síntesis de componentes (proteínas, lípidos, lactosa, inmunofactores) sino también un diseño anatómico para almacenarla y expulsarla de manera eficiente a través de un árbol ductal que converge hacia el pezón⁵⁶.

En reposo, la glándula mamaria mantiene un parénquima relativamente estable con cambios cíclicos; durante gestación y lactancia, se activa con expansión epitelial y remodelación estromal mediadas por señalización endocrina.

Función biológica de la glándula mamaria

Función secretora

La secreción láctea se sostiene sobre la diferenciación del epitelio luminal secretor en acinos/alvéolos y el soporte contráctil de células mioepiteliales; este binomio “produce + moviliza”, permitiendo que el producto secretado transite desde la unidad ducto-lobulillar terminal hacia ductos mayores. La arquitectura tridimensional del sistema ductal, incluida la

unidad terminal ducto-lobulillar TDLU, define rutas de drenaje y zonas de proliferación, por lo que su estudio en 3D es clave para comprender la predisposición a enfermedad^{56 57}.

Regulación hormonal

La maduración y la actividad secretora dependen de una orquesta hormonal: estrógenos y progesterona impulsan crecimiento y ramificación; prolactina favorece diferenciación secretora y mantenimiento de la lactancia; y la oxitocina es clave para el reflejo de eyección al contraer el compartimento mioepitelial. La prolactina es esencial para la lactancia, porque actúa directamente sobre los receptores del tejido mamario. Cuando se desregula, ya sea por alteraciones en la hipófisis u otras causas, puede disminuir la producción de leche⁵⁶.

La oxitocina permite la contracción de las células mioepiteliales y permite que la leche fluya. El complejo pezón areola es una parte clave del reflejo de la lactancia.

Ubicación anatómica

La glándula mamaria es un órgano par situado en la pared torácica anterior, que se extiende aproximadamente desde la segunda hasta la sexta costilla y desde el borde lateral del esternón hasta la línea axilar media. Puede presentar una prolongación superolateral hacia la axila, conocida como cola de Spence, la cual tiene relevancia clínica y quirúrgica debido a su implicación en procesos patológicos y en la evaluación por imágenes⁵⁷.

Anatomía macroscópica de la glándula mamaria

Desde el punto de vista macroscópico, la mama está constituida por tejido glandular, tejido adiposo y tejido conectivo. La proporción de estos componentes varía según la edad, el estado hormonal y la historia reproductiva, influyendo directamente en la densidad mamaria y en la interpretación de estudios diagnósticos como la mamografía.

Tejido glandular

Se organiza en lóbulos dispuestos de forma radial alrededor del pezón. Cada lóbulo está constituido por múltiples lobulillos que drenan su contenido hacia un sistema de conductos lactíferos⁵⁶. Esta disposición explica patrones de diseminación de lesiones mamarias y es un aspecto clave en la planificación quirúrgica y el análisis macroscópico del tejido mamario.

Tejido conectivo y ligamentos de Cooper

Estas estructuras fibrosas que fijan la glándula a la piel y a la fascia profunda del músculo pectoral mayor. La alteración de estos ligamentos puede manifestarse clínicamente como retracción cutánea, un signo relevante en la evaluación del cáncer de mama^{56 57}.

Tejido adiposo mamario

Ocupa los espacios interlobulares y constituye el principal determinante del volumen mamario en mujeres no gestantes. Además de su función estructural, este tejido actúa como un microambiente metabólicamente activo, secretando adipocinas que influyen en la biología del epitelio glandular y en procesos patológicos⁵⁷.

Anatomía histológica de la glándula mamaria

Desde el punto de vista microscópico, la glándula mamaria está constituida por un parénquima glandular inmerso en un estroma fibro-adiposo. El parénquima se organiza en unidades ducto-lobulillares terminales (TDLU), consideradas la unidad funcional y estructural básica de la mama, donde ocurren la mayoría de los procesos fisiológicos y patológicos⁵⁶.

Unidades ducto-lobulillares terminales (TDLU)

Las TDLU están formadas por pequeños conductos terminales y lobulillos que contienen acinos secretorios. Estas estructuras presentan una alta tasa de recambio celular y sensibilidad hormonal, lo que explica por qué son el principal sitio de origen de lesiones precursoras y del carcinoma mamario invasivo⁵⁷.

Epitelio ductal y lobulillar

El epitelio mamario está compuesto por dos capas celulares bien definidas: una capa luminal interna con función secretora y una capa basal de células mioepiteliales. Esta organización bicapa es fundamental para mantener la arquitectura normal de la glándula y su pérdida es un criterio histopatológico clave en la diferenciación entre lesiones benignas e invasivas⁵⁸.

Células mioepiteliales

Las células mioepiteliales rodean los conductos y acinos, poseen características contráctiles y cumplen un rol esencial en la eyección de la leche. Además, actúan como barrera física y biológica frente a la invasión tumoral, siendo su ausencia o discontinuidad un marcador histológico de malignidad⁵⁹.

Estroma mamario

El estroma mamario está compuesto por tejido conectivo laxo y denso, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y células inmunes. Este microambiente no es pasivo: participa activamente en la señalización celular, la respuesta inflamatoria y la progresión tumoral, modulando la conducta biológica del epitelio mamario⁶⁰.

Cáncer de mama

El cáncer de mama se define como una neoplasia maligna originada por la proliferación clonal descontrolada de células del epitelio mamario, caracterizada por capacidad de invasión local y potencial de diseminación metastásica. Este comportamiento se asocia a alteraciones moleculares que confieren ventajas proliferativas, evasión de la apoptosis y capacidad de invasión tisular⁶¹.

Desde el punto de vista oncológico, una neoplasia maligna se distingue de lesiones benignas por su crecimiento infiltrativo, inestabilidad genómica y capacidad de inducir angiogénesis. En el cáncer de mama, estas características se manifiestan mediante alteraciones estructurales y funcionales del tejido glandular normal, particularmente a nivel de las unidades ducto-lobulillares terminales⁶².

Origen celular

El cáncer de mama se origina principalmente a partir de células epiteliales luminales o basales localizadas en las unidades ducto-lobulillares terminales (TDLU). Estas células poseen alta sensibilidad hormonal y capacidad proliferativa, lo que las convierte en un blanco frecuente de transformaciones malignas cuando se acumulan alteraciones genéticas y epigenéticas⁶³.

La evidencia actual indica que distintos subtipos moleculares de cáncer de mama pueden derivar de poblaciones celulares específicas del epitelio mamario, lo que explica la heterogeneidad biológica y clínica de la enfermedad. Esta diversidad celular es clave para comprender la expresión diferencial de biomarcadores utilizados en el diagnóstico molecular⁶³.

Etiopatogenia del cáncer de mama

Alteraciones genéticas

El origen del cáncer de mama está muy ligado a cambios genéticos, tanto adquiridos como heredados, que afectan genes encargados de controlar el ciclo celular, reparar el ADN y activar la apoptosis. Entre las mutaciones más estudiadas se encuentran las que involucran a los genes BRCA1, BRCA2, TP53 y PIK3CA, las cuales incrementan el riesgo de transformación maligna del epitelio mamario⁶⁴.

Estas alteraciones genéticas inducen inestabilidad genómica y acumulación de mutaciones, fundamento para el uso de marcadores moleculares en el diagnóstico y estratificación del cáncer de mama⁶⁴.

Alteraciones epigenéticas

Además de las mutaciones genéticas, el cáncer de mama presenta alteraciones epigenéticas que modifican la expresión génica sin cambiar la secuencia del ADN. Entre estas se incluyen la hipermetilación de promotores génicos, modificaciones de histonas y regulación aberrante por microARN, las cuales contribuyen al silenciamiento de genes supresores tumorales⁶⁵.

Desempeñan un papel crucial en las etapas tempranas de la carcinogénesis mamaria y son potencialmente reversibles, lo que las convierte en blancos atractivos para investigación diagnóstica y terapéutica⁶⁵.

Influencia hormonal

Constituye un factor central en la etiopatogenia del cáncer de mama, dado que los estrógenos y la progesterona regulan la proliferación y diferenciación del epitelio mamario. Cuando

estas hormonas se mantienen elevadas o fuera de control por mucho tiempo, el riesgo de que aparezcan cambios tumorales aumenta⁶⁶.

A nivel molecular, los estrógenos pueden inducir daño genómico directo y promover la proliferación celular mediante la activación de receptores hormonales, lo que favorece la acumulación de errores replicativos. Esta interacción hormona–genoma explica la utilidad clínica de biomarcadores hormonales en la clasificación y manejo del cáncer de mama⁶⁷.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

Tipo de investigación

Según el enfoque: cualitativo, debido a que se basó en la interpretación de información de distintas fuentes bibliográficas acerca de los marcadores moleculares asociados al cáncer de mama, y su descripción analítica.

Según el nivel: la presente investigación fue de nivel descriptivo, porque se fundamentó en la literatura de diversos estudios que han sido publicados en diferentes sitios digitales para destacar las características más relevantes de los marcadores objeto de estudio.

Diseño de investigación: para la búsqueda de información se aplicó un diseño documental no experimental, ya que se recopiló y analizó información de fuentes secundarias, como artículos científicos, estudios de caso y revisiones sistemáticas, tomando en cuenta que no se manipularon las variables, sino que fueron observadas tal como se presentaron.

Según la secuencia temporal: de corte transversal, debido a que se trabajó en un periodo de tiempo determinado, es decir, en un solo momento y con un bloque único de resultados siendo desde el año 2015 al 2025 la información revisada.

Según la cronología de los hechos: retrospectivo, ya que se analizaron datos previamente publicados relacionados con los marcadores moleculares para la ayuda diagnóstica asociada al cáncer de mama.

Técnicas de recolección de datos

Población y muestra

Población

La población estuvo constituida por 70 artículos científicos relacionados con marcadores moleculares para detección de cáncer de mama, identificados mediante la aplicación de operadores booleanos (marcadores moleculares, cáncer de mama, diagnóstico) así como palabras clave afines. Estos estudios incluyeron investigaciones realizadas en poblaciones femeninas con diferentes edades y estadios de la enfermedad disponibles en base de datos

como: Medigraphic, SciELO, SEMERGEN, Elsevier, Google Académico, ProQuest, Portales médicos, BMJ Journals, Crónicas Científicas, PubMed, Scopus, SEIMC, Análisis Clínicos.

Muestra

A partir de la población total se aplicaron criterios de inclusión y exclusión para obtener la muestra de estudio, por ello se seleccionaron 43 publicaciones luego de aplicar criterios de inclusión y exclusión, los cuales daban salida a los objetivos planteados tomadas de diferentes bases de datos e información publicada en los repositorios de la OMS, OPS y MSP.

Criterios de inclusión

- Publicación en revistas científicas indexadas durante los últimos 10 años.
- Estudios que incluyan análisis de marcadores moleculares relevantes para la ayuda diagnóstica del cáncer de mama.
- Idiomas: español e inglés.
- Acceso a texto completo y validez científica comprobada.

Criterios de exclusión

- Artículos que contengan información incompleta acerca de los marcadores moleculares para la determinación de cáncer de mama.
- Se excluyen documentos que no poseen relevancia significativa con información acerca de investigaciones recientes.
- Información obtenida de libros obsoletos que no compartan criterios con artículos actuales.

Método de análisis

Se llevó a cabo un análisis y síntesis de la información obtenida de las distintas bases de datos científicas, como artículos, manuales y sitios web de organizaciones nacionales e internacionales vinculadas a la temática de investigación, utilizando el enfoque del método teórico.

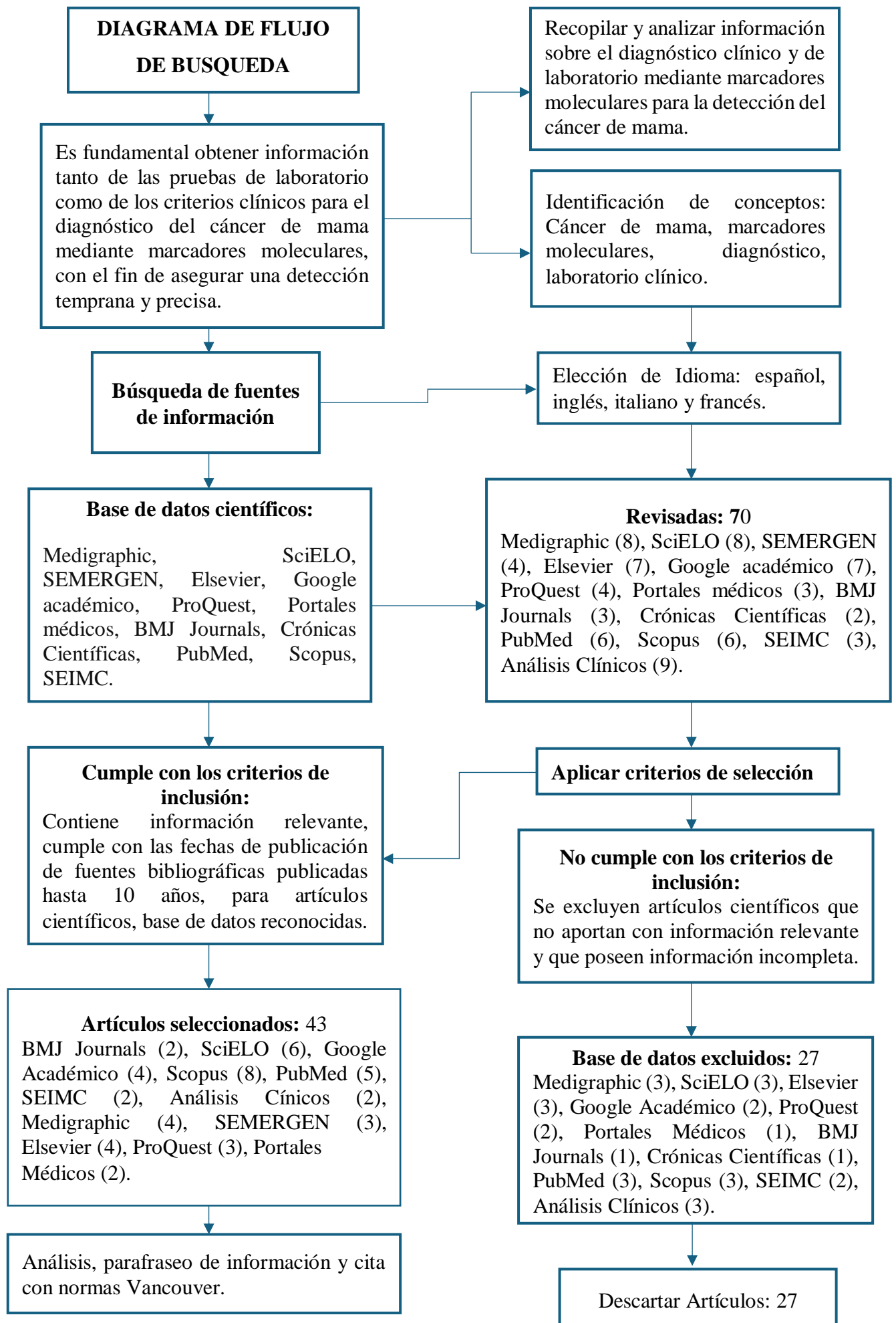
Procesamiento de datos

La técnica que se utilizó fue la observación, mientras que el procedimiento fue la revisión de las diversas bases de datos de información bibliográfica, para la recolección y tratamiento de la información descriptivamente.

Consideraciones éticas

Por ser un proyecto de revisión bibliográfica no requirió de un comité de ética debido a que no se manipularon muestras biológicas ni se trabajó con seres humanos, animales ni plantas, respetando las normas éticas de la investigación científica además que los resultados no fueron empleados con fines maleficentes.

En el siguiente diagrama de flujo se detalla el proceso llevado a cabo para la búsqueda bibliográfica y la selección de los artículos más relevantes.



CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación busca analizar los marcadores moleculares para la detección de cáncer de mama, se presentan los resultados revisados de los artículos publicados por diferentes autores en la cual se recabó información pertinente al tema. Los datos se organizaron en tablas, acorde a cada objetivo planteado, que facilite la lectura clara y ordenada para su mejor comprensión que permita tener conclusiones precisas.

En primera instancia se describe los principales marcadores moleculares relacionados con el cáncer de mama para proporcionar una base teórica sólida que facilite su comprensión en la aplicación en la práctica clínica que sirve de apoyo al médico en el manejo de pacientes que padecen esta enfermedad, tal como se refleja en la tabla 10.

Tabla 10. Principales marcadores moleculares utilizados para la detección de cáncer de mama.

Marcadores más utilizados	Descripción	Tipo de muestra	Población y muestra (n)	Autor/año
PIK3CA (exones 9 y 20)	Mutación somática	Plasma (ctDNA)	Pacientes con cáncer de mama no metastásico sometidas a cirugía curativa; n = 62	Hassan et al. 2024
ESR1	Mutación en ctDNA	Plasma (ctDNA)	Pacientes con cáncer de mama metastásico ER+/HER2-; 161 muestras de plasma analizadas	Maloberti et al. 2025
TEVs (vesículas extracelulares derivadas de tumor), enriquecidas con CD63 y EpCAM	Expresión	Sangre/Plasma: cfDNA de plasma	512 pacientes con cáncer de mama + 198 no neoplásicos	Xu et al., 2024
TP53, BRCA1, BRCA2	Mutación	Sangre/Plasma: cfDNA de plasma	95 pacientes con cáncer de mama primario (incluye TNBC en el enfoque del paper)	Arimura et al., 2024
21-gene recurrence score (Oncotype DX)	Firma génica	Tejido: bloques FFPE de tumor mamario	5083 mujeres randomizadas; 5018 incluidas en el análisis (participaron)	Kalinsky et al. 2021
Prosigna / PAM50: ROR score	Firma génica / expresión	Tejido: bloques FFPE de tumor mamario	n=1140 (análisis conjunto MA.5 + DBCG 89D)	Jensen et al. 2025
Breast Cancer Index (BCI) y BCIN+	Firma génica	Tejido: bloques FFPE de tumor mamario	n=4,086 Mujeres posmenopáusicas	Bartlett et al. 2024

EndoPredict y EPclin	Firma génica de expresión	Tejido: bloques FFPE de tumor mamario	Tamizaje: 4,059; aleatorizadas: 2,045 a anastrozol + placebo vs anastrozol + everolimus	Penault-Llorca et al. 2024
MammaPrint (70 genes) y Blueprint (80 genes)	Firmas génicas de expresión	Tejido FFPE (RNA extraído de FFPE)	Enroladas 9,464 (estadio I-III); pasaron QC 7,819	Lian et al. 2025
PTEN	Expresión proteica	Tejido: bloques FFPE de tumor mamario	n=96 con muestras pretratamiento y postratamiento	Chen et al. 2023
Oncotype DX; Ki67; p53; HER2	Firma génica; Expresión proteica (IHC): RE, RP, Ki67, HER2, p53	Tejido: muestra tumoral obtenida por biopsia / resección	70 pacientes con cáncer de mama RE+ y HER2-	Sunén et al. 2021
HR+/HER2- (ER+ / HER2-) metastásico.	Mutación	Sangre/Plasma: cfDNA de plasma	Pacientes: 109 mujeres con cáncer de mama metastásico HR+/HER2-	Corné et al. 2023
PD-L1 (CD274); CD8; CD20	Expresión proteica: PD-L1, CD8, CD20 (FC, IHC, IF)	Sangre: EDTA; separación de linfocitos (Ficoll); PBMCs	Pacientes: 50 mujeres egipcias recién diagnosticadas con cáncer de mama; Controles: 30 mujeres sanas	Hamed et al. 2022
Panel inmune (CD45, CD3, CD4, CD8, PD-1; NK; B; DC/APC, etc.)	Expresión proteica	Tejido: bloques FFPE de tumor mamario	Seleccionados: 43 pacientes con cáncer de mama (Luminal A y TNBC)	Heger et al. 2024
OncotypeDX Recurrence Score (21 genes); MammaPrint (70 genes)	Firma génica	Tejido: bloques FFPE de tumor mamario	Cohorte OncotypeDX: n = 2219 (pacientes con NA+); Cohorte MammaPrint: n = 345 (pacientes con NA+).	Freeman et al. 2023

Análisis y discusión

La tabla integra los biomarcadores clave bajo una lógica clínica sólida: riesgo hereditario (BRCA1/2, PALB2, CHEK2), caracterización tumoral en tejido (ER/PR, Ki-67, HER2, TRPS1, PTEN, AR, PD-L1) y biomarcadores circulantes/epigenéticos (ctDNA/cfDNA con ESR1, PIK3CA, TP53; metilación; miRNAs; TEVs). Esta organización evidencia que la detección y la valoración molecular no dependen de un solo marcador, sino de un conjunto que responde a preguntas distintas: estratificación del subtipo, selección terapéutica, pronóstico y vigilancia de progresión o resistencia.

La presencia de firmas multigénicas (Oncotype DX, Prosigna/PAM50, BCI, EndoPredict, MammaPrint/Blueprint) ponen al laboratorio en el centro de la decisión clínica, porque transforman la expresión génica en riesgo y posible beneficio del tratamiento. Y cada vez se usan más enfoques menos invasivos: la biopsia líquida se suma al FFPE para captar la heterogeneidad y los cambios del tumor en el tiempo, sin reemplazar la base histopatológica.

En predisposición hereditaria, los genes BRCA1 y BRCA2 son mutaciones germinales de alto impacto que guían el consejo genético, la prevención y la vigilancia. El PALB2 es un gen clave dentro del riesgo hereditario, ampliando el panel más allá de BRCA, el CHEK2 es un gen de susceptibilidad útil en clínica para estimar el riesgo y guiar el manejo familiar, con ello sustentan que los paneles germinales son necesarios cuando se quiere precisar el riesgo y la herencia tumoral.

En caracterización tisular el Ki 67 muestra qué tan rápido se está multiplicando el tumor y sirve para estratificar y apoyar el pronóstico, especialmente en tumores con receptores hormonales, cuando se interpreta junto con ER y PR para definir subtipos luminales. El eje HER2 se aborda desde dos perspectivas complementarias. Integran ERBB2 o HER2 como marcador clave de amplificación y de selección de terapia anti HER2, mientras que el HER2 es valorado como un determinante en fenotipo tumoral y conducta terapéutica. La convergencia entre inmunohistoquímica y medición de transcritos se observa mediante un panel de expresión que incluye ESR1, PGR, ERBB2 y MKI67, aportando soporte analítico cuando se requiere estandarización de expresión y correlación con el fenotipo tumoral.

En rutas de señalización tumoral, Chen et al (2023)⁸⁷ incluyen PTEN como marcador relevante en regulación de crecimiento y supervivencia celular, con implicación para comprender biología tumoral y potenciales resistencias asociadas a vías PI3K AKT.

En biopsia líquida, el ctDNA permite detectar variantes y seguir la enfermedad en tiempo real. Hassan et al (2024)⁸⁸ identificaron PIK3CA en exones 9 y 20 en plasma de pacientes no metastásicas operadas, mostrando señal tumoral circulante en fases tempranas. Corné et al (2023)⁵ confirman que la presión terapéutica en HR+ HER2– metastásico genera cambios detectables para monitoreo. Arimura et al (2024)⁸⁹ amplían el panel con TP53, BRCA1 y BRCA2 en cfDNA, con posible valor pronóstico.

En epigenética circulante el WNT1 hipermetilado en cfDNA como firma de detección, mostrando que la metilación ayuda cuando la señal mutacional circulante es baja y se busca más sensibilidad. La presencia de metilación del promotor de BRCA1 amplía el valor de epigenética en cáncer de mama, especialmente como complemento a mutaciones, dado que el silenciamiento génico puede reflejar mecanismos de progresión y comportamiento tumoral.

En biomarcadores circulantes no genómicos, Xu et al (2024)⁹⁰ incluyen vesículas extracelulares derivadas de tumor enriquecidas con CD63 y EpCAM, aportando evidencia de que la señal tumoral puede recuperarse mediante fracciones extracelulares con marcadores de superficie, útil para detección y potencial monitoreo. Hamed et al (2022)⁹¹ analizan PD L1 CD274 junto con CD8 y CD20 para valorar infiltrado citotóxico y componente. Heger et al (2024)⁹² proponen un panel amplio con CD45, CD3, CD4, CD8 y PD 1 más marcadores de inmunidad innata y células presentadoras para caracterizar el microambiente y asociarlo con respuesta y pronóstico.

Las firmas multigénicas ayudan a predecir recurrencia y a guiar el tratamiento, especialmente en tumores con receptores hormonales. Kalinsky et al (2021)⁹³ incluyen el puntaje de recurrencia de 21 genes Oncotype DX como soporte de decisión en cohortes clínicas, mientras Sunén et al (2021)⁹⁴ integran Oncotype DX con Ki 67, p53 y HER2, articulando biomarcadores clásicos con firmas genómicas para fortalecer estratificación. Jensen et al (2025)⁹⁵ aportan Prosigna basado en PAM50 con cálculo de ROR score,

orientado a riesgo de recurrencia y subtipificación intrínseca. Bartlett et al (2024)⁹⁶ destacan Breast Cancer Index y BCIN plus para afinar pronóstico y decisiones en tratamiento prolongado. Penault Llorca et al (2024) usan EndoPredict y EPclin al combinar firma genómica y datos clínicos para predecir recurrencia. Lian et al (2025)⁹⁷ incluyen MammaPrint 70 genes y Blueprint 80 genes para clasificación y pronóstico con impacto clínico. Freeman et al 2023⁹⁸ refuerzan el uso de OncotypeDX y MammaPrint como métodos ampliamente aplicados en práctica, consolidando el rol de firmas multigénicas en la medicina personalizada.

Los diferentes autores permiten hacer notar que los marcadores de mayor utilidad son los que hacen uso de técnicas inmunohistoquímicas entre otras, tal como se expone en la tabla 11.

Tabla 11. Utilidad de las pruebas de laboratorio empleadas dentro del área de biología molecular para la valoración de los marcadores moleculares en el diagnóstico del cáncer de mama.

Técnica	Utilidad	Tipo de muestra más usada	Marcador típico	Autores
IHC (Inmunohistoquímica)	Detección/estratificación: estado de receptores y biomarcadores proteicos (HER2, ER/PR, Ki-67) y evaluación inmune/predictiva (PD-L1). También como subrogado (p53 ↔ TP53).	Tejido (FFPE) (principal); algunos incluyen sangre/suero como complemento	HER2, ER/PR, Ki-67, p53, PD-L1/CD8/CD20	Sunén et al., 2021; Hamed et al., 2022
RT-qPCR (miRNA)	Diagnóstico por panel sérico de miRNAs.	Suero	miR-497-5p (panel 8-miRNA)	Zou et al., 2022
qRT-PCR (exomiRNA)	Diagnóstico/pronóstico (p. ej., TNBC) mediante miRNA en exosomas.	Exosomas (medio condicionado)	miR-1180	Choudhary et al., 2025
RT-PCR / PCR (dirigida)	Detección dirigida de mutaciones y soporte de pruebas basadas en PCR (según estudio).	Tejido (FFPE) (principal); algunos incluyen sangre/suero como complemento	PIK3CA; (según matriz también se reporta soporte en firmas/RT-PCR)	Sunén et al., 2021
NGS (panel BRCA1/2)	Diagnóstico genético germinal (variantes patogénicas).	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	BRCA1/2	Doraczynska-Kowalik et al., 2022
NGS + MLPA (germinal)	Detección germinal de susceptibilidad (confirmación/duplicaciones-delecciones).	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	BRCA1	Pramanik et al., 2024
Targeted NGS panel + MLPA	Predisposición germinal en panel multigénico (según estudio).	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	TP53 R337H	Guindalini et al., 2022

WGS-based tumour-informed ctDNA sequencing (MRD)	Enfermedad mínima residual (MRD) / recidiva post-tratamiento por ctDNA.	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	ctDNA (MRD)	Garcia-Murillas et al. 2022
cfDNA shallow WGS fragmentomics (sWGS)	Detección temprana por CNV/fragmentómica en cfDNA.	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	CNV	Yang et al. 2021
dPCR (PCR digital; drop-off / multiplex)	Monitorización dirigida/multiplex (resistencia/seguimiento) en cfDNA; incluye desempeño analítico (p. ej., LOB95%).	Plasma (cfDNA) ± tejido comparativo	Hotspots PIK3CA / ESR1	Corné et al., 2023
Chip-based digital PCR (dPCR)	Detección de amplificación (p. ej., HER2) en ctDNA vs IHC/FISH.	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	HER2	Xie et al. 2023
Crystal Digital PCR®	Seguimiento de mutaciones en biopsia líquida.	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	ESR1	Smilkou et al., 2024
Methylation-specific PCR (MSP)	Detección temprana basada en metilación específica.	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	RASSF1A	Yazici et al., 2009
SPOT-MAS	Tamizaje/detección temprana por metilación global en cfDNA.	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	GWM (genome-wide methylation)	Pham et al., 2023
TELQAS	Recurrencia/metástasis con panel metilado tumor-agnostic.	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	MDMs (panel 16)	Giridhar et al., 2026
cfMeDIP-seq	Evaluación de respuesta a NACT (pCR vs RD) por metilación.	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	DMRs	Ravera et al., 2024
Citometría de flujo	Inmunofenotipado/estratificación: firmas NK/DC, marcadores de superficie (incl. EV) y perfiles por subtipo.	Exudado/fluido y/o sangre + tejido fresco	CD29/CD146; paneles inmunes (CD's, HLA-DR, etc.)	Ekström et al., 2022; Hamed et al., 2022; Heger et al., 2024
Proteomics (MS)	Biomarcadores proteicos en EV para diferenciar benigno/TNBC.	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	Histone H2A	Tamarindo et al., 2025
ScreenCell + inmunocitoquímica	Aislamiento y caracterización de CTCs (biomarcadores).	Sangre/Plasma (cfDNA/ctDNA)	MARCKSL1	Mehtar et al., 2025

Multigene assay (Oncotype DX / MammaPrint)	Estratificación pronóstica/predictiva (riesgo/score; decisión terapéutica).	Tejido (FFPE/biopsia)	Oncotype DX, MammaPrint	Sunén et al., 2021; Freeman et al., 2023
Prosigna (PAM50)	Pronóstico y riesgo de recurrencia (ROR).	Tejido (biopsia/FFPE)	PAM50	Brufsky et al., 2025
EndoPredict (EPclin)	Riesgo de recurrencia a distancia (HR+/HER2-).	Tejido (biopsia/FFPE)	EPclin	Penault-Llorca et al., 2024
MammaPrint (70 genes)	Pronóstico y beneficio de quimioterapia.	Tejido (biopsia/FFPE)	MPI	Brufsky et al., 2025
GeoMx DSP	Perfil inmune espacial para estimar beneficio terapéutico (p. ej., antraciclina).	Tejido (biopsia/FFPE)	HLA-DR	Shenasa et al., 2025

Análisis y Discusión

La tabla muestra que el diagnóstico se arma según la pregunta clínica, la muestra y el nivel de detalle que se necesita. IHC suele ser la primera elección porque en FFPE define subtipos y marcadores predictivos con aplicación inmediata. RT qPCR y qPCR sirven para cuantificar y validar expresión génica, pero dependen mucho del control preanalítico y de la estandarización del FFPE. NGS aporta una visión amplia para medicina de precisión y paneles multigénicos, aunque exige más infraestructura, bioinformática y tiempo. ddPCR y dPCR destacan en biopsia líquida por su alta sensibilidad, sobre todo para variantes puntuales, baja carga tumoral y seguimiento de resistencia.

Las técnicas complementarias como metilación, proteómica en vesículas extracelulares, CTCs y plataformas espaciales apuntan a una caracterización más completa del tumor y del microambiente, más allá de lo genético.

En la caracterización tisular, la inmunohistoquímica se mantiene como pilar para estratificación por receptores y biomarcadores proteicos, con evaluación de HER2, ER, PR, Ki 67 y componentes inmunes como PD L1 y subpoblaciones CD8 y CD20. Este bloque se alinea con el uso de tejido FFPE como matriz principal y sostiene la utilidad como subrogado

de alteraciones genéticas cuando se interpreta p53 como aproximación funcional de TP53. En esta línea se integran a Sunén et al (2021)⁹⁴ y Hamed et al (2022)⁹¹ como referencias que consolidan el rol de IHC en clasificación y toma de decisiones. qPCR y RT qPCR en mRNA permiten cuantificar la expresión de ESR1, PGR, ERBB2 y MKI67, y apoyar estandarización y validación con referencias.

En biomarcadores circulantes, la RT qPCR de microARN y exomiRNA amplía el análisis en suero y plasma mediante paneles, como el que incluye miR 497 5p en Zou et al (2022) y los exomiRNA en Choudhary et al (2025)⁹⁹ útil cuando la señal se refleja más en perfiles regulatorios que en DNA.

En genómica tumoral, la PCR dirigida y la RT PCR se orientan a detección específica de variantes o blancos concretos con alta factibilidad analítica. La secuenciación de nueva generación se posiciona como estrategia integral para perfiles de mutación, paneles dirigidos y detección de genes de predisposición, con Guindalini et al (2022)¹⁰⁰ para NGS en contexto de paneles, Yazici et al (2009)¹⁰¹ para panel BRCA1 y BRCA2, y Yang et al (2021)¹⁰² para integración de NGS con MLPA en análisis germinal. En esta misma lógica de cobertura, se incluyen aproximaciones combinadas de panel NGS dirigido con MLPA para maximizar rendimiento en variantes puntuales y reordenamientos, con Ravera et al (2024)¹⁰³ como referencia adicional de implementación.

En seguimiento de enfermedad residual mínima y vigilancia longitudinal, el esquema incorpora secuenciación tumoral informada por tumor basada en genoma completo aplicada a ctDNA para MRD, donde se prioriza sensibilidad y especificidad mediante selección personalizada de variantes. Este bloque se asocia a Giridhar et al (2026)¹⁰⁴ como evidencia de aplicación clínica. Como complemento de señal global circulante, el análisis de fragmentómica mediante shallow WGS en cfDNA integra patrones de fragmentación y carga tumoral aproximada con potencial utilidad en detección y monitoreo, con Smilkou et al (2024)¹⁰⁵ como referencia.

En detección ultrasensible de variantes, ddPCR y múltiples variantes de PCR digital se presentan como técnicas orientadas a mutaciones puntuales y cuantificación precisa en matrices circulantes. Se incluyen ddPCR y dPCR en modalidades multiplex, drop off y chip

based, además de plataformas específicas como Crystal Digital PCR. Este bloque se asocia a Pham et al (2023)¹⁰⁶ para ddPCR, Pramanik et al (2024)¹⁰⁷ para dPCR en esquemas avanzados, Mehtar et al (2025)¹⁰⁸ para chip based dPCR y Brufsky et al (2025)¹⁰⁹ para Crystal Digital PCR. La integración de estas referencias sustenta un perfil de utilidad centrado en sensibilidad analítica, cuantificación absoluta y monitorización de cambios clonales en ctDNA.

En epigenética, la tabla incorpora pruebas basadas en metilación circulante como parte del enfoque de biopsia líquida, cubriendo desde PCR específica de metilación hasta plataformas de múltiples regiones. Se integran Doraczynska Kowalik et al (2022)¹¹⁰ para methylation specific PCR, y pruebas multianálisis o multicáncer como SPOT MAS, TELQAS y cfMeDIP seq, con Shenasa et al (2025)¹¹¹, Tamarindo et al (2025)¹¹² y Xie et al (2022)¹¹³ como soporte de aproximaciones de metiloma y enriquecimiento inmunoprecipitado en cfDNA. Este enfoque muestra que la epigenética es clave cuando hay poca señal tumoral y se necesita una detección más certera.

En enfoques celulares y proteómicos, la citometría define subpoblaciones, la espectrometría de masas perfila proteínas en tejido o sangre, y ScreenCell con inmunocitoquímica ayuda a aislar y analizar células tumorales circulantes. En este bloque se incluyen Ekström et al (2022)¹¹⁴, Hamed et al (2022)⁹¹ y Heger et al (2024)⁹² sobre paneles inmunes y caracterización celular. Para análisis espacial en tejido, GeoMx DSP permite perfilar expresión de forma localizada y estratificar microambiente y señal inmune o tumoral, según Garcia Murillas et al (2022)¹¹⁵.

En el componente de utilidad clínica decisional, se integran ensayos multigénicos pronósticos y predictivos como Oncotype DX y MammaPrint, además de Prosigna basado en PAM50 y EndoPredict con EPclin. Este bloque se orienta a riesgo de recurrencia, beneficio terapéutico y apoyo en decisiones en tumores con receptores hormonales. Se incluyen Sunén et al (2021)⁹⁴ y Freeman et al (2023)⁹⁸ para integración y aplicabilidad de Oncotype DX y MammaPrint, Penault Llorca et al (2024)¹¹⁶ para EndoPredict EPclin, y se mantiene coherencia con el enfoque de firmas para estratificación biológica en escenarios seleccionados.

En este contexto, los datos recopilados de los diferentes autores permitieron comparar la sensibilidad y especificidad de los marcadores moleculares utilizados para la ayuda diagnóstica del cancer de mamá, cómo se observa en la Tabla 12, en la cual se identifican los marcadores más eficaces y confiables para la detección temprana de esta malignidad.

Tabla 12. Comparación de técnicas de laboratorio en cáncer de mama según sensibilidad, especificidad.

Muestra	Técnica 1	Sensibilidad	Especificidad	Muestra	Técnica 2	Sensibilidad	Especificidad	Autor/Año
Tejido tumoral	One-Step RT-qPCR (HER2)	93.4 %	100 %	Plasma	PCR TR (PIK3CA)	97.39 %	91.26 %	Albanyahyati 2024 vs FDA 2025
Tejido tumoral	Therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit	54,6 %	97.2 %	Tejido tumoral	IHC (HER2)	87.96 %	93.75 %	FDA 2025 vs Thanasan 2023
Tejido tumoral	NGS (TP53)	100 %	67.7 %	Tejido + sangre/ plasma	NGS (PIK3CA)	83 %	98 %	Sung 2022 vs Galvano 2022
Sangre/plasma	ddPCR/BEAMing (PIK3CA)	74 %	84 %	Tejido + sangre/plasma	RT-PCR (PIK3CA)	51 %	96 %	Galvano (ddPCR) 2022 vs Galvano (RT-PCR) 2022
Sangre/plasma	ddPCR (ESR1)	98 %	100 %	Tejido	qPCR (ESR1)	89 %	90.5 %	Sun 2023 vs Wegscheider 2024
Tejido (FFPE)	RT-qPCR (ESR1)	98 %	93 %	Sangre/plasma	ddPCR (PIK3CA)	88 %	100 %	Sinn 2017 vs Borkar 2025
Sangre/plasma	Metilación biopsia líquida	80 %	100 %	Plasma	Múltiple dPCR (PIK3CA)	95 %	100 %	Cristall 2021 vs Corné 2021

Nota: NR = No reportado.

Análisis y Discusión

El estudio evalúa el rendimiento diagnóstico de diversas tecnologías (PCR, NGS, IHC, ddPCR) aplicadas a biomarcadores críticos como HER2, PIK3CA, TP53, ESR1 y BRCA1. El análisis se divide en comparativas específicas que revelan el equilibrio entre sensibilidad (capacidad de detectar positivos) y especificidad (capacidad de descartar negativos).

Se observa que la RT-qPCR para HER2 según Albanyahyati (2024)¹⁵² logra un equilibrio superior con un promedio combinado del 96.7% y una especificidad perfecta (100%), superando al desempeño de la PCR en tiempo real de la FDA 2025¹⁵⁴ para PIK3CA en sensibilidad (97.39%), aunque esta última falla más en los falsos positivos.

Therascreen RGQ PCR Kit según FDA (2025)¹⁵⁴ muestra una sensibilidad muy baja (54.6%) debido a la escasa fracción de ADN tumoral en plasma, mientras que la IHC para HER2 (Thanasan, 2023)¹¹⁰ resulta ser una herramienta de cribado más equilibrada con un 90.9% de promedio combinado.

El fenómeno de TP53: El estudio de Sung (2022)¹²⁰ para TP53 alcanza una sensibilidad del 100%, pero su baja especificidad (67.7%) se explica porque el NGS detecta mutaciones genómicas que la inmunohistoquímica (IHC) no puede ver, clasificándolas erróneamente como falsos positivos.

Consistencia en PIK3CA: Por el contrario, el NGS de Galvano (2022)¹¹⁴ para PIK3CA ofrece una alta especificidad (98%) al estar validado contra tejido tumoral.

En la detección de ESR1, la ddPCR en plasma (Sun, 2023)¹⁰⁷ destaca con un 99% de promedio combinado, superando a la qPCR en tejido (Wegscheider, 2024)⁸⁸. La ventaja radica en la capacidad de realizar un monitoreo no invasivo de resistencias adquiridas.

Al comparar métodos dentro del mismo estudio (Galvano et al., 2022)¹¹⁴, la ddPCR/BEAMing demuestra ser 1.5 veces más sensible que la RT-PCR para PIK3CA, aunque esta última es más específica (96%), siendo ideal para confirmar antes de tratar con fármacos como alpelisib.

Llama la atención que técnicas más antiguas, como la RT-qPCR de Sinn et al. (2017)¹¹¹, mantienen sensibilidades del 98%, compitiendo con métodos modernos como la ddPCR en plasma de Borkar et al. (2025)¹¹⁶, cuya fortaleza reside en una especificidad del 100%.

Según Corné et al., (2021)¹⁰¹ Multiplex dPCR para PIK3CA se posiciona como una de las más precisas (97.5% de promedio). Como señala Cristall et al., (2021)¹⁰⁴ en contraste, la metilación de BRCA1 muestra una especificidad total pero menor sensibilidad (80%) debido a la dilución del ADN circulante.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- Los principales tipos de marcadores moleculares relacionados con el cáncer de mama se agrupan en marcadores de predisposición germinal, marcadores de expresión tisular, alteraciones somáticas detectables en tejido y sangre, biomarcadores epigenéticos y firmas genéticas, así como marcadores inmunológicos y circulantes. Cada uno cumple funciones específicas en la evaluación del riesgo, clasificación tumoral, pronóstico, predicción de respuestas terapéutica y monitoreo de la enfermedad.
- La utilidad de los marcadores moleculares en la práctica oncológica no es fruto de una tecnología única, sino de la combinación estratégica de distintas plataformas moleculares. Si bien la IHC sigue siendo el pilar para la clasificación fenotípica evaluando receptores hormonales y el índice de proliferación, el uso estratégico de herramientas como la RT-qPCR y NGS, permiten profundizar en la expresión génica y descifrar perfiles de mutación mucho más complejos los cuales impulsan a una medicina personalizada. A esto se suma la PCR digital en biopsias líquidas, que se ha vuelto un recurso indispensable por su enorme sensibilidad al monitorear el ADN tumoral circulante.
- La valoración comparativa entre la sensibilidad y especificidad de marcadores en CM revela la eficacia diagnóstica ligada a la interacción entre la técnica empleada y el tipo de muestra. El análisis de datos recientes demuestra que técnicas aplicadas en tejido, mantienen una sensibilidad superior (93.4 % - 98 %), mientras que la biopsia líquida se consolida como el método más confiable para la confirmación terapéutica y el monitoreo de resistencias al alcanzar una especificidad del 100 %.

Por el contrario, marcadores como TP53 evaluados por NGS muestran una sensibilidad perfecta (100 %) pero una baja especificidad relativa (67.7 %) frente a métodos proteicos, evidenciando que la fiabilidad de un marcador depende de su validación contra el estándar de referencia adecuado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albanyahayti B, El Hadi H, Bakri Y, Benider A, Karkouri M, Moumen A. Prospective Validation of a One-Step RT-qPCR-based Test for Quantifying HER2 Gene Expression in Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 1 de noviembre de 2024;25(11):3885-94. doi:10.31557/APJCP.2024.25.11.3885
2. Asamblea Nacional del Ecuador. Constitución de la República del Ecuador [Internet]. Sec. Artículo 32, Registro Oficial No. 449. 2008. p. 19. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/04/CONSTITUCI%C3%93N_449_20-10-2008.pdf
3. Breasted, James Henry. THE UNIVERSITY OF CHICAGO Edited by [Internet]. 1930. Disponible en: <https://isac.uchicago.edu/sites/default/files/uploads/shared/docs/oip4.pdf>
4. Corné J, Le Du F, Quillien V, Godey F, Robert L, Bourien H, et al. Development of multiplex digital PCR assays for the detection of PIK3CA mutations in the plasma of metastatic breast cancer patients. *Sci Rep.* 27 de agosto de 2021;11(1):17316. doi:10.1038/s41598-021-96644-6 PubMed PMID: 34453076; PubMed Central PMCID: PMC8397758.
5. Corné J, Quillien V, Callens C, Portois P, Bidard FC, Jeannot E, et al. Development of sensitive and robust multiplex digital PCR assays for the detection of ESR1 mutations in the plasma of metastatic breast cancer patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 1 de mayo de 2023;545:117366. doi:10.1016/j.cca.2023.117366 PubMed PMID: 37105452.
6. HALSTED WS. THE RESULTS OF OPERATIONS FOR THE CURE OF CANCER OF THE BREAST PERFORMED AT THE JOHNS HOPKINS HOSPITAL FROM JUNE, 1889, TO JANUARY, 1894. *Ann Surg* [Internet]. 1894;20. Disponible en: https://journals.lww.com/annalsurgery/fulltext/1894/07000/the_results_of_operations_for_the_cure_of_cancer.75.aspx
7. home – Instituto Nacional de Estadística y Censos [Internet]. 2022 [citado 5 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/institucional/home/>
8. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: Cancer today [Internet]. 2024 [citado 5 de abril de 2026]. *Cancer Today.* Disponible en: <https://gco.iarc.who.int/today/>
9. Organización Panamericana de la Salud. Cáncer de mama - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. 2023 [citado 5 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/cancer-mama>
10. Registro Nacional de Tumores – SOLCA. SOLCA [Internet]. Sociedad de Lucha Contra el Cáncer; 2022 [citado 5 de abril de 2026]. Estadísticas de incidencia y mortalidad por cáncer en Ecuador, 2022–2024. Disponible en: <https://www.solca.med.ec/>

11. Sajjadi E, Guerini-Rocco E, De Camilli E, Pala O, Mazzarol G, Venetis K, et al. Pathological identification of HER2-low breast cancer: Tips, tricks, and troubleshooting for the optimal test. *Front Mol Biosci.* 2023;Volume 10-2023. doi:10.3389/fmolb.2023.1176309
12. Servicio de Oncología – Hospital SOLCA. Registro epidemiológico de cáncer de mama, 2014–2024. SOLCA [Internet]. 2024 [citado 5 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.solca.med.ec/revista-oncologica/>
13. Thanasan S, Sukhakul K, Chitpakdee S, Kitkumthorn N. Diagnostic Accuracy of Immunohistochemistry for HER2-Positive Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 1 de diciembre de 2023;24(12):4321-7. doi:10.31557/APJCP.2023.24.12.4321 PubMed PMID: 38156869; PubMed Central PMCID: PMC10909106.
14. López VC, Fernández JÁ, Ozores PP, Mosquera AC, López RL. Marcadores moleculares en el cáncer de mama. Implicaciones terapéuticas. *Enfermedades Oncológicas IVMelanoma Cáncer Mama Tumores Ginecológicos.* 1 de marzo de 2021;13(27):1543-5. doi:10.1016/j.med.2021.03.006
15. Martínez González J de F, Corriols Molina M. Pruebas moleculares para cáncer de mama: Revisión sistemática de la disponibilidad en países de latinoamérica y el caribe. *Rev Torreón Univ.* 25 de junio de 2024;13(37):219-48. doi:10.5377/rtu.v13i37.18176
16. Raei M, Heydari K, Tabarestani M, Razavi A, Mirshafiei F, Esmaeily F, et al. Diagnostic accuracy of ESR1 mutation detection by cell-free DNA in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *BMC Cancer.* 28 de julio de 2024;24(1):908. doi:10.1186/s12885-024-12674-z
17. De Marchi T, Lai CF, Simmons GM, Goldsbrough I, Harrod A, Lam T, et al. Proteomic profiling reveals that ESR1 mutations enhance cyclin-dependent kinase signaling. *Sci Rep.* 22 de marzo de 2024;14(1):6873. doi:10.1038/s41598-024-56412-8
18. Shahab M, Ziyu P, Waqas M, Zheng G, Bin Jordan YA, Fentahun Wondmie G, et al. Targeting human progesterone receptor (PR), through pharmacophore-based screening and molecular simulation revealed potent inhibitors against breast cancer. *Sci Rep.* 21 de marzo de 2024;14(1):6768. doi:10.1038/s41598-024-55321-0
19. Królewska-Daszczynska P, Englisz A, Morawiec ML, Miśkiewicz J, Gołębski M, Mielczarek-Palacz A. The assessment of breast cancer biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment monitoring: integrated analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 22 de agosto de 2025;151(8):233. doi:10.1007/s00432-025-06271-1
20. Chen J, Kehm R, Yang W, Terry MB. Increasing rates of early-onset Luminal A breast cancers correlate with binge drinking patterns. *Breast Cancer Res.* 18 de octubre de 2024;26(1):145. doi:10.1186/s13058-024-01894-7

21. Walbaum B, Acevedo F, Medina L, Sánchez C. Cáncer de mama HER2-bajo: una nueva era en terapias dirigidas. TEMA Cent NEUROHOSPITALISMO INTEGRAR Neurol PRÁCTICA Hosp Mod. 1 de mayo de 2025;36(3):210-20. doi:10.1016/j.rmclc.2025.05.003
22. Cheng X. A Comprehensive Review of HER2 in Cancer Biology and Therapeutics. Genes. 2024;15(7):903. doi:10.3390/genes15070903
23. Swain SM, Shastry M, Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. Nat Rev Drug Discov. 1 de febrero de 2023;22(2):101-26. doi:10.1038/s41573-022-00579-0
24. Orbe L, Pozo J, Bigoni G. Sobreexpresión de HER-2 en pacientes con cáncer de mama en SOLCA - Cuenca / HER-2 overexpression in patients with breast cancer in SOLCA-Cuenca. Rev Fac Cienc Méd Univ Cuenca. 2023;41(2).
25. Probert J, Dodwell D, Broggio J, Charman J, Dowsett M, Kerr A, et al. Ki67 and breast cancer mortality in women with invasive breast cancer. JNCI Cancer Spectr. 1 de octubre de 2023;7(5):pkad054. doi:10.1093/jncics/pkad054
26. Labidi S, Mulla N, Elkholi IE, Capella MP, Rose AAN, Panasci L, et al. High Ki-67 expression is associated with increased risk of distant recurrence in Oncotype Dx low risk breast cancer. Clin Breast Cancer. 1 de agosto de 2025;25(6):e690-e696.e1. doi:10.1016/j.clbc.2025.04.001
27. Tornesello M Lina. TP53 mutations in cancer: Molecular features and therapeutic opportunities (Review). Int J Mol Med. 1 de enero de 2025;55(1):7. doi:10.3892/ijmm.2024.5448
28. Hwang SH, Baek SH, Lee MJ, Kook Y, Bae SJ, Ahn SG, et al. Clinical Relevance of TP53 Mutation and Its Characteristics in Breast Cancer with Long-Term Follow-Up Date. Cancers. 2024;16(23):3899. doi:10.3390/cancers16233899
29. Tapia Sarmiento BP, Ortiz Tejedor JG. Genes BRCA1 y BRCA2 en cáncer de mama en mujeres a nivel de América latina. Polo del Conocimiento. 2023.^a-12.^a-29.^a ed. 2024. p. 16.
30. Jangjou M, Alipour M, Mofarrah R, Alipour S. Prevalence of BRCA1 gene mutations in female breast cancer patients in Mazandaran Province, Northern Iran. Egypt J Med Hum Genet. 17 de junio de 2025;26(1):105. doi:10.1186/s43042-025-00743-2
31. Valentini V, Bucalo A, Conti G, Celli L, Porzio V, Capalbo C, et al. Gender-Specific Genetic Predisposition to Breast Cancer: BRCA Genes and Beyond. Cancers. 2024;16(3):579. doi:10.3390/cancers16030579
32. Berton Giachetti PPM, Carnevale Schianca A, Trapani D, Marra A, Toss A, Marchiò C, et al. Current controversies in the use of Oncotype DX in early breast cancer. Cancer Treat Rev. 1 de abril de 2025;135:102887. doi:10.1016/j.ctrv.2025.102887

33. Dhungana A, Vannier A, Zhao F, Freeman JQ, Saha P, Sullivan M, et al. Development and validation of a clinical breast cancer tool for accurate prediction of recurrence. *Npj Breast Cancer*. 15 de junio de 2024;10(1):46. doi:10.1038/s41523-024-00651-5
34. Rastogi P, Bandos H, Lucas PC, van 't Veer LJ, Wei JPJ, Geyer CE, et al. Utility of the 70-Gene MammaPrint Assay for Prediction of Benefit From Extended Letrozole Therapy in the NRG Oncology/NSABP B-42 Trial. *J Clin Oncol*. 20 de octubre de 2024;42(30):3561-9. doi:10.1200/JCO.23.01995
35. Papalexis P, Georgakopoulou V, Epameinondas, Drossos P V, Thymara E, Nonni A, Lazaris A C, et al. Precision medicine in breast cancer (Review). *Mol Clin Oncol*. 1 de noviembre de 2024;21(5):78. doi:10.3892/mco.2024.2776
36. Calderón León MF, Cabrera Moyano DM, Cárdenas Rodríguez JD, Vásquez Jaramillo PA, Saltos Román AA, González Sánchez M. Caracterización inmunohistoquímica del cáncer de mama correlacionado con histopatología, estudio realizado en un hospital de Ecuador. *J Selva Andina Res Soc*. 2025;16:116-27.
37. Pozo Rodríguez V, Méndez Silva N, Pozo Abreu SM. Caracterización de la Inmunohistoquímica en el cáncer de mama. *Rev Cuba Reumatol*. 27 de marzo de 2025;27:e1439.
38. Pati A, Panigrahi A, Parhi M, Giri J, Qin H, Mallik S, et al. Performance assessment of hybrid machine learning approaches for breast cancer and recurrence prediction. *PLOS ONE*. 1 de agosto de 2024;19(8):e0304768. doi:10.1371/journal.pone.0304768
39. Rehman ZU, Ahmad Fauzi MF, Wan Ahmad WS, Abas FS, Cheah PL, Chiew SF, et al. Review of In Situ Hybridization (ISH) Stain Images Using Computational Techniques. *Diagnostics*. 2024;14(18):2089. doi:10.3390/diagnostics14182089
40. Mosele MF, Westphalen CB, Stenzinger A, Barlesi F, Bayle A, Bièche I, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancer in 2024: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 1 de julio de 2024;35(7):588-606. doi:10.1016/j.annonc.2024.04.005
41. Colomer R, González-Farré B, Ballesteros AI, Peg V, Bermejo B, Pérez-Mies B, et al. Biomarkers in breast cancer 2024: an updated consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clin Transl Oncol*. 1 de diciembre de 2024;26(12):2935-51. doi:10.1007/s12094-024-03541-1
42. Ma L, Guo H, Zhao Y, Liu Z, Wang C, Bu J, et al. Liquid biopsy in cancer: current status, challenges and future prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2 de diciembre de 2024;9(1):336. doi:10.1038/s41392-024-02021-w
43. Mazzeo R, Sears J, Palmero L, Bolzonello S, Davis AA, Gerratana L, et al. Liquid biopsy in triple-negative breast cancer: unlocking the potential of precision oncology. *ESMO Open*. 1 de octubre de 2024;9(10). doi:10.1016/j.esmoop.2024.103700

44. Kim HJ, Schjøtt M, Olesen NJ, Choi E, Ku BK, Lee KK, et al. Development of a novel strategy to reduce diagnostic errors in real-time polymerase chain reaction using probe-based techniques. *Sci Rep.* 8 de noviembre de 2024;14(1):27163. doi:10.1038/s41598-024-78654-2
45. Hicks DG, Turner BM. Optimized biomarker evaluation and molecular testing in the era of breast cancer precision medicine. *Biotech Histochem.* 2 de octubre de 2024;99(7):357-69. doi:10.1080/10520295.2024.2390179
46. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 1 de marzo de 2005;5(2):209-19. doi:10.1586/14737159.5.2.209
47. Juma K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle, Requirements, Types and Application. Vol. 3. 6 de marzo de 2025;3:98-105.
48. Budhbaware T, Rathored J, Shende S. Molecular methods in cancer diagnostics: a short review. *Ann Med.* 31 de diciembre de 2024;56(1):2353893. doi:10.1080/07853890.2024.2353893
49. Awrahman HA, Mohamad D. Advanced breast cancer diagnosis: Multiplex RT-qPCR for precise typing and angiogenesis profiling. *Biochem Biophys Rep.* 1 de marzo de 2024;37:101615. doi:10.1016/j.bbrep.2023.101615
50. Meng P, Dalal H, Chen Y, Brueffer C, Gladchuk S, Alcaide M, et al. Digital PCR quantification of ultrahigh ERBB2 copy number identifies poor breast cancer survival after trastuzumab. *Npj Breast Cancer.* 19 de febrero de 2024;10(1):14. doi:10.1038/s41523-024-00621-x
51. Venetis K, Pepe F, Pescia C, Cursano G, Criscitiello C, Frascarelli C, et al. ESR1 mutations in HR+/HER2-metastatic breast cancer: Enhancing the accuracy of ctDNA testing. *Cancer Treat Rev.* 1 de diciembre de 2023;121. doi:10.1016/j.ctrv.2023.102642
52. Smilkou S, Ntzifa A, Tserpeli V, Balgkouranidou I, Papatheodoridi A, Razis E, et al. Detection rate for ESR1 mutations is higher in circulating-tumor-cell-derived genomic DNA than in paired plasma cell-free DNA samples as revealed by ddPCR. *Mol Oncol.* julio de 2025;19(7):2109-19. doi:10.1002/1878-0261.13787 PubMed PMID: 39754401; PubMed Central PMCID: PMC12234389.
53. Rojo FGT, Guarneri V, Bragadin AB, Indraccolo S, Rocco EG, Fusco N, et al. 76P Real-world study of ESR1 mutation testing by liquid biopsy using digital PCR or NGS to guide elacestrant use in metastatic breast cancer patients. *ESMO Open.* 1 de mayo de 2025;10. doi:10.1016/j.esmoop.2025.104630
54. Bidard FC, Hardy-Bessard AC, Dalenc F, Bachelot T, Pierga JY, de la Motte Rouge T, et al. Switch to fulvestrant and palbociclib versus no switch in advanced breast cancer with rising ESR1 mutation during aromatase inhibitor and palbociclib therapy

- (PADA-1): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* noviembre de 2022;23(11):1367-77. doi:10.1016/S1470-2045(22)00555-1 PubMed PMID: 36183733.
55. Bardia A, Cortés J, Bidard FC, Neven P, Garcia-Sáenz J, Aftimos P, et al. Elacestrant in ER+, HER2- Metastatic Breast Cancer with ESR1-Mutated Tumors: Subgroup Analyses from the Phase III EMERALD Trial by Prior Duration of Endocrine Therapy plus CDK4/6 Inhibitor and in Clinical Subgroups. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de octubre de 2024;30(19):4299-309. doi:10.1158/1078-0432.CCR-24-1073 PubMed PMID: 39087959; PubMed Central PMCID: PMC11443208.
 56. García M, Ortiz C. Anatomía microscópica normal de la glándula mamaria, con algunas consideraciones prácticas para el diagnóstico histopatológico. *Patol Rev Latinoam.* 2024;2024(62):1-21. doi:https://doi.org/10.24245/patrl.v62id.9588
 57. Paavolainen O, Peurla M, Koskinen LM, Pohjankukka J, Saberi K, Tammelin E, et al. Volumetric analysis of the terminal ductal lobular unit architecture and cell phenotypes in the human breast. *Cell Rep.* 22 de octubre de 2024;43(10):114837. doi:10.1016/j.celrep.2024.114837 PubMed PMID: 39368089.
 58. Buchholz MB, Scheerman DI, Levato R, Wehrens EJ, Rios AC. Human breast tissue engineering in health and disease. *EMBO Mol Med.* octubre de 2024;16(10):2299-321. doi:10.1038/s44321-024-00112-3 PubMed PMID: 39179741; PubMed Central PMCID: PMC11473723.
 59. Shams A. Re-evaluation of the myoepithelial cells roles in the breast cancer progression. *Cancer Cell Int.* 12 de diciembre de 2022;22(1):403. doi:10.1186/s12935-022-02829-y PubMed PMID: 36510219; PubMed Central PMCID: PMC9746125.
 60. Giorello MB, Borzone FR, Labovsky V, Piccioni FV, Chasseing NA. Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast Tumor Microenvironment. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* junio de 2021;26(2):135-55. doi:10.1007/s10911-020-09475-y PubMed PMID: 33398516.
 61. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primer.* 23 de septiembre de 2019;5(1):66. doi:10.1038/s41572-019-0111-2
 62. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12 de enero de 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
 63. Li W, Zhao X, Han Q, Ren C, Gao S, Liu Y, et al. Relationship between breast tissue involution and breast cancer. *Front Oncol.* 2025;Volume 15-2025. doi:10.3389/fonc.2025.1420350

64. Ulloa M, Sánchez E, Sánchez F. Incidencia de mutaciones genéticas en pacientes con cáncer de mama y ovario con patrón de origen hereditario. *Ginecol Obstet Mex.* 2020;88(02):92-7.
65. Mathur R, Jha NK, Saini G, Jha SK, Shukla SP, Filipejová Z, et al. Epigenetic factors in breast cancer therapy. *Front Genet.* 2022;13:886487. doi:10.3389/fgene.2022.886487 PubMed PMID: 36212140; PubMed Central PMCID: PMC9539821.
66. Al-Shami K, Awadi S, Khamees A, Alsheikh AM, Al-Sharif S, Ala' Bereshy R, et al. Estrogens and the risk of breast cancer: A narrative review of literature. *Heliyon.* 1 de septiembre de 2023;9(9):e20224. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e20224
67. García-Sancha N, Corchado-Cobos R, Pérez-Losada J. Understanding Susceptibility to Breast Cancer: From Risk Factors to Prevention Strategies. *Int J Mol Sci.* 2025;26(7):2993. doi:10.3390/ijms26072993
68. Ahn SG, Bae SJ, Kim Y, Ji JH, Chu C, Kim D, et al. Author Correction: Primary endocrine resistance of ER+ breast cancer with ESR1 mutations interrogated by droplet digital PCR. *Npj Breast Cancer.* 18 de mayo de 2022;8(1):67. doi:10.1038/s41523-022-00436-8
69. Neves Rebello Alves L, Dummer Meira D, Poppe Meriguetti L, Correia Casotti M, do Prado Ventorim D, Ferreira Figueiredo Almeida J, et al. Biomarkers in Breast Cancer: An Old Story with a New End. *Genes.* 2023;14(7):1364. doi:10.3390/genes14071364
70. Rezvani H, Forghani S, Forghani A, Sabet FM, Akbari A, Tabarestani S. Assessment of ESR1, PGR, ERBB2, and MKI67 mRNA in Hormone Receptor-Positive Early Breast Cancer: A Cross-Sectional Study. *Health Sci Rep.* julio de 2025;8(7):e71062. doi:10.1002/hsr2.71062 PubMed PMID: 40666735; PubMed Central PMCID: PMC12261032.
71. Beijing Genetron Health Technology Co., Ltd., Liu F, Zhang W, Chen H. Primer, probe, kit and detection method for detecting PGR gene expression. Chinese patent CN112725444A. 2021 Apr 30. Disponible en: [Internet]. CN112725444A. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/CN112725444A/en>
72. Wegscheider AS, Gorniak J, Rollinson S, Gough L, Dhaliwal N, Guardiola A, et al. Comprehensive and Accurate Molecular Profiling of Breast Cancer through mRNA Expression of ESR1, PGR, ERBB2, MKI67, and a Novel Proliferation Signature. *Diagn Basel Switz.* 23 de enero de 2024;14(3). doi:10.3390/diagnostics14030241 PubMed PMID: 38337757; PubMed Central PMCID: PMC10855423.
73. OriGene Technologies. Ki67 (MKI67) Human qPCR Primer Pair (NM_002417) product datasheet. [Internet]. 2025. Disponible en: <https://cdn.origene.com/datasheet/hp206104.pdf>

74. Garrido-Navas MC, García-Díaz A, Molina-Vallejo MP, González-Martínez C, Alcaide Lucena M, Cañas-García I, et al. The Polemic Diagnostic Role of TP53 Mutations in Liquid Biopsies from Breast, Colon and Lung Cancers. *Cancers*. 2020;12(11):3343. doi:10.3390/cancers12113343
75. Ali M, Uddin A, Ghafoor SU, Rehman AU. BRCA1 Exon 11 Mutations in Breast Cancer: A Study From Pakistan. *Genet Res*. 2025;2025:5544418. doi:10.1155/genr/5544418 PubMed PMID: 40904409; PubMed Central PMCID: PMC12404825.
76. Xiujuan W, Yanlin Z, Duan Weitao, Pingfeng Z. Primers, probe, and kit for detecting BRCA1 gene expression [Internet]. CN105420393A. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/CN105420393A/en>
77. Huang H, Hu C, Na J, Hart SN, Gnanaolivu RD, Abozaid M, et al. Functional evaluation and clinical classification of BRCA2 variants. *Nature*. 1 de febrero de 2025;638(8050):528-37. doi:10.1038/s41586-024-08388-8
78. Quilligana L. Mutación en los genes BrCa1 y BrCa2 y su relación con el cáncer mamario [Internet]. Universidad Nacional de Chimborazo; 2025. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/16207/1/Quilligana%20U.%20Lorena%20E.%20%282025%29%20Mutaci%C3%B3n%20en%20los%20genes%20BrCa1%20y%20BrCa2%20y%20su%20relacion%20con%20el%20c%C3%A1ncer%20mamario..pdf>
79. Zehua T, Qinghua L, Yingkang W, Jun Y, Huijuan G, Xuchao L, et al. Primers, kit and method for detecting human BRCA1 and BRCA2 gene mutation [Internet]. CN105586427B. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/CN105586427B/en>
80. Tomás A, Pojo M. PIK3CA Mutations: Are They a Relevant Target in Adult Diffuse Gliomas? *Int J Mol Sci*. 2025;26(11):5276. doi:10.3390/ijms26115276
81. Lee D, Kozurek EC, Abdullah M, Wong EJ, Li R, Liu ZS, et al. PIK3CA mutation fortifies molecular determinants for immune signaling in vascular cancers. *Cancer Gene Ther*. 1 de febrero de 2025;32(2):254-67. doi:10.1038/s41417-024-00867-4
82. Bio-Rad Laboratories. ddPCR Mutation Assay: PIK3CA WT for p.H1047R c.3140A>G, Human, Homo sapiens [Internet]. 2025. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/digital-assays/assay-detail/dHsaCP2000078>
83. Maphutha J, Twilley D, Lall N. The Role of the PTEN Tumor Suppressor Gene and Its Anti-Angiogenic Activity in Melanoma and Other Cancers. *Molecules*. 2024;29(3):721. doi:10.3390/molecules29030721
84. OriGene Technologies. PTEN Human qPCR Primer Pair (NM_000314) [Internet]. 2025. Disponible en: <https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp200295-pten-human-qpcr-primer-pair-nm-000314>

85. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 1 de julio de 2007;448(7152):439-44. doi:10.1038/nature05933
86. George B, Gui B, Raguraman R, Paul AM, Nakshatri H, Pillai MR, et al. AKT1 Transcriptomic Landscape in Breast Cancer Cells. *Cells*. 25 de julio de 2022;11(15). doi:10.3390/cells11152290 PubMed PMID: 35892586; PubMed Central PMCID: PMC9332453.
87. Chen H, Ding Q, Khazai L, Zhao L, Damodaran S, Litton JK, et al. PTEN in triple-negative breast carcinoma: protein expression and genomic alteration in pretreatment and posttreatment specimens. *Ther Adv Med Oncol*. 2023;15:17588359231189422. doi:10.1177/17588359231189422 PubMed PMID: 37547448; PubMed Central PMCID: PMC10399250.
88. Hassan F, Wang JH, O'Leary DP, Corrigan M, Redmond HP. Association of preoperative and postoperative circulating tumour DNA (ctDNA) with PIK3CA gene mutation with risk of recurrence in patients with non-metastatic breast cancer. *Surg Oncol*. junio de 2024;54:102060. doi:10.1016/j.suronc.2024.102060 PubMed PMID: 38603927.
89. Arimura A, Sakai K, Kaneshiro K, Morisaki T, Hayashi S, Mizoguchi K, et al. TP53 and/or BRCA1 Mutations Based on CtDNA Analysis as Prognostic Biomarkers for Primary Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*. 18 de marzo de 2024;16(6). doi:10.3390/cancers16061184 PubMed PMID: 38539518; PubMed Central PMCID: PMC10969106.
90. Xu J, Zeng Q, Li S, Su Q, Fan H. Inflammation mechanism and research progress of COPD. *Front Immunol*. 2024;15:1404615. doi:10.3389/fimmu.2024.1404615 PubMed PMID: 39185405; PubMed Central PMCID: PMC11341368.
91. Hamed MM, Gouida MS, Abd El-Aziz SR, El-Sokkary AMA. Evaluation PD-L1, CD8 and CD20 as early predictor and tracking markers for breast cancer (BC) in Egypt. *Heliyon*. mayo de 2022;8(5):e09474. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09474 PubMed PMID: 35647336; PubMed Central PMCID: PMC9136277.
92. Heger L, Heidkamp GF, Amon L, Nimmerjahn F, Bäuerle T, Maier A, et al. Unbiased high-dimensional flow cytometry identified NK and DC immune cell signature in Luminal A-type and triple negative breast cancer. *Oncoimmunology*. 2024;13(1):2296713. doi:10.1080/2162402X.2023.2296713 PubMed PMID: 38170155; PubMed Central PMCID: PMC10761100.
93. Kalinsky K, Barlow WE, Gralow JR, Meric-Bernstam F, Albain KS, Hayes DF, et al. 21-Gene Assay to Inform Chemotherapy Benefit in Node-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 16 de diciembre de 2021;385(25):2336-47. doi:10.1056/NEJMoa2108873 PubMed PMID: 34914339; PubMed Central PMCID: PMC9096864.

94. Suñén I, García Barrado AI, Antón-Torres A, Eizaguirre Zarza B, Sebastián Sebastián C, García Mur C. Predicción del resultado del test Oncotype DX con RM mamaria de 1.5T en tumores con receptores hormonales positivos y HER2 negativo. *Rev Senol Patol Mamar*. 1 de octubre de 2021;34(4):185-92. doi:10.1016/j.senol.2021.02.001
95. Jensen MB, Nielsen TO, Bartlett J, Lænkholm AV, Shepherd L, Ejlertsen B. Prosigna Risk of Recurrence score and intrinsic subtypes are associated with adjuvant anthracycline chemotherapy benefit in high-risk breast cancer. *Npj Breast Cancer*. 10 de marzo de 2025;11(1):26. doi:10.1038/s41523-025-00738-7
96. Bartlett JMS, Xu K, Wong J, Pond G, Zhang Y, Spears M, et al. Validation of the Prognostic Performance of Breast Cancer Index in Hormone Receptor-Positive Postmenopausal Breast Cancer Patients in the TEAM Trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de abril de 2024;30(8):1509-17. doi:10.1158/1078-0432.CCR-23-2436 PubMed PMID: 38345755; PubMed Central PMCID: PMC11016895.
97. Lian J, Yao R, Xu Y, Tan L, Chen F, Zhang J, et al. Prediction of the 70-gene signature (MammaPrint) high versus low risk by nomograms among axillary lymph node positive (LN+) and negative (LN-) Chinese breast cancer patients, a retrospective study. *BMC Cancer*. 1 de julio de 2025;25(1):1128. doi:10.1186/s12885-025-14507-z PubMed PMID: 40597882; PubMed Central PMCID: PMC12211753.
98. Freeman JQ, Shubeck S, Howard FM, Chen N, Nanda R, Huo D. Evaluation of multigene assays as predictors for response to neoadjuvant chemotherapy in early-stage breast cancer patients. *NPJ Breast Cancer*. 6 de mayo de 2023;9(1):33. doi:10.1038/s41523-023-00536-z PubMed PMID: 37149628; PubMed Central PMCID: PMC10164191.
99. Choudhary A, Poojary SS, Jain P, Chaturvedi H, Das BC. Identification of novel exosomal miRNAs and their role in diagnosis and prognosis of triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 13 de enero de 2026;26(1):210. doi:10.1186/s12885-025-15499-6 PubMed PMID: 41526862; PubMed Central PMCID: PMC12888123.
100. Guindalini RSC, Viana DV, Kitajima JPFW, Rocha VM, López RVM, Zheng Y, et al. Detection of germline variants in Brazilian breast cancer patients using multigene panel testing. *Sci Rep*. 9 de marzo de 2022;12(1):4190. doi:10.1038/s41598-022-07383-1 PubMed PMID: 35264596; PubMed Central PMCID: PMC8907244.
101. Yazici H, Terry MB, Cho YH, Senie RT, Liao Y, Andrulis I, et al. Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. octubre de 2009;18(10):2723-5. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-1237 PubMed PMID: 19755643; PubMed Central PMCID: PMC3791602.
102. Yang L, An M, Song H, Zhang X, Wang M, Yang L, et al. Multidimensional cell-free DNA fragmentomics enables early detection of breast cancer. *Breast Cancer Res*

BCR. 9 de diciembre de 2025;28(1):6. doi:10.1186/s13058-025-02190-8 PubMed PMID: 41366809; PubMed Central PMCID: PMC12801790.

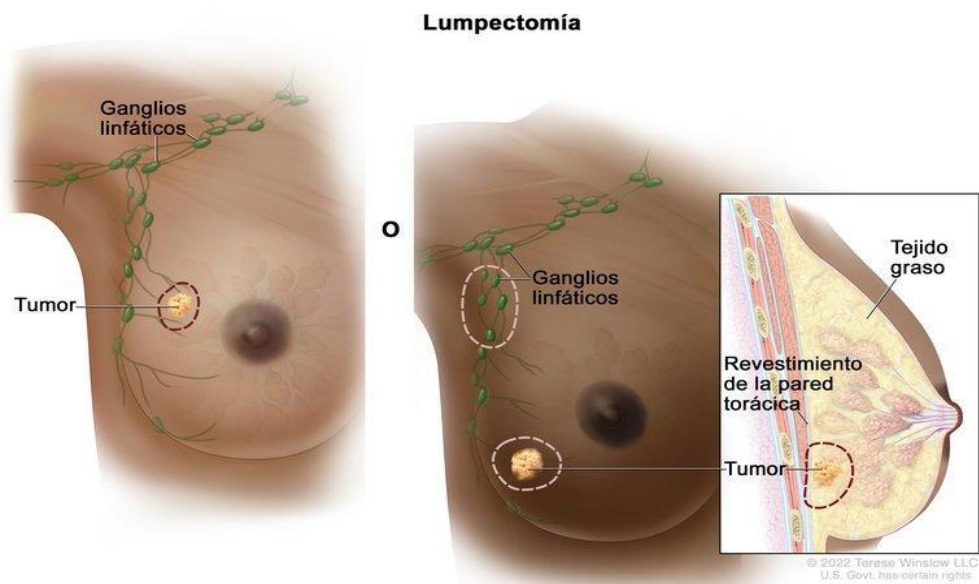
103. Ravera F, Dameri M, Nuzzo PV, Stabile M, Fregatti P, Ballestrero A, et al. Comprehensive analysis of plasma methylome reveals distinct patterns of methylation changes between responders and non-responders to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Liq Biopsy*. diciembre de 2024;6:100159. doi:10.1016/j.jlb.2024.100159 PubMed PMID: 40027300; PubMed Central PMCID: PMC11863947.
104. Giridhar KV, Sinnwell JP, Slettedahl SW, Taylor WR, Mahoney DW, Foote PH, et al. Plasma assay of methylated DNA markers detects recurrent metastatic breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 29 de noviembre de 2025;12(1):2. doi:10.1038/s41523-025-00866-0 PubMed PMID: 41318666; PubMed Central PMCID: PMC12774997.
105. Smilkou S, Ntzifa A, Stergiopoulou D, Georgoulas V, Lianidou E. Multiplex detection of ten ESR1 mutations and AKT1 E17K in breast cancer using digital PCR. *J Liq Biopsy*. septiembre de 2024;5:100154. doi:10.1016/j.jlb.2024.100154 PubMed PMID: 40027941; PubMed Central PMCID: PMC11863943.
106. Pham TMQ, Phan TH, Jasmine TX, Tran TTT, Huynh LAK, Vo TL, et al. Multimodal analysis of genome-wide methylation, copy number aberrations, and end motif signatures enhances detection of early-stage breast cancer. *Front Oncol*. 2023;13:1127086. doi:10.3389/fonc.2023.1127086 PubMed PMID: 37223690; PubMed Central PMCID: PMC10200909.
107. Pramanik R, Chitikela S, Deo SVS, Gogia A, Batra A, Kumar A, et al. Comprehensive germline profiling of patients with breast cancer: initial experience from a Familial Cancer Clinic. *Ecancermedicalsecience*. 2024;18:1670. doi:10.3332/ecancer.2024.1670 PubMed PMID: 38439815; PubMed Central PMCID: PMC10911669.
108. Mehtar A, Wechsler J, Desterke C, Giron-Michel J, Bouzidi A, Burlion A, et al. Optimizing Detection of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Unveiling New Markers for Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 14 de mayo de 2025;26(10). doi:10.3390/ijms26104714 PubMed PMID: 40429857; PubMed Central PMCID: PMC12111556.
109. Brufsky AM, Hoskins KF, Conter HJ, Kelemen P, Habibi M, Samian L, et al. MammaPrint predicts chemotherapy benefit in HR+HER2- early breast cancer: FLEX Registry real-world data. *JNCI Cancer Spectr*. 1 de septiembre de 2025;9(5). doi:10.1093/jncics/pkaf079 PubMed PMID: 40796181; PubMed Central PMCID: PMC12413225.
110. Doraczynska-Kowalik A, Michalowska D, Matkowski R, Czykalko E, Blomka D, Semeniuk M, et al. Detection of BRCA1/2 pathogenic variants in patients with breast and/or ovarian cancer and their families. Analysis of 3,458 cases from Lower Silesia (Poland) according to the diagnostic algorithm of the National Cancer Control

Programme. *Front Genet.* 2022;13:941375. doi:10.3389/fgene.2022.941375 PubMed PMID: 36171877; PubMed Central PMCID: PMC9510890.

111. Shenasa E, He Y, Wang Z, Tu D, Gao D, Kos Z, et al. Digital Profiling of Immune Biomarkers in Breast Cancer: Relation to Anthracycline Benefit. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* mayo de 2025;38(5):100718. doi:10.1016/j.modpat.2025.100718 PubMed PMID: 39863112.
112. Tamarindo GH, Novais AA, Frigieri BM, Alves DL, de Souza CA, Amadeu A, et al. Distinct proteomic profiles of plasma-derived extracellular vesicles in healthy, benign, and triple-negative breast cancer: candidate biomarkers for liquid biopsy. *Sci Rep.* 9 de abril de 2025;15(1):12122. doi:10.1038/s41598-025-95232-2 PubMed PMID: 40204835; PubMed Central PMCID: PMC11982211.
113. Xie S, Wang Y, Gong Z, Li Y, Yang W, Liu G, et al. Liquid Biopsy and Tissue Biopsy Comparison with Digital PCR and IHC/FISH for HER2 Amplification Detection in Breast Cancer Patients. *J Cancer.* 2022;13(3):744-51. doi:10.7150/jca.66567 PubMed PMID: 35154443; PubMed Central PMCID: PMC8824896.
114. Ekström K, Crescitelli R, Pétursson HI, Johansson J, Lässer C, Olofsson Bagge R. Characterization of surface markers on extracellular vesicles isolated from lymphatic exudate from patients with breast cancer. *BMC Cancer.* 10 de enero de 2022;22(1):50. doi:10.1186/s12885-021-08870-w PubMed PMID: 35012489; PubMed Central PMCID: PMC8744234.
115. Garcia-Murillas I, Abbott CW, Cutts RJ, Boyle SM, Pugh J, Keough KC, et al. Whole genome sequencing-powered ctDNA sequencing for breast cancer detection. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* junio de 2025;36(6):673-81. doi:10.1016/j.annonc.2025.01.021 PubMed PMID: 39914664.
116. Penault-Llorca F, Dalenc F, Chabaud S, Cottu P, Allouache D, Cameron D, et al. Prognostic value of EndoPredict test in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative primary breast cancer screened for the randomized, double-blind, phase III UNIRAD trial. *ESMO Open.* mayo de 2024;9(5):103443. doi:10.1016/j.esmoop.2024.103443 PubMed PMID: 38692082; PubMed Central PMCID: PMC11070798.

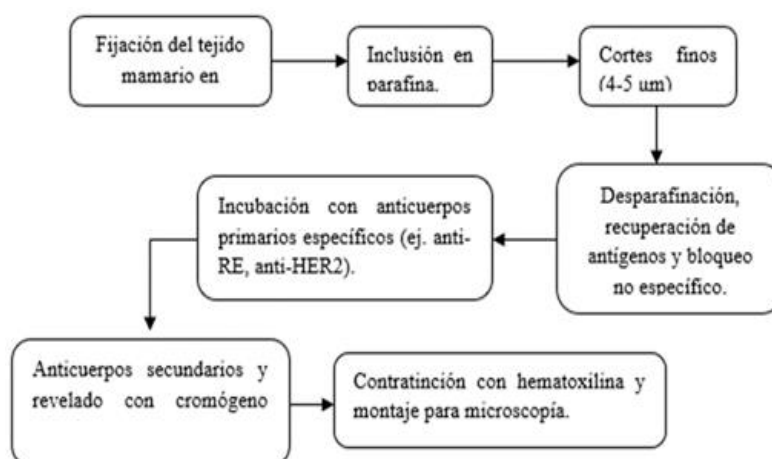
ANEXOS

Anexo 1. Tumor mamario.



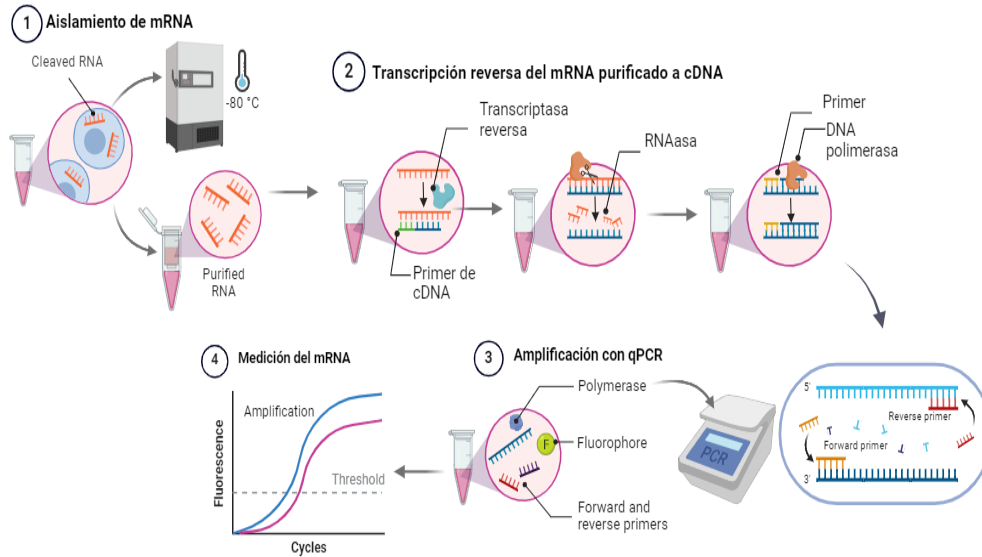
Fuente: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/tratamiento-mama>

Anexo 2. Pasos de la Técnica IHQ.



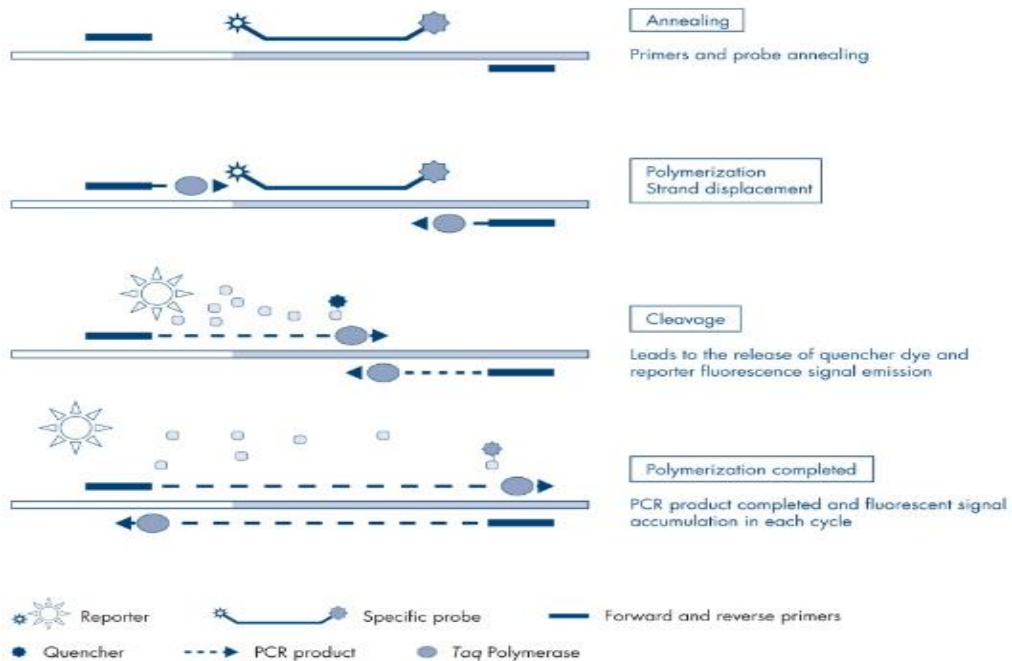
Fuente: <https://www.infomama.com.br/blog/imuno-histoquimica-no-cancer-de-mama/>

Anexo 3. Procedimiento para realizar procedimiento de RT-qPCR.



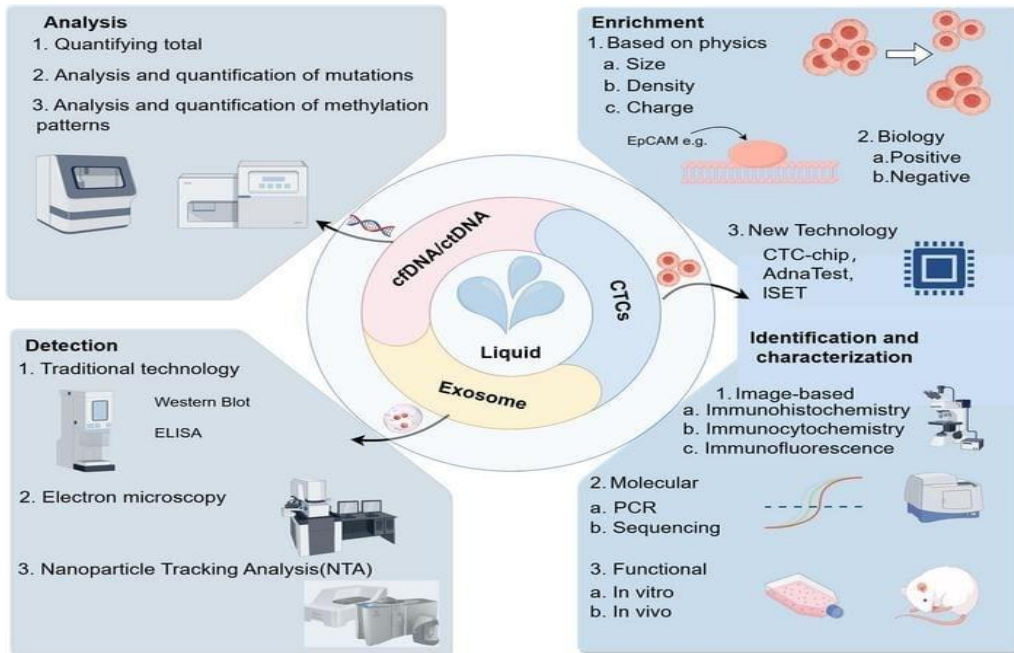
Fuente: <https://www.biorender.com/template/rt-qpcr-70042>

Anexo 4. Therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit. Principio de la reacción con sondas de hidrólisis.



Fuente: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf19/P190001C.pdf

Anexo 5. Biopsia líquida para detección temprana del cáncer.



Fuente: <https://clpmag.com/disease-states/cancer/liquid-biopsy-is-an-early-cancer-screening-breakthrough-technology/>

Anexo 6. cobas® PIK3CA Mutation Test



cobas® PIK3CA Mutation Test

Para diagnóstico *in vitro*



cobas® PIK3CA Mutation Test

24 Tests

P/N: 07003986190

Para las muestras FFPET, consulte el **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) para la preparación de las muestras.

Uso previsto

El ensayo cobas® PIK3CA Mutation Test es una prueba de PCR a tiempo real para la detección e identificación cualitativas de 17 mutaciones en los exones 2, 5, 8, 10 y 21 del gen codificador de la subunidad catalítica de la fosfoinositida-3-quinasa (PIK3CA) en ADN aislado de tejido tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina (FFPET). El ensayo cobas® PIK3CA Mutation Test es una prueba de PCR a tiempo real para su uso en el cobas® 4800 System diseñada para identificar pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores presentan estas mutaciones.

Resumen y explicación de la prueba

Información de referencia

La vía de señalización de la fosfoinositida-3-quinasa (PI3K) es un regulador clave de numerosas características del comportamiento celular normal, incluido el crecimiento, la supervivencia, la motilidad y la proliferación celular.¹⁻³ La activación y desregularización de la vía de la PI3K se han relacionado en una amplia variedad de cánceres humanos.⁴ En el cáncer, un mecanismo importante de la activación de la vía se produce mediante receptores conocidos como receptores de tirosina quinasa (RTK), tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2) o el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). PI3K, Akt y mTOR presentan 3 uniones importantes en la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR.⁵ La activación de la vía de la PI3K causa la conversión del fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP3), un importante mensajero secundario que estimula una amplia gama de vías de efectores descendentes, incluidos Akt y mTOR. La activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR da lugar a numerosos procesos celulares, incluido el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular.⁶

El PIK3CA es uno de los oncogenes más frecuentemente mutado que se ha identificado en los cánceres humanos. Asimismo, la mayoría de las mutaciones registradas tienen lugar en unos pocos "puntos calientes" de la proteína (codones 1047 [40 %], 545 [25 %] y 542 [13 %]).⁷ La mayor parte de las mutaciones se producen principalmente en los exones 10 y 21 del PIK3CA. Sin embargo, también se han identificado mutaciones activadoras en los exones 2, 5 y 8. En la base de datos COSMIC se demuestra que el PIK3CA presenta una mutación del 12 % en todos los tipos de tumores. En el caso del cáncer de mama, se han detectado mutaciones en PIK3CA en el 26 % de los tumores analizados. Se ha demostrado que las mutaciones en PIK3CA son más comunes en cánceres de mama con receptores de hormonas positivos (~40 %) y HER-2 positivos (~25 %).^{8,9}

Entre las mujeres, el cáncer de mama es el tumor maligno diagnosticado con mayor frecuencia y la causa principal de muerte por cáncer. En 2017, el cáncer de mamá supuso el 25 % de los casos totales de cáncer y el 15 % de las muertes por cáncer en mujeres en todo el mundo.¹⁰ Se estima que aproximadamente la mitad de los casos de cáncer de mama y el 60 % de las muertes se producen en países desarrollados económicamente. En términos generales, las tasas de incidencia son elevadas en Europa Occidental y Septentrional, Australia/Nueva Zelanda y América del Norte. Los elementos que contribuyen a la variación internacional de las tasas de incidencia tienen su origen en gran medida en las diferencias de los factores reproductivos y hormonales y de la disponibilidad de servicios de detección precoz.¹¹ Se necesitan nuevas terapias para combatir la alta incidencia del cáncer de mama en general y el elevado número de muertes causadas por el cáncer de mama. Conocer el estado mutacional del gen PIK3CA es fundamental para utilizar terapias dirigidas a la actividad de la vía del PIK3CA.

Las mutaciones detectadas por la prueba cobas® PIK3CA Mutation Test (prueba cobas PIK3CA) se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1: Mutaciones detectadas por la prueba cobas® PIK3CA

Número de exón de PIK3CA actual	Número de exón de PIK3CA anterior*	Mutación en PIK3CA	Secuencia de ácidos nucleicos de PIK3CA	Nomenclatura de proteínas según HGVS**	Nomenclatura de nucleótidos según HGVS**	ID de COSMIC ¹²
2	1	R88Q	263G>A	NM_006218.2.p.(Arg88Gln)	NM_006218.2.c.263G>A	746
5	4	N345K	1035T>A	NM_006218.2.p.(Asn345Lys)	NM_006218.2.c.1035T>A	754
8	7	C420R	1258T>C	NM_006218.2.p.(Cys420Arg)	NM_006218.2.c.1258T>C	757
10	9	E542K	1624G>A	NM_006218.2.p.(Glu542Lys)	NM_006218.2.c.1624G>A	760
10	9	E545A	1634A>C	NM_006218.2.p.(Glu545Ala)	NM_006218.2.c.1634A>C	12458
10	9	E545D	1635G>T	NM_006218.2.p.(Glu545Asp)	NM_006218.2.c.1635G>T	765
10	9	E545G	1634A>G	NM_006218.2.p.(Glu545Gly)	NM_006218.2.c.1634A>G	764
10	9	E545K	1633G>A	NM_006218.2.p.(Glu545Lys)	NM_006218.2.c.1633G>A	763
10	9	Q546E	1636C>G	NM_006218.2.p.(Gln546Glu)	NM_006218.2.c.1636C>G	6147
10	9	Q546K	1636C>A	NM_006218.2.p.(Gln546Lys)	NM_006218.2.c.1636C>A	766
10	9	Q546L	1637A>T	NM_006218.2.p.(Glu546Leu)	NM_006218.2.c.1637A>T	25041
10	9	Q546R	1637A>G	NM_006218.2.p.(Gln546Arg)	NM_006218.2.c.1637A>G	12459
21	20	H1047L	3140A>T	NM_006218.2.p.(His1047Leu)	NM_006218.2.c.3140A>T	776
21	20	H1047R	3140A>G	NM_006218.2.p.(His1047Arg)	NM_006218.2.c.3140A>G	775
21	20	H1047Y	3139C>T	NM_006218.2.p.(His1047Tyr)	NM_006218.2.c.3139C>T	774
21	20	G1049R	3145G>C	NM_006218.2.p.(Gly1049Arg)	NM_006218.2.c.3145G>C	12597
21	20	M1043I	3129G>T	NM_006218.2.p.(Met1043Ile)	NM_006218.2.c.3129G>T	773

* Numeración del exón de PIK3CA anterior excluido el primer exón no traducido.

** HGVS - Human Genome Variation Society

Principios del procedimiento

La prueba cobas PIK3CA se basa en dos procesos principales: (1) preparación manual de las muestras para obtener ADN genómico a partir de FFPET y (2) amplificación y detección del ADN diana mediante PCR y pares de cebadores (primers) complementarios y sondas oligonucleótidas con marcadores fluorescentes. La prueba está diseñada para detectar R88Q en el exón 2, N345K en el exón 5, C420R en el exón 8, E542K, E545X (E545A, E545D*, E545G y E545K), Q546X (Q546E, Q546K, Q546L y Q546R) en el exón 10 y M1043I*, H1047X (H1047L, H1047R, y H1047Y) y G1049R en el exón 21. La detección de la mutación se realiza mediante el análisis de PCR con el cobas z 480 analyzer. Cada serie incluye un control de mutación y un control negativo para confirmar la validez de la serie.

* Para el cambio de aminoácido E545D, la prueba solo detecta la mutación c.1635G>T del cambio de nucleótido.

** Para el cambio de aminoácido M1043I, la prueba solo detecta la mutación c.3129G>T del cambio de nucleótido.

Secuencias de referencia

Consulte la fuente siguiente para conocer la secuencia de referencia para el gen PIK3CA.¹³

PIK3CA: LRG_310t1

Instrucciones de uso

Nota: la prueba cobas PIK3CA solamente admite secciones de FFPET de cáncer de mama con un grosor de 5 µm y que contengan como mínimo un 10 % de células tumorales. Las muestras con menos de un 10 % de células tumorales por área deben someterse a macrodissección después de la desparafinación.

Nota: consulte la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para obtener instrucciones de uso detalladas del cobas z 480 analyzer.

Tamaño de la serie

Una única serie puede incluir entre 1 y 30 muestras (además de los controles) por cada placa de amplificación y detección de 96 pocillos. Si se analizan más de 24 muestras, será necesario utilizar varios kits de la prueba cobas PIK3CA.

La prueba cobas PIK3CA contiene reactivos suficientes para realizar 8 series de 3 muestras (además de los controles) para un máximo de 24 muestras por kit.

Controles para todo el proceso

Esta prueba requiere un control negativo para todo el proceso (NEG). En cada serie debe procesarse un NEG junto con las muestras empezando por el procedimiento de aislamiento de ADN.

Aislamiento de ADN

El ADN se aísla de las muestras FFPET de cáncer de mama mediante el cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Macrodissección

Si la muestra contiene menos de un 10 % de células tumorales por área, será necesario proceder a su macrodissección como parte de la preparación.

Cuantificación del ADN

Nota: la medición de la concentración de ADN debe realizarse inmediatamente después del procedimiento de aislamiento de ADN y antes del almacenamiento.

Nota: almacene el stock de ADN según las instrucciones del apartado Almacenamiento y estabilidad de las muestras durante el transporte.

1. Mezcle cada stock de ADN mediante un agitador vórtex durante 5 segundos.
2. Cuantifique el ADN mediante un espectrofotómetro, según el protocolo del fabricante. Utilice el buffer de elución de ADN (DNA EB) como blanco para el instrumento. Es necesario un promedio de dos lecturas coincidentes. Si las lecturas de concentración de ADN son $\geq 20,0$ ng/µl, las dos mediciones no deben presentar una diferencia mayor a ± 10 % entre ellas. En el caso de las lecturas de concentración de ADN $< 20,0$ ng/µl, la diferencia entre ambas mediciones no debe superar los ± 2 ng/µl. Si las dos mediciones presentan una diferencia mayor a ± 10 % entre ellas cuando las lecturas de concentración de ADN son $\geq 20,0$ ng/µl o mayor a ± 2 ng/µl cuando las lecturas de concentración de ADN son $< 20,0$ ng/µl, se deben realizar 2 lecturas adicionales hasta que se cumplan los requisitos. A continuación, debe calcularse el promedio de estas dos nuevas mediciones.

Nota: no es necesario medir el stock de ADN del NEG procesado.

3. La concentración del stock de ADN de las muestras debe ser ≥ 2 ng/ μ l para realizar la prueba cobas PIK3CA. Se realizan tres ciclos de amplificación/detección por muestra, para cada uno de los cuales se utilizan 25 μ l de una dilución de 2 ng/ μ l de stock de ADN (un total de 50 ng de ADN).

Nota: cada stock de ADN debe tener una concentración mínima de 2 ng/ μ l para realizar la prueba cobas PIK3CA. Si la concentración de un stock de ADN es < 2 ng/ μ l, repita los procedimientos de desparafinación, aislamiento de ADN y cuantificación de ADN para la muestra en cuestión utilizando dos secciones de FFPE de 5 μ m. En los casos de las muestras colocadas en portaobjetos, tras la desparafinación, combine el tejido de ambas secciones en un tubo, sumerja el tejido en buffer de lisis del tejido de ADN (DNA TLB) + proteinasa K (PK) y lleve a cabo el aislamiento y la cuantificación de ADN tal y como se ha descrito anteriormente. En los casos de las muestras que no están colocadas en portaobjetos, combine ambas secciones en un tubo y lleve a cabo la desparafinación. Sumerja el tejido en DNA TLB + PK y lleve a cabo el aislamiento y la cuantificación de ADN tal y como se ha descrito anteriormente. Si el stock de ADN sigue siendo < 2 ng/ μ l, solicite otra sección de muestra FFPE al centro clínico correspondiente.

Amplificación y detección

Nota: para evitar la contaminación de las mezclas MMX de trabajo con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área distinta de la de aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Para llevar a cabo una limpieza adecuada, es necesario limpiar todas las superficies, incluidos pipeteadores y bandejas, primero con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % y luego con una solución de etanol al 70 %. La lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

Configuración del instrumento

Consulte la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para obtener instrucciones detalladas del cobas z 480 analyzer.

Configuración de las peticiones de pruebas

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de la prueba cobas PIK3CA, consulte la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System.

Cree un esquema de placas con la posición de todas las muestras y controles de la serie. El control de mutación (MC) se carga en las posiciones A01-A03 de la placa. El NEG se carga en las posiciones B01-B03 de la placa. A continuación se añaden las muestras diluidas en conjuntos de 3 columnas, comenzando por C01-C03 hasta H10-H12, tal como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Distribución de la placa para la prueba cobas PIK3CA

Fila/ Columna	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3
B	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3
C	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3
D	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3
E	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3
F	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3
G	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3
H	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3

Donde: MC = Control de mutación, NEG = Control negativo, S n.º = ID de muestra, y MMX n.º = reactivo de Master Mix 1, 2 o 3.

Nota: cualquiera de las muestras debe aparecer en tres columnas consecutivas de una fila para obtener una respuesta.

Nota: la solución Master Mix 1 de trabajo se debe cargar en las columnas 01, 04, 07 y 10 de la placa. La solución Master Mix 2 de trabajo se debe cargar en las columnas 02, 05, 08 y 11 de la placa. La solución Master Mix 3 de trabajo se debe cargar en las columnas 03, 06, 09 y 12 de la placa.

Nota: se pueden cargar hasta 30 muestras en una única placa. Si se necesita más de un kit de reactivo para procesar todas las muestras de la placa, entonces todos los kits deberán pertenecer al mismo lote.

Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra

Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN entre 2 ng/µl y 36 ng/µl

Nota: es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.

Nota: se realizan tres ciclos de amplificación/detección de cada muestra que requieren un volumen total de 75 µl (25 µl para cada una de las tres reacciones) de una dilución de 2 ng/µl de stock de ADN (un total de 150 ng de ADN).

1. Para cada muestra, se debe calcular el volumen (µl) de stock de ADN necesario:

$$\mu\text{l de stock de ADN} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{concentración de stock de ADN [ng}/\mu\text{l}]$$

2. Para cada muestra, se debe calcular el volumen (µl) de DNA SD necesario:

$$\mu\text{l de DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \mu\text{l de stock de ADN}$$

Ejemplo:

Concentración de stock de ADN = 6,5 ng/µl

1. $\mu\text{l de stock de ADN} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 27,7 \mu\text{l}$
2. $\mu\text{l de DNA SD} = (90 \mu\text{l} - 27,7 \mu\text{l}) = 62,3 \mu\text{l}$

Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN > 36 ng/μl

Nota: es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.

Nota: se realizan tres ciclos de amplificación/detección de cada muestra que requieren un volumen total de 75 μl (25 μl para cada una de las tres reacciones) de una dilución de 2 ng/μl de stock de ADN (un total de 150 ng de ADN).

1. Con concentraciones de stock de ADN > 36 ng/μl, utilice la fórmula siguiente para calcular la cantidad de **DNA SD** necesario para preparar al menos 90 μl de stock de ADN diluido. De esta manera se garantiza que cada muestra utilice como mínimo 5 μl de stock de ADN.
2. Para cada muestra, calcule el volumen de (μl) de **DNA SD** necesario para diluir 5 μl de stock de ADN en 2 ng/μl:

$$\text{Vol. de DNA SD necesario en } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l de stock de ADN} \times \text{concentración de stock de ADN en ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Ejemplo:

Concentración de stock de ADN = 100 ng/μl

1. Vol. de **DNA SD** necesario en μl = $[(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$
2. Utilice el volumen calculado de **DNA SD** para diluir 5 μl de stock de ADN.

Dilución de muestras

1. Prepare el número adecuado de tubos para microcentrifuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml para diluciones de ADN etiquetándolos con la identificación de muestra correspondiente.
2. Con un pipeteador equipado con una punta resistente a aerosoles, pipetee los volúmenes calculados de **DNA SD** en los tubos etiquetados correspondientes. Pipetee 45 μl de **DNA SD** en un tubo para microcentrifuga con tapa de bloqueo etiquetado como **NEG**.
3. Mezcle cada stock de ADN y el **NEG** mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.
4. Con un pipeteador con punta de pipeta resistente a aerosoles (una punta nueva para cada pipeteado), pipetee con cuidado el volumen calculado de cada stock de ADN en el tubo etiquetado correspondiente que contiene **DNA SD**. Pipetee 45 μl de **NEG** (elución extraída) en el tubo **NEG**.
5. Tape los tubos y agítelos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.
6. Cámbiese los guantes.

Configuración de las reacciones**Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3)**

Nota: las mezclas PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2, PIK3CA MMX-3 y MMX de trabajo son sensibles a la luz y se deben proteger de la exposición prolongada a la luz.

Nota: debido a la viscosidad de los reactivos PIK3CA y la mezcla MMX de trabajo, es importante pipetear con lentitud para asegurar que toda la muestra se dispensa por completo a través de la punta.

Nota: las mezclas PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2 y PIK3CA MMX-3 pueden adquirir un aspecto azul claro/púrpura. Esto no afecta el rendimiento del reactivo.

Prepare tres mezclas MMX de trabajo a granel: una con **PIK3CA MMX-1**, otra con **PIK3CA MMX-2** y la tercera con **PIK3CA MMX-3** en tubos para microcentrifuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml individuales.

1. Calcule el volumen de **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** o **PIK3CA MMX-3** necesario para cada solución MMX de trabajo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2 o PIK3CA MMX-3 necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Calcule el volumen de **MGAC** necesario para cada mezcla MMX de trabajo con la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de MGAC necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 7 \mu\text{l}$$

Utilice la Tabla 3 para determinar el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la mezcla MMX de trabajo a partir del número de muestras incluidas en cada serie.

Tabla 3: Volúmenes de reactivos necesarios para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 de trabajo según el número de muestras* analizadas

Reactivo	Volumen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 µl	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	7 µl	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
-	Vol. total para cada MMX de trabajo (µl)	108	135	162	189	216	243	270	297	324	351

* Los volúmenes para el número de muestras se calculan a partir de la suma del número de muestras + 2 controles + 1

3. Retire el número de viales necesarios de **PIK3CA MMX-1/PIK3CA MMX-2/PIK3CA MMX-3** y de **MGAC** de la nevera a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. Agite cada reactivo durante 5 segundos y espere a que se deposite el líquido en la parte inferior del tubo antes de utilizarlo. Etiquete un tubo para microcentrifuga estéril para la mezcla **MMX-1** de trabajo, **MMX-2** de trabajo y **MMX-3** de trabajo.
4. Añada el volumen calculado de **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** o **PIK3CA MMX-3** al tubo de MMX de trabajo correspondiente.
5. Añada el volumen calculado de **MGAC** a los tubos de MMX de trabajo.
6. Mezcle el contenido de los tubos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 3 a 5 segundos para obtener una mezcla adecuada.

Nota: las muestras y los controles deben añadirse a la placa de amplificación y detección durante la hora siguiente a la preparación de las mezclas MMX de trabajo.

Nota: utilice únicamente placas de amplificación y detección y películas de sellado para el cobas® 4800 System.

Preparación de la placa

1. Pipetee 25 µl de mezcla MMX de trabajo en cada pocillo de reacción de la placa de amplificación y detección necesario para la serie. No permita que la punta del pipeteador toque la parte exterior de la placa del pocillo.
 - Añada MMX-1 de trabajo (que contiene **PIK3CA MMX-1**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 01, 04, 07 y 10, según sea necesario.
 - Añada MMX-2 de trabajo (que contiene **PIK3CA MMX-2**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 02, 05, 08 y 11, según sea necesario.
 - Añada MMX-3 de trabajo (que contiene **PIK3CA MMX-3**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 03, 06, 09 y 12, según sea necesario.

2. Pipetee 25 µl de **PIK3CA MC** en los pocillos **A01**, **A02** y **A03** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.
3. Con una punta de pipeteador nueva, pipetee 25 µl de **NEG** en los pocillos **B01**, **B02** y **B03** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.

Nota: cada serie debe contener **PIK3CA MC** en los pocillos **A01**, **A02** y **A03**, y un control negativo **NEG** en los pocillos **B01**, **B02** y **B03**. En caso contrario, el **cobas z 480 analyzer** invalidará la serie.

Nota: cámbiese los guantes según sea necesario para evitar la contaminación entre muestras y en el exterior de los tubos para reacción de la PCR.

4. Con puntas de pipeteador nuevas para cada ADN de muestra diluida, añada 25 µl del primer ADN de la muestra a los pocillos **C01**, **C02** y **C03** de la placa de amplificación y detección con una punta nueva para la adición del ADN de la muestra a cada pocillo y mezcle la solución en cada pocillo con una pipeta para aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces. Repita este procedimiento con el ADN diluido de cada muestra y siga la plantilla de la Tabla 2 hasta que todas las diluciones de ADN de las muestras estén cargadas en la placa de amplificación y detección. Asegúrese de que todo el líquido se deposite en la parte inferior de los pocillos.
5. Tape la placa de amplificación y detección con la película de sellado (suministrada con las placas). Utilice el sellador para sellar bien la película en la placa de amplificación y detección.
6. Compruebe que todo el líquido se deposite en la parte inferior de cada pocillo antes de iniciar la PCR.

Nota: los procesos de amplificación y detección deben iniciarse en el plazo de 1 hora después de añadir la primera dilución de ADN de la muestra a la mezcla **MMX** de trabajo.

Inicio de la PCR

Consulte la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System** para obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo para **PIK3CA**. Cuando aparezca la ventana emergente "Select test", seleccione el tipo de flujo de trabajo "PCR Only" y, a continuación, marque la opción "PIK3CA P1" y haga clic en el botón "OK".

Resultados

Interpretación de los resultados

Nota: la validación de las series y las muestras la lleva a cabo el cobas® 4800 software.

Nota: una serie de pruebas válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

En las series consideradas válidas, los resultados de las muestras se interpretan tal como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4: Interpretación de los resultados de la prueba cobas PIK3CA

Resultado de la prueba	Resultado de la mutación	Interpretación
Mutation Detected	R88Q	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	N345K	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	C420R	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	E542K	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	E545X (E545A, E545D*, E545G o E545K)	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	Q546X (Q546E, Q546K, Q546L o Q546R)	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	M1043I**	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	H1047X (H1047L, H1047R o H1047Y)	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	G1049R	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
Mutation Detected	(Puede existir más de una mutación)	Se ha detectado una mutación en la región diana especificada del PIK3CA.
No Mutation Detected	N/A	No se ha detectado ninguna mutación en las regiones diana del PIK3CA.
Invalid	N/A	El resultado de la muestra no es válido. Repita el análisis de las muestras cuyos resultados no sean válidos según las instrucciones que encontrará en el apartado "Repetición del análisis de las muestras con resultados no son válidos" que figura más adelante.
Failed	N/A	Serie errónea debido a un problema de hardware o software. Póngase en contacto con su oficina de Roche para recibir asistencia técnica.

* Para el cambio de aminoácido E545D, la prueba solo detecta la mutación c.1635G>T del cambio de nucleótido.

** Para el cambio de aminoácido M1043I, la prueba solo detecta la mutación c.3129G>T del cambio de nucleótido.

Nota: un resultado "No Mutation Detected" no excluye la presencia de una mutación en las regiones diana del PIK3CA porque los resultados dependen del porcentaje de secuencias mutadas, de una correcta integridad de las muestras, de la ausencia de inhibidores y de que haya ADN suficiente para la detección.

Anexo 7. VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody



VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4493
06999670001

IVD 50

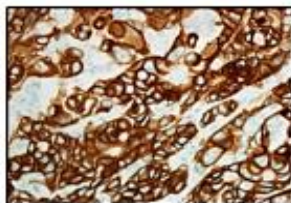


Figura 1. Tinción 3+ del carcinoma gástrico con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5).

USO PREVISTO

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody está destinado a su uso en laboratorio para la detección semicuantitativa del antígeno HER2 en secciones de tejido de mama normal o neoplásica y de tejido gástrico fijado con formalina y embebido en parafina, teñidas en un instrumento Benchmark IHC/ISH. Este producto se ha indicado como ayuda en la evaluación de pacientes con cáncer de mama o gástrico para los que se está planteando un tratamiento con Herceptin®

(trastuzumab) o para las pacientes con cáncer de mama para las que se contempla la administración de un tratamiento con KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansina) o PERJETA® (pertuzumab).

La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados.

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico in vitro (IVD).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El anticuerpo VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5)) es un anticuerpo monoclonal de conejo (don 4B5) generado contra el dominio intrínseco del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). La clonación y la caracterización de HER2 corresponden a Akiyama et al en el año 1986.¹ El clon 4B5 ha demostrado su reacción a la proteína de 185 kD de los lisados celulares de SK-BR-3 mediante la técnica Western blotting. SK-BR-3 es una estirpe celular del carcinoma de mama con una sobreexpresión de 128 del mRNA de HER2.² El tamaño de la banda que se ha identificado se corresponde adecuadamente con el confirmado por Akiyama et al en el caso de la proteína HER2 (185 kD).¹ Los experimentos de inmunohistoquímica (IHC) con líneas celulares transfectadas (HEK293) han demostrado que el don 4B5 tiene las células transfectadas con HER2 y con HER1. No se ha observado la tinción de células transfectadas con HER1 ni con HER3. Los datos de la técnica Western blotting con una proteína recombinante HER4 también sugieren que el clon 4B5 detecta el epítopo HER4.

HER2 es un receptor transmembrana de tirosina quinasa de 185 kD con una estructura parecida a la del receptor del factor de crecimiento epidérmico.^{3,4} La amplificación del gen y la correspondiente sobreexpresión de HER2 se ha observado en una variedad de tumores, como los carcinomas gástricos y de mama.^{3,4,5} La sobreexpresión de proteína, inducida por la amplificación del gen HER2, es la causa principal de la carcinogénesis inducida por HER2.³ El exceso de la expresión de la proteína HER2 en la membrana celular aumenta la señal de transducción, con la consecuente hiperactivación de la proliferación y la diferenciación que, en último término, provoca la formación de tumores.^{3,4,5}

Entre el 15 y el 30 % de los cánceres ductales invasivos son positivos en la sobreexpresión de proteína HER2 y/o en la amplificación del gen.^{6,7} Casi todos los casos de la enfermedad de Paget en mama y hasta el 90 % de los casos del carcinoma ductal in situ de tipo comedo son positivos.^{6,8} La sobreexpresión de proteína HER2 y/o la amplificación del gen se dan en los adenocarcinomas gástricos y de la unión gastroesofágica.^{9,10,11} En los estudios publicados se ha comunicado un amplio intervalo de la frecuencia de la sobreexpresión de HER2. No obstante, en uno de los conjuntos de

datos de cribado más numerosos, que contenía los datos de 3803 pacientes con adenocarcinoma gástrico y de unión gastroesofágica se comunicó que un 22 % de los pacientes contaban con resultados positivos en la sobreexpresión de proteína HER2 o la de amplificación del gen.¹²

IMPORTANCIA CLÍNICA

El cáncer de mama es el carcinoma más habitual en mujeres y es la segunda causa de mortalidad por cáncer.^{4,6} En Norteamérica, la probabilidad de una mujer de contraer cáncer de mama es de una entre ocho.⁴ La detección temprana y los tratamientos adecuados tienen una importante repercusión en la supervivencia global.^{13,14} Las muestras pequeñas de tejido se pueden utilizar fácilmente en los análisis mediante IHC rutinarios, lo que aporta a esta técnica, junto con los anticuerpos que detectan los antígenos, suma importancia en la interpretación del carcinoma y la convierte en una herramienta eficaz para el anatomopatólogo a la hora de llevar a cabo el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad. Uno de los marcadores importantes del cáncer de mama en la actualidad es la oncoproteína HER2.¹⁵⁻¹⁸ Los tratamientos con fármacos como Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) y KADCYLA (ado-trastuzumab emtansina/trastuzumab emtansina) han demostrado ser útiles en los pacientes con carcinoma de mama, dado que debilitan y, en algunas ocasiones, invierten el crecimiento del cáncer.¹⁵⁻¹⁹ Estos fármacos son anticuerpos monoclonales humanizados que se unen a la proteína HER2 en las células cancerosas.^{7,15,18,19} Los métodos de diagnóstico in vitro para la evaluación del estado de HER2 en pacientes con cáncer de mama son cruciales para ayudar al facultativo a determinar el tratamiento dirigido contra HER2.¹⁵⁻¹⁸ La detección mediante IHC de la expresión de la proteína HER2 puede ser de utilidad en la evaluación de los pacientes con cáncer de mama para los que se está planteando la aplicación de un tratamiento dirigido contra HER2 con Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) o KADCYLA (trastuzumab emtansina).

El cáncer gástrico es el quinto cáncer más habitual y es la principal causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial.¹⁰ El tratamiento más habitual del cáncer gástrico es la cirugía.^{11,20} Sin embargo, la mayor parte de los casos de cáncer gástrico se detectan en un estado avanzado de la enfermedad y a menudo es complicado llevar a cabo la cirugía.^{11,20} La quimioterapia se emplea para el tratamiento del cáncer gástrico avanzado aunque el índice de supervivencia de los pacientes con cáncer es muy reducido.^{11,20} El tratamiento dirigido a HER2 con trastuzumab es el puntal de la gestión del carcinoma de mama invasivo y tiene un gran valor terapéutico en la gestión del cáncer gástrico en pacientes con sobreexpresión del receptor.^{9,11} La manifestación de la amplificación del gen HER2 y/o de la sobreexpresión de proteína es fundamental para seleccionar a los pacientes a los que asignar el tratamiento con trastuzumab.^{9,11} Los estudios clínicos han demostrado que los pacientes con cáncer de mama o gástrico con una elevada sobreexpresión de proteína HER2 y/o la amplificación del gen responden mejor al tratamiento con trastuzumab.⁹ La detección mediante IHC de la expresión de la proteína HER2 sirve como ayuda en la evaluación de los pacientes con cáncer gástrico para los que se está planteando un tratamiento con Herceptin (trastuzumab).

En la interpretación de los resultados de cualquier sistema de detección de HER2 se debe tener en cuenta el hecho de que la expresión de HER2 se observa tanto en los tumores del cáncer de mama y gástrico como en el tejido sano, aunque con diferentes niveles y distintos patrones de expresión.^{10,21} La preparación de los tejidos histológicos deja la morfología del tejido intacta, lo que supone una ventaja que contribuye a la interpretación de la positividad en HER2 de la muestra.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) es un anticuerpo monoclonal de conejo que se une a HER2 en secciones de tejido fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE). El anticuerpo específico se puede localizar mediante una formulación de anticuerpo secundario conjugado con biotina que detecta inmunoglobulinas de conejo seguida de la incorporación de peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (VIEW DAB Detección Kit) mediante un conjugado de anticuerpo secundario y HRP (VIEW Universal DAB Detección Kit). El complejo anticuerpo-enzima específico se puede visualizar a través del precipitado del producto de la reacción enzimática. En cada paso deben aplicarse con precisión tanto el tiempo como la temperatura de incubación. Cuando finaliza cada uno de los pasos de incubación, las secciones se enjuagan en el instrumento con el fin de detener la reacción y eliminar el material que no se ha ligado y que podría impedir la reacción que se quiere lograr en los pasos posteriores. Además, en el instrumento se aplica el Líquid Coverslip, que reduce al máximo la evaporación de los reactivos acuosos del portaobjetos que contiene la muestra.

Los casos dudosos se deberían evaluar dentro del contexto del rendimiento de los controles correspondientes. Se recomienda la incorporación de un control de tejido positivo fijado y procesado con el mismo método que la muestra de la paciente (por ejemplo, un carcinoma de mama o gástrico positivo débil). Además de la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5), se debe teñir un segundo portadjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Para que la prueba tenga validez, el tejido de control positivo debe presentar tinción de membrana en las células tumorales. Todos estos componentes deben dar resultado negativo en la tinción con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Además, se recomienda incluir un portadjetos de control tisular negativo (como un carcinoma de mama o gástrico negativo en HER2) en cada lote de muestras que se procesen y se analicen en el instrumento BenchMark IHC/ISH. Este control tisular negativo debería teñirse con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) para garantizar que la amplificación del antígeno y el resto de procedimientos previos al tratamiento no generan falsos positivos en las tinciones.

MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) contiene reactivo suficiente para 50 pruebas. Un dispensador de 5 mL de anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) contiene aproximadamente 30 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno HER2 humano.

El anticuerpo se diluye en un tampón salino formado por 0,05 M Tris, 0,01 M EDTA y Brij-35 al 0,05 % con una proteína transportadora al 0,3 % y ácido sódico al 0,05 %, un conservante. Existen trazas de aproximadamente un 0,25 % de suero bovino fetal de la solución de partida.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 6 µg/mL. El anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) es un IgG de conejo diluido de sobrenadantes de cultivo tisular.

Consulta en la hoja de datos correspondiente del kit de detección de VENTANA las descripciones detalladas de: Principio del procedimiento, Material y métodos, Recogida y preparación de muestras para análisis, Procedimientos de control de calidad, Resolución de problemas, Interpretación de los resultados y Limitaciones.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

No se suministran reactivos de tinción como los kits de detección de VENTANA ni componentes auxiliares, incluyendo portadjetos de control de tejido negativos y positivos.

No todos los productos que aparecen en la hoja de datos están disponibles en todos los lugares. Consulte al representante local de asistencia técnica de Roche.

No se suministran los reactivos y materiales siguientes, pero pueden ser necesarios para la tinción:

1. Tejido de control recomendado
2. Portadjetos para microscopio con carga positiva
3. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (n.º cat. 790-4795 / 0668338001)
4. *in-situ* View DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269805001)
5. MEX DAB Detection Kit (n.º cat. 760-091 / 05266157001 [50 pruebas])
6. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353959001)
8. LCS (Pre dilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Pre dilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424969001)
12. Hematoxín II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
14. Equipo de laboratorio de uso general
15. Instrumento BenchMark IHC/ISH

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Tras la recepción y cuando no se utilice, consérvese entre 2 y 8 °C. No lo congele.

Para garantizar una dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, vuelva a poner el tapón del dispensador después de cada uso y almacene inmediatamente el dispensador en la nevera, en posición vertical.

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y los instrumentos BenchMark IHC/ISH. El fijador de tejido recomendado es formal tamponado neutro al 10%.²² Los portadjetos deberían teñirse inmediatamente, ya que la antigenidad de las secciones de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo.

Se recomienda que los controles positivos y negativos se ejecuten simultáneamente con muestras desconocidas.

Es necesario cortar secciones de tejido de un grosor aproximado de 4 µm y recogerlas en el portadjetos de vidrio. Los portadjetos deberán ser del tipo Superfrost Plus o equivalente. Los estudios señalan que las secciones de tejido que se han dejado secar al aire y las secciones de estípes celulares almacenadas a una temperatura de entre 2 y 8 °C se conservan estables durante seis meses. En cada laboratorio se deberá validar la estabilidad del corte del portadjetos en función de sus propios procedimientos y de sus condiciones del entorno de conservación.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. Los portadjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portadjetos.
6. Es posible que no esté disponible en todas las regiones el uso de este producto para la selección de pacientes que cumplen los requisitos de idoneidad para administrar un tratamiento con KADCYLA o PERJETA. Consulte a su representante local de servicio Roche para confirmar la disponibilidad en ubicaciones concretas.
7. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{23,24}
8. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
9. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
10. Si se utiliza tal y como se indica en las instrucciones, este producto no se clasifica como una sustancia biopeligrosa. El conservante del reactivo es ácido sódico. Los indicios de sobreexposición a esta sustancia pueden ser, entre otros, irritación en la piel y los ojos e irritación en las membranas mucosas y las vías respiratorias altas. La concentración de ácido sódico que contiene este producto es 0,05 % y no cumple los criterios necesarios para clasificarla como sustancia peligrosa. La acumulación de NaOH puede reaccionar con los componentes de plomo y cobre de las tuberías y generar ácidos metálicos extremadamente explosivos. Cuando se vaya a eliminar, añada grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de ácidos en las tuberías.²⁵ Es posible que se presenten reacciones alérgicas sistémicas en personas con mayor sensibilidad.
11. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios que puede encontrar en diag.roche.com.
12. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
13. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directivas del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
14. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Los anticuerpos primarios VENTANA se han desarrollado para su uso en los instrumentos BenchMark IHC/ISH junto con los kits de detección de VENTANA y sus accesorios. Consulte las tablas que aparecen a continuación para ver los protocolos de tinción recomendados.

Este anticuerpo se ha optimizado para periodos de incubación específicos, pero el usuario debe validar los resultados obtenidos con este reactivo.

Los parámetros de los procedimientos automatizados se pueden mostrar, imprimir y editar según el procedimiento descrito en el Manual del usuario de los instrumentos. Consulte la hoja de datos del kit de detección VENTANA correspondiente para obtener más detalles sobre los procedimientos de tinción de inmunohistoquímica.

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con PIN 790-4493.

Tabla 1. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) con VENTANA DAB Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Estándar	CC1, Estándar	ULTRA CC1, Suave
Anticuerpo (Primario)	32 minutos, 37 °C	32 minutos, 37 °C	24 minutos, 36 °C
A/B Block (Biotin Blocking)	No seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

Tabla 2. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) con VENTANA Universal DAB Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Suave	CC1, Suave	ULTRA CC1, Suave
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 37 °C	12 minutos, 36 °C
ultraWash	Seleccionado		
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, así como a las condiciones generales de los instrumentos y del entorno del laboratorio, puede que sea necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario o el acondicionamiento celular en función de las muestras particulares, de la detección que se haya utilizado y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».²⁶

En la Tabla 3 se indican los procedimientos de tinción recomendados para los carcinomas de mama y gástricos.

Tabla 3. Procedimientos de tinción en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS
Carcinoma de mama	Procedimiento de tinción VENTANA DAB o VENTANA Universal DAB*	Procedimiento de tinción VENTANA DAB o VENTANA Universal DAB*	Procedimiento de tinción VENTANA DAB o VENTANA Universal DAB*
Carcinoma gástrico	Gástrico GX VENTANA DAB HER2 4B5 (Tabla 2)	Gástrico XT VENTANA DAB HER2 4B5 (Tabla 2)	Gástrico ULTRA VENTANA DAB HER2 4B5 (Tabla 2)

* En las muestras de carcinoma de mama que se tiñen con los instrumentos BenchMark IHC/ISH se emplean los procedimientos de tinción con VENTANA DAB Detection Kit (Tabla 1) o VENTANA Universal DAB Detection Kit (Tabla 2)

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Controles del sistema de líneas celulares

Ventana pone a su disposición, por separado, cuatro controles de líneas celulares fijados con formol y embebidos en parafina, cortados y colocados en un único portaobjetos cargado. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (con n.º de referencia 781-299) pueden resultar útiles a la hora de llevar a cabo la validación preliminar del método de procesamiento que se utiliza para la tinción de los tejidos con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5). Los cuatro controles de líneas celulares se caracterizan por la hibridación in situ para obtener el número de copias del gen, tal y como se muestra en la Tabla 4. Cuando se procesan y se tiñen adecuadamente, la tinción de las líneas celulares debería aparecer tal y como se describe en la hoja de datos de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide. Si la tinción indicada no es evidente en las secciones correspondientes, concretamente en los controles 1+ y 2+, debería repetirse la tinción de los tejidos.

Tabla 4. Características de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

Puntuación IHC de HER2	Estirpe celular	Proporción HER2/Chr17*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* La proporción HER2/Chr17 es el resultado de la media de tres lotes de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides obtenida mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH).

CONTROL DE TEJIDO POSITIVO

Se debe utilizar un tejido de control positivo que se haya fijado y procesado de la misma forma que las muestras del paciente con cada conjunto de condiciones de la prueba y en cada uno de los procedimientos de tinción con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) que se lleven a cabo. La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad. El tejido de control puede contener elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra de autopsia reciente, biopsia o cirugía, preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba.

Estos tejidos se utilizan para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el proceso, desde la preparación del tejido hasta la tinción. El uso de una sección de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra de la prueba actúa como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y preparación de tejidos. La opción más idónea es elegir un tejido que se caracterice por una tinción débil pero positiva, para garantizar que el sistema es sensible a pequeños niveles de degradación de reactivos o a problemas con la metodología IHC. Sin embargo, habitualmente los tejidos neoplásicos positivos en HER2 suelen dar como resultado una tinción positiva fuerte dada la naturaleza de la patología (sobrexpresión).

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los reactivos y los instrumentos, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras de prueba. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Como ejemplo de tejido de control positivo para el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) se encuentra el tejido de carcinoma de mama invasivo positivo o las muestras de carcinoma gástrico con positividad débil conocida en HER2. Los componentes de tinción positiva del tejido (tinción membranosa de células neoplásicas) sirven para comprobar que el anticuerpo se ha aplicado y el instrumento ha funcionado correctamente.

Control tisular negativo

El mismo portaobjetos que se utiliza como control de tejido positivo (carcinoma ductal o lobulillar invasivo de mama o carcinoma gástrico) puede servir como control tisular negativo. En los componentes sin tinción (como el estroma, las células linfáticas y los vasos sanguíneos arredondados) debería observarse una absoluta ausencia de tinción específica y deberían ofrecer una indicación sobre la tinción de fondo específica (falso positivo) con el anticuerpo primario. Utilice un tejido negativo conocido con una fijación, procesamiento e inclusión idénticos a los de la muestra del paciente.

Control de reactivo negativo

Se debe utilizar el control de reactivo negativo de cada muestra en cada sesión como ayuda para la interpretación de los resultados. Para evaluar la tinción no específica se utiliza un control de reactivo negativo en lugar del anticuerpo primario. La tinción del portaobjetos debería realizarse con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. El período de incubación del control de reactivo negativo debe ser idéntico al del período de incubación del anticuerpo primario.

Discrepancias no explicadas

Las discrepancias no explicadas en los controles deberían comunicarse al representante local de asistencia técnica de Roche de forma inmediata. Si los resultados de los controles de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no serán válidos. Consulte la sección sobre Resolución de problemas. Identifique el problema y corrija, a continuación, repita las muestras del paciente.

Verificación del ensayo

Antes de comenzar a utilizar un anticuerpo o un sistema de tinción en un procedimiento diagnóstico, se debe comprobar la especificidad del anticuerpo mediante pruebas en una serie de tejidos que contengan características de rendimiento en inmunohistoquímica conocidas y que reflejen tejidos positivos y negativos conocidos (consulte la sección Procedimientos de control de calidad que se ha mencionado anteriormente y que se encuentra en la hoja de datos del producto y las recomendaciones sobre control de calidad de College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist²⁷, CLSI Approved Guideline²⁸ o todos ellos). Estos procedimientos de control de calidad se deberían repetir con cada lote nuevo de anticuerpo o siempre que se cambien los parámetros del ensayo. Los tejidos de cáncer de mama y gástrico con un estado de HER2 conocido son adecuados para la verificación del ensayo.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El procedimiento de inmunotinción automatizada VENTANA provoca que un producto de reacción con color marrón (DAB) se precipite en los puntos del antígeno que localiza el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5). Un anatomopatólogo cualificado con experiencia en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles y calificar el producto con tinción antes de interpretar los resultados.

Controles positivos

Debe examinarse el control de tejido positivo con tinción en primer lugar para comprobar que todos los reactivos han funcionado correctamente. La existencia de un producto de reacción con el color adecuado en las membranas de las células diana indica una reactividad positiva. En función de la duración de la incubación y de la potencia de la hematoxilina que se haya utilizado, la contraindicación puede dar como resultado una coloración azul, más clara o más oscura, en los núcleos celulares. Una contraindicación excesiva o incompleta puede poner en riesgo la interpretación correcta de los resultados. Si el control de tejido positivo no muestra una tinción positiva, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Controles tisulares negativos

El control tisular negativo se debe estudiar después del control de tejido positivo para comprobar el etiquetado específico del antígeno diana mediante el anticuerpo primario. La ausencia de una tinción específica en el control de tejido negativo confirma la falta de

reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se lleva a cabo una contraindicación del tejido, es posible que se observe tinción alrededor de la parte exterior de la célula, como en los espacios intersticiales. Si se presenta una tinción específica en el control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

Controles de reactivo negativo

De presentarse tinción no específica, tendrá una apariencia difusa. También es posible observar una ligera tinción esporádica en el tejido conjunto en aquellas secciones de tejido que se han fijado excesivamente con formol. Se deben utilizar células intactas para la interpretación de los resultados de tinción, ya que la tinción de las células necróticas o degeneradas suele ser no específica.

Tejido del paciente

Las muestras del paciente se deben examinar en último lugar. La intensidad de la tinción positiva deberá evaluarse en contexto junto con la tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como ocurre en todas las pruebas de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno en concreto, no necesariamente que este no esté presente en las células o en el tejido que se ha usado para el ensayo. Siempre que se vaya a interpretar un resultado de inmunohistoquímica, debería examinarse también la morfología de cada muestra de tejido mediante una sección de tejido con tinción de hematoxilina y eosina. La interpretación de las conclusiones morfológicas del paciente y los datos clínicos pertinentes deben dejarse en manos de un anatomopatólogo cualificado.

Un anatomopatólogo cualificado con experiencia en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles positivos y negativos y calificar el producto con tinción antes de interpretar los resultados.

Convenciones de puntuación para la interpretación del anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) en carcinoma de mama

Para que los carcinomas de mama se consideren positivos en la sobreexpresión de proteína HER2, deben cumplirse los criterios límite en cuanto a la intensidad de la tinción (2+ o superior en una escala de 0 a 3+) y al porcentaje de células tumorales positivas (superior al 10%). La tinción debe localizarse, además, en la membrana celular. Podría observarse una tinción citoplasmática, pero esta tinción no debe incluirse en los criterios de establecimiento de la positividad. Escanee la sección de tejido completa para garantizar la puntuación únicamente en las zonas bien conservadas y con tinción adecuada. A una tinción que rodea por completo la membrana citoplasmática debería asignarse una puntuación de intensidad de +2+ o de +3+. A la tinción parcial de la membrana se debería asignar la puntuación +1+. Es posible que sea necesario estudiar los casos límite con un aumento de 40x o superior para poder discriminar entre las intensidades de +1+ y +2+. A diferencia de los casos con una puntuación de intensidad +3+, las puntuaciones de tinción +2+ contienen un anillo con una delimitación muy clara y nítida, mientras que los casos con puntuaciones +3+ presentan un perfil mucho más grueso. A continuación se expone un gráfico de referencia rápida sobre los criterios de tinción. Consulte la *Guía de interpretación de la tinción del carcinoma de mama y del carcinoma gástrico con VENTANA anti-HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody* (n.º de ref. 1012716) para obtener una descripción más detallada con imágenes de la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5).

Tabla 5. Criterios de intensidad y patrón de la tinción de membrana celular con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) en carcinoma de mama.

Patrón de tinción	Puntuación (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Evaluación de la tinción HER2
No se observa tinción de membrana	0	Negativa
Tinción difusa y parcial de la membrana en cualquier proporción de células cancerosas	1+	Negativa
Tinción de débil a moderada completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas > 10%	2+	Equívoca*

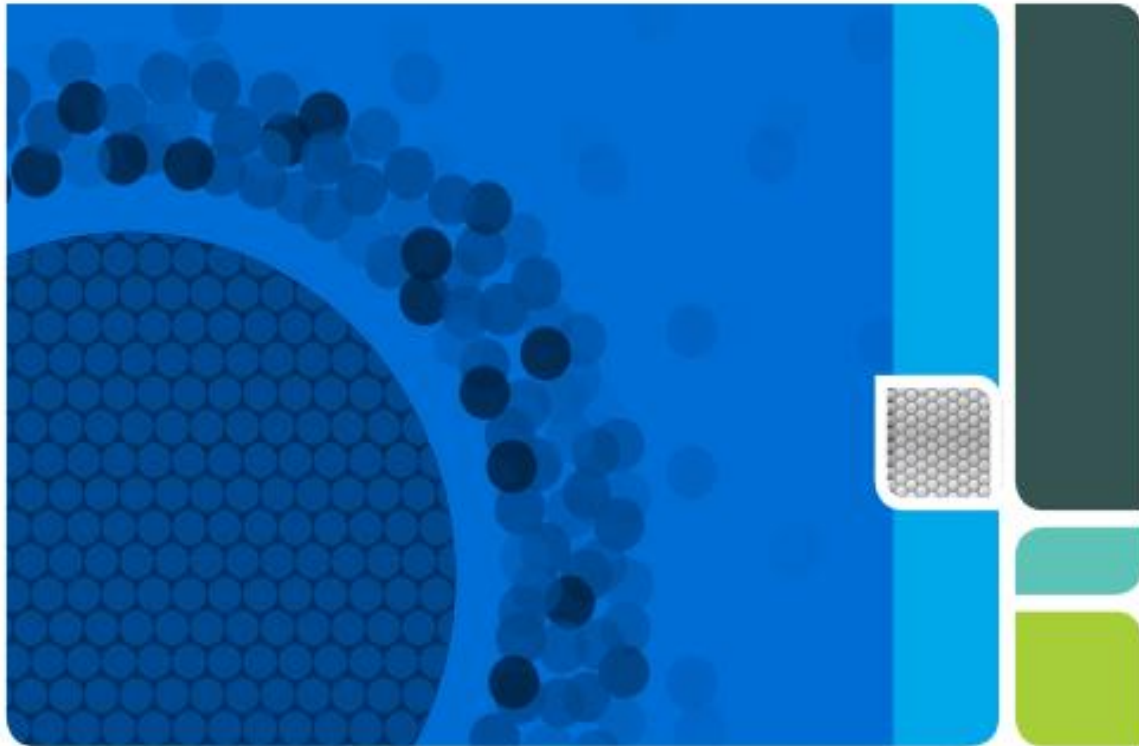
Patrón de tinción	Puntuación (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Evaluación de la tinción HER2
Tinción intensa completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas > 10 %	3+	Positiva

*Se recomienda reflejar en ISH

Fuente: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/2acdad4e-4413-ea11-fa90-005056a772fd?countryIsoCode=es>

Anexo 8. Droplet Digital PCR

Droplet Digital™ PCR



Droplet Digital™ PCR
Applications Guide

BIO-RAD

1 Droplet Digital™ PCR

Introduction

Droplet Digital polymerase chain reaction (ddPCR™) was developed to provide high-precision, absolute quantification of nucleic acid target sequences with wide-ranging applications for both research and clinical diagnostic applications. ddPCR measures absolute quantities by counting nucleic acid molecules encapsulated in discrete, volumetrically defined water-in-oil droplet partitions. Droplet Digital PCR using Bio-Rad's QX100™ or QX200™ Droplet Digital PCR system overcomes the previous lack of scalable and practical technologies for digital PCR implementation.

ddPCR has the following benefits for nucleic acid quantification:

- Unparalleled precision — the massive sample partitioning afforded by ddPCR enables small fold differences in target DNA sequence between samples to be reliably measured
- Increased signal-to-noise — enrich for rare targets by reducing competition that comes from high-copy templates
- Removal of PCR efficiency bias — error rates are reduced by removing the amplification efficiency reliance of PCR, enabling accurate quantification of targets
- Simplified quantification — a standard curve is not required for absolute quantification

QX100/QX200 Workflow

Bio-Rad's QX100 or QX200 ddPCR System (Figure 1.1) combines water-oil emulsion droplet technology with microfluidics. The QX200 Droplet Generator partitions samples into 20,000 droplets (Figure 1.2). PCR amplification is carried out within each droplet using a thermal cycler. After PCR, droplets are streamed in single file on a QX200 Droplet Reader, which counts the fluorescent positive and negative droplets to calculate target DNA concentration.



Fig. 1.1. QX200 ddPCR System with associated consumables.



Fig. 1.2. In ddPCR, a single PCR sample is partitioned into 20,000 discrete droplets.

Droplet Generation

Before droplet generation, ddPCR reactions are prepared in a similar manner as real-time PCR reactions that use TaqMan hydrolysis probes labeled with FAM and HEX (or VIC) reporter fluorophores, or an intercalating dye such as EvaGreen®.

ddPCR must be performed with the proprietary reagents developed specifically for droplet generation by Bio-Rad. Reagent mixes include the ddPCR Supermix for Probes and QX200™ ddPCR™ EvaGreen® Supermix to partition DNA, and the One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes.

Samples are placed into a QX100 or QX200 Droplet Generator, which uses specially developed reagents and microfluidics to partition each sample into 20,000 nanoliter-sized droplets. As shown in Figure 1.3, target and background DNA are distributed randomly into the droplets during the partitioning process.

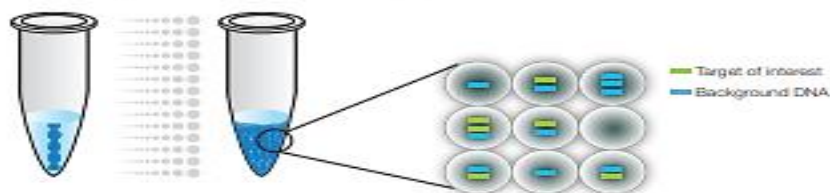


Fig. 1.3. In ddPCR, a single PCR sample is partitioned into 20,000 droplets.

Droplet generation produces uniform droplets for the sample, enabling precise target quantification (Figure 1.4).

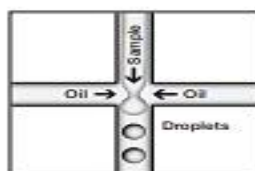


Fig. 1.4. The droplets created by the QX200 Droplet Generator are uniform in size and volume.

Droplet Digital PCR

PCR Amplification

Droplets are transferred to a 96-well plate for PCR in a thermal cycler. We recommend the C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-deep well reaction module for PCR (Figure 1.5). This high-performance thermal cycler has excellent temperature uniformity and settling across all 96 wells to help ensure successful PCR.



Fig. 1.5. The C1000 Touch Thermal Cycler provides robust performance for ddPCR experiments.

Droplet Reading

Following PCR amplification of the nucleic acid target in the droplets, the plate containing the droplets is placed in a QX100 or QX200 Droplet Reader, which analyzes each droplet individually using a two-color detection system (set to detect FAM and HEX [or VIC]).

The autosampler of the droplet reader picks up the droplets from each well of the PCR plate (Figure 1.6).



Fig. 1.6. QX200 Droplet Reader autosampler.

Droplets are spaced out individually for fluorescence reading by the droplet reader (Figure 1.7). Fluorescence in two channels is then measured for individual droplets.

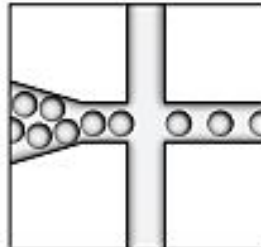


Fig. 1.7. Separating individual droplets in the QX100 Droplet Reader.

Positive droplets, which contain at least one copy of the target DNA molecule, exhibit increased fluorescence compared to negative droplets (Figure 1.8).

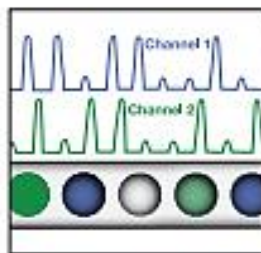


Fig. 1.8. Fluorescence readings are measured for each droplet in two channels.

ddPCR Data Analysis

Droplet Digital PCR data can be viewed as a 1-D plot with each droplet from a sample plotted on the graph of fluorescence intensity vs. droplet number. In Figure 1.9, all positive droplets, those above the red threshold line, are scored as positive and each is assigned a value of 1. All negative droplets, those below the red threshold line, are scored as negative and each is assigned a value of 0.

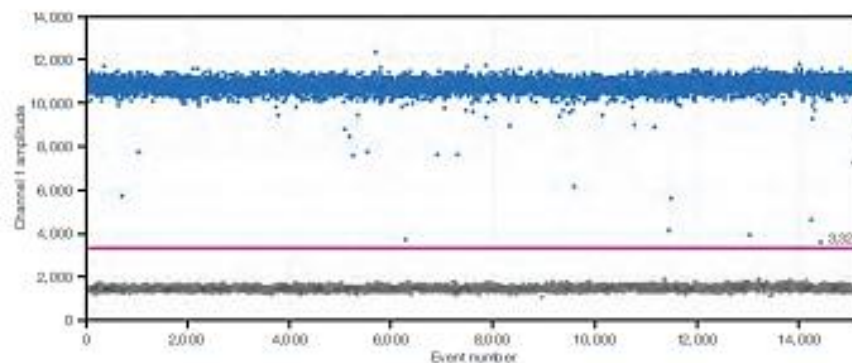


Fig. 1.9. Each droplet from a sample is plotted on the graph of fluorescence intensity vs. droplet number.

Droplet Digital PCR data from a duplex experiment in which two targets are PCR amplified can also be viewed in a 2-D plot in which channel 1 fluorescence (FAM) is plotted against channel 2 fluorescence (HEX or VIC) for each droplet (Figure 1.10).

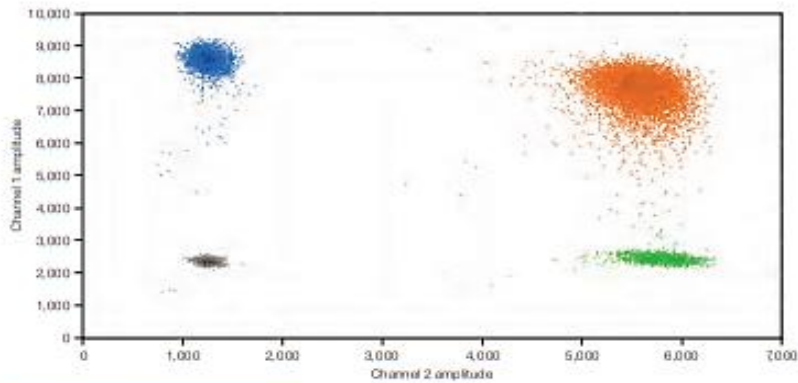


Fig. 1.10. 2-D plot of droplet fluorescence.

Because the DNA distribution into the droplets follows a random pattern, droplets cluster into four groups:

- FAM negative, HEX negative (double-negative droplets)
- FAM positive, HEX negative
- FAM negative, HEX positive
- FAM positive, HEX positive (double-positive droplets)

QuantaSoft™ Software measures the number of positive and negative droplets for each fluorophore in each sample. The software then fits the fraction of positive droplets to a Poisson algorithm to determine the starting concentration of the target DNA molecule in units of copies/μl input (Figure 1.11).

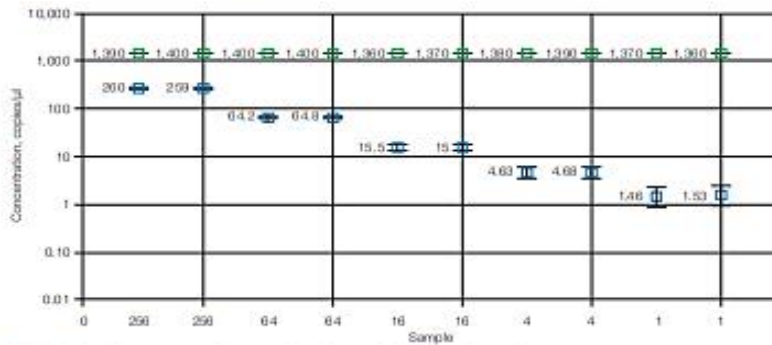


Fig. 1.11. Sample concentrations are plotted as copies/μl from the sample.