

VALIDACIÓN INICIAL DE ENSAYO DE SECUENCIACIÓN MASIVA EN BIOPSIA LÍQUIDA PARA DETECTAR EL MARCADOR ONCOGÉNICO PIK3CA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

INITIAL VALIDATION OF LIQUID BIOPSY MASS SEQUENCING ASSAY FOR DETECTION OF THE ONCOGENIC MARKER PIK3CA IN BREAST CANCER PATIENTS

Isabella D`Achiardi Meza^{a*}

Isabel Maldonado Brito^a

Valentina Vera Leonelli^a

^aEstudiante de Tecnología Médica, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

Artículo recibido el 6 de febrero, 2024. Aceptado en versión corregida el 22 de mayo, 2024.

RESUMEN

Introducción: En Chile, las técnicas aprobadas para la detección de mutaciones en biopsias líquidas son variantes de la reacción en cadena de la polimerasa, siendo la técnica de referencia. No obstante, la secuenciación masiva presenta ventajas, sirviendo para el monitoreo y selección del tratamiento de patologías como el cáncer de mama. Según estándares de laboratorio clínico internacionales, se realizó la comparación de la técnica evaluada con la de referencia, necesarias para la validación e implementación en pacientes con cáncer de mama. **Objetivo:** Realizar la validación inicial de un protocolo de secuenciación masiva capaz de detectar mutaciones en PIK3CA del ADN tumoral circulante de dichos pacientes. **Metodología:** Se obtuvieron 11 muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama avanzado, donde se realizó la secuenciación del ADN extraído y se evaluó la detección de tres mutaciones en PIK3CA mediante una reacción en cadena de la polimerasa, y los resultados se compararon mediante una tabla de contingencia y la prueba de McNemar. **Resultado:** La prueba exacta de McNemar dio un valor $p > 0,05$ y la técnica evaluada tuvo una sensibilidad y especificidad del 100%, con una concordancia de 1. **Discusión:** La costo-efectividad de la secuenciación masiva es mayor por sobre los ensayos genéticos singulares, pero se deben tener en cuenta las limitaciones de ambas técnicas. **Conclusión:** Se encontró un alto nivel de concordancia entre las técnicas, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos. Aun así, se debería continuar la validación de este ensayo en el futuro con un número mayor de muestras.

Palabras clave: Estudio de validación, Secuenciación de nueva generación, Reacción en cadena en tiempo real de la polimerasa, Cáncer de mama, Fosfatidilinositol 3-Quinasas.

ABSTRACT

Introduction: In Chile, the techniques approved for mutation detection in liquid biopsies are variants of the polymerase chain reaction. However, massive sequencing has certain advantages, serving for the monitoring and treatment selection for pathologies such as breast cancer. According to international clinical laboratory standards, a comparison between the evaluated technique and the reference one was carried out, necessary for the validation and implementation of this technique in patients with breast cancer. **Objective:** To carry out the initial validation of a massive sequencing protocol capable of detecting PIK3CA mutations in the circulating tumor DNA of these patients. **Objective:** To carry out the initial validation of a massive sequencing protocol capable of detecting PIK3CA mutations in the circulating tumor DNA of these patients. **Methodology:** 11 blood samples were obtained from patients with advanced breast cancer, where the extracted DNA was sequenced and the detection of 3 mutations in PIK3CA was evaluated by a real time polymerase chain reaction, and the results were compared using a table of contingency and the McNemar test. **Result:** McNemar's exact test gave a p value $> 0,05$ and the evaluated technique had a sensitivity and specificity of 100%, with an agreement of 1 according to Cohen's kappa coefficient. **Discussion:** The cost-effectiveness of massive sequencing is greater than single genetic assays, but the limitations of both techniques must be taken into account. **Conclusion:** A high level of agreement was found between the techniques, but the results were not statistically significant. Even so, the validation of this assay should continue in the future with a larger number of samples.

Key words: Validation study, High-Throughput nucleotide sequencing, Real-Time polymerase chain reaction, Breast cancer, Phosphatidylinositol 3-Kinases.

INTRODUCCIÓN

En el año 2020 se diagnosticaron más de 2,26 millones de mujeres con cáncer de mama alrededor del mundo, presentándose como el cáncer de mayor

frecuencia en esta población¹. A pesar de que existen tratamientos efectivos para esta enfermedad, la resistencia a fármacos genera recaídas, mientras que los métodos de diagnóstico y monitoreo vigentes

*Correspondencia: idachiardim@udd.cl
2024, Revista Confluencia, 7

presentan varios inconvenientes, como ser muy invasivos y costosos^{2,3}. Por lo anterior, y teniendo en cuenta la heterogeneidad tumoral, actualmente se busca una alternativa no invasiva, segura y fácil para detectar biomarcadores del cáncer de mama, como la biopsia líquida, que permite mediante técnicas de biología molecular examinar una gran cantidad de mutaciones en genes de interés para la enfermedad⁴.

El cáncer corresponde a un grupo de enfermedades que presentan un crecimiento celular desregulado y la invasión y diseminación de células desde su lugar de origen hacia otros sitios del cuerpo⁵, y el cáncer de mama reporta la tasa de incidencia y mortalidad más alta en el mundo¹. Asimismo, durante el período de 2009 y 2018 han fallecido un total de 10.890 mujeres por cáncer de mama en Chile, con una tasa de incidencia de 11,8 mujeres cada 100.000 habitantes⁶.

El cáncer de mama se puede clasificar molecularmente según la expresión inmunohistoquímica de receptores como el Receptor de Estrógeno (ER), el Receptor de Progesterona (PR), el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano Tipo 2 (HER2) y el Antígeno Ki67⁷. Es así como se pueden dividir en diferentes subtipos, y entre ellos está el triple negativo, caracterizado por no tener ninguno de los tres receptores hormonales mencionados y por presentar un peor pronóstico en comparación a otros subtipos⁸.

Dentro del laboratorio se pueden estudiar biomarcadores, los cuales son moléculas como proteínas, enzimas, material genético y/o metabolitos que tienen como finalidad representar procesos biológicos o patológicos⁹, incluso permitiendo ver el estado y pronóstico de una enfermedad¹⁰. Éstos se han empezado a utilizar como blancos de terapias personalizadas, formando parte de la medicina de precisión¹¹. En el cáncer de mama, el gen PI3K da origen a la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la cual se compone de una subunidad reguladora y una catalítica. Esta última es conocida como p110 α y es codificada por el gen de PIK3CA que forma parte de la vía de señalización PI3K/AKT¹², participando en procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, la migración y la apoptosis desregulada¹³.

Las mutaciones del gen PIK3CA son de las más frecuentes en cáncer de mama y produce la sobreactivación de PI3K que aumenta la proliferación de las células tumorales¹². Las mutaciones en PIK3CA están en su mayoría localizadas en los *hotspots* E542K, E545K y H1047R¹⁴, produciendo una forma constitutivamente activa de PI3K que promueve a una señalización descendente y contribuyendo a la transformación celular^{14,15}. Para la pesquisa de estas mutaciones, la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) es una de las más utilizadas para cuantificar moléculas de ADN o ARN, ya que combina la amplificación y detección en un mismo paso¹⁶, lo

que la hace una técnica precisa y con la ventaja de ser rápida, sensible, específica, robusta y de relativo bajo costo¹⁷. Sin embargo, tiene las desventajas de que se detecta un número limitado de blancos por ensayo⁴ y se deben diseñar partidores apropiados, por lo que es necesario conocer la secuencia de nucleótidos de la región de interés, tiene una limitación del tamaño de la secuencia que se busca amplificar y existen riesgos de contaminación que pueden resultar en falsos positivos¹⁷. Por otro lado, la técnica de secuenciación masiva (NGS) realiza la secuenciación de múltiples fragmentos de ADN realizada en paralelo¹⁸. A diferencia de la qPCR, la NGS permite la detección de secuencias conocidas y desconocidas con un rango de conteo y lectura más ilimitado. Presenta las ventajas de poder realizar la secuenciación completa del genoma, tiene un bajo límite de detección y una alta repetibilidad y reproducibilidad. Por otro lado, entre sus desventajas está ser menos rentable y requerir mucho tiempo para secuenciar un número bajo de objetivos¹⁹⁻²¹.

En Chile, la única tecnología aprobada para la detección de mutaciones en el ADN circulante liberado por las células normales y tumorales (cfDNA) de biopsias líquidas es por PCR digital, mientras que para NGS existen dos ensayos disponibles: Guardant Health 360 CDx (Guardant Health, EEUU) y Foundation One-liquid CDx (Foundation Medicine, Roche, EEUU). Ambos fueron desarrollados para la detección de cáncer, sin diferenciar entre los distintos tipos, además de no ser específicos para detectar los genes con mayor relevancia del cáncer de mama, puesto que cubren muchos genes que no son útiles para la toma de decisiones terapéuticas. Es por lo anterior que todavía se necesita de una mayor estandarización de los métodos de NGS específicos para llegar a implementarlo en la práctica clínica²², como el protocolo de TumorSec-Liq, un ensayo de NGS diseñado específicamente para la detección de mutaciones relevantes en el cfDNA que guíen la toma de decisiones terapéuticas en cáncer de mama avanzado.

Pregunta de investigación

¿Es la secuenciación de última generación un método equivalente a la qPCR en sensibilidad y especificidad para la detección de mutaciones en el gen PIK3CA de muestras de biopsia líquida de pacientes con cáncer de mama avanzado?

Planteamiento de la hipótesis

La detección de mutaciones en el gen PIK3CA en muestras de biopsia líquida de cáncer de mama avanzado mediante NGS presenta un desempeño equivalente con respecto a la técnica de qPCR.

Objetivo general

Realizar la validación inicial de un protocolo de laboratorio para NGS que permita la secuenciación de mutaciones en PIK3CA en muestras de plasma de

pacientes con cáncer de mama avanzado, mediante la comparación de los resultados con una técnica de qPCR.

Objetivos específicos

- Determinar la calidad del ADN de las muestras de biopsia líquida para el análisis de mutaciones en PIK3CA del cfDNA en pacientes con cáncer de mama avanzado.
- Evaluar la presencia o ausencia de 3 mutaciones en el gen PIK3CA del cfDNA extraído del plasma sanguíneo mediante ensayos de NGS y qPCR.
- Comparar el desempeño, ventajas y desventajas entre los ensayos de NGS y qPCR.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio de investigación cuantitativo, no experimental y transversal, debido a que se efectuó un análisis de concordancia entre NGS y qPCR, además se calculó la sensibilidad y especificidad de la técnica NGS para PIK3CA de biopsia líquida. Cabe destacar que este estudio cuenta con la aprobación de un comité de Ética y de Bioseguridad, ambos entregados en el año 2021 por la Universidad de Chile.

Se reclutaron pacientes del Instituto Nacional del Cáncer, Clínica Universidad Católica y Fundación Arturo López Pérez, desconociendo si tenían o no la presencia de alguna mutación en PIK3CA y en el caso de que quisieran participar en la investigación, se daba inicio al proceso del consentimiento informado. Como criterios de inclusión para seleccionar a los pacientes se requirió que fueran de sexo femenino, mayores de 18 años, que tuvieran cáncer de mamá metastásico y firmaran un documento que autorizara el uso de su muestra. Por otro lado, se excluyeron pacientes que tuvieran enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes previas, debido a que producen liberación de cfDNA inespecífico.

Las variables a estudiar fueron la detección de la mutación PIK3CA (Positivo/Negativo), la concentración del cfDNA en la muestra (ng/μL) y el método de procesamiento de la muestra (NGS/qPCR).

Del total de muestras obtenidas de sangre periférica que fueron enviadas al Laboratorio de Genómica del Cáncer de la Universidad de Chile, donde se realizó la extracción de ctDNA y posteriormente se secuenciaron por la técnica de NGS, sólo 11 cumplieron los criterios para luego ser enviadas al Instituto de Ciencias e Innovación en Medicina (ICIM) de la Universidad del Desarrollo, donde se analizó la presencia o ausencia de la mutación mediante una qPCR. Para esto se utilizó el kit QClamp® PIK3CA Mutation Detection Test fabricado por Diacarta que detecta las mutaciones E542K, E545K y H1047R en PIK3CA. Las muestras se seleccionaron evaluando si tenían suficiente

volumen y una concentración adecuada para realizar la qPCR con un volumen final de 10 uL por ensayo, luego se configuró el perfil térmico según los parámetros del kit y se seleccionó la detección en el canal FAM y HEX. Además, para cada corrida se debió incluir un control positivo, un control negativo y un blanco de agua. Cuando ya se obtuvieron los resultados de ambas técnicas, se realizó un análisis estadístico mediante el programa "RStudio", versión 4.3.2 con las librerías "mcnemar.test" y "pysch" para obtener una tabla de contingencia y realizar la prueba de McNemar, pues dentro de las biopsias líquidas de cáncer de mama disponibles se eligió un tamaño muestral al azar donde se desconocía si tenían la mutación estudiada. Además, se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y el Coeficiente Kappa de Cohen.

RESULTADO

Se obtuvo un total de 11 muestras de plasma y el conjunto de datos fue representado en una tabla de contingencia (Tabla 1), obteniendo 1 verdadero positivo (VP), 10 verdaderos negativos (VF), 0 falsos positivos (FP) y 0 falsos negativos (FN).

Tabla 1. Tabla de contingencia con los resultados de la prueba de comparación entre la prueba de referencia (qPCR) y la prueba evaluada (NGS).

	qPCR PIK3CA +	qPCR PIK3CA (-)
NGS PIK3CA +	1	0
NGS PIK3CA (-)	0	10

*Valor p de prueba exacta de McNemar: 1

Finalmente, se optó por realizar la prueba exacta de McNemar, utilizada cuando el tamaño muestral es pequeño, se tienen pocas observaciones en la tabla de contingencia y no se puede asumir una distribución chi-cuadrado (χ^2) debido a la ausencia de valores discordantes. Con los resultados de la tabla de contingencia se calculó la especificidad, sensibilidad y valores predictivos positivos y negativos con el fin de establecer el desempeño de la técnica evaluada (Tabla 2).

Tabla 2. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos entre las técnicas de NGS y qPCR

Índice de concordancia NGS y qPCR	Valor (%)	IC de 95% (%)
Sensibilidad	100	5,1-100
Especificidad	100	72,3-100
Valor Predictivo Positivo	100	5,1-100
Valor Predictivo Negativo	100	72,3-100

*Coeficiente Kappa de Cohen: 1

DISCUSIÓN

El siguiente estudio consistió en una validación de fase inicial, que permitió implementar la secuenciación masiva en el área clínica mediante la detección de mutaciones en el gen PIK3CA. Este

estudio comparativo pretendió demostrar cómo la NGS puede igualar, e incluso aportar más información que tecnologías de uso rutinario, en la clínica.

Es relevante destacar que la NGS posee la capacidad de analizar múltiples mutaciones a la vez en una muestra (Figura 1), dando información pertinente sobre la progresión de la enfermedad y tratamientos recomendados para el paciente. Por lo anterior, sería mucho más conveniente y beneficioso para un paciente con cáncer de mama realizarse un estudio genético mediante secuenciación masiva, ya que se ha visto que la costo-efectividad es mayor al poder analizar más variantes dentro de múltiples genes en un ensayo singular que un número menor en diversos ensayos^{23,24}.

ESR1	BRCA1	BRCA2	FGFR1
FGFR2	FGFR3	FGFR4	ERBB2
PTEN	PIK3CA	AKT1	NF1
RB1	FAT1	MYC	FOXA1
PIK3R1	EGFR	CDKN2A	ERBB3
TP53	ARID1A		

Figura 1. Panel TumorSec-Liq de NGS para detección de 22 genes conocidos por albergar mutaciones en cáncer de mama, incluido PI3KCA.

Por otro lado, una fortaleza de este ensayo de qPCR fue el uso de análogos de ácidos nucleicos (XNA) que disminuyeron la probabilidad de obtener falsos positivos (Figura 2), mientras que una limitación fue que no se incluyeron todas las mutaciones *driver* del gen en estudio.

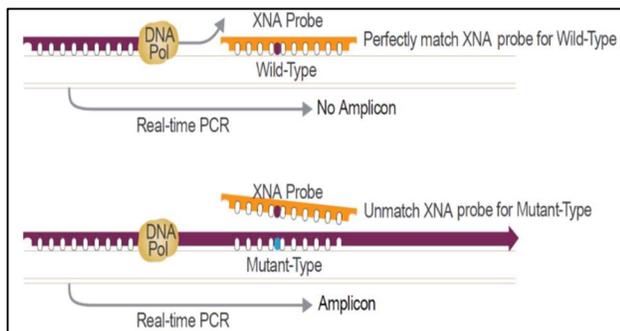


Figura 2. Principio de la prueba de detección de mutaciones QClamp® PIK3CA. La sonda de XNA se une a la secuencia wild type, bloqueando la extensión de la ADN polimerasa, mientras que cuando está presente la mutación PIK3CA en la secuencia blanco, la sonda no se hibrida y la ADN polimerasa puede extender la secuencia complementaria, permitiendo una amplificación más selectiva.

Con respecto a los resultados, de las 11 muestras de plasma analizadas por qPCR, solo una dio positiva para la presencia de una mutación en PIK3CA, específicamente la H1047R y la E545K, considerando que solo se analizaron tres mutaciones. No se encontraron discordancias en ninguna muestra al comparar los resultados de la qPCR con los de

secuenciación masiva, obteniendo una sensibilidad y especificidad del 100% para la técnica en estudio, y considerando que el porcentaje de concordancia fue del 100%, por lo que sería plausible continuar el estudio con el fin de aprobar esta técnica para el apoyo de la monitorización y selección del tratamiento de pacientes con cáncer de mama.

En cuanto a las limitaciones encontradas durante este estudio, la principal fue el acotado tamaño muestral, pues al ser un número bajo no llegó a ser representativo y de utilidad para hacer una validación según el manual "CLSI EP12", impidiendo obtener un valor de $p < 0,05$. Además, no todas las muestras se pudieron procesar en duplicado o triplicado debido al escaso volumen por muestra.

Con respecto a la técnica de qPCR, una limitación fue el kit utilizado, ya que solo detecta tres mutaciones en el gen PIK3CA, pero existen 11 mutaciones accionables en total. Adicionalmente, como el cfDNA es una secuencia liberada por el tumor, muchas veces se encuentra en concentraciones insuficientes para ser analizadas por la técnica de qPCR ya que, aunque se tenga un volumen de plasma mayor al mínimo requerido por el kit (6 uL), si el cfDNA está en bajas concentraciones para ser estudiado.

En cuanto a las limitaciones de la técnica NGS, es posible que haya existido una variante que no se pudo alinear con el genoma de referencia debido a la poca profundidad de las lecturas²⁵, por lo tanto, el equipo no sería capaz de reportarla. Adicionalmente, durante la optimización de los ensayos con TumorSec-Liq se vio que cuando se estudian más de cuatro muestras en conjunto, puede ocurrir que la profundidad de las lecturas también disminuya, haciendo que la calidad sea menor.

Hasta la fecha, no se encontraron artículos publicados donde se comparen estas técnicas en biopsias líquidas para cáncer de mama. No obstante, en uno de ellos se compararon los índices de concordancia calculados entre un ensayo de NGS y otro de qPCR que se usó como estándar de referencia para 44 muestras de FFPE de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), los que mostraron una estimación de la especificidad y del VPN del 100%, revelando la robustez del ensayo de secuenciación para descartar los pacientes que realmente tenían ausentes los "rearrangos" del gen de fusión en estudio²⁶. Pese a lo anterior, la estimación de la sensibilidad fue de un 63,2% mientras que el VPP fue de un 84,1%²⁶, por lo que podrían existir factores preanalíticos y otros parámetros relevantes durante el proceso, que permitirían obtener una mayor tasa de detección de los casos verdaderamente positivos.

CONCLUSIÓN

Este estudio mostró un alto nivel de concordancia entre las técnicas de NGS y qPCR. Sin embargo, lo

anterior tendría que ser respaldado con un tamaño muestral mayor, ya que no se capturó la variabilidad biológica de las muestras ni se alcanzaron resultados estadísticamente significativos que permitieran establecer que la técnica de NGS tuvo el mismo desempeño que la de referencia. Se pudo determinar exitosamente la calidad del ADN extraído y evaluar las tres mutaciones más frecuentes de PIK3CA mediante ambos métodos, por lo que se pudo evaluar su desempeño, además de establecer ventajas y desventajas de cada uno. Otras variables para considerar en un estudio futuro serían la complejidad de conseguir nuevas muestras útiles para ambos ensayos, la proporción de muestras positivas y negativas requerida, y la detección de otros marcadores oncológicos relevantes en el contexto de cáncer de mama. Aún así, estos resultados son prometedores para seguir analizando, en estudios posteriores, más muestras que permitan la validación de este protocolo de NGS para biopsias líquidas de pacientes con cáncer de mama avanzado.

Se espera que el creciente y continuo uso de NGS haga que sus costos se vayan reduciendo cada vez más. En este sentido, sería mucho más rentable para un paciente con cáncer de mama avanzado secuenciar el genoma completo de su tumor para obtener más información sobre la resistencia reportada y cuáles son las mejores opciones de tratamientos, por lo que esta investigación sirvió como aporte para la investigación y tratamientos innovadores en oncología clínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 [citado 5 de abril de 2022];71(3):209–49. Disponible en: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Gote V, Nookala AR, Bolla PK, Pal D. Drug Resistance in Metastatic Breast Cancer: Tumor Targeted Nanomedicine to the Rescue. *Int J Mol Sci*. 2021 [citado 5 de abril de 2022];22(9):4673. Disponible en: <https://doi.org/10.3390%2Fijms22094673>.
- Panagopoulou M, Esteller M, Chatzaki E. Circulating cell-free dna in breast cancer: Searching for hidden information towards precision medicine. *Cancers (Basel)*. 2021 [citado 5 de abril de 2022];13(4):728. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cancers13040728>.
- Cheung AHK, Chow C, To KF. Latest development of liquid biopsy. *J Thorac Dis*. 2018 [citado 5 de abril de 2022];10(Suppl 14):S1645. Disponible en: <https://doi.org/10.21037%2Fjtd.2018.04.68>.
- Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. 5a ed. Oxford University Press; 2021.
- Departamento de Epidemiología Ministerio de Salud. Informe de vigilancia de cáncer. Análisis de mortalidad prematura y años de vida potencialmente perdidos (AVPP) por cáncer década 2009-2018 [Internet]. Minsal.cl. 2021 [citado 15 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2022/01/Informe-Mortalidad-Prematura-y-AVPP-por-C%C3%A1ncer-2009-2018.pdf>
- Orrantia-Borunda E, Anchondo-Núñez P, Acuña-Aguilar L, Gómez-Valles F, Ramírez-Valdespino C. Subtypes of Breast Cancer. *Exon Publications* [Internet]. 2022 [citado 6 de junio de 2022];31–42. Disponible en: <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes>
- Martínez BEH, Fernández HG. Caracterización del cáncer de mama triple negativo. *Revista Finlay*. 2020; [citado 5 de abril de 2022] 10(3):259–68. Disponible en: <https://revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/850>
- Benozzi S, Coniglio RI. Atherosclerosis: biomarcadores plasmáticos emergentes. *Acta bioquím. clín. latinoam*. 2010; [citado 20 de junio de 2022] 44(3):317–28. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572010000300003&lng=es&nrm=iso
- Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Sage journals*. 2018; [citado 5 de abril de 2022] 243(3):213–21. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Najjar S, Allison KH. Updates on breast biomarkers. *Virchows Archiv*. 2022; [citado 29 de marzo de 2023] 480(1):163–76. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03267-x>
- Dong C, Wu J, Chen Y, Nie J, Chen C. Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Front Pharmacol*. 2021; [citado 29 de marzo de 2023] 12:628690. Disponible en: <https://doi.org/10.3389%2Ffphar.2021.628690>
- Verret B, Cortes J, Bachelot T, Andre F, Arnedos M. Efficacy of PI3K inhibitors in advanced breast cancer. *Annals of Oncology*. 2019; [citado 29 de marzo de 2023] 30(10):x12–20. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz381>
- Alvarez-Garcia V, Bartos C, Keraite I, Trivedi U, Brennan PM, Kersaudy-Kerhoas M, et al. A simple and robust real-time qPCR method for the detection of PIK3CA mutations. *Sci Rep*. 2018; [citado 6 de junio de 2022] 8(1):1–10. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22473-9>
- André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. 2019;380(20):1929–40. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1813904>
- Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends Biotechnol*. 2019 [citado 5 de abril de 2022];37(7):761–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- Raby BA. Polymerase chain reaction (PCR) [Internet]. UpToDate. 2021 [citado 5 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/polymerase-chain-reaction-pcr>
- Hulick PJ. Next-generation DNA sequencing (NGS): Principles and clinical applications [Internet]. UpToDate. 2021 [citado 5 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/next-generation-dna-sequencing-ngs-principles-and-clinical-applications>

- [generation-dna-sequencing-ngs-principles-and-clinical-applications](#)
19. Illumina Inc. Advantages of next-generation sequencing vs. qPCR [Internet]. Illumina.com. 2018 [citado 5 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/ngs-vs-qpcr.html>
 20. Pérez-Barrios C. Estudio de biomarcadores a partir de ADN tumoral circulante en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado [Tesis doctoral]. [Madrid]; 2019 [citado 5 de abril de 2021]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.14352/17352>
 21. Asensio-Del-Barrio C, Garcia-Carpintero EE, Carmona M. Validez, utilidad clínica y seguridad de la nueva plataforma genómica de secuenciación de próxima generación (NGS) FoundationOne® en el cáncer de pulmón no microcítico y otros tipos de tumores sólidos [Internet]. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (MSCBS); 2019 [citado 5 de abril de 2022]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12105/9064>
 22. Ivanov M, Laktionov K, Breder V, Chernenko P, Novikova E, Telysheva E, et al. Towards standardization of next-generation sequencing of FFPE samples for clinical oncology: Intrinsic obstacles and possible solutions. *J Transl Med.* 2017; [citado 4 de mayo de 2021] 15(1):1–13. Disponible en: <https://doi.org/10.1186%2Fs12967-017-1125-8>
 23. Vanderpoel J, Stevens AL, Emond B, Lafeuille MH, Hilts A, Lefebvre P, et al. Total cost of testing for genomic alterations associated with next-generation sequencing versus polymerase chain reaction testing strategies among patients with metastatic non-small cell lung cancer. *J Med Econ.* 2022; [citado 12 de octubre de 2022] 25(1):457–68. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/13696998.2022.2053403>
 24. Arriola E, Bernabé R, Campelo RG, Biscuola M, Enguita AB, López-Ríos F, et al. Cost-Effectiveness of Next-Generation Sequencing Versus Single-Gene Testing for the Molecular Diagnosis of Patients With Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer From the Perspective of Spanish Reference Centers. *JCO Precis Oncol.* 2023; [citado 12 de octubre de 2023] 7(7). Disponible en: <https://doi.org/10.1200/po.22.00546>
 25. Tébar Martínez R. Impacto de la tecnología de secuenciación masiva en el cáncer de pulmón no microcítico. [València]; 2016 [citado 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/68731>
 26. Sepúlveda-Hermosilla G, Freire M, Blanco A, Cáceres J, Lizana R, Ramos L, et al. Concordance Analysis of ALK Gene Fusion Detection Methods in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer from Chile, Brazil, and Peru. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2021; [citado 29 de marzo de 2023] 23(9):1127–37. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.05.018>