

Determinación de mutaciones (del E746-A750 exón 19 y L858R exón 21) en el gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) en muestras de suero y biopsia de carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM)

Karla Castro-Valencia¹, Lizbeth González-Herrera^{1,2}, Elena Muñoz-Santos², Paola López-González², Javier Enrique Sosa-Escalante², Gerardo Pérez-Mendoza¹, Gilberto Medina-Escobedo³.

¹ Laboratorio de Genética, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. ² DIMYGEN Laboratorio S.C.P. Mérida, Yucatán, México. ³ Departamento de Patología. Unidad Médica de alta especialidad del Centro Médico Nacional "Dr. Ignacio García Téllez" del Instituto Mexicano del Seguro Social. Mérida, Yucatán, México.

ABSTRACT

Determination of mutations (del E746-A750 exon 19 and L858R exon 21) in the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene in serum samples and in biopsys of non-microcytic lung carcinoma (NMLC)

Introduction. *EGFR* mutations, del E746-A750 in exon 19 and L858R in exon 21 in tumor cells of NMLC represent biomarkers of response to tyrosine kinase inhibitors (TKI) therapy. Patients with tumors positive for *EGFR* mutations show better response and greater survival. These mutations occupy 90% of mutations in lung cancer.

Objective. To evaluate the frequency of mutations del E746-A750-exon 19 and L858R-exon 21 of *EGFR* gene in NMLC biopsy samples and in serum samples of the general population from Yucatán.

Material and methods. 19 NMLC biopsy samples of adenocarcinoma type and 101 serum samples from healthy subjects were selected. *EGFR* mutations del E746-A750 and L858R were determined by allele-specific PCR amplification (PCR-ASO). The genotypic and allelic frequencies; and their distribution according to Hardy Weinberg expectations were calculated using the SNPstats software.

Results. For serum, *EGFR* del E746-A750 mutation, homozygous genotype (1/1) was present in 26.58%, heterozygote (1/0) in 73.42% and absence of mutant genotype with deletion (0/0); whereas for L858R mutation, 21.78% were homozygous (TT), 54.46% heterozygous (T/G)

Historial del artículo

Recibido: 14 mar 2018

Aceptado: 15 jun 2018

Disponible online: 1 sep 2018

Palabras clave

Mutación *EGFR*, cáncer de pulmón, inhibidores de tirosina cinasa.

Keywords

EGFR mutation, lung cancer, thyrosine kinase inhibitors ITK.

Copyright © 2018 por autores y Revista Biomédica.

Está trabajo esta licenciado bajo las atribuciones de la Creative Commons (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Editor: Fernando I. Puerto Manzano, , Centro de investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi". Universidad Autónoma de Yucatán

*Autor para correspondencia:

Lizbeth González Herrera, Centro de investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" UADY
correo electrónico: lizbeth@correo.uady.mx
<http://revistabiomedica.mx>.

and 23.76% GG mutants. For the NMLC biopsies, the heterozygote was the most frequent genotype for both mutations, 63.16% and 73.68% for del E746-A750 and L858R, respectively.

Conclusion. The frequency of mutations of *EGFR* gene in serum samples was 36.71% for deletion delE746-A750 in exon 19 and 50.99% for L858R in exon 21. Distribution of mutations in biopsy samples NMLC resulted in 42.11% for each *EGFR* mutation.

RESUMEN

Introducción. Las mutaciones, del *E746-A750* exón 19 y *L858R* exón 21 del gen *EGFR* en células tumorales de CPNM representan biomarcadores de respuesta a fármacos inhibidores de tirosina cinasa (ITK). Pacientes con tumores positivos a mutaciones *EGFR* muestran mejor respuesta y mayor supervivencia. Estas mutaciones ocupan el 90% de las mutaciones en cáncer de pulmón.

Objetivo. Evaluar la frecuencia de las mutaciones del *E746-A750* exón 19 y *L858R* exón 21 del *EGFR* en muestras de biopsia de CPNM y en muestras de suero de población abierta de Yucatán.

Material y métodos. Se seleccionaron 19 muestras de biopsia de CNPM tipo adeconocarcinoma y 101 sueros de sujetos sanos. Las mutaciones del *E746-A750* y *L858R* en *EGFR* se determinaron mediante amplificación por PCR oligo-alelo específica (PCR-ASO). Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas y su distribución según Hardy Weinberg, utilizando la plataforma SNPstats.

Resultados. En muestras de suero se determinó el genotipo homocigoto (1/1) en 26.58%, 73.42% el heterocigoto (1/0) y ausencia del genotipo mutante con delección (0/0) para del *E746-A750*; en tanto que, para *L858R*, 21.78% resultó homocigoto (TT), 54.46% heterocigoto (T/G) y 23.76% mutantes GG. En las biopsias, el heterocigoto fue más frecuente en ambas mutaciones 63.16% y 73.68% para del *E746-A750* y *L858R*, respectivamente.

Conclusión. La frecuencia de las mutaciones del gen *EGFR* en las muestras de sueros fue de 36.71% para la delección del *E746-A750* en exón 19 y 50.99% para *L858R* en exón 21. La distribución

de las mutaciones en muestras de biopsia CPNM resultó en 42.11% para cada mutación estudiada.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer pulmonar es un serio problema de salud pública, representa una de las principales causas de mortalidad. En México, ocupa la cuarta causa de muerte general por cáncer. Los pacientes hispanos con esta patología tienden a ser diagnosticados en etapas tardías de la enfermedad, en comparación con los de origen no hispano (1). La tasa de supervivencia no supera 10% en la mayoría de los países. 80% de los cánceres de pulmón pertenecen a la estirpe histológica carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), que incluye el carcinoma epidermoide, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes (2). Una de las estrategias que ha revolucionado el tratamiento personalizado del cáncer pulmonar, ha sido la identificación de características moleculares (mutaciones o amplificaciones génicas) que son responsables de la supervivencia tumoral y que han permitido tratamientos dirigidos contra blancos específicos que actúan de forma selectiva. El pronóstico de los pacientes cuyos tumores expresan estas alteraciones moleculares y son tratados con terapias específicas, es más favorable al de la población general con cáncer de pulmón. Una de las dianas terapéuticas para el CPNM es la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*, por sus siglas en inglés), que está activada en 43-83% de los pacientes. *EGFR* forma parte de la vía de señalización de varios procesos celulares críticos, como el crecimiento, la proliferación y la motilidad celulares, así como la organogénesis y angiogénesis. Además, se ha demostrado que tiene una función fundamental en la transformación y progresión tumoral (3). El gen *EGFR* (7p13-p12) se identificó como protooncogén, constituido por 28 exones que ocupan un segmento de 75 kb y codifican una proteína precursora de 1,210 aminoácidos con masa molecular de 170 kDa (4).

EGFR, es una glicoproteína transmembranal compuesta de un dominio extracelular amino-terminal para la unión de ligandos, una hélice transmembranal hidrófoba, un dominio citoplasmático con el dominio

tirosina-cinasa y una región carboxilo-terminal con residuos de tirosina y elementos reguladores del receptor. Cuando esta vía es activada, por unión de ligandos en el dominio extracelular, produce oligomerización del receptor que activa el dominio tirosina-cinasa y autofosforilación, de ambos dominios del receptor. De esta manera, se induce una cascada de señales que lleva a la proliferación celular, protección frente a apoptosis, mayor supervivencia y transcripción génica (5). La activación de este receptor supone, tanto un beneficio de proliferación como un freno a la apoptosis, al estimular rutas oncogénicas como la vía RAS/MAPK (2). Por consiguiente, los inhibidores de tirosina-cinasa (ITK), como Gefitinib (Iressa®), Erlotinib (Tarceva®) y Afatinib (Giotrif®), son utilizados en el tratamiento de CPNM ya que inhiben de forma irreversible al *EGFR*, interrumpiendo la señal de crecimiento y produciendo un efecto antitumoral (6,7).

Las células tumorales de CPNM pueden presentar mutaciones específicas en el gen *EGFR* que se comportan como elementos predictivos de respuesta a los fármacos ITK (3). Pacientes con tumores positivos a mutaciones en el gen *EGFR*, responden mejor y muestran mayor sobrevida con tratamientos ITK en comparación con pacientes que desarrollan tumores negativos a mutaciones específicas en *EGFR*, quienes responden solo en 10% (2). De esta manera, el tratamiento contra cáncer de pulmón ha mejorado, al implementarse dianas terapéuticas dirigidas al *EGFR*. La expresión de *EGFR* es 20 veces mayor en el tumor que lo normal y correlaciona con un peor pronóstico, que deriva en un mayor índice de proliferación y capacidad invasiva, así como en una reducción de la sobrevida (8). Dos mutaciones principales del gen *EGFR* ocupan 90% de todas las observadas en cáncer de pulmón. La primera del E746-A750, NM-005228.4 (*EGFR*): c.2235-2249delGGAATTAAGAGAAGC (p.Glu746-Ala750del, rs121913421), es una delección del nucleótido 9 al 24 en el exón 19 que comprende los codones 746-750 y corresponden de 45% a 50% de las mutaciones. La segunda, L858R, NM-005228.3(*EGFR*):c.2573T>G (p.Leu858Arg, rs121434568) es una mutación puntual en el nucleótido 2573 (CTG>CGG) en el exón 21, que

resulta en sustitución de leucina por arginina en el codón 858, que se encuentra hasta en 45% de las mutaciones en *EGFR* (9). Estas mutaciones aumentan la actividad de *EGFR* y confieren susceptibilidad al inhibidor, debido a cambios conformacionales que aumentan la sensibilidad de la célula mutada a las señales del *EGFR*. Cuando se administra un inhibidor, la activación del *EGFR* que es necesaria para la supervivencia celular, se interrumpe, provocando la muerte celular (10). El tratamiento con ITK en tumores positivos a mutación en *EGFR*, ha logrado una tasa de respuesta global superior al 80% como tratamiento de primera línea y ha alcanzado una supervivencia global que supera los 15.4 meses (8). La proporción de casos reportados con la mutación va dependiendo de la población analizada; el porcentaje más elevado se ha encontrado en Asia (40%), mientras que en la zona occidental del mundo la frecuencia es menor (5% a 20%) (8, 11).

La determinación de mutaciones del gen *EGFR* es considerado un valioso biomarcador para la aplicación de tratamientos ITK en pacientes con CPNM metastásico o quimioresistentes, quienes requieren monitoreo y seguimiento. Adicionalmente, se ha propuesto como un método no invasivo la determinación de mutaciones *EGFR* en ADN circulante, como una alternativa para evitar biopsias repetidas para monitoreo en la práctica clínica. La cantidad de tejido tumoral obtenido por biopsia es a menudo insuficiente, especialmente en CPNM avanzado, planteando la interrogante de si el ADN circulante puede ser utilizado como una biopsia líquida sustituta, para la detección no invasiva de las mutaciones de *EGFR*. Ensayos clínicos han demostrado consistencia entre muestras de tumor y de suero con una tasa de 79.7 a 92.9% (7, 12). Así mismo, un metaanálisis sugiere, que la sangre puede ser usada como sustituto de tejido tumoral para la determinación de mutaciones *EGFR* (13). Por otra parte, la presencia de éstas en tejido sano, puede indicar una predisposición genética para el desarrollo de cáncer de pulmón y/o un indicio temprano de carcinogénesis (5). Sin perder de vista, que estas dos mutaciones específicas de *EGFR* se asocian a una buena respuesta al tratamiento con ITK.

En la población de Yucatán, se desconoce la frecuencia de las mutaciones del gen *EGFR*, tanto en casos de CPNM como en muestras de personas sanas, información de relevancia para contribuir en la toma de decisión del tratamiento personalizado, así como para determinar la proporción de la población local que puede resultar beneficiada debido a la buena respuesta con ITK. El objetivo de este trabajo fue evaluar la frecuencia de las mutaciones del E746-A750 exón 19 y L858R exón 21 del gen *EGFR*, en muestras de biopsia de CPNM y en muestras de suero de población abierta de Yucatán.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 101 muestras de sangre periférica pertenecientes a sujetos voluntarios adultos no relacionados, que acudieron al banco de sangre del Hospital Regional sede Mérida, Yucatán. Se seleccionaron donadores sin manifestaciones de enfermedades crónico-degenerativas, con estudio de electrocardiograma normal y prueba de esfuerzo negativa; sin antecedente familiar de algún tipo de cáncer; con lugar de nacimiento en Yucatán, en al menos, dos generaciones. 86.14% fueron hombres y 13.86% mujeres con promedio de edad 46.2 ± 7.3 y media de peso, talla e IMC de 70.2 ± 12.5 kg, 1.62 ± 0.07 m y 26.9 ± 3.8 kg/m², respectivamente.

Los sujetos seleccionados manifestaron participación voluntaria mediante consentimiento informado. El procedimiento y selección de sujetos se llevó a cabo de acuerdo con las buenas prácticas, siguiendo los lineamientos éticos de la Declaración de Helsinki y manteniendo la confidencialidad de los participantes.

Se incluyeron 19 muestras de biopsia de carcinoma pulmonar no microcítico, mediante donación y autorización de la colección biológica del Departamento de Patología de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional "Dr. Ignacio García Téllez" del IMSS, Mérida, Yucatán. A partir de sus registros, se seleccionaron muestras de tejido embebido en parafina con diagnóstico citopatológico confirmado de CPNM de tipo adenocarcinoma en 100% de los casos,

independientemente de sexo y edad, nueve de las cuales procedían de pacientes del sexo masculino y 10 del femenino.

A partir de un 1 ml de sangre periférica se purificó el ADN genómico del suero, mediante el método de Bounce con solventes orgánicos. Para la determinación de las mutaciones *EGFR*, en muestras de parafina para biopsias de CPNM, se siguió un método directo para la amplificación por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aplicando el estuche comercial Phusion Human Specimen Direct PCR de la marca Thermo Scientific.

La identificación las mutaciones del E746-A750 exón 19 y L858R exón 21 del gen *EGFR*, se ejecutó mediante la técnica de PCR oligo-alelo específica, siguiendo el protocolo propuesto por Dahse *et al.*, (14), que propone para del E746-A750 exón 19, cuatro cebadores, dos externos (19P y 19Q) y dos internos complementarios (19A y 19B), en tres reacciones independientes de PCR: PQ que amplifica un fragmento de 444 pb como control interno de la reacción, AQ amplifica un fragmento de 325 pb en presencia del alelo normal o sin delección (alelo 1) y PB amplifica un fragmento de 134 pb en presencia del alelo mutado o con delección (alelo 0). En tanto que, para la detección de la mutación L858R exón 21, el protocolo de Dahse *et al.*, propone tres secuencias de cebadores, uno externo 21P y dos internos complementarios 21A y 21B para amplificar en dos reacciones independientes: 21P-A amplifica un fragmento de 137 pb específico para el alelo normal T; y 21P-B que amplifica un fragmento de 134 pb correspondiente al alelo mutante G (14). En todas las reacciones de PCR, se utilizó como control negativo una reacción sin ADN. Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% durante una hora a 120 voltios. Cabe mencionar que, para la mutación del E746-A750 exón 19, amplificaron 79 del total de 101 muestras de suero.

Se utilizó el programa SNPStats (<https://www.snpstats.net>) para determinar la distribución de las frecuencias genotípicas de acuerdo al equilibrio de las poblaciones según Hardy Weinberg; así como para estimar las frecuencias genotípicas y alélicas

para ambos grupos de muestras. Las frecuencias genotípicas encontradas para ambas mutaciones en *EGFR*, fueron comparadas estadísticamente con la frecuencia descrita para otras poblaciones usando tablas de contingencia en el paquete RxC (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/contingency.html>)

RESULTADOS

En las muestras de suero, se encontró para la mutación del E746-A750 exón 19, la presencia de dos genotipos, el homocigoto silvestre o sin delección (1/1) y el genotipo heterocigoto (1/0), siendo éste el más frecuente (73.42%). Es interesante destacar la ausencia del genotipo homocigoto mutante o con delección (0/0) en las muestras de suero. La frecuencia de la mutación por delección E746-A750 exón 19 fue 36.71% para la población estudiada. La distribución de las frecuencias genotípicas para la mutación del E746-A750 no se ajustaron al equilibrio de las poblaciones según el teorema Hardy-Weinberg ($p = 0.0001$), explicado debido a la ausencia de homocigotos con la mutación del E746-A750 (0/0). Para la mutación *L858R* exón 21 de *EGFR* se encontraron los tres genotipos esperados en las muestras de suero, siendo el genotipo heterocigoto (T/G) el más frecuente con 54.46%. La frecuencia para la mutación *L858R* (T>G) exón 21 fue 50.99%. La distribución de las frecuencias genotípicas para la mutación *L858R* en el gen *EGFR*, se ajustaron al equilibrio de Hardy-Winberg en las muestras de suero de la población general ($p = 0.43$) (**Cuadro 1**).

Para el grupo de muestras de biopsias CPNM, se encontraron los tres genotipos para la mutación del E746-A750 exón 19, siendo el más frecuente el genotipo heterocigoto con 63.16%. El genotipo homocigoto con delección (0/0) se encontró en 10.52% de las muestras de biopsia. La distribución de las frecuencias genotípicas para ambas mutaciones de *EGFR* en las muestras de biopsia, se ajustaron al equilibrio de las poblaciones Hardy Weinber ($p = 0.36$). La frecuencia de cada una de las mutaciones *EGFR* correspondió a 42.11% en las biopsias. Para la mutación *L858R* exón 21, se presentaron los tres genotipos esperados, para el heterocigoto T/G correspondió la mayor frecuencia con 73.68%.

La comparación de la distribución de las frecuencias genotípicas entre muestras de suero y las de biopsia, arrojó diferencias significativas para la mutación del E746-A750 ($p = 0.014$), debido a que el genotipo mutante (0/0) se encontró, únicamente, en las muestras de biopsia. En tanto, no se encontró diferencia significativa en la distribución alélica para la mutación del E746-A750, ni para las frecuencias genotípicas y alélicas para la mutación *L858R*, entre las muestras de biopsia CPNM y las de suero ($p = 0.538$).

La combinación genotípica TG/1-0 fue la más frecuente para ambos grupos de muestras, debiendo destacar que la combinación genética doble mutante (GG/0-0), es decir la presencia simultánea de homocigotos para ambas mutaciones en la misma muestra, no se encontró en ningún grupo de muestras estudiadas. De las nueve combinaciones genéticas esperadas, se mostraron ocho en las biopsias de CPNM y seis en las muestras de suero. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la comparación de la distribución de las frecuencias de las combinaciones genotípicas *EGFR* *L858R* / del E746-750 entre muestras de biopsia de CPNM y suero ($p = 0.120$).

DISCUSIÓN

El presente estudio contribuye al conocimiento sobre la frecuencia y distribución de las dos mutaciones del gen *EGFR* más relevantes e implicadas en la respuesta al tratamiento para cáncer de pulmón, la *L858R* en el exón 21 y la mutación por delección *E746-A750* en el exón 19, en un grupo de muestras de biopsia de pacientes con CPNM y de sueros de personas sanas. Las mutaciones en el gen *EGFR* se han descrito más frecuentemente en cáncer de pulmón que, en otro tipo, de manera que la identificación de mutaciones en el gen *EGFR* representa uno de los marcadores más predictivos para la aplicación de terapias ITK en CPNM (6). Particularmente, en la población estudiada se demostró la presencia de mutaciones en *EGFR* en ambos grupos de muestras, en las biopsias CPNM, 42.11% para cada mutación y para suero 36.71% con la delección E746-A750 y 50.99% para la *L858R*. De acuerdo con la distribución de las combinaciones

Cuadro 1
Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones en el gen *EGFR* en muestras de suero y biopsias de carcinoma pulmonar

Mutación <i>EGFR</i>	Muestras de suero	Biopsias CPNM	Suero versus biopsias
	n (%)	n (%)	Valor de <i>p</i>
Exón 19 del E746-A750	n=79	n=19	
Genotipos			
Homocigoto sin delección (1/1)	21 (26.58)	5 (26.32)	0.014
Heterocigoto (0/1)	58 (73.42)	12 (63.16)	
Homocigoto con delección (0/0)	0 (0)	2 (10.52)	
Alelos			
Sin delección (1)	100 (63.29)	22 (57.89)	0.538
Con delección (0)	58 (36.71)	16 (42.11)	
HWE (<i>p</i>)	(0.0001)	(0.36)	
Exón 21 L858R T>G	n=101	n=19	
Genotipos			
Homocigoto silvestre (T/T)	22 (21.78)	4 (21.05)	0.160
Heterocigoto (T/G)	55 (54.46)	14 (73.68)	
Homocigoto mutante (G/G)	24 (23.76)	1 (5.27)	
Alelos			
Alelo T	99 (49.01)	22 (57.89)	0.315
Alelo G	103 (50.99)	16 (42.11)	
HWE (<i>p</i>)	(0.43)	(0.06)	

genotípicas solamente 5.26% de las biopsias de CPNM y 2.53% de los sueros, son negativos para la presencia de al menos una mutación de las analizadas, lo que sugiere que, en la población de la región de Yucatán, un número importante de pacientes, mayor a 90%, puede resultar beneficiado, con buen pronóstico y respuesta favorable con la selección de un tratamiento personalizado con ITK, basado en el genotipo *EGFR*, contribuyendo además con un aumento en la tasa de sobrevivencia y calidad de vida, con menores efectos secundarios.

Así mismo, los resultados aportan información sobre las expectativas de detección de mutaciones de *EGFR* en suero; por un lado, estima la proporción de sujetos de la población general que tendrían una respuesta favorable a ITK y por otro, aporta evidencia para la detección de las mutaciones *EGFR* como una alternativa ante la limitación de obtención de biopsia o la cantidad de material biológico suficiente para el estudio. El análisis en tejido tumoral sigue siendo el método recomendado para la detección de la presencia de

Cuadro 2.
Combinaciones genotípicas de las mutaciones *EGFR* *L858R* / *del E746-A750* en muestras de suero y biopsias de carcinoma pulmonar

Combinación genotípica <i>EGFR</i>	Biopsias CPNM	Muestras de suero
<i>L858R/del E746-750</i>	n=19 (%)	n=79 (%)
GG / 0-0	0	0
GG / 1-0	1 (5.26)	17 (21.52)
GG / 1-1	0	2(2.53)
TG / 0-0	1 (5.26)	0
TG /1-0	9 (47.37)	34 (43.04)
TG / 1-1	4 (21.06)	16 (20.25)
TT / 0-0	1 (5.26)	0
TT / 1-0	2 (10.53)	8 (10.13)
TT / 1-1	1 (5.26)	2 (2.53)

mutaciones de *EGFR*. Un reporte previo demostró la viabilidad de utilizar ADN circulante libre a partir de muestras de sangre de pacientes con CPNM avanzado como un sustituto para biopsias de tejido. A 78% de los pacientes se le detectaron mutaciones de *EGFR* en ADN circulante libre. El tiempo medio de supervivencia global fue menor en los pacientes con la mutación *L858R* que en aquellos con la delección en el exón 19 en ADN circulante (13.7 versus 30 meses). Para los pacientes con la mutación *L858R* en biopsia, el tiempo medio de supervivencia global fue de 13.7 meses y 27.7 meses para aquellos en los que no se detectó la mutación circulante. Para los pacientes con mutaciones de *EGFR* en ADN circulante, sólo el tratamiento con erlotinib fue un predictor independiente de la enfermedad para la supervivencia libre de progresión. Se colocó a la mutación *L858R* en *EGFR* como un factor pronóstico y predictivo de la supervivencia en determinados pacientes, con niveles de sensibilidad de 78% y especificidad de 100%, así como la importancia de la biopsia líquida en la monitorización de los pacientes (15). Ensayos clínicos han apoyado la consistencia entre las muestras de biopsia de tumor y suero con un índice aproximado de 79.7 a 92.9% (7,12,15). Así mismo, un metaanálisis ha evidenciado que la sangre es un sustituto del tejido tumoral para detectar mutaciones en *EGFR* (13).

La frecuencia de cada mutación *EGFR* estudiada, se encontró en 42.11%, de las biopsias, siendo significativamente diferente a lo descrito para otras poblaciones étnicamente relacionadas de México, Colombia y Costa Rica, que determinó 55.9% para la delección *E746-A750* del exón 19 y 23.9% para la *L858R* del exón 21 (3). El Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) de la Ciudad de México ha descrito una frecuencia de 63.9% para la mutación del exón 19 y 26% para la del exón 21 (16). También hay que tomar en cuenta, que el INCAN atiende a pacientes de todo el país, razón que podría aumentar ligeramente la frecuencia observada. En pacientes mexicanos sometidos a terapia dirigida con ITK en primera, segunda y tercera línea de tratamiento, los resultados fueron favorables, ya que la tasa de respuesta global fue de 62%, la supervivencia libre de progresión de 15.1 meses y la supervivencia global alcanzó los 16.4 meses, que es mayor de lo que se reporta para la quimioterapia (16). Las industrias farmacéuticas, han demostrado que los tratamientos con terapia dirigida, son más eficientes y menos tóxicos que la quimioterapia en pacientes que presentan mutaciones en el gen *EGFR*. La mediana de supervivencia libre de progresión es, aproximadamente, de 14 meses con fármacos ITK frente a 4.6 meses para la quimioterapia, también la tasa de respuesta objetiva es superior, con 83%

para los ITK y 36% para quimioterapia (2). En otras poblaciones, no relacionadas étnicamente, se han descrito frecuencias significativamente menores; como en Francia con 4.9% para la mutación en el exón 19 y 5.9% para la del exón 21 (17). La frecuencia de mutaciones en el gen *EGFR* muestra diferencias significativas entre subgrupos étnicos y raciales, teniendo la mayor frecuencia los asiáticos no latinos (57%), seguido de latinos (23%), no latinos blancos (22%) y no latinos negros (10%) (18).

El análisis de las combinaciones genotípicas en el gen *EGFR* (L858R/delE746-A750), muestra que los genotipos más severos, es decir las combinaciones con homocigotos mutantes de la delección, sólo están presentes en las biopsias de CPNM, lo cual sugiere la inestabilidad genómica característica de un tejido tumoral. Estos genotipos severos, representan un indicador en la identificación en tejido circulante de pacientes afectados con CPNM, para la óptima aplicación de la terapia con ITK y que a su vez resaltan la diferencia en marcadores *EGFR* circulantes entre sujetos afectados y sanos, como lo demuestra este estudio por la ausencia de tales combinaciones genotípicas en muestras de suero de sujetos sanos voluntarios de población abierta. La limitación en el tamaño de muestra de las biopsias CPNM, no tuvo efecto en la detección de las dos mutaciones *EGFR*, debido a que la selección de las muestras de estudio estuvo dirigida en la caracterización clínica y citopatológica idónea de CPNM, ya que, a pesar del bajo número de muestra, se detectaron ambas mutaciones y ocho de nueve combinaciones genotípicas. La combinación genotípica de dobles mutantes GG / 0/0, no se presentó en ningún tejido, abriendo la posibilidad, de que ésta no sea compatible con la vida.

En conclusión, la frecuencia de las mutaciones del gen *EGFR* en la población general local de Yucatán, estimada a partir de muestras de sueros, fue de 36.71% para la delección del E746-A750 en el exón 19 y 50.99% para L858R en el exón 21. En tanto que, la distribución de las mutaciones en muestras de biopsia de cáncer de pulmón, resultó en 42.11% para cada mutación *EGFR*. El genotipo homocigoto para la delección del exón 19 (0/0) solo se presentó

en biopsia y ausente en muestras de suero de sujetos sanos, sugiriendo que la severidad de las mutaciones puede reflejar la inestabilidad genómica propia del tejido tumoral. Las combinaciones genotípicas obtenidas en el gen *EGFR* con presencia de al menos una mutación sugiere que, aproximadamente, 90% de la población estudiada, tendría buen pronóstico y buena respuesta al tratamiento con ITK.

AGRADECIMIENTOS:

A DIMYGEN Laboratorio y a la Fundación Educación Superior-Empresa (FESE) por el financiamiento del proyecto de vinculación Núm. CIRB-2014-0007. Los autores agradecen al Departamento de Patología de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional “Dr. Ignacio García Téllez” del IMSS, Mérida, Yucatán por las facilidades prestadas para análisis de las biopsias.

REFERENCIAS

1. Arrieta O, Ramirez-Tirado LA, Báez-Saldaña R, Peña-Curiel O, Soca-Chafre G, Macedo-Perez EO. Different mutation profiles and clinical characteristics among Hispanic patients with non-small cell lung cancer could explain the “Hispanic paradox”. *Lung Cancer*. 2015 Nov; 90(2): 161-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.08.010>.
2. García-Fonsillas J, Garrido P, Gómez J, Palacios J, Tarón M. Recomendaciones para la determinación de las mutaciones del gen *EGFR* en el carcinoma de pulmón no microcitico. *Rev Esp Pat*. 2011 Ene-Mar; 44(1): 17-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patol.2011.02.003>.
3. Arrieta O, Cardona A, Corrales L, Campos-Parra AD, Sánchez-Reyes R, Amieva-Rivera E, et al. The impact of common and rare *EGFR* mutations in response to *EGFR* tyrosine kinase inhibitors and platinum-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2015 Feb; 87(2): 169-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.12.009>.
4. Nair P. Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression. *Current Science*. 2005 Mar; 88 (6): 890-5.
5. Zerecero-Carreón O, Valle-Mendiola A, Weiss-Steider B, Soto-Cruz I. El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y su relación con el cáncer. *Revista especializada en Ciencias de la Salud*. 2012 May; 15(1): 15-25.
6. Taus A, Vollmer I, Arriola E. Mutaciones de sensibilidad y resistencia del gen receptor del factor de crecimiento

- epidérmico (*EGFR*) en el cáncer de pulmón de célula no pequeña: una realidad clínica. Arch Bronconeumol. 2011 Agos; 47(2): 103-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2010.06.013>.
7. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, et al. Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Serum as a Predictor of the Response to Gefitinib in Patients with Non-Small-Cell Lung. Clin Cancer Res. 2006 July; 12(13): 3915-21. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2324>.
 8. Otero J, Cardona A, Reveiz L, Campo F, Carranza H, Vargas C; et al. Supervivencia en pacientes con adenocarcinoma de pulmón metastásico y registro de las primeras mutaciones en el receptor para el factor de crecimiento epidérmico documentado en Colombia. Acta Med Colomb. 2009 Abril-Junio; 34(2): 55-65.
 9. Tu HY, Ke E-E, Yang JJ, Sun YL, Yan HH, Zheng MY, et al. A comprehensive review of uncommon *EGFR* mutations in patients with non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2017, Dic; 114: 96-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.11.005>.
 10. Zhen Z, Jin X, Lin B, Su H, Chen H, Feo S et al. Efficacy of Second-line Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Metastatic Advanced Non-small-cell Lung Cancer Harboring Exon 19 and 21 *EGFR* Mutations. J Cancer. 2017 Feb; 8(4): 597-605. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.16959>.
 11. Graham R, Treece A, Lindeman N, Vasalos P, Shan M, Jennings L, et al. Worldwide frequency of commonly detected *EGFR* mutations. Arch Pathol Lab Med. 2018 Feb; 142(2): 163-7. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0579-CP>.
 12. Kimura H, Nishikawa S, Koba H, Yoneda T, Sone T, Kasahara K. A Rapid and Sensitive Method for Detection of the T790M Mutation of *EGFR* in Plasma DNA. In: Gahan P, Fleischhacker M., Schmidt B. (eds) Circulating Nucleic Acids in Serum and Plasma – CNAPS IX. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer, Cham 2016.vol 924. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-42044-8_31.
 13. Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of *EGFR* mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2014 Sep; 9(4): 6269. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep06269>.
 14. Dahse R, Berndt A, Dahse AK, Kosmehl H. Two Two allele-specific PCR assays for screening epidermal growth factor receptor gene hotspot mutations in lung adenocarcinoma. Mol Med Rep. 2008 Jan-Feb; 1(1): 45-50. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.1.1.4>.
 15. Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, de Aguirre I, Melloni B, Cardenal F, et al. Association of *EGFR* L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. JAMA Oncol. 2015 May; 1(2): 149-57. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2014.257>.
 16. Campos-Parra AD, Cruz-Rico G, Arrieta O. Genotipificación en cáncer de pulmón de células no pequeñas. GAMO. 2012 Ene; 11(1): 35-44.
 17. Naderi S, Ghorra C, Haddad F, Kourie H, Rassy M, Karak F, et al. *EGFR* mutation status in Middle Eastern patients with non-squamous non-small cell lung carcinoma: A single institution experience. Cancer Epidemiol. 2015 Dic; 39(6): 1099-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.08.016>.
 18. Lopez-Chavez A, Thomas A, Evbuomwan M, Xi L, Chun G, Vidaurre T, et al. *EGFR* mutations in Latinos from the United States and Latin America. J Glob Oncol. 2016 Mar; 2(5): 259-67. DOI: <https://doi.org/10.1200/JGO.2015.002105>.