



ARTÍCULO ORIGINAL

Resultados de las pruebas para mutación EGFR en pacientes mexicanos con CPCNP

Javier Ortiz-Ibarra^{a,*}, Erika González-Zapata^b y Ema Valenzuela-Méndez^c

^a Dirección General, Laboratorios Diagnomol, México D.F., México

^b Unidad de Oncogenética, Laboratorios Diagnomol, México D.F., México

^c Gerencia de Biología Molecular, Laboratorios Diagnomol, México D.F., México

PALABRAS CLAVE

EGFR; Mutaciones;
Pro-oncogén;
Adenocarcinoma;
Activación; Cáncer de
pulmón de células no
pequeñas; México.

Resumen La mutación EGFR (por sus siglas en inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*) se ha convertido en una de las dianas terapéuticas en el cáncer de pulmón. Por ello, expertos mexicanos en Biología Molecular y Oncogenética, realizaron una investigación para profundizar en el campo de las mutaciones, como una colaboración al conocimiento de la mutación EGFR en la epidemiología mexicana. En el presente trabajo, primero se revisan las alteraciones genéticas y epigenéticas; posteriormente, se presenta la investigación que evaluó una muestra por conveniencia, de pacientes con cáncer pulmonar, confirmado histopatológicamente en sus sitios de atención. El DNA total fue extraído a partir de biopsias de pulmón. Se analizaron los datos utilizando el programa estadístico SPSS™. Se estudiaron casos provenientes de 19 estados de la República Mexicana, se incluyeron un total de 105 pacientes. La edad promedio de la muestra fue de 62.8 ± 10.5 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los que portaban alguna mutación y el tipo de tumor (adenocarcinoma vs. otros tumores), o presencia de mutaciones por género. Se encontró que 81 (77.1%) de los casos fueron diagnosticados como adenocarcinoma pulmonar y que 24 (22.9%) fueron diagnosticados como portadores de otro tipo de tumores. La importancia de este estudio consiste en su calidad de primera publicación sobre mutaciones EGFR en pacientes mexicanos y su aportación a la epidemiología de las mutaciones del cáncer pulmonar en nuestro país.

KEYWORDS

EGFR; Mutations; Pro-oncogen;
Adenocarcinoma;

Results of testing for EGFR mutations in Mexican patients with NSCLC

Abstract EGFR mutation became one of the main therapeutic targets in lung cancer treatment. This is why Mexican experts in Molecular Biology and Oncogenetics performed a

* Autor para correspondencia: Camino a Sta. Teresa N° 13, Nivel 3, Local 25. Teléfono: 5652 0307, ext. 4128. Correo electrónico: javier.ortiz@diagnomol.com (Javier Ortiz-Ibarra).

Activation; Non-small-cell lung cancer; Mexico.

study in these mutations to contribute to the epidemiological knowledge in Mexico. In the present study, genetic and epigenetic alterations are reviewed and samples of pathology specimens were studied. Samples were taken from Mexican patients with histology confirmed lung cancer. Total DNA was extracted from lung biopsies. Statistics analysis was performed with SPSS™. Cases from 19 Mexican states were studied. Mean age was 62.8 ± 10.5 years. No statistical difference was found among mutation positives and type tumor or presence of mutations and sex. Eighty-one (77.1%) of cases were diagnosed pulmonary adenocarcinoma and 24 (22.9%) were diagnosed with other tumors. The importance of this study is that it is the first publication on EGFR mutations in Mexico and its contribution to lung cancer mutations epidemiology in our country.

Introducción

El cáncer de pulmón se caracteriza por presentar múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas, incluyendo las que conducen a la activación de oncogenes y a la inactivación de los genes supresores de tumores¹⁻³.

El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), forma parte de la familia del receptor de tirosin cinasa (TK), referido como HER o familia ErbB. Ésta se conforma de 4 miembros que regulan procesos tanto metabólicos como fisiológicos:

- EGFR (HER1/ErbB1).
- HER2 (ErbB2).
- HER3 (ErbB3).
- ErbB4.

Con respecto a EGFR, la actividad intracelular del TK se eleva debido a la unión de varios ligandos, que incluyen a EGF. Esta actividad los conduce a la homodimerización de 2 EGFR o a la heterodimerización del EGFR con otros componentes de la familia, generalmente HER2⁴.

La heterodimerización con HER2 es un potente activador de EGFR TK. Por su parte, la activación del receptor TK conduce a la autofosforilación del dominio intracelular de EGFR⁵. En células tumorales, la actividad TK de EGFR puede ser desregulada por mecanismos oncogénicos, incluyendo mutación del gene *EGFR*, elevada copia de genes y sobreexpresión de la proteína EGFR⁶. Las mutaciones de *EGFR* son las más prevalentes, por lo cual, se cree que representan eventos genéticos muy tempranos que conducen al desarrollo de cáncer de pulmón^{7,8}.

Por su parte, las mutaciones del dominio cinasa en el EGFR se denominan "mutaciones activadoras", porque conducen a una activación ligando-independiente de la actividad TK. Las mutaciones activadoras del gene *EGFR* se encuentran en los exones 18 al 21 del dominio TK. Éstas caen en 3 clases mayores^{9,10}.

Las mutaciones clase I son deleciones en ventana, en el exón 19; estas deleciones generalmente incluyen residuos de aminoácidos leucina-747 a ácido glutámico-749 (Δ LRE), y representan aproximadamente el 44% de todas las mutaciones del EGFR TK¹¹.

Las mutaciones clase II son sustituciones de un solo nucleótido que alteran un aminoácido. La mutación predominante de un solo punto es en el exón 21, que sustituye una arginina por una leucina en el codón 858; éste, el L858R, suma casi el 41% de todas las mutaciones activadoras de EGFR TK¹¹.

Otras mutaciones activadoras de clase II, resultan en una glicina-719 (G719) que cambia a serina, alanina o cisteína, y que constituye el 4% de todas las mutaciones activadoras EGFR TK¹¹.

Las mutaciones clase III son duplicaciones en marco y/o inserciones en el exón 20. Éstas representan el restante 5% de las mutaciones activadoras del EGFR TK¹¹.

Una inadecuada activación de EGFR TK resulta en una supervivencia aumentada de las células malignas, proliferación, invasión y metástasis. La sobreexpresión de EGFR se observa en tumores de más del 60% de los pacientes con cáncer metastásico de células no pequeñas y se correlaciona con pobre pronóstico¹¹.

Dado que las alteraciones descritas condicionan mutaciones y las amplificaciones génicas, permitiendo la supervivencia tumoral, EGFR se ha convertido en una de las dianas terapéuticas en el cáncer de pulmón. Cabe decir, que el EGFR forma parte de una red de señalización y representa el componente central del crecimiento, la proliferación y la motilidad celulares¹².

De forma global, la frecuencia de la mutación del gen del EGFR en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), es del 5%-20%; es más frecuentes en mujeres y en no fumadores, con histología de adenocarcinoma y pertenecientes a la raza asiática¹².

La evidencia es cada vez mayor, en el sentido de que las mutaciones en EGFR son favorables marcadores de pronóstico de supervivencia, así como en relación a que constituyen marcadores predictivos de la respuesta, en función de la reducción tumoral¹³. El pronóstico de los pacientes que presentan las alteraciones moleculares descritas y son tratados con terapias específicas, es más favorable comparado con el de la población general de cáncer de pulmón¹².

Por lo anterior, una de las perspectivas de tratamiento actualmente más importantes, es la terapia blanco, la cual depende de la tipificación molecular de los tumores. Es necesario profundizar la epidemiología de las mutaciones en poblaciones específicas. En nuestro país se conoce la epidemiología basada en series considerables y el presente trabajo forma parte de ese esfuerzo.

Metodología

Se evaluó una muestra por conveniencia, de pacientes con cáncer pulmonar, confirmado histopatológicamente en sus sitios de atención. Los pacientes aceptaron que se enviase alguna muestra de tejido para explorar la presencia de mutaciones en el tumor. En el consentimiento informado se

Tabla 1 Mutaciones más comunes

Resultados	Porcentaje
Sin mutaciones	77.1%
Exón 19: deleciones	14.3%
Exón 21: mutación L858R	6.7%
Exón 21: mutación L861Q	1%

aclaró que las muestras no afectarían su atención y que los resultados permanecerían en forma anónima.

Extracción de DNA

El DNA total fue extraído a partir de biopsias de pulmón fijados en formol y embebidos en parafina, utilizando el kit de extracción QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen®), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de DNA se ajustaron a 150 ng/μL para su procesamiento.

Detección de mutaciones

El análisis de las mutaciones en EGFR se realizó con el kit EGFR RGQ PCR (Qiagen®) utilizando la plataforma de PCR en tiempo real (qPCR) Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen®). Esta metodología nos permite identificar 29 mutaciones somáticas mediante la técnica ARMS, donde las secuencias mutadas son selectivamente amplificadas y la detección de la amplificación se realizó con sondas Scorpions™.

Las reacciones de qPCR se realizaron en 25 μL por reacción, la cual contenía 19.5 μL de mezcla de reacción (Qiagen®), 0.5 μL de Taq DNA polimerasa (Qiagen®) y 5 μL de DNA. El programa de amplificación incluyó un paso de desnaturalización durante 15 minutos a 95 °C y uno de amplificación de 40 ciclos, 30 segundos a 95 °C, y 60 segundos a 60 °C.

La presencia de una mutación se determinó cuando el valor ΔC_T de la muestra (C_T ensayo de la mutación - C_T ensayo del control) era menor que el ΔC_T de corte. La muestra se consideró sin mutaciones (silvestre) o que contenía cantidades menores de DNA mutado al que puede ser detectado por el kit, con un valor por arriba del corte.

Para confiabilidad de resultados, el fabricante provee en el ensayo un control positivo de mutaciones en EGFR.

Análisis estadístico

Se describieron las variables discretas con número y porcentaje, y las variables valores continuas con media y desviación estándar. Los valores no disponibles fueron sustituidos con la mediana o moda de la variable, siempre y cuando los valores perdidos no superaran al 10%. Todos los casos tenían el resultado de la presencia o ausencia de mutación.

Utilizando el programa estadístico SPSS™, se analizaron los datos, recodificando las variables centrales. La variable "mutación" fue recodificada como presente o ausente con fines del análisis.

Se utilizó *ji cuadrada* para analizar variables discretas y *T de Student* para comparar medias.

Resultados

Se incluyeron un total de 105 pacientes, 54 (51.4%) del sexo femenino y 51 (48.6%) masculino. La edad promedio de la muestra fue de 62.8 ± 10.5 , con un rango de 33 a 89 años de edad. Se analizaron casos provenientes de 19 estados de la República Mexicana; 96 (91.4%) y 9 (8.6%) no reportaron el estado de origen. Los estados que aportaron más muestras fueron: Distrito Federal con 25 (23.8%), Veracruz con 17 (16.2%) y Jalisco con 14 (13.3%).

En cuanto al consumo de tabaco, 37 (35.2) eran positivos, 51 (48.6%) negativos y 17 (16.2%) pasivos.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los que portaban alguna mutación y el tipo de tumor (adenocarcinoma vs. otros tumores), o presencia de mutaciones por género.

Tumores reportados

El adenocarcinoma fue el tumor más frecuente (frecuencia 86, 81.9%), por lo cual se le recodificó la variable en 2 categorías, con adenocarcinoma u otros tipos de tumores. Se encontró que 81 (77.1%) de los casos fueron diagnosticados como adenocarcinoma pulmonar y que 24 (22.9%) fueron diagnosticados como portadores de otro tipo de tumores. Así, se tiene lesión pulmonar (1.0%), carcinoma epidermoide (8.6%), neoplasia de extirpe epitelial (1.9%), carcinoma de células grandes (1.9%), carcinoma anaplásico (1.0%), metástasis por cáncer bronquio-alveolar (3.8%).

Mutaciones reportadas

Se encontró que los sujetos sin mutación (79.0%), tuvieron una edad significativamente mayor que los sujetos con mutación (13.3%). El resultado asociado con la edad fue: sin mutación 65.1 ± 10.4 vs. con mutación 55.8 ± 1.3 ($T=3.5$; $GL 88$; $p=0.001$).

Las mutaciones más comunes identificadas fueron: las deleciones en el exón 19 con un 14.3% y la mutación L858R (6.7%), como se muestra en la tabla 1.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Financiamiento

Los autores no recibieron patrocinio para llevar a cabo este artículo.

Referencias

- Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:1136-1152.
- Gazdar AF. The molecular and cellular basis of human lung cancer. *Anticancer Res* 1994;14:261-267.
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:F21-59.
- Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(Suppl 1):S17-S27.

5. Kumar A, Petri ET, Halmos B, et al. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1742-1751.
6. Ciardello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-1174.
7. Politi K, Zakowski MF, Fan PD, et al. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancer respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* 2006;20:1496-1510.
8. Gazdar AF, Minna JD. Deregulated EGFR signaling during lung cancer progression: mutations, amplicons, and autocrine loops. *Cancer Prev Res* 2008;1:156-160.
9. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor-signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* 2006;118:257-262.
10. Kumar A, Petri ET, Halmos B, et al. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1742-1751.
11. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169-181.
12. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:123-32.
13. Shepherd FA, Tsao MS. Unraveling the Mystery of Prognostic and Predictive Factors in Epidermal Growth Factor Receptor Therapy. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24(7):1219-1223.